

Aus der Klinik und Poliklinik für Neurologie
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Assoziation von genetischen Varianten mit dem zerebralen Läsionsvolumen in der
Kernspintomographie bei Patient/innen mit Multipler Sklerose

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der Universitätsmedizin
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Vorgelegt von

Marie Leonore Hildesheim
aus Köln

Mainz, 2023

Wissenschaftlicher Vorstand: Univ.-Prof. Dr. Hansjörg Schild

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Felix Lüssi

Tag der Promotion: 08. Mai 2024

Ich widme diese Arbeit allen Patientinnen und Patienten mit Multipler Sklerose.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	III
Tabellen- und Abbildungsverzeichnis	VI
1 Einleitung / Ziel der Dissertation.....	1
1.1 Grundlagen der Multiplen Sklerose	2
1.1.1 Epidemiologie	2
1.1.2 Ätiologie	3
1.1.3 Pathogenese.....	4
1.1.4 Verlauf.....	5
1.1.5 Diagnostik und Verlaufsbeurteilung	6
1.1.6 Therapie und Prognose	7
1.2 Allgemeine Grundlagen der Genetik	9
1.2.1 Genomweite Assoziationsstudien	10
2 Literaturdiskussion	12
2.1 Einfluss von Genvarianten auf MS: Entstehung	12
2.2 Einfluss von Genvarianten auf MS: Endophänotypen	14
3 Material und Methoden	23
3.1 Material	23
3.1.1 Reagenzien.....	23
3.1.2 Laborgeräte und Zubehör	23
3.2 Methoden	24
3.2.1 Studiendesign	24
3.2.2 Bestimmung des TLVs mittels LST	25
3.2.3 Genotypisierung.....	28
3.2.4 Qualitätskontrolle	29
3.2.5 Statistische Auswertung.....	31
4 Ergebnisse.....	33
4.1 Beschreibung des Kollektivs	33

4.1.1	Demographische Daten	33
4.1.2	Klinische Daten	33
4.1.3	MRT-Auswertung	35
4.2	Einfluss demographischer und klinischer Parameter auf das TLV	36
4.3	Einfluss von Genvarianten auf das TLV	38
5	Diskussion	44
6	Zusammenfassung.....	53
7	Literatur.....	54
Lebenslauf Fehler! Textmarke nicht definiert.	

Abkürzungsverzeichnis

κ	Schwellenwert Kappa
β	Regressionskoeffizient
Abb.	Abbildung
AHI1	Abelson Helper Integration Site 1
CNTN4	Contactin 4
CREB	cAMP-response Element-binding Protein
CSF	Cerebrospinalflüssigkeit
CYBA	Cytochrome b-245 Alpha Chain
DICOM	Digital Imaging and Communications in Medicine
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDSS	Expanded Disability Status Scale
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FLAIR	Fluid attenuated inversion Recovery
FOV	Field of View
GM	Grey Matter (graue Substanz)
GRIN2A	Glutamat N-methyl D-Aspartat Rezeptor Subtyp 2A
GWAS	Genomweite Assoziationsstudie
HLA	Humanes Leukozytenantigen
HWE	Hardy-Weinberg Equilibrium
IMSGC	International Multiple Sclerosis Genetics Consortium
IQR	Interquartilsabstand
KIS	Klinisch isoliertes Syndrom
LGA	Lesion Growth Algorithmus
I-MSSS	Longitudinal erhobene Multiple Sclerosis Severity Scale
LRP2	LDL-Rezeptor-related Protein 2

LST	Lesion Segmentation Toolbox
MAF	Minor Allele Frequencies
MAP	Mitogen activated Protein
MHC	Major Histocompatibility Complex
MNI	Montreal Neurological Institute
MP-RAGE	Magnetization Prepared Rapid Gradient Echo
MRT	Magnetresonanztomographie
MS	Multiple Sklerose
MSSS	Multiple Sclerosis Severity Scale
MTSS1	Missing In Metastasis Protein
n	Anzahl
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NIFTI	Neuroimaging Informatics Technology Initiative
NLRP5	NLR Family Pyrin Domain containing 5
NOD	Nucleotide-binding Oligomerization Domain
NRCAM	Neuronales Zell-Adhäsionsmolekül
NTRK3	Neurotrophische Tyrosin Kinase, Rezeptor Typ 3
p	P-Signifikanzwert
PC	Principal Components
PPMS	Primär progrediente Multiple Sklerose
PSMG4	Proteasome Assembly Chaperone 4
PTPRD	Protein Tyrosin Phosphatase, Rezeptor Typ D
RIS	Radiologisch-isoliertes Syndrom
RNA	Ribonukleinsäure
RRMS	Relapsing Remitting Multiple Sclerosis (schubförmig-remittierend)

SEZ6L	Seizure Related 6 Homolog Like
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
SPM	Statistical Parametric Mapping Software
SPMS	Sekundär progrediente Multiple Sklerose
STAT3	Signal Transducer and Activator of Transcription 3
TLV	Totale Lesion Volume (gesamtes Läsionsvolumen)
TRIM2	tripartite Motif-containing 2
VBM	Voxel-based Morphometry
WM	White Matter (Weiße Substanz)
ZNS	Zentrales Nervensystem

Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 EDSS im Verlauf in Abhängigkeit von der initialen Läsionslast	9
Abb. 2 Kranielle MRT Aufnahmen eines Patienten	26
Abb. 3 Prozess der Segmentierung	27
Abb. 4 Ergebnis des Segmentierungsprozesses	28
Abb. 5 Schematische Darstellung des Arrays	29
Abb. 6 Verlaufsabhängige Erkrankungsdauer und -schwere	35
Abb. 7 Geschlechterabhängiges Läsionsvolumen	36
Abb. 8 Korrelation des Läsionsvolumen mit Krankheitsdauer und EDSS	37
Abb. 9 Verlaufsabhängiges Läsionsvolumen	38
Abb. 10 Manhattan Blot	39
Tabelle 1 Literaturübersicht: Entstehung	19
Tabelle 2 Literaturübersicht: Endophänotypen	21
Tabelle 3 Demographische Daten	33
Tabelle 4 Klinische Parameter	34
Tabelle 5 Zerebrale MRT-Befunde	36
Tabelle 6 Die 15 statistisch relevantesten SNPs	42

1 Einleitung / Ziel der Dissertation

Die Multiple Sklerose (MS) ist eine autoimmun vermittelte neurodegenerative Erkrankung des Zentralen Nervensystems (ZNS). Mit weltweit etwa 2,8 Millionen Betroffenen und zunehmender Prävalenz sowie einem durchschnittlichen Erstmanifestationsalter zwischen dem 20. und 40. Lebensjahr gehört die MS zu den häufigsten Ursachen neurologischer Defizite bei jungen Erwachsenen. (1, 2)

Durch Demyelinisierung und axonale Schäden entstehen im Rahmen der Erkrankung herdförmige Läsionen im Gehirn und im Rückenmark, welche lage- und größenabhängig zu vielfältigen neurologischen Symptomen führen können. Auch wenn die Erkrankung klinisch in mehrere Verlaufsformen unterteilt werden kann, gestaltet sich das Fortschreiten der MS individuell höchst unterschiedlich, sodass Aussagen über den Verlauf schwierig zu treffen sind und Behandelnde sich vor große therapeutische Herausforderungen gestellt sehen. (3)

Bildgebung mit Hilfe von Magnetresonanztomographie (MRT) gehört zu den sensitivsten Methoden, um die durch MS verursachten Läsionen darzustellen und andere Erkrankungen auszuschließen (1). Neben klinischen Kriterien stellt die MRT somit eines der wichtigsten Verfahren sowohl zur Diagnose, welche nach den sogenannten McDonald-Kriterien gestellt wird, als auch zur Verlaufsbeurteilung der MS dar (4). Aktuelle Studien legen nahe, dass hierbei insbesondere eine erhöhte Läsionslast sowie spezifische Läsionslokalisationen zum Zeitpunkt der Diagnosestellung prognostisch auf einen aggressiveren Krankheitsverlauf und dementsprechend frühere Behinderung hindeuten (5, 6).

Ein erhöhtes familiäres Risiko bei Individuen mit positiver Familienanamnese und eine auf 30% geschätzte Heritabilität weisen darauf hin, dass neben Umwelteinflüssen genetische Faktoren maßgeblich zur Pathophysiologie der MS beitragen (7). Nachdem erste genetische Studien bereits den Einfluss von Varianten im Humanen Leukozytenantigen (HLA)-Gencluster auf MS nachweisen konnten, wurden in den letzten Jahren durch genomweite Assoziationsstudien (GWAS) über 200 weitere genetische Risikovarianten außerhalb der HLA-Region bei MS-Patient/innen identifiziert (8).

Vor dem Hintergrund der zuvor beschriebenen epidemiologischen Daten und therapeutischen Herausforderungen bei individuellen Verläufen ist ein besseres

Verständnis der krankheitsbeeinflussenden Faktoren sowie eine frühe Einschätzung des Krankheitsverlaufes unabdingbar.

Das Ziel dieser Doktorarbeit ist die Untersuchung potenzieller Assoziationen zwischen Genvarianten und dem zerebralen Läsionsvolumen (Total Lesion Volume, TLV) bei Patient/innen mit verschiedenen Formen einer MS unter Berücksichtigung von etablierten klinischen und bildgebenden Parametern der Krankheitsschwere.

Hierdurch soll ein Beitrag zu einem besseren Verständnis der heterogenen Phänotypen, Verläufe und Schweregrade der MS und der Rolle, die hierbei genetischen Einflüssen zukommt, geleistet werden. Ein erweitertes Wissen um krankheitsmodifizierende Genmutationen und deren möglicher Einsatz als prognostische Faktoren könnte sowohl zu einer frühzeitigen Einordnung individueller Krankheitsprognosen - und somit einer frühzeitigeren therapeutischen Konsequenz - als auch zur Entwicklung präventiver Verhaltensstrategien und neuer adaptierter Therapieansätze beitragen.

1.1 Grundlagen der Multiplen Sklerose

1.1.1 Epidemiologie

Die Prävalenz der MS wird mit 35,9/100.000 Einwohnern angegeben, was weltweit circa 2,8 Millionen Erkrankten entspricht (2). Die beobachtete Zunahme der Erkrankungsfälle über die letzten Jahre kann zu Teilen, jedoch nicht gänzlich, durch eine verbesserte Lebenserwartung der Betroffenen dank verbesserter Therapieoptionen, sensitivere Methoden der Diagnostik und den Ausbau von Datenerfassungssystemen erklärt werden (9). Auffällig sind hierbei eine hohe geographische Varianz sowie geschlechterspezifische Unterschiede. Prävalenzen variieren von 2,2 (Asien und Subsahara) bis 300 von 100.000 (Nordeuropa und Nordamerika) (10). Ein genereller Trend einer ansteigenden Prävalenz mit zunehmender Entfernung vom Äquator konnte festgestellt werden, es kommen jedoch ebenfalls starke Unterschiede innerhalb ähnlicher Breitengrade vor (0,77/100.000 Hongkong; 85,8/100.000 Iran) (11). Migrationsstudien legen nahe, dass die Herkunft und die dort herrschenden Prävalenzen auch nach der Migration nachhaltigen Einfluss auf das Erkrankungsrisiko haben, dieses jedoch ebenfalls durch eine zunehmende Verweildauer im Zielland modifiziert werden kann (12, 13).

Frauen erkranken bis zu 2,5-mal häufiger an der remittierend-schubförmigen MS (RRMS) als Männer, wohingegen bei der primär-progredienten Verlaufsform (PPMS) ein ausgeglichenes Geschlechterverhältnis vorliegt. (s. [1.1.4 Verlauf](#)) Verlaufsabhängig unterscheidet sich ebenfalls das Erstmanifestationsalter, welches mit einem Gipfel um das 30. Lebensjahr bei der RRMS zehn Jahre früher eintritt als bei der primär-progredienten Verlaufsform (Manifestationsgipfel um das 40. Lebensjahr). (10, 14)

1.1.2 Ätiologie

Auch wenn die genaue Ursache und der Entstehungsmechanismus der MS noch nicht gänzlich erklärt werden können, ist in Anbetracht regionaler und geschlechterabhängiger Unterschiede von einem komplexen Zusammenspiel umweltbedingter, genetischer und epigenetischer Faktoren auszugehen. (15)

Ein erhöhtes familiäres Risiko bei Individuen mit positiver Familienanamnese weist darauf hin, dass genetische Faktoren bei der Entstehung der MS eine prominente Rolle spielen. So beträgt das Risiko an MS zu erkranken bei eineiigen Zwillingen 20-30% und bei zweieiigen Zwillingen 2-5% (16–18). Bei betroffenen Geschwisterkindern liegt ein 15fach erhöhtes Erkrankungsrisiko vor, welches mit einem entfernteren Verwandtschaftsgrad abnimmt, jedoch erhöht bleibt (18, 19). Es wird hierbei von einem komplexen, polygenetischen Vererbungsmodell ausgegangen, bei welchem eine Interaktion zahlreicher weitverbreiteter Risikoallele mit jeweils kleinen Effektstärken zur Entstehung der Erkrankung beiträgt (7). Erste genetische Studien konnten bereits in den 1970er Jahren eine Assoziation zwischen Genvarianten, welche innerhalb des Major Histocompatibility Komplex (MHC) Genclusters auf Chromosom 6p21 liegen, und einem erhöhten Risiko der MS-Entstehung nachweisen. Diese Genregion kodiert für die Humanen Leukozytenantigene, welche auf der Oberfläche der Leukozyten exprimiert werden und eine zentrale Rolle bei der Antigenpräsentation und -erkennung spielen und somit essenziell für eine effiziente Immunantwort sind. (20) Insgesamt wird der Beitrag des HLA-Genlocus zur genetischen Prädisposition der Erkrankung auf 20-30% geschätzt (21), wobei insbesondere Träger des Allels HLA DRB1*15:01 ein dreifach erhöhtes Risiko an MS zu erkranken aufweisen (22). Durch die Einführung genomweiter Assoziationsstudien (GWAS, s. [1.2.1 Genomweite Assoziationsstudien](#))

konnten in den letzten Jahren über 200 weitere genetische Risikovarianten außerhalb der HLA-Region bei MS-Patient/innen identifiziert werden (8).

Neben der genetischen Prädisposition tragen ebenfalls nicht-genetische Faktoren maßgeblich zu der Entstehung der MS bei, welche teilweise auf pathogenetischer Ebene mit Risikoallelen interagieren und die erworbene und angeborene Immunantwort beeinflussen. Zu den lebensstil- und umweltbedingten Risikofaktoren zählen neben den bereits genannten geographischen Faktoren und dem weiblichen Geschlecht Rauchen, durch mangelnde Sonnenexposition und Ernährung verursachte niedrige Vitamin D Level und Übergewicht in der frühen Kindheit (23). Darüber hinaus wird von einem Zusammenhang zwischen einer Infektion mit dem Epstein-Barr-Virus und einem 32fach erhöhten Erkrankungsrisiko ausgegangen (24, 25), wohingegen stattgehabte Cytomegalievirus-Infektionen einen schwachen protektiven Einfluss aufzuweisen scheinen (26).

1.1.3 Pathogenese

Trotz intensivierter Forschung und zunehmendem Verständnis bleiben zu der Pathogenese der MS noch viele Fragen offen. Sie wird als autoimmun vermittelter Prozess angesehen, infolgedessen es zu Inflammation, Demyelinisierung, Neurodegeneration und Narbenbildung im ZNS kommt. Autoreaktiven T- und B-Zellen wird hierbei eine Schlüsselrolle zugeschrieben, wobei zur Entstehung der Autoreaktivität zwei Hypothesen diskutiert werden: Einer peripheren Aktivierung durch unbekannte Antigene (beispielsweise im Rahmen einer systemischen Infektion) und anschließender Invasion des ZNS wird die Möglichkeit einer zentralen Aktivierung der T-Lymphozyten durch ein unbekanntes Antigen und sekundärer Einwanderung von T-Lymphozyten gegenübergestellt. (27) Die ausgelöste Inflammation führt durch Ausschüttung von Entzündungsmediatoren, Rekrutierung weiterer T-Zellen und dauerhafte Aktivierung von Mikroglia und Makrophagen zum herdförmigen Verlust der neuronalen Myelinscheiden (Demyelinisierung) (28). Zusätzlich begünstigt eine erhöhte Expression endothelialer Adhäsionsmoleküle innerhalb der entstehenden Läsionen die Einwanderung weiterer Immunzellen über die Blut-Hirn-Schranke, wodurch inflammatorisch-demyelinisierende Prozesse aufrechterhalten und verstärkt werden (29). Mit der Demyelinisierung einhergehend kommt es zur Minderversorgung der Neurone und anschließend zu axonaler und neuronaler Schädigung (Neurodegeneration), von welcher sowohl die weiße als auch graue Substanz

betroffen sein kann. Die Neurodegeneration wird zusätzlich unabhängig von Demyelinisierung durch oxidativen Stress, mitochondriale Schädigung und eine adaptive Umverteilung von Ionen-Kanälen begünstigt, welche durch diffuse Inflammation entstehen. (30) Entgegen früherer Annahmen laufen akute Entzündung und chronische Neurodegeneration gleichzeitig ab und axonale Schädigung und Verluste können bereits in frühen Stadien beobachtet werden (30, 31).

In den entstandenen Läsionsherden begünstigen reaktive Prozesse wie eine begrenzte Re-Myelinisierung sowie eine reaktive Proliferation von Astrozyten das Entstehen der namensgebenden gliösen Vernarbung (Sklerose). Neben der Re-Myelinisierung kommt es in der Nähe der Entzündungsherde zu weiteren adaptiven Mechanismen in Form von axonaler Regeneration und dendritischer Aussprossung sowie synaptischer Plastizität, um die Schädigung zu begrenzen und einen irreversiblen Substanzverlust zu kompensieren. Hierbei nehmen Makrophagen bei der Schaffung eines optimalen Milieus für Neurogenese durch Elimination wachstumshemmender Faktoren und Ausschüttung lokaler neurotropher Faktoren eine wichtige Rolle ein. (32)

Bedingt durch die Variabilität der Lage und des Ausmaßes der Läsionen können sich diese sowohl klinisch stumm als auch in Form manifester neurologischer Ausfälle im Rahmen eines Schubereignisses äußern. (33) Können neuroprotektive Kompensationsmechanismen die schädigenden Prozesse nicht mehr aufwiegen, kommt es klinisch zu einem Übergang in eine progrediente Verlaufsform der Erkrankung. Funktionelle Einschränkungen wie neurokognitive Defizite und Fatigue sind hierbei Folge sowohl läsionsbedingter Schädigung als auch schubunabhängiger neurodegenerativer Prozesse. (34)

1.1.4 Verlauf

Die Multiple Sklerose kann klinisch in mehrere Verlaufsformen unterteilt werden. Hierbei unterscheidet man zwischen einem remittierend-schubförmigen Verlauf (RRMS), welcher in eine sekundär progrediente Form (SPMS) übergehen kann, sowie einem primär-progredienten Verlauf (PPMS). In Folge der RRMS kommt es im Rahmen klar abgrenzbarer Schübe zum Auftreten neurologischer Defizite, welche sich zwischen den Schüben vollständig oder teilweise zurückbilden. Der Übergang zur

SPMS ist meist nur retrospektiv festzulegen und zeichnet sich durch eine progrediente Behinderungszunahme mit oder ohne aufgesetzte Schübe aus. In selteneren Fällen (15%) liegt bereits bei Erstdiagnose eine progrediente Verschlechterung und somit eine PPMS vor. (35)

Als erste klinische Manifestation einer möglichen MS wird das klinisch isolierte Syndrom (KIS) diskutiert, welches sich in Form eines Schubereignisses mit neurologischen Defiziten, welches mit einer MS zu vereinbaren ist, ohne Erfüllung des Kriteriums der zeitlichen Dissemination (s. [1.1.5 Diagnostik und Verlaufsbeurteilung](#)) präsentiert. Im Falle einer inzidentellen Entdeckung MS-typischer Läsionsherde in der MRT ohne klinische Symptome spricht man von einem radiologisch-isolierten Syndrom (RIS), ohne dass die Diagnose einer MS gestellt werden kann. (36)

In Anbetracht starker Heterogenität auch innerhalb einer Verlaufsform bezüglich klinischer Manifestation und Geschwindigkeit des Behinderungsprogresses kann traditionell zwischen einer benignen und malignen Form unterschieden werden. Letztere führt hierbei innerhalb kürzerer Zeit zu signifikanten neurologischen Ausfällen oder dem Tod (35). Angesichts einer unscharfen Definition dieser rein deskriptiven Unterteilung legt eine Überarbeitung der Einteilung der Verlaufsformen von 2013 nahe, zukünftig innerhalb jeder Verlaufsform mithilfe der MRT und klinischer Abschätzung zwischen aktiv und inaktiv sowie progredient und nicht-progredient zu differenzieren und den individuellen Verlauf somit näher zu charakterisieren (36).

1.1.5 Diagnostik und Verlaufsbeurteilung

Die Diagnose der Multiplen Sklerose ist eine auf der Beurteilung des klinischen Bildes und auf Bildgebung mittels MRT basierende Ausschlussdiagnose. Zusätzlich können Liquorpunktionen, Blut- und Urindiagnostik weitere Anhaltspunkte liefern. (1)

Durch verbesserte technische Möglichkeiten hat die Bildgebung mittels MRT zunehmend sowohl für die Diagnostik als auch die anschließende Verlaufsbeurteilung und die Evaluation des Therapieansprechens an Wichtigkeit gewonnen, da es sich bei dieser um die sensitivste Methode zu Detektion MS-typischer Läsionen handelt (1). Diese präsentieren sich bei nahezu allen Patient/innen mit MS und 80% der Patient/innen mit KIS als scharf abgrenzbare ovale Herde (37, 38) im Gehirn und treten dort charakteristischerweise periventrikulär, juxtacortikal und infratentoriell auf. 80%

aller MS-Patient/innen weisen darüber hinaus Läsionen im Rückenmark auf (1, 39). Während die Läsionen sich in den T2-Sequenzen hyperintens darstellen, wobei die FLAIR-Einstellung bei der Identifikation kortikaler Läsionen anderen Wichtungen überlegen ist, erscheinen sie in der T1-Einstellung hypointens. Die Aufnahme von Kontrastmittel wird als Zeichen einer Störung der Blut-Hirn-Schranke gewertet und zeigt somit die Aktivität von Läsionen an. Bei fortgeschrittener oder aggressiv verlaufender Erkrankung lassen sich neurodegenerative Prozesse in Form hypointenser Herde („Black Holes“) sowie Atrophie des Hirngewebes und des Rückenmarkes beobachten. (40, 41)

Die Beurteilung und letztendliche Diagnosestellung mittels MRT erfolgt anhand der zuletzt 2017 revidierten McDonald-Kriterien. Diese geben die Notwendigkeit des Vorliegens einer räumlichen Dissemination, das heißt dem Auftreten von Läsionen in mindestens zwei von vier MS-typischen Regionen und zudem einer zeitlichen Dissemination vor. Letztere kann sowohl durch das Nebeneinander aktiver und inaktiver Läsionen als auch durch den Nachweis neu aufgetretener Läsionen in der Verlaufs bildgebung belegt werden. (42) Für die Vergleichbarkeit der Bildgebung sind dabei standardisierte MRT-Protokolle notwendig (43). Zusätzlich wird der Schweregrad der durch MS verursachten körperlichen Behinderung regelmäßig klinisch mittels der EDSS (Expanded Disability Status Scale) evaluiert. Diese beurteilt mittels einer Skala von 1.0 bis 10.0 sieben unterschiedliche Funktionssysteme sowie die Gehfähigkeit und dient der Abschätzung der Behinderungsprogression. (44) Besonders in der frühen Krankheitsphase scheinen EDSS und die mittels MRT dargestellte Läsionslast miteinander zu korrelieren. (5, 6, 44)

Das zunehmende Wissen über genetische Korrelate verschiedener Erkrankungen trägt bereits partiell zum Prozess der Differenzialdiagnostik bei, genetische Tests können jedoch noch nicht für eine differenziertere Charakterisierung eines individuellen MS-Verlaufes eingesetzt werden. (1)

1.1.6 Therapie und Prognose

Durch das verbesserte Verständnis der Erkrankung und den Einsatz zielgerichteter krankheitsmodifizierender Medikamente konnte in den letzten Jahren die Prognose deutlich verbessert werden. Neben symptomatisch ausgerichteten Therapieansätzen

und einer Glucocorticoid-basierten Schubtherapie kommen zunehmend immunmodulatorische und immunsuppressive Wirkstoffe zum Einsatz. (45) Diese werden individuell ausgewählt, da das Ansprechen sowie der Ausprägungsgrad der Nebenwirkungen stark in Abhängigkeit von der Verlaufsform, dem Schweregrad und patientenbezogenen Faktoren variieren. (46) Da die Therapie mit Immunmodulatoren anhand eines Stufenschemas mit Wirkstoffen unterschiedlicher Aggressivität erfolgt nimmt die Abschätzung der Krankheitsaktivität und der individuellen Prognose eine wichtige Schlüsselrolle im klinischen Alltag bei der Auswahl eines Medikamentes ein. Hierfür werden neben klinischen Aspekten die Läsionslast und Dynamik dieser mittels Bildgebung zu Rate gezogen. (47) Als entscheidend für ein günstiges Outcome hat sich neben der Wahl eines passenden Medikamentes die möglichst frühe Intervention erwiesen, um einem Krankheitsprogress und der Entstehung von Behinderung in einer frühen und entscheidenden Phase effizient entgegen wirken zu können (48).

Zu den prognostisch ungünstigen Faktoren werden ein männliches Geschlecht, ein später, polysymptomatischer Krankheitsbeginn mit inkompletter Remission oder progredientem Verlauf, sowie das frühe Erreichen eines EDSS von 4 gezählt (49). Zusätzlich können zur Abschätzung des Verlaufes die Liquordiagnostik, sowie die Bildgebung mittels MRT hinzugezogen werden: Der Nachweis oligoklonaler Banden im Liquor als Ausdruck von Entzündungsprozessen des ZNS sowie mehr als zehn Läsionen in der MRT bei Patient/innen mit KIS sind mit einer erhöhten Manifestationen einer RRMS assoziiert. Hierbei spielt neben der Läsionsgröße auch die Lage dieser eine Rolle, da insbesondere infratentorielle und spinale Läsionen mit einem schlechteren Langzeitergebnis einhergehen. Bei Patient/innen mit bereits manifestierter RRMS geht darüber hinaus eine erhöhte initiale Läsionslast und deren rasche Zunahme mit einem höheren Behinderungsgrad nach 20 Jahren einher (**s. Abb. 1**). (37, 47, 50) Als Korrelat bereits früh einsetzender Neurodegeneration kann die mittels MRT ermittelte Atrophie der grauen Substanz Hinweise auf einen frühen Krankheitsprogress und eine vorzeitige Konversion in eine sekundär progrediente Erkrankungsform geben (51).

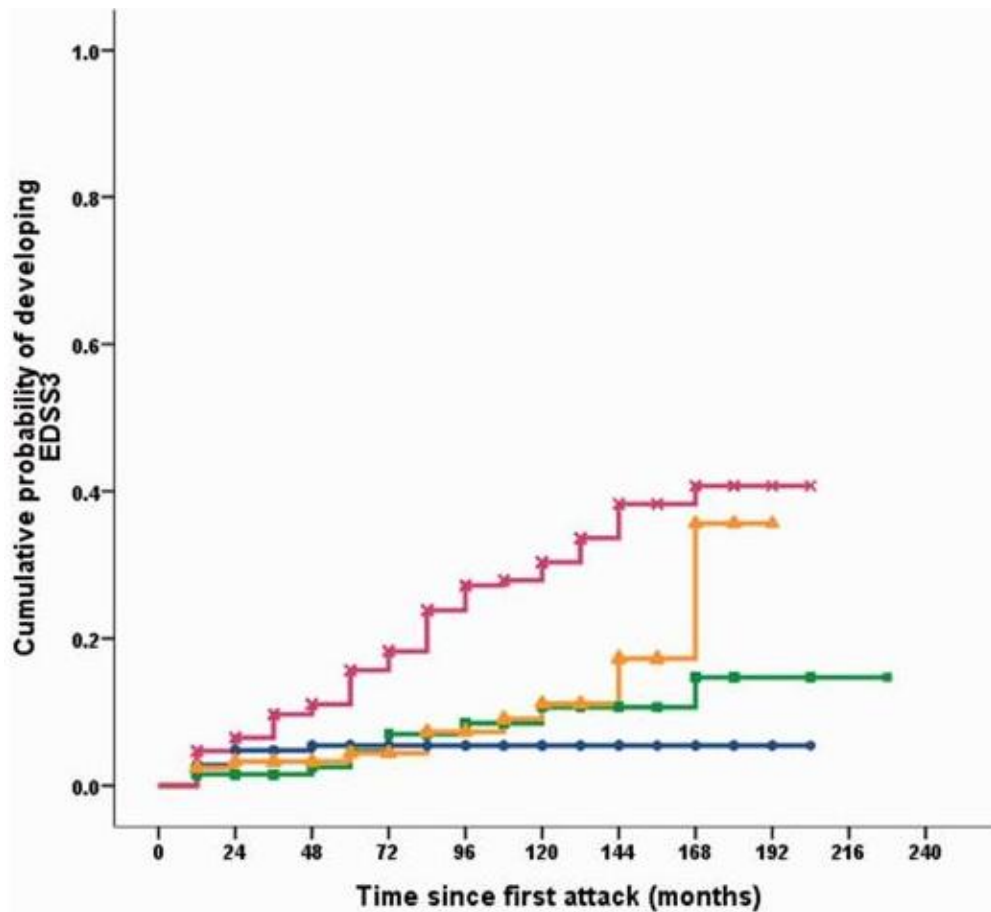


Abb. 1 EDSS im Krankheitsverlauf in Abhängigkeit von der initialen Läsionslast Kreuze: >10 Läsionen; Dreiecke: 4-9 Läsionen; Vierecke: 1-3 Läsionen; Kreise: 0 Läsionen. Abbildung aus Tintore et al. Defining high, medium and low impact prognostic factors for developing multiple sclerosis 2015 (50)

Genetische Tests bilden zurzeit keine Grundlagen zur Verlaufsbeurteilung oder Auswahl der Medikamente. Zahlreiche Studien legen jedoch nahe, dass bestimmte Risikomutationen genutzt werden könnten, um die Schwere eines Krankheitsverlaufes oder das Ansprechen auf bestimmte Medikamente abzuschätzen (52).

1.2 Allgemeine Grundlagen der Genetik

Die genetische Information eines Individuums wird in Form von DNA (Desoxyribonukleinsäure) und RNA (Ribonukleinsäure) gespeichert und vererbt, wobei Gene, proteinkodierende Abschnitte der DNA, die Grundeinheit der Erbinformation bilden. Hierbei ist die Reihenfolge der Basenbausteine der DNA entscheidend, welche durch Transkription und Translation in eine Aminosäuresequenz und dementsprechend in ein funktionelles Protein übersetzt wird. An einem Genlocus

kann die DNA-Sequenz in Form unterschiedlicher Ausprägungen (Allele) vorliegen, welche in häufigere und seltenere Allele unterschieden werden. Kommt eine bestimmte Sequenz mit einer erhöhten Häufigkeit vor ($>1\%$) liegt in Abgrenzung zu einer Mutation ($<1\%$) ein Polymorphismus vor. Unterscheidet sich die Variante dabei in nur einem Basenpaar, spricht man von einem Single Nucleotid Polymorphismus (SNP). (53) Da nicht alle Abschnitte der DNA abgelesen werden und als Exons den Zellkern verlassen, ist die Lage eines Polymorphismus mitentscheidend für seine Auswirkung. SNPs können in kodierenden Regionen zu einem Aminosäureaustausch (25% nicht-synonym) und zu einer funktionellen Einschränkung eines Proteins führen oder stumm auftreten (25% synonym). 50% der Polymorphismen liegen in nicht-kodierenden Abschnitten zwischen Genen oder auf Introns, welche im Zellkern verbleiben. Ein Einfluss dieser SNPs auf die Genexpression und Translationseffizienz und somit auf die Diversität unterschiedlicher Individuen wird jedoch diskutiert (54).

1.2.1 Genomweite Assoziationsstudien

Bei der Erforschung verschiedenster Erkrankungen nimmt die Suche nach der Beziehung zwischen Genotyp und Phänotyp eine zentrale Rolle ein. Seit 2007 kommen zunehmend genomweite Assoziationsstudien zum Einsatz, um weit verbreitete genetische Varianten im gesamten Genom zahlreicher Individuen zu erfassen und solche zu identifizieren, welche mit einer Erkrankung assoziiert sind. Die genomweite Analyse bietet den Vorteil, dass nicht im Vorfeld mögliche Gene von Interesse ausgewählt werden müssen, sondern ohne vorgeschaltete Hypothesenbildung nach neuen Risikoallelen geforscht werden kann. (53, 55)

GWAS können im Design einer Fall-Kontroll-Studie basierend auf Unterschieden in Allelfrequenzen durchgeführt werden und bieten so Rückschlüsse auf Risikoallele, welche mit dem generellen Entstehen einer Erkrankung im Zusammenhang stehen (Suszeptibilitätsgene). Sie können jedoch auch auf die Assoziation von SNPs mit ausgewählten quantitativen Erkrankungsmerkmalen (Endophänotypen) prüfen und somit zum Verständnis variabler Krankheitsverläufe beitragen. (56)

Zu beachten ist hierbei, dass eine beobachtete Assoziation keine Rückschlüsse auf Kausalitäten zulässt. In Anbetracht zahlreicher möglicher Konfounder, wie unterschiedlichen Ethnizitäten, Umweltfaktoren und DNA-Qualität, ist eine genaue

Charakterisierung des Patientenkollektivs und Qualitätskontrolle des Datensatzes unerlässlich. Da den untersuchten Erkrankungen häufig polygenetische Strukturen zugrunde liegen und die einzelnen detektierten Allelvarianten kleine Effektstärken aufweisen sind große Kohorten und eine anschließende Replikation in einer unabhängigen Population notwendig, um Assoziationen sensitiv zu identifizieren und zu validieren. (53)

2 Literaturdiskussion

Zu der Fragestellung welche genetischen Faktoren maßgeblich an der MS beteiligt sind, wurde in den letzten Jahrzehnten intensiv geforscht. Im Folgenden wird eine Übersicht zu im Rahmen von Genomanalysen identifizierten Risikovarianten gegeben. Hierbei wird zwischen solchen genetischen Polymorphismen unterschieden, welche mit der Entstehung von MS assoziiert sind (s. [2.1 Einfluss von Genvarianten auf MS: Entstehung](#)) und solchen, welche im Zusammenhang mit verlaufsbeurteilenden Parametern stehen und somit Auswirkungen auf die Schwere des Krankheitsverlaufes haben und zur Heterogenität des Krankheitsbildes beitragen (s. [2.2 Einfluss von Genvarianten auf MS: Endophänotypen](#)). Angesichts der Fragestellung der Dissertation werden im Folgenden die Studien zu verlaufsassozierten genetischen Varianten ausführlicher wiedergegeben werden, obwohl die Studienlage zu genetischen Einflüssen auf die Entstehung der MS insgesamt umfangreicher ist.

2.1 Einfluss von Genvarianten auf MS: Entstehung

Da in Anbetracht eines erhöhten Auftretens von MS bei familiärer Vorbelastung und großer regionaler Unterschiede früh von einem genetischen Beitrag zur MS ausgegangen werden konnte, bestand bereits in den 1970er Jahren der Wunsch, Risikomutationen, welche zur Entstehung der MS beitragen, zu identifizieren. Seitdem wurden in der MSGene Datenbank (msgene.org, (57)) bis 2012 über 700 Studien zu über 800 Genen registriert, wobei in einer ersten Phase der Studien, welche überwiegend auf kleinen Kohorten kaukasischer Abstammung basierten, wenige Ergebnisse repliziert werden konnten. Als robust erwies sich der durch Bertrams et al. (58) und Naito et al. (59) 1972 erstmals beschriebene Zusammenhang zwischen Genvarianten in dem auf dem kurzen Arm von Chromosom 6 liegenden HLA-Gencluster und MS, welcher durch mehrere Studien bestätigt werden konnte (7). Durch verbesserte technische Möglichkeiten konnte 2002 durch Barcellos et al. (60) innerhalb des HLA-Genclusters das maßgebliche Allel HLA-DRB1*15:01 genauer lokalisiert und identifiziert werden, welches innerhalb der Region die Einflussnahme dominiert und das Risiko an MS zu erkranken um das Dreifache erhöht. (8)

Durch den Einsatz von GWAS ab Mitte der 2000er Jahre konnten in einer zweiten Phase der Assoziationsstudien durch das hypothesenfreie Untersuchen des gesamten Genoms in großen Kohorten zahlreiche SNPs identifiziert werden. Einen Überblick

über die in den letzten Jahren durchgeführten GWAS gibt **Tabelle 1**. Die einzelnen Polymorphismen wiesen dabei in den Studien nur kleine Effektstärken auf und konnten zu einem verbesserten Verständnis des komplexen Vererbungsmusters der MS beitragen. Im Sinne der common disease - common variant-Hypothese, welche besagt, dass das genetische Risiko häufigerer Erkrankungen durch ein breites Spektrum häufiger Allelvarianten (>1% der Bevölkerung betreffend) bestimmt wird, kann auch im Falle der MS von einem Zusammenspiel verschiedener weit verbreiteter Risikovarianten, welche in einem akkumulierten Erkrankungsrisiko resultieren, ausgegangen werden. (8, 61)

Die erste groß angelegte GWAS wurde 2007 durch das International Multiple Sclerosis Genetics Consortium (IMSGC) durchgeführt und entdeckte Polymorphismen in den Genen ILR2A und ILR7A, welche für Interleukin-Rezeptoren kodieren, sowie zahlreiche Varianten innerhalb der MHC-Region (62). In den folgenden Jahren konnten mehrere Studien mittels GWAS weitere Genloci außerhalb des HLA-Genclusters identifizieren, welchen moderate Effektstärken nachgewiesen wurden (Odds Ratio<1.2) und welche somit nur jeweils einen kleinen Beitrag zur Entstehung der Erkrankung leisten (63).

Im Rahmen einer aktuelleren Assoziationsanalyse aus dem Jahre 2019 konnte das IMSGC (64) 233 SNPs innerhalb und außerhalb der MHC-Region identifizieren, darunter eine erste das X-Chromosom betreffende Genvariante. Die funktionelle Auswirkung dieser Polymorphismen, welche größtenteils in nicht kodierenden Regionen auf Introns oder intragenetisch liegen, ist überwiegend unbekannt, eine regulatorische Einflussnahme auf die Genexpression und Splicingprozesse kann jedoch angenommen werden. Die 200 autosomalen non-MHC Varianten wiesen erneut geringe Effektstärken auf, deren akkumulierte Auswirkung den genetischen Beitrag zur Krankheitsentstehung noch nicht gänzlich erklären kann.

Neben der Identifikation häufig auftretender Risikovarianten mittels GWAS wurden Exom- und Sequenzierungsstudien durchgeführt, um auch seltene Varianten mit Einfluss auf die Krankheitsentstehung zu erfassen. Das IMSGC konnte so weitere, in GWAS bisher noch nicht beschriebene Varianten mit geringer Prävalenz ermitteln, deren akkumulierter Einfluss auf das Auftreten der MS auf 5% geschätzt wird. (65)

Das Zusammenspiel der einzelnen Risikovarianten, welche in einem erhöhten Erkrankungsrisiko resultieren, wurde in den letzten Jahren durch Analysen der betroffenen Signalwege genauer erforscht. Hierbei fand sich in Überschneidung mit anderen Autoimmunerkrankungen eine überwiegende Beteiligung von Immunsystem-betreffenden Signalwegen wie der Lymphozytenproliferation, T-Zell-Differenzierung und -aktivierung. (66) Darüber hinaus scheinen Risikovarianten mit jeweils geringer Effektstärke, welche insbesondere in Netzwerke der Zell-Adhäsion involviert sind, überproportional an der Entstehung der Multiplen Sklerose beteiligt zu sein (67).

Auch wenn die epidemiologischen Daten nahelegen, dass das Risiko an MS zu erkranken, ethnizitätsabhängig variiert, ist zu den zugrundeliegenden Unterschieden der genetischen Mechanismen wenig bekannt, da der Großteil der Studien auf kaukasische Studienkohorten beschränkt ist (8).

2.2 Einfluss von Genvarianten auf MS: Endophänotypen

In Anbetracht des heterogenen Verlaufes des durch MS verursachten Behinderungsgrades und -progress besteht ein großes Interesse, neben krankheitsverursachenden Polymorphismen auch verlaufsmodifizierende genetische Varianten zu identifizieren und diese als prognostische Marker einsetzen zu können. Zu dieser Fragestellung durchgeführte Studien lieferten in den letzten Jahren nicht nur unterschiedliche Ergebnisse, sondern unterschieden sich auch in der Wahl des Schweregrad-charakterisierenden Markers (68). **Tabelle 2** bietet einen Überblick über bisherige genomweite Studien zur Assoziation von Genvarianten mit den unterschiedlichen Verlaufsparemtern. Lediglich zwei der in den GWAS analysierten SNPs erreichten hierbei das zuvor definierte genomweite Signifikanzniveau von $p < 1 \times 10^{-8}$ (p-Signifikanzwert), zahlreiche Polymorphismen können jedoch durch niedrige p-Werte als hinweisend gewertet werden.

2009 untersuchten Baranzini et al. (69) erstmalig in einer genomweiten Assoziationsstudie neben dem Einfluss von 551642 SNPs auf die generelle Krankheitsentstehung den zusätzlichen Einfluss dieser Polymorphismen auf den Krankheitsverlauf. Als verlaufsabbildende Parameter wurden hierfür das Alter bei Krankheitsbeginn, die Krankheitschwere, gemessen mittels Multiple Sclerosis Severity Scale (MSSS), sowie das durch MRT ermittelte Gehirnparenchym- und

Läsionsvolumen gewählt. Weiterführende Analysen der durch die Polymorphismen betroffenen Gene und ihrer Signalwege stellten funktionelle Unterschiede zwischen krankheitsauslösenden und verlaufsbeeinflussenden Genvarianten fest: Während im ersteren Fall überwiegend an Antigenprozessierung und -präsentation beteiligte Signalwege betroffen waren, wurden durch verlaufsbeeinflussende Polymorphismen betroffene Gene überwiegend in Geweben des ZNS exprimiert und spielten bei der Axonausrichtung und Signalübertragung eine zentrale Rolle. Gene, welche mit dem Läsionsvolumen assoziiert waren (Neurologin 1, Huntingtin interacting Protein 2, Cadherin 10), konnten regulatorischen Homöostase fördernden Zellprozessen zugeordnet werden.

Weitere ebenfalls mit dem MSSS assoziierte genetische Varianten konnten im Rahmen dreier sich anschließender Studien 2010, 2011 und 2015 identifiziert werden: Brynedal et al. (70) heben in ihrer Studie hierbei vor allem zwei SNPs hervor, welche auf dem MGAT-Gen lokalisiert sind. Dieses kodiert für ein Enzym, welches an der T-Zell-Aktivierung beteiligt ist. Mittels einer groß angelegten Studie mit 1470 Patient/innen und 2,5 Millionen SNPs konnte das IMSGC 29 weitere Polymorphismen identifizieren, welche unter anderem PTPRD (Protein Tyrosin Phosphatase, Rezeptor Typ D), TRIM2 (Tripartite motif-containing 2) und die LOC100289506/YWHAG Region betrafen. In Übereinstimmung mit Baranzini et al. fand sich eine Beteiligung des Genes GRIN2A (Glutamat N-methyl D-Aspartat Rezeptor Subtyp 2A) sowie in Signalweg-Analysen eine Überrepräsentation von an Calcium-abhängigen und neuronalen Prozessen beteiligten Genen (71). In einer kleineren italienischen Kohorte konnten Giacalone et al. 2015 (72) keinen der zuvor entdeckten Polymorphismen replizieren, fanden jedoch 26 neue mit MSSS assoziierte Polymorphismen, sowie 39 SNPs, welche mit dem Erkrankungsalter im Zusammenhang standen. Interessanterweise gab es bezüglich der assoziierten Genvarianten keine Übereinstimmung zwischen Patient/innen mit RRMS und PPMS. Die Analyse der durch die betroffenen Gene gebildeten Netzwerke ergab eine überdurchschnittliche Involvierung CREB (cAMP-response element-binding protein) - sowie p53-assoziiierter Signalwege.

Matsushita et al. (73) wählten im Rahmen einer weiteren Genomanalyse 2015 anstelle des MSSS mittels MRT erhobene Daten zur Kortexdicke. Diese wurde als Verlaufparameter für durch kortikale Läsionen und generalisierten Substanzverlust verursachte Schädigungen der grauen Substanz und damit einhergehender

Behinderungsakkumulation gewertet. Die betroffenen Gene, die in Übereinstimmung mit vorherigen Forschungsergebnissen Signalwegen zugeordnet wurden, welche die neuronale Entwicklung, die Regulation der intrazellulären Calciumkonzentration und das Glutamat-abhängige Transmittersystem betreffen, wiesen erneut keine Schnittmenge mit bekannten MS-verursachenden Genvarianten auf. Dem gegenüber stehen die Ergebnisse einer Studie von Pan et al. aus dem Jahre 2016, in welcher sieben Polymorphismen auf Genen identifiziert werden konnten, die sowohl mit der Krankheitsentstehung als auch der Behinderungszunahme gemessen anhand des EDSS assoziiert waren (74).

Sich anschließende Untersuchungen zu genetischen Varianten und mittels MRT charakterisierten Phänotypen konnten zusätzlich eine Assoziation von HLA-DRB1*15:01 mit einem erhöhten Läsionsvolumen der weißen Substanz darstellen, sowie weitere mit Läsionsverteilungen und Hirnstammvolumen assoziierte SNPs identifizieren (75–77). Einem anderen Polymorphismus des HLA-Genclusters konnte hingegen ein protektiver Charakter zugeordnet werden, da beispielsweise das HLA-A*02-Allel in einer Studie von Lysandropoulos et al. mit einem niedrigeren MSSS, EDSS und einer verringerten Läsionszahl assoziiert war (78).

Jokubaitis et al. kommen durch die Analyse der aufgeführten GWAS und einer Vielzahl weiterer kleinerer Studien zu dem Schluss, dass dem Verlauf der MS unterschiedliche Genarchitekturen zugrunde liegen: Während Verlaufsmarker, welche ein inflammatorisches Geschehen widerspiegeln, überwiegend mit bekannten krankheitsverursachenden Polymorphismen assoziiert sind, stehen Parameter der Neurodegeneration, wie beispielsweise die Gehirnatrophie, mit einer eigenen Gruppe an genetischen Varianten im Zusammenhang. Somit kann die geringe Schnittmenge zwischen krankheitsbeeinflussenden Genvarianten bei schubförmigen und progressiven Verläufen teils durch Unterschiede der zugrundeliegenden Pathomechanismen erklärt werden, welche bei den beiden Verlaufsformen bezüglich des Anteils an inflammatorischen und neurodegenerativen Prozessen divergieren. (68)

Die beiden verlaufsassozierten Polymorphismen, welche ein genomweites Signifikanzniveau erreichten, konnten Zhou et al. (79) in einer longitudinal angelegten Studie 2017 und Vandenberg et al 2021 (80) identifizieren. Der durch Zhou et al. beschriebene mit einem erhöhten Schubrisiko assoziierte Polymorphismus liegt auf

dem LRP2(LDL-Rezeptor-related Protein 2)-Gen, welches überwiegend in Neuronen und Oligodendrozyten exprimiert wird und als membranständiger Rezeptor eine zentrale Rolle bei dem Wachstum und der Ausrichtung von Axonen spielt. Auch Träger des in der zweiten Studie beschriebenen Risikoallels rs11871306 auf dem Gen WNTB9, welches ebenfalls an der Axonausrichtung und Bildung von Synapsen beteiligt ist, wiesen höherfrequenter Schubraten auf. Als zusätzlich mit dem Schubrisiko assoziierten Genlocus, ohne jedoch genomweite Signifikanz zu erreichen, identifizierten Graves et al. 2018 (81) AHI1, womit dieses bereits aus Fall-Kontroll-GWAS bekannte Gen eine der wenigen Schnittstellen zwischen krankheitsverursachenden und verlaufsmodifizierenden Genvarianten darstellt.

Keiner der zuvor beschriebenen Polymorphismen ließ sich in der derzeit aktuellsten Assoziationsstudie von Jokubaitis et al. (82) aus dem Jahr 2023 replizieren. Die Studie, welche auf den Daten einer gut phänotypisierten und großen Kohorte von Patient/innen mit einer schubförmigen MS basiert, nutzt unter anderem den Median longitudinal erhobener MSSS-Werte (l-MSSS) um den Schweregrad der Erkrankung umfassend zu charakterisieren. Keine der genetischen Varianten erreichte das genomweite Signifikanzniveau. Zahlreiche Polymorphismen wiesen jedoch niedrige p-Werte auf, darunter mehrere innerhalb der für SEZ6L (Seizure Related 6 Homolog Like) kodierenden Region, einem mit dendritischer Fortsatzbildung und Aussprossung assoziiertem Gen. Ebenso ließen sich genetische Varianten innerhalb des MTSS1 (Missing In Metastasis Protein)-Genes identifizieren, welche sich nach Stratifizierung nach Geschlecht für Patientinnen als signifikant erwiesen. Wie in vorausgegangenen GWAS ließ sich ein Großteil der Polymorphismen auf intergenetischen Arealen oder Introns lokalisieren und wies keinerlei Schnittmenge mit bekannten krankheitsverursachenden SNPs auf. In weiterer Übereinstimmung mit vorherigen funktionellen Netzwerk-Analysen zeigten sich die betroffenen, überwiegend im ZNS exprimierten Genen in Prozesse der synaptischen Plastizität und der mitochondrialen Funktion sowie in Kalzium-anhängige Signalwege involviert. In einem zweiten Schritt nutzten Jokubaitis et al. einen Algorithmus um unter Berücksichtigung 62000 ausgewählter Polymorphismen den Krankheitsverlauf der Patient/innen vorauszusagen. Dieser Ansatz zeigte sich prognostischen Herangehensweisen auf Basis klinischer Daten überlegen und konnte somit den möglichen klinischen Nutzen genetischer Analysen zur Abschätzung der Prognose und die damit einhergehende

Relevanz verlaufsmodifizierende Polymorphismen umfassend zu identifizieren hervorheben.

In den letzten Jahren hat die Sequenzierung des Exoms ebenfalls für das genauere Verständnis verlaufsmodifizierender Mechanismen an Wichtigkeit gewonnen. Im Rahmen einer Exom-Sequenzierung, welche den Einfluss genetischer Varianten auf den Krankheitsverlauf untersuchte, konnten Sadovnick et al. 2017 (83) PSMG4 (Proteasome Assembly Chaperone 4) und NLRP5 (NLR Family Pyrin Domain containing 5) als mit der Verlaufsschwere, Verlaufsform und Krankheitsbeginn assoziierte Genloci identifizieren. Studien aus dem Jahr 2022 mit gezielter Genotypisierung auf Basis vorheriger genomweiter Assoziationsstudien konnten weitere Assoziationen zwischen Polymorphismen und der Krankheitsschwere, gemessen am MSSS nachweisen: So gehen Polymorphismen im P2X7-Rezeptor-Gen, welches von Mikrogliazellen exprimiert wird und eine entzündungsfördernde Rolle durch Aktivierung von T-Zellen einnimmt, insbesondere in frühen Krankheitsphasen mit einem erhöhten MSSS einher (84). Ebenfalls die Expression in Mikrogliazellen betreffend scheint eine Veränderung des CYBA (Cytochrome b-245 Alpha Chain)-Gens über eine verminderte Produktion freier Sauerstoffradikale hingegen eine protektive und somit positive Auswirkung auf den Krankheitsverlauf auszuüben (85).

Einen zusätzlichen Zugang zum Verständnis des Zusammenhanges von Genetik und Krankheitsverlauf ermöglicht einer Reihe epigenetischer Studien der letzten Jahre. Diese untersuchen die Einflussnahme epigenetisch beeinflusster Genaktivität und -expression durch Methylierung und Histonmodifikation auf Myelinisierungsprozesse und neuro-axonale Vulnerabilität und die damit einhergehende Behinderungsprogression. Eine post mortem Studie von Kular et al. (86) konnte 2019 abweichende Methylierungsmuster in neuronalen Zellen von MS-Patient/innen nachweisen, welche, in Übereinstimmung mit Giacalone et al., in CREB-assoziierte Signalwege involviert sind und somit Einfluss auf die Ausrichtung von Axonen und synaptische Plastizität nehmen (72, 87).

Tabelle 1 Literaturübersicht: Entstehung der MS Überblick bisheriger Studien zur Assoziation von Genvarianten mit der Entstehung von MS, Tabelle übernommen und angepasst von Cotsapas et al. 2018 (63), in Klammern werden exemplarisch die durch die identifizierten SNPs betroffenen Gene angegeben

Referenz (Nr.)	Fälle/Kontrollen	Signifikanzniveau	Interne Replikationen	Signifikante Loci nach/vor Replikation
IMSGC, 2007 (62)	931/2 431	1×10^{-4}	1x	2/1 (IL2RA, IL7RA)
Comabella et al., 2008 (88)	242/242	0,01	2x	2/2 (HLA-DRB/DQA)
Baranzini et al., 2009 (69)	978/883	1×10^{-4}	Ausgewählte SNPs	1/5 (GPC5)
ANZgene, 2009 (89)	1 618/3 413	1×10^{-4}	1x	2/6
Jager et al., 2009 (90)	2 624/220	1×10^{-3}	1x	10/6 (TNFRSF1A, IRF8, CD6)
Jakkula et al., 2010 (91)	768/136	1×10^{-3}	2x	8/7 (STAT3)
Sanna et al., 2010 (92)	882/872	5×10^{-8}	1x	11/10 (CBLB)
Nischwitz et al., 2010 (93)	592/825	10×10^{-6}	-	3 (VAV2, ZNF433)
Patsopoulos et al., 2011 (94)	5 545/12 153	5×10^{-8}	Meta-Analyse	3 (MLANA)

Referenz (Nr.)	Fälle/Kontrollen	Signifikanzniveau	Interne Replikationen	Signifikante Loci nach/vor Replikation
IMSGC, 2011 (95)	9 772/17 376	$10 \times 10^{-4,5}$	1	52/102
IMSGC, 2013 (96)	14 498/24 091	1×10^{-4}	1	103/135
IMSGC, 2019 (64)	14 802/26 703	1×10^{-5}	2	200/207

Tabelle 2 Literaturübersicht: Endophänotypen der MS Überblick bisheriger Studien zur Assoziation von Genvarianten mit Verlaufsparemtern der MS, Tabelle zu Teilen übernommen und ergänzt von Jokubaitis et al., 2016 (68), in Klammern werden exemplarisch die durch die identifizierten SNPs betroffenen Gene angegeben

Referenz (Nr.)	Outcome	Anzahl (Erkrankung)	Ergebnisse (Gene)
Baranzini et al., 2009 (69)	Erkrankungsalter, MSSS, Gehirnparenchymvolumen, TLV	794 (RRMS, SPMS)	Kein SNP mit $p < 1 \times 10^{-8}$ 15/21/17/13 SNP mit $p < 1 \times 10^{-5}$
Brynedal et al., 2010 (70)	MSSS	1040/873 (RRMS, SPMS, PPMS)	Kein SNP mit $p < 1 \times 10^{-8}$ Ein SNP mit $p < 1 \times 10^{-6}$ (MGAT5)
IMSGC, 2011 (71)	MSSS	1470 (RRMS, SPMS, PPMS, RRMS)	Kein SNP mit $p < 1 \times 10^{-8}$ 29 SNP mit $p < 1 \times 10^{-3}$
Matsushita et al., 2015 (73)	Cortexdicke	775 (CIS, RRMS, SPMS, PRMS, unbekannt)	Kein SNP mit $p < 1 \times 10^{-8}$; Signalweg- Analysis
Giacalone et al., 2015 (72)	Erkrankungsalter, MSSS	451 (PPMS), 407 (RRMS)	Kein SNP mit $p < 1 \times 10^{-8}$ 39/26 SNP mit $p < 1 \times 10^{-4}$

Referenz (Nr.)	Outcome	Anzahl (Erkrankung)	Ergebnisse (Gene)
Pan et al., 2016 (74)	Konversion zu MS, Schubrate, EDSS	282 (Demyelinisierende Erkrankung des ZNS)	Kein SNP mit $p < 1 \times 10^{-8}$, 5/4/7 SNP mit $p < 0,05$
Zhou et al., 2017 (79)	Schub-Risiko	449 (CIS, RRMS)	Ein SNP mit $p = 3.30 \times 10^{-8}$ (LRP2)
Graves et al., 2018 (81)	Schub-Risiko	323 (CIS, RRMS)	Kein SNP mit $p < 1 \times 10^{-8}$ Ein SNP mit $p = 0,006$ (AHI1)
Vandebergh et al., 2021 (80)	Schub-Risiko	2231 (CIS, RRMS)	Ein SNP mit $p < 5 \times 10^{-8}$ (WNT9B)
Sun et al., 2021 (97)	Volumen der grauen Substanz	1391	Kein SNP mit $p < 1 \times 10^{-8}$ 623 SNP mit $p = 0,036$
Jokubaitis et al., 2023 (82)	I-MSSS, altersbezogener I-MSSS	1813 (RRMS)	Kein SNP mit $p < 1 \times 10^{-8}$ >100 SNP 1×10^{-5} (SEZ6L, MTSS1)

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Reagenzien

RBC Lysepuffer	NH ₄ Cl 8,29g (155mM) KHCO ₃ 1,00g (20mM) Na ₂ EDTA 0,034g (0,1mM) Finales Volumen: 1 Liter, pH-angepasst mit HCl/NaOH auf 7,4
SE Puffer	NaCl 4,39g (75mM) Na ₂ EDTA 8,41g (25mM) Finales Volumen: 1 Liter, pH-angepasst mit NaOH auf 8,0
Proteinase K	10mg/ml aqua dest. Merck Nr. 124568, gelagert bei -20°C.
SDS 20%	20g SDS + 80ml aqua bidest
Gesättigte NaCl-Lösung	6 M, autoclave the solution (58,44g/mol)
TE Puffer	Tris/HCl (pH 8,0) 10mM (0,121g / 100ml) EDTA 1mM (0,02925g / 100ml)

3.1.2 Laborgeräte und Zubehör

Zentrifuge	Thermo Scientific™ Heraeus™ Multifuge™ X1 Thermo Scientific™ Heraeus™ Multifuge™ 3 L-R Thermo Scientific™ Heraeus™ Fresco™ 21
Vortex-Schüttler	VWR® Analog

Biologische Sicherheitswerkbank	Thermo Scientific™ MSC-Advantage™
-80° Labor-Gefrierschrank	Panasonic® Ultra-low temperature Freezer DU700VH
Mundschutz	HALYARD Health The lite one* Procedure Mask
Eppendorfgefäße 2,0ml	Eppendorf Safe-Lock Tubes
Pipetten 10-1000 µl	Eppendorf Research®
Akku-betriebene Pipettierhilfe	Hirschmann® Pipetus®
Pipettenspitzen	STARLAB TipOne®
Falcon Röhrchen 50ml	Greiner Bio-One™

3.2 Methoden

3.2.1 Studiendesign

In die Studie im Querschnittsdesign wurden 358 Patient/innen (n=358) mit nach McDonald-Kriterien diagnostizierter MS sowie KIS aufgenommen, welche Mitglieder der Kohorte der MS-Gutenbergstudie sind und zwischen 2013 und 2019 eine standardisierte MRT in der Neurologie der Universitätsmedizin Mainz erhalten haben. Mittels der Lesion Segmentation Toolbox (LST) konnten das zerebrale Läsionsvolumen sowie die Volumina der grauen und weißen Substanz automatisch erfasst werden. Einschlusskriterien waren hierbei:

- die Diagnose einer schubförmig oder sekundär progredient verlaufenden MS (CIS/RRMS/SPMS) nach den 2017 revidierten McDonald-Kriterien (zwischen 2013 und 2017 gestellten Erstdiagnosen lagen die McDonald-Kriterien von 2010 zugrunde)
- das Vorliegen einer cMRT mit den folgenden Sequenzen: T1-Wichtung („magnetization prepared rapid gradient echo“ (MP-RAGE)-Sequenzen) und T2-Wichtung („fluid attenuated inversion recovery“ (FLAIR)-Sequenzen)
- das Vorliegen von demographischen und klinischen Daten zum Zeitpunkt der MRT

Zusätzlich wurden folgende Ausschlusskriterien definiert:

- Diagnose einer PPMS
- Nicht-europäische Abstammung (mittels anamnestischer Erhebung der Abstammung der Eltern und der Großeltern)

Um SNP-Daten zu generieren, wurde von den Patient/innen EDTA-Blut gewonnen und DNA extrahiert, welche anschließend mithilfe eines genomweiten Array-Chips am Max-Planck-Institut für experimentelle Medizin in Göttingen genotypisiert wurde.

Zusätzlich wurden neben den demographischen Daten Geschlecht und Alter weitere klinische Daten retrospektiv zum Zeitpunkt der Bildgebung anhand der ärztlichen Dokumentation erhoben. Hierzu zählen der EDSS-Wert zur Erfassung des durch MS verursachten Grades der Behinderung, die Verlaufsform der MS (RRMS, KIS, PPMS, SPMS) und die eventuelle Behandlungsart und -dauer.

Das schriftliche Einverständnis zur Studienteilnahme wurde von allen Patient/innen im Vorfeld eingeholt und ein Ethikantrag bei der lokalen Ethikkommission beantragt und bewilligt (837.019.10).

3.2.2 Bestimmung des TLVs mittels LST

Die Bildgebung mittels MRT erfolgte als Routineuntersuchung teils im Kontext der Diagnosestellung, teils im Rahmen der Verlaufskontrollen nach standardisiertem Schema im Neuroimaging Center in Mainz. Hierbei erhielten alle Patient/innen mit einem 3 Tesla Magnetresonanztomographen (Magnetom Tim Trio, Siemens Healthcare, Erlangen, Germany) mit einer 32-Kanal Empfängerspule Aufnahmen vom Kopf in T1-Wichtung (sagittale 3D T1-gewichtete MP-RAGE-Sequenzen (TE/TI/TR = 2,52/900/1900ms, Anregungswinkel = 9°, FOV (field of view) = 256 x 256 mm, Matrixgröße = 256 x 256, slab thickness = 192 mm, voxel size = 1 x 1 x 1 mm)) und in T2-Wichtung (sagittale 3D T2-gewichtete FLAIR-Sequenzen (TE/TI/TR = 388/1800/5000 ms, echo-train length = 848, FOV = 256 x 256 mm, Matrixgröße = 256 x 256, slab thickness = 192 mm, voxel size = 1 x 1 x 1 mm)) (**s. Abb. 2**).

Die MRT-Aufnahmen im DICOM Format (Digital Imaging and Communications in Medicine Format) wurden im ersten Schritt in das NIFTI Format (Neuroimaging Informatics Technology Initiative Format) überführt. Aus diesen Daten ließen sich

anschließend das zerebrale Läsionsvolumen sowie die Volumina der weißen und grauen Substanz ermitteln. Für die Segmentierung der Läsionen verwendeten wir den Lesion Growth Algorithmus (LGA, Schmidt et al., 2021), welcher Teil der Lesion Segmentation Toolbox (LST, Version 3.0.0, www.statistical-modelling.de/lst.html) ist, sowie die VBM8 (voxel-based morphometry) Toolbox (98). Hierfür nutzten wir die Statistical Parametric Mapping (SPM8) Software, welche über die Plattform Matlab R2021b (www.mathworks.de/products/matlab/) lief. (99)

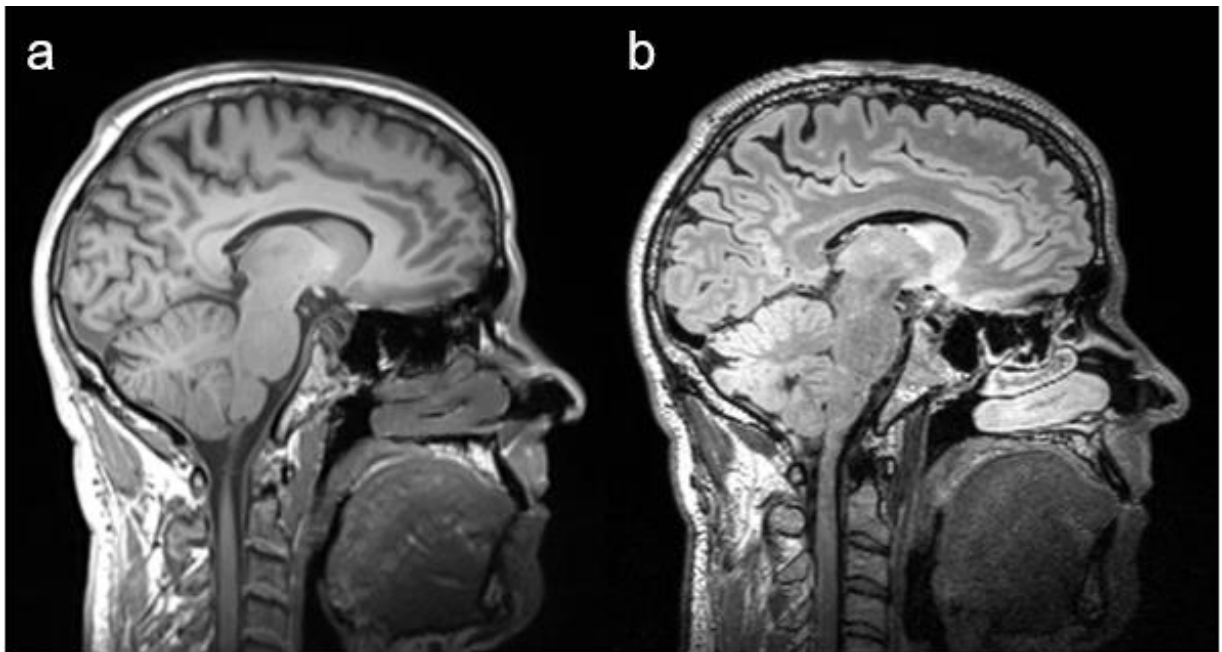


Abb. 2 Kranielle MRT Aufnahmen eines Patienten (Subject419, 35 Jahre alt, männlich mit einem Läsionsvolumen von 2,68ml, dem Median unserer Kohorte (2,05ml) ähnelnd) a) T1-gewichtet sagittal b) T2-gewichtet FLAIR sagittal

Für die Segmentierung ordnet der Algorithmus Bereiche der 3D T1-gewichteten Bilder intensitätsbasiert den drei Gewebeklassen Liquor, graue Substanz und weiße Substanz zu. Mittels einer Ko-Registrierung mit den 3D FLAIR Bildern wird das Läsionsvolumen berechnet, indem voxelweise in der FLAIR-Einstellung für hyperintens erscheinende Areale Wahrscheinlichkeiten, dem Läsionsgewebe anzugehören, errechnet werden.

Durch das Ausfüllen dieser Bereiche im korrespondierenden T1-gewichteten Bild entstehen sogenannte Lesion Belief Maps. Die ausgefüllten Bereiche können anschließend bei der Zuordnung der grauen und weißen Substanz als Läsionen im

Mark kategorisiert werden und werden nicht mehr aufgrund ihrer abweichenden Intensität fälschlicherweise dem Kortex oder dem Marklager zugeordnet. Wir legten für alle Patient/innen einen Schwellenwert (κ) von 0,1 fest, für welchen wir im Vorfeld durch mehrmaliges Testen und visuelles Abgleichen herausfanden, dass dieser die genauesten Ergebnisse bei unserem Patientenkollektiv erzielte.

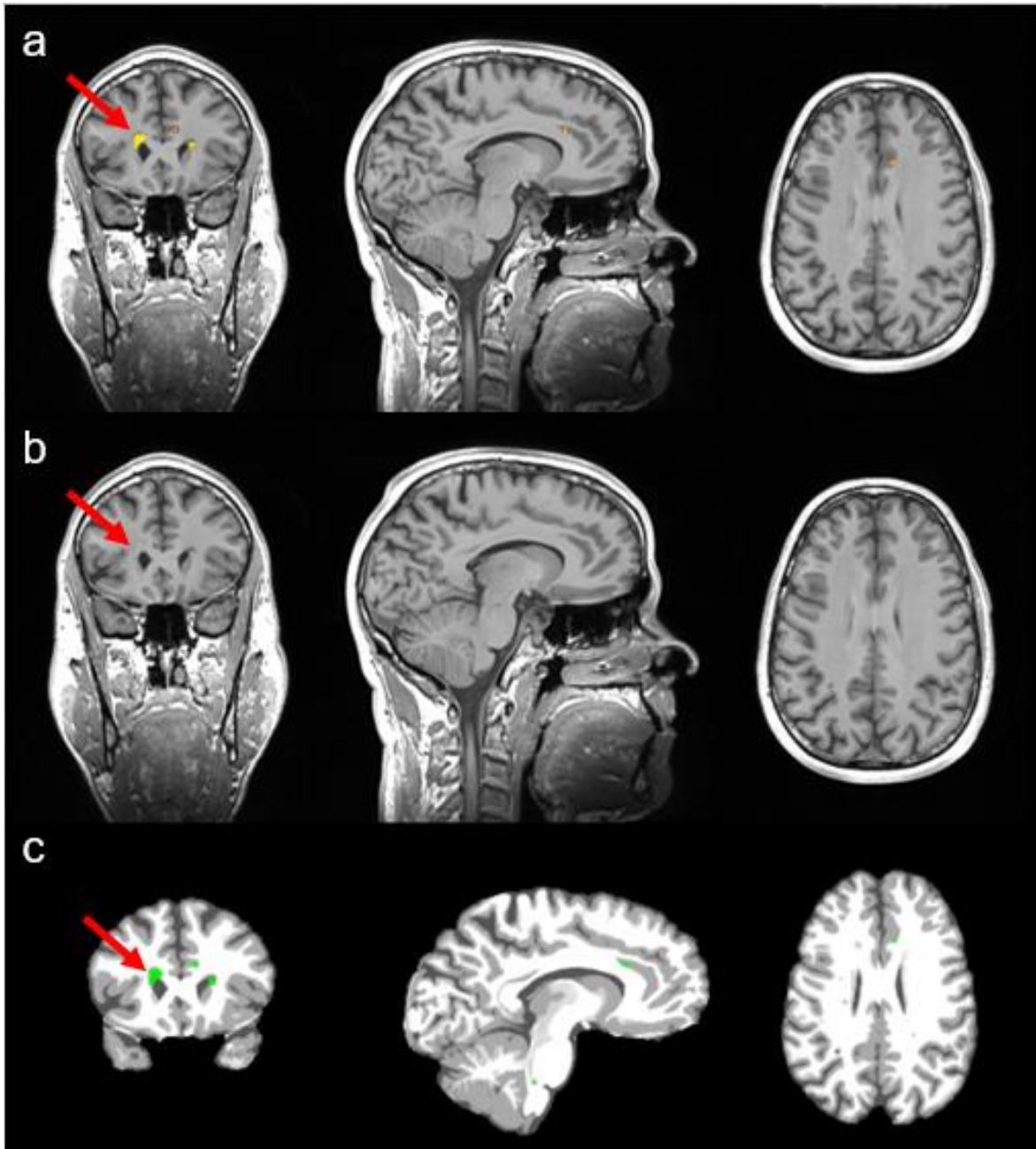


Abb. 3 Prozess der Segmentierung: MRT T1-gewichtete Sequenz in Coronar-, Sagittal- und Transversalebene a) mit sichtbar eingezeichneten Läsionen (gelb) periventrikulär (s. Pfeil) und juxtacortical nach der Co-Registrierung mit den Flair-Aufnahmen und Erstellung einer Lesion Belief Map b) nach erfolgtem Lesion Filling (grau) c) nach Erstellung einer binären Maske (Läsionen in grün) durch Applikation des Schwellenwerts $\kappa=0,1$ und Segmentierung in weiße und graue Substanz

Durch Anwendung des Schwellenwerts wird eine binäre Läsionsmaske generiert (**s. Abb. 3**) und nach Auslesung des Läsionsvolumens werden die Bilder durch den Algorithmus atlas-basiert (MNI (Montreal Neurological Institute) normalisiert) in Liquor, weiße und graue Substanz segmentiert. (**s. Abb. 4**) Das Gehirngesamtvolumen wurde als die Summe von Liquor, grauer und weißer Substanz definiert. Abschließend wurden die Ergebnisse der Segmentierung optisch geprüft, um die Zuverlässigkeit der automatischen Zuteilung zu überprüfen.

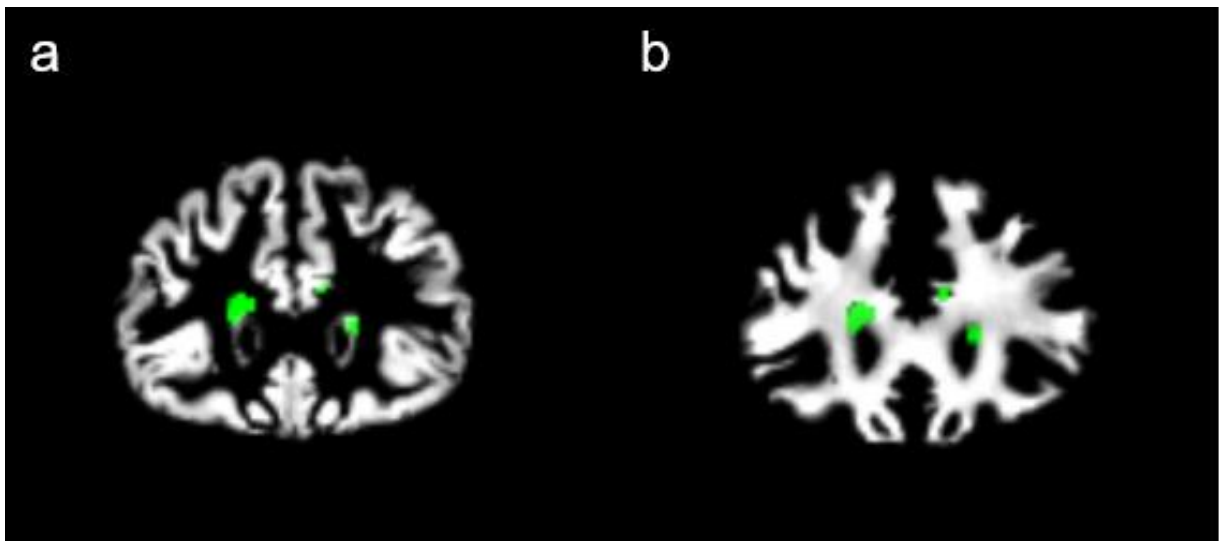


Abb. 4 Ergebnis des Segmentierungsprozesses Darstellung der grauen und weißen Substanz, sowie der Läsionen (grün) am Beispiel des Coronarschnitts nach atlas-basierter Normalisierung

3.2.3 Genotypisierung

Durch Gewinnung von EDTA-Blut im Rahmen einer venösen Blutentnahme konnte für alle Patient/innen DNA aus den Zellen nach standardisiertem Schema isoliert werden. Dies geschah nach laborinternem Protokoll (s. [3.1 Material](#)) durch das Neurologie Labor der Universitätsmedizin Mainz.

Für die Generierung genomweiter SNP-Daten wurde der Affymetrix Axiom® myDesign™ GW Array Chip (Thermofischer) verwendet. Dieser umfasst 610 849 SNPs, deren Auswahl auf neurowissenschaftliche Fragestellungen und ein kaukasisches Patientenkollektiv zurechtgeschnitten wurde. Letzteres berücksichtigten wir, um die Wahrscheinlichkeit zu reduzieren, dass eventuelle Effekte auf das Läsionsvolumen durch unterschiedliche genetische Abstammung und nicht durch krankheitsspezifische Mechanismen verursacht worden sein könnten. Aus diesem

Grund wurden im Rahmen der anschließenden Qualitätskontrolle und Auswertung ausschließlich Daten von Patient/innen europäischer Abstammung berücksichtigt. Das Array wurde nach Protokoll der Hersteller im Rahmen eines multizentrischen Projektes durch das Max-Planck-Institut für experimentelle Medizin in Göttingen durchgeführt.

(s. Abb.5)

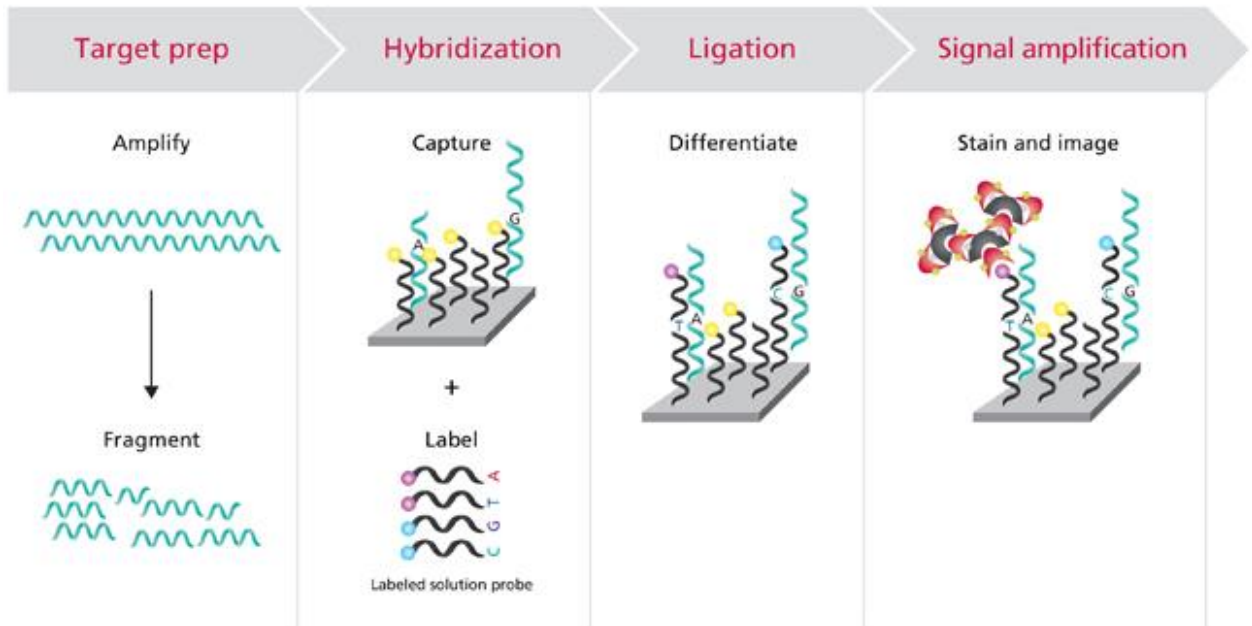


Abb. 5 Schematische Darstellung des Arrays Nach Vermehrung der gesamten DNA (200ng) wird diese zufällig fragmentiert (25 bis 125 Basenpaare). Die Fragmente werden aufgereinigt, suspendiert und auf die Axiom Genome-Wide Human Array Plate aufgebracht. Nach Hybridisierung werden die gebundenen Zielstrukturen gewaschen, um unspezifische Hintergrundsignale durch zufällige Bindungsereignisse zu minimieren. Jedes unterschiedliche Nucleotid wird an der Arrayoberfläche mit einem farblich verschiedenen Marker versehen. Nach der Bindung wird der Array angefärbt und mittels des GeneTitan™ Multi-Channel Instrumentes abgebildet. (http://www.affymetrix.com/products_services/axiom_custom/axiom_mydesign.affx#1_1)

3.2.4 Qualitätskontrolle

Die Qualitätskontrolle erfolgte nach standardisiertem Protokoll nach dem Einlesen der klinischen und genotypisierten Daten in PLINK 1.9. (Purcell et al., [2007](#), <http://pngu.mgh.harvard.edu/purcell/plink/>) (100):

3.2.4.1 SNP-level filtering

Im ersten Schritt wurden SNPs, für welche bei mehr als 5% der Patient/innenproben keine Daten generiert werden konnten, ausgeschlossen (Call Rate < 95%). Simultan wurde eine Mindestfrequenz des selteneren Allels von 5% festgelegt (Minor Allele Frequencies, MAF=5%), da Genotypisierungsfehler auf seltenerere Allele einen höheren Einfluss haben und so einer Verfälschung der Analyseergebnisse entgegengewirkt werden kann. Es wurden ausschließlich autosomale SNPs in der späteren Assoziationsanalyse berücksichtigt. 125 495 der ursprünglichen 610 849 SNPs entsprachen diesen Kriterien nicht und wurden ausgeschlossen.

3.2.4.2 Sample-level filtering

Im zweiten Schritt wurden die Daten auf Probenebene bereinigt. Analog zu den SNPs wurde eine call rate auf 99% festgelegt und Patient/innen, bei denen weniger als 99% der SNP-Daten generiert werden konnten, wurden ausgeschlossen. Zusätzlich wurden Proben, welche signifikant ($P < 10^{-06}$) von dem zu erwartenden Hardy-Weinberg Equilibrium (HWE) abwichen, ausgeschlossen, da eine überdurchschnittliche Heterozygotie über alle SNPs als Hinweis auf eine schlechte Probenqualität gewertet werden kann (101). Darüber hinaus wurde, da es sich um eine regionale Kohorte handelt, geprüft, ob Proben von verwandten Patient/innen vorliegen und lediglich die Daten des Individuums des verwandten Paares mit der höheren call rate beibehalten. Hierzu wurde ein relativer Cut off von 0,125 gewählt. Proben, bei welchen das angegebene Geschlecht nicht mit dem Genotyp übereinstimmte, wurden ausgeschlossen. Durch einen Abgleich mit Referenzgenomanalysen konnten, wie bereits genannt, Patient/innen europäischer Abstammung herausgefiltert werden (HapMap3). Zusätzlich konnte durch die Analyse ähnlicher SNP-Muster und die Identifikation von Hauptkomponenten (Principal Components, PCs) eine Stratifikation von Subpopulationsstrukturen erzielt werden (102).

Insgesamt verblieben nach der vollständigen Qualitätskontrolle 485 038 SNPs und 315 Patient/innen für die anschließende Assoziationsanalyse.

3.2.5 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mittels PLINK 1.9 und SPSS 27.0 (IBM Corp., USA). Hierbei handelt es sich um eine explorative und nicht-konfirmatorische Datenanalyse.

Für die deskriptive Statistik werden im Folgenden stetige Variablen wie Alter und Läsionsvolumen durch Mittelwert, Median und ihren Interquartilsabstand (IQR) beschrieben und mittels Boxplots graphisch dargestellt. Für kategoriale Variablen wie Geschlecht und Erkrankungsform werden absolute und relative Häufigkeiten angegeben.

Die Daten wurden mittels des Shapiro-Wilk-Tests und des Kolmogorov-Smirnov-Tests auf eine Normalverteilung geprüft.

Für den Vergleich zweier Gruppen nutzten wir in Anbetracht fehlender Normalverteilung (Läsionsvolumen, Erkrankungsdauer, EDSS) den Mann-Whitney-U-Test. Mehrere Gruppen wurden mittels des Kruskal-Wallis-Tests verglichen. Für die optische Darstellung nicht normalverteilter Daten wählten wir eine logarithmische Skalierung. Auf den Zusammenhang von Daten prüften wir mit Hilfe der Korrelationsanalyse nach Spearman, Stärke und Richtung der Beziehung wurden mit dem Korrelationskoeffizienten beschrieben und in Form eines Streudiagrammes optisch dargestellt.

Die Assoziationsanalyse der nach der Qualitätskontrolle verbleibenden SNPs erfolgte durch lineare Regressionsmodelle für jeden einzelnen SNP separat und dem TLV als abhängige Variable über PLINK. Hierbei wurden folgende Parameter als Kovariaten in das Regressionsmodell aufgenommen:

- Geschlecht: Wir wählten das Geschlecht als Kovariate, da Studien belegen, dass es sowohl bezüglich der Krankheitsentstehung als auch des Verlaufes Unterschiede zwischen Männer und Frauen gibt. Während Frauen häufiger von MS betroffen sind, ist der Verlauf bei Männern aggressiver, sodass es bei diesen schneller zu einem höheren Behinderungsgrad und früher zu einem Progress zur sekundär progredienten Form kommt. (103)
- Alter: In der Literatur wird vielfach ein Einfluss der Erkrankungsdauer auf die zerebrale Läsionslast beschrieben: Hier wird sowohl eine stetige Zunahme und das anschließende Erreichen eines Plateaus bei fortgeschrittener Krankheit (104), als auch ein Volumenabnahme im Rahmen akuter Entzündung und

Remodelierungsprozesse beobachtet (105). Da eine anamnestische Erhebung der Erkrankungsdauer durch retrospektive Erfragung erster Symptome nicht objektivierbar ist und wir davon ausgehen, dass zunehmendes Alter mit einer weiter fortgeschrittenen Krankheit und somit höheren Läsionslast einhergeht, berücksichtigten wir dieses in unserem Regressionsmodell.

- Therapieform: Der therapeutischen Intention entsprechend wirken sich unterschiedliche krankheitsmodifizierende Medikamente, wie sie zurzeit zu der Behandlung der MS eingesetzt werden, auf die zerebrale Läsionslast und somit das in der MRT dargestellte Läsionsvolumen aus. Zwar ist der Effekt unterschiedlicher Wirkstoffe von großer Heterogenität (106–109), dennoch entschieden wir lediglich die Frage nach Therapienaivität in unserer Regressionsanalyse zu berücksichtigen, um diese übersichtlich zu gestalten.
- PCs: Als mögliche Konfounder wurden abschließend die ersten zehn Hauptkomponenten der Genanalyse gewählt und in unser Modell der Regressionsanalyse aufgenommen, um eventuellen Effekten durch unterschiedliche genetische Subgruppierungen anstelle von krankheitsspezifischen Mechanismen Rechnung zu tragen. Die hier gewählte Zahl entspricht etablierten Standards bei GWAS. (102)

Um eine Korrektur für multiples Testen zu gewährleisten und falsch positiven Ergebnissen entgegenzuwirken, wurde das genomweite Signifikanzniveau auf 5×10^{-8} festgelegt. Genvarianten, welche einen p-Wert von 1×10^{-5} erreichen, wurden als suggestiv definiert. Diese Grenzwerte haben sich auf Grundlage vorausgegangener Studien als Standard für GWAS etabliert. (110) Da es sich um eine explorative Fragestellung handelt, ist der p-Wert im Folgenden aus informativen Gründen angegeben und als statistisch relevant anstelle von statistisch signifikant einzuordnen. Die Darstellung der Mutationsverteilung erfolgt mittels Manhattan Blot.

4 Ergebnisse

4.1 Beschreibung des Kollektivs

4.1.1 Demographische Daten

Nach Ausschluss aller Patient/innen nicht-europäischer Abstammung und der mittels PLINK durchgeführten Qualitätskontrolle verblieben 315 Patient/innen für unsere Studie. In dieser Kohorte befanden sich der epidemiologischen Verteilung der schubförmigen MS entsprechend (2-3:1) mehr Frauen (67.6%) als Männer (32.4%) (103). Das Alter (Minimum: 17, Maximum: 69) wurde zum Zeitpunkt der Bildgebung festgehalten. Bezüglich des mittleren Alters und seiner Verteilung unterschieden sich Männer und Frauen nicht. Die demographischen Parameter werden in **Tabelle 3** zusammengefasst.

Parameter	Anzahl (%)	Median (IQR)
Alter (Jahre)		34 (27 - 45)
Geschlecht		
Männlich	102 (32.4%)	
Weiblich	213 (67.6%)	

Tabelle 3 Demographische Daten, die relativen Daten und Interquartilsabstände werden in Klammern angegeben

4.1.2 Klinische Daten

Bei 259 (82,2%) der 315 in der Studie ausgewerteten Patient/innen konnte zum Zeitpunkt der Bildgebung die Diagnose einer MS nach den 2017 revidierten McDonald-Kriterien gestellt werden. Der Großteil wies hierbei einen schubförmig-remittierenden Verlauf auf wohingegen 9 Patient/innen bereits in das Stadium einer sekundären Behinderungsprogression mit oder ohne aufgesetzte Schübe übergegangen waren. Bei 56 (17,8%) Patient/innen lag zum Zeitpunkt der Bildgebung ein KIS vor, wobei dieses als das Vorliegen eines Schubereignisses mit neurologischen Defiziten, welches mit MS vereinbar ist, ohne Erfüllung des Kriteriums der zeitlichen Dissemination definiert wurde. Eine räumliche Dissemination zerebraler und spinaler Läsionen konnte nachgewiesen werden (**s. Tabelle 4**). (36)

Bei einem mittleren Alter von 31 (IQR: 25-40) Jahren bei Erstdiagnose erfolgte die Bildgebung mittels MRT bei der Hälfte unseres Kollektivs innerhalb eines Jahres (Median:12 Monate, IQR:2-53). Der maximale Abstand zwischen Diagnose und MRT lag bei 27,5 Jahren. Das hier dokumentierte durchschnittlicher Erkrankungsalter entspricht ebenfalls den epidemiologischen Daten weltweit (10).

Parameter	Anzahl (%)	Median (IQR)
Diagnose		
KIS	56 (17.8%)	
RRMS	250 (79.4%)	
SPMS	9 (2.8%)	
Therapie		
Naiv	123 (39%)	
Unter Behandlung	192 (61%)	
Erkrankungsdauer zum Zeitpunkt der MRT (Monate)		12 (2 - 53)
Alter bei Erstdiagnose (Jahre)		31 (25 - 40)
EDSS		1.0 (0 - 2)

Tabelle 4 Klinische Parameter

Mit einem Median von 1 des EDSS zum Zeitpunkt der Bildgebung lag bei unserer Kohorte ein eher milder Beeinträchtigungsgrad vor, was den Erwartungen einer diagnosenahen Erhebung entspricht. Ebenfalls den Erwartungen entsprechend waren Patient/innen mit einem sekundär-progredienten Krankheitsverlauf signifikant längere Zeit erkrankt (n=9, Median 200 Monate, IQR 72,5-258 Monate) und wiesen einen höheren Beeinträchtigungsgrad auf (EDSS: Median 6, IQR 4,74-6,5) als Patient/innen mit RRMS (n=250, Median 14 Monate, IQR 2-70,75 Monate; EDSS Median 1, IQR 1-2) und KIS (n=56, Median 3,5 Monate, IQR 1-8,75 Monate; EDSS Median 1, IQR 0-1,5) (**s. Abb. 6**).

Unter Behandlung mit verlaufsmodifizierenden Medikamenten standen zum Zeitpunkt der MRT 61% unserer Kohorte, 39% der Patient/innen waren therapienaiv.

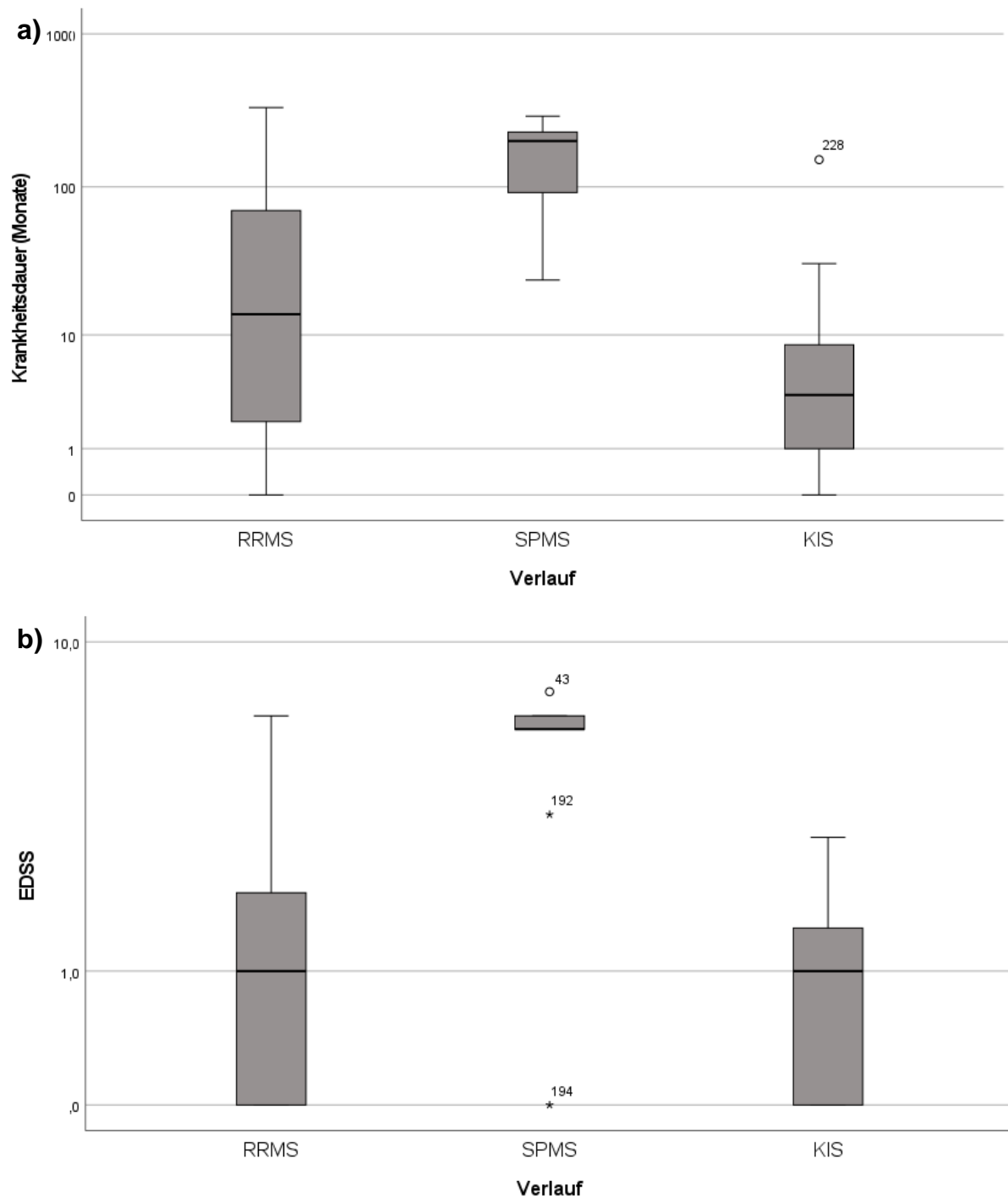


Abb. 6 Verlaufsabhängige Erkrankungsdauer und -schwere Vergleich a) der Erkrankungsdauer, $p < 0,001$ und b) des EDSS, $p < 0,001$, (beide auf der y-Achse in logarithmischer Skalierung aufgetragen) zwischen Patient/innen mit KIS (56), RRMS (250) und SPMS (9). Der Boxplot gibt den Median (horizontale Linie), die 25. Und 75. Perzentile (Box), sowie minimale und maximale Werte an (Whiskers), Ausreißer werden als Sternchen dargestellt

4.1.3 MRT-Auswertung

Das in der MRT dargestellte mittlere Läsionsvolumen lag bei 2,05ml (IQR:0,8-6,47). Alle weiteren Volumina werden in **Tabelle 5** angegeben.

Parameter (ml)	Median (IQR)	Mittelwert (SE)
TLV	2,05 (0,8 - 6,47)	6,84 (11,3)
Totale Volume	1409,55 (1336,16 – 1508,73)	1425,4
CSF	224,94	231,05
GM	620,61	618,03
WM	566,85	571,18

Tabelle 5 zerebrale MRT-Befunde Gesamtes Läsionsvolumen (TLV), Cerebrospinalflüssigkeit (CSF), graue Substanz (GM), und weiße Substanz (WM)

4.2 Einfluss demographischer und klinischer Parameter auf das TLV

Das Läsionsvolumen unterschied sich geschlechterabhängig statistisch signifikant ($p < 0.001$), wobei Frauen ($n=213$, Median 1,64 ml, IQR 0,59-5,05 ml) ein geringeres Läsionsvolumen aufwiesen als Männer ($n=102$, Median 3,75 ml, IQR 1,42-5,05ml). (**s. Abb. 7**)

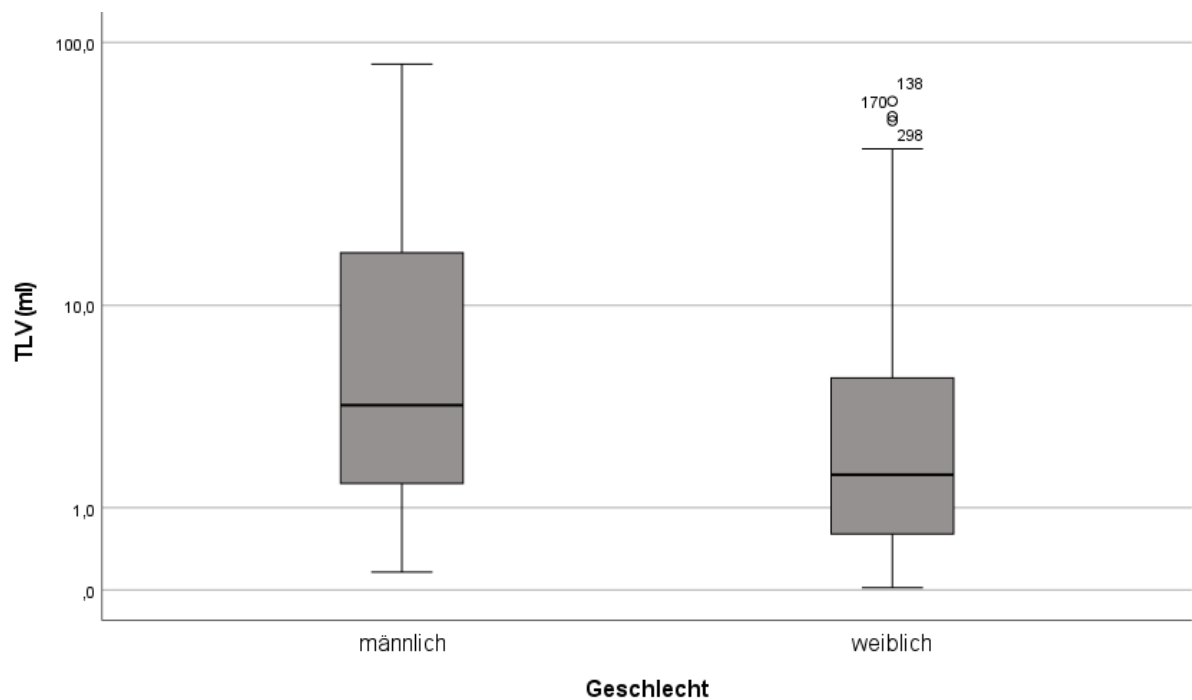


Abb. 7 Geschlechterabhängiges Läsionsvolumen Vergleich des Läsionsvolumens (auf der y-Achse in logarithmischer Skalierung aufgetragen) zwischen männlichen (102) und weiblichen (213) Patient/innen ($p < 0,001$)

Das Alter der Patient/innen zum Zeitpunkt der Bildgebung und das Läsionsvolumen korrelierten moderat miteinander (Spearman's $\rho = 0,295$ $p < 0,001$).

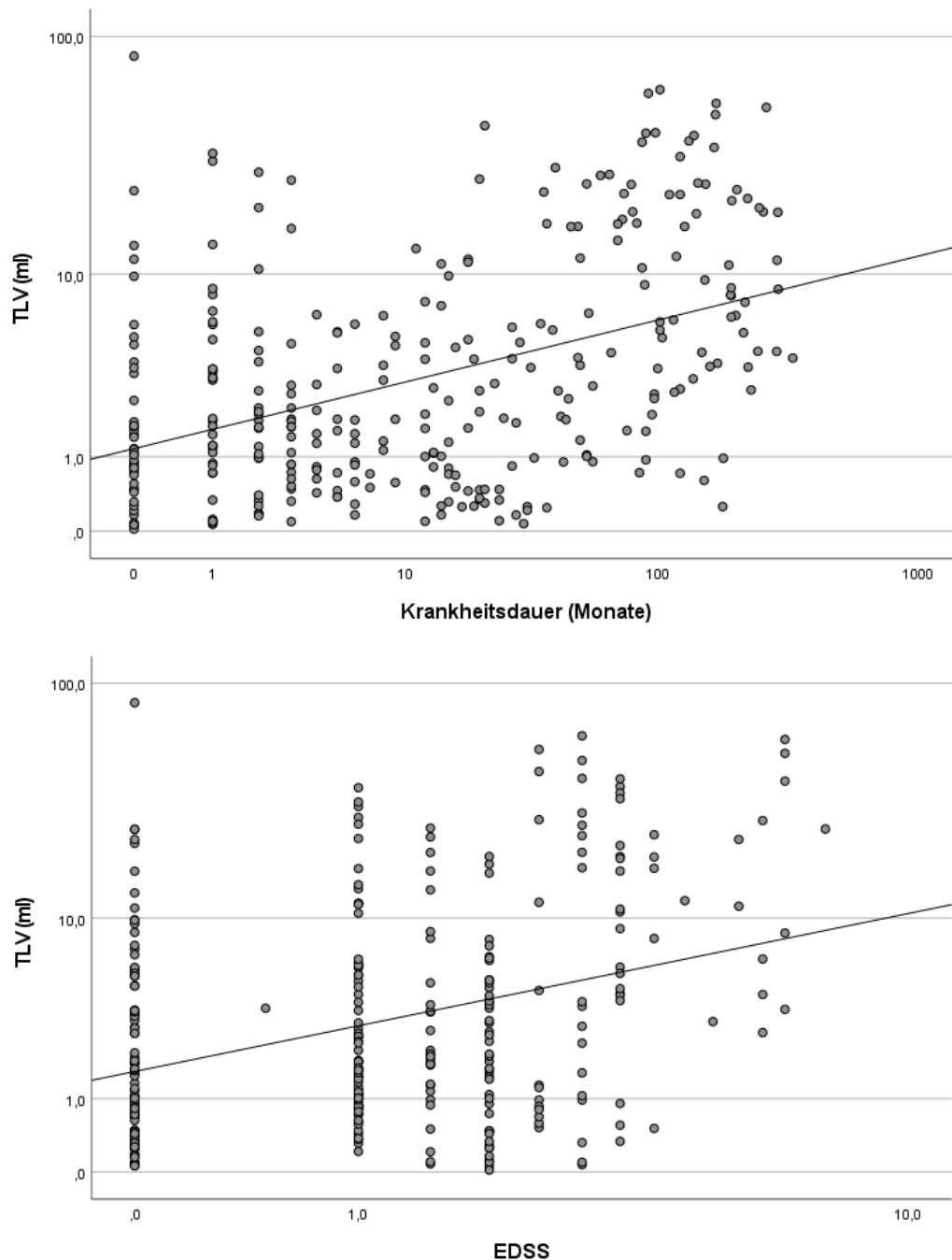


Abb. 8 Korrelation des Läsionsvolumen mit Krankheitsdauer und EDSS Korrelation des Läsionsvolumens (TLV) mit a) der Krankheitsdauer ab Erstdiagnose zum Zeitpunkt der Bildgebung und b) dem Grad der Beeinträchtigung (EDSS). Es zeigt sich in beiden Fällen ein signifikanter Zusammenhang (Erkrankungsdauer: Spearman's $\rho=0,403$, $p<0,001$; EDSS Spearman's $\rho=0,316$, $p<0,001$). Läsionsvolumen, Erkrankungsdauer und EDSS werden auf der x- und y-Achse in logarithmischer Skalierung aufgetragen.

Die Erkrankungsdauer stand in starkem Zusammenhang mit dem Läsionsvolumen (Spearman's $\rho = 0,403$ $p < 0,001$), hiermit einhergehend korrelierten der EDSS und das Läsionsvolumen moderat miteinander (Spearman's $\rho = 0,316$ $p < 0,001$, **s. Abb. 8**). Das Alter bei Erstdiagnose und das Läsionsvolumen standen in keinem signifikanten Zusammenhang ($p=0,2$).

Bezüglich der Verlaufsform zeigten sich ebenfalls signifikante Unterschiede des Läsionsvolumens ($p < 0,001$): Patient/innen mit einem progressiven Verlauf wiesen ein höheres Läsionsvolumen auf ($n=9$, Median 4,35ml, IQR 3,18-16,55ml) als solche mit einem remittierend-schubförmigen Verlauf ($n=250$, Median 2,44ml, IQR 0,9-8,23ml). Das geringste Läsionsvolumen war in der Untergruppe der Patient/innen mit einem KIS zu beobachten ($n=56$, Median 0,97ml, IQR 0,34-3,52ml). (**s. Abb. 9**)

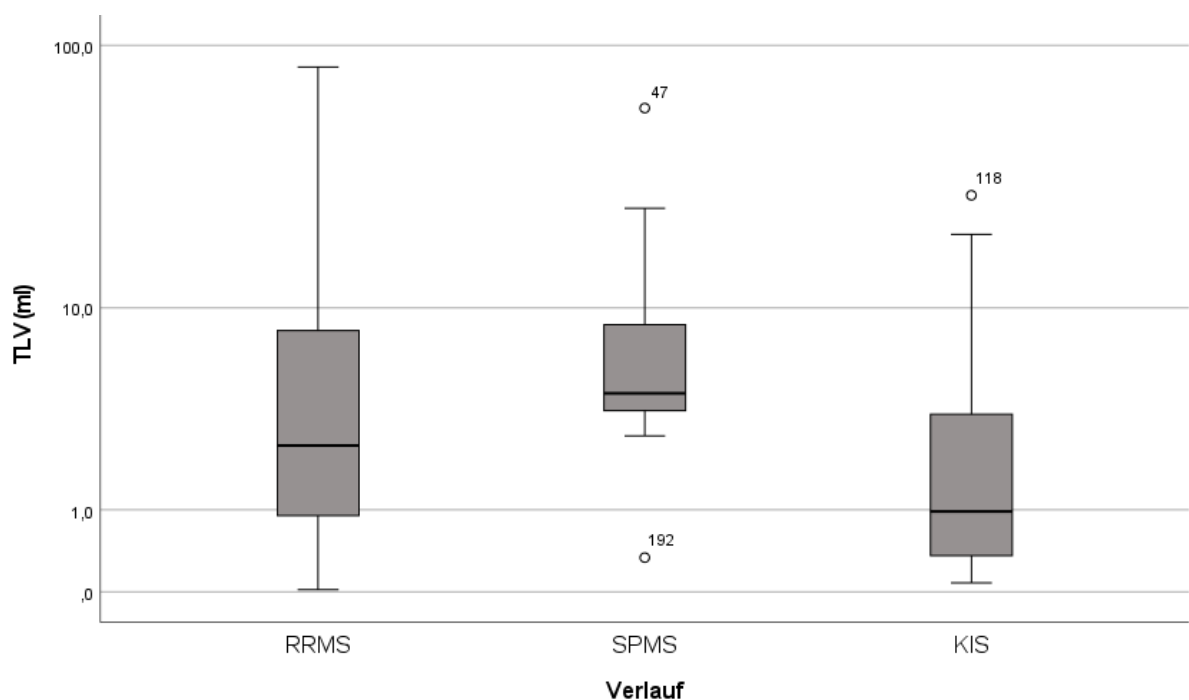


Abb. 9 Verlaufsabhängiges Läsionsvolumen Vergleich des Läsionsvolumens (auf der y-Achse in logarithmischer Skalierung aufgetragen) zwischen Patient/innen mit RRMS (250), SPMS (9) und KIS (56), es zeigen sich signifikante Unterschiede ($p < 0,001$)

4.3 Einfluss von Genvarianten auf das TLV

Die Assoziationsanalyse wurde nach der Qualitätskontrolle für 485 038 SNPs an 315 Patient/innenproben durchgeführt. Hierbei wurde ein additives Modell gewählt, bei welchem die SNPs durch die Anzahl des selteneren Allels definiert wurden (0,1,2). Die

Regressionsanalyse erfolgte separat für jeden einzelnen SNP unter Berücksichtigung der zuvor gewählten Kovariaten.

Nach Durchführung der Regressionsanalyse zeigten sich statistisch signifikant erhöhte Läsionsvolumina bei drei SNPs auf den Chromosomen 2, 9 und 15. Zwölf weitere SNPs auf zehn Chromosomen können als hinweisend gewertet werden, ohne statistische Signifikanz zu erreichen. Diese werden in **Tabelle 6** bezüglich ihrer Lage, ihres p-Wertes und ihres Regressionskoeffizientens (β) genauer beschrieben. Die Verteilung der identifizierten Basenaustausche sind in **Abbildung 10** in Form eines Manhattan-Blots grafisch dargestellt.

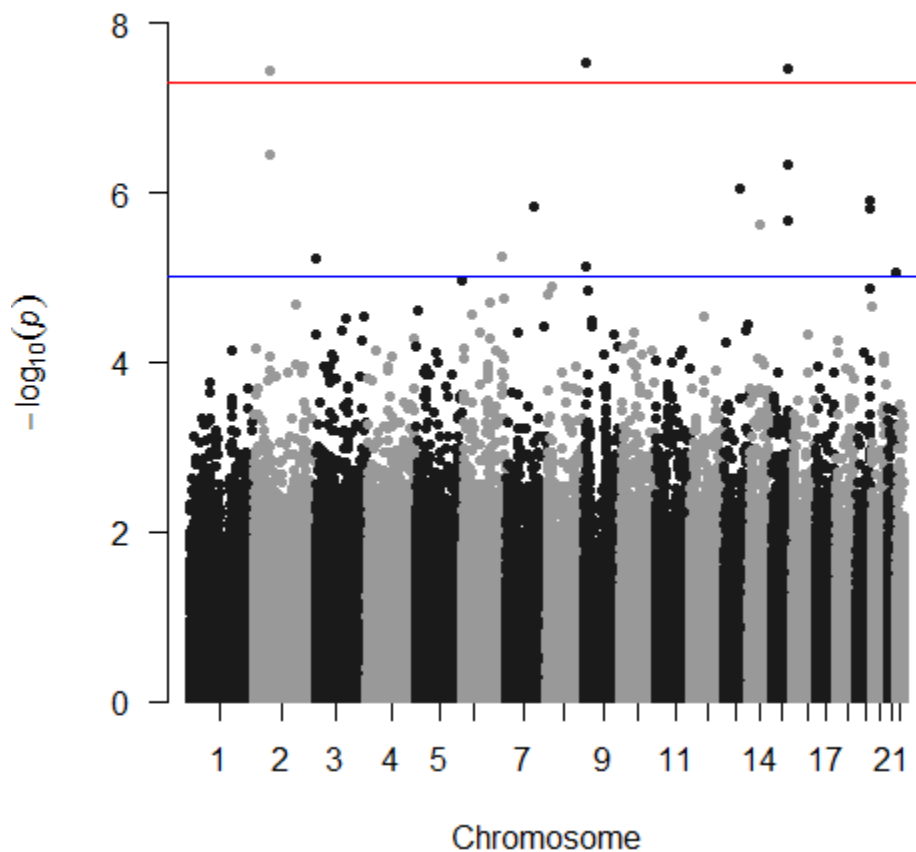


Abb. 10 Manhattan Blot Darstellung der statistischen Signifikanz in Form des negativen dekadischen Logarithmus des p-Wertes (y-Achse) für jeden SNP (graue und schwarze Punkte) aufgetrennt nach chromosomaler Lage (x-Achse). Drei SNPs erreichen statistische Signifikanz ($p < 5 \times 10^{-8}$ - rote Linie) auf Chromosom 2, 9 und 15, zwölf sind suggestiv ($p < 1 \times 10^{-5}$ - blaue Linie)

Auf die drei signifikantesten und einige der suggestiven SNPs wird im Folgenden genauer eingegangen. Alle Daten bezüglich der durch die Polymorphismen betroffenen Gene, ihrer Häufigkeiten und Funktion entstammen der SNP-Database des NCBI (National Center for Biotechnology Information, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>), sowie dem UCSC (University of California Santa Cruz) Genome Browser (<http://genome.ucsc.edu>) (111, 112).

Auf Chromosom 9p23 liegt der SNP rs12348024 (-Log₁₀(P) 7.537) an der 9069573. Basenpaarstelle. Hier kommt es zu einem Austausch von Guanin zu Adenin im Intron (11/16) des PTPRD Gens (Protein Tyrosin Phosphatase, Rezeptor Typ D), welches für ein Mitglied der Protein Tyrosin Phosphatasen Familie kodiert. Auf einem anderen Intron dieses Genes liegend (5/16) konnten wir einen weiteren SNP identifizieren (rs10491913), welcher mit einem p-Wert < 1 × 10⁻⁵ (-Log₁₀(P) 5.123) als suggestiv angesehen werden kann.

Ein weiterer statistisch signifikanter SNP (rs11636752, -Log₁₀(P) 7.472) liegt auf Chromosom 15q25 an der 88899726. Basenpaarstelle im Intron des nicht-proteinkodierenden Genlocus LOC105370959, benachbart zu dem Gen NTRK3 (Neurotrophische Tyrosin Kinase, Rezeptor Typ 3). Letzteres erstreckt sich, DNA-aufwärts von rs11636752 gelegen, von Basenpaar 88420166 bis 88799384 und kodiert für einen membran-gebundenen Rezeptor. In der Nähe dieses Genes liegend (Position 88.891.497 und 88.897.349) konnten wir darüber hinaus rs4392026 (-Log₁₀(P) 6.327) und rs1899416 (-Log(P) 5.667) als weitere möglicherweise mit dem Läsionsvolumen assoziierte SNPs identifizieren.

Auf Chromosom 2p14 kommt es im Rahmen des dritten statistisch signifikanten SNPs rs7583237 (-Log₁₀(P) 7.441) innerhalb eines intergenetischen, nicht Protein-kodierenden Abschnitts zu einem Austausch von Guanin zu Adenin an Basenpaarstelle 66.079.084. Innerhalb desselben Abschnittes findet sich ebenfalls rs6546185, ein weiterer Polymorphismus, welcher als statistisch hinweisend gewertet werden kann.

Von den bisher nicht näher erläuterten acht der zwölf SNPs, welche als hinweisend angesehen werden können (P < 1 × 10⁻⁵), sind einige weitere zu nennen:

Ergebnisse

Auf Chromosom 7 führt der SNP rs2041001 (-Log (P) 5.847) an der 108083099. Basenpaarstelle im Intron des Gens NRCAM (Neuronales Zell-Adhäsionsmolekül) zu einem Basenaustausch.

Ein weiteres für ein Zell-Adhäsionsmolekül kodierendes Gen, CNTN4 (Contactin 4) auf Chromosom 3, ist durch den Polymorphismus rs12497706 (-Log (P) 5.220) betroffen.

Der SNP rs397977 (-Log₁₀ (P) 5.805) betrifft auf Chromosom 19 an der 56539240. Basenpaarstelle den Protein-kodierenden Bereich (Exon 7/15) des Genes NLRP5 (NLR family pyrin domain containing 5), führt jedoch zu einer synonymen Variante und somit zu keinem Aminosäureaustausch. Der negative Korrelationskoeffizient (β : -4.015) zeigt an, dass das seltenere Allel mit einem geringeren Läsionsvolumen assoziiert ist.

Auf Chromosom 14 liegend, betrifft der SNP rs2355062 (-Log (P) 5.623) ein Intron des Genes KCNH5 (Potassium voltage-gated Channel Subfamily H Member 5), welches für eine Porus-bildende Untereinheit spannungsabhängiger Kaliumkanäle kodiert (113).

Der Polymorphismus rs4818738 (-Log(P) 5.053) liegt an der 46284110. Basenpaarstelle des 21. Chromosoms und somit auf einem Intron des Genes PTTG1IP (Pituitary Tumor-transforming 1 interacting Protein). Dieses befindet sich in räumlicher Nähe zu dem Gen ITGB2 (Integrin Beta 2), welches sich DNA-abwärts von Position 46305868 bis Basenpaarstelle 46330741 erstreckt.

Ergebnisse

Tabelle 6 Die 15 statistisch relevantesten SNPs ($-\log_{10}(P) > 5,0$), ausgewählte benachbarte Gene werden in Klammern angegeben, Abkürzungen: Chr, Chromosom; Beta (gibt die Effektstärke an, ein positives Beta zeigt einen positiven Zusammenhang zwischen dem selteneren Allel und einem größeren Läsionsvolumen an), Neg. logP, negativ dekadisch logarithmierter p-Wert, Alle Gene, Allele und Funktionen der SNPs wurden der SNPdb des NCBI und der UCSC entnommen. Die minor allele Frequenzen entsprechen den Angaben der ALFA Project-Datenbank für Europäer (L. Phan 2020, www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/docs/gsr/alfa/) (114)

SNP	Chr	Position	Gen	Funktion	Allele	MAF	BETA	-Log10(P)
rs12348024	9	9069573	PTPRD	Intron (11/16)	G>A	0.064	9.996	7.537
rs11636752	15	88899726	LOC1053 70959 (NTRK3)	Intron (2/2)	G>A	0.293	5.278	7.472
rs7583237	2	66079084	-	-	A>G	0.109	6.875	7.441
rs6546185	2	66074830	-	-	T>G	0.046	8.264	6.438
rs4392026	15	88891497	LOC1053 70959 (NTRK3)	Intron	G>C	0.15	5.196	6.327
rs17067747	13	78032193	LOC1249 03186 (SCEL, MYCBP2)	Intron	A>G	0.172	5.352	6.057
rs16983630	19	52745749	LOC1053 72449	Intron	T>C	0.027	7.284	5.905
rs2041001	7	10808309 9	NRCAM	Intron (1/30)	A/G/T> C	0.053	8.959	5.847
rs397977	19	56539240	NLRP5	Exon (7/15)	C>T	0.449	-4.015	5.805
rs1899416	15	88897349	LOC1053 70959 (NTRK)	Intron	T>C	0.35	4.4	5.667
rs2355062	14	63179771	KCNH5	Intron (10/10)	G>A	0.085	8.759	5.623
rs2129345	6	15369396 2	LOC1053 78066	Intron	C>A	0.253	4.335	5.258

Ergebnisse

SNP	Chr	Position	Gen	Funktion	Allele	MAF	BETA	-Log10(P)
rs12497706	3	2910734	CNTN4	Intron (8/20)	G>A	0.145	5.53	5.220
rs10491913	9	9906906	PTPRD	Intron (5/16)	C>G	0.14	5.245	5.123
rs4818738	21	46284110	PTTG1IP (ITGB2)	Intron (2/5)	T>C	0.089	7.022	5.053

5 Diskussion

Die große Bandbreite klinischer Präsentation, Verlaufsform und Therapieansprechen bei Patient/innen mit MS stellt weiterhin eine große Herausforderung dar, aus dem bestehenden Spektrum an Medikamenten zielgerichtet zu wählen. In Anbetracht nicht unerheblicher potenzieller Nebenwirkungen der zurzeit zur Verfügung stehenden Therapieoptionen sowie des Nutzens eines frühen Therapiebeginnes müssen Therapieform und Zeitpunkt individuell abgewogen werden. Trotz großer Fortschritte im Verständnis und der Therapie fehlt dennoch ein umfassendes Wissen zu den Faktoren der Behinderungszunahme und des Phänotyps. Für eine individuelle Risikostratifizierung bedarf es der Identifikation verlaufsspezifischer (epi-)genetischer und biologischer Merkmale, welche als prognostische und prädiktive Marker im frühen Krankheitsstadium den bereits eingetretenen Gewebsschaden und das individuelle Risiko eines schnellen Progresses einschätzen können. (46, 48) Bisherigen Studien gelang es, die der MS zugrunde liegende genetische Architektur genauer zu entschlüsseln, im Rahmen welcher eine Vielzahl an häufigen Genvarianten mit jeweils geringen Effektstärken im Sinne eines polygenetischen Modells zu der Krankheitsentstehung beitragen. Der Einsatz genomweiter Assoziationsstudien ermöglichte in den letzten Jahren die Identifikation zahlreicher Risikovarianten, welche den genetischen Beitrag zur Erkrankung bislang jedoch nicht gänzlich erklären können. Die Ergebnisse legen nahe, dass zwischen Polymorphismen differenziert werden muss, welche einen Einfluss auf das Risiko an MS zu erkranken ausüben, und solchen, welche mit einem schwereren Verlauf im Zusammenhang stehen. (115) Während bereits über 200 krankheitsverursachende Polymorphismen bekannt sind, konnten in verlaufsassozierten genomweiten Studien lediglich zwei SNPs ein genomweites Signifikanzniveau ($p < 1 \times 10^{-8}$) erreichen (64, 79, 80).

In dieser Arbeit untersuchten wir den Zusammenhang genetischer Polymorphismen und dem durch MRT ermittelten zerebralen Läsionsvolumen, welches wir als Parameter zur Abbildung des Krankheitsverlaufes der Patient/innen unserer Kohorte nutzten. Im Rahmen der durchgeführten GWAS untersuchten wir 485 038 SNPs bei 315 Patient/innen und konnten drei Polymorphismen identifizieren, welche genomweite Signifikanz erreichen, zwölf weitere SNPs verfügen über einen suggestiven Charakter.

Von besonderem Interesse ist hierbei das Gen PTPRD auf Chromosom 9, auf welchem zwei der detektierten Polymorphismen liegen (rs12348024 und rs10491913). Dieses kodiert für ein transmembranes Protein der Immunoglobulin-Superfamilie, einem überwiegend in Geweben des Gehirns exprimierten und unter anderem als neuronalen Zelladhäsionsmolekül fungierenden Protein. Darüber hinaus spielt es im Gehirn bei zahlreichen zellulären Prozessen eine zentrale Rolle, wie bei der Ausdifferenzierung von Neuronen, der Aussprossung von Neuriten und der Ausbildung exzitatorischer Synapsen (116). In genomweiten Assoziationsstudien konnte gezeigt werden, dass PTPRD möglicherweise im Zusammenhang mit Suchterkrankungen, neurofibrillärer Degeneration bei Alzheimer, Zwangsstörungen und dem Restless-Leg-Syndrom steht. Interessanterweise findet sich letzteres gehäuft bei MS-Patient/innen mit einer schwereren Beeinträchtigung. (117–120) Zusätzlich konnte eine veränderte PTPRD-Expression in Leukozyten bei Patient/innen mit rheumatoider Arthritis nachgewiesen werden, was in Übereinstimmung mit bisherigen Erkenntnissen auf einen gemeinsamen genetischen Hintergrund verschiedener autoimmuner Erkrankungen hinweist (121, 122). Auch in zahlreichen Tumorentitäten liegen Mutationen im PTPRD-Gen vor und nehmen Einfluss auf das Immunsystem, wobei eine verminderte oder erhöhte Gen-Expression mit einer veränderten Immunzellinvasion in das jeweilige Tumorgewebe einhergeht (123). Bezüglich eines Zusammenhanges mit MS bestätigen wir mit unserer Studie die Ergebnisse des IMSSC von 2011, welche erstmalig eine Assoziation von einem anderen auf PTPRD liegendem Polymorphismus und dem Krankheitsverlauf, charakterisiert durch den MSSS, beobachten konnten. Jokubaitis et al. konnten 2023 diesen Zusammenhang zwar nicht bestätigen ($p= 8.63E-01$), wiesen jedoch in ihrer Assoziationsstudie eine Korrelation zwischen PTPRD-AS2, einem gegenläufigen Transkript des Genes, und einem jüngeren Alter bei Erkrankung nach (82). Darüber hinaus interagiert PTPRD mit MTSS1, welches durch Jokubaitis et al. nach Geschlechtsstratifikation als statistisch signifikant im Zusammenhang mit einem schwereren Verlauf bei Frauen beschrieben wurde: In *in vitro* Studien zeigte sich eine Hochregulation der PTPRD-Expression in Anwesenheit von MTSS1 sowie eine verminderte Transkription bei niedrigen MTSS1-Leveln. (82, 124) Zusätzlich ist PTPRD maßgeblich an der Phosphorylierung von STAT3 (Signal Transducer and Activator of Transcription 3) und dessen Möglichkeit, im Zellkern Einfluss auf die Genexpression zu nehmen, beteiligt (125). Für STAT3 konnte bereits durch Jakkula et al. eine Assoziation mit der Entstehung von MS

beschrieben und durch Lill et al. repliziert werden (91, 126). Die Beteiligung von PTPRD an Prozessen der Axonausrichtung und Bildung exzitatorischer Synapsen entspricht der Beobachtung von Baranzini et al. und Matsushita et al., dass die mit dem Krankheitsverlauf assoziierten Polymorphismen in Signalweganalysen überwiegend Proteine betreffen, welche in neuronale Netzwerke der Signalübertragung und Glutamat-abhängige Transmittersysteme involvierte sind (69, 73).

Ebenfalls an der neuronalen Zelldifferenzierung und -entwicklung beteiligt ist NTRK3, ein membrangebundener Rezeptor in dessen Gen-Nähe wir einen statistisch signifikanten (rs11636752) und einen suggestiven (rs1899416) Polymorphismus nachweisen konnten. Das zu der Familie der Neurotrophischen Tyrosin Rezeptor Kinasen gehörige Protein wird überwiegend im Nerven- und Fettgewebe exprimiert. Es stellt einen wichtigen Bestandteil des MAP (mitogen activated Protein)-Kinaseweges dar, für welchen bei Überaktivierung in Mikrogliazellen lokoregionäre Prozesse der Demyelinisierung beobachtet werden konnten (127, 128). In diesen findet sich ebenfalls PTPRD involviert und interagiert mit anderen Proteinen der NTRK-Familie (123). NTRK3 selbst wurde bisher noch nicht als Risikovariante für einen schweren MS-Verlauf diskutiert, jedoch im Zusammenhang mit Bipolaren Störungen und zahlreichen Krebsentitäten, darunter dem Medulloblastom beschrieben (128, 129).

Weitere Polymorphismen, welche in unserer Studie keine genomweite Signifikanz erreichten, jedoch durch niedrige p-Werte auffielen zeigten ebenfalls eine überproportionale Lokalisierung auf Genen, welche in neuronale Prozesse involviert sind: Hervorzuheben ist ein SNP auf dem NRCAM-Gen auf Chromosom 7 (rs2041001). Dieses kodiert wie auch PTPRD für ein der Immunoglobulin-Superfamilie angehöriges neuronales Zelladhäsionsmolekül und ist sowohl in den gerichteten Wachstum von Axonen, die Ausbildung von Synapsen und Myelinscheiden als auch in Prozesse der Zell-Zell-Kommunikation involviert (130). NRCAM wird in der Literatur als möglicher Marker für ein Therapie-Monitoring bei Alzheimer diskutiert, sowie verstärkt bei Patient/innen mit Schizophrenie exprimiert (131, 132). Erhöhte Serumentiter des Proteins treten darüber hinaus im Rahmen der Antikörper-positiven Neuromyelitis Optica Spektrum Erkrankung auf, einer ebenfalls inflammatorisch demyelinisierenden Erkrankung des ZNS (133). Mit seinen axonausbildenden und pro-myelinisierenden

Funktionen entspricht dieses Zelladhäsionsmolekül der Gruppe regulatorischer Homöostase fördernder Proteine, welche Baranzini et al. als mit dem Läsionsvolumen assoziiert identifizieren konnten (69). Mit einigen dieser läsionsassoziierten Proteine interagiert NRCAM, so beispielsweise mit Neuroligin bei der Formierung glutamaterger Synapsen (134).

Um ein weiteres der Immunoglobulin-Superfamilie angehöriges neuronales Zelladhäsionsmolekül handelt es sich bei Contactin 4, dessen zugehöriges Gen betreffend wir einen weiteren Polymorphismus identifizieren konnten (rs12497706). Mit Erkrankungen wie Autismus, Schizophrenie und Alzheimer assoziiert, scheint Contactin 4 von Bedeutung für die neuronale Entwicklung, insbesondere der Neuritenausprossung und Bildung neuronaler Netzwerke zu sein (135). Sowohl in vitro als auch in vivo Studien konnten eine Dichteabnahme der dendritischen Fortsätze in Neuronen mit verminderter CNTN4-Expression nachweisen. In Übereinstimmung mit vorausgegangenen Signalweganalysen der verlaufsmodifizierenden Polymorphismen findet sich hierbei insbesondere eine Fehlregulation der Ausbildung glutamaterger Synapsen (73, 136). Veränderte Methylierungsmuster von CNTN4 in CD8+ T-Zellen bei Patient/innen mit MS wurden in der Literatur beschrieben (137), sowie eine starke Assoziation verschiedener auf CNTN4 liegender Polymorphismen und der Harnsäure-Konzentration im Serum, welche bei MS-Patient/innen häufig erniedrigt ist (138). Weitere Contactine wurden ebenfalls bereits im Zusammenhang mit MS diskutiert, so beispielsweise CNTN6 als mit dem Erkrankungsalter assoziiert und Contactin 1 als prognostischer Marker für eine schwerere Langzeitbehinderung bei MS-Patient/innen unter Natalizumab-Therapie (69, 139). Darüber hinaus konnten in einigen Patient/innen mit MS Autoantikörper gegen Contactin 2 nachgewiesen werden, welche im Tiermodell zu Schäden der grauen Substanz führen. Diese Beobachtungen fördern die Annahme, dass diese Gruppe der Zelladhäsionsmoleküle in die Immunpathogenese der Erkrankung involviert sein könnte. (140)

Genauer zu betrachten ist der Polymorphismus im Protein-kodierenden Bereich des Genes NLRP5, welcher auf einem Intron liegend negativ mit dem Läsionsvolumen assoziiert ist (rs397977). Als Mitglied der NOD (Nucleotide-binding Oligomerization Domain)-like Rezeptor(NLR)-Familie, der eine wichtige Rolle bei autoinflammatorischen Erkrankungen zugeschrieben wird, ist NLRP5 an der regulatorischen Antwort des angeborenen Immunsystems beteiligt. NLRP5 induziert

über die Aktivierung von Caspasen die Apoptose in geschädigten Neuronen und wird als mögliche therapeutische Zielstruktur bei neurodegenerativen Erkrankungen diskutiert. (141, 142) In Anbetracht erhöhter Caspase-Level in MS-assoziierten Läsionen wird von einem NLR-vermittelten proinflammatorischen Beitrag zur Pathogenese der MS ausgegangen (143, 144). Spezifisch NLRP5 betreffend deckt sich unsere Identifikation dieses Genes mit Ergebnissen genomweiter Exom-Sequenzierungen: Sadovnick et al. beschrieben 2017 fünf weitere Polymorphismen, welche zu Missense-Mutation des Genes führen und mit der Verlaufsschwere, Verlaufsform und dem Erkrankungsalter assoziiert sind (83). Interessanterweise weist ein auf demselben Exon gelegener Polymorphismus (rs471979), wie der durch uns erstmalig beschriebene SNP gegensätzlich zu unseren Beobachtungen eine positive Assoziation mit der Krankheitsschwere und der schwereren progredienten Verlaufsform auf. Eine Assoziation eines weiteren Proteins der NLRP-Subfamilie (NLRP11) mit der Verteilung und Form von Läsionen in der MRT bei Patient/innen mit MS konnte durch Gourraud et al. beobachtet werden, was die Vermutung bestärkt, dass Mitglieder dieser Proteingruppe an der Pathogenese der MS und hier explizit an der Entstehung von Läsionsherden beteiligt sind.

KCNH5 (rs2355062), ein auf Chromosom 14 liegendes und für eine Untereinheit spannungsabhängiger Kalium-Kanäle kodierendes Gen, wird in exzitatorischen Neuronen des Cortex und des Hippocampus exprimiert, wo es Einfluss auf die neuronale Erregbarkeit nimmt (145). Varianten dieses Gens wurden überwiegend im Zusammenhang mit Epilepsie, jedoch ebenfalls als einflussnehmend auf MS beschrieben. Eine Assoziation von einem anderen KCNH5-betreffenden Polymorphismus und dem Alter bei Erstdiagnose bei Patient/innen mit PPMS konnte durch Giacalone et al. festgestellt werden (72). KCNK5, ein weiteres Mitglied der Familie spannungsabhängiger Kalium-Kanäle, fand sich bei Signalweganalysen bei Baranzini et al. ebenfalls in Prozesse involviert, welche verstärkt mit dem Erkrankungsalter assoziiert waren (69). Auf KCNH7 konnten darüber hinaus mit der MS-Entstehung und weiteren Autoimmunerkrankungen assoziierte Polymorphismen identifiziert werden (146). Hinsichtlich unserer Fragestellung von Interesse konnte eine Transkriptom-Studien in Läsionen der weißen Substanz eine Hochregulation der KCNH5-Expression in Neuronen und Astrozyten nachweisen, sodass dieser Untereinheit bei MS eine funktionelle Rolle über eine Einflussnahme auf die Erregbarkeit geschädigter Neurone zugeschrieben wird (147). Bildmorphologisch

zeigten sich bei Patient/innen mit Mutationen auf dem KCNH5-Gen, welche unter kognitiven Entwicklungsstörungen und Epilepsie litten, diverse Auffälligkeiten, darunter periventrikuläre Läsionen und kortikale Atrophie (145).

ITGB2 auf Chromosom 21, auch bekannt als CD18 und mac-1, in dessen Nähe ein weiterer SNP liegt (rs4818738), kodiert für eine beta-Untereinheit des bei der Immunantwort eine wichtige Rolle spielenden Integrins 2. Dieses wird von CD8+-Zellen exprimiert und ist zusammen mit weiteren Oberflächenproteinen maßgeblich an der Migration der Entzündungszellen über die Blut-Hirnschranke und T-Zell-Aktivierung beteiligt. Eine erhöhte ITGB2-Expression in isolierten T-Zellen konnte bei Patient/innen mit RRMS nachgewiesen werden. Hierbei lag eine Korrelation mit dem EDSS vor, sodass ITGB2 als möglicher prognostischer Biomarker diskutiert werden kann (148). In experimentellen Studien an Makaken konnte nachgewiesen werden, dass der Einsatz gegen diese und weitere Integrin-Untereinheiten gerichteter Antikörper Immunzell-vermittelt zu einem verlangsamten Fortschreiten demyelinisierender Erkrankungen führt und in der MRT nachweisbare Inflamationsprozesse in Läsionen der weißen Substanz reduziert (149). Eine Korrelation von dem in unserer Studie identifiziertem SNP und einem erhöhten Läsionsvolumen wäre durch einen funktionellen Zugewinn des Proteins durch den Polymorphismus oder eine verstärkte Expression zu erklären, wobei der Mechanismus ungeklärt bleibt. Der effektive Einsatz des Immunmodulators Natalizumab, welcher sich gegen VLA-4, einem Integrin-Dimer aus einer alpha-4- und beta-1-Untereinheit richtet, zeigt, dass Integrine als mögliche Zielstruktur bei der Therapie eine maßgebliche Rolle bei der Krankheitsentstehung spielen (150). Weitere für Integrin-Untereinheiten kodierende Gene konnten in der verlaufsassozierten Genomanalyse von MS-Patient/innen von Giacalone et al. in einer Signalweganalyse Protein-Netzwerken zugeordnet werden, welche sich als mit dem Erkrankungsalter (ITGB7) und der Verlaufsschwere gemessen anhand des MSSS (ITGB3) assoziiert erwiesen (72).

Insgesamt konnten wir zahlreiche genetische Varianten identifizieren, welche potentiell mit dem zerebralen Läsionsvolumen bei Patient/innen mit MS assoziiert sind. Vier der betroffenen Gene, PTPRD, CNTN4, NLRP5 und KCNH5 wurden bereits im Rahmen genomweiter Assoziations- und Transkriptionsstudien der letzten Jahre als assoziiert mit verschiedenen Parametern der Verlaufsschwere und -form beschrieben.

Besonders hervorzuheben ist hierbei der PTPRD-betreffende Polymorphismus, welcher genomweite Signifikanz erreichen konnte und somit die Beobachtung der großangelegten GWAS des IMSSC aus dem Jahre 2011 in unserer unabhängigen Kohorte bestätigt. Entgegen einigen Beobachtungen konnten wir keinen signifikanten Zusammenhang von Polymorphismen des MHC-Komplexes und dem zerebralen Läsionsvolumen beobachten. Auch ließen sich die zwei Polymorphismen auf den Genen LRP2 und WNTB9 nicht replizieren, bei welchen es sich um die einzigen genomweite Signifikanz erreichenden Risikovarianten aller bisherigen verlaufsassozierten Genomstudien handelt. Wohl aber ließ sich die Wichtigkeit weiterer an der Axonausrichtung beteiligten Proteine bestätigen. An GWAS angeschlossene Signalweganalysen der letzten Jahre konnten verlaufsassozierte Risikogene überwiegend neuronalen Prozessen der Axonaussprossung und der Calcium-abhängigen und Glutamat-vermittelten Signalübertragung zuordnen. Dieser Beobachtung entsprechen die durch unsere Studie identifizierten und diskutierten Gene, welche überwiegend an neuronaler Ausdifferenzierung und Plastizität, sowie exzitatorischer Synapsenbildung und Zell-Kommunikation beteiligt sind. Beobachtete Effekte einer erhöhten Läsionslast bei Risikoallel-Träger/innen könnten somit auf eine erhöhte Vulnerabilität der zerebralen Nervenzellen mangels neuronaler Plastizität und Reorganisation zurückzuführen sein, welche in einem erhöhten Gewebeschaden resultieren. Unsere Ergebnisse decken sich darüber hinaus mit den Beobachtungen der letzten Jahre, dass das Risiko an MS zu erkranken und das Risiko einen schweren Krankheitsverlauf zu erleiden, auf unterschiedliche genetische Varianten zurückzuführen ist, da die im Rahmen unserer Studie diskutierten Gene keine Schnittmenge mit bereits bekannten krankheitsverursachenden Genen aufweisen. Als ebenfalls übereinstimmend mit der bisherigen Forschungslage erweist sich die geringe Effektstärke der assoziierten Polymorphismen und die Beteiligung der identifizierten Gene an weiteren autoimmun-vermittelten und neurodegenerativen Erkrankungen.

Mit der Identifikation dreier genomweite Signifikanz erreichenden Polymorphismen konnten wir das Spektrum bisher bekannter verlaufsassoziierter Risikogene erweitern. Darüber hinaus konnten wir mit unserer Arbeit bisherige Erkenntnisse zur genetischen Architektur der MS bestätigen, sowie weitere suggestive Risikogene identifizieren und somit zu einem vertieften Verständnis der an der Krankheitsprogredienz beteiligten Mechanismen beitragen.

Stärken unserer Studie lagen dabei in der gut charakterisierten und homogenen Kohorte, in welche keine Patient/innen mit einem primär progredienten Verlauf oder nicht-europäischer Abstammung eingeschlossen wurden. Um den Einfluss genetischer Varianten auf das zerebrale Läsionsvolumen frei von weiteren Einflussfaktoren bestimmen und bewerten zu können, erhoben wir von allen Patient/innen zusätzlich demographische und klinische Daten und berücksichtigten diese im Rahmen der Regressionsanalyse. Unsere Kohorte entsprach hierbei bezüglich der Geschlechterverteilung sowie des Ersterkrankungsalters den in der Literatur beschriebenen Daten. Wie zu erwarten war, zeigte sich neben genetischen Varianten ein signifikanter Einfluss von Geschlecht und Verlaufsform auf das Läsionsvolumen, wobei Männer und Patient/innen mit einer sekundär-progredienten Verlaufsform eine höhere Läsionslast aufwiesen. Diese korrelierte darüber hinaus signifikant mit dem Behinderungsgrad, was unsere auf aktuellen Forschungskennnissen basierende Annahme bestätigte, dass eine fortgeschrittene Schädigung der Gehirnsubstanz mit einem schwerer beeinträchtigenden Krankheitsverlauf einhergeht. Das mittels MRT bestimmte Läsionsvolumen stellt hierbei einen Marker dar, welcher, im Gegensatz zum EDSS und dem auf diesem basierenden MSSS, durch ein standardisiertes MRT-Protokoll und die automatisierte Segmentierung nicht Untersucher-abhängig ist. Zudem handelt es sich um einen robusten Marker, der den im Krankheitsverlauf akkumulierten Gewebsschaden widerspiegelt und dabei von intermittierenden Schubereignissen unbeeinflusst bleibt. Um die Läsionslast zu beschreiben, wählten wir hierbei gegensätzlich zu zahlreichen Studien, welche die Anzahl der Läsionen beschrieben, das Volumen, um die tatsächliche Schädigung der grauen und weißen Substanz besser abbilden zu können.

Es bleibt zu beachten, dass wir in unserer Studie ausschließlich das zerebrale Läsionsvolumen betrachteten. Genetische Zusammenhänge mit möglichen Läsionen des Rückenmarks, welchen ebenfalls eine klinische und prognostische Relevanz zukommt, wurden dementsprechend nicht miteinbezogen. Da es sich um kein longitudinales Studiendesign handelt, bildet unsere Studie nur die Läsionslast zu einem diagnosenahen Zeitpunkt, nicht aber im Verlauf ab. Zudem befragten wir die Patient/innen nicht zu zusätzlichen Umweltfaktoren, wie Rauchen oder Vitamin D-Spiegel, sodass eine Einflussnahme über zusätzliche patientenbezogene und umweltbedingte Faktoren auf das Läsionsvolumen und den Behinderungsprogress nicht ausgeschlossen werden kann. Bezüglich der genetischen Varianten

konzentrierten wir uns auf den Beitrag der genomischen DNA, wobei in Übereinstimmung bisheriger GWAS überwiegend nicht-codierende Genabschnitte betroffen waren. Weiterführende Studien zu den molekularen Mechanismen nicht-codierender Polymorphismen sowie der Rolle der mitochondrialen und epigenetischen Einflussfaktoren wären wünschenswert.

In Anbetracht des kleinen Patientenkollektives und einer fehlenden Replikation der Ergebnisse in einer unabhängigen Kohorte muss der explorative Charakter unserer Studie betont und die statistische Signifikanz unserer Ergebnisse als statistische Relevanz gewertet werden. Durch die fehlende statistische Power und das Wissen um die polygenetische Architektur der Erkrankung ist nicht auszuschließen, dass Risikovarianten mit geringen Effektstärken hierbei unentdeckt blieben. Weitere Studien werden nötig sein, um die Ergebnisse unserer Studie in einer großen und unabhängigen Kohorte durch Replikation zu validieren und die Interaktion der diskutierten Gene in ihren funktionellen Netzwerken genauer zu entschlüsseln.

6 Zusammenfassung

Wir führten in Rahmen unserer Arbeit eine genomweite Assoziationsstudie durch und untersuchten explorativ den Beitrag genetischer Varianten zu dem mittels MRT nachgewiesenen zerebralen Läsionsvolumen bei Patient/innen mit Multipler Sklerose. Dabei konnten wir als wesentliche Ergebnisse zeigen, dass drei der genomweit untersuchten Polymorphismen signifikant mit einem erhöhten zerebralen Läsionsvolumen einhergehen und konnten somit das bekannte Spektrum der verlaufsassozierten genetischen Varianten erweitern. Von diesen ist als besonders vielversprechend das für ein neuronales Zelladhäsionsmolekül kodierende Gen PTPRD hervorzuheben. Darüber hinaus konnten wir nachweisen, dass die identifizierten Gene größtenteils keine Schnittmenge mit bekannten MS-verursachenden, wohl aber teilweise mit verlaufsassozierten Genen aufwiesen und bereits im Zusammenhang anderer autoimmuner und neurodegenerativer Erkrankungen diskutiert werden. Mit unserer Beobachtung, dass alle weiteren potenziell assoziierten Polymorphismen auf Genen liegen, welche überwiegend in neuronale Prozesse der Axonausrichtung, der Formierung exzitatorischer Synapsen und des Calcium-Haushaltes involviert sind, konnten wir die Vermutung früherer Arbeiten bestätigen, dass verlaufsassozierte Gene Signalwegen der neuronalen Netzwerkbildung und Homöostase-Förderung zugeordnet werden können.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass wir in unserer Studie zahlreiche neue Anhaltspunkte für weitere Forschung an verlaufsassozierten Risikogenen identifizieren konnten. Die hier präsentierten Ergebnisse heben die Rolle der Neurodegeneration bei der Läsionsentstehung im Rahmen der Multiplen Sklerose hervor, welche unter dem genetischen Einfluss zahlreicher Risikovarianten zu stehen scheint, und sich in Form neurologischer Ausfälle bezüglich der Verlaufsschwere und Verlaufsform klinisch heterogen manifestiert.

Weitere Studien werden nötig sein, um die erbrachten Ergebnisse in größeren Kohorten durch Replikation zu validieren und um die unseren Beobachtungen zugrundeliegenden molekularen Mechanismen besser zu verstehen. Das vertiefte Wissen um weitere verlaufsassozierte Polymorphismen kann somit zu einem verbesserten Verständnis der Multiplen Sklerose beitragen und langfristig neue Ansätze für eine frühe Verlaufsabschätzung sowie adaptierte Therapie liefern.

7 Literatur

1. Brownlee WJ, Hardy TA, Fazekas F, Miller DH. Diagnosis of multiple sclerosis: progress and challenges. *The Lancet* 2017; 389(10076):1336–46. doi: 10.1016/S0140-6736(16)30959-X.
2. Walton C, King R, Rechtman L, Kaye W, Leray E, Marrie RA et al. Rising prevalence of multiple sclerosis worldwide: Insights from the Atlas of MS, third edition. *Mult Scler* 2020; 26(14):1816–21. doi: 10.1177/1352458520970841.
3. Cotsapas C, Mitrovic M, Hafler D. Multiple sclerosis. *Handb Clin Neurol* 2018; 148:723–30. doi: 10.1016/B978-0-444-64076-5.00046-6.
4. Filippi M, Rocca MA, Ciccarelli O, Stefano N de, Evangelou N, Kappos L et al. MRI criteria for the diagnosis of multiple sclerosis: MAGNIMS consensus guidelines. *The Lancet Neurology* 2016; 15(3):292–303. doi: 10.1016/S1474-4422(15)00393-2.
5. Chung KK, Altmann D, Barkhof F, Miszkiel K, Brex PA, O’Riordan J et al. A 30-Year Clinical and Magnetic Resonance Imaging Observational Study of Multiple Sclerosis and Clinically Isolated Syndromes. *Ann Neurol* 2020; 87(1):63–74. doi: 10.1002/ana.25637.
6. Tintore M, Arrambide G, Otero-Romero S, Carbonell-Mirabent P, Río J, Tur C et al. The long-term outcomes of CIS patients in the Barcelona inception cohort: Looking back to recognize aggressive MS. *Mult Scler* 2020; 26(13):1658–69. doi: 10.1177/1352458519877810.
7. Canto E, Oksenberg JR. Multiple sclerosis genetics. *Mult Scler* 2018; 24(1):75–9. doi: 10.1177/1352458517737371.
8. Patsopoulos NA. Genetics of Multiple Sclerosis: An Overview and New Directions. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2018; 8(7). doi: 10.1101/cshperspect.a028951.
9. Browne P, Chandraratna D, Angood C, Tremlett H, Baker C, Taylor BV et al. Atlas of Multiple Sclerosis 2013: A growing global problem with widespread inequity. *Neurology* 2014; 83(11):1022–4. doi: 10.1212/WNL.0000000000000768.
10. Oh J, Vidal-Jordana A, Montalban X. Multiple sclerosis: clinical aspects. *Curr Opin Neurol* 2018; 31(6):752–9. doi: 10.1097/WCO.0000000000000622.

11. Eskandarieh S, Heydarpour P, Minagar A, Pourmand S, Sahraian MA. Multiple Sclerosis Epidemiology in East Asia, South East Asia and South Asia: A Systematic Review. *Neuroepidemiology* 2016; 46(3):209–21. doi: 10.1159/000444019.
12. Hammond SR, English DR, McLeod JG. The age-range of risk of developing multiple sclerosis: evidence from a migrant population in Australia. *Brain* 2000; 123 (Pt 5):968–74. doi: 10.1093/brain/123.5.968.
13. Dean G, Kurtzke JF. On the risk of multiple sclerosis according to age at immigration to South Africa. *Br Med J* 1971; 3(5777):725–9. doi: 10.1136/bmj.3.5777.725.
14. McKay KA, Kwan V, Duggan T, Tremlett H. Risk factors associated with the onset of relapsing-remitting and primary progressive multiple sclerosis: a systematic review. *BioMed Research International* 2015; 2015:817238. doi: 10.1155/2015/817238.
15. Kamińska J, Koper OM, Piechal K, Kemonia H. Multiple sclerosis - etiology and diagnostic potential. *Postepy Hig Med Dosw (Online)* 2017; 71(0):551–63. doi: 10.5604/01.3001.0010.3836.
16. Hansen T, Skytthe A, Stenager E, Petersen HC, Brønnum-Hansen H, Kyvik KO. Concordance for multiple sclerosis in Danish twins: an update of a nationwide study. *Mult Scler* 2005; 11(5):504–10. doi: 10.1191/1352458505ms1220oa.
17. Kuusisto H, Kaprio J, Kinnunen E, Luukkaala T, Koskenvuo M, Elovaara I. Concordance and heritability of multiple sclerosis in Finland: study on a nationwide series of twins. *Eur J Neurol* 2008; 15(10):1106–10. doi: 10.1111/j.1468-1331.2008.02262.x.
18. Willer CJ, Dyment DA, Risch NJ, Sadovnick AD, Ebers GC. Twin concordance and sibling recurrence rates in multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100(22):12877–82. doi: 10.1073/pnas.1932604100.
19. Robertson NP, Fraser M, Deans J, Clayton D, Walker N, Compston DA. Age-adjusted recurrence risks for relatives of patients with multiple sclerosis. *Brain* 1996; 119 (Pt 2):449–55. doi: 10.1093/brain/119.2.449.

20. Hollenbach JA, Oksenberg JR. The immunogenetics of multiple sclerosis: A comprehensive review. *J Autoimmun* 2015; 64:13–25. doi: 10.1016/j.jaut.2015.06.010.
21. Haines JL, Terwedow HA, Burgess K, Pericak-Vance MA, Rimmler JB, Martin ER et al. Linkage of the MHC to familial multiple sclerosis suggests genetic heterogeneity. The Multiple Sclerosis Genetics Group. *Hum Mol Genet* 1998; 7(8):1229–34. doi: 10.1093/hmg/7.8.1229.
22. Patsopoulos NA, Barcellos LF, Hintzen RQ, Schaefer C, van Duijn CM, Noble JA et al. Fine-mapping the genetic association of the major histocompatibility complex in multiple sclerosis: HLA and non-HLA effects. *PLoS Genet* 2013; 9(11):e1003926. doi: 10.1371/journal.pgen.1003926.
23. Olsson T, Barcellos LF, Alfredsson L. Interactions between genetic, lifestyle and environmental risk factors for multiple sclerosis. *Nat Rev Neurol* 2017; 13(1):25–36. doi: 10.1038/nrneurol.2016.187.
24. Handel AE, Williamson AJ, Disanto G, Handunnetthi L, Giovannoni G, Ramagopalan SV. An updated meta-analysis of risk of multiple sclerosis following infectious mononucleosis. *PLoS One* 2010; 5(9). doi: 10.1371/journal.pone.0012496.
25. Bjernevik K, Cortese M, Healy BC, Kuhle J, Mina MJ, Leng Y et al. Longitudinal analysis reveals high prevalence of Epstein-Barr virus associated with multiple sclerosis. *Science* 2022; 375(6578):296–301. doi: 10.1126/science.abj8222.
26. Sundqvist E, Bergström T, Daialhosein H, Nyström M, Sundström P, Hillert J et al. Cytomegalovirus seropositivity is negatively associated with multiple sclerosis. *Mult Scler* 2014; 20(2):165–73. doi: 10.1177/1352458513494489.
27. Hemmer B, Kerschensteiner M, Korn T. Role of the innate and adaptive immune responses in the course of multiple sclerosis. *The Lancet Neurology* 2015; 14(4):406–19. doi: 10.1016/S1474-4422(14)70305-9.
28. Hemmer B, Archelos JJ, Hartung H-P. New concepts in the immunopathogenesis of multiple sclerosis. *Nat Rev Neurosci* 2002; 3(4):291–301. doi: 10.1038/nrn784.
29. Rodríguez Murúa S, Farez MF, Quintana FJ. The Immune Response in Multiple Sclerosis. *Annu Rev Pathol* 2022; 17:121–39. doi: 10.1146/annurev-pathol-052920-040318.

30. Friese MA, Schattling B, Fugger L. Mechanisms of neurodegeneration and axonal dysfunction in multiple sclerosis. *Nat Rev Neurol* 2014; 10(4):225–38. doi: 10.1038/nrneurol.2014.37.
31. Popescu BFG, Lucchinetti CF. Pathology of demyelinating diseases. *Annu Rev Pathol* 2012; 7:185–217. doi: 10.1146/annurev-pathol-011811-132443.
32. Mallucci G, Peruzzotti-Jametti L, Bernstock JD, Pluchino S. The role of immune cells, glia and neurons in white and gray matter pathology in multiple sclerosis. *Prog Neurobiol* 2015; 127-128:1–22. doi: 10.1016/j.pneurobio.2015.02.003.
33. Compston A, Coles A. Multiple sclerosis. *The Lancet* 2002; 359(9313):1221–31. doi: 10.1016/S0140-6736(02)08220-X.
34. Di Filippo M, Portaccio E, Mancini A, Calabresi P. Multiple sclerosis and cognition: synaptic failure and network dysfunction. *Nat Rev Neurosci* 2018; 19(10):599–609. doi: 10.1038/s41583-018-0053-9.
35. Lublin FD, Reingold SC. Defining the clinical course of multiple sclerosis: results of an international survey. National Multiple Sclerosis Society (USA) Advisory Committee on Clinical Trials of New Agents in Multiple Sclerosis. *Neurology* 1996; 46(4):907–11. doi: 10.1212/WNL.46.4.907.
36. Lublin FD, Reingold SC, Cohen JA, Cutter GR, Sørensen PS, Thompson AJ et al. Defining the clinical course of multiple sclerosis: the 2013 revisions. *Neurology* 2014; 83(3):278–86. doi: 10.1212/WNL.0000000000000560.
37. Fisniku LK, Brex PA, Altmann DR, Miszkiel KA, Benton CE, Lanyon R et al. Disability and T2 MRI lesions: a 20-year follow-up of patients with relapse onset of multiple sclerosis. *Brain* 2008; 131(Pt 3):808–17. doi: 10.1093/brain/awm329.
38. Offenbacher H, Fazekas F, Schmidt R, Freidl W, Flooh E, Payer F et al. Assessment of MRI criteria for a diagnosis of MS. *Neurology* 1993; 43(5):905–9. doi: 10.1212/wnl.43.5.905.
39. Fazekas F, Barkhof F, Filippi M, Grossman RI, Li DK, McDonald WI et al. The contribution of magnetic resonance imaging to the diagnosis of multiple sclerosis. *Neurology* 1999; 53(3):448–56. doi: 10.1212/wnl.53.3.448.
40. Filippi M, Preziosa P, Banwell BL, Barkhof F, Ciccarelli O, Stefano N de et al. Assessment of lesions on magnetic resonance imaging in multiple sclerosis: practical guidelines. *Brain* 2019; 142(7):1858–75. doi: 10.1093/brain/awz144.

41. Chard DT, Griffin CM, Parker GJM, Kapoor R, Thompson AJ, Miller DH. Brain atrophy in clinically early relapsing-remitting multiple sclerosis. *Brain* 2002; 125(Pt 2):327–37. doi: 10.1093/brain/awf025.
42. Thompson AJ, Banwell BL, Barkhof F, Carroll WM, Coetzee T, Comi G et al. Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria. *The Lancet Neurology* 2018; 17(2):162–73. doi: 10.1016/S1474-4422(17)30470-2.
43. Wattjes MP, Rovira À, Miller D, Yousry TA, Sormani MP, Stefano MP de et al. Evidence-based guidelines: MAGNIMS consensus guidelines on the use of MRI in multiple sclerosis--establishing disease prognosis and monitoring patients. *Nat Rev Neurol* 2015; 11(10):597–606. doi: 10.1038/nrneurol.2015.157.
44. Kurtzke JF. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). *Neurology* 1983; 33(11):1444–52. doi: 10.1212/wnl.33.11.1444.
45. Hemmer Bea. Diagnose und Therapie der Multiplen Sklerose, Neuromyelitis-optica-Spektrum-Erkrankungen und MOG-IgG-assoziierten Erkrankungen: S2k-Leitlinie; 2021. Verfügbar unter: www.dgn.org/leitlinien (abgerufen am 20.10.2021).
46. Gafson A, Craner MJ, Matthews PM. Personalised medicine for multiple sclerosis care. *Mult Scler* 2017; 23(3):362–9. doi: 10.1177/1352458516672017.
47. van Wijmeersch B, Hartung H-P, Vermersch P, Pugliatti M, Pozzilli C, Grigoriadis N et al. Using personalized prognosis in the treatment of relapsing multiple sclerosis: A practical guide. *Front Immunol* 2022; 13:991291. doi: 10.3389/fimmu.2022.991291.
48. Giovannoni G, Butzkueven H, Dhib-Jalbut S, Hobart J, Kobelt G, Pepper G et al. Brain health: time matters in multiple sclerosis. *Mult Scler Relat Disord* 2016; 9 Suppl 1:S5-S48. doi: 10.1016/j.msard.2016.07.003.
49. Bergamaschi R. Prognosis of multiple sclerosis: clinical factors predicting the late evolution for an early treatment decision. *Expert Rev Neurother* 2006; 6(3):357–64. doi: 10.1586/14737175.6.3.357.
50. Tintore M, Rovira À, Río J, Otero-Romero S, Arrambide G, Tur C et al. Defining high, medium and low impact prognostic factors for developing multiple sclerosis. *Brain* 2015; 138(Pt 7):1863–74. doi: 10.1093/brain/awv105.

51. Mey GM, Mahajan KR, DeSilva TM. Neurodegeneration in multiple sclerosis. *WIREs Mech Dis* 2022; 15(1). doi: 10.1002/wsbm.1583.
52. Esposito F, Sorosina M, Ottoboni L, Lim ET, Replogle JM, Raj T et al. A pharmacogenetic study implicates SLC9a9 in multiple sclerosis disease activity. *Ann Neurol* 2015; 78(1):115–27. doi: 10.1002/ana.24429.
53. Kim JH. *Genome Data Analysis*. Singapore: Springer Singapore; 2019.
54. Shastry BS. SNPs: impact on gene function and phenotype. *Methods Mol Biol* 2009; 578:3–22. doi: 10.1007/978-1-60327-411-1_1.
55. Visscher PM, Wray NR, Zhang Q, Sklar P, McCarthy MI, Brown MA et al. 10 Years of GWAS Discovery: Biology, Function, and Translation. *Am J Hum Genet* 2017; 101(1):5–22. doi: 10.1016/j.ajhg.2017.06.005.
56. Knutson KA, Pan W. Integrating brain imaging endophenotypes with GWAS for Alzheimer’s disease. *Quant Biol* 2020. doi: 10.1007/s40484-020-0202-9.
57. Lill CM, Roehr JT, McQueen MB, Bagade S, Schjeide BM, Zipp F, Bertram L. The MSGene Database. *Alzheimer Research Forum*. Verfügbar unter: Available at <http://www.msgene.org/>. Accessed on 05.10.2021.
58. Bertrams J, Kuwert E, Liedtke U. HL-A antigens and multiple sclerosis. *Tissue Antigens* 1972; 2(5):405–8. doi: 10.1111/j.1399-0039.1972.tb00060.x.
59. Naito S, Namerow N, Mickey MR, Terasaki PI. Multiple sclerosis: association with HL-A3. *Tissue Antigens* 1972; 2(1):1–4. doi: 10.1111/j.1399-0039.1972.tb00111.x.
60. Barcellos LF, Oksenberg JR, Green AJ, Bucher P, Rimmler JB, Schmidt S et al. Genetic basis for clinical expression in multiple sclerosis. *Brain* 2002; 125(Pt 1):150–8. doi: 10.1093/brain/awf009.
61. Reich DE, Lander ES. On the allelic spectrum of human disease. *Trends in Genetics* 2001; 17(9):502–10. doi: 10.1016/s0168-9525(01)02410-6.
62. Hafler DA, Compston A, Sawcer S, Lander ES, Daly MJ, Jager PL de et al. Risk alleles for multiple sclerosis identified by a genomewide study. *N Engl J Med* 2007; 357(9):851–62. doi: 10.1056/NEJMoa073493.
63. Cotsapas C, Mitrovic M. Genome-wide association studies of multiple sclerosis. *Clin Transl Immunology* 2018; 7(6):e1018. doi: 10.1002/cti2.1018.

64. Multiple sclerosis genomic map implicates peripheral immune cells and microglia in susceptibility. *Science* 2019; 365(6460). doi: 10.1126/science.aav7188.
65. Kim W, Patsopoulos NA. Genetics and functional genomics of multiple sclerosis. *Semin Immunopathol* 2022; 44(1):63–79. doi: 10.1007/s00281-021-00907-3.
66. Patsopoulos NA, Baranzini SE, Santaniello A, Shoostari P, Cotsapas C, Wong G et al. The Multiple Sclerosis Genomic Map: Role of peripheral immune cells and resident microglia in susceptibility; 2017.
67. Damotte V, Guillot-Noel L, Patsopoulos NA, Madireddy L, El Behi M, Jager PL de et al. A gene pathway analysis highlights the role of cellular adhesion molecules in multiple sclerosis susceptibility. *Genes Immun* 2014; 15(2):126–32. doi: 10.1038/gene.2013.70.
68. Jokubaitis VG, Butzkueven H. A genetic basis for multiple sclerosis severity: Red herring or real? *Mol Cell Probes* 2016; 30(6):357–65. doi: 10.1016/j.mcp.2016.08.007.
69. Baranzini SE, Wang J, Gibson RA, Galwey N, Naegelin Y, Barkhof F et al. Genome-wide association analysis of susceptibility and clinical phenotype in multiple sclerosis. *Hum Mol Genet* 2009; 18(4):767–78. doi: 10.1093/hmg/ddn388.
70. Brynedal B, Wojcik J, Esposito F, Debailleul V, Yaouanq J, Martinelli-Boneschi F et al. MGAT5 alters the severity of multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 2010; 220(1-2):120–4. doi: 10.1016/j.jneuroim.2010.01.003.
71. Genome-wide association study of severity in multiple sclerosis. *Genes Immun* 2011; 12(8):615–25. doi: 10.1038/gene.2011.34.
72. Giacalone G, Clarelli F, Osiceanu AM, Guaschino C, Brambilla P, Sorosina M et al. Analysis of genes, pathways and networks involved in disease severity and age at onset in primary-progressive multiple sclerosis. *Mult Scler* 2015; 21(11):1431–42. doi: 10.1177/1352458514564590.
73. Matsushita T, Madireddy L, Sprenger T, Khankhanian P, Magon S, Naegelin Y et al. Genetic associations with brain cortical thickness in multiple sclerosis. *Genes Brain Behav* 2015; 14(2):217–27. doi: 10.1111/gbb.12190.
74. Pan G, Simpson S, van der Mei I, Charlesworth JC, Lucas R, Ponsonby A-L et al. Role of genetic susceptibility variants in predicting clinical course in multiple

- sclerosis: a cohort study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2016; 87(11):1204–11. doi: 10.1136/jnnp-2016-313722.
75. Elvsåshagen T, Bahrami S, van der Meer D, Agartz I, Alnæs D, Barch DM et al. The genetic architecture of human brainstem structures and their involvement in common brain disorders. *Nat Commun* 2020; 11(1):4016. doi: 10.1038/s41467-020-17376-1.
76. Gourraud P-A, Sdika M, Khankhanian P, Henry RG, Beheshtian A, Matthews PM et al. A genome-wide association study of brain lesion distribution in multiple sclerosis. *Brain* 2013; 136(Pt 4):1012–24. doi: 10.1093/brain/aws363.
77. Okuda DT, Srinivasan R, Oksenberg JR, Goodin DS, Baranzini SE, Beheshtian A et al. Genotype-Phenotype correlations in multiple sclerosis: HLA genes influence disease severity inferred by 1HMR spectroscopy and MRI measures. *Brain* 2009; 132(Pt 1):250–9. doi: 10.1093/brain/awn301.
78. Lysandropoulos AP, Mavroudakis N, Pandolfo M, El Hafsi K, van Hecke W, Maertens A et al. HLA genotype as a marker of multiple sclerosis prognosis: A pilot study. *J Neurol Sci* 2017; 375:348–54. doi: 10.1016/j.jns.2017.02.019.
79. Zhou Y, Graves JS, Simpson S, Charlesworth JC, van der Mei I, Waubant E et al. Genetic variation in the gene LRP2 increases relapse risk in multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2017; 88(10):864–8. doi: 10.1136/jnnp-2017-315971.
80. Vandebergh M, Andlauer TFM, Zhou Y, Mallants K, Held F, Aly L et al. Genetic Variation in WNT9B Increases Relapse Hazard in Multiple Sclerosis. *Ann Neurol* 2021; 89(5):884–94. doi: 10.1002/ana.26061.
81. Graves JS, Barcellos LF, Simpson S, Belman A, Lin R, Taylor BV et al. The multiple sclerosis risk allele within the AHI1 gene is associated with relapses in children and adults. *Mult Scler Relat Disord* 2018; 19:161–5. doi: 10.1016/j.msard.2017.10.008.
82. Jokubaitis VG, Campagna MP, Ibrahim O, Stankovich J, Kleinova P, Matesanz F et al. Not all roads lead to the immune system: the genetic basis of multiple sclerosis severity. *Brain* 2023; 146(6):2316–31. doi: 10.1093/brain/awac449.

83. Sadovnick AD, Traboulsee AL, Zhao Y, Bernales CQ, Encarnacion M, Ross JP et al. Genetic modifiers of multiple sclerosis progression, severity and onset. *Clin Immunol* 2017; 180:100–5. doi: 10.1016/j.clim.2017.05.009.
84. Guerini FR, Agliardi C, Bolognesi E, Zanzottera M, Caputo D, Pasanisi MB et al. Two Single Nucleotide Polymorphisms in the Purinergic Receptor P2X7 Gene Are Associated with Disease Severity in Multiple Sclerosis. *Int J Mol Sci* 2022; 23(23). doi: 10.3390/ijms232315381.
85. Törnell A, Kiffin R, Haghighi S, Mossberg N, Andersen O, Hellstrand K et al. Impact of CYBA genotypes on severity and progression of multiple sclerosis. *Eur J Neurol* 2022; 29(5):1457–64. doi: 10.1111/ene.15259.
86. Kular L, Needhamsen M, Adzemovic MZ, Kramarova T, Gomez-Cabrero D, Ewing E et al. Neuronal methylome reveals CREB-associated neuro-axonal impairment in multiple sclerosis. *Clin Epigenetics* 2019; 11(1):86. doi: 10.1186/s13148-019-0678-1.
87. Kular L, Jagodic M. Epigenetic insights into multiple sclerosis disease progression. *J Intern Med* 2020; 288(1):82–102. doi: 10.1111/joim.13045.
88. Comabella M, Craig DW, Camiña-Tato M, Morcillo C, Lopez C, Navarro A et al. Identification of a novel risk locus for multiple sclerosis at 13q31.3 by a pooled genome-wide scan of 500,000 single nucleotide polymorphisms. *PLoS One* 2008; 3(10):e3490. doi: 10.1371/journal.pone.0003490.
89. Genome-wide association study identifies new multiple sclerosis susceptibility loci on chromosomes 12 and 20. *Nat Genet* 2009; 41(7):824–8. doi: 10.1038/ng.396.
90. Jager PL de, Jia X, Wang J, Bakker PIW de, Ottoboni L, Aggarwal NT et al. Meta-analysis of genome scans and replication identify CD6, IRF8 and TNFRSF1A as new multiple sclerosis susceptibility loci. *Nat Genet* 2009; 41(7):776–82. doi: 10.1038/ng.401.
91. Jakkula E, Leppä V, Sulonen A-M, Varilo T, Kallio S, Kempainen A et al. Genome-wide association study in a high-risk isolate for multiple sclerosis reveals associated variants in STAT3 gene. *Am J Hum Genet* 2010; 86(2):285–91. doi: 10.1016/j.ajhg.2010.01.017.

92. Sanna S, Pitzalis M, Zoledziowska M, Zara I, Sidore C, Murru R et al. Variants within the immunoregulatory CBLB gene are associated with multiple sclerosis. *Nat Genet* 2010; 42(6):495–7. doi: 10.1038/ng.584.
93. Nischwitz S, Cepok S, Kroner A, Wolf C, Knop M, Müller-Sarnowski F et al. Evidence for VAV2 and ZNF433 as susceptibility genes for multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 2010; 227(1-2):162–6. doi: 10.1016/j.jneuroim.2010.06.003.
94. Patsopoulos NA, Esposito F, Reischl J, Lehr S, Bauer D, Heubach J et al. Genome-wide meta-analysis identifies novel multiple sclerosis susceptibility loci. *Ann Neurol* 2011; 70(6):897–912. doi: 10.1002/ana.22609.
95. Sawcer S, Hellenthal G, Pirinen M, Spencer CCA, Patsopoulos NA, Moutsianas L et al. Genetic risk and a primary role for cell-mediated immune mechanisms in multiple sclerosis. *Nature* 2011; 476(7359):214–9. doi: 10.1038/nature10251.
96. Beecham AH, Patsopoulos NA, Xifara DK, Davis MF, Kempainen A, Cotsapas C et al. Analysis of immune-related loci identifies 48 new susceptibility variants for multiple sclerosis. *Nat Genet* 2013; 45(11):1353–60. doi: 10.1038/ng.2770.
97. Sun J, Xie Y, Wang Q, Shen J, Qin W, Zhang N et al. Genes associated with grey matter volume reduction in multiple sclerosis. *J Neurol* 2021. doi: 10.1007/s00415-021-10777-2.
98. Ashburner J, Friston KJ. Voxel-based morphometry--the methods. *Neuroimage* 2000; 11(6 Pt 1):805–21. doi: 10.1006/nimg.2000.0582.
99. Schmidt P, Gaser C, Arsic M, Buck D, Förchler A, Berthele A et al. An automated tool for detection of FLAIR-hyperintense white-matter lesions in Multiple Sclerosis. *Neuroimage* 2012; 59(4):3774–83. doi: 10.1016/j.neuroimage.2011.11.032.
100. Reed E, Nunez S, Kulp D, Qian J, Reilly MP, Foulkes AS. A guide to genome-wide association analysis and post-analytic interrogation. *Stat Med* 2015; 34(28):3769–92. doi: 10.1002/sim.6605.
101. Wright S. Coefficients of Inbreeding and Relationship. *The American Naturalist* 1922; 56(645):330–8. doi: 10.1086/279872.
102. Marees AT, Kluiver H de, Stringer S, Vorspan F, Curis E, Marie-Claire C et al. A tutorial on conducting genome-wide association studies: Quality control and

- statistical analysis. *Int J Methods Psychiatr Res* 2018; 27(2):e1608. doi: 10.1002/mpr.1608.
103. Golden LC, Voskuhl R. The importance of studying sex differences in disease: The example of multiple sclerosis. *Journal of Neuroscience Research* 2017; 95(1-2):633–43. doi: 10.1002/jnr.23955.
104. Li DKB, Held U, Petkau J, Daumer M, Barkhof F, Fazekas F et al. MRI T2 lesion burden in multiple sclerosis: a plateauing relationship with clinical disability. *Neurology* 2006; 66(9):1384–9. doi: 10.1212/01.wnl.0000210506.00078.5c.
105. Pongratz V, Schmidt P, Bussas M, Grahl S, Gaser C, Berthele A et al. Prognostic value of white matter lesion shrinking in early multiple sclerosis: An intuitive or naïve notion? *Brain Behav* 2019; 9(12):e01417. doi: 10.1002/brb3.1417.
106. Filippi M, Wolinsky JS, Comi G. Effects of oral glatiramer acetate on clinical and MRI-monitored disease activity in patients with relapsing multiple sclerosis: a multicentre, double-blind, randomised, placebo-controlled study. *The Lancet Neurology* 2006; 5(3):213–20. doi: 10.1016/S1474-4422(06)70327-1.
107. Kappos L, Giovannoni G, Gold R, Phillips JT, Arnold DL, Hotermans C et al. Time course of clinical and neuroradiological effects of delayed-release dimethyl fumarate in multiple sclerosis. *Eur J Neurol* 2015; 22(4):664–71. doi: 10.1111/ene.12624.
108. Kappos L, Radue E-W, O'Connor P, Polman C, Hohlfeld R, Calabresi P et al. A placebo-controlled trial of oral fingolimod in relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med* 2010; 362(5):387–401. doi: 10.1056/NEJMoa0909494.
109. O'Connor P, Wolinsky JS, Confavreux C, Comi G, Kappos L, Olsson TP et al. Randomized trial of oral teriflunomide for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med* 2011; 365(14):1293–303. doi: 10.1056/NEJMoa1014656.
110. Li M-X, Yeung JMY, Cherny SS, Sham PC. Evaluating the effective numbers of independent tests and significant p-value thresholds in commercial genotyping arrays and public imputation reference datasets. *Hum Genet* 2012; 131(5):747–56. doi: 10.1007/s00439-011-1118-2.

111. Sherry ST, Ward MH, Kholodov M, Baker J, Phan L, Smigielski EM et al. dbSNP: the NCBI database of genetic variation. *Nucleic Acids Research* 2001; 29(1):308–11. doi: 10.1093/nar/29.1.308.
112. Kent WJ, Sugnet CW, Furey TS, Roskin KM, Pringle TH, Zahler AM et al. The human genome browser at UCSC. *Genome Research* 2002; 12(6):996–1006. doi: 10.1101/gr.229102.
113. Codding SJ, Johnson AA, Trudeau MC. Gating and regulation of KCNH (ERG, EAG, and ELK) channels by intracellular domains. *Channels (Austin)* 2020; 14(1):294–309. doi: 10.1080/19336950.2020.1816107.
114. L. Phan, Y. Jin, H. Zhang, W. Qiang, E. Shekhtman, D. Shao, D. Revoe, R. Villamarin, E. Ivanchenko, M. Kimura, Z. Y. Wang, L. Hao, N. Sharopova, M. Bihan, A. Sturcke, M. Lee, N. Popova, W. Wu, C. Bastiani, M. Ward, J. B. Holmes, V. Lyoshin, K. Kaur, E. Moyer, M. Feolo, and B. L. Kattman. "ALFA: Allele Frequency Aggregator."; 2020 10.03.2020. Verfügbar unter: www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/docs/gsr/alfa/.
115. Jokubaitis VG, Zhou Y, Butzkueven H, Taylor BV. Genotype and Phenotype in Multiple Sclerosis-Potential for Disease Course Prediction? *Curr Treat Options Neurol* 2018; 20(6):18. doi: 10.1007/s11940-018-0505-6.
116. Uhl GR, Martinez MJ. PTPRD: neurobiology, genetics, and initial pharmacology of a pleiotropic contributor to brain phenotypes. *Ann N Y Acad Sci* 2019; 1451(1):112–29. doi: 10.1111/nyas.14002.
117. Liu Q-R, Drgon T, Johnson C, Walther D, Hess J, Uhl GR. Addiction molecular genetics: 639,401 SNP whole genome association identifies many "cell adhesion" genes. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2006; 141B(8):918–25. doi: 10.1002/ajmg.b.30436.
118. Chibnik LB, White CC, Mukherjee S, Raj T, Yu L, Larson EB et al. Susceptibility to neurofibrillary tangles: role of the PTPRD locus and limited pleiotropy with other neuropathologies. *Mol Psychiatry* 2018; 23(6):1521–9. doi: 10.1038/mp.2017.20.
119. Mattheisen M, Samuels JF, Wang Y, Greenberg BD, Fyer AJ, McCracken JT et al. Genome-wide association study in obsessive-compulsive disorder: results from the OCGAS. *Mol Psychiatry* 2015; 20(3):337–44. doi: 10.1038/mp.2014.43.

120. Schormair B, Kemlink D, Roeske D, Eckstein G, Xiong L, Lichtner P et al. PTPRD (protein tyrosine phosphatase receptor type delta) is associated with restless legs syndrome. *Nat Genet* 2008; 40(8):946–8. doi: 10.1038/ng.190.
121. Cotsapas C, Voight BF, Rossin E, Lage K, Neale BM, Wallace C et al. Pervasive sharing of genetic effects in autoimmune disease. *PLoS Genet* 2011; 7(8):e1002254. doi: 10.1371/journal.pgen.1002254.
122. Su Jin Yoo, Mi Kyoung Lim et al. The Potential Role Of Protein Tyrosine Phosphatase Receptor D (PTPRD) Gene Copy Number Variation In Susceptibility To Rheumatoid Arthritis; 2013. (*Genetics and Genomics of Rheumatic Disease I*).
123. Ou C, Peng Q, Zeng C. An integrative prognostic and immune analysis of PTPRD in cancer. *Math Biosci Eng* 2022; 19(6):5361–79. doi: 10.3934/mbe.2022251.
124. Chen M, Dong Y, Tian L, Zhou J, Zhu E, Yuan H et al. Metastasis suppressor 1 interacts with protein tyrosine phosphatase receptor- δ to regulate adipogenesis. *FASEB J* 2023; 37(4):e22857. doi: 10.1096/fj.202201322R.
125. Kim M, Morales LD, Jang I-S, Cho Y-Y, Kim DJ. Protein Tyrosine Phosphatases as Potential Regulators of STAT3 Signaling. *Int J Mol Sci* 2018; 19(9). doi: 10.3390/ijms19092708.
126. Lill CM, Schjeide B-MM, Akkad DA, Blaschke P, Winkelmann A, Gerdes L-A et al. Independent replication of STAT3 association with multiple sclerosis risk in a large German case-control sample. *Neurogenetics* 2012; 13(1):83–6. doi: 10.1007/s10048-011-0305-6.
127. Bosch GJA ten, Bolk J, Hart BA 't, Laman JD. Multiple sclerosis is linked to MAPKERK overactivity in microglia. *J Mol Med (Berl)* 2021; 99(8):1033–42. doi: 10.1007/s00109-021-02080-4.
128. Nurnberger JI, Koller DL, Jung J, Edenberg HJ, Foroud T, Guella I et al. Identification of pathways for bipolar disorder: a meta-analysis. *JAMA Psychiatry* 2014; 71(6):657–64. doi: 10.1001/jamapsychiatry.2014.176.
129. Kim JY, Nelson AL, Algon SA, Graves O, Sturla LM, Goumnerova LC et al. Medulloblastoma tumorigenesis diverges from cerebellar granule cell differentiation in patched heterozygous mice. *Developmental Biology* 2003; 263(1):50–66. doi: 10.1016/s0012-1606(03)00434-2.

130. Sakurai T. The role of NrCAM in neural development and disorders--beyond a simple glue in the brain. *Mol Cell Neurosci* 2012; 49(3):351–63. doi: 10.1016/j.mcn.2011.12.002.
131. Ayalew M, Le-Niculescu H, Levey DF, Jain N, Changala B, Patel SD et al. Convergent functional genomics of schizophrenia: from comprehensive understanding to genetic risk prediction. *Mol Psychiatry* 2012; 17(9):887–905. doi: 10.1038/mp.2012.37.
132. Brummer T, Müller SA, Pan-Montojo F, Yoshida F, Fellgiebel A, Tomita T et al. NrCAM is a marker for substrate-selective activation of ADAM10 in Alzheimer's disease. *EMBO Mol Med* 2019; 11(4). doi: 10.15252/emmm.201809695.
133. Fu C-C, Gao C, Zhang H-H, Mao Y-Q, Lu J-Q, Petritis B et al. Serum molecular biomarkers in neuromyelitis optica and multiple sclerosis. *Mult Scler Relat Disord* 2022; 59:103527. doi: 10.1016/j.msard.2022.103527.
134. Petralia RS, Sans N, Wang Y-X, Wenthold RJ. Ontogeny of postsynaptic density proteins at glutamatergic synapses. *Mol Cell Neurosci* 2005; 29(3):436–52. doi: 10.1016/j.mcn.2005.03.013.
135. Oguro-Ando A, Zuko A, Kleijer KTE, Burbach JPH. A current view on contactin-4, -5, and -6: Implications in neurodevelopmental disorders. *Mol Cell Neurosci* 2017; 81:72–83. doi: 10.1016/j.mcn.2016.12.004.
136. Zhao R, Zhu T, Liu Q, Tian Q, Wang M, Chen J et al. The autism risk gene CNTN4 modulates dendritic spine formation. *Hum Mol Genet* 2021; 31(2):207–18. doi: 10.1093/hmg/ddab233.
137. Bos SD, Page CM, Andreassen BK, Elboudwarej E, Gustavsen MW, Briggs F et al. Genome-wide DNA methylation profiles indicate CD8+ T cell hypermethylation in multiple sclerosis. *PLoS One* 2015; 10(3):e0117403. doi: 10.1371/journal.pone.0117403.
138. Chittoor G, Kent JW, Almeida M, Puppala S, Farook VS, Cole SA et al. GWAS and transcriptional analysis prioritize ITPR1 and CNTN4 for a serum uric acid 3p26 QTL in Mexican Americans. *BMC Genomics* 2016; 17:276. doi: 10.1186/s12864-016-2594-5.
139. van Lierop ZY, Wieske L, Koel-Simmelink MJ, Chatterjee M, Dekker I, Leurs CE et al. Serum contactin-1 as a biomarker of long-term disease progression in

- natalizumab-treated multiple sclerosis. *Mult Scler* 2021;13524585211010097. doi: 10.1177/13524585211010097.
140. Derfuss T, Parikh K, Velhin S, Braun M, Mathey E, Krumbholz M et al. Contactin-2/TAG-1-directed autoimmunity is identified in multiple sclerosis patients and mediates gray matter pathology in animals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106(20):8302–7. doi: 10.1073/pnas.0901496106.
141. Frederick Lo C, Ning X, Gonzales C, Ozenberger BA. Induced expression of death domain genes NALP1 and NALP5 following neuronal injury. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 366(3):664–9. doi: 10.1016/j.bbrc.2007.11.174.
142. Kim YK, Shin JS, Nahm MH. NOD-Like Receptors in Infection, Immunity, and Diseases. *Yonsei Med J* 2016; 57(1):5–14. doi: 10.3349/ymj.2016.57.1.5.
143. Hernández-Pedro NY, Espinosa-Ramirez G, La Cruz VP de, Pineda B, Sotelo J. Initial immunopathogenesis of multiple sclerosis: innate immune response. *Clin Dev Immunol* 2013; 2013:413465. doi: 10.1155/2013/413465.
144. Huang W-X, Huang P, Hillert J. Increased expression of caspase-1 and interleukin-18 in peripheral blood mononuclear cells in patients with multiple sclerosis. *Mult Scler* 2004; 10(5):482–7. doi: 10.1191/1352458504ms1071oa.
145. Happ HC, Sadleir LG, Zemel M, Valles-Ibáñez G de, Hildebrand MS, McConkie-Rosell A et al. Neurodevelopmental and Epilepsy Phenotypes in Individuals With Missense Variants in the Voltage-Sensing and Pore Domains of KCNH5. *Neurology* 2023; 100(6):e603-e615. doi: 10.1212/WNL.0000000000201492.
146. Martínez A, Santiago JL, Cénit MC, Las Heras V de, La Calle H de, Fernández-Arquero M et al. IFIH1-GCA-KCNH7 locus: influence on multiple sclerosis risk. *Eur J Hum Genet* 2008; 16(7):861–4. doi: 10.1038/ejhg.2008.16.
147. Boscia F, Elkjaer ML, Illes Z, Kukley M. Altered Expression of Ion Channels in White Matter Lesions of Progressive Multiple Sclerosis: What Do We Know About Their Function? *Front Cell Neurosci* 2021; 15:685703. doi: 10.3389/fncel.2021.685703.
148. Elkhodiry AA, Zamzam DA, El Tayebi HM. miR-155 and functional proteins of CD8+ T cells as potential prognostic biomarkers for relapsing-remitting multiple

sclerosis. *Mult Scler Relat Disord* 2021; 53:103078. doi:
10.1016/j.msard.2021.103078.

149. Rose LM, Richards TL, Peterson J, Petersen R, Alvord EC. Resolution of CNS lesions following treatment of experimental allergic encephalomyelitis in macaques with monoclonal antibody to the CD18 leukocyte integrin. *Mult Scler* 1997; 2(6):259–66. doi: 10.1177/135245859700200601.
150. Hu X, Wohler JE, Dugger KJ, Barnum SR. beta2-integrins in demyelinating disease: not adhering to the paradigm. *J Leukoc Biol* 2010; 87(3):397–403. doi: 10.1189/jlb.1009654.

Danksagung

Mein Dank gilt allen Mitarbeitern/innen der Klinik und Poliklinik für Neurologie und des Neurologie-Labors an der Uniklinik in Mainz, ohne deren Arbeit und Einsatz das Entstehen dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Insbesondere möchte ich hier [REDACTED] danken, die mir durch ihre Unterstützung und ihre Ratschläge in vielen Punkten weitergeholfen hat, sowie [REDACTED] für seine Hilfe zur Generierung und grafischen Aufarbeitung der MRT-Daten.

Mein besonderer Dank geht an alle Patient/innen, die sich bereit erklärt haben an der Studie im Rahmen meiner Doktorarbeit teilzunehmen und mit bewundernswertem Engagement zur Forschung beizutragen. Ich wünsche allen von ganzem Herzen alles Gute.

Des Weiteren möchte ich mich bei meiner Familie und meinem Freund bedanken, sowie meinen Freundinnen und Freunden, die mich stets unterstützt haben. Hier möchte ich im Besonderen Paula Bark, Rebecca Llannes, Fritzi Heinzmann und Elva Thönnies danken.

Zuletzt gilt mein ganz besonderer Dank meinem Betreuer Prof. Dr. med. Felix Lüssi, der durch seine stetige und freundliche Unterstützung und Motivation maßgeblich zum Entstehen und Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.