

Aus dem Institut für klinische Chemie
(Direktor: Prof. Dr. med. R. Junker)
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**Differentielle Glykosylierung des IgG-Moleküls und ihre Krankheitsassoziationen bei
Patienten mit Multipler Sklerose:
Eine retrospektive Fall-Kontroll-Studie**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

Julia Kreipe

aus Hildesheim

Kiel 2020

1. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. Frank Leypoldt

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Thorsten Bartsch

Tag der mündlichen Prüfung: 21.09.2021

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 18.06.2021

gez.: Prof. Dr. rer. nat. Burkhard Brandt

(Vorsitzender der Prüfungskommission)

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis IV

<u>1</u>	<u>Einleitung.....</u>	<u>1</u>
1.1	<u>Definition und Epidemiologie der Multiplen Sklerose</u>	<u>1</u>
1.2	<u>Ätiologie der Multiplen Sklerose</u>	<u>1</u>
1.3	<u>Klassifikation und Klinik</u>	<u>1</u>
1.4	<u>Diagnosekriterien bei der Multiplen Sklerose</u>	<u>3</u>
1.5	<u>Pathogenese der Multiplen Sklerose</u>	<u>4</u>
1.6	<u>Die Rolle von Autoantikörpern bei der Multiplen Sklerose.....</u>	<u>5</u>
1.7	<u>Therapie der Multiplen Sklerose</u>	<u>7</u>
1.8	<u>Welche Bedeutung haben Biomarker bei der Multiplen Sklerose?.....</u>	<u>7</u>
1.9	<u>Definition und physiologische Funktion der IgG-Fc-Glykosylierung</u>	<u>8</u>
1.10	<u>Die Bedeutung der IgG-Fc-Glykosylierung bei systemischen Autoimmunsyndromen und bei der Multiplen Sklerose</u>	<u>11</u>
1.11	<u>Fragestellung dieser Studie.....</u>	<u>11</u>
<u>2</u>	<u>Methoden.....</u>	<u>12</u>
2.1	<u>Einschlusskriterien und Patientenauswahl der Kieler Kohorte (Discovery Kohorte)</u>	<u>12</u>
2.2	<u>Patientenauswahl der Hamburger Kohorte (Validations-Kohorte).....</u>	<u>13</u>
2.3	<u>Analyse der IgG-Fc-Glykosylierung mittels High Performance Liquid Chromatography.....</u>	<u>13</u>
2.4	<u>Statistische Auswertung</u>	<u>15</u>
<u>3</u>	<u>Ergebnisse: Deskriptive Beschreibung des Patienten- und Kontrollkollektivs .</u>	<u>16</u>
<u>4</u>	<u>Ergebnisse der Kieler Kohorte (Discovery-Kohorte).....</u>	<u>20</u>
4.1	<u>Unterschiede der IgG-Fc-Glykosylierung i.L. und i.S. zwischen Patienten und Kontrollen</u>	<u>20</u>
4.2	<u>Vergleich des IgG-Fc-Glykosylierungsmusters zwischen den MS- Verlaufsformen: Erstmanifestation, RRMS, PPMS.....</u>	<u>22</u>
4.3	<u>Geschlechtsabhängige Veränderungen des IgG-Fc-Glykosylierungsmusters.....</u>	<u>23</u>
4.4	<u>Altersabhängige Veränderungen des IgG-Fc-Glykosylierungsmusters</u>	<u>24</u>
4.5	<u>Veränderungen des IgG-Fc-Glykosylierungsmusters in Abhängigkeit von Erkrankungsdauer und Behinderungsgrad</u>	<u>26</u>
4.6	<u>Veränderungen der IgG-Fc-Glykosylierung i.L. in Zusammenhang mit weiteren Liquorparametern.....</u>	<u>29</u>
4.7	<u>Zusammenhang der IgG-Fc-Glykosylierung mit Schubereignissen</u>	<u>29</u>

4.8	<u>Zusammenhang der IgG-Fc-Glykosylierung mit MRT-Läsionen.....</u>	31
4.9	<u>Zusammenhang der IgG-Fc-Glykosylierung mit einer Therapie vor dem Zeitpunkt der Liquorpunktion.....</u>	31
5	<u>Ergebnisse der Hamburger Kohorte (Validations-Kohorte).....</u>	32
5.1	<u>Unterschiede der IgG-Fc-Glykosylierung zwischen Patienten und Kontrollen ..</u>	32
5.2	<u>Vergleich der IgG-Fc-Glykosylierung zwischen RRMS- und PPMS-Patienten.</u>	33
5.3	<u>Vergleich der Kieler Discovery- und der Hamburger Validationskohorte</u>	34
5.4	<u>Altersabhängige Veränderungen des IgG-Fc-Glykosylierungsmusters</u>	35
5.5	<u>Geschlechtsspezifische Unterschiede des IgG-Fc-Glykosylierungsmusters.....</u>	35
5.6	<u>Veränderungen des IgG-Fc-Glykosylierungsmusters im Zusammenhang mit Erkrankungsdauer und Behinderungsgrad</u>	36
6	<u>Diskussion</u>	37
6.1	<u>Zusammenfassung der Hauptergebnisse</u>	37
6.2	<u>Wodurch können die unterschiedlichen Beobachtungen zwischen der Kieler und der Hamburger Kohorte bedingt sein?</u>	37
6.3	<u>Wie sind die krankheitsunabhängigen Veränderungen der IgG-Fc-Glykosylierung in Zusammenhang mit Alter und Geschlecht zu bewerten?.....</u>	40
6.4	<u>Wie sind die beobachteten Unterschiede zwischen MS-Patienten und Kontrollen zu bewerten?.....</u>	41
6.5	<u>Welche Relevanz haben die beobachteten Unterschiede zwischen verschiedenen MS-Verlaufsformen, insbesondere zwischen RRMS und PPMS?</u>	41
6.6	<u>Welche Schlussfolgerungen lassen die beobachteten Zusammenhänge der IgG-Fc-Glykosylierung mit klinischen Parametern zu?</u>	43
6.7	<u>Welche Relevanz haben die beobachteten Veränderungen des IgG-Fc-Glykosylierungsmusters im Serum für das Verständnis der MS-Pathophysiologie und die Planung weiterer Studien?.....</u>	51
6.8	<u>Limitationen: Welche Limitationen birgt die Art der Patientenrekrutierung?</u>	52
6.9	<u>Limitationen: Welche Limitationen bergen die technischen Messmethoden?</u>	53

<u>7</u>	<u>Ausblick.....</u>	<u>54</u>
<u>8</u>	<u>Zusammenfassung und Schlussfolgerung</u>	<u>56</u>
<u>9</u>	<u>Literaturverzeichnis</u>	<u>58</u>
<u>10</u>	<u>Abbildungsverzeichnis</u>	<u>64</u>
<u>11</u>	<u>Tabellenverzeichnis</u>	<u>68</u>
<u>12</u>	<u>Anhang.....</u>	<u>69</u>
<u>13</u>	<u>Danksagung</u>	<u>82</u>
<u>14</u>	<u>Veröffentlichungen.....</u>	<u>83</u>

Abkürzungsverzeichnis

CED = chronisch-entzündliche Darmerkrankungen

CIS = klinisch isoliertes Syndrom

EDSS = expanded disability status scale

Fab = Antigen-bindendes-Fragment von IgG

Fc = Fragment crystallisable von IgG

FcγRs = Fcγ-Rezeptoren

G0-IgG = agalaktosyliertes und asialyliertes IgG

i.L. / i.S. = im Liquor / im Serum

Ig = Immunglobuline

IgG, IgA, IgM = Immunglobulin G, A, M

IVIG = intravenöse Immunglobuline

LPZP = Zeitpunkt der Entnahme von Liquor und Serum

MS = Multiple Sklerose

MSSS = multiple sclerosis severity score

OKB = oligoklonale Banden

PPMS = primär chronisch-progrediente MS

RRMS = schubförmig-remittierende MS

Sial-IgG = sialyliertes IgG

SPMS = sekundär chronisch-progrediente MS

Term gal-IgG = terminal galaktosyliertes Ig

1 Einleitung

1.1 Definition und Epidemiologie der Multiplen Sklerose

Die Multiple Sklerose (MS) ist eine chronische entzündlich-degenerative ZNS-Erkrankung, bei der es an verschiedenen Lokalisationen des gesamten ZNS zu Entzündung und einer folgenden Vernarbung kommt. Sie ist eine der häufigsten Ursachen für eine nichttraumatisch bedingte Behinderung junger Menschen. Das Hauptmanifestationsalter liegt zwischen dem 20.-40. Lebensjahr. Frauen erkranken 2-3 mal häufiger als Männer. Die Zahl der Betroffenen weltweit wird auf 2,3 Millionen geschätzt und ist am höchsten in Nordamerika (140 pro 100.000 Einwohner) und Europa (108 pro 100.000 Einwohner). (Multiple Sclerosis International Federation 2013). Die Anzahl MS-Erkrankter in Deutschland lag im Jahr 2014 bei 200.000, was einer Prävalenz von 289 pro 100.000 entspricht (Petersen et al. 2014, S.995). Neben hohen direkten und indirekten Kosten für Krankenkassen und Gesellschaft, bedeutet die Diagnose MS für die Betroffenen starke körperliche, psychische und soziale Beeinträchtigungen, eine verminderte Lebenserwartung und dadurch eine starke Verminderung der Lebensqualität.

1.2 Ätiologie der Multiplen Sklerose

Die Ursachen für die Entstehung der MS sind bis heute nicht genau bekannt. Sie gilt als multifaktoriell bedingt. Eine höhere Prävalenz unter Weißen gegenüber Farbigen und ein um 20-40-fach gesteigertes Erkrankungsrisiko unter Verwandten MS-Erkrankter weisen auf einen genetischen Einfluss auf die Krankheitsentstehung hin. Es konnten mehr als 100 assoziierte Genregionen identifiziert werden, die größtenteils dem Immunsystem zugeordnet werden. Auf der anderen Seite scheinen Umweltfaktoren zu der Pathogenese der MS beizutragen. Wichtige Umweltfaktoren, die mit einem erhöhten Erkrankungsrisiko assoziiert sind, sind ein Vitamin-D-Mangel, Rauchen und Virusinfektionen, besonders Epstein-Barr-Virus-Infektionen. (Belbasis et al. 2015, S.270)

1.3 Klassifikation und Klinik

Den Erkrankungsverlauf betreffend gilt, dass bei etwa einem Drittel der Betroffenen lebenslang keine wesentlichen Behinderungen auftreten. Ein Drittel kann trotz neurologischer Defizite, die das alltägliche Leben beeinträchtigen, ein normales Leben mit Berufstätigkeit und Familie führen. Ein Drittel leidet unter starken Behinderungen, die zu Berufsunfähigkeit, Verlust der Gehfähigkeit und bis zur vollständigen Pflegebedürftigkeit führen. Häufige Todesursachen sind Sekundärkomplikationen wie eine Aspirationspneumonie, Dekubitus, Harnwegsinfektionen oder Stürze. (Wiendl et al. 2012, S. 633) Abhängig von der Krankheitsprogredienz und – Aktivität werden unterschiedliche Verlaufsformen voneinander abgegrenzt (Abb. 1): das klinisch isolierte Syndrom (CIS), die schubförmig-remittierende MS (RRMS), die sekundär chronisch-progrediente MS (SPMS) und die primär chronisch-progrediente MS (PPMS). Als CIS wird die erste klinische Präsentation eines demyelinisierenden ZNS-Ereignisses

bezeichnet. Die Symptome und Befunde sind charakteristisch für eine entzündlich-demyelinisierende Erkrankung und deuten auf eine MS hin. Die für die Diagnosestellung erforderlichen Kriterien der zeitlichen Dissemination (siehe Abschnitt 2.4) werden noch nicht erfüllt. Wenn im weiteren Verlauf die Diagnose MS gestellt wird, kann das CIS rückblickend als Erstereignis der MS verstanden werden. Die RRMS, die bei 85% der Patienten auftritt, wird definiert durch das Auftreten klinisch klar abgrenzbarer Erkrankungsschübe mit klinischer Verschlechterung, auf die eine Phase der Erholung mit oder ohne komplette Remission folgt. Eine Krankheitsprogression findet im Intervall zwischen den Schüben nicht statt. (Wiendl et al. 2012, S. 631-632) Ein Schub ist definiert als abgrenzbar neu aufgetretene oder sich deutlich verschlechternde klinische Symptomatik, die mindestens 24 Stunden besteht und nicht im Rahmen eines Infektes auftritt. Als separate Schübe werden 2 Schübe bezeichnet, zwischen denen mindestens 30 Tage liegen. (McDonald et al. 2001, S.122) Ein Schub dauert meistens 1-3 Wochen, wobei Symptome auch residuell zurückbleiben können. Die Schubrate liegt vor allem in der Frühphase bei 0,5-1,3/Jahr. (Wiendl et al. 2012, S. 632) SPMS und PPMS sind chronische Verlaufsformen, bei denen die neurologischen Defizite fortlaufend zunehmen. Die SPMS entwickelt sich bei etwa 50% der Patienten mit zunächst schubförmig-remittierendem Verlauf nach 15-20 Jahren. Die Schubsymptomatik bildet sich häufig nur noch inkomplett zurück und es kommt zu einer schleichenden Progression der Behinderung. Bei 15% der Patienten tritt von Beginn an eine stetige Progredienz neurologischer Defizite mit unterschiedlich starker Ausprägung und mit oder ohne aufgelagerte Schübe auf, was als PPMS bezeichnet wird. (Wiendl et al. 2012, S. 632)

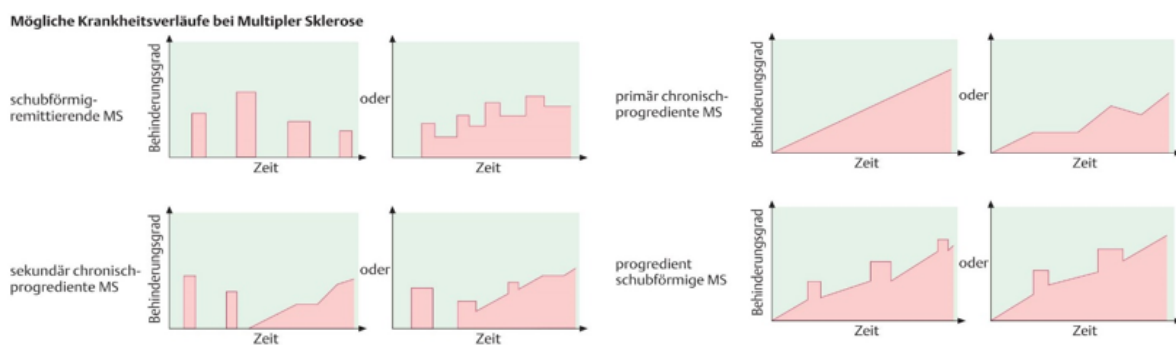


Abb. 1: Unterschiedliche Erkrankungsverläufe bei MS. Darstellung der Dynamik des Behinderungsgrads über die Zeit. (Limmroth, V. und Sindern, E. 2004, S.17)

Aus einem weiten Spektrum an unterschiedlichen klinischen Verläufen heben sich Patienten mit besonders mildem oder selten besonders schwerem klinischem Verlauf hervor. Es werden Verläufe bei Patienten beobachtet, die nach 15 Jahren volle Funktionalität in allen neurologischen Systemen aufweisen, oder aber Erkrankungsverläufe mit rascher Progression, die zu starken Behinderungen in multiplen neurologischen Systemen und teilweise sogar zum Tod innerhalb kurzer Zeit führen. (Lublin und Reingold 1996, S. 909) Die klinische Manifestation, der Erkrankungsverlauf, die

zugrundeliegenden pathophysiologischen Mechanismen und das therapeutische Ansprechen sind nicht nur zwischen RRMS-, SPMS- und PPMS-Patienten, sondern auch innerhalb dieser Gruppen sehr heterogen. Das „Krankheitssyndrom MS“ beinhaltet vermutlich verschiedene Erkrankungssubtypen, welche bisher klinisch nicht differenzierbar sind. Möglicherweise gibt es innerhalb dieser Subtypen eigene charakteristische pathophysiologische Mechanismen, eine ähnliche Prognose und ein ähnliches Therapieansprechen. (Comabella und Montalban 2014, S. 122)

Häufige Erstmanifestationen sind die Opticusneuritis und Sensibilitätsstörungen mit Parästhesien, Hypästhesien und aufgehobenem Lage- und Vibrationssinn. Motorische Störungen treten in Form spastischer Paresen auf. Typisch sind eine asymmetrische spastische Paraparese und in späteren Stadien oft eine progrediente Gehverschlechterung. Typisch ist außerdem das Auftreten zerebellärer Störungen, sowie vegetativer Störungen in Form von Blasenentleerungsstörungen, Stuhlinkontinenz und sexuellen Funktionsstörungen. Auch die Kognition kann mit Konzentrations- und Aufmerksamkeitsstörungen, Verlangsamung und seltener demenzieller Entwicklung betroffen sein. Viele Patienten leiden unter verminderter Leistungsfähigkeit, rascher Erschöpfbarkeit und ausgeprägter Müdigkeit, der sogenannten Fatigue. (Wiendl et al. 2012, S. 625, S.632) Wichtige Determinanten des Krankheitsverlaufs sind die Häufigkeit, Schwere und Dauer der Schübe und die Akkumulation von Funktionsstörungen zu einem immer weiter steigenden Behinderungsgrad. Dieser wird anhand der expanded disability status scale (EDSS), eines Skalensystems zur systemischen Erfassung der Behinderung von MS-Patienten, gemessen. (Kurtzke 1983). Eine weitere Methode zur Erfassung des individuellen Schweregrades ist der multiple sclerosis severity score (MSSS), der sich aus dem Verhältnis des vorliegenden EDSS-Wertes zu der Erkrankungsdauer ergibt. (Roxburgh et al. 2005)

1.4 Diagnosekriterien bei der Multiplen Sklerose

Anamnestische Hinweise auf zurückliegende Schübe und die klinische Objektivierung zentraler neurologischer Defizite führen zu der Verdachtsdiagnose einer entzündlich-demyelinisierenden ZNS-Erkrankung. Daraufhin werden ein kraniales und spinales MRT und Liquordiagnostik durchgeführt. Es zeigen sich typischerweise multilokuläre Schädigungen der weißen und grauen Substanz supra- und infratentoriell und spinal. Die Läsionen sind hyperintens in der T2/FLAIR-Sequenz und iso- bis leicht hypointens in der T1-Wichtung, wobei die akut entzündlichen Läsionen ein Kontrastmittelenhancement aufweisen. (Wiendl et al. 2012, S. 626-629) Ein typischer Liquorbefund zeigt eine leichte lymphomonozytäre Pleozytose mit 5-30 Zellen/ μ l, ein normwertiges oder leicht erhöhtes Gesamtprotein, einen normwertigen Glucose- und Laktatgehalt, eine intrathekale Immunglobulinsynthese in Form von oligoklonalen Banden oder dem Nachweis einer quantitativen IgG-Synthese im Reiber-Diagramm (siehe Abschnitt 2.6) und eine positive MRZ-Reaktion. (Wiendl et al. 2012, S. 629-631)

Die McDonald-Kriterien ermöglichen die Diagnosestellung der MS nach Ausschluss von Differenzialdiagnosen. Nach den Revisionen der McDonald-Kriterien von 2010 und den MAGNIMS-Leitlinien von 2016 müssen für die Diagnosestellung einer RRMS Kriterien der örtlichen und zeitlichen Dissemination auf der Basis von Anamnese, klinischem Befund und MRT-Bildgebung erfüllt sein. Eine örtliche Dissemination bedeutet die Entwicklung von MS-Läsionen in unterschiedlichen ZNS-Regionen, was sich entweder klinisch oder bildgebend durch die Verteilung der Läsionen im MRT zeigt. Es müssen mindestens 1 Läsion in 2 typischen Bereichen vorkommen: periventrikulär (hier mindestens 3 Läsionen), kortikal bzw. juxtakortikal, infratentoriell, spinal oder in den Nn.optici. Eine zeitliche Dissemination zeigt sich klinisch durch einen 2. Schub oder im MRT entweder durch den gleichzeitigen Nachweis von Kontrastmittel-anreichernden und nicht-anreichernden Läsionen oder durch ein Verlaufs-MRT mit einer neu aufgetretenen Läsion. (Filippi et al. 2016, S. 292-295) Positive oligoklonale Banden (OKB) und ein erhöhter IgG-Index (siehe Abschnitt 2.6) unterstützen die Diagnose. Für die Diagnose PPMS gelten andere Kriterien als für RRMS. Es muss ein Krankheitsverlauf von mindestens 1 Jahr vorliegen und 2 von 3 weiteren Kriterien erfüllt sein: Nachweis einer zerebralen örtlichen Dissemination mit mindestens 1 Läsion infratentoriell, kortikal bzw. juxtakortikal oder periventrikulär, der Nachweis einer spinalen örtlichen Dissemination mit mindestens 2 spinalen Läsionen und ein Liquorbefund mit Nachweis liquorspezifischer OKB. (Thompson et al. 2018, S. 166)

1.5 Pathogenese der Multiplen Sklerose

Die Pathogenese der MS ist bis heute noch nicht gänzlich verstanden. Nach dem heutigen Stand der Forschung setzen bei der MS autoimmunologische Prozesse im systemischen Immunkompartiment eine Entzündungskaskade in Gang. Potenziell autoreaktive T-Zellen werden in der Peripherie aktiviert, die nach dem Prinzip des molekularen Mimikry spezifisch für Myelinantigene im ZNS sind. Vorhanden sind diese auch bei Gesunden, und werden normalerweise von peripheren Toleranzmechanismen kontrolliert. Möglicherweise führt die Kombination aus genetischen Veränderungen, wie HLA-Varianten, und dem Kontakt zu Umweltfaktoren zu einer Umstellung des Immunsystems von einem Zustand der Selbsttoleranz in einen Entzündungsmodus. (Dendrou et al. 2015, S. 548) Entzündungszellen- und mediatoren migrieren über die Blut-Hirn-Schranke in das ZNS und verursachen innerhalb von herdförmigen Läsionen (MS-Läsionen, Plaques) Entzündung, Demyelinisierung und axonale Degeneration mit folgender Atrophie. (Gran et al. 1999) Je nach Größe und Lokalisation verursachen die Läsionen unterschiedliche neurologische Ausfallerscheinungen. Im frühen Verlauf der Erkrankung führen entzündliche Prozesse zu der meist schubförmigen neurologischen Symptomatik, während im späteren Krankheitsverlauf und bei der PPMS bereits von Beginn an neurodegenerative Prozesse im Vordergrund stehen. (Dendrou et al. 2015, S. 554)

Die vor allem perivaskulär gelegenen MS-Läsionen werden makroskopisch und im MRT sichtbar. Die Art und das Ausmaß der entzündlichen Prozesse und die Größe, Verteilung und Pathologie der Plaques

variieren. Lucchinetti et al. untersuchten im Jahr 2000 eine große Zahl an Autopsien und Biopsien von aktiven Läsionen bei MS-Patienten histopathologisch. Die Läsionen konnten in 4 verschiedene Muster der Gewebeschädigung eingeteilt werden. Die pathologischen Muster der Läsionen unterschieden sich zwischen den Patienten, aber bei einzelnen Patienten waren alle aktiven Läsionen einem Schädigungsmuster zuzuordnen. (Lucchinetti et al. 2000, S.709-712) Die Autoren vertreten daher die Auffassung, dass bei MS Subgruppen mit unterschiedlichen pathophysiologischen Mechanismen der Demyelinisierung und möglicherweise mit unterschiedlichem Ansprechen auf medikamentöse Therapien bestehen. (Lucchinetti et al. 2000, S. 715) Das Patientenkollektiv dieser Studie ist möglicherweise nicht ausreichend repräsentativ, da Autopsien bei MS-Patienten nicht regelhaft durchgeführt werden. Die Theorie der pathophysiologischen Heterogenität unterstützt aber neben der Heterogenität der klinischen Symptomatik und des klinischen Verlaufs die Auffassung der MS als Überbegriff für verschiedene Erkrankungssubtypen. Für diese Studie besonders interessant ist der Subtyp mit Muster 2. Bei diesem Schädigungsmuster, das bei 58% der Patienten auftrat, lag eine Immunglobulin (Ig)-Ablagerung und Komplementaktivierung in Bereichen mit aktiver Myelinschädigung vor. (Lucchinetti et al. 2000, S.710-712) Bei einem großen Teil der Patienten scheinen Demyelinisierung und Gewebeschädigung also durch Antikörper und das Komplementsystem vermittelt zu sein. (Popescu und Lucchinetti 2012, S.190)

1.6 Die Rolle von Autoantikörpern bei der Multiplen Sklerose

Nicht nur Forschungsergebnisse wie die histopathologischen Untersuchungen von Lucchinetti et al. weisen auf eine Beteiligung von B-Lymphozyten, Antikörpern und Komplement bei der Krankheitsentstehung hin. Elliot et al. konnten 2012 nachweisen, dass Antikörper aus dem Serum von MS-Patienten in vitro Demyelinisierung und axonale Schäden verursachen. B-Zell-depletierende Medikamente zeigten bei der MS therapeutische Erfolge wie die monoklonalen CD-20-Antikörper Rituximab (in Studien) und das seit 2017 zur PPMS-Therapie zugelassene Ocrelizumab. (Montalban et al. 2017, S. 218) Auch die für MS charakteristischen Liquormarker weisen auf die Bedeutung von Antikörpern für die Krankheitsentstehung hin. Liquormarker, die für eine lokale B-Zell-Antwort und eine polyklonale B-Zell-Proliferation im ZNS sprechen, sind ein erhöhter IgG-Index ($>0,6$), der quantitative Nachweis einer intrathekalen IgG-Synthese im Reiber-Diagramm und der qualitative Nachweis einer intrathekalen IgG-Synthese in Form von OKB. (Link und Huang, 2006, S.20-22) Entzündliche ZNS-Erkrankungen gehen oft mit einer Störung der BHS einher. Dadurch diffundieren Antikörper aus dem Serum ins ZNS. Außerdem migrieren Plasmazellen ins ZNS, die dort Antikörper produzieren. Eine ZNS-Entzündung führt nicht nur zu einer mengenmäßigen Zunahme der im ZNS gebildeten Antikörper, sondern auch zu einer klonalen Expansion von B-Zellen. Durch eine präferentielle Zunahme einzelner Zellklone werden oligoklonale Ig gebildet. Um zwischen den systemisch produzierten, ins ZNS diffundierten, und den intrathekal produzierten Ig zu unterscheiden,

und somit die oligoklonale Ig-Produktion nachzuweisen, gibt es den qualitativen Nachweis von oligoklonalen Ig und den quantitativen Nachweis der intrathekalen Antikörpersynthese. Qualitativ wird die oligoklonale Ig-Produktion durch OKB in der isoelektrischen Fokussierung und mit nachfolgendem Immunoblot im Liquor (i.L.) nachgewiesen. Distinkte Banden i.L., die nicht im Serum (i.S.) auftreten, sprechen für ein entzündliches Liquorsyndrom mit lokaler B-Zell-Antwort. OKB sind auch bei anderen neuroimmunologischen Erkrankungen nachweisbar. Nach Ausschluss von Differenzialdiagnosen hat der Nachweis von isolierten OKB i.L. aber eine hohe Sensitivität und Spezifität für MS. Sie treten bei über 95% der MS-Patienten auf. (Reiber 2006, S. 148-150) (Abb. 2)

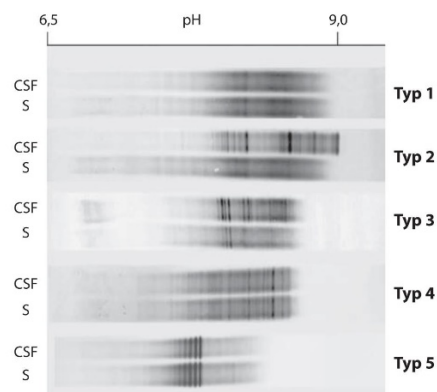


Abb. 2: Qualitativer Nachweis einer intrathekalen IgG-Synthese in Form von oligoklonalen Banden: Charakterisierung nach Typ 1-5: Typ 1: Keine Banden i.L. und i.S. Typ 2: Oligoklonale IgG-Banden i.L., nicht i.S. Interpretation: Intrathekale IgG-Synthese. Typ 3: Oligoklonale Banden i.L. und zusätzlich identische oligoklonale Banden i.L. und i.S. Interpretation: Intrathekale IgG-Synthese. Typ 4: Übereinstimmende oligoklonale Bandenmuster i.L. und i.S. Interpretation: Keine intrathekale IgG-Synthese, systemische Immunreaktion. Typ 5: Monoklonale Bandenmuster i.L. und i.S. Interpretation: Systemische Paraproteinämie. (Reiber 2006, S. 149)

Quantitativ kann eine intrathekale Ig-Synthese anhand der Auswertung mit dem Reiber-Felgenhauer-Diagramm nachgewiesen werden. Es gibt den Anteil des intrathekal gebildeten IgGs, IgAs oder IgMs am Gesamt-IgG-, IgA- oder IgM i.L. an. Bei der MS ist vor allem die intrathekale IgG-Fraktion erhöht, die IgM und IgA-Synthese seltener und immer begleitet durch eine IgG-Synthese. Der IgG-Index, $(\text{Liquor/Serum IgG})/(\text{Liquor/Serum Albumin})$, ist bei 70% der MS-Patienten erhöht. Aufgrund seiner relativ geringen Sensitivität wird er nur zur Unterstützung der Diagnosestellung verwendet. (Link und Huang 2006, S. 22) In anderen Studien wurde sogar i.L. von MS-Patienten eine auf das ZNS-Kompartiment begrenzte B-Zell-Antwort mit B-Zellen aller Reifungsstufen und Chemokinen der lymphoiden Neogenese, die normalerweise in lymphatischen Organen auftreten, festgestellt. Diese Beobachtungen deuten auf die Etablierung einer humoralen Immunantwort innerhalb des ZNS-Kompartiments hin. (Corcione et al. 2004)

1.7 Therapie der Multiplen Sklerose

Die Therapie der MS gliedert sich in die Therapie eines akuten Schubes, verlaufsmodifizierende Therapie und symptomatische Therapie. Das Ziel der Schubtherapie ist die schnelle Symptomrückbildung. Aufgrund der antiinflammatorischen und antiödematösen Wirkung von Glukokortikoiden wird im akuten Schub als 1. Wahl eine Hochdosistherapie mit 500-1000 mg/Tag Methylprednisolon i.v. für 3-5 Tage mit oralem Ausschleichschema eingesetzt. Plasmapherese oder Immunadsorption werden als 2. Wahl bei Nichtansprechen auf eine erhöhte Glukokortikoiddosis und nach Verlängerung der Therapiedauer angewendet. Mit einer verlaufsmodifizierenden Therapie soll eine Verringerung der Krankheitsaktivität mit Reduktion der Schubfrequenz und eine Verzögerung der Krankheitsprogression erreicht werden. Eingesetzt werden verschiedene Immunmodulatoren und Immunsuppressiva in Monotherapie. (Anhang 1) In den letzten Jahren sind viele teils hochwirksame immunmodulatorische und –suppressive Therapien international und in Deutschland zugelassen worden. Nicht jedes Therapeutikum ist für jede Verlaufsform einsetzbar, die Therapeutika sind unterschiedlich stark wirksam, und greifen in unterschiedliche wichtige pathophysiologische Prozesse ein. Bislang erfolgt die Auswahl eines Medikaments anhand der klinisch beobachteten Verlaufsform (CIS, RRMS, SPMS, PPMS, mit oder ohne aufgesetzten Schüben) und der Krankheitsaktivität, die anhand der Schubfrequenz, der Behinderungsprogression und der Läsionslast im MRT als moderat oder hochaktiv eingestuft wird. Um die Vielzahl an hochwirksamen Medikamenten individuell sinnvoll einsetzen zu können, müssen Erkrankungssubtypen identifiziert und näher charakterisiert werden.. Dafür werden Biomarker benötigt, die verlässlich und reproduzierbar zwischen verschiedenen MS-Phänotypen differenzieren können. (Lublin et al. 2013, S. 281-282) Weiterhin bedarf es an Biomarkern, durch die die bei einem Patienten vordergründigen pathophysiologischen Mechanismen identifiziert werden können. Es gibt bislang außerdem keine Biomarker, die die Krankheitsaktivität eines Patienten sensitiver abbilden können als die klinische Krankheitsaktivität und die Läsionslast im MRT. Durch die Identifikation solcher Biomarker könnte der Patient zu dem frühestmöglichen Zeitpunkt und zielgerichteter therapiert werden, und die Wirkung der Medikamente könnte besser reflektiert werden. (Bielekova und Martin 2004, S. 1466-1467; Housley et al. 2015, S. 56)

1.8 Welche Bedeutung haben Biomarker bei der Multiplen Sklerose?

Biomarker bei MS werden zur Prognosestellung, Diagnostik, Abgrenzung zu Differenzialdiagnosen, Beurteilung des Schweregrades und der Krankheitsaktivität und zur Überprüfung des therapeutischen Ansprechens herangezogen. (Comabella und Montalban 2014, S. 113) Ein großer Bereich der MS-Forschung beschäftigt sich mit der Identifizierung geeigneter Biomarker. Die Zahl der Biomarker, deren Zusammenhang mit der Erkrankung in Studien entdeckt wurde, ist sehr groß. Viele Biomarker sind generelle Marker entzündlicher Aktivität jedoch nicht spezifisch für MS. Wenige wurden bisher in weiteren klinischen Studien validiert und sehr wenige sind integrierter Bestandteil der klinischen Praxis.

(Katsavos und Anagnostouli 2013, S.7) Zu den Biomarkern, die am häufigsten in der klinischen Praxis sowie in Studien verwendet werden, zählen die OKB als diagnostischer und prognostischer humoraler Biomarker, der IgG-Index als diagnostischer humoraler Biomarker und die Anzahl und Art der Läsionen im MRT. Diese dienen als diagnostischer und prognostischer Biomarker sowie zur Beurteilung des Krankheitsverlaufs. (Housley et al. 2015, S. 52) Klinische Biomarker als Verlaufsparemeter sind die Verlaufsform (RRMS, SPMS, PPMS), die Schubrate, die Dynamik der Rückbildung der Schübe und der Behinderungsgrad, gemessen anhand des EDSS.

1.9 Definition und physiologische Funktion der IgG-Fc-Glykosylierung

In dieser Studie wurde die IgG-Fc-Glykosylierung i.L. und i.S. von MS-Patienten untersucht. Sie ist ein Biomarker, dessen Zusammenhang mit systemischen Autoimmunsyndromen bereits in mehreren Studien festgestellt wurde.

Ig sind ein wichtiger Teil der Abwehrfunktion des adaptiven Immunsystems. Plasmazellen produzieren verschiedene Ig-Klassen (IgM, IgG, IgD, IgA, IgE) und Subklassen (IgG1-4). Diese zeigen eine große Variabilität in der Antigenerkennung, -spezifität und -affinität. IgG bildet den Großteil der Ig i.S. und ist verantwortlich für die Erkennung, Neutralisierung und Eliminierung von pathogenen und toxischen Antigenen. IgG besteht aus 2 schweren und 2 leichten Ketten, die eine konstante und eine variable Region bilden. Die variable Region (Fab-Fragment) ist für die Antigenerkennung zuständig. (Russell et al. 2018, S.3) Über die konstante Domäne (Fc-Fragment) werden die inflammatorischen Effektorfunktionen vermittelt. Dazu zählen die Aktivierung der Komplementkaskade und die Aktivierung von Effektorzellen des angeborenen Immunsystems über die Bindung von IgG an deren Fc-Rezeptoren (Fc γ -Rezeptoren, Fc γ Rs). Dabei gibt es inhibitorisch und aktivierend wirkende Fc γ -Rezeptoren. (Russell et al. 2018, S.6-10) Durch die Bindung werden Phagozytose, Freisetzung von Zytokinen, die Regulierung der Antikörperproduktion und die antikörperabhängige zelluläre Zytotoxizität beeinflusst. An beiden schweren Ketten ist der Fc-Teil des IgGs an einem konservierten Aminosäurerest, einer Asparaginsäure an Position 297, glykosyliert. Jedes IgG trägt 2 N-Glykane, jeweils eines an jeder schweren Kette. Diese können verschieden aufgebaut und verzweigt sein, was die Variabilität der IgG-Fc-Glykosylierung erhöht. (Abb. 3, 4) Bis jetzt wurden über 30 unterschiedliche Varianten des IgG-Fc-N-Glykans identifiziert. Bei der Antikörperproduktion im endoplasmatischen Retikulum und während der posttranslationalen Modifikation im Golgiapparat der B-Zellen wird ein Glykan auf die Aminosäurekette übertragen. Dieses besitzt ein festes Grundgerüst aus 4 N-Acetylglukosaminen und 3 Mannose-Molekülen. Als weitere variable Bestandteile treten Fukose, ein vom Kern abzweigendes N-Acetylglukosamin, Galaktose und Sialinsäure auf. (Collin und Ehlers 2013, S.211-212) Die verantwortlichen Enzyme befinden sich auch im Kreislaufsystem, wodurch das IgG-Fc-Glykan auch nach Austritt des IgG-Moleküls aus der B-Zelle weiter verändert werden kann. (Jones et al. 2016)

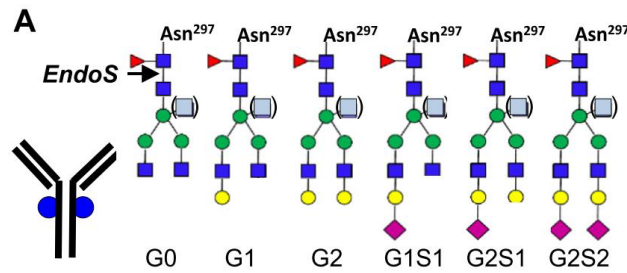


Abb. 3: Aufbau des IgG-Fc-N-Glykans an der Asparaginsäure an Position 297: Grundgerüst aus 4 N-Acetylglucosaminen (blau) und 3 Mannosemolekülen (grün). Variable Bestandteile: Fukose (rot), abzweigendes N-Acetylglucosamin (hellblau), Galaktose (gelb), Sialinsäure (violett). Durch enzymatische Behandlung mit Endoglycosidase aus *Streptococcus pyogenes* (EndoS) kann das Fc-N-Glykan bis auf das Kernmolekül N-Acetylglucosamin und eine Fukose abgespalten werden. G0 = agalaktosyliert+asialyliert, G1+G2 = terminal galaktosyliert, G1S1, G2S1, G2S2 = sialyliert. (Epp et al. 2018, S. 400)



Abb. 4: Assoziation der verschiedenen IgG-Fc-Glykoformen zu pro-bzw. antiinflammatorischen Immunreaktionen. Rechte Spalte: Rezeptorkomplexe, über die IgG durch seine variable IgG-Fc-Glykosylierung pro- oder antiinflammatorisch wirkt. Fcγ-R2B = inhibitorisch wirksam, SIGN-R1/DC-SIGN = CD209, Typ2-FcγR der C-Typ-Lektin-Rezeptorfamilie. (Collin und Ehlers 2013, S. 512)

Die IgG-Fc-Glykosylierung übernimmt eine physiologische Funktion bei der Regulation von Entzündungsreaktionen. Nach Kontakt zu Antigenen reagiert das Immunsystem entweder mit einer proinflammatorischen Immunantwort im Sinne einer Entzündungsreaktion oder antiinflammatorisch im Sinne einer Toleranzreaktion. Der variierende Aufbau des IgG-Fc-Glykans ist ein Weg des Immunsystems, Entzündungsreaktionen zu modulieren. Die Art der Reaktion auf den Kontakt zu Antigenen und damit auch das Muster der IgG-Fc-Glykosylierung hängen von der Art der Antigenpräsentation, von dem umgebenden entzündlichen Milieu und dem genetischen Aufbau der IgG-

produzierenden B-Zellen ab. (Abb. 5) Die zelluläre Umgebung beeinflusst das Expressionsniveau von Enzymen wie Glykosyltransferasen, Glykosylhydrolasen und zuckerbereitstellenden Enzymen und dadurch den Aufbau des IgG-Fc-Glykans. Beispielsweise werden unter proinflammatorischen Bedingungen hauptsächlich B-Zellen mit einem niedrigen Expressionsgrad der alpha-2,6-Sialyltransferase aktiviert, die proinflammatorisch wirksames agalaktosyliertes, asialyliertes IgG produzieren. Unter Toleranzbedingungen des umgebenden Entzündungsmilieus wird die Expression der alpha-2,6-Sialyltransferase hochreguliert, und es werden B-Zellen aktiviert, die das Enzym zu einem ähnlich hohen Grad wie unter Normalbedingungen exprimieren. Durch die Produktion von sialyliertem IgG resultiert eine antiinflammatorische Immunreaktion. (Oefner et al. 2012) Möglicherweise ist die Sialylierung von IgG ein Mechanismus des Immunsystems, eine antiinflammatorische Aktivität im Grundzustand aufrechtzuerhalten. Andererseits ermöglicht die Umstellung der Produktion auf proinflammatorische asialylierte IgGs eine adaptive proinflammatorische Immunantwort. (Kaneko et al. 2006, S.672-673)

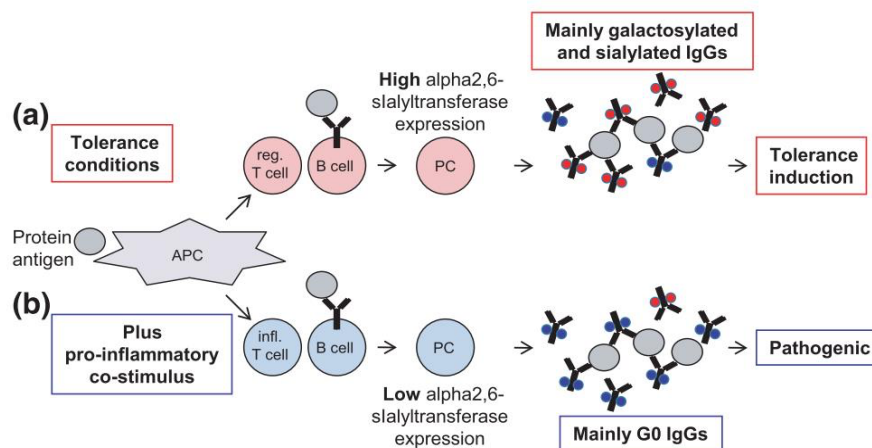


Abb. 5: Das pro-/antiinflammatorische Umgebungsmilieu beeinflusst die IgG-Fc-Glykosylierung durch Plasmazellen (PC), APC = Antigen-präsentierende Zelle. (Collin und Ehlers 2013, S. 513)

Die Effektorfunktionen des IgGs werden maßgeblich durch den Aufbau des IgG-Fc-N-Glykans beeinflusst. Dieser beeinflusst die Aktivierung des Komplementsystems, die Komplement-abhängige Zytotoxizität, die antikörper-abhängige zelluläre Zytotoxizität, die Expression und die Spezifität zu aktivierenden oder inhibitorischen FcγRs und weitere komplexe inflammatorische Mechanismen. Die Einteilung von IgG in verschiedene Wirkungstypen anhand ihres Fc-N-Glykosylierungsmusters stammt aus der Rheumatologie und aus Tiermodellen. Agalaktosylierte und asialylierte IgG-Formen (G0-IgG) und das Vorhandensein von abzweigendem N-Acetylglucosamin sind mit proinflammatorischen Immunreaktionen assoziiert. IgG-Moleküle, deren Fc-N-Glykan Galaktose, Sialinsäure und ein Fukosekernmolekül beinhalten, wirken antiinflammatorisch. Unterschiede in den Effektorfunktionen der Glykoformen G1, G2, G1S1, G2S1, G2S2 sind noch nicht näher erforscht. (Collin und Ehlers 2013, Russell et al. 2018) (Abb. 3, 4)

1.10 Die Bedeutung der IgG-Fc-Glykosylierung bei systemischen Autoimmunsyndromen und bei der Multiplen Sklerose

Eine veränderte IgG-Fc-Glykosylierung ist jedoch auch mit Krankheiten, insbesondere mit systemischen Autoimmunsyndromen, assoziiert. Die Assoziation einer veränderten IgG-Fc-Glykosylierung mit der Krankheitsentstehung und dem Krankheitsverlauf wurde in klinischen Studien und teilweise in Tiermodellen über die rheumatoide Arthritis, (Pasek et al. 2006; van de Geijn et al. 2009; Goulabchand et al. 2014) das Lambert-Eaton-Myasthenie-Syndrom und Myasthenia gravis, (Selman et al. 2011), das Guillain-Barré-Syndrom (Fokkink et al. 2014), den systemischen Lupus erythematodes (Vučković et al. 2015) und chronisch-entzündliche Darmerkrankungen (CED), (Šimurina et al. 2018) festgestellt. (Anhang 10) Die Veränderungen zeigen sich in Form eines verminderten Anteils an term gal- und sial-IgG und eines erhöhten Anteils an G0-IgG i.S. Bei der rheumatoiden Arthritis, dem systemischen Lupus erythematodes und den CED wurde eine Assoziation der IgG-Fc-Glykosylierung mit der Erkrankungsschwere und dem Erkrankungsverlauf festgestellt. Ein hoher Anteil an term gal- und sial-IgG am Gesamt-IgG gingen mit einer klinischen Verbesserung einher. Ein hoher Anteil an G0-IgG war mit schwereren und komplizierteren Verläufen assoziiert. Die IgG-Fc-Glykosylierung i.L. und i.S. von MS-Patienten wurde bereits in 2 vorhergehenden Studien von Wuhrer et al. 2015 und von Decker et al. 2016 in kleinen Kohorten untersucht. Beide Studien zeigten, dass das IgG-Fc-Glykosylierungsmuster i.L. von MS-Patienten im Gegensatz zu Kontrollen proinflammatorisch verändert war.

1.11 Fragestellung dieser Studie

Bei Patienten mit systemischen Autoimmunsyndromen und im Tiermodell wurden Veränderungen der IgG-Fc-Glykosylierung festgestellt, die mit der Krankheitsaktivität korrelieren. Agalaktosylierte IgG-Formen gehen mit proinflammatorischen Immunreaktionen einher. Galaktosylierte und sialylierte IgG-Formen gelten als immunprotektiv. Für eine sinnvolle individuelle Therapieplanung- und Überwachung und zur Vorhersage des individuellen Krankheitsverlaufs vor dem Hintergrund einer großen Heterogenität werden bei der MS humorale Biomarker dringend benötigt. (Bielekova und Martin 2004, S.1466-1467, Lublin et al. 2013, S281-282) Klinische Beobachtungen wie OKB, die Wirksamkeit von Anti-B-Zell-Therapien und histopathologische Befunde bei MS weisen auf eine Beteiligung von Antikörpern und Komplement bei der Krankheitsentstehung hin. Daher ist es möglich, dass – wie in zwei kleineren Studien (Wuhrer et al. 2015; Decker et al. 2016) erwogen – eine veränderte IgG-Fc-Glykosylierung auch bei der MS einen prognostischen Biomarker darstellt.

Ziele dieser Arbeit sind (1) die Untersuchung der Unterschiede der IgG-Fc-Glykosylierung im Liquor und im Serum von MS-Patienten und Kontrollen in zwei größeren, unabhängigen Patientenkollektiven und (2) die Analyse der Assoziation der IgG-Fc-Glykosylierung im Liquor und im Serum von MS-Patienten mit Verlaufsform, Befunden und Prognose in diesen Kohorten.

2 Methoden

2.1 Einschlusskriterien und Patientenauswahl der Kieler Kohorte (Discovery Kohorte)

Das Studienvorhaben wurde der Ethik-Kommission der medizinischen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel zur ethischen Überprüfung vorgelegt.

Die Patientenauswahl erfolgte retrospektiv mithilfe einer ICD-10-Code basierten Diagnosesuche (ICD 10 G35.-, G35.0, G35.1, G35.10, G35.11, G35.2, G35.20, G35.21, G35.3, G35.30, G35.31, G35.9) unter den Patienten der neurologischen Klinik des UKSH, Campus Kiel, zwischen dem 01.01.2006 und 01.04.2016. Einschlusskriterien waren 1. eine laut Arztbriefen und MRT-Befunden anhand der McDonald-Kriterien 2010/MAGNIMS-Kriterien 2016 gesicherte MS zum Zeitpunkt der Liquorpunktion (LPZP) und 2. mindestens eine asservierte und verfügbare Serum-/Liquor-Probe mit einem ausreichenden Volumen in dem seit 1998 geführten Liquorarchiv des Instituts für klinische Chemie des UKSH, Campus Kiel. Anhand der vorliegenden Befunde und Arztbriefe wurde die Klassifikation des vorliegenden Erkrankungsverlaufs zum LPZP überprüft. Es wurden folgende Patientenkohorten zusammengestellt: (1) Patienten mit Erstmanifestation: Patienten mit CIS, bei denen die Kriterien der zeitlichen Dissemination entweder durch ein MRT mit KM- anreichernden- und nicht anreichernden Läsionen oder durch vorliegende Informationen über einen weiteren Schub zu einem späteren Zeitpunkt erfüllt waren; (2) Patienten mit RRMS; (3) Patienten mit SPMS; (4) Patienten mit PPMS: Patienten, die entweder bereits zum LPZP oder zu einem späteren Zeitpunkt nach der Punktion die Kriterien für eine PPMS erfüllten.

Eine Kontrollkohorte mit Patienten mit nicht-entzündlichen neurologischen Erkrankungen wurde zusammengestellt, die sich zwischen dem 28.12.2012 und dem 08.03.2016 in der neurologischen Klinik des UKSH, Campus Kiel, vorstellten, und von denen eine Serum-/Liquor-Probe im Liquorarchiv asserviert und verfügbar war. Die Diagnosen dieser Patienten beinhalteten Kopfschmerzsyndrome, idiopathische intrakranielle Hypertension, Normaldruckhydrozephalus, benigner paroxysmaler Lagerungsschwindel, Morbus Menière, radikuläre Syndrome bei Diskusprolaps und funktionelle Störungen. Die Auswahl der Kontrollpatienten erfolgte Alters- und Geschlechts-gemacht bezogen auf die Alters- und Geschlechtsverteilung der MS-Gesamtkohorte und der Untergruppen. Von allen Patienten wurden retrospektiv mittels Aktenanalyse demographische und klinische Daten und Verlaufparameter sowie Laborparameter erfasst. (Anhang 2) Die Analyse der IgG-Fc-Glykosylierung von Liquor- und Serumproben von 8 MS- Patienten und 8 Kontrollpatienten erfolgte bereits für eine Pilotstudie im Vorfeld dieser Studie. Die Ergebnisse dieser Analysen wurden für diese Studie übernommen.

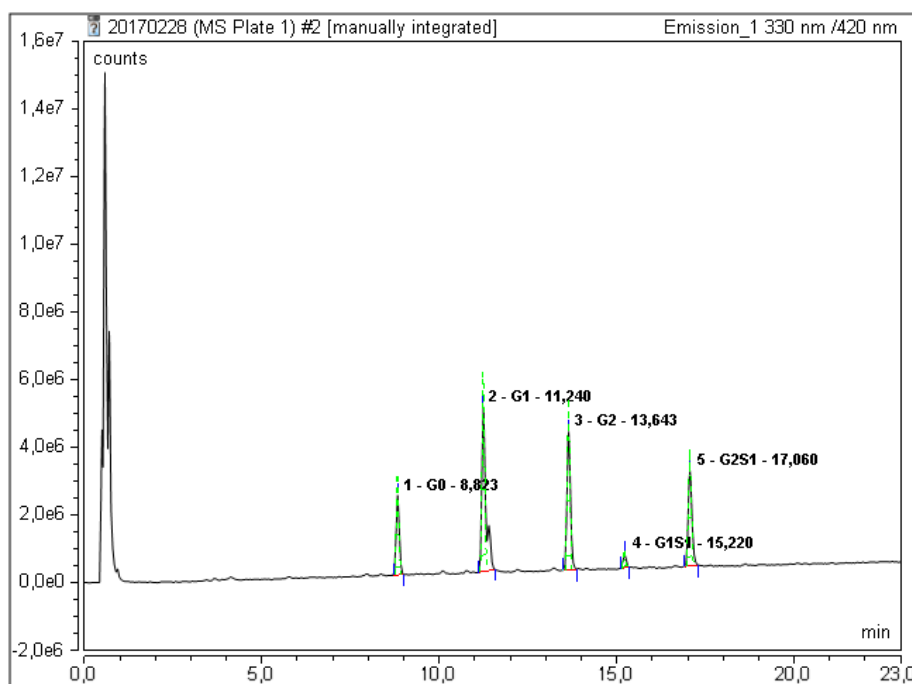
2.2 Patientenauswahl der Hamburger Kohorte (Validations-Kohorte)

Nach Messung und Auswertung der IgG-Fc-Glykosylierung der Kieler Patienten- und Kontrollkohorte erfolgten die Zusammenstellung einer 2. Patienten- und Kontrollkohorte, die Messung der IgG-Fc-Glykosylierung i.S. und Auswertung der Daten. Die Patienten wurden durch die Mitarbeiter des Instituts für Neuroimmunologie und Multiple Sklerose (INIMS) des UKE Hamburg anhand ihrer MS-Verlaufsform (RRMS, PPMS) und orientierend an der Altersverteilung der Kieler Kohorte rekrutiert. Die Serumproben stammen aus den Jahren 2010-2018. Anschließend wurde eine bezüglich Alter und Geschlecht mit der Patientenkohorte gematchte Kontrollkohorte mit nicht-entzündlichen neurologischen Erkrankungen zusammengestellt. Aufgrund der Ergebnisse der Kieler Kohorte, die Veränderungen der IgG-Fc-Glykosylierung nicht nur i.L., sondern auch i.S. zeigten, wurde die IgG-Fc-Glykosylierung bei der Hamburger Kohorte nur i.S. gemessen. Die Patientendaten wurden durch das INIMS und die Serumproben durch dessen Biobank zur Verfügung gestellt.

2.3 Analyse der IgG-Fc-Glykosylierung mittels High Performance Liquid Chromatography

Die Liquor- und Serumproben wurden nach Gewinnung in der Biobank des Instituts für klinische Chemie des UKSH Kiel bzw. des INIMS des UKE Hamburgs bei -80°C tiefgefroren gelagert. Die für diese Studie erforderlichen Proben wurden aufgetaut, und das jeweils notwendige Volumen entnommen. Von den Serumproben wurden jeweils $30\mu\text{l}$, von den Liquorproben ein Volumen, das entsprechend der im Liquorbefund festgehaltenen Liquor-IgG-Konzentration eine Menge von $30\text{-}50\mu\text{g}$ IgG enthält, entnommen. Die Proben wurden erneut bei -80°C tiefgefroren und auf Trockeneis in das Labor der Arbeitsgruppe für Immunologie und Glykoanalytik des Instituts für Ernährungsmedizin des UKSH, Campus Lübeck, transportiert. Dort wurden die Proben erneut aufgetaut. IgG aus Serum- und Liquorproben wurde mittels Protein-G-Sepharose-Affinitätschromatographie isoliert. N-Glykane wurden aus gereinigten IgG-Proben mittels Hydrolyse mit rekombinanter Endoglykosidase S aus *Streptococcus pyogenes* isoliert. Das Enzym spaltet spezifisch IgG-Fc-N-Glykane zwischen dem 1. und 2. N-Acetylglucosaminmolekül, sodass Glykane des IgG-Fab-Fragments nicht mitgemessen werden. (Abb. 3) Die resultierenden N-Glykane wurden unter Verwendung einer Festphasenextraktion mit carbographitisierten Kohlenstoffsäulen (Fisher Scientific, Hampton, NH) gereinigt, und mit Anthranilamid (Sigma-Aldrich) fluoreszenzmarkiert. Die High Performance Liquid Chromatography (HPLC) mit den markierten Glykanen wurde an einem Dionex Ultimate 3000 (Thermo Fischer Scientific, Waltham, Mass) unter Verwendung einer Xbridge XP BEH Glykan-Säule ($2,5\text{mm}$, $100 \times 3,4,6\text{ mm ID}$; Waters, Milford, Mass) durchgeführt. Dabei wurden die markierten N-Glykane nach ihrer Hydrophobizität in der HPLC-Säule aufgetrennt. Je größer ein Glykan ist und je mehr hydrophobe Gruppen es besitzt, desto länger sind seine Retentionszeiten in der HPLC-Säule. Nach der Passage durch die Säule wurden die gesammelten Peak-Fractionen einer Glykangruppe mittels matrixunterstützter

Laser-Desorptions/Ionisations-Flugzeit-Massenspektrometrie durch einen Fluoreszenzdetektor über die Zeit aufgezeichnet, was graphisch als Chromatogramm dargestellt wurde. Anhand der unterschiedlichen Retentionszeiten konnte ein Fluoreszenzpeak einer Glykangruppe zugeordnet werden. (Abb. 6) Basierend auf der terminalen Zuckereinheit wurden die Peaks einer der folgenden Glykangruppen zugeordnet: G0, G1, G2, G1S1, G2S1. Die Glykoform G2S2 konnte aufgrund des zu geringen Anteils am Gesamt-IgG nicht gemessen werden. Die Anteile der Glykoformen am Gesamt-IgG konnten durch Berechnung der Fläche der einzelnen Peak-Fractionen als Anteil an der Gesamtfläche berechnet werden, sodass in dieser Studie verwendete Glykosylierungswerte immer als Anteil am Gesamt-IgG zu betrachten sind. (Epp et al. 2018, S. 402, e2)



Peak Results									
No.	Peak Name	Retention Time min	Width (50%) min	Type	Resolution (EP)	Asymmetry (EP)	Area counts*min	Height counts	Rel.Area (IDENTIFIED) %
1	G0	8.823	0.096	M	14.58	1.12	244.443	2.355.305	13.90501914
2	G1	11.240	0.100	MB*	13.91	1.74	660.076	4.864.086	37.54813578
3	G2	13.643	0.104	M	9.21	1.11	462.695	4.076.191	26.32020798
4	G1S1	15.220	0.098	BMB*	10.31	1.01	43.414	423.075	2.469570245
5	G2S1	17.060	0.113	M	n.a.	1.21	347.318	2.813.333	19.75706686

Abb. 6: Aufzeichnung der mittels matrixunterstützter Laser-Desorptions/Ionisations-Flugzeit-Massenspektrometrie gesammelten Peak-Fractionen der einzelnen Glykan-Gruppen über die Zeit als Chromatogramm. Tabellarische Aufführung der Retentionszeiten und der Flächenanteile der einzelnen IgG-Fc-Glykoformen an der Gesamtfläche im Chromatogramm. G0 = agalaktosyliertes IgG, G1/G2 = terminal galaktosyliertes IgG, G1S1/G2S1 = sialyliertes IgG.

2.4 Statistische Auswertung

Die Daten wurden graphisch durch das Programm Graphpad PRISM Version 7.0 für Microsoft Windows und tabellarisch durch das Programm Microsoft Excel Version 2016 veranschaulicht. Die statistische Auswertung erfolgte ebenfalls mit Graphpad PRISM Version 7.0. Die deskriptiven Daten wurden mit Mittelwert/Standardabweichung und Median/95%-Konfidenzintervall dargestellt. Eine Normalverteilung der gemessenen IgG-Fc-Glykosylierungswerte wurde aufgrund der graphischen Verteilung mit Angabe von Mittelwerten und Standardabweichung angenommen. Normalverteilte, metrische Daten wurden mit dem Student-t-Test für 2 unabhängige Stichproben und mit dem one-way-ANOVA-Test mit post-hoc-Analyse für mehr als 2 unabhängige Stichproben verglichen. Alle Tests waren zweiseitig mit einem 95%-Konfidenzintervall. Zur Analyse des Zusammenhangs der IgG-Fc-Glykosylierung mit qualitativen nominalskalierten Variablen wurde die Patienten-bzw. Kontrollkohorte anhand des Geschlechts, dem Vorhandensein von OKB i.L., dem Vorhandensein von Kontrastmittelanreichernden Läsionen oder der T2-Läsionslast im MRT in 2 (bzw. 3: T2-Läsionslast) Gruppen aufgeteilt und der Unterschied zwischen diesen Gruppen mittels Student t-Test (bzw. One-way-ANOVA mit post-hoc-Analyse) ermittelt. Zur Analyse der Korrelation der IgG-Fc-Glykosylierung mit ordinalskalierten Variablen wie dem EDSS oder MSSS wurde der Spearman-Rang-Korrelationskoeffizient berechnet. Zur Analyse der Korrelation von metrischen nicht normalverteilten Variablen wie dem Alter, der Erkrankungsdauer und Liquorparametern und der IgG-Fc-Glykosylierung wurden die Variablen einer logarithmischen Transformation unterzogen und anschließend der Pearson-Korrelationskoeffizient berechnet. Als statistisches Signifikanzniveau wurde $p < 0,05$ festgelegt.

3 Ergebnisse: Deskriptive Beschreibung des Patienten- und Kontrollkollektivs

Die ICD-10-Code-basierte Diagnosesuche für die Kieler Kohorte ergab 1073 Patienten. Von diesen Patienten erfüllten 222 zum LPZP die Einschlusskriterien. Von diesen hatten nur 5% (n=12) eine SPMS, so dass bei diesen Patienten kein sinnvoller statistischer Gruppenvergleich möglich war. Die Kieler Gesamtpatientenkohorte (Discovery-Kohorte) ohne SPMS-Patienten umfasst 210 Patienten. Das mittlere Alter beträgt 38,5 Jahre, der Frauenanteil 70%. (Tab. 1a) Zum LPZP hatten 42% eine Erstmanifestation der MS, 45% eine RRMS und 12% eine PPMS. Die Gesamtkontrollkohorte umfasst 86 Personen mit einem mittleren Alter von 36,2 Jahren und einem Frauenanteil von 69%. Die Gesamtpatientenkohorte und die Gesamtkontrollkohorte, sowie die Patientensubgruppen und ihre jeweiligen Kontrollsubgruppen unterscheiden sich in ihrer Alters- und Geschlechtsverteilung nicht signifikant. Es konnten bei 200/210 Patientenserumproben, bei 153/210 Patientenliquorproben, bei 80/86 Kontrollserumproben und 79/86 Kontrollliquorproben IgG-Glykosylierungsanteile bestimmt werden. (Abb.7a) Die Hamburger Patientenkohorte (Validationskohorte) umfasst 80 PPMS- und 118 RRMS-Patienten. (Abb. 7b) In der PPMS-Kohorte lag das mittlere Alter bei 53 Jahren und der Frauenanteil bei 30%. In der RRMS-Kohorte lag das mittlere Alter bei 41 Jahren und der Frauenanteil bei 69,5%. Die PPMS-Kontrollkohorte umfasst 33 Patienten mit einem mittleren Alter von 52 Jahren und einem Frauenanteil von 39%. In der RRMS-Kontrollkohorte (n=71) lag das mittlere Alter bei 35 Jahren und der Frauenanteil bei 73%. Die PPMS- und die RRMS-Patientenkohorten unterscheiden sich in ihrer Alters- und Geschlechtsverteilung nicht signifikant von ihren jeweiligen Kontrollkohorten. Fasst man die RRMS- und PPMS-Kohorte sowie ihre jeweiligen Kontrollkohorten zu einer Gesamtpatientenkohorte bzw. zu einer Gesamt-Kontrollkohorte zusammen, besteht ein signifikanter Unterschied in der Altersverteilung bei höherem Alter in der Patienten- als in der Kontrollkohorte. (Tab. 1b) Die Kieler und Hamburger Patientenkohorten unterscheiden sich bezüglich ihrer Alters- und Geschlechtsverteilung, in der Erkrankungsdauer zum LPZP und teilweise ihres EDSS-Scores. Die Hamburger RRMS- und PPMS-Kohorten zeigen ein höheres Alter und eine längere Erkrankungsdauer als die Kieler RRMS- und PPMS-Kohorten. Die Hamburger PPMS-Patientenkohorte hat einen niedrigeren Frauenanteil und die Hamburger RRMS-Patientenkohorte einen niedrigeren EDSS-Score als die entsprechende Kieler Kohorte. (Tab. 1c)

		MS-Patienten gesamt n=210 Liquor n=153 Serum n=200		Kontrollen gesamt n=86 Liquor n=79 Serum n=80			
Erstmanifestation		RRMS		PPMS		SPMS	
Patienten n=89 (42%) Liquor n=64 Serum n=88	Kontrollen n=82 Liquor n=75 Serum n=74	Patienten n=95 (45%) Liquor n=74 Serum n=87	Kontrollen n=93 Liquor n=86 Serum n=85	Patienten n=26 (12%) Liquor n=15 Serum n=25	Kontrollen n=24 Liquor n=20 Serum n=24	Patienten n=12 Liquor n=5 Serum n=11	

Abb.7a: Kieler Kohorte (Discovery Kohorte): Anzahl der Kontrollen und Patienten mit jeweiliger Anzahl der Liquor- und Serumwerte. Die SPMS-Kohorte wurde nicht zur MS-Gesamtkohorte gezählt. (Pat.= Patienten, Kont.= Kontrollen, n = Anzahl, MS = Multiple Sklerose, RRMS = schubförmig-remittierende MS, PPMS = primär chronisch-progrediente MS, SPMS = sekundär chronisch-progrediente MS)

		MS-Patienten gesamt Serum n=198		Kontrollen gesamt Serum n=104	
		RRMS		PPMS	
Patienten Serum n=118 (60%)	Kontrollen Serum n=71	Patienten Serum n=80 (40%)	Kontrollen Serum n=33		

Abb.7b: Hamburger Kohorte (Validations-Kohorte): Anzahl Kontrollen und Patienten mit jeweiliger Anzahl der Serumwerte. n=Anzahl, MS=Multiple Sklerose, RRMS=schubförmig-remittierende MS, PPMS=primär chronisch-progrediente MS

Tabelle 1a: Demographische und klinische Charakterisierung der Kieler Patienten- und Kontrollkohorte (Discovery Kohorte), Angabe mit Median (Interquartilsabstand), n = Anzahl, EDSS = expanded disability status scale, MSSS = multiple sclerosis severity score, MS = Multiple Sklerose, EM = Erstmanifestation, RRMS = schubförmig-remittierende MS, PPMS = primär chronisch-progrediente MS

Kieler Kohorte	Alter in Jahren	Geschlecht (Anteil Frauen in %)	Erkrankungsdauer in Jahren	EDSS	MSSS	Alter bei EM
Kontrollen (MS gesamt) n=86	36,2 (26,8-45,8)	69% (n=59)				
MS gesamt n=210	38,5 (28,9-46,9)	70% (n=145)	0,4 (0,04-3,8)	n=207: 2,5 (2-3,5)	n=204: 6,5 (4,2-8,3)	34,3 (27,3-43,6)
Signifikanz	p=0,15	p=0,94				
Kontrollen (Erstman.) n=82	35,05 (24,2-44,1)	72% (n=59)				
Erstmanifestation n=89	35,3 (27,8-43,9)	73% (n=65)	0,03 (0,02-0,09)	2,5 (2-3)	7,8 (6,5-8,3)	35,07 (27,7-43,8)
Signifikanz	p=0,32	p=0,87				
Kontrollen (RRMS) n=93	35,1 (24,3-44,6)	66% (n=62)				
RRMS n=95	37,5 (28-45,3)	68% (n=65)	2,7 (0,5-7,2)	n=92: 3 (2-3,5)	n=91: 5,7 (2,9-7,8)	32,57 (24,5-38,1)
Signifikanz	p=0,24	p=0,8				
Kontrollen (PPMS) n=24	47,6 (45,8-52,56)	63% (n=15)				
PPMS n=26	52,3 (46,5-63,6)	60% (n=15)	3,7 (1,1-8,6)	3,5 (3-78)	8,3 (5,3-9,6)	47,8 (40,2-51,7)
Signifikanz	p=0,06	p=0,73				

Tabelle 1b: Demographische und klinische Charakterisierung der Hamburger Patienten- und Kontrollkohorte (Validationskohorte), Angabe mit Median (Interquartilsabstand), n = Anzahl, EDSS = expanded disability status scale, RRMS = schubförmig-remittierende MS, PPMS = primär chronisch-progrediente MS

<u>Hamburger Kohorte</u>	<u>Alter</u>	<u>Geschlecht (Anteil Frauen in %)</u>	<u>Erkrankungsdauer</u>	<u>EDSS</u>
Kontrollen (gesamt) n=104	44 (32-52)	62,5% (n=65)		
Patienten (gesamt) n=198	45 (38-53)	<u>53,5%</u> (n=106)	5 (3-11)	3 (2-4)
Signifikanz	p=0,015	p=0,14		
Kontrollen (RRMS) n=71	35 (29-48)	73,2% (n=52)		
RRMS n=118	41 (34-47)	69,5% (n=82)	4 (2-9)	2 (1-3)
Signifikanz	p=0,08	p=0,58		
Kontrollen (PPMS) n=33	52 (47-58)	39,4% (n=13)		
PPMS n=80	53 (46-58)	30% (n=24)	9 (4-15)	3,5 (3-5)
Signifikanz	p=0,45	p=0,33		

Tabelle 1c: Vergleich der Kieler und Hamburger Patientenkohorte bezüglich demographischer und klinischer Daten, Angabe mit Median (Interquartilsabstand), n=Anzahl, EDSS = expanded disability status scale, RRMS = schubförmig-remittierende MS, PPMS = primär chronisch-progrediente MS

<u>Kieler versus Hamburger Kohorte</u>	<u>Alter in Jahren</u>	<u>Geschlecht (Anteil Frauen in %)</u>	<u>Erkrankungsdauer in Jahren</u>	<u>EDSS</u>
MS gesamt Kiel, n=210	38,5 (28,9-46,9)	70% (n=145)	0,4 (0,04-3,8)	n=207: 2,5 (2-3,5)
MS gesamt Hamburg, n=198	45 (38-53)	53,5% (n=106)	5 (3-11)	n=197: 3 (2-4)
Signifikanz	p<0,0001	p=0,0013	p<0,0001	p=n.s.
RRMS Kiel, n=95	37,5 (28-45,3)	68% (n=65)	2,7 (0,5-7,2)	n=92: 3 (2-3,5)
RRMS Hamburg n=118	41 (34-47)	69,5% (n=82)	4 (2-9)	2 (1-3)
Signifikanz	p=0,0005	p=n.s.	p<0,0001	p=0,0005

PPMS Kiel, n=26	52,3 (46,5-63,6)	60% (n=15)	3,7 (1,1-8,6)	3,5 (3-7)
PPMS Hamburg n=80	53 (46-58)	30% (n=24)	9 (4-15)	3,5 (3-5)
Signifikanz	p=0,0029	p=0,01	p=0,0072	p=n.s.

4 Ergebnisse der Kieler Kohorte (Discovery-Kohorte)

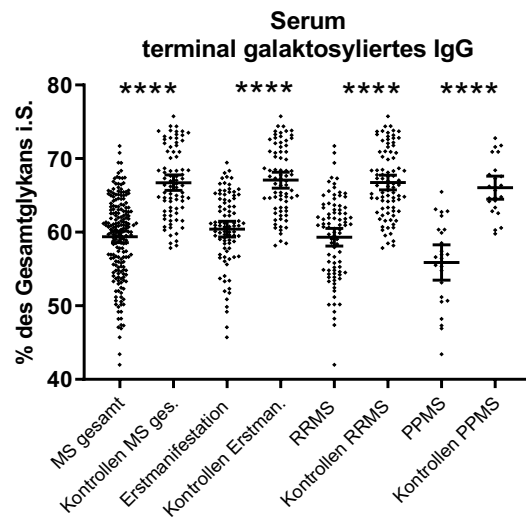
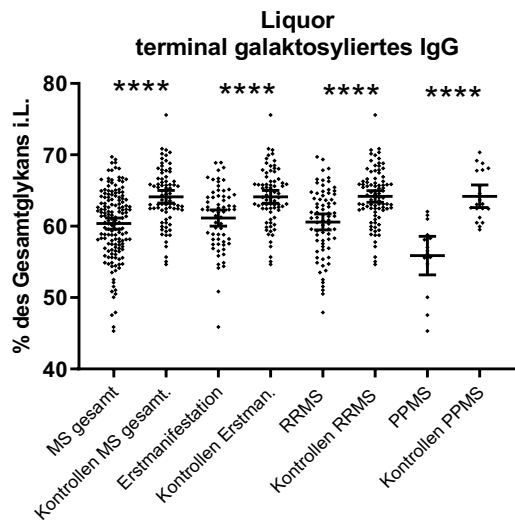
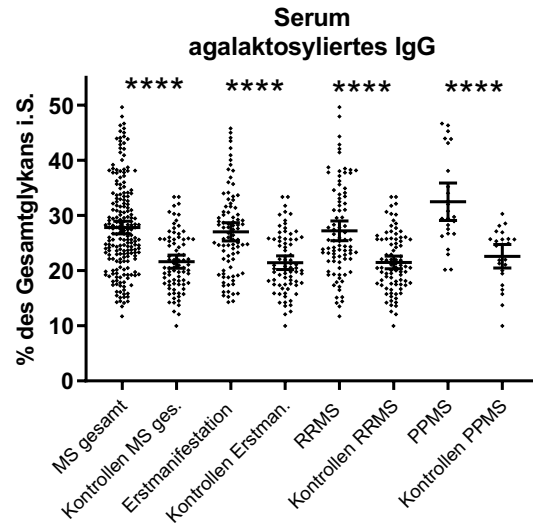
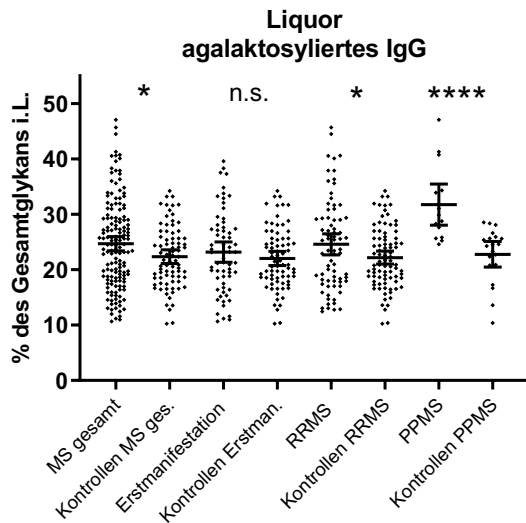
4.1 Unterschiede der IgG-Fc-Glykosylierung i.L. und i.S. zwischen Patienten und Kontrollen

Sowohl im Vergleich der Gesamt-MS-Kohorte mit der Gesamtkontrollkohorte und im Vergleich der Subkohorten der MS (Erstmanifestation, RRMS, PPMS) mit den jeweiligen Einzelkontrollkohorten ergaben sich signifikante Veränderungen. Sämtliche Mittelwerte und Standardabweichungen sind in Tabelle 2a dargestellt und graphisch in den Abbildungen 8 und 9. Bei allen Gruppen waren i.L. und i.S. agalaktosylierte IgG-Anteile (G0-IgG) signifikant gegenüber den Kontrollen erhöht, term gal-IgG-Anteile signifikant vermindert und sial-IgG-Anteile kaum verändert bis leicht erhöht. Die Veränderungen zeigten sich dabei nicht nur i.L., sondern auch i.S. (Abb. 8)

Tabelle 2a: Anteile der einzelnen Glykoformen am Gesamt-IgG-Fc-N-Glykan im Serum (i.S.) und im Liquor (i.L.) der Kieler Patienten- und Kontrollkohorte (Discovery-Kohorte) in %. Angabe mit Mittelwert (Standardabweichung), n = Anzahl, MS = Multiple Sklerose, EM = Erstmanifestation, RRMS = schubförmig-remittierende MS, PPMS = primär chronisch-progrediente MS, i.S.= im Serum, i.L= im Liquor, G0 = agalaktosylated IgG, term gal = terminal galaktosylated IgG, sial = sialylated IgG

<u>Kohorte</u>	<u>G0 i.S.</u>	<u>term gal. i.S.</u>	<u>sial i.S.</u>	<u>G0 i.L.</u>	<u>term gal i.L.</u>	<u>sial i.L.</u>
Kontrollen MS gesamt n=80 Seren, n=79 Liquores	21,6% (SD 5,3)	66,7% (4,7)	11,6% (3,3)	22,3% (5,6)	64,1% (3,9)	13,7% (3,7)
MS gesamt n=200 Seren, n=153 Liquores	27,9% (8,5)	59,1% (6,1)	12,9% (4,1)	24,7% (8,1)	60,4% (4,9)	15,0% (4,8)
Signifikanz	p<0,0001	p<0,0001	p=0,02	p=0,02	p<0,0001	p=0,04
Kontrollen EM n=74 Seren, n=75 Liquores	21,4% (5,4)	67,1% (4,6)	11,4% (3,1)	22% (5,5)	64% (3,9)	14% (3,3)
EM n=88 Seren, n=64 Liquores	27,3% (8,4)	60,1% (5,8)	12,6% (3,9)	23,2% (7,3)	61,2% (4,5)	15,7% (4,5)
Signifikanz	p<0,0001	p<0,0001	p=0,046	p=0,3	p<0,0001	p=0,01

Kontrollen (RRMS) n=85 Seren, n=86 Liquores	21,5% (5,3)	66,8% (4,6)	11,7% (3,3)	22,2% (5,5)	64,2% (3,8)	13,8% (3,6)
RRMS n=87 Seren, n=74 Liquores	27,2% (8,3)	59,3% (5,7)	13,5% (4,1)	24,6% (8,3)	60,6% (4,8)	14,8% (5,1)
Signifikanz	p>0,0001	p<0,0001	p=0,002	p=0,03	p<0,0001	p=0,1
Kontrollen (PPMS) n=24 Seren, n=20 Liquores	22,6% (5,1)	66,1% (3,7)	11,4% (3,7)	22,8% (4,9)	64,2% (3,4)	13% (3,9)
PPMS n=25 Seren, n=15 Liquores	33,5% (9,4)	54,9% (7)	11,7% (4,2)	31,7% (6,7)	55,9% (4,9)	12,4% (3,7)
Signifikanz	p<0,0001	p<0,0001	p=0,8	p<0,0001	p<0,0001	p=0,6



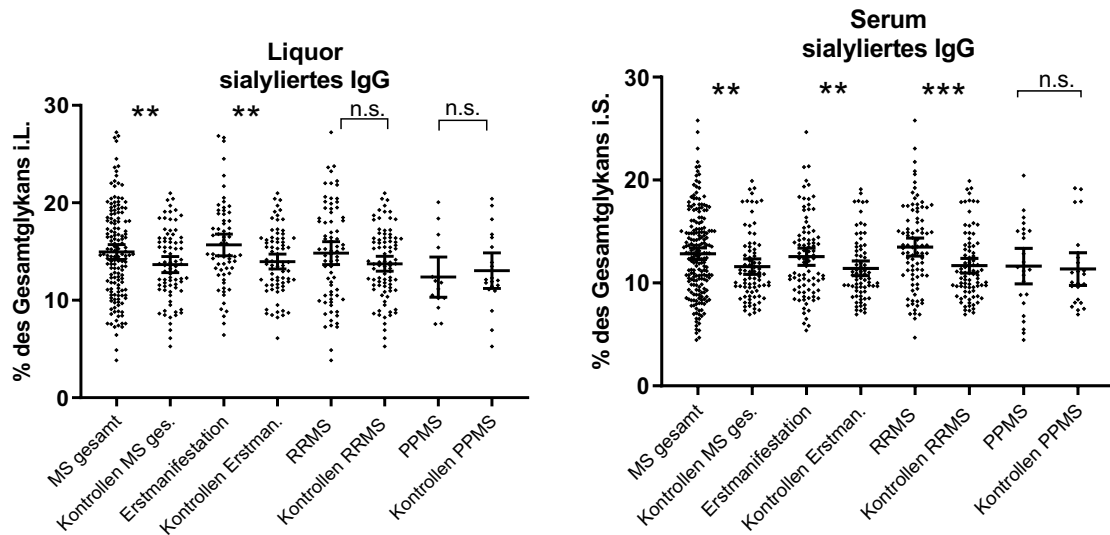
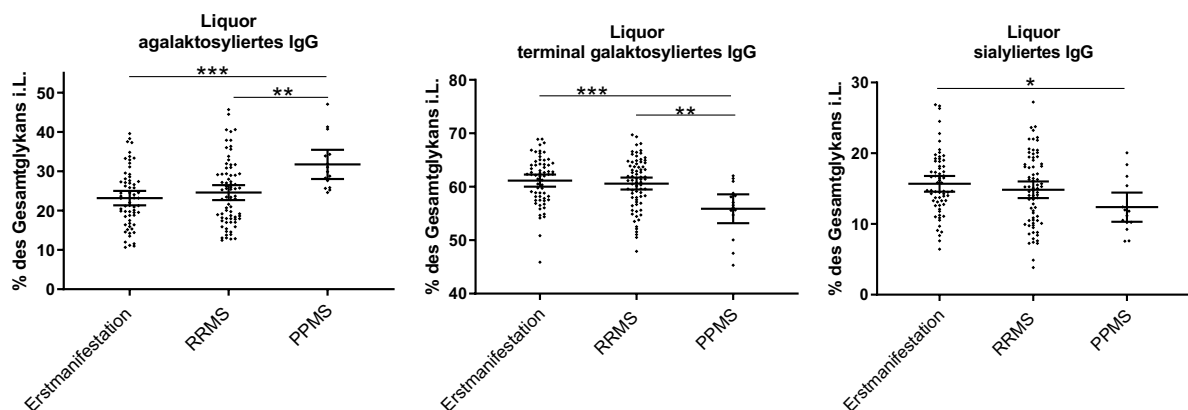


Abb. 8: Kieler Kohorte (Discovery-Kohorte): Vergleich der Glykoformen-Anteile am Gesamt-IgG-Fc-N-Glykan im Liquor (i.L.) (links) und im Serum (i.S.) (rechts) zwischen MS-Gesamtkohorte und Gesamtkontrollkohorte bzw. zwischen Gruppe mit MS-Verlaufsform und jeweiliger Kontrollkohorte. Angabe der Grundgesamtheit in Tab.2a. Darstellung: Mittelwert+95%-Konfidenzintervall. Statistik: One-way-ANOVA, post-hoc-Analyse, nicht signifikant = n.s., * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$, MS = Multiple Sklerose, RRMS = schubförmig-remittierende MS, PPMS = primär chronisch-progrediente MS, Erstman.=Erstmanifestation

4.2 Vergleich des IgG-Fc-Glykosylierungsmusters zwischen den MS-Verlaufsformen: Erstmanifestation, RRMS, PPMS

PPMS-Patienten zeigten gegenüber RRMS-Patienten und Patienten mit Erstmanifestation einen signifikant erhöhten G0-IgG-Anteil und einen signifikant verminderten term gal-IgG-Anteil i.L. und i.S. I.L. war der sial-IgG-Anteil gegenüber den Patienten mit Erstmanifestation signifikant erhöht. Zwischen Patienten mit Erstmanifestation und RRMS-Patienten ergaben sich keine signifikanten Unterschiede. (Abb. 9) Die einzelnen Kontrollkohorten (Erstmanifestation, RRMS, PPMS) unterschieden sich nicht signifikant in ihren Glykoformenanteilen i.L. oder i.S. (Anhang 3)



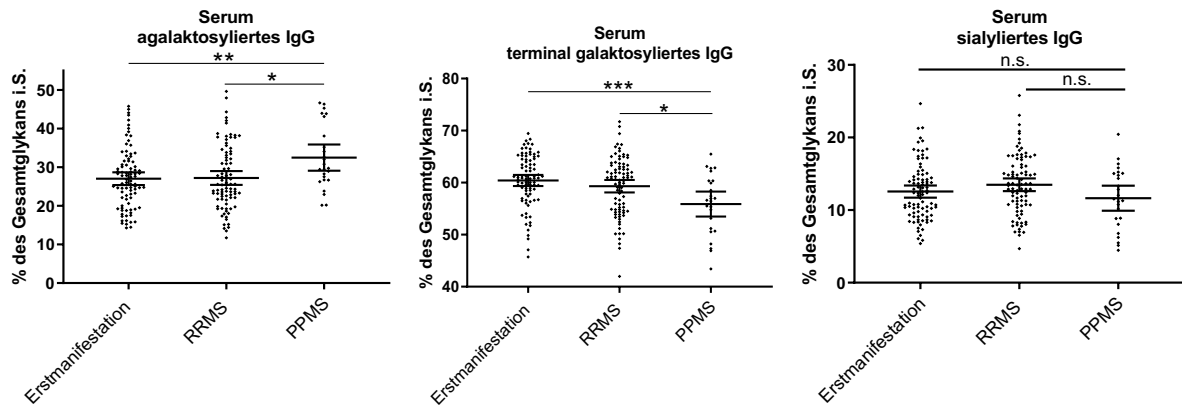
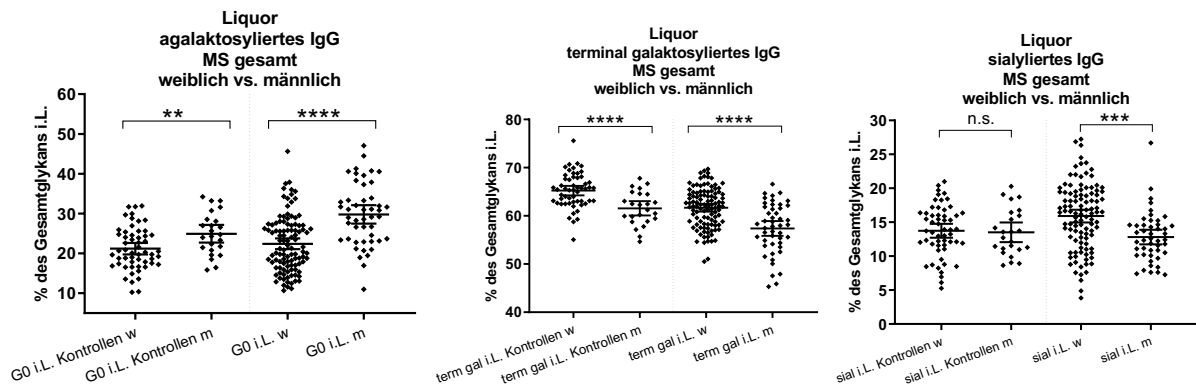


Abb. 9: Kieler Kohorte (Discovery-Kohorte): Vergleich der Glykoformen-Anteile am Gesamt-IgG-Fc-N-Glykan im Liquor (i.L.) (oben) und im Serum (i.S.) (unten) zwischen Patienten mit Erstmanifestation, RRMS = schubförmig-remittierender MS und PPMS = primär chronisch-progredienter MS. Beschreibung der Grundgesamtheit in Tab. 2a. Darstellung: Mittelwert+95%-Konfidenzintervall. Statistik: One-way-ANOVA mit post-hoc-Analyse, nicht signifikant = n.s., * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$

4.3 Geschlechtsabhängige Veränderungen des IgG-Fc-Glykosylierungsmusters

Es zeigten sich starke geschlechtsabhängige Veränderungen des IgG-Fc-Glykosylierungsmusters bei Kontrollen und Patienten i.L. und i.S. Sowohl bei Kontrollen als auch bei Patienten zeigten Männer einen signifikant gegenüber Frauen erhöhten G0-IgG-Anteil und einen signifikant verminderten terminal gal-IgG-Anteil. (Abb. 10 links, Mitte) Dabei war der G0-IgG-Anteil der Patientinnen i.S. signifikant höher als der der weiblichen Kontrollen ($p < 0,0001$) und der terminal gal-IgG-Anteil i.L. ($p < 0,0001$) und i.S. ($p < 0,0001$) signifikant niedriger. Der G0-IgG-Anteil der Patienten war i.L. ($p = 0,0078$) und i.S. ($p < 0,0001$) signifikant höher als der der männlichen Kontrollen und der terminal gal-IgG-Anteil i.L. ($p = 0,0008$) und i.S. ($p < 0,0001$) signifikant niedriger. Es zeigte sich kein Unterschied des sial-IgG-Anteils zwischen männlichen und weiblichen Kontrollen. Allerdings war der sial-IgG-Anteil der Patientinnen signifikant gegenüber dem der Patienten erhöht. (Abb. 10 rechts)



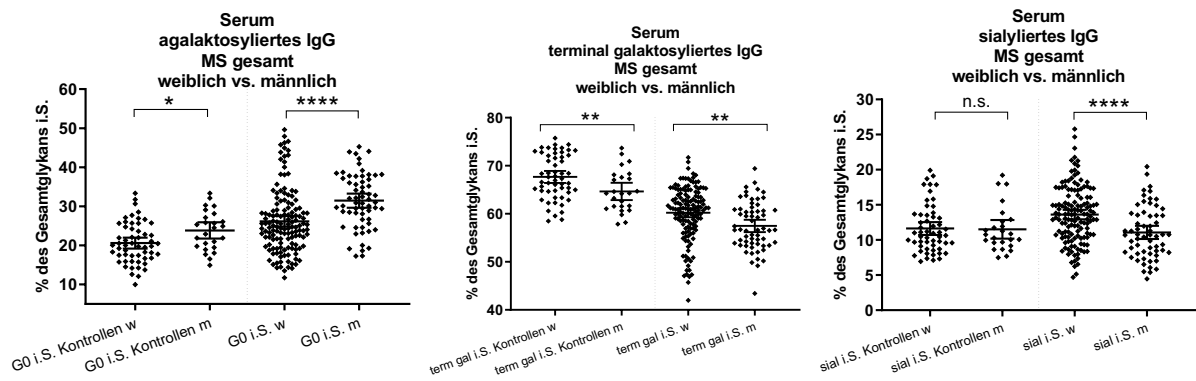
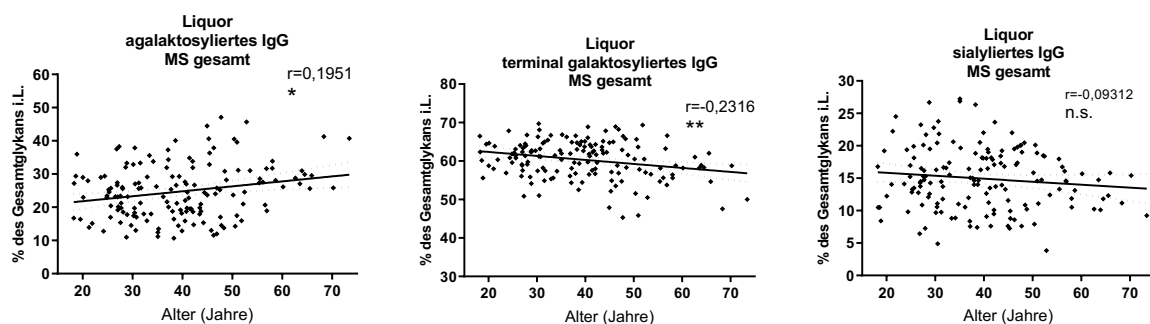


Abb. 10: Kieler Kohorte (Discovery Kohorte): Vergleich der Glykoformen-Anteile am Gesamt-IgG-Fc-N-Glykan im Serum (i.S.) (unten) und im Liquor (i.L.) (oben) zwischen weiblichen (w) und männlichen (m) Patienten bzw. weiblichen und männlichen Kontrollen. G0, term gal, sial i.L. und i.S. Kontrollen weiblich: n=55; Kontrollen männlich: n=25. G0, term gal, sial Patienten weiblich: i.S. n=139, i.L. n=106; G0, term gal, sial Patienten männlich: i.S. n=61, i.L. n=47. Darstellung: Mittelwert+95%-Konfidenzintervall. Statistik: zweiseitiger t-Test, nicht signifikant = n.s., * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$, MS= Multiple Sklerose, G0 = agalaktosylated IgG, term gal = terminal galaktosylated IgG, sial = sialylated IgG

4.4 Altersabhängige Veränderungen des IgG-Fc-Glykosylierungsmusters

Bei Kontrollen und Patienten zeigte sich ein Anstieg des G0-IgG-Anteils und ein Absinken des term gal-IgG-Anteils i.S. und i.L. mit steigendem Alter. Bei Patienten sank der sial-IgG-Anteil i.S. mit steigendem Alter. (Abb. 11a, b) Veränderungen des IgG-Fc-Glykosylierungsmusters mit steigendem Alter verliefen bei Patienten und Kontrollen gleichförmig ($p > 0,05$). Diese Veränderungen liefen bei Patienten aber auf einem unterschiedlichen Anteilsniveau der einzelnen Glykoformen ab ($p < 0,05$). Die Patienten hatten in jedem Alter signifikant höhere G0-IgG-Anteile i.S., niedrigere term gal-IgG-Anteile i.L. und i.S. und höhere sial-IgG-Anteile i.L. und i.S. als Kontrollen. Die Veränderung des G0-IgG-Anteils i.L. von Patienten und Kontrollen unterschied sich nicht signifikant. (Abb. 12)



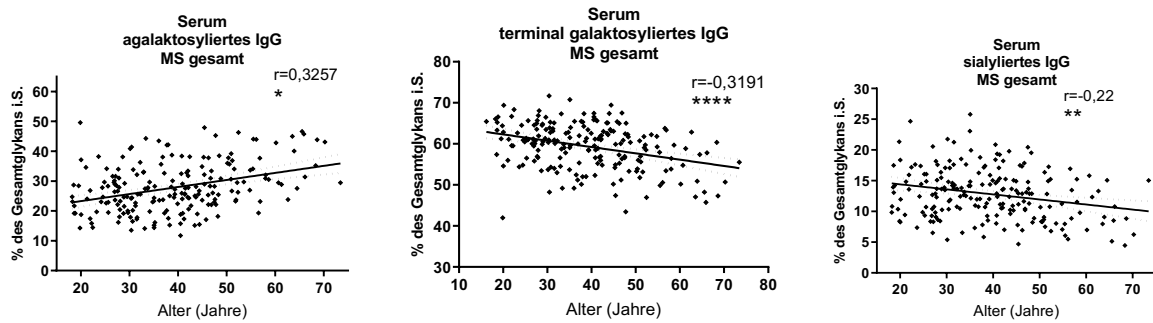


Abb. 11 a: Kieler Kohorte (Discovery-Kohorte): Korrelation von Alter zum Zeitpunkt der Liquorpunktion und Glykananteilen am Gesamt-IgG-Fc-N-Glykan im Liquor (i.L.) (oben) und im Serum (i.S.) (unten) bei Patienten. Beschreibung der Grundgesamtheit in Tab. 1a, 2a. Darstellung mit linearer Regressionsgeraden + 95%-Konfidenzintervall. Statistik: logarithmische Transformation des klinischen Parameters Alter zum LPZP, Korrelation mit Pearson-Korrelationskoeffizient (r), nicht signifikant = n.s., * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$

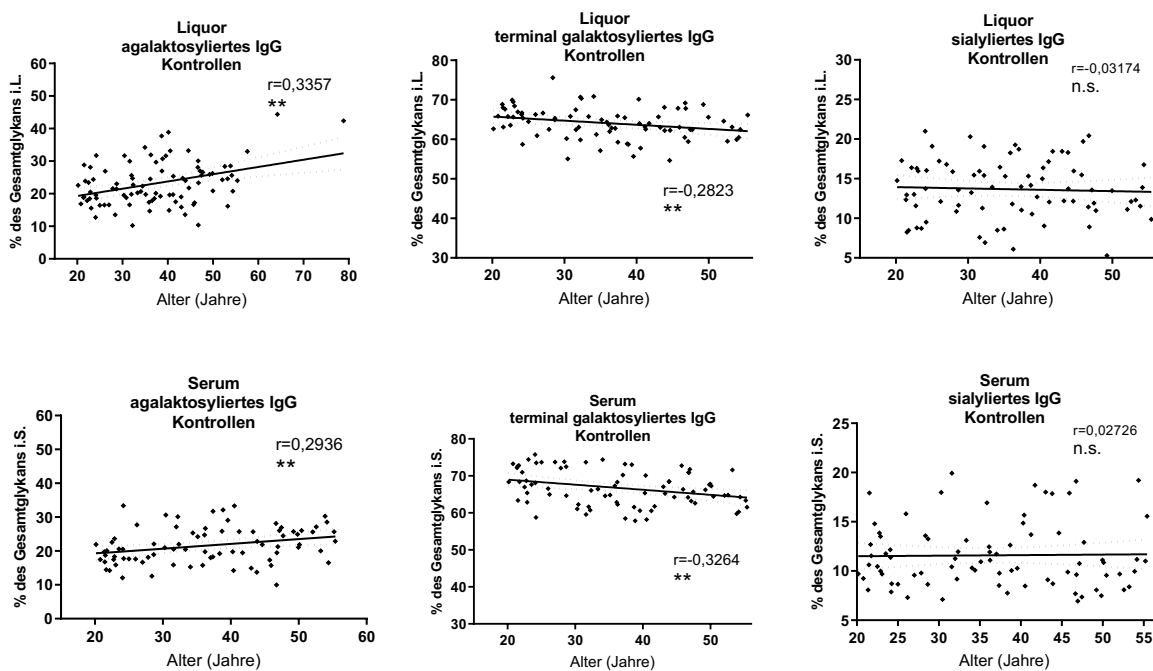


Abb. 11 b: Kieler Kontrollkohorte (Discovery-Kohorte): Korrelation von Alter zum Zeitpunkt der Liquorpunktion und Glykananteilen am Gesamt-IgG-Fc-N-Glykan im Liquor (i.L.) (oben) und im Serum (i.S.) (unten) bei Kontrollen. Beschreibung der Grundgesamtheit in Tab. 1a, 2a. Darstellung mit linearer Regressionsgeraden + 95%-Konfidenzintervall. Statistik: logarithmische Transformation des klinischen Parameters Alter zum LPZP, Korrelation mit Pearson-Korrelationskoeffizient (r), nicht signifikant = n.s., * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$

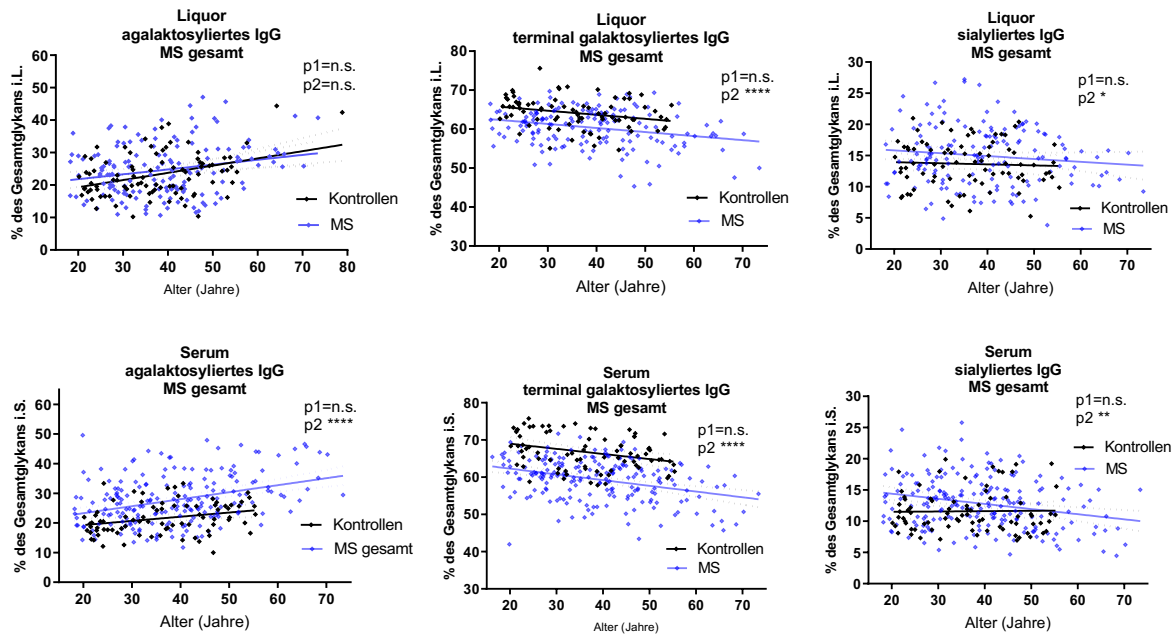


Abb. 12: Kieler Kohorte (Discovery-Kohorte): Vergleich der altersabhängigen Veränderung der Glykananteile am Gesamt-IgG-Fc-N-Glykan von Patienten und Kontrollen im Liquor (i.L.) und im Serum (i.S.). Darstellung mit linearer Regressionsgeraden + 95%-Konfidenzintervall. Beschreibung der Grundgesamtheit in Tab. 1a, 2a. Statistik: Vergleich der Steigung und Y-Achsenabschnitte der linearen Regressionsgeraden von Kontrollen und Patienten. MS = Multiple Sklerose, nicht signifikant = n.s., * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$; p1 = n.s. und p2 = signifikant bedeutet, Geraden unterscheiden sich nicht in der Steigung aber im y-Achsenabschnitt

4.5 Veränderungen des IgG-Fc-Glykosylierungsmusters in Abhängigkeit von Erkrankungsdauer und Behinderungsgrad

Der Behinderungsgrad zum LPZP gemessen anhand des EDSS-Scores korrelierte signifikant mit einem steigenden G0-IgG-Anteil und sinkenden term gal- und sial-IgG-Anteilen i.L. und i.S. (Abb.13). Mit steigendem MSSS – einer Erkrankungsdauer-korrigierten MS Schwereskala - stieg der G0-IgG-Anteil i.L. und i.S. und sank der term gal- und sial-IgG-Anteil i.S. signifikant. (Abb.14) Bei 129/210 MS-Patienten lagen follow-up-Daten vor. Es zeigte sich jedoch keine Korrelation mit der Progressionsrate des Behinderungsgrades gemessen anhand $(\Delta)EDSS/(\Delta)Zeit$ zwischen LPZP und follow-up. Es zeigte sich ein signifikanter Anstieg des G0-IgG-Anteils i.L. und ein signifikanter Abfall des term gal-IgG-Anteils i.L. und i.S. mit zunehmender Erkrankungsdauer (Abb. 15). So hatten Patienten mit einer Erkrankungsdauer >10 Jahren einen signifikant höheren G0-IgG-Anteil i.L. und niedrigeren term gal-IgG-Anteil i.L. und i.S. als Patienten mit einer Erkrankungsdauer <10 Jahren. Patienten mit einer Erkrankungsdauer >10 Jahren zeigten einen signifikant niedrigeren sial-IgG-Anteil als Patienten mit einer Erkrankungsdauer <10 Jahren. (Abb.16)

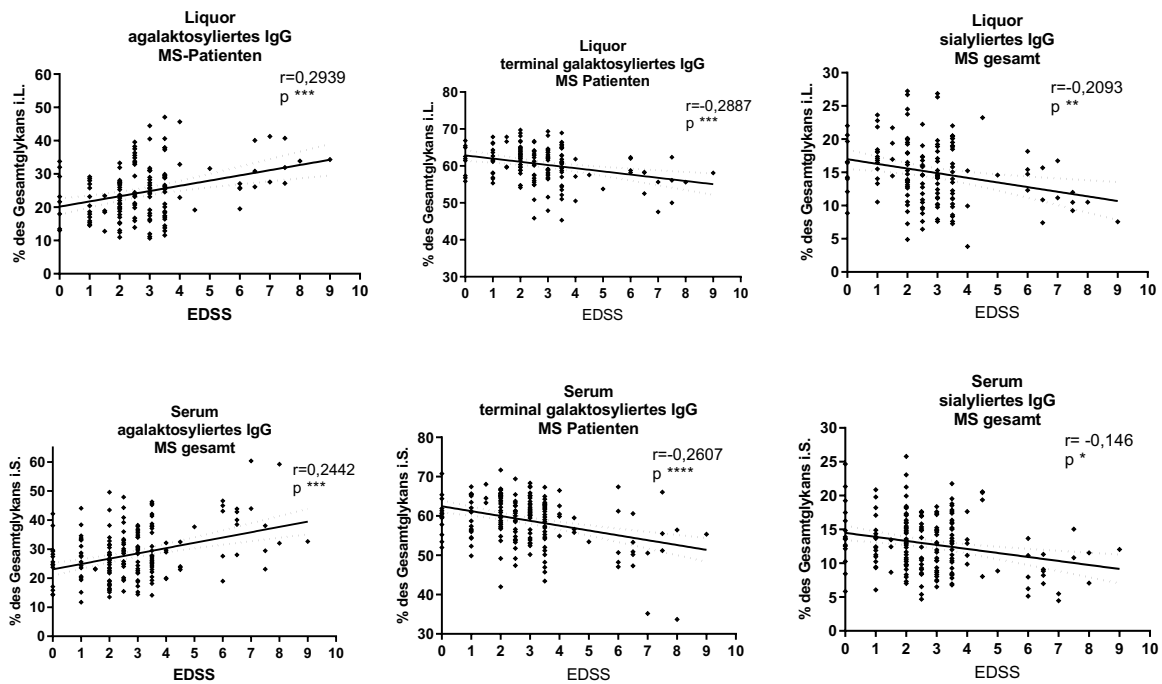


Abb. 13: Kieler Kohorte (Discovery-Kohorte): Korrelation von EDSS = expanded disability status scale zum Zeitpunkt der Liquorpunktion und Glykananteilen am Gesamt-IgG-Fc-N-Glykan im Liquor (i.L.) (oben) und im Serum (i.S.) (unten). Grundgesamtheit: i.L. Anzahl: $n=150$; i.S. $n=197$. Darstellung mit lin. Regressionsgeraden + 95%-Konfidenzintervall. Statistik: Korrelation mit Spearman-Rang-Korrelationskoeffizient (r). * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$, **** $p<0,0001$, MS = Multiple Sklerose

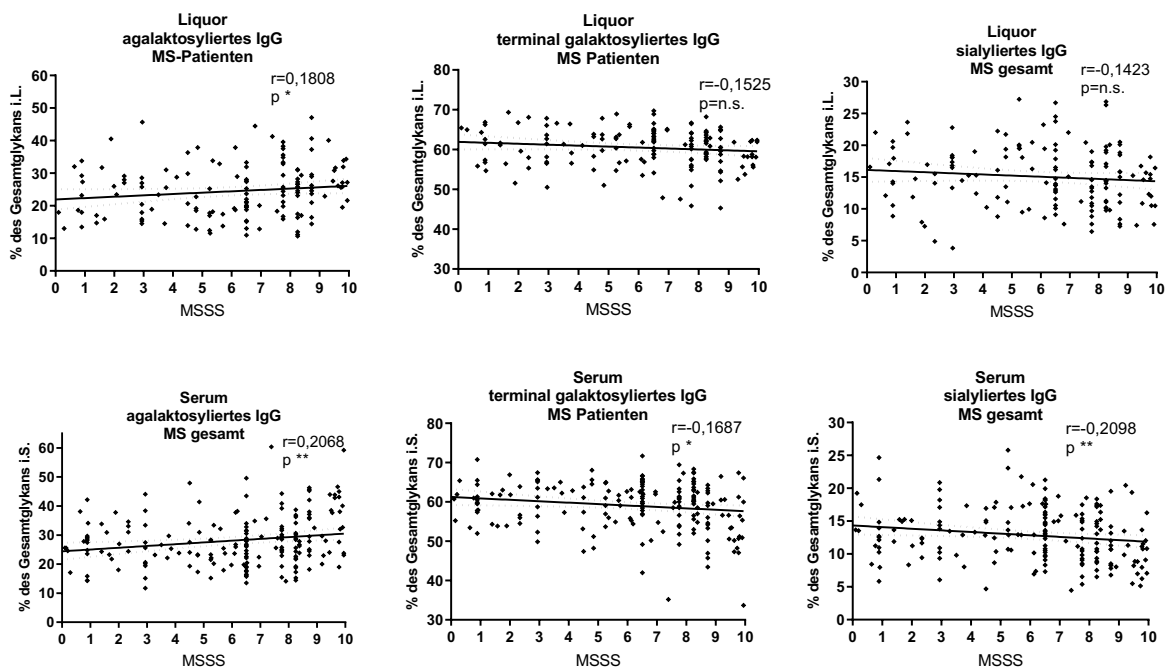


Abb. 14: Kieler Kohorte (Discovery-Kohorte): Korrelation von multiple sclerosis severity score = MSSS zum Zeitpunkt der Liquorpunktion und Glykananteilen am Gesamt-IgG-Fc-N-Glykan im Liquor (i.L.) (oben) und im Serum (i.S.) (unten): i.L. Anzahl: $n=149$; i.S. $n=196$. Darstellung mit lin. Regressionsgeraden + 95%-

Konfidenzintervall. Statistik: Korrelation mit Spearman-Rang-Korrelationskoeffizient (r). nicht signifikant = n.s., * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001, **** p<0,0001, MS = Multiple Sklerose

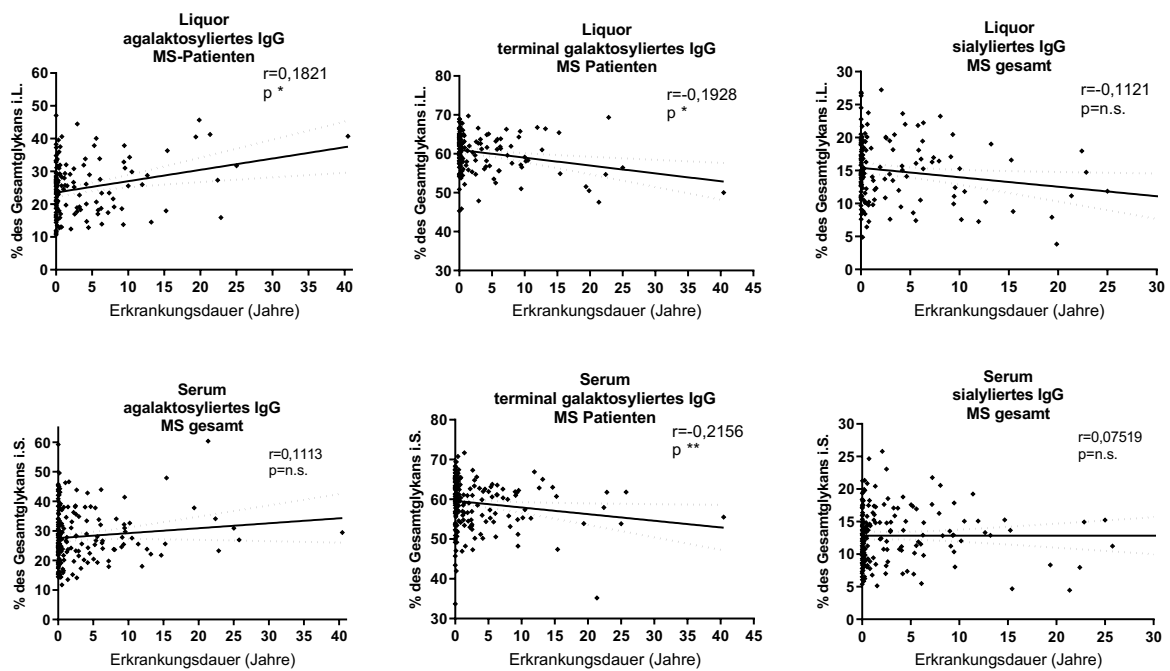
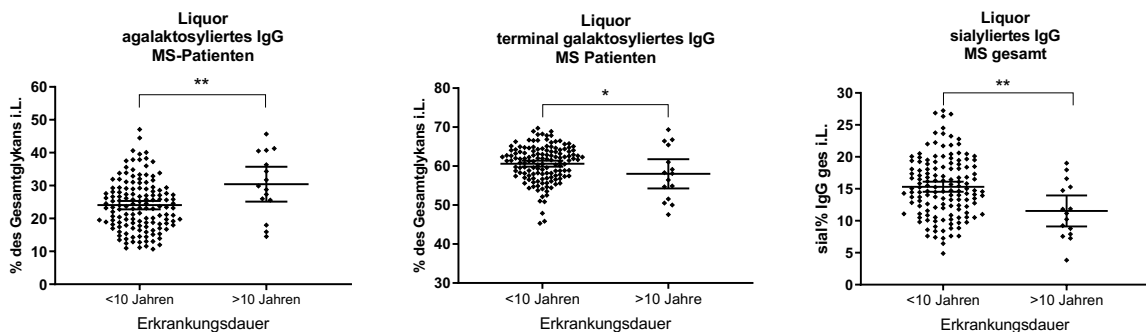


Abb. 15: Kieler Kohorte (Discovery-Kohorte): Korrelation der Erkrankungsdauer (in Jahren) zum Zeitpunkt der Liquorpunktion mit den Glykananteilen am Gesamt-IgG-Fc-N-Glykan im Liquor (i.L.) (oben) und im Serum (i.S.) (unten) Grundgesamtheit: i.L. Anzahl: n=148; i.S. n=192. Darstellung mit linearer Regressionsgeraden + 95%-Konfidenzintervall. Statistik: logarithmische Transformation des klinischen Parameters Erkrankungsdauer, Korrelation mit Pearson-Korrelationskoeffizient (r). nicht signifikant = n.s., * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001, **** p<0,0001, MS = Multiple Sklerose



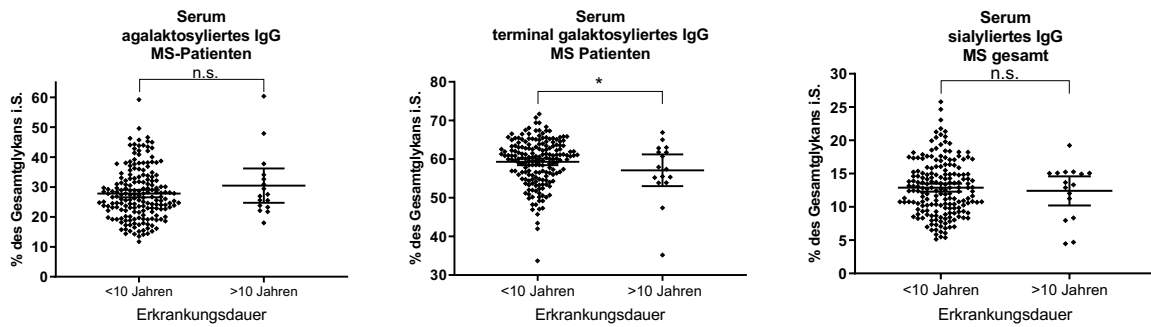


Abb. 16: Kieler Kohorte (Discovery-Kohorte): Vergleich der Glykananteile am Gesamt-IgG-Fc-N-Glykan im Liquor (i.L.) (oben) und im Serum (i.S.) (unten) von Patienten <10 Jahren und >10 Jahren Erkrankungsdauer zum Zeitpunkt der Liquorpunktion. n = Anzahl, i.L. <10 Jahre n=153, >10 Jahre n=15; i.S. <10 Jahre n=186, >10 Jahre n=16. Darstellung mit Mittelwert + 95%-Konfidenzintervall. Statistik: zweiseitiger t-Test. nicht signifikant = n.s., * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001, **** p<0,0001, MS = Multiple Sklerose

4.6 Veränderungen der IgG-Fc-Glykosylierung i.L. in Zusammenhang mit weiteren Liquorparametern

Ein Anstieg des Gesamteiweißes i.L., ein Anstieg der IgG-Konzentration i.L. und ein Anstieg des IgG-Quotienten ging mit einem signifikanten Anstieg des G0-IgG-Anteils und einem signifikanten Abfall des term gal- und sial-IgG-Anteils am Gesamt-IgG-Fc-Glykan i.L. einher. Bei den Kontrollen zeigten sich diese Zusammenhänge nicht. Es bestand keine Korrelation mit der Zellzahl i.L. und dem Vorhandensein von oligoklonalen Banden i.L. (Anhang 4 a-g).

4.7 Zusammenhang der IgG-Fc-Glykosylierung mit Schubereignissen

Es zeigte sich keine Korrelation der IgG-Fc-Glykosylierung i.L. und i.S. mit der Schubanzahl vor LPZP. (Anhang 5) Ein Patient galt als während eines akuten Schubes punktiert, wenn der letzte Schubbeginn innerhalb der letzten 6 Wochen vor LPZP lag und die klinische Symptomatik zum LPZP anhielt. Diese Patienten zeigten einen signifikant niedrigeren G0-IgG-Anteil (p=0,0131) und einen höheren term gal-IgG-Anteil (p=0,0121) i.L. als Patienten, die außerhalb eines akuten Schubes punktiert wurden. (Abb. 17) Um die zeitlichen Veränderungen genauer zu untersuchen, wurde die Glykosylierung von Patienten verglichen, deren letzter Schubbeginn innerhalb der letzten 2, 3 bzw. 9 Wochen vor LPZP lag und Patienten, deren letzter Schubbeginn außerhalb der letzten 2, 3 bzw. 9 Wochen vor LPZP lag. Bei diesen zeitlichen Grenzen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede der Glykananteile am Gesamt-IgG-Fc-N-Glykan i.L. oder i.S. (Anhang 6a-c) Es zeigte sich ein signifikanter Anstieg des G0-IgG-Anteils, sowie ein signifikanter Abfall des term gal-IgG- und sial-IgG-Anteils am Gesamt-IgG-Fc-Glykan i.L. aber nicht i.S. mit zunehmender Zeit seit dem letzten Schubbeginn. (Abb.18)

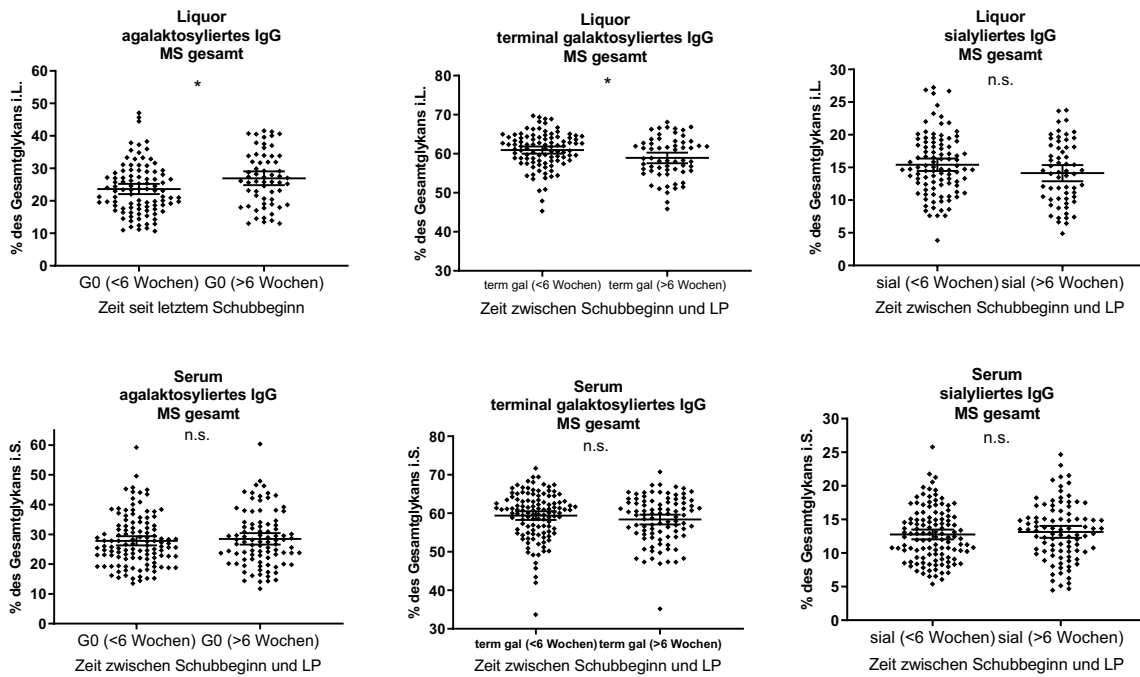


Abb. 17: Kieler Kohorte (Discovery-Kohorte): Unterschied der IgG-Fc-Glykosylierung im Liquor (i.L.) (oben) und im Serum (i.S.) (unten) von Patienten, die während, und Patienten, die außerhalb eines akuten Schubes liquorpunktiert wurden. n = Anzahl, i.L. <6 Wochen n=97, >6 Wochen n=60; i.S. <6 Wochen n=118; >6 Wochen n=92. Darstellung mit Mittelwert+95%-Konfidenzintervall. Statistik: zweiseitiger t-Test. nicht signifikant = n.s., * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001, **** p<0,0001, MS = Multiple Sklerose, LP = Liquorpunktion, G0 = agalaktosyated IgG, term gal = terminal galaktosylated IgG, sial = sialylyated IgG

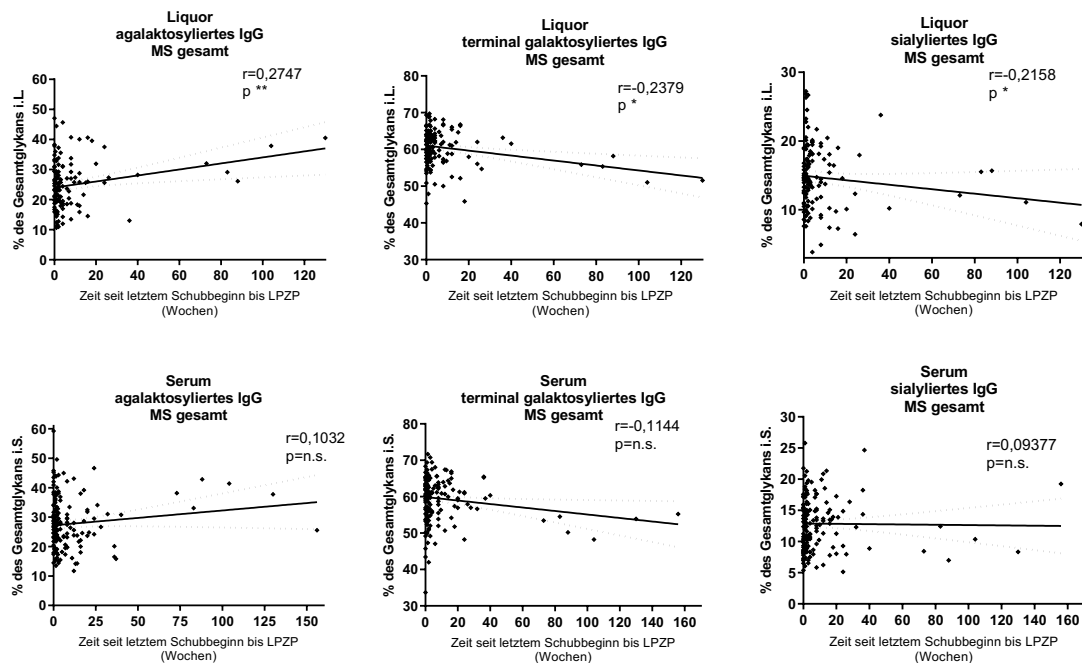


Abb. 18: Kieler Kohorte (Discovery-Kohorte): Korrelation der Glykananteile am Gesamt-IgG-Fc-N-Glykan im Liquor (i.L.) (oben) und im Serum (i.S.) (unten) mit der Zeit seit dem letzten Schubbeginn bis zum LPZP. n = Anzahl: i.L. n=107; i.S. n=136. Darstellung mit linearer Regressionsgeraden + 95%-Konfidenzintervall.

Statistik: logarithmische Transformation des klinischen Parameters Zeit seit dem letzten Schubbeginn, Korrelation mit Pearson-Korrelationskoeffizient (r). nicht signifikant = n.s., * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001, **** p<0,0001, MS = Multiple Sklerose, LPZP = Zeitpunkt der Liquorpunktion

4.8 Zusammenhang der IgG-Fc-Glykosylierung mit MRT-Läsionen

Es zeigte sich keine Assoziation von Veränderungen der Glykananteile am Gesamt-IgG-Fc-N-Glykan i.L. mit der Anzahl an T2-Läsionen im MRT (Anhang 7a), mit dem Vorhandensein von akut entzündlichen Gadolinium-aufnehmenden T1-Läsionen im MRT im Zeitraum von 2 Wochen vor und 2 Wochen nach LPZP (Anhang 7c), oder dem Vorhandensein hypointenser T1-Läsionen (black holes). Nur bei 112 von 222 Patienten waren MRT-Daten aus diesem Zeitraum um den LPZP verfügbar. Von 110 Patienten waren MRT-Daten von einem späteren Zeitpunkt verfügbar, deren Analyse im Zusammenhang mit der IgG-Fc-Glykosylierung i.L. jedoch auch keine signifikante Assoziation zeigte. (Anhang 7b, d)

4.9 Zusammenhang der IgG-Fc-Glykosylierung mit einer Therapie vor dem Zeitpunkt der Liquorpunktion

33/210 Patienten hatten vor LPZP bereits eine Therapie erhalten, davon 24 eine Cortisontherapie, 6 eine Cortisontherapie und eine Immuntherapie und 3 ausschließlich eine Immuntherapie. Bei 3 Patienten war die Medikamentenanamnese unbekannt. Therapierte Patienten zeigten einen signifikant höheren G0-IgG-Anteil, niedrigeren term gal-IgG-Anteil und niedrigeren sial-IgG-Anteil i.L. als nicht therapierte Patienten. (Abb.19) Diese Unterschiede zeigten sich nicht i.S. (Anhang 8)

19/210 Patienten erhielten zum LPZP eine Therapie. 15/20 Patienten erhielten im Zeitraum von 6 Wochen vor LPZP eine Cortisontherapie. 4/20 Patienten eine Intervalltherapie, davon einer Interferon-beta, einer Glatirameracetat, einer Fingolimod und einer Natalizumab. Der Vergleich der Glykananteile am Gesamt-IgG-Fc-N-Glykan i.L. und i.S. von Patienten mit und ohne Therapie zum LPZP ergab keinen signifikanten Unterschied. Der Vergleich von Patienten mit Intervalltherapie und mit Cortisontherapie zum LPZP ist wegen der geringen Anzahl an Patienten mit Intervalltherapie nicht aussagekräftig. (Anhang 9)

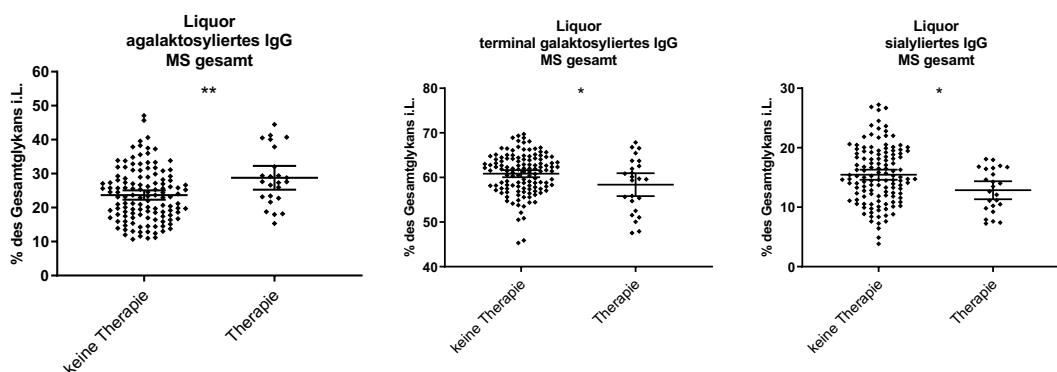


Abb.19: Kieler Kohorte (Discovery Kohorte): Unterschied der Glykananteile am Gesamt-IgG-Fc-N-Glykan im Liquor (i.L.) von Patienten, die vor dem Zeitpunkt der Liquorpunktion (LPZP) keine Therapie erhalten haben (n=174) und Patienten, die bereits therapiert wurden (Cortisontherapie, Intervalltherapie) (n=33) (bezogen auf Zeit >6 Wochen vor LPZP), Darstellung mit Mittelwert+95%-Konfidenzintervall. Statistik: zweiseitiger t-Test. nicht signifikant = n.s., * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001, **** p<0,0001, , MS = Multiple Sklerose

5 Ergebnisse der Hamburger Kohorte (Validations-Kohorte)

Zur Bestätigung oder Widerlegung der beobachteten Daten in der monozentrischen „Kieler Kohorte“ wurde eine unabhängige Kohorte (Hamburger Kohorte) als Bestätigungs-Kohorte rekrutiert.

5.1 Unterschiede der IgG-Fc-Glykosylierung zwischen Patienten und Kontrollen

In der Hamburger Validations-Kohorte bestanden im Gegensatz zu der Kieler Discovery-Kohorte keine signifikanten Unterschiede der Glykananteile i.S. von Patienten und Kontrollen, weder bei der PPMS-, noch bei der RRMS-Gruppe. Sämtliche Mittelwerte und Standardabweichungen sind in Tabelle 2b dargestellt und graphisch in den Abbildungen 20 und 21. (Vgl. Kieler Kohorte: Abb. 8)

Tabelle 2b: Anteile der einzelnen Glykoformen am Gesamt-IgG-Fc-N-Glykan im Serum (i.S.) und im Liquor (i.L.) der Hamburger Patienten- und Kontrollkohorte in %. Angabe mit Mittelwert (Standardabweichung), n = Anzahl, RRMS = schubförmig-remittierende MS, PPMS = primär chronisch-progrediente MS, G0 = agalactosylated IgG, term gal = terminal galaktosylated IgG, sial = sialylated IgG

<u>Kohorte</u>	<u>G0 i.S.</u>	<u>term gal. i.S.</u>	<u>sial i.S.</u>
Kontrollen (RRMS) n=71 Seren	21,8% (6,8)	64,3% (4)	14% (4,2)
RRMS n=118 Seren	21,2% (5,9)	64,4% (3,6)	14,4% (4)
<i>Signifikanz</i>	<i>p=0,5</i>	<i>p=0,8</i>	<i>p=0,5</i>
Kontrollen (PPMS) n=33 Seren	24,7% (7,6)	62,9% (5,1)	12,4% (4)
PPMS n=80 Seren	24,3% (6,2)	63,2% (4,73)	12,4% (2,74)
Signifikanz	p=0,8	p=0,7	p=0,95

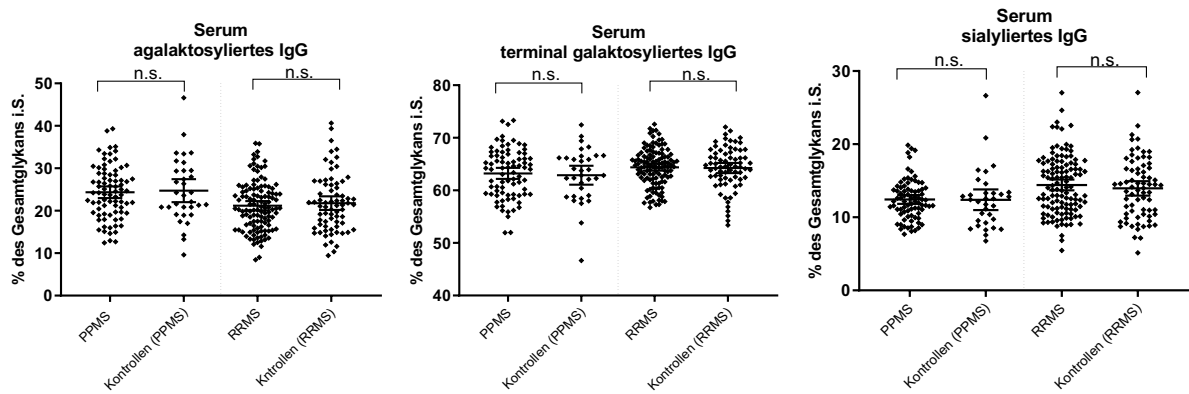


Abb.20: Hamburger Kohorte (Validations-Kohorte): Vergleich der Glykananteile am Gesamt-IgG-Fc-Glykan im Serum (i.S.) von PPMS- bzw. RRMS- Patienten- und Kontrollkohorten (PPMS vs. Kontrollen PPMS, RRMS vs. Kontrollen RRMS). Grundgesamtheit siehe Tab. 2b. Darstellung mit Mittelwert+95%-Konfidenzintervall. Zweiseitiger t-Test, n.s.=nicht signifikant, PPMS = primär chronisch-progrediente MS, RRMS = schubförmig-remittierende MS

5.2 Vergleich der IgG-Fc-Glykosylierung zwischen RRMS- und PPMS-Patienten

Wie in der Kieler Kohorte zeigte sich ein signifikant erhöhter G0-IgG-Anteil und ein signifikant verminderter term gal- und sial-IgG-Anteil am Gesamt-IgG-Fc-Glykan i.S. bei PPMS- gegenüber RRMS-Patienten. Zwischen den beiden jeweiligen Kontrollkohorten ergaben sich keine signifikanten Unterschiede der IgG-Fc-Glykosylierung i.S. (Abb. 21, Vgl. Kieler Kohorte: Abb. 9)

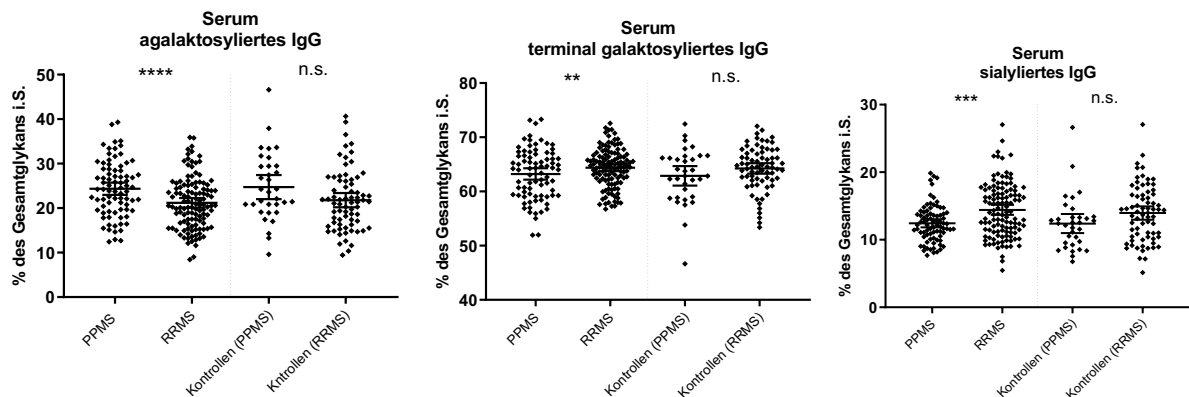


Abb. 21: Hamburger Kohorte (Validations-Kohorte): Vergleich der Glykananteile am Gesamt-IgG-Fc-Glykan im Serum (i.S.) von PPMS und RRMS-Patienten bzw. von Kontrollen (PPMS) und Kontrollen (RRMS). Grundgesamtheit siehe Tab. 2b. Darstellung mit Mittelwert+95%-Konfidenzintervall, Statistik: zweiseitiger T-Test, nicht signifikant = n.s., ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$; PPMS = primär chronisch-progrediente MS, RRMS = schubförmig-remittierende MS

5.3 Vergleich der Kieler Discovery- und der Hamburger Validationskohorte

Die Kieler PPMS- bzw. RRMS-Patienten zeigten signifikant erhöhte G0-IgG-Anteile gegenüber den Hamburger PPMS- bzw. RRMS-Patienten. (Abb. 22 oben links) Diese Unterschiede lagen zwischen den Kontrollkohorten nicht vor. (Abb. 22 unten links) Während der G0-IgG-Anteil bei den Kieler Patienten besonders erhöht war, lagen die G0-IgG-Anteile der Hamburger Patienten, Hamburger Kontrollen und Kieler Kontrollen bei ähnlich niedrigeren Werten. Die Kieler PPMS- bzw. RRMS-Patienten zeigten außerdem signifikant verminderte term gal-IgG-Anteile gegenüber den Hamburger PPMS- bzw. RRMS-Patienten. (Abb. 22 oben mittig) Die term gal-IgG-Anteile der Kieler PPMS- bzw. RRMS-Kontrollen waren signifikant gegenüber den Hamburger Kontrollen erhöht. (Abb. 22, unten mittig) Die sial-IgG-Anteile der Hamburger RRMS-Patienten, Hamburger RRMS-Kontrollen und Kieler RRMS-Patienten zeigten ähnliche Werte. (Abb.22 rechts)

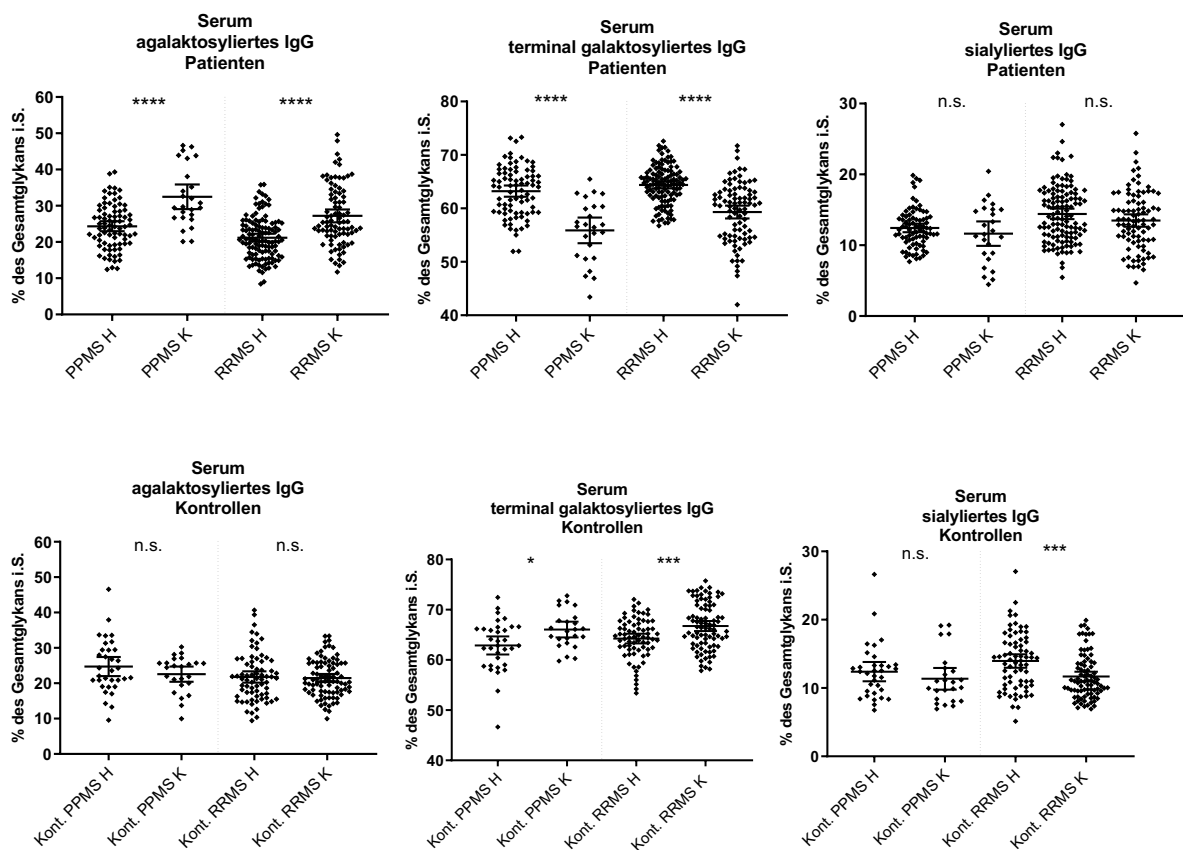


Abb.22: Vergleich Glykananteile am Gesamt-IgG-Fc-Glykan im Serum (i.S.) von Kieler versus Hamburger Patienten (oben) und Kieler versus Hamburger Kontrollen (unten) Grundgesamtheit siehe Tab. 2a,b. Darstellung mit Mittelwert+95%-Konfidenzintervall. Statistik: zweiseitiger t-Test. nicht signifikant = n.s., *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$, Kont. = Kontrollen, PPMS = primär chronisch-progrediente MS, RRMS = schubförmig-remittierende MS, H = Hamburger Kohorte, K = Kieler Kohorte

5.4 Altersabhängige Veränderungen des IgG-Fc-Glykosylierungsmusters

Die Hamburger Kohorte zeigte mit steigendem Alter einen signifikanten Anstieg des G0-IgG-Anteiles und Abfall des term gal- und sial-IgG-Anteils bei Patienten und Kontrollen. Die altersabhängige Veränderung der IgG-Fc-Glykosylierung unterschied sich zwischen Patienten und Kontrollen nicht signifikant. (Abb. 23, Vgl. Kieler Kohorte: Abb. 12)

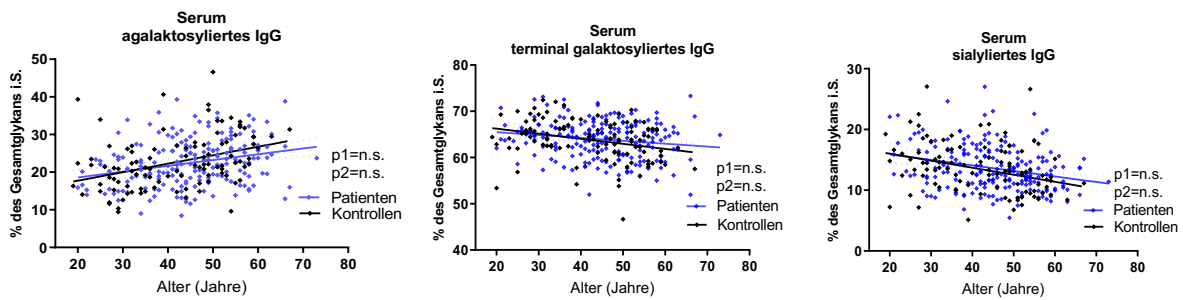


Abb. 23: Hamburger Kohorte (Validations-Kohorte): Vergleich der altersabhängigen Veränderung der IgG-Fc-Glykosylierung von Patienten und Kontrollen im Serum (i.S.). n = Anzahl: Patienten n=198, Kontrollen n=104. Darstellung mit linearer Regressionsgeraden + 95%-Konfidenzintervall. Statistik: Vergleich der Steigung und Y-Achsenabschnitte der lin. Regressionsgeraden von Kontrollen und Patienten, MS = Multiple Sklerose, n.s.=nicht signifikant, p1 = n.s. und p2 = n.s. bedeutet, Geraden unterscheiden sich nicht in der Steigung und nicht im y-Achsenabschnitt

5.5 Geschlechtsspezifische Unterschiede des IgG-Fc-Glykosylierungsmusters

In der Hamburger Kohorte zeigten die Kontrollen keine signifikanten geschlechtsspezifischen Unterschiede des IgG-Fc-Glykosylierungsmusters. Bei den Patienten war der G0-IgG-Anteil von Männern gegenüber Frauen signifikant erhöht und der sial-IgG-Anteil signifikant vermindert. (Abb. 24, Vgl. Kieler Kohorte: Abb. 10)

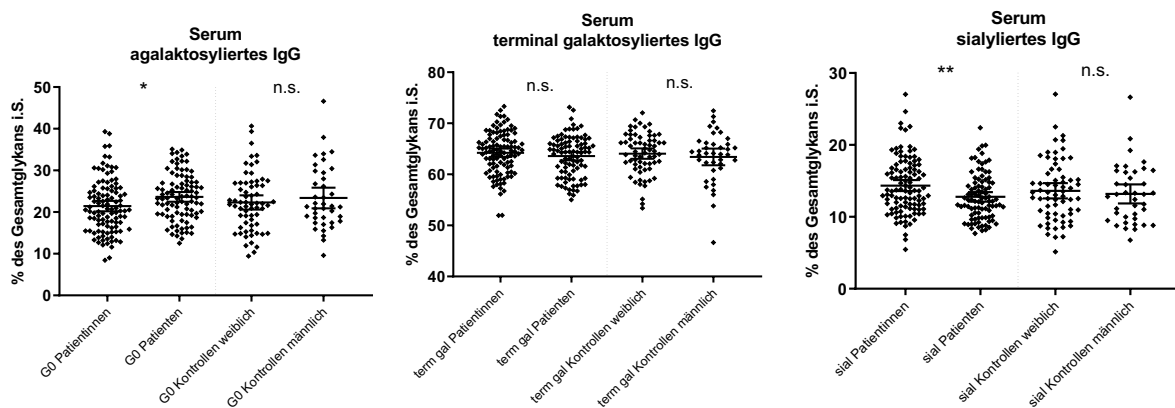


Abb. 24: Hamburger Kohorte (Validations-Kohorte): Vergleich der Glykan-Anteile am Gesamt-IgG-Fc-N-Glykan im Serum (i.S.) zwischen weiblichen und männlichen Patienten bzw. Kontrollen. n = Anzahl: Kontrollen weiblich n=65; Kontrollen männlich n=39; Patientinnen n=106, Patienten n=92. Darstellung mit

Mittelwert+95%-Konfidenzintervall. Statistik: zweiseitiger t-Test. nicht signifikant = n.s., * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$, G0 = agalaktosyliertes IgG, term gal = terminal galaktosyliertes IgG, sial = sialyliertes IgG

5.6 Veränderungen des IgG-Fc-Glykosylierungsmusters im Zusammenhang mit Erkrankungsdauer und Behinderungsgrad

Mit steigendem Behinderungsgrad gemessen anhand des EDSS stieg der G0-IgG-Anteil i.S. der Hamburger Kohorte signifikant an und der sial-IgG-Anteil fiel signifikant ab. (Abb. 26, Vgl. Kieler Kohorte: Abb.13) Der G0-IgG-Anteil stieg ebenfalls mit steigender Erkrankungsdauer signifikant an, der sial-IgG-Anteil fiel signifikant ab. (Abb. 25, Vgl. Kieler Kohorte: Abb. 15)

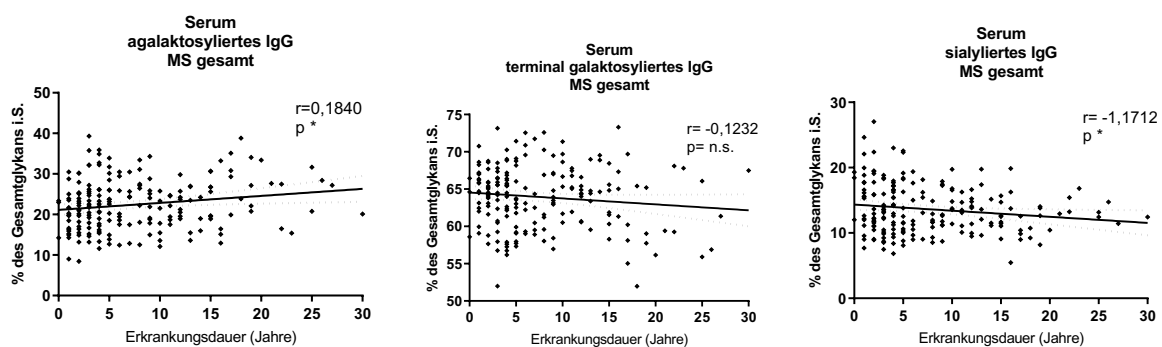


Abb. 25: Hamburger Kohorte (Validationskohorte): Korrelation von Erkrankungsdauer zum Zeitpunkt der Liquorpunktion und Glykananteilen am Gesamt-IgG-Fc-N-Glykan im Serum (i.S.) $n=198$. Darstellung mit linearer Regressionsgeraden + 95%-Konfidenzintervall. Statistik: logarithmische Transformation des klinischen Parameters Erkrankungsdauer, Korrelation mit Pearson-Korrelationskoeffizient= r , nicht signifikant = n.s., * $p < 0,05$, MS = Multiple Sklerose

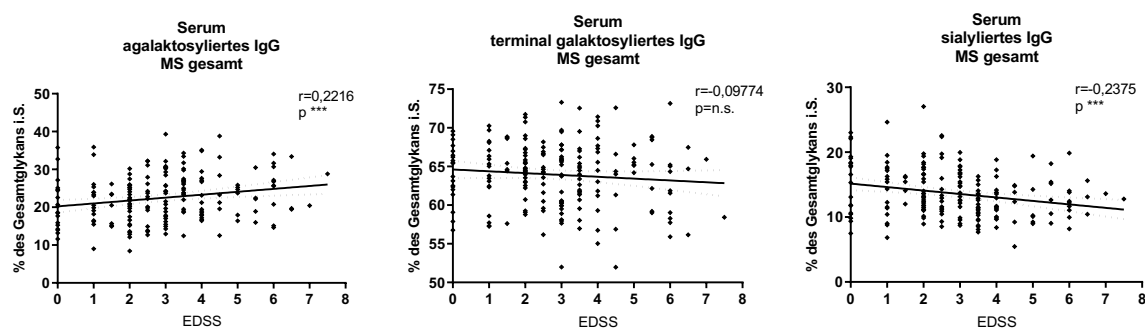


Abb. 26: Hamburger Kohorte (Validations-Kohorte): Korrelation von expanded disability status scale (EDSS) zum Zeitpunkt der Liquorpunktion und Glykananteilen am Gesamt-IgG-Fc-N-Glykan im Serum (i.S.), $n=198$. Darstellung mit linearer Regressionsgeraden + 95%-Konfidenzintervall. Statistik: Korrelation mit Spearman-Rang-Korrelationskoeffizient (r). n.s.=nicht signifikant, *** $p < 0,001$, MS = Multiple Sklerose

6 Diskussion

6.1 Zusammenfassung der Hauptergebnisse

Zusammenfassend zeigten sich in unseren Untersuchungen der Kieler Kohorte (Discovery-Kohorte) sieben Hauptbefunde. (1) Die IgG-Fc-Glykosylierung veränderte sich bei Patienten und Kontrollen alters- und geschlechtsabhängig. (2) MS-Patienten zeigten signifikante proinflammatorische Veränderungen der IgG-Fc-Glykosylierung im Vergleich zu gesunden Kontrollen. (3) Diese Veränderungen zeigten sich nicht nur i.L., sondern auch i.S. (4) Sie waren bei PPMS-Patienten deutlich stärker ausgeprägt als bei RRMS-Patienten und Patienten mit Erstmanifestation. (5) Sie korrelierten mit steigender Erkrankungsdauer, steigendem Behinderungsgrad und Liquorparametern (Gesamteiweiß i.L., Gesamt-IgG i.L., IgG-Quotient). (6) Die proinflammatorischen Veränderungen zeigten sich in einer Zunahme des G0-IgG-Anteils und in einer Abnahme des term gal-IgG-Anteils. Der sial-IgG-Anteil war fast bei allen untersuchten Parametern nicht signifikant aber mit ähnlicher Tendenz wie der term gal-IgG-Anteil verändert. (7) Es zeigten sich keine signifikanten Zusammenhänge der IgG-Fc-Glykosylierung mit der Anzahl der Erkrankungsschübe vor LPZP, mit dem Vorliegen eines akuten Schubes zum LPZP, mit der Zeit zwischen letztem Schubbeginn und LPZP, mit der Läsionslast und dem Vorhandensein akuter kontrastmittelanreichernder Läsionen im MRT oder mit der Therapieform zum LPZP oder mit einer vorherigen Therapie.

Die Ergebnisse der Kieler Kohorte konnten in der Hamburger Validationskohorte teilweise bestätigt werden. Die Unterschiede im IgG-Fc-Glykosylierungsmuster zwischen PPMS- und RRMS-Patienten (ad 4) und die Korrelation proinflammatorischer Glykoformen mit der Erkrankungsdauer und dem Behinderungsgrad (ad 5) zeigten sich auch in der Validationskohorte. Die proinflammatorischen Veränderungen zeigten sich wie in der Kieler Kohorte in einer signifikanten Zunahme des G0-IgG-Anteils, allerdings begleitet durch eine signifikante Abnahme des sial- und nicht des term gal-IgG-Anteils. Der term gal-IgG-Anteil war fast bei allen untersuchten Parametern nicht signifikant aber mit ähnlicher Tendenz wie der sial-IgG-Anteil verändert. (ad 6)

Es zeigten sich allerdings auch bedeutende Unterschiede. Die IgG-Fc-Glykosylierung i.S. unterschied sich nicht signifikant zwischen Patienten und Kontrollen. (ad 2 bzw. 3) Die geschlechtsabhängigen Veränderungen zeigten sich nur bei Patienten, nicht bei Kontrollen. (ad 1)

6.2 Wodurch können die unterschiedlichen Beobachtungen zwischen der Kieler und der Hamburger Kohorte bedingt sein?

Es ergaben sich deutliche Unterschiede in den IgG-Fc-Glykosylierungswerten zwischen der Kieler Discovery-Kohorte und der Hamburger Validationskohorte. Das deutlich proinflammatorisch veränderte IgG-Fc-Glykosylierungsmuster bei Patienten im Vergleich zu Kontrollen zeigte nur die Kieler Kohorte. (Abb. 8) In der Hamburger Kohorte zeigten sich solche signifikanten Unterschiede zwischen Patienten und Kontrollen nicht. (Abb. 20) Das IgG-Fc-Glykosylierungsmuster der Patienten

der Kieler Kohorte war nicht nur im Vergleich zu Kieler Kontrollen, sondern auch im Vergleich zu den Hamburger Patienten deutlich proinflammatorisch verändert. (Abb. 22)

Können die beobachteten Unterschiede durch die Art der Patientenrekrutierung bedingt sein?

Die Patientenrekrutierung der Kieler Discovery-Kohorte erfolgte anhand einer ICD-Code-basierten Diagnosesuche in den Jahren von 2006-2016. Jeder Patient, der die Einschlusskriterien erfüllte, wurde in die Studie eingeschlossen. Die Liquor- und Serumproben stammen aus den Jahren 1998-2016. Für die Hamburger Validationskohorte wurden Patienten mit PPMS und RRMS zwischen 2010 und 2018 mit dem Ziel rekrutiert, eine in Alter und Geschlecht mit der Kieler Kohorte gematchte Kohorte zusammenzustellen. Die Hamburger Validationskohorte insgesamt sowie jeweils die RRMS- und PPMS-Kohorte zeigen jedoch ein signifikant höheres Alter als die Kieler Discovery-Kohorte. Der Frauenanteil unterscheidet sich zwischen der Hamburger und der Kieler RRMS-Kohorte nicht signifikant, ist aber in der Hamburger PPMS-Kohorte signifikant niedriger als in der Kieler PPMS-Kohorte. Bei der Rekrutierung der Hamburger Patientenkohorten erfolgte keine Selektion bezüglich weiterer Parameter wie Erkrankungsdauer und Erkrankungsschwere. Die Hamburger PPMS- und RRMS-Patienten zeigen eine signifikant längere Erkrankungsdauer als die Kieler Patienten. Der EDSS der Kieler RRMS-Kohorte ist signifikant höher als der der Hamburger RRMS-Kohorte. (s. Abschnitt 4.1, Tab. 1c)

Welche Rolle könnten Umweltfaktoren bezüglich der Unterschiede spielen?

Es ist bekannt, dass die IgG-Fc-Glykosylierung stark mit Umweltfaktoren assoziiert ist, darunter besonders mit Alter und Geschlecht. (Russell et al. 2018, S.402) In dieser Studie konnte dieser Zusammenhang bestätigt werden. Es zeigte sich ein proinflammatorischeres Glykosylierungsmuster mit steigendem Alter (s. Abschnitt 5.4) und bei Männern im Vergleich zu Frauen (s. Abschnitt 5.3) bei MS-Patienten und Kontrollpatienten der Kieler Kohorte und bei MS-Patienten der Hamburger Kohorte. Um starke Veränderungen dieses Biomarkers im Zusammenhang mit Umweltfaktoren als Störfaktor auszuschließen wurden die Kontrollkohorten mit Anpassung an die Alters- und Geschlechtsverteilung der MS-Kohorten zusammengestellt, sodass sie sich in diesen Punkten nicht signifikant unterscheiden. Allerdings unterscheiden sich die Kieler und die Hamburger Patientenkohorten signifikant in diesen Punkten. (Tab. 1c) Weiterhin ist die IgG-Fc-Glykosylierung mit dem Raucherstatus, Alkoholkonsum, Ernährung, sportlicher Betätigung, Body-Mass-Index, Plasmalipidprofil, Blutdruck, Nüchternblutzucker, Medikamenten, Hormonhaushalt und Schwangerschaft und weiteren Faktoren assoziiert. (Russell et al. 2018, S.12-13) Die Unterschiede in der Alters- und Geschlechtsverteilung, sowie weitere Unterschiede in relevanten Umweltfaktoren, die in dieser Studie nicht erhoben wurden, sind sicherlich eine Ursache für die unterschiedlichen Beobachtungen zwischen der Kieler Discovery- und der Hamburger Validationskohorte, können aber nicht allein durch sie erklärt werden. Denn

aufgrund der Ergebnisse dieser Studie, dass bei höherem Alter und bei männlichem Geschlecht ein proinflammatorischeres IgG-Fc-Glykosylierungsmuster vorliegt, wäre ein proinflammatorischeres IgG-Fc-Glykosylierungsmuster bei der Hamburger Patientenkohorte im Vergleich zu der Kieler Patientenkohorte zu erwarten gewesen.

Welche Rolle könnten Unterschiede im Umgang mit dem Biomaterial spielen?

Die Liquor- und Serumproben, die in dieser Studie verwendet wurden, wurden den Patienten zu diagnostischen Zwecken entnommen und Teile davon zu Studienzwecken in den Biobanken des Instituts für klinische Chemie des UKSH Kiel und des INIMS des UKE Hamburg bei -80°C tiefgefroren gelagert. Das Biomaterial der Hamburger Kohorte stammt aus den Jahren 2010-2016. Das Biomaterial der Kieler Kohorte stammt aus den Jahren 1998-2016. Viele Liquor- und Serumproben waren also bis zu 12 Jahre länger als andere Proben tiefgefroren gelagert. Weiterhin ist Biomaterial solcher Biobanken auch für andere Studien zugänglich und wird zu der Entnahme von Probenanteilen aufgetaut und danach wieder eingefroren. Es ist nicht bekannt, inwieweit sich die IgG-Fc-Glykosylierung in Abhängigkeit von Aufbewahrungszeit und Temperaturschwankungen durch mehrfaches Einfrieren und Auftauen verändert. Diese Faktoren retrospektiv in die Auswertung mit einzubeziehen ist nicht möglich. Diese potenziellen Störfaktoren können in dieser Studie zu den unterschiedlichen Beobachtungen zwischen der Kieler und der Hamburger Kohorte beigetragen haben.

Kann eine unterschiedliche Krankheitsaktivität in der Hamburger gegenüber der Kieler Kohorte für die unterschiedlichen Beobachtungen ursächlich sein?

Die Krankheitsaktivität wird in dieser Studie anhand des Behinderungsgrades (gemessen anhand der EDSS), eines Progressionsindex des Behinderungsgrades bei Patienten mit follow-up, der Schubanzahl und der Läsionslast im MRT gemessen. Ein steigender Behinderungsgrad ging dabei in der Kieler Discovery- und der Hamburger Validationskohorte mit einem proinflammatorischen IgG-Fc-Glykosylierungsmuster einher. Auch eine steigende Erkrankungsdauer war in beiden Kohorten mit einem proinflammatorischen Glykosylierungsmuster assoziiert. (Abschnitt 5.5, Abb. 13-16, Abschnitt 6.6, Abb. 25, 26) Die Schubanzahl, die Läsionslast im MRT und die Progression des Behinderungsgrades gingen nicht mit proinflammatorischen Veränderungen einher und wurden daher in der Hamburger Kohorte nicht erneut erhoben und ausgewertet. Die Hamburger Kohorte zeigte eine längere Erkrankungsdauer als die Kieler Kohorte. Der Behinderungsgrad unterschied sich zwischen den beiden PPMS-Kohorten nicht signifikant und war in der Hamburger RRMS-Kohorte sogar niedriger als in der Kieler Kohorte. (Tab. 1c) Aufgrund des retrospektiven Studiendesigns konnte - abgesehen von dem Progressionsindex des Behinderungsgrades bei 129/210 Kieler Patienten - nur eine „Momentaufnahme“ der Krankheitsaktivität eines Patienten bestimmt werden. Der EDSS-Score und die Erkrankungsdauer sind die einzigen Parameter, die uns Auskunft über die Krankheitsaktivität der

Patienten der Hamburger Kohorte geben. Dadurch ist es schwierig, eine klare Aussage darüber zu treffen, in welcher Kohorte eine höhere Krankheitsaktivität vorlag. Eine niedrigere Krankheitsaktivität in der Hamburger Kohorte kann Ursache für die unterschiedlichen Beobachtungen zwischen Kieler und Hamburger Kohorte sein. Insbesondere ist es möglich, dass sich aufgrund einer niedrigeren Krankheitsaktivität in der Hamburger Validationskohorte kein signifikanter Unterschied im IgG-Fc-Glykosylierungsmuster zwischen Patienten und Kontrollen ergab.

6.3 Wie sind die krankheitsunabhängigen Veränderungen der IgG-Fc-Glykosylierung in Zusammenhang mit Alter und Geschlecht zu bewerten?

In vielen Studien wurde bestätigt, dass die IgG-Fc-Glykosylierung stark alters- und geschlechtsabhängig ist. (Russell et al. 2018, S.402) Der Anteil der Fc-galaktosylierten IgG steigt von der Geburt bis zum Ende der 3. Lebensdekade an und sinkt dann bis zum Ende des Lebens auf unter 50% der Werte in jungem Alter, wobei agalaktosylierte Glykane immer weiter ansteigen. Dabei gibt es starke Unterschiede zwischen Männern und Frauen. Bei Männern sinkt der Anteil galaktosylierter Glykoformen stetig ab. Junge Frauen unter 30 Jahren haben zunächst einen höheren Anteil galaktosylierter IgG als Männer. Dieser sinkt mit dem Alter aber auch schneller wieder ab. Am stärksten verändert sich die Glykosylierung bei Frauen mit dem Übergang in die Menopause, zwischen einem Alter von 45 bis 55 Jahren, sodass der Anteil galaktosylierter IgG danach auf unterhalb der Werte von gleichaltrigen Männern absinkt. Dementsprechend ist der G0-IgG-Anteil bei Frauen unter 30 Jahren niedriger, ab einem Alter von 60 Jahren aber höher als bei Männern. Die Ursachen und molekularen Mechanismen, die solch starken Veränderungen der IgG-Fc-Glykosylierung zu Grunde liegen, sind nicht bekannt. Auch ist nicht klar, ob das steigende Alter sich auf die Glykosylierung auswirkt, oder ob diese Veränderungen durch ein Vorantreiben entzündlicher Prozesse zum Altern beitragen. (Krištić et al. 2014, S. 781–785) Die alters- und geschlechtsabhängigen Veränderungen der IgG-Fc-Glykosylierung, die wir in dieser Studie feststellen konnten, stimmen mit den in der Literatur berichteten Veränderungen überein. Das mittlere Alter lag bei Kieler MS-Patienten bei 38,5 Jahren und das der Kieler Kontrollen bei 36,2 Jahren. Wie oben beschrieben ist ein verstärkt proinflammatorisches Glykosylierungsmuster bei Männern im Vergleich zu Frauen in diesem Alter häufig. Dass der Unterschied zwischen Männern und Frauen nicht krankheitsbedingt ist, lässt sich auch daraus schließen, dass die Kieler Kontrollkohorte die gleichen geschlechtsspezifischen Unterschiede zeigte. Die Hamburger Kontrollen zeigten diese jedoch nicht, was den bisherigen Feststellungen in der Literatur widerspricht.

Durch diese Studie lässt sich nicht beantworten, ob ein kausaler Zusammenhang zwischen IgG-Fc-Glykosylierungsmuster und MS besteht. Dennoch fällt auf, dass Männer im Hauptmanifestationsalter der MS ein stärker proinflammatorisches IgG-Fc-Glykosylierungsmuster aufweisen als Frauen und dass die MS bei Männern mit einer schnelleren Krankheitsprogression und einer schlechteren Prognose

einhergeht als bei Frauen. (Weinshenker et al. 1991, S. 1049) Frauen zeigen etwa doppelt so häufig benigne Verläufe als Männer. (Hawkins und Mc Donnell 1999, S. 151) Das häufigere Auftreten von MS bei Frauen deutet allerdings daraufhin, dass ihr höherer Anteil an protektiven IgG-Fc-Glykoformen i.L. und i.S. nicht vor einer Krankheitsaktivierung bewahrt.

6.4 Wie sind die beobachteten Unterschiede zwischen MS-Patienten und Kontrollen zu bewerten?

Die Studie ergab in der Kieler Kohorte signifikante proinflammatorische Veränderungen der IgG-Fc-Glykosylierung i.L. und i.S. bei MS-Patienten im Vergleich zu Kontrollen. Damit konnten die Ergebnisse von Wuhrer et al. 2015 und Decker et al. 2016, die ein proinflammatorisch verändertes IgG-Fc-Glykosylierungsmuster i.L. feststellten, erneut bestätigt werden. Das IgG-Fc-Glykosylierungsmuster von MS-Patienten dieser Studie ähnelt dem von Patienten mit systemischen Autoimmunerkrankungen i.S. Auch bei Patienten mit rheumatoider Arthritis, (Goulabchand et al. 2014, Pasek et al. 2006, van de Geijn et al. 2009), Lambert-Eaton-Myasthenie-Syndrom, Myasthenia gravis, (Selman et al. 2011), systemischem Lupus erythematoses (Vučković et al. 2015), CED, (Šimurina et al. 2018, S. 1330), und Guillain-Barré-Syndrom (Fokkink et al. 2014) war insbesondere der G0-IgG-Anteil i.S. im Vergleich zu Kontrollen deutlich erhöht, sowie der term gal- und sial-IgG-Anteil (nicht bei Lambert-Eaton-Myasthenie-Syndrom, Myasthenia gravis) vermindert. (Anhang 10)

Wie in beiden vorhergehenden Studien zeigten sich beim Vergleich des IgG-Fc-Glykosylierungsmusters von Patienten und Kontrollen große Überlappungen der Werte. (Abb. 8) (Wuhrer et al. 2015, S.9; Decker et al. 2016, S.1798) Mittelwert und Verteilung der Anteile der einzelnen Glykoformen unterscheiden sich zwar deutlich zwischen Kontrollen und Patienten, die IgG-Fc-Glykosylierung bietet aber keine ausreichende Trennschärfe zwischen MS-Patienten und Gesunden, was aber eine wichtige Eigenschaft eines humoralen Biomarkers ist. Es fällt auf, dass der signifikante Unterschied besonders durch eine MS-Subgruppe mit besonders auffälligen Werten getragen wird. Innerhalb dieser Subgruppe ließ sich jedoch kein überwiegender Verlaufstyp, kein besonders hohes Alter, kein überwiegender Geschlechtsanteil, keine besonders lange Erkrankungsdauer und kein besonders hoher Behinderungsgrad feststellen. In zukünftigen Untersuchungen sollten Faktoren identifiziert werden, die diese Subgruppe charakterisieren.

6.5 Welche Relevanz haben die beobachteten Unterschiede zwischen verschiedenen MS-Verlaufsformen, insbesondere zwischen RRMS und PPMS?

Diese Studie ergab sowohl in der Discovery- als auch in der Validationskohorte, dass das IgG-Fc-Glykosylierungsmuster bei PPMS-Patienten proinflammatorischer ausgeprägt ist als das von Patienten mit RRMS oder Erstmanifestation. Dass Patienten mit RRMS und mit Erstmanifestation ein ähnliches

Glykosylierungsmuster i.L. und i.S. zeigten, passt zu der Feststellung, dass es keinen Zusammenhang mit der Schubanzahl vor LPZP gab. Der Unterschied zwischen der Subgruppe mit Erstmanifestation und der mit RRMS besteht in einer häufigeren Schubanzahl, einer längeren Erkrankungsdauer und einem leicht höheren Behinderungsgrad bei RRMS-Patienten zum LPZP. Decker et. al konnten keine unterschiedliche IgG-Fc-Glykosylierung zwischen den verschiedenen MS-Subtypen feststellen. (Decker et al. 2016, S.1800) Allerdings beinhaltet ihre Auswertung nur Werte von 2 PPMS-Patienten, was zu gering ist, um einen Unterschied tatsächlich beurteilen zu können. Bis jetzt gibt es noch keine genaue Erklärung, was bei MS genau die Entwicklung einer Verlaufsform verursacht. Zwischen der PPMS und RRMS bestehen klinische, epidemiologische, ätiologische und histopathologische Unterschiede und ein unterschiedliches Therapieansprechen:

Klinische, epidemiologische und ätiologische Unterschiede:

Die RRMS verläuft schubförmig und beginnt häufig mit Optikusneuritis, Sensibilitätsstörungen und Fatigue mit einem Häufigkeitsgipfel um das 30. Lebensjahr und einem Verhältnis von Männern zu Frauen von 1:3. Die PPMS verläuft typischerweise ohne Schübe mit einer kontinuierlichen Zunahme neurologischer Symptome, wobei sich häufig über Jahre eine zunehmende spastische Gangstörung oder ein zerebelläres Syndrom entwickeln. Von der PPMS sind Männer und Frauen etwa gleich häufig betroffen. Der Häufigkeitsgipfel liegt zwischen dem 40.-50. Lebensjahr. (Deutsche Gesellschaft für Neurologie, S2e-Leitlinie 2014, S.3-4) Es besteht ein unterschiedliches Risiko in Zusammenhang mit Umweltfaktoren wie dem Vitamin-D-Spiegel. Ein niedriger Vitamin-D-Spiegel ist bei der RRMS stark mit der Krankheitsentstehung assoziiert, bei der PPMS nicht. (Abdelhak et al. 2017, S.2) Betrachtet man die unterschiedlichen MS-Verlaufsformen, geht eine PPMS mit einer schlechteren Prognose als die anderen MS-Verlaufsformen einher. (Hawkins und Mc Donnell 1999, S. 148)

Unterschiede des Therapieansprechens, der Histopathologie und MRT-Morphologie:

Unterschiede der Histopathologie zeigen sich in Art und Verteilung der ZNS-Läsionen und in der Beteiligung unterschiedlicher Immunzellen. Bei der RRMS treten häufig akute entzündliche Läsionen auf. Diese zeigen eine hyperzelluläre entzündliche Demyelinisierung mit relativem Erhalt der Axone. Es gibt eine massive Infiltration von myelinbeladenen Makrophagen, eine perivaskuläre und parenchymale Infiltration hauptsächlich von T-Lymphozyten aber auch von B-Lymphozyten, eine reaktive Astrozytose und einen variablen Verlust an Oligodendrozyten. Mit Oligodendrozyten-Vorläuferzellen und dünn myelinisierten Axonen sind auch Zeichen einer frühen Remyelinisierung sichtbar. Bei der PPMS finden sich häufiger chronische inaktive Plaques. Diese sind komplett demyelinisierte hypozelluläre Läsionen mit geschädigten und substanzial verminderten Axonen, Verlust von Oligodendrozyten, Astroglie und einer geringen Infiltration von Makrophagen, Mikroglia und Lymphozyten. Diese zeigen kaum Remyelinisierungspotenzial. (Popescu und Lucchinetti 2012,

S.186-187) Die RRMS präsentiert sich im MRT mit einer hohen Zahl an fokalen entmarkenden Läsionen und häufig Gadolinium-anreichernden Läsionen. Bei der SPMS sind große konfluierende hyperintense T2-Läsionen typisch, die sich teilweise im Sinne von "black holes" in der T1-Wichtung hypointens darstellen. Die PPMS zeigt im MRT dahingegen eine relativ geringe Anzahl kleiner Hirnläsionen. Bei der SPMS und PPMS sind eine diffuse Schädigung der weißen Substanz von Hirn und Rückenmark und deren Atrophie, die bei PPMS ausgeprägter ist, typisch. (Lycklama a` Nijeholt, G.J et al. 1998, S. 688), (Abdelhak et al. 2017, S.234) PPMS spricht nicht auf die bei RRMS stark wirksamen Medikamente an. Diese können zwar die Schubrate vermindern, wirken aber nicht der chronischen Progression neuroaxonaler Schäden bei der PPMS entgegen. (Dendrou et al. 2015, S. 554)

Diese Unterschiede legen nahe, dass diesen beiden Verlaufsformen auch unterschiedliche pathophysiologische Prozesse zugrunde liegen. (Abdelhak et al. 2017) Unser Ergebnis, dass sich die IgG-Fc-Glykosylierung i.L. und i.S. von PPMS- und RRMS-Patienten unterscheidet, könnte ein weiterer Hinweis dafür sein, dass bei PPMS andere pathophysiologische Prozesse im Vordergrund stehen. Außerdem ist es passend zu vorherigen Studien über die IgG-Fc-Glykosylierung bei systemischen Autoimmunsyndromen, bei denen sich ein proinflammatorischeres IgG-Fc-Glykosylierungsmuster bei Patienten mit schwererem Erkrankungsverlauf zeigte. (Vučković et al. 2015, Fokkink et al. 2014, Šimurina et al. 2018) Erkenntnisse über pathophysiologische Unterschiede zwischen MS-Verlaufsformen und zwischen MS-Patienten mit unterschiedlich schwerem Erkrankungsverlauf sind wichtig, um in Zukunft Medikamente aus einem größer werdenden Repertoire sinnvoll individuell einzusetzen.

6.6 Welche Schlussfolgerungen lassen die beobachteten Zusammenhänge der IgG-Fc-Glykosylierung mit klinischen Parametern zu?

Durch vorhergehende Studien werden eine Zunahme des G0-IgG-Anteils, bzw. die Abnahme des sial- und terminal-IgG-Anteils mit proinflammatorischen Entzündungsreaktionen assoziiert, die sich klinisch in einer schwereren Symptomatik äußern. Bei Patienten mit rheumatoider Arthritis zeigte sich das proinflammatorische IgG-Fc-Glykosylierungsmuster bereits 3 Monate vor Erkrankungsbeginn (Goulabchand et al. 2014, S. 745), und es wurde eine Assoziation mit dem Erkrankungsverlauf festgestellt. Bei Patienten mit rheumatoider Arthritis fällt der G0-IgG-Anteil, bzw. steigt der Anteil galaktosylierten und sialylierten IgGs während einer klinischen Remission und während einer Remission, die bei rheumatoider Arthritis häufig im Rahmen einer Schwangerschaft auftritt. (van de Geijn et al. 2009, S. 8) Auch bei CED war ein steigender Anteil an G0-IgG mit schwereren Krankheitsverläufen assoziiert. Entsprechend dem unterschiedlichen Krankheitsverlauf stieg der G0-IgG-Anteil bei Morbus Crohn kontinuierlich an. Bei Colitis ulcerosa treten im Erkrankungsverlauf Remissionen und Phasen der Verbesserung auf. Entsprechend blieb der G0-IgG-Anteil teilweise

konstant oder war absinkend. (Šimurina et al. 2018, S. 1330) Daher bestand die Hypothese, dass bei der MS klinische Parameter, die mit einer schlechten Prognose bzw. mit einer erhöhten Krankheitsaktivität assoziiert sind, ebenfalls mit einem proinflammatorisch veränderten IgG-Fc-Glykosylierungsmuster einhergehen. Diese Hypothese konnte zum Teil bestätigt werden.

Einige klinische Parameter werden im klinischen Alltag verwendet, um den Grad der Krankheitsaktivität und die Prognose einzuschätzen. Faktoren, die mit einem prognostisch eher ungünstigen spontanen Krankheitsverlauf assoziiert sind, sind ein polysymptomatischer Beginn, Erkrankungsbeginn nach dem 35. Lebensjahr, das frühe Auftreten motorischer und zerebellärer Symptomatik, eine hohe Schubfrequenz von Erkrankungsbeginn an, lang andauernde Schübe und schlechte Rückbildung der Schübe. Prognostisch günstige Faktoren sind ein monosymptomatischer Beginn der Erkrankung mit Sensibilitätsstörungen vor dem 35. Lebensjahr, eine gute Remission nach dem ersten Schub, wenige Tage andauernde Schübe mit vollständiger Rückbildung und erhaltene Gehfähigkeit.

Erkrankungsdauer

In dieser Studie wurde eine zunehmend proinflammatorische Veränderung des IgG-Fc-Glykosylierungsmusters i.L. und i.S. mit steigender Erkrankungsdauer festgestellt. Dieses Ergebnis lässt interessante Interpretationen über den Zusammenhang mit pathophysiologischen Prozessen bei der MS zu.

Es konnte nachgewiesen werden, dass sich pathophysiologische Vorgänge im Verlauf einer MS-Erkrankung verändern. Unter dem großen Spektrum an pathophysiologischen Prozessen, die bei der MS ablaufen, können grob 2 Arme unterschieden werden. Beide laufen in unterschiedlicher Ausprägung abhängig von Erkrankungssubtyp und früher oder später Erkrankungsphase ab. (Dendrou et al. 2015, S. 556) In frühen Stadien der RRMS gelangen Immunzellen des peripheren angeborenen und adaptiven Immunsystems über die Blut-Hirn-Schranke und die Blut-Liquor-Schranke, akkumulieren im perivaskulären Raum und treten ins ZNS-Parenchym über. Sie führen zu einer Demyelinisierung und zur Schädigung von Neuronen. Eine verlangsamte oder blockierte Nervenleitung wird ausgelöst, die sich klinisch durch eine Schubsymptomatik äußert. Die Remission geht mit dem Rückgang des entzündlichen Ödems und einer partiellen Remyelinisierung einher. Therapeutisch wirksam sind in dieser Phase immunologisch wirksame Medikamente, die die Aktivierung der Immunzellen in der Peripherie oder deren Passage über die Blut-Hirn-Schranke oder Blut-Liquor-Schranke hemmen. Im späteren Erkrankungsverlauf schwindet die Immuneinfiltration des ZNS möglicherweise durch eine erschöpfte Reproduktion von Zellen des adaptiven Immunsystems durch chronische Antigenexposition. Trotzdem schreiten chronische ZNS-Entzündung und Neurodegeneration weiter fort. Es gibt mehrere Hinweise darauf, dass in den chronischen Erkrankungsphasen intrathekal entzündliche Prozesse ablaufen, die sich selbst unterhalten. Dafür sprechen eine verstärkte Aktivierung von Mikroglia und Astrozyten in späteren Erkrankungsphasen (Dendrou et al. 2015, S. 554) und der Nachweis von B-Zellen

aller Reifungsstufen zusammen mit Chemokinen der lymphoiden Neogenese. (Corcione et al. 2004, S.11067-11068) Außerdem wurden in den zerebralen Meningen von SPMS-Patienten lymphoide follikelähnliche Strukturen entdeckt. Sie waren mit einer Aktivierung von Mikroglia, lokaler Entzündung und neuronalem Verlust im nahegelegenen Kortex verbunden. (Magliozzi et al. 2007, S. 1090) Dass das proinflammatorische IgG-Fc-Glykosylierungsmuster besonders i.L. mit der Erkrankungsdauer korreliert, stärker als i.S., könnte mit diesen histopathologischen Veränderungen zusammenhängen. (Abb. 15) Die histopathologischen Veränderungen werden durch eine veränderte Dynamik und klinische Präsentation mit steigender Erkrankungsdauer begleitet. Trotz der Heterogenität des klinischen Erkrankungsverlaufs verläuft die Erkrankung in den meisten Fällen in späten Erkrankungsphasen weniger schubförmig, sondern mehr chronisch-progredient. (Deutsche Gesellschaft für Neurologie, S2e-Leitlinie 2014, S. 3–4) Vor diesem Hintergrund lässt sich interpretieren, dass eine verstärkt proinflammatorisch veränderte IgG-Fc-Glykosylierung eher dem 2. Arm der pathophysiologischen Prozesse, die in späteren Erkrankungsphasen oder bei der PPMS schon von Erkrankungsbeginn an ablaufen, zuzuordnen ist. Diese Annahme wird unterstützt durch das vermehrt proinflammatorische IgG-Fc-Glykosylierungsmuster bei PPMS- gegenüber RRMS-Patienten und durch den fehlenden Zusammenhang mit akuten Schubereignissen und Entzündungsmarkern im MRT.

Die Beurteilung des Zusammenhangs der Erkrankungsdauer ist in dieser Studie erschwert, da Patienten mit langer Erkrankungsdauer nur selten punktiert werden und daher wenige Werte von Patienten mit langer Erkrankungsdauer in diese Auswertung mit einfließen konnten. Außerdem geht eine längere Erkrankungsdauer auch mit steigendem Alter und oft auch mit einem steigenden Behinderungsgrad einher. Beide Parameter sind ebenfalls mit einem proinflammatorischen IgG-Fc-Glykosylierungsmuster assoziiert, wodurch der festgestellte Effekt beeinflusst sein könnte. (Russell et al. 2018, S.402) Dass eine steigende Erkrankungsdauer mit einem steigenden Behinderungsgrad einhergeht, ist jedoch nicht immer der Fall. Der Verlauf einer benignen MS ist sogar dadurch definiert, dass nach 15 Jahren nach Erkrankungsbeginn noch keine beeinträchtigenden neurologischen Defizite vorliegen. (Hawkins und Mc Donnell 1999, S. 148–149)

Behinderungsgrad:

Der Behinderungsgrad wird bei der MS üblicherweise mit dem EDSS-Score angegeben. Mit Punkten von 0-10 wird durch ein Skalensystem die Gehfähigkeit des Patienten und Beeinträchtigungen in 7 funktionellen Systemen bewertet: Pyramidenbahn, Kleinhirn, Hirnstamm, Sensorium, Blasen- und Mastdarmfunktion, Sehfunktion und zerebrale Funktionen. Ein Punktwert von 0 bedeutet keine funktionellen Einschränkungen, ab einem Punktwert von 6 werden Gehhilfen zur Fortbewegung benötigt, 9 bedeutet Bettlägerigkeit und vollständige Pflegebedürftigkeit, 10 bedeutet Tod infolge einer MS. Anhand des EDSS-Wertes kann der Erkrankungsverlauf dokumentiert werden. (Kurtzke 1983) Der MSSS ergibt sich aus dem Verhältnis des vorliegenden EDSS-Wertes zu der Erkrankungsdauer. Da die

Entwicklung der Behinderung bei MS nicht linear verläuft, sondern sich im Verlauf der Jahre und mit Schüben verändert, wurde mit dem MSSS ein Algorithmus entwickelt, der die individuelle Behinderung mit der Verteilung von Scores in Fällen mit gleicher Krankheitsdauer vergleicht. Er kann Werte zwischen 0 und 10 annehmen, wobei 5 eine durchschnittliche Krankheitsprogression darstellt: 50% der Patienten mit der gleichen Krankheitsdauer haben einen höheren Behinderungsgrad, 50% einen geringeren Behinderungsgrad. (Roxburgh et al. 2005)

Der EDSS wird in klinischen Studien und im klinischen Alltag als einheitlicher Messparameter der Krankheitsschwere, der Krankheitsprogression, als Marker für Therapieentscheidungen und zur Beurteilung des Therapieansprechens verwendet. Er dient in Kombination mit der Erkrankungsdauer als prognostischer Parameter, wobei der EDSS nach 5-10 Jahren prognostisch aussagekräftig wird. Patienten, die nach 5-10 Jahren einen niedrigen EDSS haben, haben eine hohe Wahrscheinlichkeit im weiteren Verlauf keine einschränkenden Behinderungen zu erleiden. (Hawkins und Mc Donnell 1999, S. 148–149) In dieser Studie zeigte sich in beiden Kohorten ein signifikanter Anstieg proinflammatorischer IgG-Fc-Glykoformen mit steigendem Behinderungsgrad zum LPZP gemessen anhand des EDSS und MSSS i.L. und i.S. Decker et al. stellten außerdem eine Korrelation mit der Krankheitsprogression im Anschluss an den LPZP fest, was der IgG-Fc-Glykosylierung die Qualität eines Prognosemarkers verleihen würde. (Decker et al. 2016, S.1798) Eine Korrelation mit der Krankheitsprogression, gemessen durch die Veränderung des EDSS pro Zeit im Anschluss an den LPZP ((EDSS bei follow-up – EDSS zum LPZP) / Zeitintervall LPZP bis follow-up) zeigte sich in dieser Studie allerdings nicht. Dafür korrelierte die IgG-Fc-Glykosylierung in Deckers Studie im Gegensatz zu unserer Studie nicht mit dem EDSS zum LPZP. (Decker et al. 2016, S.1796, 1798)

Insgesamt besteht also ein Zusammenhang der IgG-Fc-Glykosylierung mit dem Behinderungsgrad, auch wenn sich zu diesem Zeitpunkt nicht genau feststellen lässt, in welcher Form dieser besteht, da sich die Ergebnisse der Vorstudie von Decker et al. nicht genau reproduzieren ließen. Prospektive Studien könnten an dieser Stelle aussagekräftigere Ergebnisse liefern.

Die Bewertung ist dadurch eingeschränkt, dass ein steigender EDSS ebenfalls mit einer steigenden Erkrankungsdauer und dadurch einem zunehmenden Alter einhergeht, wodurch die proinflammatorischen Veränderungen ebenfalls bedingt sein könnten. (Anhang 11: Korrelation Alter mit EDSS zum LPZP: $p < 0,0001$) Allerdings war auch der MSSS, der durch seinen Algorithmus für eine gleichzeitig steigende Erkrankungsdauer berichtigt ist, mit proinflammatorischen Veränderungen signifikant korreliert.

Schubanzahl

Patienten, deren letztes Schubereignis zum LPZP länger als 6 Wochen zurücklag, zeigten ein stärker proinflammatorisches IgG-Fc-Glykosylierungsmuster als Patienten, deren letztes Schubereignis innerhalb der letzten 6 Wochen vor LPZP lag. Weiterhin zeigte sich eine signifikante Zunahme

proinflammatorischer Glykoformen in Korrelation mit der Zeit seit dem letzten Schubbeginn. Durch das retrospektive Studiendesign können die Veränderungen der IgG-Fc-Glykosylierung mit akuten Schubereignissen trotz dieser Ergebnisse nicht genau beurteilt werden. Es zeigte sich zwar ein signifikanter Unterschied bei 6 Wochen, nicht aber zwischen Patienten, deren letztes Schubereignis bei LPZP länger oder kürzer als 2, 3 oder 9 Wochen zurücklag. Das würde bedeuten, dass IgG-Moleküle mit proinflammatorischem IgG-Fc-Glykosylierungsmuster in einer Zeitspanne zwischen der 6. und 9. Woche nach Schubbeginn gebildet werden und sich daraufhin bis zur 9. Woche wieder zurückentwickeln. Dies wäre generell mit der Halbwertszeit von IgG vereinbar. Sie ist für IgG i.L. nicht genau bekannt, beträgt aber i.S. 23 Tage. (Pingoud und Urbanke, 1997, S. 211) Auch Wuhrer et al. stellten in ihrer Studie eine zu einem akuten Schubereignis zeitversetzte Veränderung der IgG-Fc-Glykosylierung fest. Hier stiegen die Anteile an afucosyliertem IgG-Fc-Glykan und an Glykanen, welche abzweigendes N-Acetylglucosamin beinhalten 8-12 Wochen nach einem Schubereignis auf Höchstwerte an. Veränderungen der Galaktosylierung und Sialylierung im Zusammenhang mit Schubereignissen zeigten sich in ihrer Studie aber nicht. (Wuhrer et al. 2015) Die signifikante Korrelation der IgG-Fc-Glykosylierungswerte mit der Zeit seit dem letzten Schubbeginn scheint durch Patienten getragen zu werden, deren Zeitspanne zwischen letztem Schubbeginn und LPZP länger als 1 Jahr beträgt. (n=5) Schließt man die Werte dieser 5 Patienten aus der Analyse aus, ergibt sich keine signifikante Korrelation mit der IgG-Fc-Glykosylierung i.L. mehr. Es lässt sich also festhalten, dass eine Veränderung der IgG-Fc-Glykosylierung zeitversetzt zu einem akuten Schub stattfindet. In unserer Studie lag diese Zeitspanne zwischen der 3.-9. Woche nach dem letzten Schubbeginn, mit signifikanten Veränderungen um die 6. Woche. In Wuhrers Studie lag sie bei 8-12 Wochen nach einem akuten Schubereignis. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass ein proinflammatorisches IgG-Fc-Glykosylierungsmuster weniger kausal zu der Entstehung eines akuten Schubes beiträgt, sondern das proinflammatorische Milieu während eines akuten Schubes zu einer vermehrten Produktion proinflammatorisch glykosylierter IgG-Moleküle führt. (Oefner et al. 2012, S. 1651)

In dieser Studie zeigte sich kein Zusammenhang der IgG-Fc-Glykosylierung i.L. oder i.S. mit der Anzahl der Schubereignisse vor LPZP. Es wird angenommen, dass die Anzahl der Schübe mit der Krankheitsaktivität korreliert und damit die Progression von bleibenden neurologischen Defiziten mitbestimmt. (Wiendl et al. 2012, S. 633) Weinshenker et al. stellten 1991 fest, dass die Schubanzahl vor allem in der frühen/schubförmigen Phase der RRMS einen starken prognostischen Wert hat. Eine hohe Schubanzahl korrelierte mit einer rascheren Krankheitsprogression. (Weinshenker et al. 1991, S. 1054) Schübe in der progredienten Phase scheinen weder bei PPMS noch bei SPMS einen wesentlichen Einfluss auf die Krankheitsprogression zu haben. (Wiendl et al. 2012, S. 633) Die IgG-Fc-Glykosylierung veränderte sich in vorhergehenden Studien über systemische Autoimmunsyndrome, z.B. bei der RA, auch in Abhängigkeit von Krankheitsschüben. (van de Geijn et al. 2009, S. 8) Simurina et al. zeigten, dass sich auch der schubförmige Verlauf der Colitis ulcerosa in einem Ansteigen und Absinken des G0-IgG-Anteils widerspiegelte. (Šimurina et al. 2018, S. 1330) Vor diesem Hintergrund

bestand vor Durchführung dieser Studie die Hypothese eines Anstiegs proinflammatorischer IgG-Fc-Glykoformen im Zusammenhang mit akuten Erkrankungsschüben. Aufgrund des retrospektiven Studiendesigns ergaben sich unklare Ergebnisse, die diese Hypothese nicht eindeutig bestätigen konnten. Um die Veränderungen der IgG-Fc-Glykosylierung mit akuten Schubereignissen besser beurteilen zu können, wären prospektive Untersuchungen über eine längere Zeitspanne vorteilhaft. Sollte sich dabei bestätigen, dass eine veränderte IgG-Fc-Glykosylierung nicht unmittelbar zum Zeitpunkt eines akuten Schubes, sondern erst einige Wochen danach vorliegt, würden sich die Annahmen, die wir aufgrund unserer Ergebnisse bisher treffen konnten, bestätigen. Nämlich die, dass die IgG-Fc-Glykosylierung stärker mit pathophysiologischen Veränderungen während späterer Erkrankungsphasen und chronischen Erkrankungssubtypen zusammenhängt, als mit akuter Krankheitsaktivität, die sich bei RRMS z.B. in Form von Krankheitsschüben zeigt.

MRT-Morphologie

Bei der Bildgebung mittels MRT bei MS wird auf die T2-Läsionszahl, auf das Vorhandensein von Gadolinium-aufnehmenden und hypointensen T1-Läsionen (black holes) und Hirnatrophie geachtet. Diese Marker werden in Studien und im klinischen Alltag zur Diagnosestellung, als Biomarker der Krankheitsaktivität, zur Beurteilung des Krankheitsverlaufs und als Progressions- und Prognosemarker verwendet. MR-typische Zeichen für Krankheitsaktivität können subklinisch bleiben, korrelieren aber meistens mit dem klinischen Bild. Zeichen für einen aggressiven Krankheitsverlauf sind eine radiologisch sichtbare Hirnatrophie, eine hohe Anzahl an T2-Läsionen oder eine starke Entzündungsaktivität in Form von neu aufgetretenen T2-Läsionen oder Gadolinium-anreichernden T1-Läsionen. (Comabella und Montalban 2014, S. 113–114)

Diese Studie ergab keine Veränderung der IgG-Fc-Glykosylierung im Zusammenhang mit dem Vorhandensein von Gadolinium-anreichernden T1-Läsionen in einem Zeitraum von 2 Wochen um den LPZP. Diese sind ein Biomarker für akute entzündliche Aktivität im ZNS, da Gadolinium nur dann die Blut-Hirn-Schranke übertritt. Ihr Nachweis im Rahmen von neu aufgetretenen neurologischen Defiziten spricht für einen erneuten Schub als Ursache. Ihre Anzahl und Größe erbringen Informationen über den Beginn und die Schwere des erneuten Schubes. (Housley et al. 2015, S. 52) Auch Decker et al. konnten in ihrer Studie keine unterschiedliche IgG-Fc-Glykosylierung zwischen Patienten mit und Patienten ohne Gd-anreichernde Läsionen im MRT feststellen. (Decker et al. 2016, S. 1796) Die uneindeutigen Ergebnisse in Bezug auf den Zusammenhang mit akuten Schubereignissen deuten zusammen mit diesem Ergebnis daraufhin, dass eine proinflammatorisch veränderte IgG-Fc-Glykosylierung nicht unmittelbar bei der Entstehung eines akuten Schubereignisses mitwirkt.

T2-Läsionen im MRT spiegeln Entzündung, Demyelinisierung, axonalen Schaden und Ödem wieder und haben einen hohen diagnostischen Wert. Die T2-Läsionslast bei Patienten mit CIS gilt außerdem als prognostischer Biomarker. Patienten mit Läsionen im MRT zum Zeitpunkt der ersten klinischen

Manifestation haben ein höheres Risiko, innerhalb der nächsten 5 Jahre an einer MS zu erkranken (60%) als Patienten mit unauffälligem MRT (8%). Je höher die Zahl der MRT-Läsionen zum Zeitpunkt der ersten klinischen Manifestation, desto kürzer ist die Zeit bis zum nächsten Schub und desto stärker ist der Behinderungsgrad nach 5 Jahren. (Tintoré et al. 2006, S. 971–972) Die T2-Läsionslast korreliert positiv mit dem Behinderungsgrad. (Housley et al. 2015, S. 52) Hypointense T1-Läsionen, sogenannte black holes, sind ein Biomarker für einen prognostisch ungünstigen fortgeschrittenen axonalen Schaden und Verlust. Es zeigten sich allerdings keine Unterschiede in der IgG-Fc-Glykosylierung in Abhängigkeit davon, ob black holes vorhanden waren oder nicht.

Dass die IgG-Fc-Glykosylierung in dieser Studie nicht mit der T2-Läsionszahl und nicht mit dem Vorhandensein von black holes korrelierte, zeigt, dass sie weder den aktuellen klinischen Status genau darstellt, noch prognostische Aussagekraft besitzt. Sie korreliert zwar mit dem Behinderungsgrad, mit dem auch die T2-Läsionslast korreliert, aber nicht mit anderen Markern der Krankheitsaktivität (T2-Läsionslast, Schubereignisse).

Liquorparameter:

Ein entzündliches Liquorsyndrom (intrathekale IgG-Synthese, lymphomonozytäre Pleozytose mit 5-30 Zellen/ μ l) ist charakteristisch für die MS und ist Zeichen für die entzündlichen Prozesse im ZNS. OKB gelten für die MS aufgrund ihres Auftretens bei >95% der Patienten als wichtiger diagnostischer Biomarker. OKB und IgG-Index werden bei Verdacht auf MS routinemäßig bestimmt. Trotzdem zeigt eine Minderheit der Patienten einen unauffälligen Liquorbefund ohne OKB im Liquor. Der Nachweis von oligoklonalem IgG i.L. durch OKB wird bei langanhaltenden chronischen Prozessen erreicht, bei denen für lange Zeiträume oligoklonales IgG im Gehirn produziert wird. Bei CIS-Patienten ohne isolierte OKB i.L. können so bei wiederholter Messung nach $\frac{1}{2}$ bis 1 Jahr neu aufgetretene OKBs festgestellt werden. Häufiger ist es aber so, dass OKB-negative Patienten OKB-negativ bleiben, was aber nicht bedeutet, dass keine humorale Immunreaktion vorliegt. (Reiber 2006, S. 149), (Link und Huang 2006, S. 24) Es wurde ein Zusammenhang von OKB i.L. mit einer stärkeren intrathekalen entzündlichen Aktivität, stärkerer kortikaler Demyelinisierung und einer stärkeren Krankheitsprogression nachgewiesen. OKB-positive Patienten zeigten i.L. höhere Werte von inflammatorischen Molekülen der B-Zell-Immunantwort und von Neurofilament light chain, einem Biomarker, der mit neuronaler Degeneration einhergeht. (Farina et al. 2017, S. 5) OKB haben als Biomarker auch einen prognostischen Wert. Patienten mit CIS haben bei positiven OKB im Liquor ein erhöhtes Risiko für das Auftreten eines erneuten Schubes und somit für die Konversion in eine definitive MS, und zwar auch bei gleichzeitig unauffälligem MRT. Gerade bei Patienten mit CIS kann der Nachweis von isolierten OKB im Liquor maßgeblich zur Stellung der richtigen Diagnose beitragen, da viele Patienten bereits positive OKB im Liquor haben, wenn das MRT noch einen Normalbefund zeigt. (Tintoré et al. 2008, S. 1082)

In dieser Studie zeigte sich bei MS-Patienten eine signifikante Korrelation des IgG-Gehalts i.L. und des Liquorgesamteiweißes mit einer Zunahme proinflammatorischer IgG-Fc-Glykoformen. Diese Korrelation gab es bei Kontrollen nicht, was für das proinflammatorische Milieu bei MS als Ursache spricht. Es zeigte sich allerdings kein signifikanter Unterschied der IgG-Fc-Glykosylierung zwischen Patienten mit (n=127) und Patienten ohne OKB i.L. (n=26). Dahingegen stellten Decker et al. bei MS-Patienten mit isolierten OKB i.L. einen erhöhten Anteil an agalaktosylierten Glykoformen im Gegensatz zu OKB-negativen Patienten fest. Hieraus und daraus, dass sie die veränderte IgG-Fc-Glykosylierung nur i.L., nicht i.S. feststellten, zogen sie den Schluss, dass diese im Rahmen der vermehrten intrathekalen klonalen IgG-Produktion entsteht. (Decker et al. 2016, S. 1796) Das proinflammatorische IgG-Fc-Glykosylierungsmuster i.S. und der fehlende Zusammenhang mit dem Auftreten von OKB i.L. in dieser Studie widerspricht dieser Schlussfolgerung dennoch nicht, da bei MS-Patienten auch bei fehlendem Nachweis von OKB i.L. eine humorale Immunreaktion vorliegt. (Reiber 2006, S.149). Dass das proinflammatorische IgG aus dem systemischen Immunkompartiment stammt, ist unwahrscheinlich, da ihr Anteil am Gesamt-IgG i.L. nur 0,2% des Blutwertes beträgt. (Reiber 2006, S.147) Der fehlende Zusammenhang der IgG-Fc-Glykosylierung mit dem Vorhandensein von OKB i.L. ist ein weiterer Punkt, der gegen die IgG-Fc-Glykosylierung als praktikabler Biomarker im Alltag spricht. Da diese Studie in diesem Punkt Decker et al. widerspricht, sollte der Zusammenhang zukünftig erneut untersucht werden.

Therapie:

Zurzeit gibt es noch keinen allgemeingültigen humoralen Biomarker, der das Therapieansprechen wiedergeben kann. (Housley et al. 2015, S.56) Unter einer Therapie mit den antiinflammatorisch wirksamen Medikamenten, die bei MS verwendet werden, wäre eine Abnahme proinflammatorischer IgG-Fc-Glykoformen anzunehmen. Unter der Therapie von Patienten mit rheumatoider Arthritis mit Methotrexat ging eine verbesserte klinische Symptomatik mit einem Anstieg galaktosylierter IgG-Fc-Glykoformen einher. (Pasek et al. 2006, S. 463) Wuhrer et al. konnten 2015 allerdings keinen Effekt einer Therapie auf die IgG-Fc-Glykosylierung bei MS-Patienten feststellen. In dieser Studie zeigten Patienten, die vor LPZP eine Therapie erhalten hatten, sogar höhere Anteile an proinflammatorisch wirksamen IgG-Fc-Glykoformen als Patienten, die keine Therapie erhalten hatten. Patienten, die eine Therapie erhalten hatten, hatten möglicherweise einen schwereren Krankheitsverlauf, mit dem auch die IgG-Fc-Glykosylierung korrelierte. Eine Auswirkung von Cortison- und Intervalltherapie innerhalb der letzten 6 Wochen vor LPZP hatte ebenfalls keine Auswirkung auf die IgG-Fc-Glykosylierung. Man weiß bisher nicht, wie schnell sich äußere Umstände auf die IgG-Fc-Glykosylierung auswirken. Möglicherweise zeigte sich ein Effekt auch erst zu einem späteren Zeitpunkt als nach 6 Wochen.

6.7 Welche Relevanz haben die beobachteten Veränderungen des IgG-Fc-Glykosylierungsmusters im Serum für das Verständnis der MS-Pathophysiologie und die Planung weiterer Studien?

Bei der rheumatoiden Arthritis gibt es verschiedene Hinweise darauf, dass die veränderte IgG-Fc-Glykosylierung direkt zur Pathogenese der Krankheitsentstehung und -aufrechterhaltung beiträgt. Im Mausmodell wurde eine Arthritis durch den passiven Transfer von Anti-Kollagen-2-Ak ausgelöst. Dabei erhöhte die enzymatische Abspaltung der Galaktosereste von IgG vor Transfer deren pathogenes Potenzial. (Rademacher et al. 1994, S. 6127) In Mausmodellen der rheumatoiden Arthritis, Immunthrombozytopenie und des systemischen Lupus erythematoses zeigte sich, dass ein enzymatisches Abspalten des IgG-Fc-Glykans bis auf die Kernmoleküle N-Acetylglukosamin und Fukose das pathogene Potenzial der krankheitsverursachenden Auto-Ak so stark reduzierte, dass die Krankheitsentstehung verzögert und teilweise sogar verhindert werden konnte. Wahrscheinlich entsteht dieser Effekt durch eine verminderte Affinität zu Fc γ -Rezeptoren. (Albert et al. 2008, S. 15005-15006) Bei fast allen bereits genannten Erkrankungen, bei denen ein verändertes IgG-Fc-Glykosylierungsmuster festgestellt wurde, ist eine Therapie mit intravenösen Immunglobulinen (IVIg) wirksam. IVIg enthalten einen hohen Anteil an protektivem sialyliertem IgG und wirken möglicherweise durch eine Aufstockung des körpereigenen Anteils an sialyliertem IgG antiinflammatorisch. Auch diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass das proinflammatorisch veränderte IgG-Fc-Glykosylierungsmuster bei diesen Erkrankungen direkt zur Krankheitsentstehung beiträgt. (Fokkink et al. 2014, Kronimus et al. 2019, S. 19–20)

Bei der Pathophysiologie der MS sind B-Zellen und Antikörper beteiligt. (Abschnitt 2.6) Die proinflammatorisch veränderte IgG-Fc-Glykosylierung bei MS und ihre Korrelation mit dem Behinderungsgrad und der Erkrankungsdauer, sowie mit den bei MS veränderten Liquorparametern, deutet auf eine Rolle bei der Krankheitsentstehung hin. Die Veränderungen könnten aber auch nur eine Folge des proinflammatorischen Milieus sein, das bei MS besteht, ohne kausal an der Krankheitsentstehung beteiligt zu sein. (Wuhrer et al. 2015, S. 12) IgG mit einem proinflammatorischen Fc-Glykosylierungsmuster bewirkt und unterhält Entzündungsreaktionen. (Abb.4) Proinflammatorische Veränderungen der IgG-Fc-Glykosylierung entstehen aber auch als Folge eines entzündlichen Umgebungsmilieus, da B-Lymphozyten in einem proinflammatorischen Milieu vermehrt G0-IgG produzieren. (Abb. 5) (Oefner et al. 2012, S. 1651) Welche Mechanismen dabei im Vordergrund stehen ist für die Bewertung der IgG-Fc-Glykosylierung als Biomarker nachrangig, solange eine Korrelation festgestellt werden kann.

Wuhrer et al. und Decker et al. interpretierten, dass die Veränderungen der IgG-Fc-Glykosylierung im Rahmen der intrathekalen IgG-Synthese entstehen, da sie die Veränderungen nur i.L. feststellen konnten. (Decker et al. 2016, S. 1796), (Wuhrer et al. 2015, S.10) Diese Studie zeigte im Gegensatz dazu die gleichen Veränderungen auch i.S. Dies bedeutet, dass die proinflammatorischen

Veränderungen, die mit einem veränderten IgG-Fc-Glykosylierungsmusters einhergehen nicht nur intrathekal, sondern auch peripher vorliegen. Bei der MS treten Schäden durch entzündliche Veränderungen nur im ZNS auf. Die veränderte IgG-Fc-Glykosylierung tritt also sowohl im systemischen, als auch im intrathekalen Immunkompartiment, auf, wirkt aber nur zentral schädlich. Diese Vermutung wird durch Beobachtungen von Elliot et al. unterstützt. Sie beobachteten 2012, dass Antikörper aus dem Serum von MS-Patienten in vitro Demyelinisierung und in geringerem Ausmaß auch axonale Schäden verursachen. (Elliott et al. 2012, S. 1827) Es bleibt zu bedenken, dass die Kieler Kohorte bisher die einzige Kohorte ist, bei der sich Veränderungen der IgG-Fc-Glykosylierung i.S. von MS-Patienten nachweisen ließen. Die Untersuchung der Hamburger Kohorte bestätigte die Ergebnisse von Wuhrer et al. und Decker et al., dass die Veränderungen i.S. nicht vorliegen. Veränderungen der IgG-Fc-Glykosylierung i.S. sind relevant für die Planung zukünftiger prospektiver Studien und für weitere Erkenntnisse über die Pathophysiologie der MS. Eine häufige Entnahme von Liquorproben, die bei prospektiven Studien notwendig wären, ist aufgrund der Invasivität der Liquorpunktion ethisch nicht vertretbar. Wenn sich die gleichen Veränderungen i.S. zeigten, wären Serumuntersuchungen in zukünftigen Studien ausreichend und es könnte auf eine Liquoruntersuchung verzichtet werden. Daher sollten zur Bestätigung weitere Kohorten untersucht werden.

6.8 Limitationen: Welche Limitationen birgt die Art der Patientenrekrutierung?

Zu geringe Patientenzahlen in den Kohorten für einzelne MS-Verlaufsformen:

Die Studienpopulation der Kieler Discovery-Kohorte wurde retrospektiv durch eine ICD-10-Code-basierte Diagnosesuche über einen Zeitraum von 10 Jahren zusammengestellt. Innerhalb von 10 Jahren erfüllten 222 Patienten die Einschlusskriterien. Viele Patienten konnten aufgrund mangelnder Verlaufsinformationen nicht eingeschlossen werden. Es ist problematisch bei Studien über MS die verschiedenen Verlaufsformen in gleich großen Gruppen abzubilden. Eine PPMS tritt seltener auf als eine RRMS. (Lublin und Reingold 1996, S. 908) Zum anderen werden MS-Patienten häufig bei Auftreten der ersten Symptome, die zum MS-Verdacht führen, liquorpunktiert. Danach wird die Liquorpunktion selten ein 2. Mal durchgeführt, da sie als invasiver Eingriff gilt, und bisher keine Biomarker i.L. bekannt sind, deren Bestimmung im Verlauf für den Umgang mit der Erkrankung hilfreich wären. Somit werden SPMS-Patienten nur selten liquorpunktiert. Das führte in dieser Studie zu ungleichen Patientenzahlen in den einzelnen Untergruppen mit geringeren Patientenzahlen in den SPMS- und PPMS-Untergruppen, sodass die SPMS-Kohorte nicht sinnvoll in die Auswertungen mit einbezogen werden konnte. Weiterhin führte es dazu, dass eine geringe Spannweite der Erkrankungsdauer und des Behinderungsgrads vorliegen. Für eine bessere Beurteilbarkeit des Zusammenhangs der IgG-Fc-Glykosylierung mit diesen Faktoren würden mehr Liquorproben von PPMS- und SPMS-Patienten, sowie Punktionen nach längerer Erkrankungsdauer benötigt. In dieser Studie war eine getrennte Auswertung des Zusammenhangs der IgG-Fc-Glykosylierung mit klinischen

Parametern in den MS-Untergruppen aufgrund geringer Patientenzahlen nicht sinnvoll und sie wurde innerhalb der gesamten MS-Kohorte durchgeführt. In weiteren Studien könnte durch größere Patientenzahlen in den MS-Subgruppen eine getrennte Auswertung des Zusammenhangs der IgG-Fc-Glykosylierung mit klinischen Parametern für RRMS-, PPMS- und SPMS-Patienten erfolgen.

Möglicherweise ist der Unterschied zwischen PPMS- und RRMS-Patienten durch höheres Alter, längere Erkrankungsdauer und höheren Behinderungsgrad der PPMS-Patienten beeinflusst:

Limitationen des Vergleichs der unterschiedlichen Erkrankungssubtypen in dieser Studie entstehen dadurch, dass die PPMS-Kohorten aufgrund ihrer unterschiedlichen epidemiologischen und klinischen Charakteristika ein deutlich höheres mittleres Alter, eine längere Erkrankungsdauer und einen höheren Behinderungsgrad aufweisen als die RRMS-Kohorten. Das beobachtete proinflammatorischere IgG-Fc-Glykosylierungsmuster bei PPMS-Patienten könnte teilweise durch diese Faktoren bedingt sein. Dass das Alter der einzelnen Kontrollkohorten nicht signifikant von der entsprechenden Patientensubgruppe abweicht und dass die Kontrollkohorten sich gleichzeitig untereinander nicht signifikant in ihrem IgG-Fc-Glykosylierungsmuster unterscheiden, spricht aber dafür, dass tatsächlich die Verlaufsform und nicht das höhere Durchschnittsalter der PPMS-Kohorte ursächlich ist.

Beeinflussung der Ergebnisse durch Umweltfaktoren:

Eine Berücksichtigung der bisher bekannten relevanten Umweltfaktoren bei der Zusammenstellung von Studienkohorten und in der Beurteilung der Ergebnisse wird besonders durch eine retrospektive Patientenauswahl erschwert. Ein prospektives Studiendesign könnte eine bessere Kontrolle von Störfaktoren und zusätzlich eine bessere Beurteilung der Veränderung des Biomarkers im Verlauf ermöglichen. Da prospektive Studien sehr aufwendig sind, sollten sie aber erst dann durchgeführt werden, wenn ein Zusammenhang des Biomarkers mit einer Erkrankung in retrospektiven Studien wie dieser Studie bereits nachgewiesen wurde. Zum Beispiel könnte der zeitliche Zusammenhang mit akuten Schüben bei der MS oder Veränderungen der IgG-Fc-Glykosylierung bei der Umwandlung einer RRMS in eine SPMS genauer untersucht werden. Außerdem ist es sinnvoll, in zukünftigen Studien weitere genetische und Umweltfaktoren in Bezug auf die IgG-Fc-Glykosylierung zu untersuchen. Nur so wird es in Biomarkerstudien möglich sein, eine veränderte IgG-Fc-Glykosylierung auf den Zusammenhang mit einer Erkrankung zurückzuführen. (Russell et al. 2018, S.403)

6.9 Limitationen: Welche Limitationen bergen die technischen Messmethoden?

Unterschiedliche Methoden bei der Messung der IgG-Fc-Glykosylierungsanteile erschweren den Vergleich mit bisherigen Studien:

Die Glykoanalytik mit HPLC-Methode wurde im Labor der Arbeitsgruppe Immunologie und Glykoanalytik des Instituts für Ernährungsmedizin des UKSH, Campus Lübeck, etabliert und in vielen

Studien über die IgG-Fc-Glykosylierung bei systemischen Autoimmunsyndromen und Krebserkrankungen angewendet. N-Glykane werden dabei mittels Hydrolyse mit Endo S isoliert. Endo S spaltet spezifisch IgG-Fc-N-Glykane zwischen dem 1. und 2. N-Acetylglucosaminmolekül. In 15-25% ist IgG auch an seinem variablen Teil des Fab-Teils glykosyliert. (Kronimus et al. 2019, S. 15) Der Vorteil der in dieser Studie verwendeten Methode gegenüber der Methode, die Decker et al. 2016 in ihrer Studie über die IgG-Fc-Glykosylierung bei MS verwendeten, liegt darin, dass Glykane des IgG-Fab-Fragments nicht mitgemessen werden. Die Ergebnisse können dadurch ausschließlich auf das IgG-Fc-Fragment zurückgeführt werden. Ihr Nachteil ist, dass die Kernfukosylierung nicht gemessen werden kann. (Epp et al. 2018, S.402.e2, e4) Die Fukosylierung des Glykankerns nimmt starken Einfluss auf die IgG-Affinität für FcRs. Das Fehlen des Fukosemoleküls bewirkt eine vier- bis hundertfache Verstärkung der antikörperabhängigen zellulären Zytotoxizität durch eine erhöhte Bindungsaffinität für FcγR3A- und B. Sie wirkt also proinflammatorisch. (Russell et al. 2018, S.396) In dieser Studie wurde außerdem der Anteil an Glykanen mit abzweigendem N-Acetylglucosamin nicht gemessen. Ein Fehlen dieses Moleküls geht mit einer verminderten Kernfukosylierung einher und bewirkt dadurch eine verstärkte Bindung an FcγR3A, welches die antikörperabhängige zelluläre Zytotoxizität verstärkt. (Russell et al. 2018, S.395-396) Durch eine ergänzende Bestimmung dieser Glykoformen in weiteren Studien könnte das IgG-Fc-Glykosylierungsmuster bei MS-Patienten noch besser beurteilt werden. Die Verwendung verschiedener Methoden zur Messung der IgG-Fc-Glykosylierung kann als Ursache für die unterschiedlichen Ergebnisse dieser und der beiden vorhergehenden Studien nicht ausgeschlossen werden. (Wuhrer et al. 2015), (Yann Decker et al. 2016)

Weitere technische Limitationen sind die unterschiedlichen Aufbewahrungszeiten und die unterschiedlichen Temperaturschwankungen, denen das Biomaterial ausgesetzt war. Es ist nicht bekannt, ob und in welcher Weise die IgG-Fc-Glykosylierung durch diese Faktoren beeinflusst wird. Ein Vergleich zwischen der Kieler und Hamburger Kohorte, sowie zwischen unserer Studie und den Vorstudien wird durch diesen unsicheren Faktor erschwert. Eine Entnahme von Liquor- und Serumproben zu Studienzwecken im Rahmen von prospektiven Studien könnte diese potenziellen Störfaktoren ausschließen.

7 Ausblick

Ist die IgG-Fc-Glykosylierung als Biomarker für MS geeignet?

Zur Bewertung eines Biomarkers können die biologische und die klinische Rationale sowie die Praktikabilität der Messmethode herangezogen werden. Ein Biomarker sollte erkrankte Personen sensitiv und spezifisch erkennen, im Hinblick auf MS zwischen verschiedenen Verlaufsformen differenzieren und den aktuellen klinischen Status bzw. die aktuelle Krankheitsaktivität darstellen. Weiterhin sollte er möglichst mit pathophysiologischen Prozessen und mit therapeutischen Effekten korrelieren. (Katsavos und Anagnostouli 2013)

Die signifikanten Unterschiede zwischen MS und Kontrollen zeigen, dass der Biomarker bei MS krankheitsbedingt verändert ist. Die auffälligen Werte bei PPMS-Patienten zeigen, dass es auch Verlaufsform-bedingte Veränderungen gibt. Durch große Überlappungen der Werte zwischen MS-Patienten und Kontrollen, sowie zwischen den einzelnen MS-Verlaufsformen ist das IgG-Fc-Glykosylierungsmuster gegenwärtig aber nicht als diagnostischer Test geeignet. Mit seiner starken Korrelation mit dem Behinderungsgrad ist das IgG-Fc-Glykosylierungsmuster ein Biomarker, der die anhaltende Krankheitsaktivität und den klinischen Ausprägungsgrad wiedergibt. Die schwachen bzw. fehlenden Veränderungen im Zusammenhang mit akuten Krankheitsschüben und MRT-Auffälligkeiten zeigen aber, dass er akute Krankheitsaktivität nicht ausreichend abbildet, um im klinischen Alltag sinnvoll verwendet zu werden.

Untersuchungsaspekte für zukünftige Studien

Für zukünftige Studien generelle interessante Aspekte sind die Veränderungen der IgG-Fc-Glykosylierung i.S., die bei der hier untersuchten Kieler Kohorte zum ersten Mal festgestellt werden konnten. Weiterhin könnten Veränderungen im Zusammenhang mit MS-Therapien untersucht werden. Aspekte für prospektive Studien sind die Veränderungen im zeitlichen Zusammenhang mit akuten Schubereignissen. In funktionellen Studien könnte untersucht werden, ob die pathologische IgG-Fc-Glykosylierung lediglich einen Biomarker einer anhaltenden Krankheitsaktivität bei MS darstellt oder auch kausal zur Krankheitsprogression beiträgt.

In Bezug auf das in dieser Studie untersuchte Patientenkollektiv sollte näher untersucht werden, welche Faktoren genau die Unterschiede zwischen Kieler und Hamburger Kohorte bedingt haben könnten. Möglicherweise sind dies epidemiologische Faktoren wie die Alters- und Geschlechtsverteilung, klinische Faktoren wie die Krankheitsaktivität, die in dieser Studie nicht berücksichtigt wurden oder technische Faktoren, wie unterschiedliche Lagerungszeiten und Temperaturschwankungen, denen die Proben ausgesetzt waren. Außerdem sollte die Subgruppe innerhalb der Kieler Kohorte näher charakterisiert werden, durch deren besonders auffällige Werte der signifikante Unterschied zu der Kontrollkohorte anscheinend maßgeblich bedingt wurde.

8 Zusammenfassung und Schlussfolgerung

Bei systemischen Autoimmunsyndromen wie der rheumatoiden Arthritis (Pasek et al. 2006, van de Geijn et al. 2009, Goulabchand et al. 2014) und im Tiermodell (Rademacher et al. 1994, Albert et al. 2008) korreliert die Glykosylierung konservierter Aminosäurereste am Fc-Terminus von IgG-Molekülen im Serum mit der Krankheitsaktivität. Dabei gelten IgG-Moleküle mit Galaktose oder Sialinsäure als protektiv, während gering glykosylierte Antikörpertypen mit proinflammatorischen Immunreaktionen in Verbindung gebracht werden. Bei der Multiplen Sklerose (MS) ist die Fc-Glykosylierung der IgG-Moleküle im Serum und im Liquor bisher nur wenig untersucht. (Wuhrer et al. 2015, Decker et al. 2016) Fragestellung dieser Studie ist, ob sich bei MS-Patienten im Vergleich zu Kontrollpatienten eine differente IgG-Fc-Glykosylierung im Liquor und/oder im Serum findet, und ob sie mit Krankheitsverlauf, Krankheitsaktivität oder Prognose korreliert.

Hierfür erfolgte eine retrospektive monozentrische Kohortenanalyse von MS-Patienten (Kiel) (McDonald 2010, MAGNIMS 2016) und Kontrollen (nicht-inflammatorische neurologische Erkrankungen) mit mindestens einer asservierten Serum-/Liquorprobe zwischen 2006 und 2016. Epidemiologische, klinische, laborchemische und Verlaufsparmeter wurden erfasst. Das Gesamt-IgG wurde aus Serum- und Liquorproben mittels Affinitätschromatographie isoliert, und die jeweilige Zusammensetzung der Fc-Glykosylierung mittels High-Density-Liquid-Chromatography analysiert. Nach Auswertung der ersten Kohorte erfolgte zur Bestätigung der Ergebnisse eine weitere unabhängige retrospektive monozentrische Kohortenanalyse (Hamburg) mit Analyse der IgG-Fc-Glykosylierung im Serum.

Von den Kieler MS-Patienten (n=222, ausschließlich SPMS n=210: 70% weiblich, mittleres Alter 38,5 Jahre) hatten zum Zeitpunkt der Liquorpunktion 42% eine Erstmanifestation (n=89), 45% RRMS (n=95), 5% eine SPMS (n=12) und 12 % eine PPMS (n=26). Insgesamt waren bei den Patienten (Kontrollen, n=86) Messungen von 153/210 (79/86) Liquor- und 200/210 (80/86) Serumproben möglich. In der Hamburger Kohorte (n=198) hatten 40% eine PPMS (n=80, 30% weiblich, mittleres Alter 53 Jahre) und 60% eine RRMS (n=118, 69% weiblich, mittleres Alter 41 Jahre). Bei Patienten und Kontrollen zeigte sich eine Zunahme des G0-IgG-Anteils mit dem Alter (Patienten: i.L. $p=0,0157$, i.S. $p<0,0001$; Kontrollen: i.L. $p=0,0012$, i.S. $p=0,0082$), sowie ein höherer G0-IgG-Anteil bei Männern als bei Frauen (Patienten: i.L. $p<0,0001$, i.S. $p<0,0001$; Kontrollen: i.L. $p=0,0053$, i.S. $p=0,0104$). MS-Patienten (Kiel) hatten i.L. ($p=0,0213$) und i.S. ($p<0,0001$) einen signifikant höheren Anteil an proinflammatorischen G0-IgG als Kontrollen. Diese Unterschiede waren in der PPMS-Gruppe stärker ausgeprägt als bei der RRMS-Gruppe und bei Patienten mit Erstmanifestation. Eine positive Korrelation des G0-IgG-Anteils mit klinischen Parametern zeigte sich bei der Erkrankungsdauer (i.L.: $p=0,0267$, i.S.: $p=n.s.$), dem Behinderungsgrad (i.L.: $p=0,0002$, i.S.: $p=0,0004$) und Liquorparametern (Gesamteiweiß i.L., Gesamt-IgG i.L., IgG-Quotient). Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen Patienten mit oder ohne Schub, mit oder ohne Therapie zum Zeitpunkt der Liquorpunktion

und keine Korrelation mit MRT-Parametern. Die Analyse der Hamburger Kohorte konnte diese Ergebnisse bestätigen mit Ausnahme der Unterschiede zwischen Patienten und Kontrollen im Serum. MS-Patienten zeigen nicht nur im Liquor, sondern möglicherweise auch im Serum ein proinflammatorisches IgG-Fc-Glykosylierungsmuster, das dem von Rheumapatienten ähnelt. Bei den Kieler Patienten zeigten sich die Veränderungen im Gegensatz zu der Hamburger Kohorte und den Patienten der beiden Vorstudien zu diesem Thema auch i.S. Dies sollte in weiteren Studien aufgrund der pathophysiologischen Bedeutung und Relevanz für zukünftige Studien erneut untersucht werden. Der ausgeprägteste Effekt war bei PPMS-Patienten nachweisbar, was mit klinischen und pathophysiologischen Besonderheiten dieser Verlaufsform einhergeht. (Popescu und Lucchinetti 2012, Dendrou et al. 2015, Abdelhak et al. 2017) Die Auffälligkeiten nahmen mit der Erkrankungsdauer und dem Behinderungsgrad zu, zeigten aber keinen deutlichen Zusammenhang mit anderen MS-Biomarkern der Krankheitsaktivität und Prognose wie oligoklonalen Banden im Liquor und MRT-Auffälligkeiten. (Housley et al. 2015) Geschlechts- und altersabhängige Veränderungen stehen in Einklang mit bisherigen Ergebnissen in der Literatur. (Russel et al. 2018)

Unsere Ergebnisse sprechen für eine Erkrankungsdauer-abhängige, persistierende Dysregulation der „Immunologischen Homöostase“ in Richtung proinflammatorisches Milieu nicht nur intrathekal, sondern möglicherweise auch im systemischen Immunkompartiment bei MS. Ob die pathologische IgG-Fc-Glykosylierung lediglich einen Biomarker einer anhaltenden Krankheitsaktivität bei MS darstellt oder auch kausal zur Krankheitsprogression beiträgt, muss in weiteren funktionellen Studien untersucht werden. Aufgrund der großen Überlappung der Werte zwischen MS-Patienten und Kontrollen, sowie zwischen den einzelnen MS-Verlaufsformen ist das IgG-Fc-Glykosylierungsmuster gegenwärtig nicht als diagnostischer Test geeignet. Die schwachen bzw. fehlenden Veränderungen im Zusammenhang mit akuten Krankheitsschüben und MRT-Auffälligkeiten zeigen, dass dieser Biomarker eine akute Krankheitsaktivität für den klinischen Alltag nicht ausreichend abbildet.

9 Literaturverzeichnis

Abdelhak, A., Martin, W., Tumani, H. (2017): Primary progressive multiple sclerosis. putting together the puzzle. In: *Frontiers in neurology* (8), S.234.

Albert, H., Collin, M., Dudziak, D., Ravetch, J.V., Nimmerjahn, F. (2008): In vivo enzymatic modulation of ige glycosylation inhibits autoimmune disease in an ige subclass-dependent manner. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (105(39)), S. 15005-15009.

Belbasis, L., Bellou, V., Evangelou, E., Ioannidis, J.P.A., Tzoulaki, I. (2015): Environmental risk factors and multiple sclerosis. an umbrella review of systematic reviews and meta-analyses. In: *The Lancet Neurology* (14(3)), S. 263–273.

Bielekova, B., Martin, R. (2004): Development of biomarkers in multiple sclerosis. In: *Brain* (127 (7)), S. 1463–1478.

Collin, M., Ehlers, M. (2013): The carbohydrate switch between pathogenic and immunosuppressive antigen-specific antibodies. In: *Experimental dermatology* (22(8)), S. 511–514.

Comabella, M., Montalban, X. (2014): Body fluid biomarkers in multiple sclerosis. In: *The Lancet Neurology* (13(1)), S. 113–126.

Corcione, A., Casazza, S., Ferretti, E., Giunti, D., Zappia, E., Pistorio, A., Gambini, C., Mancardi, G.L., Uccelli, A., Pistoia, V. (2004): Recapitulation of b cell differentiation in the central nervous system of patients with multiple sclerosis. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (101(30)), S. 11064–11069.

Decker, Y., Schomburg, R., Németh, E., Vitkin, A., Fousse, M., Liu, Y., Fassbender, K. (2016): Abnormal galactosylation of immunoglobulin g in cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients. In: *Multiple Sclerosis Journal* (14(22)), S. 1794–1803.

Dendrou, C.A., Fugger, L., Friese, M.A. (2015): Immunopathology of multiple sclerosis. In: *Nature reviews. Immunology*. (15 (9)), S. 545–558.

Deutsche Gesellschaft für Neurologie (2012, Ergänzung 2014): S2e-Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Neurologie: Diagnose und Therapie der Multiplen Sklerose [Internet]. 01/2012, Ergänzung 04/2014 [zitiert am 10.01.2019] URL: <https://www.dgn.org/leitlinien/2333-ll-31-2012-diagnose-und-therapie-der-multiplen-sklerose>

- Elliott, C., Lindner, M., Arthur, A., Brennan, K., Jarius, S., Hussey, J., Chan, A., Stroet, A., Olsson, T., Willison, H., Barnett, S.C., Meinl, E., Linington, C. (2012): Functional identification of pathogenic autoantibody responses in patients with multiple sclerosis. In: *Brain* (135(6)), S. 1819–1833.
- Epp, A., Hobusch, J., Bartsch, Y.C., Petry, J., Lilienthal, G.-M., Koeleman, C.A.M., Eschweiler, S., Möbs, C., Hall, A., Morris, S.C., Brumann, D., Engellenner, C., Bitterling, J., Rahmöller, J., Thurmann, R., Collin, M., Moremen, K.W., Strait, R.T., Blanchard, V., Petersen, A., Gemoll, T., Habermann, J.K., Petersen, F., Nandy, A., Kahlert, H., Hertl, M., Wuhrer, M., Pfützner, W., Jappe, U., Finkelman, F.D., Ehlers, M. (2018): Sialylation of igg antibodies inhibits igg-mediated allergic reactions. In: *The Journal of allergy and clinical immunology* (141(1)), S.399-402(e8)
- Farina, G., Magliozzi, R., Pitteri, M., Reynolds, R., Rossi, S., Gajofatto, A., Benedetti, M.D., Facchiano, F., Monaco, S., Calabrese, M. (2017): Increased cortical lesion load and intrathecal inflammation is associated with oligoclonal bands in multiple sclerosis patients. a combined csf and mri study. In: *Journal of neuroinflammation* (14(1)), S. 40.
- Filippi, M., Rocca, M.A., Ciccarelli, O., de Stefano, N., Evangelou, N., Kappos, L. Alex Rovira, Jaume Sastre-Garriga, Tintorè, M., Frederiksen, J.L., Gasperini, C., Palace, J., Reich, D.S., Banwell, B., Montalban, X., Barkhof, F. (2016): Mri criteria for the diagnosis of multiple sclerosis. MAGNIMS consensus guidelines. In: *The Lancet Neurology* (15(3)), S. 292–303.
- Fokkink, W.J.R., Selman, M.H.J., Dortland, J.R., Durmus, B., Kuitwaard, K., Huizinga, R., van Rijs, W., Tio-Gillen, A.P., van Doorn, P.A., Deelder, A.M., Wuhrer, M., Jacobs, B.C. (2014): Igg fc n-glycosylation in guillain-barré syndrome treated with immunoglobulins. In: *Journal of proteome research* (13(3)), S. 1722–1730.
- Goulabchand, R., Vincent, T., Batteux, F., Eliaou, J-F., Guilpain, P. (2014): Impact of autoantibody glycosylation in autoimmune diseases. In: *Autoimmunity reviews* (13(7)), S. 742–750.
- Gran, B., Hemmer, B., Vergelli, M., McFarland, HF., Martin, R. (1999): Molecular mimicry and multiple sclerosis: degenerate t-cell recognition and the induction of autoimmunity. In: *Annals of Neurology* (45(5)), S.559-567
- Hawkins, S.A., Mc Donnell, G.V. (1999): Benign multiple sclerosis? clinical course, long term follow up, and assessment of prognostic factors. In: *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* (67), S. 148–152.
- Housley, W.J., Pitt, D., Hafler, D.A. (2015): Biomarkers in multiple sclerosis. In: *Clinical immunology* (161(1)), S. 51–58.

- Jones, M.B., Oswald, D.M., Joshi, S., Whiteheart, S.W., Orlando, R., Cobb, B.A. (2016): B-cell-independent sialylation of igg. In: Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. (113(26)) S.7207–7212.
- Kaneko, Y., Nimmerjahn, F., Ravetch, J.V. (2006): Anti-inflammatory activity of immunoglobulin g resulting from fc sialylation. In: Science (313), S. 670–673.
- Katsavos, S., Anagnostouli, M. (2013): Biomarkers in multiple sclerosis. an up-to-date overview. In: Multiple sclerosis international (2013): 340508 DOI: 10.1155/2013/340508.
- Krištić, J., Vučković, F., Menni, C., Klarić, L., Keser, T., Beccheli, I. et al. (2014): Glycans are a novel biomarker of chronological and biological ages. In: The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences (69(7)), S. 779–789.
- Kronimus, Y., Dodel, R., Galuska, S.P., Neumann, S. (2019): Igg fc n-glycosylation: alterations in neurologic diseases and potential therapeutic target? In: Journal of Autoimmunity (96), S. 14–23.
- Kurtzke, J.F. (1983): Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). In: Neurology (33(11)), S. 1444-1452.
- Limmroth, V., Sindern, E. (2004): Multiple Sklerose. Taschenatlas spezial. Epidemiologie und Genetik: Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart
- Link, H., Huang, Y-M. (2006): Oligoclonal bands in multiple sclerosis cerebrospinal fluid. an update on methodology and clinical usefulness. In: Journal of Neuroimmunology (180(1)), S. 17–28.
- Lublin, F.D., Reingold, S.C. (1996): Defining the clinical course of multiple sclerosis. an international survey. In: Neurology (46), S. 907–911.
- Lublin, F.D., Reingold, S.C., Cohen, J.A., Cutter, G.R., Sørensen, P.S., Thompson, A.J., Wolinsky, J.S., Balcer, L.J., Banwell, B., Barkhof, F., Bebo Jr., B., Calabresi, P.A., Clanet, M., Comi, G., Fox, R.J., Freedman, M.S., Goodman, A.D., Inglesse, M., Kappos, L., Kieseier, B.C., Lincoln, J.A., Lubetzki, C., Miller, A.E., Montalban, X., O'Connor, P.W., Petkau, J., Pozzilli, C., Rudick, R.A., Sormani, M.P., Stüve, O., Waubant, E., Polman, C.H. (2013): Defining the clinical course of multiple sclerosis. the 2013 revisions. In: Neurology (83), S. 278–286.
- Lucchinetti, C.F., Brück, W., Parisi, J., Scheithauer, B., Rodriguez, M., Lassmann, H. (2000): Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination. In: Annals of Neurology (47(6)), S.707-717.

Lycklama a` Nijeholt, G.J., van Walderveen, M.A.A., Castelijns, J.A., van Waesberghe, J.H.T.M., Polman, C., Scheltens, P., Rosier, P.F.W.M., Jongen, P.J.H., Barkhof, F. (1998): Brain and spinal cord abnormalities in multiple sclerosis. correlation between mri parameters, clinical subtypes and symptoms. In: *Brain* (121), S.687–697.

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. In: *Brain* (130), S. 1089–1104.

McDonald, W.I., Compston, A., Edan, G., Goodkin, D., Hartung, H.P., Lublin, F.D., McFarland, H.F., Paty, D.W., Polman, C.H., Reingold, S.C., Sandberg-Wollheim, M., Sibley, W., Thompson, A., van den Noort, S., Weinshenker, B.Y., Wolinsky, J.S. (2001): Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the international panel on the diagnosis of multiple sclerosis. In: *Annals of Neurology* (50(1)), S. 121–127.

Montalban, X., Hauser, S.L., Kappos, L., Arnold, D.L., Bar-Or, A., Comi, G., de Seze, J., Giovannoni, G., Hartung, H.P., Hemmer, B., Lublin, F., Rammohan, K.W., Selmaj, K., Traboulsee, A., Sauter, A., Masterman, D., Fontoura, P., Belachew, S., Garren, H., Mairon, N., Chin, P., Wolinsky, J.S. (2017): Ocrelizumab versus placebo in primary progressive multiple sclerosis. In: *The New England Journal of Medicine* (376(3)), S. 209–220.

Multiple Sclerosis International Federation (2013): Atlas-of-MS 2013. Mapping multiple sclerosis around the world [Internet]. 2013, [zitiert am 20.12.2018] URL: www.msif.org/about-us/who-we-are-and-what-we-do/advocacy/atlas/

Oefner, C.M., Winkler, A., Hess, C., Lorenz, A.K., Holecska, V., Huxdorf, M., Schommartz, T., Petzold, D., Bitterling, J., Schoen, A-L., Stoehr, A.D., Van, D.V., Darcan-Nikolaisen, Y., Blanchard, V., Schmutte, I., Laumonier, Y., Ströver, H.A., Hegazy, A.N., Eiglmeier, S., Schoen, C.T., Mertes, M.M.M., Loddenkemper, C., Löhning, M., König, P., Petersen, A., Luger, E.O., Collin, M., Köhl, J., Hutloff, A., Hamelmann, E., Berger, M., Wardemann, H., Ehlers, M. (2012): Tolerance induction with t cell-dependent protein antigens induces regulatory sialylated iggs. In: *The Journal of allergy and clinical immunology* (129(6)), S. 1647-55.e13.

Pasek, M., Duk, M., Podbielska, M., Sokolik, R., Szechiński, J., Lisowska, E., Krotkiewski, H. (2006): Galactosylation of igg from rheumatoid arthritis patients - changes during therapy. In: *Glycoconjugate journal* (23(7-8)), S. 463–471.

Petersen, G., Wittmann, R., Arndt, V. Göppfarth, D. (2014): Epidemiologie der Multiplen Sklerose in Deutschland. Regionale Unterschiede und Versorgungsstruktur in Abrechnungsdaten der gesetzlichen Krankenversicherung. In: *Der Nervenarzt* (85(8)), S. 990–998.

Pingoud, A., Urbanke, C. (1997): *Arbeitsmethoden der Biochemie*, Verlag de Gruyter, Berlin, New York

Popescu, B.F.G., Lucchinetti, C.F. (2012): Pathology of demyelinating diseases. In: *Annual reviews of pathology* (7), S. 185–217.

Rademacher, T. W.; Williams, P.; Dwek, R. A. (1994): Agalactosyl glycoforms of ige autoantibodies are pathogenic. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (91(13)), S. 6123–6127.

Reiber, H. (2006): *Liquordiagnostik*. In: Berlit, P., Hrsg. *Klinische Neurologie*. 2.Aufl., Berlin, Heidelberg: Springer. S.137-170.

Roxburgh, R.H, Seaman, S.R., Masterman, T., Hensiek, A.E., Sawcer, S.J, Vukusic, S., Achiti, I., Confavreux, C., Coustans, M., le Page, E., Edan, G., McDonnell, G.V., Hawkins, S., Trojano, M., Liguori, M., Cocco, E., Marrosu, M.G., Tesser, F., Leone, M.A., Weber, A., Zipp, F., Mitterski, B., Epplen, J.T., Oturai, A., Sørensen, P.S., Celius, E.G., Lara, N.T., Montalban, X., Villoslada, P., Silva, A.M., Marta, M., Leite, I., Dubois, B., Rubio, J., Butzkueven, H., Kilpatrick, T., Mycko, M.P., Selmaj, K.W., Rio, M.E., Sá, M., Salemi, G., Savettieri, G., Hillert, J., Compston, DA. (2005): Multiple sclerosis severity score: using disability and disease duration to rate disease severity. In: *Neurology* (64(7)), S. 1144-1151.

Russell, A., Adua, E., Ugrina, I., Laws, S., Wang, W. (2018): Unravelling immunoglobulin g fc n-glycosylation. a dynamic marker potentiating predictive, preventive and personalised medicine. In: *International journal of molecular sciences* (19(2)) S.390-408

Selman, M.H.J., Niks, E.H., Titulaer, M.J., Verschuuren, J.J.G.M., Wuhrer, M., Deelder, A.M. (2011): Igg fc n-glycosylation changes in lambert-eaton myasthenic syndrome and myasthenia gravis. In: *Journal of proteome research* (10(1)), S. 143–152.

Simurina, M., de Haan, N., Vuckovic, F., Kennedy, N.A., Stambuk, J., Falck, D., Trbojevic-Akmacic, I., Clerc, F., Razdorov, G., Khon, A., Latiano, A., D’Incà, R., Danese, S., Targan, S., Landers, C., Dubinsky, M., The Inflammatory Bowel Disease Biomarkers Consortium, McGovern, D.P.B., Annese, V., Wuhrer, M., Lauc, G. (2018): Glycosylation of immunoglobulin g associates with clinical features of inflammatory bowel diseases. In: *Gastroenterology* (154(5)), S.1320-1333.

Thompson, A. J., Banwell, B.L., Barkhof, F., Carroll, W.M., Coetzee, T., Comi, G. Jorge Correale, Franz Fazekas, Filippi, M., Freedman, M.S., Fujihara, K., Galetta, S.L., Hartung, H.P., Kappos, L., Lublin, F.D., Marrie, R.A., Miller, A.E., Miller, D.H., Montalban, X., Mowry, E.M., Sorensen, P.S., Tintoré, M., Traboulsee, A.L., Trojano, M., Uitdehaag, B.M.J. (2018): Diagnosis of multiple sclerosis. 2017 revisions of the mcdonald criteria. In: *The Lancet Neurology* (17(2)), S. 162–173.

Tintoré, M., Rovira, A., Río, J., Nos, C., Grivé, E., Téllez, N., Pelayo, R., Comabella, M., Sastre-Garriga, J., Montalban, X. (2006): Baseline mri predicts future attacks and disability in clinically isolated syndromes. In: *Neurology* (67(6)), S. 968–972.

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? In: *Neurology* (70), S. 1079–1083.

Van de Geijn, F. E., Wuhrer, M., Selman, M.H., Willemsen, S.P., de Man, Y.A., Deelder, A.M., Hazes, J.M.W., Dolhain, R.J.E.M. (2009): Immunoglobulin g galactosylation and sialylation are associated with pregnancy-induced improvement of rheumatoid arthritis and the postpartum flare: results from a large prospective cohort study. In: *Arthritis research & therapy* (11(6)), R193.

Vučković, F., Krištić, J., Gudelj, I., Teruel, M., Keser, T., Pezer, M., Pučić-Baković, M., Štambuk J., Trbojević-Akmačić, I., Barrios, C., Pavić, T., Menni, C., Wang, Y., Zhou, Y., Cui, L., Song, H., Zeng, Q., Guo, X., Pons-Estel, BA., McKeigue, P., Leslie Patrick, A., Gornik, O., Spector, T.D., Harjaček, M., Alarcon-Riquelme, M., Molokhia, M., Wang, W., Lauc, G. (2015): Association of systemic lupus erythematosus with decreased immunosuppressive potential of the igg glycome. In: *Arthritis & rheumatology* (Hoboken, N.J.) (67(11)), S. 2978–2989.

Weinshenker, B.G., Rice, G.P.A., Noseworthy, J.H., Carriere, W., Baskerville, J., Ebers, G.C. (1991): The natural history of multiple sclerosis: a geographically based study. 3. multivariate analysis of predictive factors and models of outcome. In: *Brain* (114), S. 1045–1056.

Wiendl, H., Friese, M.A., Limmroth, V., Hohlfeld, R. (2012): Brandt, T., Diener, H.C., Gerloff, C. (Hrsg.): *Therapie und Verlauf neurologischer Erkrankungen*, 6. Aufl., S.625-S.696, Verlag W. Kohlhammer, Stuttgart

Wuhrer, M., Selman, M.H.J., McDonnell, L.A., Kümpfel, T., Derfuss, T., Khademi, M., Olsson, T., Hohlfeld, R., Meinl, E., Krumbholz, M. (2015): Pro-inflammatory pattern of igg1 fc glycosylation in multiple sclerosis cerebrospinal fluid. In: *Journal of neuroinflammation* (12), S. 235.

10 Abbildungsverzeichnis

1. Unterschiedliche Erkrankungsverläufe bei MS. Darstellung der Dynamik des Behinderungsgrads über die Zeit. (Limmroth, V. und Sindern, E. 2004, S.17)
2. Qualitativer Nachweis einer intrathekalen IgG-Synthese in Form von oligoklonalen Banden: Charakterisierung nach Typ 1-5: Typ 1: Keine Banden im Liquor und im Serum. Typ 2: Oligoklonale IgG-Banden im Liquor, nicht im Serum. Interpretation: Intrathekale IgG-Synthese. Typ 3: Oligoklonale Banden im Liquor. und zusätzlich identische oligoklonale Banden im Liquor und im Serum. Interpretation: Intrathekale IgG-Synthese. Typ 4: Übereinstimmende oligoklonale Bandenmuster im Liquor und im Serum. Interpretation: Keine intrathekale IgG-Synthese, systemische Immunreaktion. Typ 5: Monoklonale Bandenmuster im Liquor und im Serum. Interpretation: Systemische Paraproteinämie. (Reiber 2006, S. 149)
3. Aufbau des IgG-Fc-N-Glykans an der Asparaginsäure an Position 297: Grundgerüst aus 4 N-Acetylglucosaminen (blau) und 3 Mannosemolekülen (grün). Variable Bestandteile: Fukose (rot), abzweigendes N-Acetylglucosamin (hellblau), Galaktose (gelb), Sialinsäure (pink). Durch enzymatische Behandlung mit Endoglycosidase aus Streptococcus pyogenes kann das Fc-N-Glykan bis auf das Kernmolekül N-Acetylglucosamin und eine Fukose abgespalten werden. G0 = agalaktosyliert+asialyliert, G1+G2 = terminal galaktosyliert, G1S1, G2S1, G2S2 = sialyliert. (Epp et al. 2018, S. 400)
4. Assoziation der verschiedenen IgG-Fc-Glykoformen zu pro-bzw. antiinflammatorischen Immunreaktionen. Rechte Spalte: Rezeptorkomplexe, über die IgG durch seine variable IgG-Fc-Glykosylierung pro- oder antiinflammatorisch wirkt. Fcγ-R2B = inhibitorisch wirksam, SIGN-R1/DC-SIGN = CD209, Typ2-FcγR der C-Typ-Lektin-Rezeptorfamilie. (Collin und Ehlers 2013, S. 512)
5. Das pro-/antiinflammatorische Umgebungsmilieu beeinflusst die IgG-Fc-Glykosylierung durch Plasmazellen (PC), APC = Antigen-präsentierende Zelle. (Collin und Ehlers 2013, S. 513)
6. Aufzeichnung der mittels matrixunterstützter Laser-Desorptions/Ionisations-Flugzeit-Massenspektrometrie gesammelten Peak-Fractionen einer Glykan-Gruppe über die Zeit als Chromatogramm.
7. a) Kieler Kohorte: Anzahl der Kontrollen und Patienten mit jeweiliger Anzahl der Liquor- und Serumwerte. Die SPMS-Kohorte wurde nicht zur MS-Gesamtkohorte gezählt. (Pat.= Patienten, Kont.= Kontrollen, n = Anzahl, MS = Multiple Sklerose, RRMS = schubförmig-remittierende MS, PPMS = primär chronisch-progrediente MS, SPMS = sekundär chronisch-progrediente MS)
b) Hamburger Kohorte: Anzahl Kontrollen und Patienten mit jeweiliger Anzahl der Serumwerte. n=Anzahl, MS=Multiple Sklerose, RRMS=schubförmig-remittierende MS, PPMS=primär chronisch-progrediente MS

Vergleich der G0-, term gal-,sial-IgG-Anteile am Gesamt-IgG-Fc-N-Glykan zwischen MS-Gesamtkohorte und Gesamtkontrollkohorte bzw. zwischen Gruppe mit MS-Verlaufsform und jeweiliger Kontrollkohorte der Kieler Kohorte

8. Kieler Kohorte: Vergleich der Glykoformen-Anteile am Gesamt-IgG-Fc-N-Glykan im Liquor (i.L.) (links) und im Serum (i.S.) (rechts) zwischen MS-Gesamtkohorte und Gesamtkontrollkohorte bzw. zwischen Gruppe mit MS-Verlaufsform und jeweiliger Kontrollkohorte. Angabe der Grundgesamtheit in Tab.3a. Darstellung: Mittelwert + 95%-Konfidenzintervall. Statistik: zweiseitiger t-Test, Angabe der p-Werte, MS = Multiple Sklerose, RRMS = schubförmig-remittierende MS, PPMS = primär chronisch-progrediente MS
9. Kieler Kohorte: Vergleich der Glykoformen-Anteile am Gesamt-IgG-Fc-N-Glykan im Liquor (i.L.) (oben) und im Serum (i.S.) (unten) zwischen Patienten mit Erstmanifestation, RRMS = schubförmig-remittierender MS und PPMS = primär chronisch-progredienter MS. Beschreibung der Grundgesamtheit in Tab. 3a. Darstellung: Mittelwert+95% -Konfidenzintervall. Statistik: One-way-ANOVA mit post-hoc-Analyse, Angabe der p-Werte
10. Kieler Kohorte: Vergleich der Glykoformen-Anteile am Gesamt-IgG-Fc-N-Glykan im Serum (i.S.) (unten) und im Liquor (i.L.) (oben) zwischen weiblichen und männlichen Patienten bzw. weiblichen und männlichen Kontrollen. N= Anzahl, w=weiblich, m=männlich. G0, term gal, sial i.L. und i.S. Kontrollen w n=55; Kontrollen m n=25. G0, term gal, sial i.S. Pat. w n=139, i.L. n=106; G0, term gal, sial i.S. m n=61, i.L. n=47. Darstellung: Mittelwert+95%-Konfidenzintervall. Statistik: zweiseitiger t-Test, Angabe der p-Werte, MS= Multiple Sklerose, G0 = agalaktosyliertes IgG, term gal = terminal galaktosyliertes IgG, sial = sialyliertes IgG
11. a) Kieler Kohorte: Korrelation von Alter zum Zeitpunkt der Liquorpunktion (LPZP) und Glykananteilen am Gesamt-IgG-Fc-N-Glykan im Liquor (i.L.) (oben) und im Serum (i.S.) (unten) bei Patienten. Beschreibung der Grundgesamtheit in Tab. 2a, 3a. Darstellung mit linearer Regressionsgeraden + 95%-Konfidenzintervall. Statistik: logarithmische Transformation des klinischen Parameters Alter zum LPZP, Korrelation mit Pearson-Korrelationskoeffizient (r), Angabe der p-Werte
b) Kieler Kohorte: Korrelation von Alter zum Zeitpunkt der Liquorpunktion (LPZP) und Glykananteilen am Gesamt-IgG-Fc-N-Glykan im Liquor (i.L.) (oben) und im Serum (i.S.) (unten) bei Kontrollen. Beschreibung der Grundgesamtheit in Tab. 2a, 3a. Darstellung mit linearer Regressionsgeraden + 95%-Konfidenzintervall. Statistik: logarithmische Transformation des klinischen Parameters Alter zum LPZP, Korrelation mit Pearson-Korrelationskoeffizient (r), Angabe der p-Werte
12. Kieler Kohorte: Vergleich der altersabhängigen Veränderung der Glykananteile am Gesamt-IgG-Fc-N-Glykan von Patienten und Kontrollen im Liquor (i.L.) und im Serum (i.S.). Darstellung mit linearer Regressionsgeraden + 95%-Konfidenzintervall. Beschreibung der Grundgesamtheit in Tab. 2a, 3a. Statistik: Vergleich der Steigung und Y-Achsenabschnitte der linearen Regressionsgeraden von Kontrollen und Patienten. Angabe der p-Werte, MS = Multiple Sklerose, n.s.=nicht signifikant, p1 = n.s.

und $p_2 =$ signifikant bedeutet, Geraden unterscheiden sich nicht in der Steigung aber im y-Achsenabschnitt

13. Kieler Kohorte: Korrelation von EDSS = expanded disability status scale zum Zeitpunkt der Liquorpunktion und Glykananteilen am Gesamt-IgG-Fc-N-Glykan im Liquor (i.L.) (oben) und im Serum (i.S.) (unten). Grundgesamtheit: i.L. Anzahl: $n=150$; i.S. $n=197$. Darstellung mit lin. Regressionsgeraden + 95%-Konfidenzintervall. Statistik: Korrelation mit Spearman-Rang-Korrelationskoeffizient (r). Angabe der p-Werte, MS = Multiple Sklerose
14. Kieler Kohorte: Korrelation von multiple sclerosis severity score = MSSS zum Zeitpunkt der Liquorpunktion und Glykananteilen am Gesamt-IgG-Fc-N-Glykan im Liquor (i.L.) (oben) und im Serum (i.S.) (unten): i.L. Anzahl: $n=149$; i.S. $n=196$. Darstellung mit lin. Regressionsgeraden + 95%-Konfidenzintervall. Statistik: Korrelation mit Spearman-Rang-Korrelationskoeffizient (r). Angabe der p-Werte, MS = Multiple Sklerose
15. Kieler Kohorte: Korrelation der Erkrankungsdauer (in Jahren) zum Zeitpunkt der Liquorpunktion mit den Glykananteilen am Gesamt-IgG-Fc-N-Glykan im Liquor (i.L.) (oben) und im Serum (i.S.) (unten) Grundgesamtheit: i.L. Anzahl: $n=148$; i.S. $n=192$. Darstellung mit linearer Regressionsgeraden + 95%-Konfidenzintervall. Statistik: logarithmische Transformation des klinischen Parameters Erkrankungsdauer, Korrelation mit Pearson-Korrelationskoeffizient (r). Angabe der p-Werte, n.s. = nicht signifikant, MS = Multiple Sklerose
16. Kieler Kohorte: Vergleich der Glykananteile am Gesamt-IgG-Fc-N-Glykan im Liquor (i.L.) (oben) und im Serum (i.S.) (unten) von Patienten <10 Jahren und >10 Jahren Erkrankungsdauer zum Zeitpunkt der Liquorpunktion. n = Anzahl, i.L. <10 Jahre $n=153$, >10 Jahre $n=15$; i.S. <10 Jahre $n=186$, >10 Jahre $n=16$. Darstellung mit Mittelwert + 95%-Konfidenzintervall. Statistik: zweiseitiger t-Test. Angabe der p-Werte, MS = Multiple Sklerose
17. Kieler Kohorte: Unterschied der IgG-Fc-Glykosylierung im Liquor (i.L.) (oben) und im Serum (i.S.) (unten) von Patienten, die während, und Patienten, die außerhalb eines akuten Schubes liquorpunktiert wurden. n = Anzahl, i.L. <6 Wochen $n=97$, >6 Wochen $n=60$; i.S. <6 Wochen $n=118$; >6 Wochen $n=92$. Darstellung mit Mittelwert+95%-Konfidenzintervall. Statistik: zweiseitiger t-Test. Angabe der p-Werte, MS = Multiple Sklerose, LP = Liquorpunktion, G0 = agalaktosyliertes IgG, term gal = terminal galaktosyliertes IgG, sial = sialyliertes IgG
18. Kieler Kohorte: Korrelation der Glykananteile am Gesamt-IgG-Fc-N-Glykan im Liquor (i.L.) (oben) und im Serum (i.S.) (unten) mit der Zeit seit dem letzten Schubbeginn bis zum LPZP. n = Anzahl: i.L. $n=107$; i.S. $n=136$. Darstellung mit linearer Regressionsgeraden + 95%-Konfidenzintervall. Statistik: logarithmische Transformation des klinischen Parameters Zeit seit dem letzten Schubbeginn, Korrelation mit Pearson-Korrelationskoeffizient (r). Angabe der p-Werte, MS = Multiple Sklerose, LPZP = Zeitpunkt der Liquorpunktion, n.s. = nicht signifikant
19. Unterschied der Glykananteile am Gesamt-IgG-Fc-N-Glykan im Liquor (i.L.) von Patienten, die vor dem Zeitpunkt der Liquorpunktion (LPZP) keine Therapie erhalten haben ($n=174$) und Patienten, die

bereits therapiert wurden (Cortisontherapie, Intervalltherapie) (n=33) (bezogen auf Zeit >6Wochen vor LPZP), Darstellung mit Mittelwert+95%-Konfidenzintervall. Statistik: zweiseitiger t-Test. Angabe der p-Werte, MS = Multiple Sklerose

20. Hamburger Kohorte: Vergleich der Glykananteile am Gesamt-IgG-Fc-Glykan im Serum (i.S.) von PPMS- bzw. RRMS- Pat. und Kontrollkohorten (PPMS vs. Kont. PPMS, RRMS vs. Kont. RRMS). Grundgesamtheit siehe Tab. 3b. Darstellung mit Mittelwert + 95%-Konfidenzintervall. Zweiseitiger t-Test: p=nicht signifikant, PPMS = primär chronisch-progrediente MS, RRMS = schubförmig-remittierende MS
21. Hamburger Kohorte: Vergleich der Glykananteile am Gesamt-IgG-Fc-Glykan im Serum (i.S.) von PPMS und RRMS-Patienten bzw. von Kontrollen (PPMS) und Kontrollen (RRMS). Grundgesamtheit siehe Tab. 3b. Darstellung mit Mittelwert+95%-Konfidenzintervall, Statistik: Zweiseitiger T-Test, Angabe der p-Werte, PPMS = primär chronisch-progrediente MS, RRMS = schubförmig-remittierende MS
22. Vergleich Glykananteile am Gesamt-IgG-Fc-Glykan im Serum (i.S.) von Kieler versus Hamburger Patienten (oben) und Kieler versus Hamburger Kontrollen (unten) Grundgesamtheit siehe Tab. 3b. Darstellung mit Mittelwert+95%-Konfidenzintervall. Statistik: Zweiseitiger t-Test. Angabe der p-Werte, Kont. = Kontrollen, PPMS = primär chronisch-progrediente MS, RRMS = schubförmig-remittierende MS, H = Hamburger Kohorte, K = Kieler Kohorte
23. Vergleich der altersabhängigen Veränderung der IgG-Fc-Glykosylierung von Patienten und Kontrollen i.S. bei der Hamburger Kohorte
24. Hamburger Kohorte: Vergleich der Glykan-Anteile am Gesamt-IgG-Fc-N-Glykan im Serum (i.S.) zwischen weiblichen und männlichen Patienten bzw. Kontrollen. n = Anzahl: Kontrollen weiblich n=65; Kontrollen männlich n=39; Patientinnen n=106, Patienten n=92. Darstellung mit Mittelwert+95%-Konfidenzintervall. Statistik: zweiseitiger t-Test. Angabe der p-Werte, G0 = agalaktosyliertes IgG, term gal = terminal galaktosyliertes IgG, sial = sialyliertes IgG
25. Hamburger Kohorte: Korrelation von Erkrankungsdauer zum Zeitpunkt der Liquorpunktion und Glykananteilen am Gesamt-IgG-Fc-N-Glykan im Serum (i.S.) n=198. Darstellung mit linearer Regressionsgeraden + 95%-Konfidenzintervall. Statistik: Korrelation mit Spearman-Rang-Korrelationskoeffizient, Angabe der p-Werte, MS = Multiple Sklerose, R² = Bestimmtheitsmaß
26. Hamburger Kohorte: Korrelation von expanded disability status scale (EDSS) zum Zeitpunkt der Liquorpunktion und Glykananteilen am Gesamt-IgG-Fc-N-Glykan im Serum (i.S.), n = Anzahl: n=198. Darstellung mit linearer Regressionsgeraden + 95%-Konfidenzintervall. Statistik: Korrelation mit Spearman-Rang-Korrelationskoeffizient (r). Angabe der p-Werte, MS = Multiple Sklerose

11 Tabellenverzeichnis

1. a) Demographische und klinische Charakterisierung der Kieler Patienten- und Kontrollkohorte, Angabe mit Median (Interquartilsabstand), n = Anzahl, EDSS = expanded disability status scale, MSSS = multiple sclerosis severity score, MS = Multiple Sklerose, EM = Erstmanifestation, RRMS = schubförmig-remittierende MS, PPMS = primär chronisch-progrediente MS
b) Demographische und klinische Charakterisierung der Hamburger Patienten- und Kontrollkohorte, Angabe mit Median (Interquartilsabstand), n = Anzahl, EDSS = expanded disability status scale, RRMS = schubförmig-remittierende MS, PPMS = primär chronisch-progrediente MS
c) Vergleich der Kieler und Hamburger Patientenkohorte bezüglich demographischer und klinischer Daten, Angabe mit Median (Interquartilsabstand), n=Anzahl, EDSS = expanded disability status scale, RRMS = schubförmig-remittierende MS, PPMS = primär chronisch-progrediente MS
2. a) Anteile der einzelnen Glykoformen am Gesamt-IgG-Fc-N-Glykan im Serum (i.S.) und im Liquor (i.L.) der Kieler Patienten- und Kontrollkohorte in %. Angabe mit Mittelwert (Standardabweichung), n = Anzahl, MS = Multiple Sklerose, EM = Erstmanifestation, RRMS = schubförmig-remittierende MS, PPMS = primär chronisch-progrediente MS, i.S.= im Serum, i.L.= im Liquor, G0 = agalaktosyliertes IgG, term gal = terminal galaktosyliertes IgG, sial = sialyliertes IgG
b) Anteile der einzelnen Glykoformen am Gesamt-IgG-Fc-N-Glykan im Serum (i.S.) und im Liquor (i.L.) der Hamburger Patienten- und Kontrollkohorte in %. Angabe mit Mittelwert (Standardabweichung), n = Anzahl, RRMS = schubförmig-remittierende MS, PPMS = primär chronisch-progrediente MS, G0 = agalaktosyliertes IgG, term gal = terminal galaktosyliertes IgG, sial = sialyliertes IgG

12 Anhang

Anhang 1:

Therapie-Stufenschema der schubförmigen Multiplen Sklerose, S2e-Leitlinie Multiple Sklerose der deutschen Gesellschaft für Neurologie (Deutsche Gesellschaft für Neurologie, S2e-Leitlinie 2014, S. 7)

Indikation	CIS ¹		RRMS ¹		SPMS ¹	
			1. Wahl	2. Wahl	mit aufgesetzten Schüben	ohne aufgesetzte Schübe
Eskalations-therapie			- Fingolimod ⁴ - Natalizumab ⁴	- Mitoxantron (- Cyclophosphamid) ⁵		
Basistherapie	- Glatirameracetat - Interferon-β 1a i.m. - Interferon-β 1a s.c. - Interferon-β 1b s.c.	- Glatirameracetat - Interferon-β 1a i.m. - Interferon-β 1a s.c. - Interferon-β 1b s.c. (- Azathioprin) ² (- IVIg) ³			- Interferon-β 1a s.c. - Interferon-β 1b s.c. - Mitoxantron (- Cyclophosphamid) ⁵	- Mitoxantron (- Cyclophosphamid) ⁵
Schub-therapie	2. Wahl		- Plasmaseparation			
	1. Wahl		- Methylprednisolonpuls			

¹ = Substanzen in alphabetischer Reihenfolge. Die hier gewählte Darstellung impliziert KEINE Überlegenheit einer Substanz gegenüber einer anderen innerhalb einer Indikationsgruppe (dargestellt innerhalb eines Kastens).

² = Zugelassen, wenn IFN-β nicht möglich ist oder unter Azathioprin-Therapie ein stabiler Verlauf erreicht wird.

³ = Einsatz nur postpartal im Einzelfall gerechtfertigt, insbesondere vor dem Hintergrund fehlender Behandlungsalternativen.

⁴ = Fingolimod und Natalizumab haben neben der Zulassung zur Eskalationstherapie auch eine Zulassung zur Behandlung Therapie-naiver Patienten bei mindestens 2 behindernden Schüben mit Krankheitsprogression binnen der letzten 12 Monate und mindestens einer Gd+-Läsion bzw. einer signifikanten Zunahme der T2-Läsionen in der MRT.

⁵ = Zugelassen für bedrohlich verlaufende Autoimmunkrankheiten, somit lediglich nur für fulminante Fälle als Ausweichtherapie vorzusehen, idealerweise nur an ausgewiesenen MS-Zentren.

Anhang 2:

Folgende demographische und klinische Daten, Verlaufs- und Laborparameter der Patientenkohorte wurden erhoben:

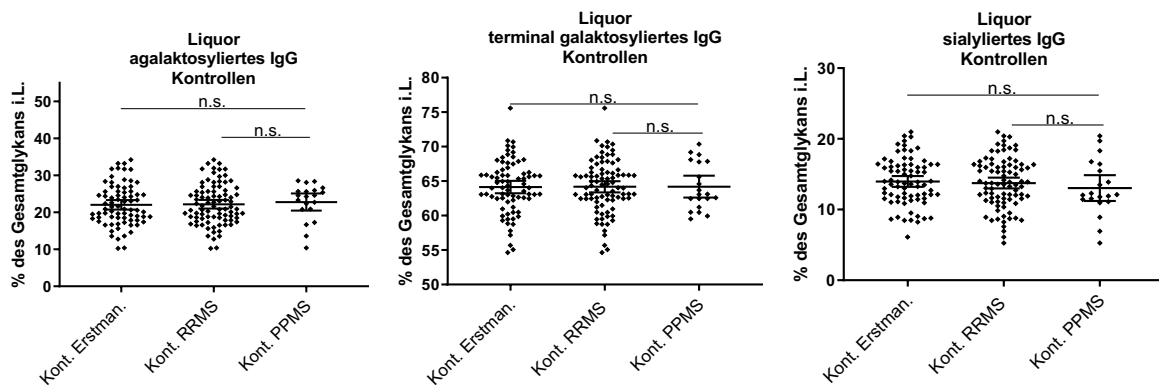
(LPZP = Zeitpunkt der Liquorpunktion, EDSS = expanded disability status scale, MSSS = multiple sclerosis severity score, OKB = oligoklonale Banden.)

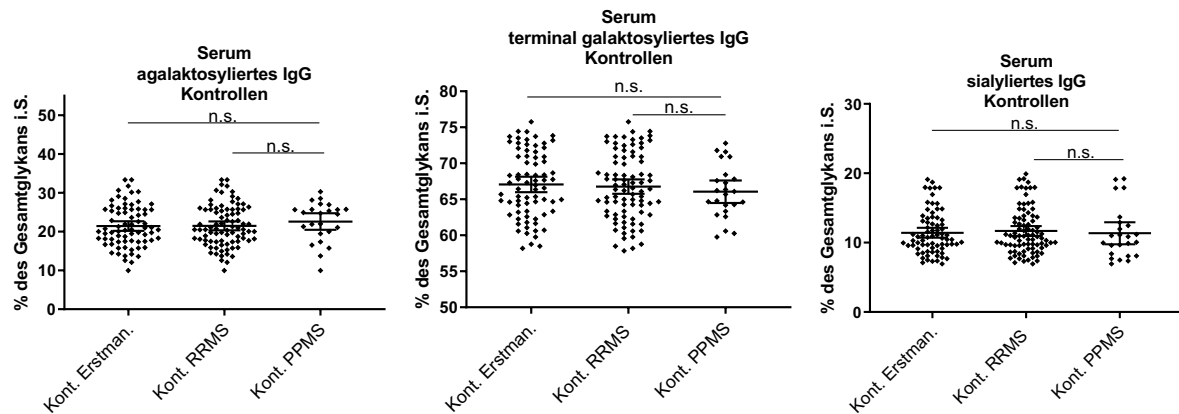
1. Geschlecht	
2. Alter bei Erstmanifestation	
3. Symptome bei Erstmanifestation	
4. Zeitintervall vom letzten Schubbeginn bis LPZP	
5. Zeitintervall LPZP bis zum nächsten Schubbeginn	
6. Daten zum LPZP:	
- Alter	
- Erkrankungsdauer	
- Vorliegen eines akuten Schubes	
- Klinischer Untersuchungsbefund	
- EDSS*	* Da selten dokumentiert, wurden EDSS-Werte häufig basierend auf der in den Arztbriefen dokumentierten Anamnese und Untersuchungsbefunde retrospektiv eingeschätzt.
- MSSS	
- Medikation	
7. Medikation:	
- Steroidtherapie im Zeitraum von 6 Wochen vor LPZP	** Interferon-beta, Glatirameracetat, Dimethylfumarat, Natalizumab, Mitoxantron, Azathioprin, Fingolimod, Teriflunomid
- Intervalltherapie vor LPZP **	
8. Liquor- und Blutwerte:	
- Liquorzellzahl/μl	

<ul style="list-style-type: none"> - Gesamteiweiß in mg/l i.L. bzw. in mg/dl i.S. - Glucose in mg/dl i.L. - Laktat in mg/dl i.L. - Albumin in mg/l i.L. bzw. in g/l i.S. - IgG, IgA, IgM in mg/l i.L. bzw. in g/l i.S. - Albumin in mg/l i.L. bzw. in g/l i.S. - Albuminquotient - IgG-Quotient - OKB - Schrankenstörung 	
<p>9. MRT-Befund:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Anzahl hypertensiver Läsionen in T2 - Anzahl Gadolinium-anreichernder Läsionen in T1 - Anzahl hypointenser Läsionen in T1 (black holes) 	
<p>10. Verlaufsbeobachtung: letztes follow-up:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Alter - EDSS - Klassifikation der MS - EDSS-Verschlechterung seit LPZP *** 	<p>*** Um die Progression der Erkrankung zwischen LPZP (ZP1) und letztem follow-up (ZP2) festzustellen, wurde ein Progressionsindex berechnet: $(EDSS\ ZP2 - EDSS\ ZP1) / \text{Zeitintervall zwischen ZP1 und ZP2.}$</p>

Anhang 3:

Kieler Kohorte (Discovery-Kohorte): Vergleich der Glykananteile-Anteile am Gesamt-IgG-Fc-N-Glykan im Serum (i.S.) (unten) und im Liquor (i.L.) (oben) der EM-/RRMS-/PPMS-Kontrollgruppe. n = Anzahl; Liquor: EM n=64, RRMS n=74, PPMS n=15; Serum: EM n=88, RRMS n=87, PPMS n=25. Darstellung mit Mittelwert+95%-Konfidenzintervall. Statistik: One-way-ANOVA mit post-hoc-Analyse, EM/Erstman. = Erstmanifestation, PPMS = primär chronisch-progrediente Multiple Sklerose, RRMS = schubförmig-remittierende Multiple Sklerose, nicht signifikant = n.s., * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001, **** p<0,0001,

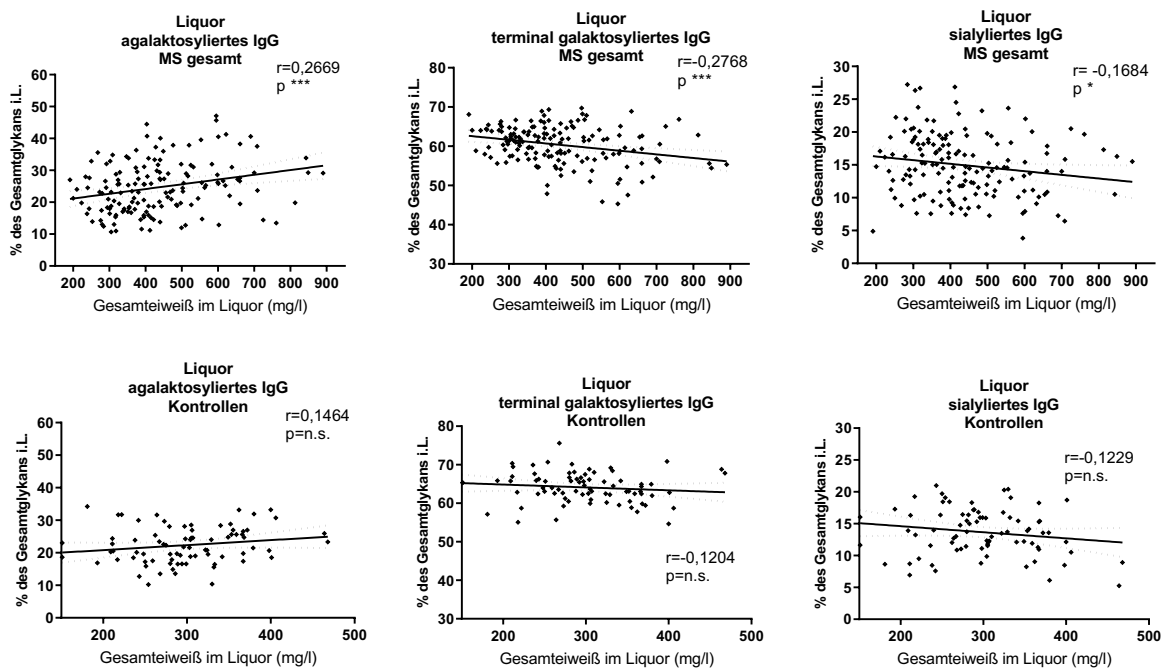




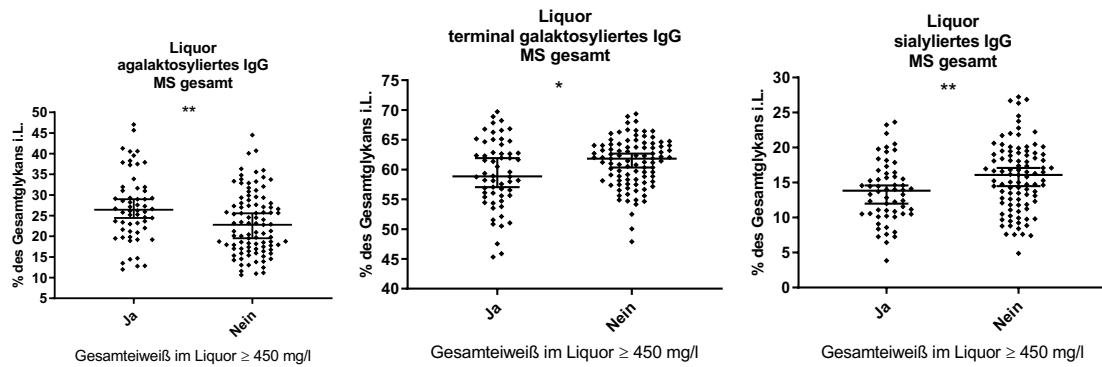
Anhang 4:

Korrelation der Glykananteile am Gesamt-IgG-Fc-N-Glykan im Liquor (i.L.) mit weiteren Liquorparametern bei Patienten der Kieler Kohorte (Discovery-Kohorte), MS = Multiple Sklerose, nicht signifikant = n.s., * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$,

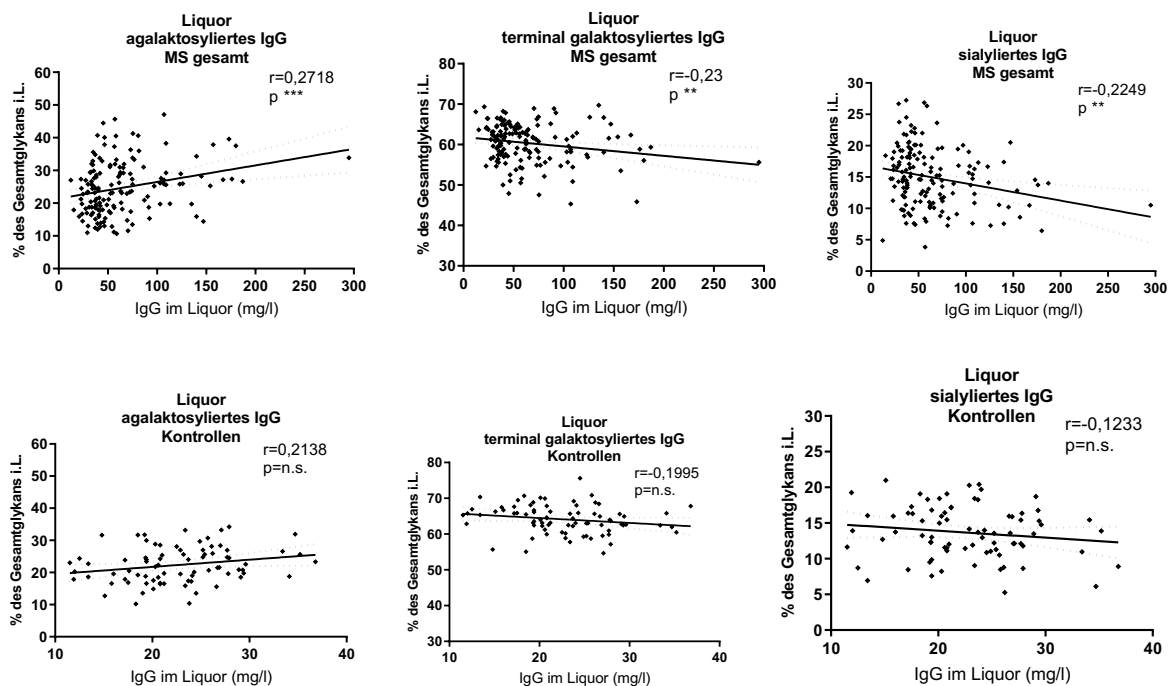
- a) Korrelation des Gesamteiweißgehalts i.L. (mg/l) mit den Glykananteilen am Gesamt-IgG-Fc-N-Glykan i.L..
 n = Anzahl: MS-Patienten n = 153 (oben), Kontrollen n = 79 (unten), Darstellung mit linearer Regressionsgeraden + 95%-Konfidenzintervall. Statistik: logarithmische Transformation, Korrelation mit Pearson-Korrelationskoeffizient (r)



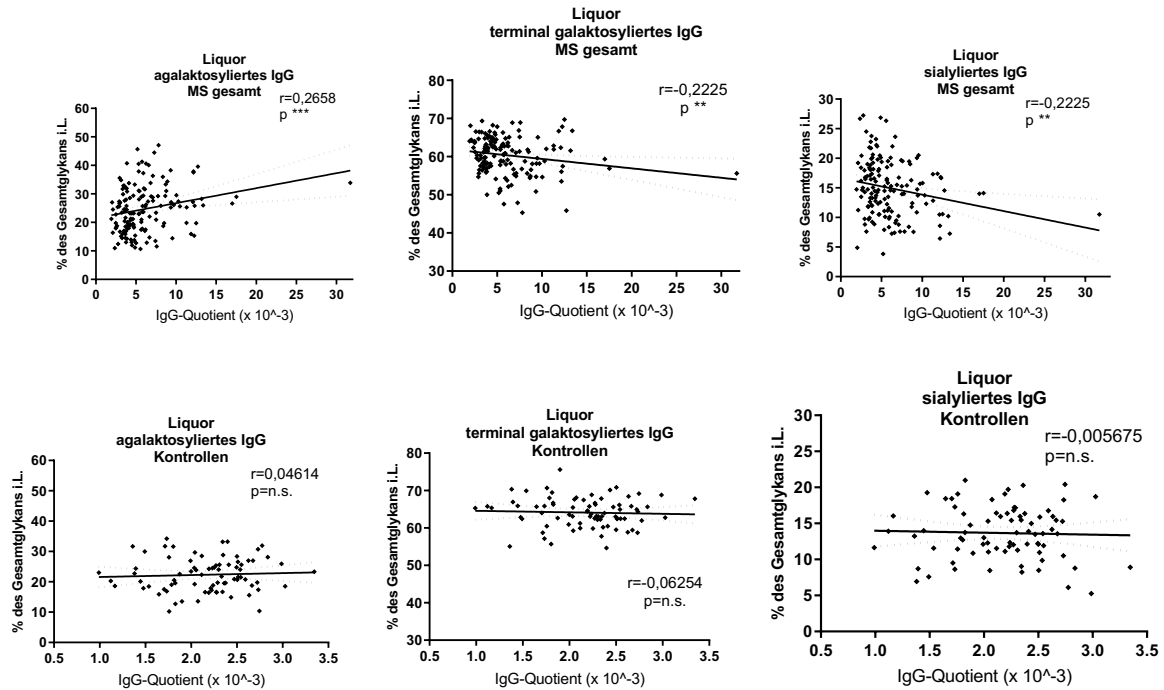
- b) Vergleich der Glykananteile am Gesamt-IgG-Fc-N-Glykan i.L. von Patienten mit pathologisch erhöhtem Gesamteiweiß i.L. (>450mg/l) (n=58) und Patienten mit normalem Gesamteiweiß i.L. (<450mg/l) (n=95). Darstellung mit Mittelwert+95%-Konfidenzintervall. Statistik: zweiseitiger t-Test



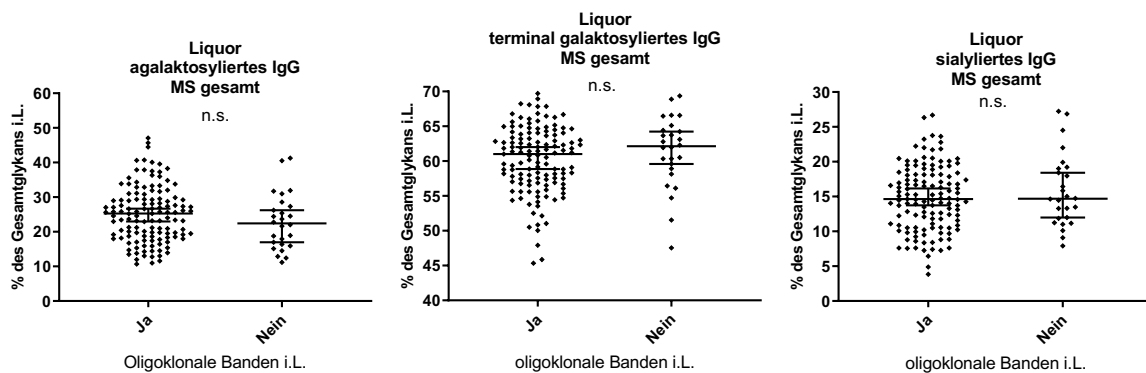
- c) Korrelation des IgG-Gehalts i.L. (mg/l) mit den Glykananteilen am Gesamt-IgG-Fc-N-Glykan i.L., MS-Patienten n = 153 (oben), Kontrollen n = 79 (unten), Darstellung mit linearer Regressionsgeraden + 95%-Konfidenzintervall. Statistik: logarithmische Transformation, Korrelation mit Pearson-Korrelationskoeffizient (r)



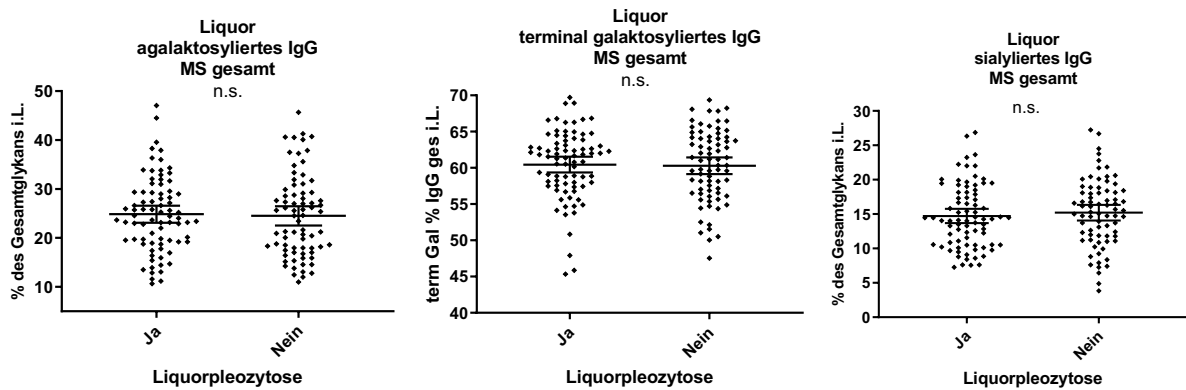
- d) Korrelation des IgG-Quotienten mit den Glykananteilen am Gesamt-IgG-Fc-N-Glykan i.L.. Patienten n=153 (oben), Kontrollen n=79 (unten), Darstellung mit linearer Regressionsgeraden + 95%-Konfidenzintervall. Statistik: logarithmische Transformation, Korrelation mit Pearson-Korrelationskoeffizient (r)



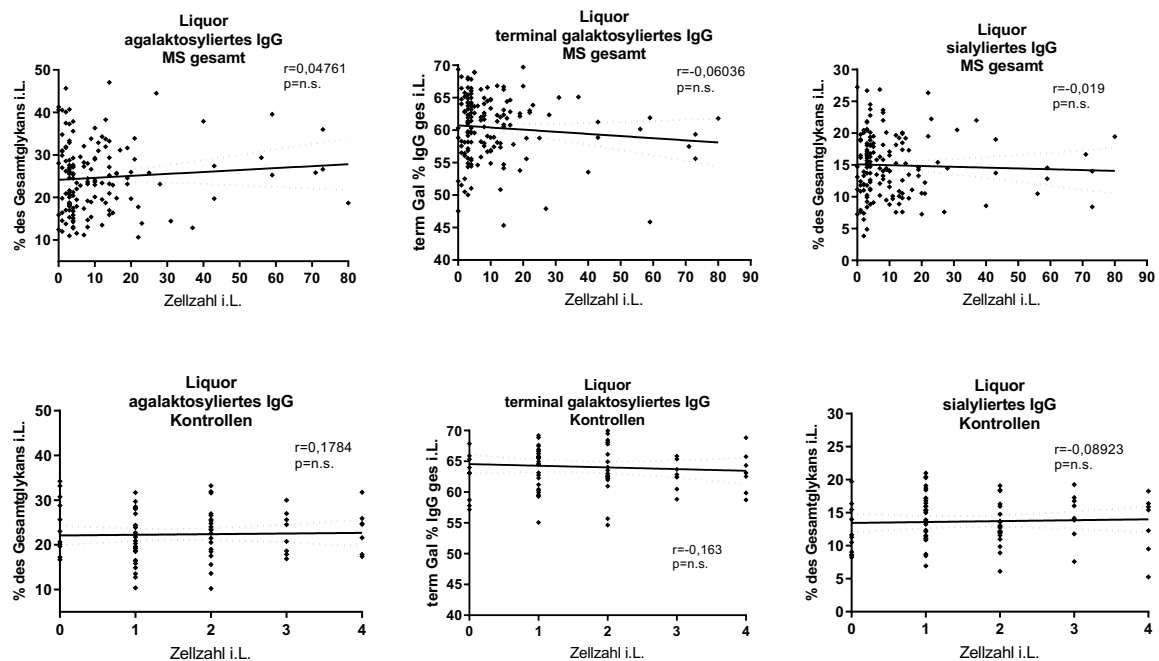
- e) Vergleich der Glykananteile am Gesamt-IgG-Fc-N-Glykan i.L. von Patienten mit ($n=127$) und Patienten ohne ($n=26$) oligoklonale Banden i.L.. Darstellung mit Mittelwert+95%-Konfidenzintervall. Statistik: zweiseitiger t-Test.



f) Vergleich der Glykananteile am Gesamt-IgG-Fc-N-Glykan i.L. von Patienten mit Liquorpleozytose (Zellzahl i.L. $>5/\mu\text{l}$) (n=79) und Patienten mit normaler Liquorzellzahl (n=74). Darstellung mit Mittelwert+95%-Konfidenzintervall. Statistik: zweiseitiger t-Test.

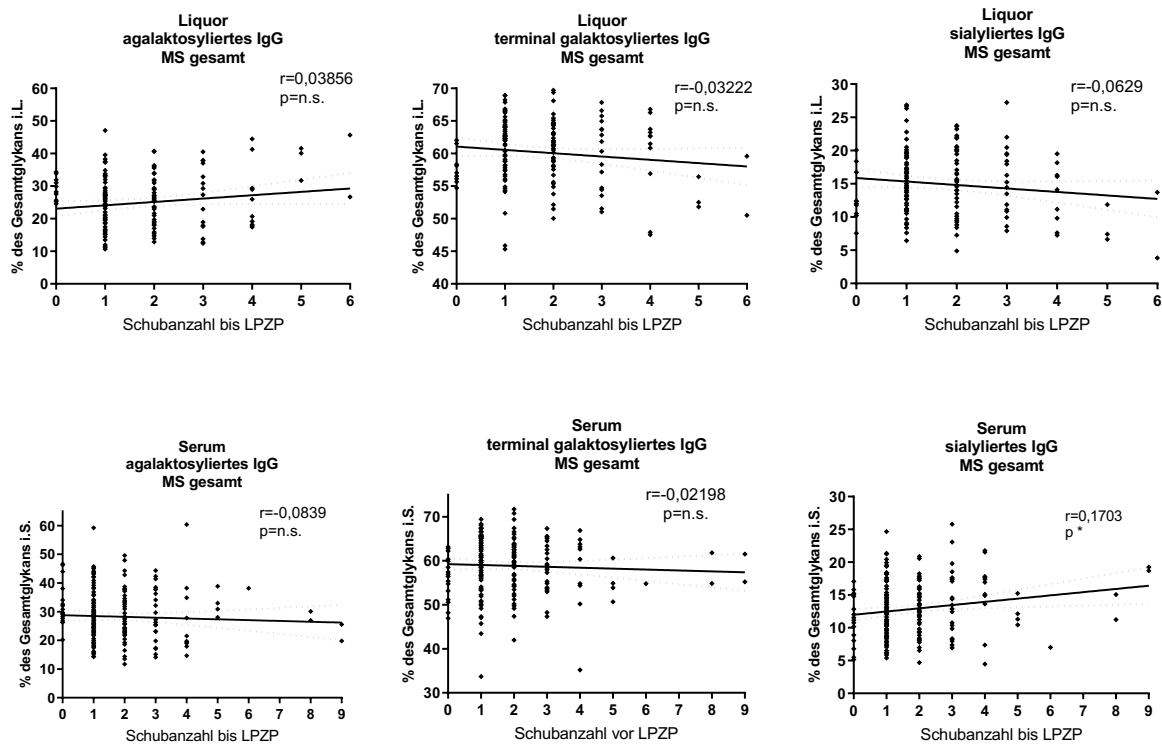


g) Korrelation der Glykananteile am Gesamt-IgG-Fc-N-Glykan i.L. mit der Zellzahl/ μl i.L.. MS-Patienten n=148 (oben), Kontrollen n=68 (unten), Darstellung mit linearer Regressionsgeraden. Statistik: logarithmische Transformation, Korrelation mit Pearson-Korrelationskoeffizient (r)



Anhang 5:

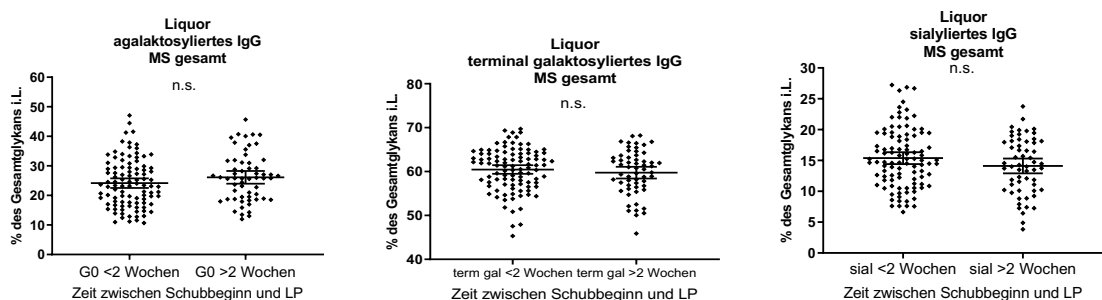
Kieler Kohorte: Korrelation der Schubanzahl bis zum Zeitpunkt der Liquorpunktion (LPZP) mit Glykananteilen am Gesamt-IgG-Fc-N-Glykan im Liquor (i.L.) (oben) und im Serum (i.S.) (unten). n = Anzahl i.L. n=154; i.S. n=207. Darstellung mit linearer Regressionsgeraden+95%-Konfidenzintervall. Statistik: Korrelation mit Spearman-Rang-Korrelationskoeffizient (r), MS=Multiple Sklerose, n.s.=nicht signifikant, *=p<0,05

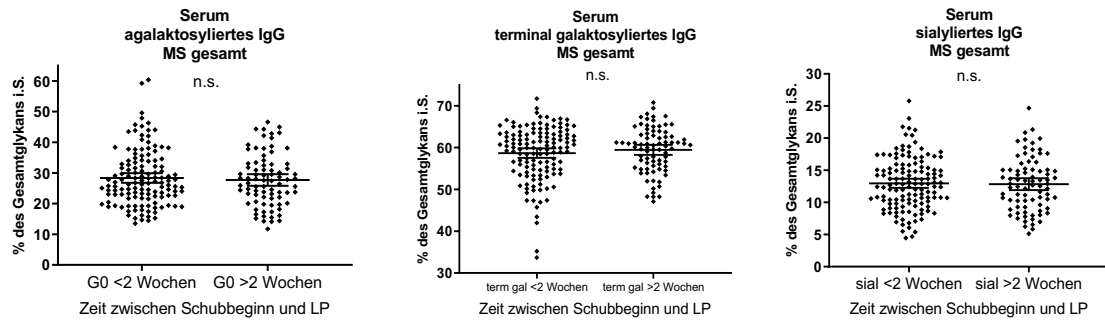


Anhang 6:

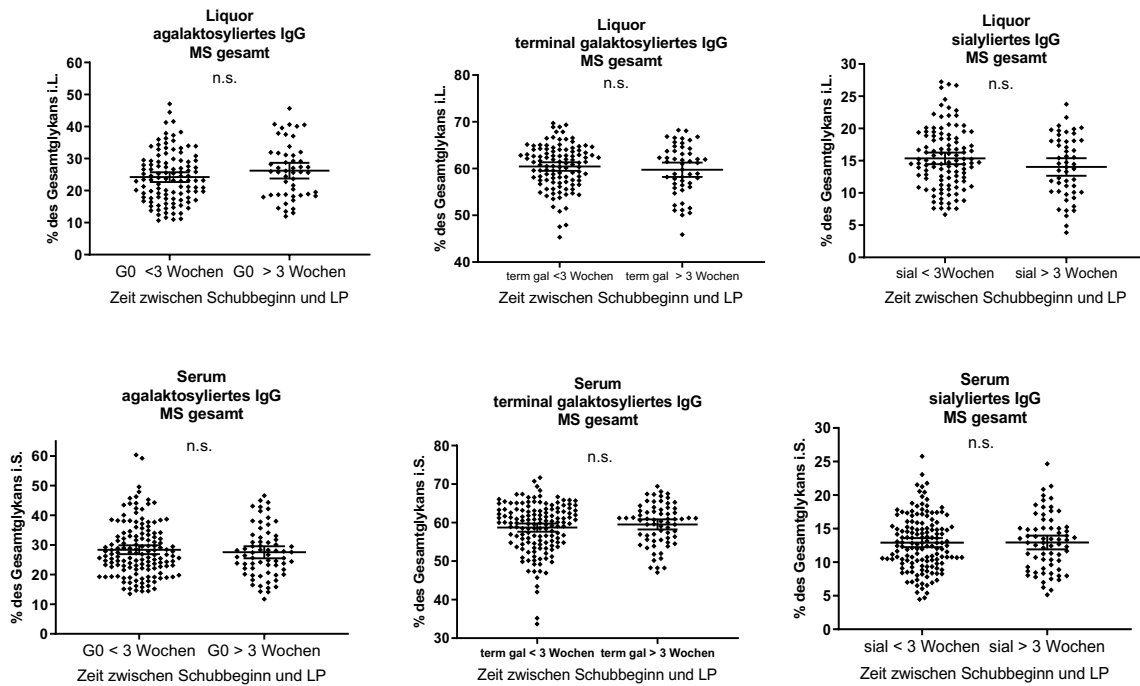
Kieler Kohorte: Unterschied der IgG-Fc-Glykosylierung im Liquor (i.L.) (oben) und im Serum (i.S.) (unten) von Patienten, deren letzter Schubbeginn innerhalb der letzten a) 2, b) 3, c) 9 Wochen vor dem Zeitpunkt der Liquorpunktion lag. Darstellung mit Mittelwert+95%-Konfidenzintervall. Statistik: zweiseitiger t-Test, MS = Multiple Sklerose, LP = Liquorpunktion, G0 = agalaktosyliertes IgG, term gal = terminal galaktosyliertes IgG, sial = sialyliertes IgG, n.s.=nicht signifikant

- a) Letzter Schubbeginn innerhalb der letzten 2 Wochen. i.L. <2 Wochen n=99; >2 Wochen n=58. i.S. <2 Wochen n=131; >2 Wochen n=80.

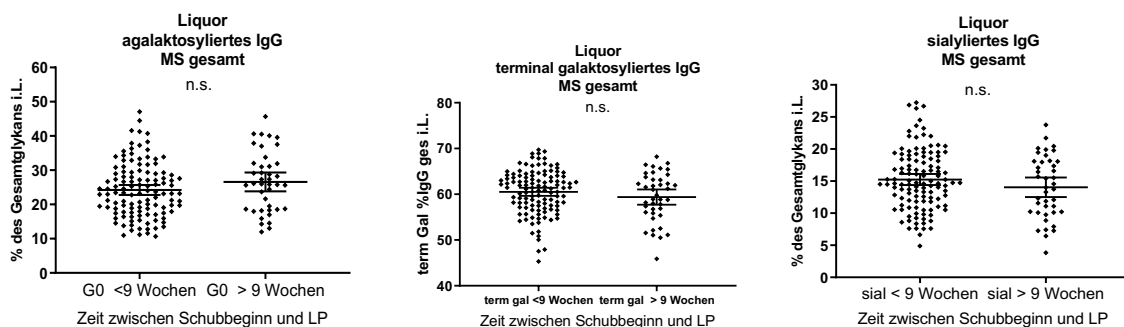


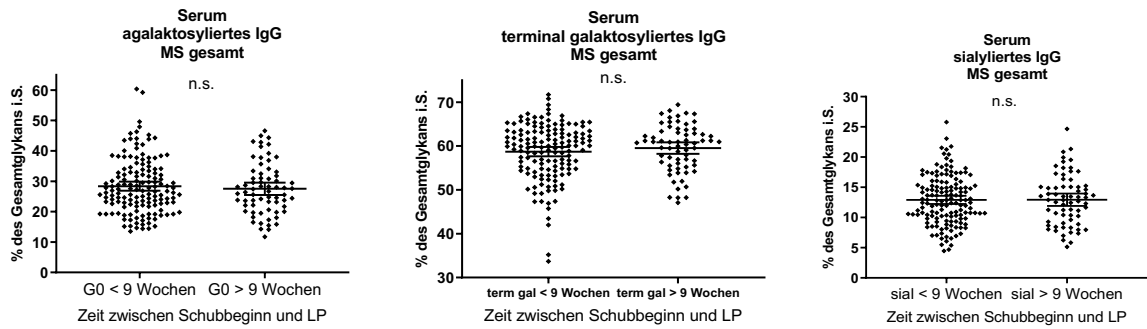


b) Letzter Schubbeginn innerhalb der letzten 3 Wochen. i.L. < 3 Wochen n=108; > 3 Wochen n=50. i.S. < 3 Wochen n=144; > 3 Wochen n=67.



c) Letzter Schubbeginn innerhalb der letzten 9 Wochen. i.L. < 9 Wochen n=117; > 9 Wochen n=41. i.S. < 9 Wochen n=144; > 9 Wochen n=67.

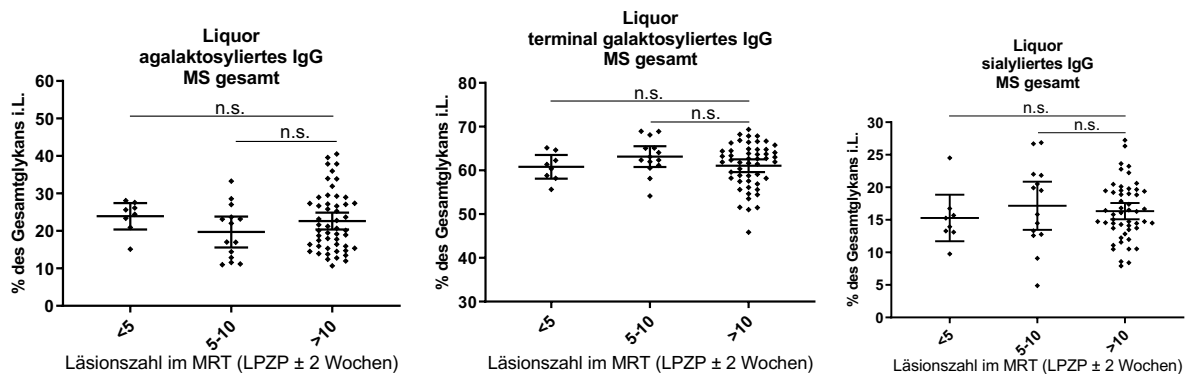




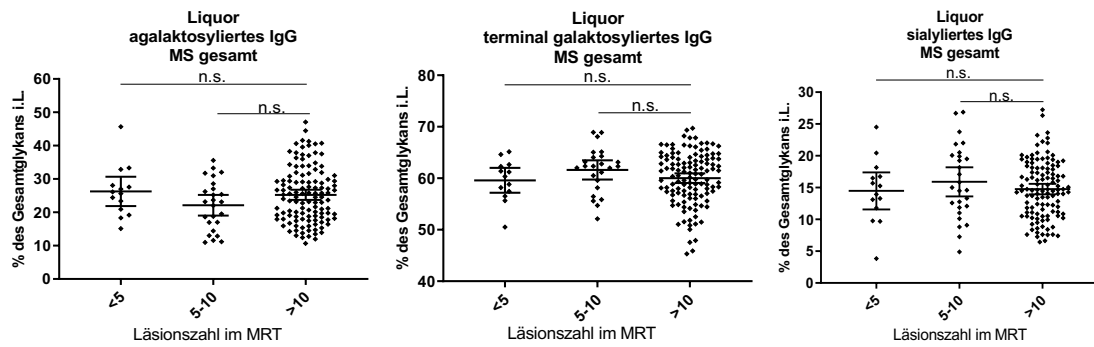
Anhang 7:

Kieler Kohorte: Zusammenhang der IgG-Fc-Glykosylierung im Liquor (i.L.) mit MRT-Befunden, n = Anzahl, MS = Multiple Sklerose, LPZP = Zeitpunkt der Liquorpunktion, n.s.=nicht signifikant

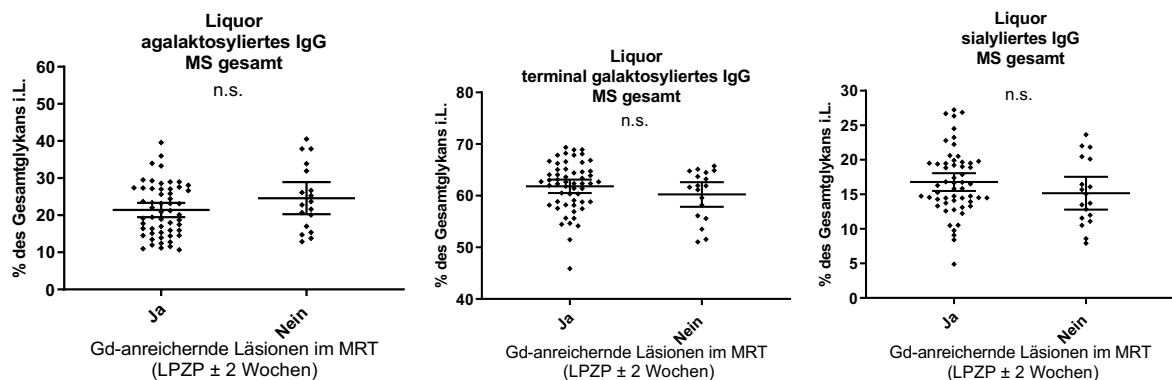
- a) Zusammenhang der IgG-Fc-Glykosylierung i.L. mit der T2-Läsionslast im MRT zum LPZP (LPZP±2 Wochen). Läsionszahl <5 n=8, 5-10 n=14, >10 n=51 Darstellung mit Mittelwert + 95%-Konfidenzintervall. Statistik: Vergleich der IgG-Fc-Glykosylierungswerte von Patienten mit <5, 5-10 und >10 T2-Läsionen im MRT zum LPZP mittels One-way-ANOVA-Test mit post-hoc-Analyse.



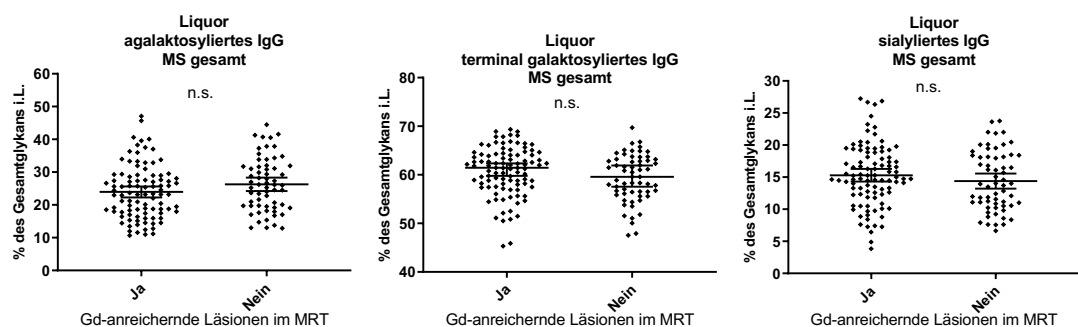
- b) Zusammenhang der IgG-Fc-Glykosylierung i.L. mit der T2-Läsionslast im MRT (Zeitraum LPZP ± 2 Wochen und außerhalb dieses Zeitraums) i.L. Läsionszahl <5 n=13, 5-10 n=24, >10 n=121. Darstellung: MW+95%-KI. Statistik: Vergleich der Glykosylierungswerte von Patienten mit <5, 5-10 und >10 T2-Läsionen im MRT zum LPZP mittels One-way-ANOVA-Test mit post-hoc-Analyse



- c) Zusammenhang der IgG-Fc-Glykosylierung i.L. mit dem Vorhandensein von Gadolinium-aufnehmenden T1-Läsionen zum LPZP (LPZP \pm 2 Wochen). i.L. Gadolinium-aufnehmende Läsionen vorhanden n=55, nicht vorhanden n=18. Darstellung mit Mittelwert+95%-Konfidenzintervall. Statistik: zweiseitiger t-Test.



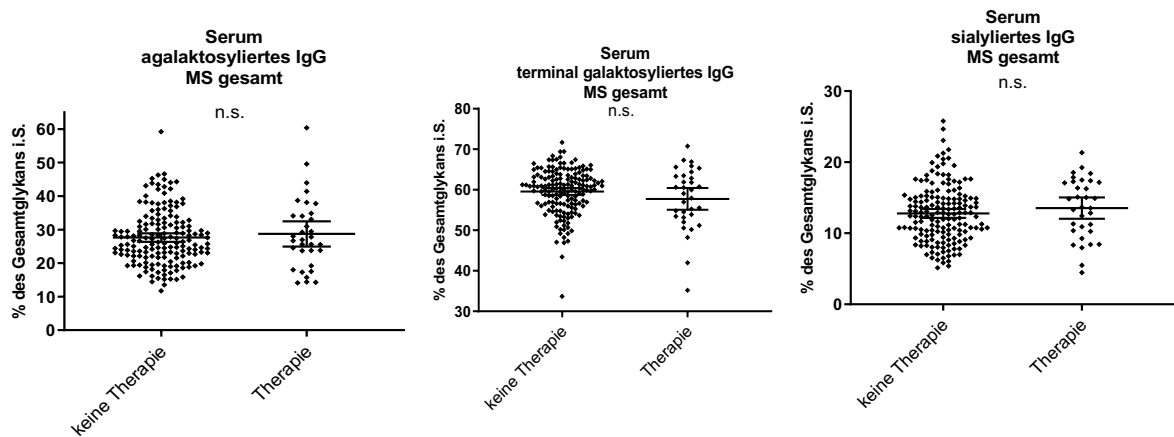
- d) Zusammenhang der IgG-Fc-Glykosylierung i.L. mit dem Vorhandensein von Gadolinium (Gd)-aufnehmenden T1-Läsionen zum LPZP (LPZP \pm 2 Wochen und außerhalb dieses Zeitraums). i.L. Gadolinium-aufnehmende Läsionen vorhanden n=95, nicht vorhanden n=62. Darstellung mit Mittelwert+95%-Konfidenzintervall. Statistik: zweiseitiger t-Test.



Anhang 8:

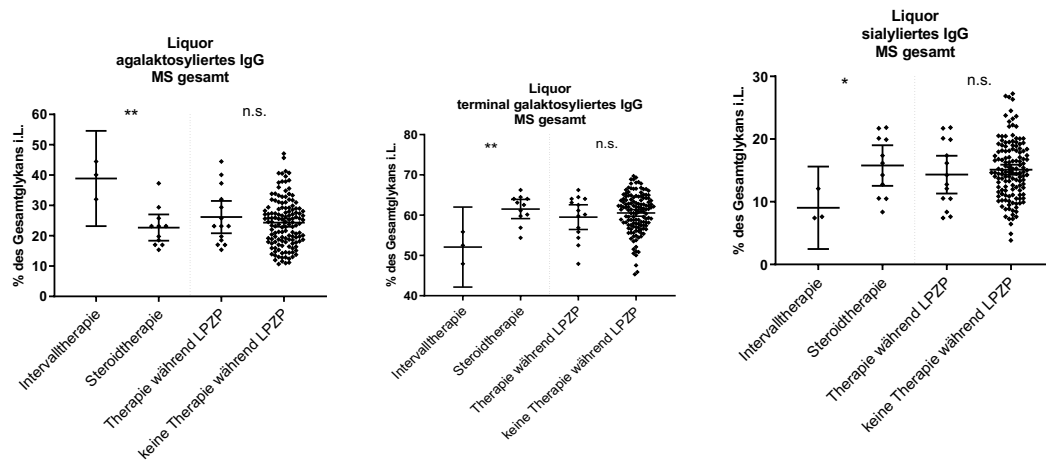
Kieler Kohorte: Unterschied der Glykananteile am Gesamt-IgG-Fc-N-Glykan im Serum (i.S.) von Patienten, die vor dem Zeitpunkt der Liquorpunktion (LPZP) keine Therapie (n=174) erhalten haben und Patienten, die bereits therapiert wurden (Cortisontherapie, Intervalltherapie) (n=33) (bezogen auf Zeit >6 Wochen vor LPZP),

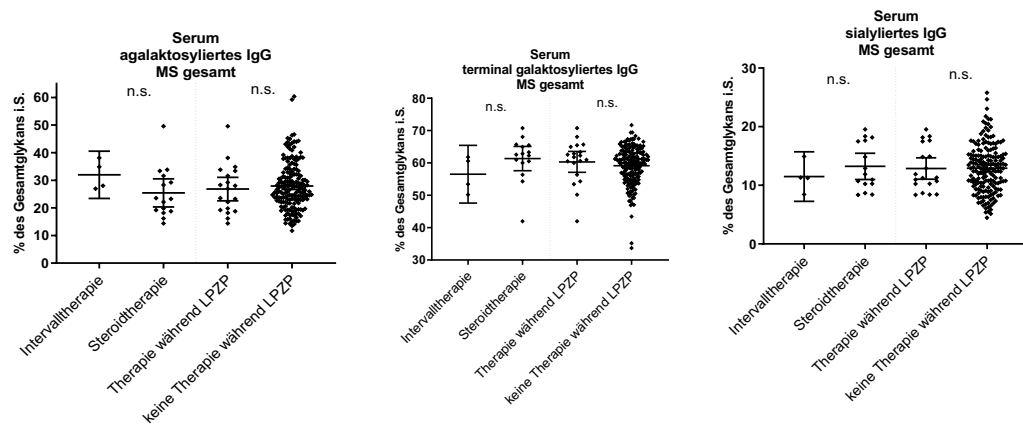
Darstellung mit Mittelwert + 95%-Konfidenzintervall, Statistik: zweiseitiger t-Test, MS = Multiple Sklerose
n.s.=nicht signifikant



Anhang 9:

Links: Vergleich der Glykananteile am Gesamt-IgG-Fc-N-Glykan im Liquor (i.L.) (oben) und im Serum (i.S.) (unten) von Patienten mit Intervalltherapie (n=4) und mit Steroidtherapie (n=15) innerhalb der letzten 6 Wochen vor dem Zeitpunkt der Liquorpunktion (LPZP). Rechts: Vergleich der Glykananteile i.L. und i.S. von Patienten mit (Cortisontherapie und Intervalltherapie) (n=19) und Patienten ohne (n=188) Therapie zum LPZP. Darstellung mit Mittelwert+95%-Konfidenzintervall. Statistik: zweiseitiger t-Test, n.s.=nicht signifikant, *=p<0,01, **p<0,01, MS = Multiple Sklerose





Anhang 10:

Zusammenfassung der aktuellen Studienlage, Quellenangabe rechts: Systemische Autoimmunerkrankungen mit Assoziation zu einer veränderten IgG-Fc-Glykosylierung im Serum

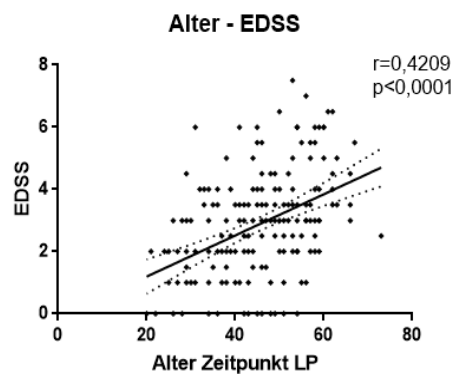
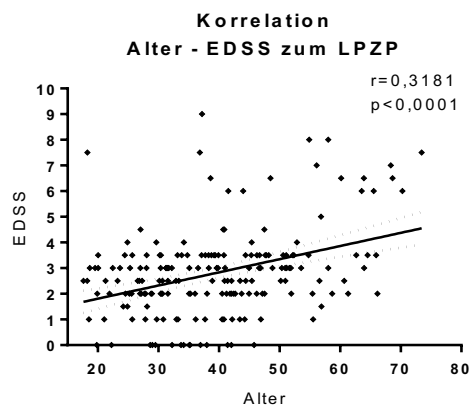
G0 = agalaktosyliertes IgG, term gal = terminal galaktosyliertes IgG, sial = sialyliertes IgG, Anti-CCP-Ak = Antikörper gegen das zyklische citrullinierte Peptid, MC = Morbus Crohn, CU = Colitis ulcerosa, IVIG = intravenöse Immunglobuline

<u>Systemische Autoimmunerkrankung</u>	<u>Veränderungen der IgG-Fc-Glykosylierung</u> <u>Assoziation der veränderten IgG-Fc-Glykosylierung mit Erkrankungsverlauf- und schwere</u>	<u>Literatur</u>
Rheumatoide Arthritis	<ul style="list-style-type: none"> - G0-IgG-Anteil am Gesamt-IgG ↑ - Rheumafaktoren haben stärkere Affinität zu G0-IgG - Anti-CCP-Ak sind vermindert galaktosyliert und sialyliert - Assoziation mit Erkrankungsverlauf: G0-IgG-Anteil fällt während Remission und während Remission im Rahmen einer Schwangerschaft - hoher Anteil an sial-IgG und term gal-IgG mit klinischer Verbesserung assoziiert - klinische Verbesserung unter Methotrexat-Therapie geht mit einer Erhöhung des term gal- und sial-IgG-Anteils einher 	Pasek et al. 2006 van de Geijn et al. 2009 Goulabchand et al. 2014
Systemischer Lupus erythematodes	<ul style="list-style-type: none"> - G0-IgG-Anteil am Gesamt-IgG ↑ - Sial- und term gal-IgG-Anteil am Gesamt-IgG ↓ - Assoziation mit Erkrankungsschwere: niedriger Anteil an sial- und term gal-IgG mit schwereren und komplizierteren Verläufen assoziiert 	Vučković et al. 2015
Lambert-Eaton-Syndrom Myaesthesia gravis	<ul style="list-style-type: none"> - Assoziiert mit vermindertem Anteil an term gal- und sial-IgG 	Selman et al. 2011
Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen:	<ul style="list-style-type: none"> - Assoziiert mit vermindertem Anteil an sial und term gal-IgG, bei MC niedriger als bei CU - Assoziiert mit erhöhtem Anteil an G0-IgG, MC zusätzlich assoziiert mit vermindertem Anteil an sial-IgG 	Šimurina et al. 2018

Morbus Crohn, Colitis ulcerosa	<ul style="list-style-type: none"> - Assoziation mit Erkrankungsverlauf: Steigender Anteil an G0-IgG bei MC und CU mit schweren Krankheitsverläufen assoziiert - Entsprechend dem unterschiedlichen Krankheitsverlauf steigt der G0-IgG-Anteil bei MC kontinuierlich an, bei CU teilweise konstant oder absinkend 	
Guillain-Barré-Syndrom	<ul style="list-style-type: none"> - Assoziation mit der Erkrankungsschwere: bei hohem terminal- und sial-IgG-Anteil schnellere Erholung - Wenn Erhöhung des gal- und sial-IgG-Anteils durch IVIG-Therapie erfolgreich: besserer klinischer Verlauf ohne weitere Krankheitsprogression, Ateminsuffizienz oder langfristiger Behinderung 	Fokkink et al. 2014

Anhang 11:

Links: Kieler Kohorte, rechts: Hamburger Kohorte: Signifikante Korrelation von Alter und expanded disability status scale (EDSS) zum Zeitpunkt der Liquorpunktion (LPZP) bei Patienten mit Multipler Sklerose, Anzahl Kieler Kohorte: n=205, Hamburger Kohorte: n=198. Darstellung mit linearer Regressionsgeraden + 95%-Konfidenzintervall. Statistik: Spearman-Rang-Korrelationskoeffizient (r), ****=p<0,0001



13 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. Frank Leypoldt und Herrn Prof. Dr. Klaus-Peter Wandler für die Überlassung des interessanten Themas und für die ausgezeichnete Betreuung und Unterstützung bei der Durchführung der gesamten Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Marc Ehlers und Herrn Yannic Bartsch möchte ich für die Durchführung der gesamten Glykoanalytik und die produktive Zusammenarbeit danken.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Manuel Friese und Anne Willing sowie den weiteren Mitarbeitern des INIMS Hamburg, die einen großen Beitrag zu dieser Studie geleistet haben, indem sie die Validationskohorte zusammengestellt, und Biomaterial und Daten zur Verfügung gestellt haben.

Auch danke ich den weiteren Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Neuroimmunologie des UKSH unter der Leitung von PD Dr. Frank Leypoldt, die dazu beigetragen haben, dass ich das Thema mit Freude bearbeiten konnte.

Herzlichen Dank an alle Patienten, die ihre Daten und ihr Biomaterial zur Verfügung gestellt, und diese Studie damit ermöglicht haben.

14 Veröffentlichungen

Abstract: 91. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Neurologie, 44. Jahrestagung der Gesellschaft für Neuropädiatrie, 63. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Neuropathologie und Neuroanatomie, Donnerstag, 01.11.2018, Postersitzung DGN – Multiple Sklerose I, P094

Patienten mit Multipler Sklerose zeigen ein distinktes, proinflammatorisches IgG-Glykosylierungsmuster im Serum und Liquor: eine retrospektive Kohortenanalyse

Julia Kreipe¹, Yannic Bartsch², Marc Ehlers², Klaus-Peter Wandinger^{1,3,*}, Frank Leyboldt^{1,4,*}

¹ Neuroimmunologie, Institut für Klinische Chemie, UKSH Schleswig-Holstein

² Immunologie und Glykoanalytik, Institut für Ernährungsmedizin, UKSH Schleswig-Holstein, Lübeck

³ Klinik für Neurologie, UKSH Schleswig-Holstein, Lübeck

⁴ Klinik für Neurologie, UKSH Schleswig-Holstein, Kiel

* Gleichermaßen beitragend

Hintergrund:

Bei systemischen Autoimmunsyndromen wie der rheumatoiden Arthritis und im Tiermodell korreliert die Glykosylierung konservierter Aminosäurereste am Fc-Terminus von IgG-Molekülen im Serum mit der Krankheitsaktivität. Dabei gelten IgG-Moleküle mit Galaktose oder Sialinsäure als protektiv, während gering glykosylierte Antikörpertypen (G0-IgG) mit proinflammatorischen Immunreaktionen in Verbindung gebracht werden. Bei der Multiplen Sklerose (MS) ist die Glykosylierung der IgG-Moleküle im Serum und Liquor kaum untersucht.

Ziele und Fragestellung:

Findet sich bei Patienten mit einer MS im Vergleich zu Kontrollpatienten eine differente IgG-Glykosylierung im Serum und/oder Liquor? Zeigt sich bei Patienten mit einer MS eine Korrelation zwischen Serum/Liquor-IgG-Fc-Glykosylierung und Krankheitsverlauf, Krankheitsaktivität oder Prognose?

Methoden:

Retrospektive, monozentrische Kohortenanalyse von Patienten mit MS (McDonald 2010, MAGNIMS 2016) und Kontrollen (nicht-inflammatorische neurologische Erkrankungen) mit mindestens einer

Liquor-/Serumprobe zwischen 2006 und 2016. Erfassung epidemiologischer, klinischer und laborchemischer sowie Verlaufsparemeter. Isolierung des Gesamt-IgG aus Liquor- und Serumproben mittels Affinitätschromatographie, Analyse der jeweiligen Zusammensetzung der Fc-Glykosylierung mittels High-density-Liquid-Chromatography.

Ergebnisse

Von den MS-Patienten (n=210, 70% weiblich, mittleres Alter 38,5 Jahre) hatten zum Zeitpunkt der Liquorpunktion 42% eine Erstmanifestation (n=89), 45% eine schubförmig-remittierende MS (RRMS) (n=95), 12% eine primär chronisch-progrediente MS (PPMS) (n=26). Eine Kohorte mit SPMS-Patienten war umfasste nur 12 Patienten und wurde nicht berücksichtigt. Die Kontrollkohorte umfasst 86 gesunde Personen (69% weiblich, mittleres Alter 36,2 Jahre). Insgesamt waren bei den Patienten (Kontrollen) Messungen von 153/200 (79/86) Liquor- und 200/210 (80/86) Serumproben möglich.

MS-Patienten hatten im Liquor ($p<0,05$) und im Serum ($p<0,0001$) einen signifikant höheren Anteil an proinflammatorischen G0-IgG als Kontrollen. Diese Unterschiede waren in der Gruppe der PPMS-Patienten am stärksten ausgeprägt (i.L. und i.S. $p=0,0001$). Alter (i.L.: $p<0,05$, i.S.: $p<0,05$), Erkrankungsdauer (i.L.: $p<0,05$, i.S.: $p=n.s.$) und Behinderungsgrad (gemessen anhand EDSS-Score) (i.L.: $p<0,001$, i.S.: $p<0,001$) waren mit einer Zunahme des Anteils an G0-IgG korreliert. Geschlechtsspezifische Unterschiede zeigten sich bei Patienten (i.L.: $p<0,0001$; i.S. $p<0,0001$) und Kontrollen (i.L. $p<0,01$; i.S. $p<0,05$): Männer hatten einen höheren Anteil an proinflammatorischem G0-IgG als Frauen. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen Patienten mit oder ohne Schub, Kortisontherapie zum Zeitpunkt der LP und keine Korrelation mit MRT-Parametern.

Schlussfolgerung

MS-Patienten (PPMS>RRMS>CIS) zeigen nicht nur im Liquor sondern auch im Serum ein proinflammatorisches IgG-Glykosylierungsmuster, das dem von Rheumapatienten ähnelt. Diese Auffälligkeiten nahmen mit der Dauer der Erkrankung zu. Unsere Ergebnisse sprechen für eine erkrankungsdauer-abhängige, persistierende Dysregulation der „Immunologischen Homöostase“ in Richtung proinflammatorisches Milieu nicht nur intrathekal sondern auch im systemischen Immunkompartiment bei Patienten mit MS. Überraschenderweise ist der ausgeprägteste Effekt bei Patienten mit einer PPMS nachweisbar. Diese Ergebnisse werden derzeit in einer unabhängigen Kohorte überprüft. Ob die pathologische IgG-Glykosylierung lediglich einen Biomarker einer anhaltenden Krankheitsaktivität bei Patienten mit MS darstellt oder auch kausal zur Krankheitsprogression beiträgt, muss in weiteren funktionellen Studien untersucht werden. Aufgrund der großen Überlappung zwischen MS-Patienten und Kontrollen ist das IgG-Glykosylierungsmuster gegenwärtig nicht als diagnostischer Test geeignet.