

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

Assoziation von intrathekaler Pleozytose und IgG-Synthese  
mit neuroaxonaler Schädigung in der Frühphase der Multiplen Sklerose

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

Vorgelegt von

Sinah Roxana Engel  
aus Frankfurt am Main

Mainz, 2020

Wissenschaftlicher Vorstand:

1. Gutachter:

2. Gutachter:

Tag der Promotion:

30.06.2020

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	1
<b>Abbildungs- und Tabellenverzeichnis</b> .....	3
<b>Einleitung und Ziel der Dissertation</b> .....	4
Akute und chronische neuroaxonale Schädigung bei der Multiplen Sklerose .....	5
Liquorveränderungen bei der Multiplen Sklerose .....	5
Serum Neurofilament als potentieller Biomarker bei der Multiplen Sklerose .....	6
Grundlagen der SiMoA-Technologie .....	8
<b>Literaturdiskussion</b> .....	10
Einfluss verschiedener Liquorparameter auf Neurofilament .....	10
1) Assoziation zwischen der Leukozytenzahl im Liquor und Neurofilament .....	10
2) Assoziation zwischen dem Albumin-Quotienten und Neurofilament .....	11
3) Assoziation zwischen OKB-Status und Neurofilament .....	11
4) Assoziation zwischen intrathekalen Immunglobulinen und Neurofilament .....	12
<b>Material und Methoden</b> .....	16
Material .....	16
Laborgeräte .....	16
Laborzubehör .....	16
Reagenzien und Lösungen .....	16
Methoden .....	18
Studiendesign .....	18
Bestimmung der Liquorparameter .....	19
Bestimmung der sNfL-Konzentration mittels SiMoA .....	20
Auswertung der MRT-Befunde .....	21
Statistische Auswertung .....	21
<b>Ergebnisse</b> .....	23
Charakterisierung der Kohorte .....	23
1. Demographische Daten .....	23
2. Klinische Daten .....	23
3. Kernspintomographische Befunde .....	24
4. Liquorbefunde .....	26
Einfluss verschiedener Parameter auf die sNfL-Konzentration .....	27
1. Demographische Parameter .....	27
2. Klinische Parameter .....	28

3. Kernspintomographische Parameter.....	30
5. Liquorparameter der akuten ZNS-Inflammation.....	32
6. Liquorparameter der chronischen ZNS-Inflammation .....	34
Regressionsanalyse.....	36
<b>Diskussion</b> .....	<b>37</b>
<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>41</b>
<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>42</b>
<b>Danksagung</b> .....	<b>46</b>

## Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
$\beta$	Standardisierter Regressionskoeffizient
$\mu$ l	Mikroliter
$\mu$ m	Mikrometer
Abb.	Abbildung
ALS	Amyotrophe Lateralsklerose
ANOVA	Analysis of variance
CSF	Cerebrospinal fluid
CV	Coefficient of variation
dl	Deziliter
EDSS	Expanded Disability Status Scale
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
fl	Femtoliter
FLAIR	Fluid attenuated inversion recovery
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
IgA	Immunglobulin A
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
IQR	Interquartilsabstand
KIS	Klinisch isoliertes Syndrom
KM	Kontrastmittel
mg	Milligramm
ml	Milliliter
MRT	Magnetresonanztomographie
MRZ	Masern-Röteln-Zoster
MS	Multiple Sklerose
n	Anzahl
nm	Nanometer
NfH	Neurofilament-Schwerketten („heavy“)
NfL	Neurofilament-Leichtketten („light“)
NfM	Neurofilament-Mittelketten („medium“)
OKB	Oligoklonale Banden
ON	Optikusneuritis

p	P-Signifikanzwert
pg	Pikogramm
PLS	Primäre Lateralsklerose
PPMS	Primär progrediente Multiple Sklerose
QAlb	Albumin-Quotient
QIgA	Immunglobulin A-Quotient
QIgG	Immunglobulin G-Quotient
QIgM	Immunglobulin M-Quotient
r	Korrelationskoeffizient nach Spearman
SiMoA	Single molecule arrays
sNfL	Neurofilament-Leichtketten im Serum
SPMS	Sekundär progrediente Multiple Sklerose
ZNS	Zentrales Nervensystem

## Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

<b>Abbildung 1:</b> Freisetzung von Neurofilament nach axonaler Schädigung .....	7
<b>Abbildung 2:</b> Ablauf des Einzelmolekülnachweises mittels SiMoA .....	9
<b>Abbildung 3:</b> Liquorspezifische oligoklonale Banden Typ 2.....	20
<b>Abbildung 4:</b> SiMoA HD-1-Analyzer .....	21
<b>Abbildung 5:</b> Vergleich der T2-Läsionen zwischen KIS- und MS-Patienten .....	25
<b>Abbildung 6:</b> Vergleich von sNfL zwischen Gesunden, KIS- und MS-Patienten.....	28
<b>Abbildung 7:</b> Vergleich von sNfL abhängig von der Schubmanifestation .....	29
<b>Abbildung 8:</b> Vergleich von sNfL abhängig von KM-aufnehmenden Läsionen .....	30
<b>Abbildung 9:</b> Korrelation von sNfL und Anzahl KM-aufnehmender Läsionen .....	31
<b>Abbildung 10:</b> Korrelation von sNfL und Anzahl der T2-Läsionen .....	31
<b>Abbildung 11:</b> Korrelation von sNfL und Leukozyten im Liquor .....	32
<b>Abbildung 12:</b> Korrelation von Leukozytenzahl und T2-Läsionen.....	33
<b>Abbildung 13:</b> Korrelation von Leukozytenzahl und KM-Läsionen.....	33
<b>Abbildung 14:</b> Vergleich von sNfL abhängig vom OKB-Status .....	34
<b>Abbildung 15:</b> Korrelation von sNfL und IgG im Liquor.....	35
<b>Abbildung 16:</b> Korrelation von sNfL und QIgG.....	35
<b>Tabelle 1:</b> Literaturübersicht .....	13
<b>Tabelle 2:</b> Demographische Daten .....	23
<b>Tabelle 3:</b> Übersicht klinischer Parameter .....	24
<b>Tabelle 4:</b> Übersicht MRT-Befunde .....	24
<b>Tabelle 5:</b> Übersicht Liquorparameter .....	26
<b>Tabelle 6:</b> Ergebnisse der Regressionsanalyse.....	36

## **Einleitung und Ziel der Dissertation**

Die Multiple Sklerose (MS) ist eine autoimmunvermittelte entzündliche Erkrankung des zentralen Nervensystems (ZNS). Durch autoaggressive Immunreaktionen kommt es zu Entmarkungen der Nervenfasern (Demyelinisierungen), welche bei der häufigsten Verlaufsform, der schubförmigen MS, zum akuten Auftreten neurologischer Defizite führen. Neben diesen akut-entzündlichen Ereignissen kann es darüber hinaus zu langsam progredienten klinischen Verschlechterungen kommen, welche auf chronisch-entzündliche Prozesse und die damit verbundene Degeneration neuroaxonalen Gewebes zurückgeführt werden (1, 2).

Aufgrund der engen räumlichen Nähe zum ZNS erlaubt die Analyse verschiedener Liquorparameter die bisher beste Annäherung an eine Einschätzung sowohl akuter als auch chronischer Entzündungsprozesse des ZNS. Da Liquor nur durch das invasive Verfahren der Lumbalpunktion gewonnen werden kann, sind regelmäßige Liquoranalysen zur Beurteilung der entzündlichen Krankheitsaktivität jedoch nicht praktikabel. Ein in jüngerer Vergangenheit an Popularität gewinnender, einfach zugänglicher Biomarker bei MS sowie bei einer Vielzahl weiterer neurologischer Erkrankungen ist das Neurofilament (3). Die Neurofilament-Leichtketten (NfL) stellen einen der Hauptbestandteile des neuronalen Zytoskeletts dar. Kommt es zu Schädigungen der Neurone oder ihrer Axone, wird NfL zunächst in den Liquor ausgeschüttet. In der Folge kommt es zudem zum Übertritt von sehr geringen Mengen von NfL in das Serum (4). Durch die Entwicklung eines hoch sensitiven Einzelmolekülnachweisverfahrens mittels „single molecule arrays“ (SiMoA) ist es nun möglich, selbst kleinste Schwankungen der Konzentration von NfL im Serum (sNfL) zu quantifizieren (3). Limitierend für den Einsatz als Biomarker ist jedoch, dass sNfL relativ unspezifisch ist und dass seine Konzentration durch jede Form neuroaxonaler Schädigung ansteigen kann.

Um zu einem besseren Verständnis der Pathomechanismen, die zu einem Anstieg der sNfL-Konzentration führen, beizutragen, wurde in der hier vorgelegten Arbeit der Einfluss von akuten und chronischen Entzündungsprozessen im Liquor auf die Konzentration von sNfL bei MS-Patienten untersucht. Langfristig sollen die aus dieser Studie gewonnenen Erkenntnisse zur Optimierung der Einsatzmöglichkeiten von sNfL als Biomarker bei MS-Patienten beitragen.



## **Akute und chronische neuroaxonale Schädigung bei der Multiplen Sklerose**

Trotz intensiver Forschungsbemühungen konnte die Pathogenese der MS bisher nicht in vollem Umfang entschlüsselt werden. Es wird angenommen, dass es initial in der Folge einer vorwiegend T Zell-vermittelten Autoimmunreaktion zu einer fokalen Demyelinisierung in der weißen Substanz des ZNS kommt. Durch eine Störung der Integrität der Blut-Hirn-Schranke kann das ZNS von weiteren Immunzellen infiltriert werden. Darüber hinaus kann es zur Aktivierung ZNS-ständiger Makrophagen und Mikrogliazellen kommen (5). Durch den mit der Demyelinisierung verbundenen Verlust von Oligodendrozyten kommt es zu einer Minderversorgung der Axone mit konsekutiver Neurodegeneration (6, 7). Neuroaxonale Schädigung tritt jedoch auch unabhängig von Demyelinisierungen auf (8, 9).

Während die traditionelle Auffassung zur Pathogenese der MS davon ausging, dass eine Phase akuter Entzündungsaktivität zu Beginn der Erkrankung im späteren Verlauf von einer Phase chronischer Neurodegeneration gefolgt wird, ist man sich heute einig, dass akute Entzündung und chronische Neurodegeneration parallel auftreten (10). So konnte beispielsweise histopathologisch nachgewiesen werden, dass es schon in frühen Krankheitsstadien zu einer Reduktion der neuronalen Dichte mit begleitender Atrophie kommen kann (11). Auch verschiedene mit Neurodegeneration assoziierte Befunde in der Magnetresonanztomographie (MRT), wie der Nachweis T1-hypointenser Herde („black holes“) sowie kortikaler Läsionen und eine zunehmende Atrophie des Hirngewebes und des Rückenmarks, können häufig bereits zum Zeitpunkt der Diagnosestellung nachgewiesen werden (12-14).

## **Liquorveränderungen bei der Multiplen Sklerose**

Die Liquoranalytik stellt einen zentralen Pfeiler in der Diagnostik der MS dar. Einerseits ist sie zum Ausschluss möglicher Differentialdiagnosen der MS, wie z.B. der von infektiologischen und anderen autoimmunologischen Erkrankungen, unerlässlich. Aber auch über die Diagnosefindung hinaus, ermöglicht sie eine Einschätzung der Krankheitsaktivität und kann sogar Hinweise auf die zu erwartende Prognose der Patienten geben.

Typische Liquorbefunde bei MS-Patienten sind eine leichte Erhöhung der Leukozytenzahl (Pleozytose) sowie der Nachweis einer intrathekalen Immunglobulinsynthese, gemessen durch die relative Erhöhung der Immunglobulin G-

(IgG)-Konzentration im Liquor und durch den Nachweis liquorspezifischer oligoklonaler Banden (OKB) (15).

Aufgrund ihres prognostischen Wertes wurden die OKB sogar in die aktuellsten Diagnosekriterien der MS, die McDonald-Kriterien in revidierter Form von 2017, aufgenommen (16). Dies unterstreicht den Stellenwert der Liquoranalyse in der Diagnostik der MS und räumt ihr einen größeren Raum neben den bisher etablierten Biomarkern, wie der MRT, ein.

Das Verhältnis zwischen der Albumin-Konzentration im Liquor und im Serum, der Albumin-Quotient (QAlb), stellt einen Marker der Integrität der Blut-Hirn-Schranke dar. Bei MS-Patienten liegt sein Wert in der Regel im Normalbereich, da es meist nur zu einer fokalen und transienten Störung der Blut-Hirn-Schranke während akut-entzündlicher Reaktionen kommt. In Einzelfällen kann QAlb jedoch auch erhöht sein (15, 17).

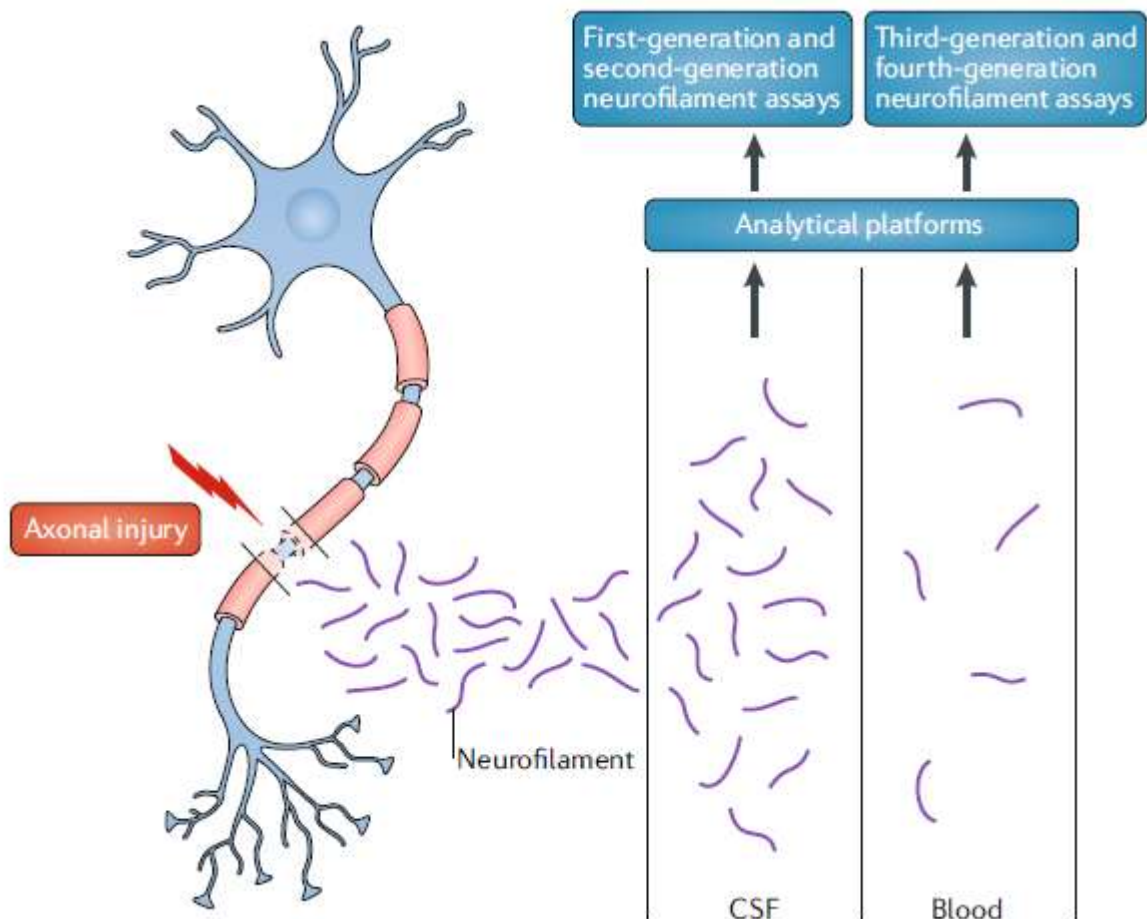
Zusammen mit der Liquorpleozytose wird QAlb als dynamischer Parameter akuter entzündlicher Aktivität angesehen (18, 19). Die intrathekale Immunglobulinsynthese spiegelt dagegen eher chronische Entzündungsprozesse im ZNS wider (20).

### **Serum Neurofilament als potentieller Biomarker bei der Multiplen Sklerose**

Der bisher einzige in der Routinediagnostik etablierte Biomarker bei der MS ist die MRT. Die Erfassung der Formation neuer Läsionen im Marklager als Ausdruck fokaler Entzündungsreaktionen ist dabei insgesamt zuverlässig möglich. Läsionen in der grauen Substanz werden in der herkömmlichen MRT dagegen häufig nicht erfasst (21). Darüber hinaus ist eine selektive Beurteilung der neuroaxonalen Degeneration mittels MRT nur bedingt möglich. In der Vergangenheit wurde eine Reihe von Atrophie-Markern, wie volumetrische Messungen und die Bestimmung der kortikalen Schichtdicke, entwickelt. Diese werden jedoch dadurch limitiert, dass sie im Einzelfall nur eine geringe Spezifität und Sensibilität aufweisen (22). Diese Lücke könnte künftig durch die quantitative Messung von Neurofilament geschlossen werden.

Neurofilamente sind Strukturproteine, die ausschließlich von Neuronen exprimiert werden. In der Folge einer neuroaxonalen Schädigung, z.B. durch neurodegenerative Erkrankungen, entzündliche, vaskuläre oder traumatische Prozesse, werden sie zunächst in den Liquor, und konsekutiv auch in das Serum der Patienten,

ausgeschüttet (**Abb. 1**) (3). Die Konzentrationen von NfL in Liquor und Serum weisen dabei eine enge Korrelation auf, sodass eine Messung in der Peripherie Rückschlüsse auf Prozesse innerhalb des ZNS erlaubt (23).



**Abbildung 1: Freisetzung von Neurofilament nach axonaler Schädigung**

Abbildung aus Khalil M. et al., Nat Rev Neurol. 2018 (3)

Durch die Schädigung von Axonen werden Proteine des Zytoskeletts, darunter Neurofilamente, in den Liquor freigesetzt. Konsekutiv kommt es zum Übertritt geringer Mengen der Neurofilamente in das Serum. Frühere diagnostische Tests (z.B. Immunoblot und ELISA) waren nicht dazu geeignet, Neurofilament in dieser geringen Konzentration nachzuweisen. Durch die Entwicklung neuer Technologien (insbesondere SiMoA) ist es nun möglich, die sNfL-Konzentration zuverlässig zu quantifizieren.

Die Neurofilamente gehören mit einem Durchmesser von etwa 10 Nanometern (nm) zur Gruppe der Intermediärfilamente. Man unterscheidet fünf Subtypen der Neurofilamente: NfL, Neurofilament-Mittelketten (NfM), Neurofilament-Schwerketten

(NfH),  $\alpha$ -Internexin und Peripherin, wobei NfL der nach aktuellem Stand vielversprechendste Biomarker für die MS zu sein scheint. Neben strukturgebenden und stützenden Funktionen sind Neurofilamente wahrscheinlich auch für die effektive Reizleitung bedeutsam (3).

Bisher konnte bereits aufgezeigt werden, dass die Bestimmung der NfL-Konzentration im Liquor und im Serum eine Abgrenzung zwischen Patienten mit Klinisch isoliertem Syndrom (KIS) und mit MS von gesunden Kontrollen ermöglicht (23-25). Die sNfL-Konzentration steigt während eines akuten Schubereignisses an und korreliert mit der Anzahl und Größe von Demyelinisierungsherden sowie der Anzahl Kontrastmittel-(KM-) aufnehmender Läsionen in der MRT (26-28). Nach Beginn einer verlaufsmodifizierenden Immuntherapie kommt es zu einer Abnahme der NfL-Konzentration, sodass sNfL auch als möglicher Marker für das Monitoring des Therapieansprechens diskutiert wird (29-31).

Für den klinischen Einsatz von Proteinen als Biomarker ist es erforderlich, selbst kleinste Schwankungen niedrigkonzentrierter Proteinmengen in komplex zusammengesetzten Proben, zuverlässig quantifizieren zu können. Im Hinblick auf den Einsatz von sNfL als Biomarker bei der MS, wird dies nun durch die hochsensitive SiMoA-Technologie ermöglicht.

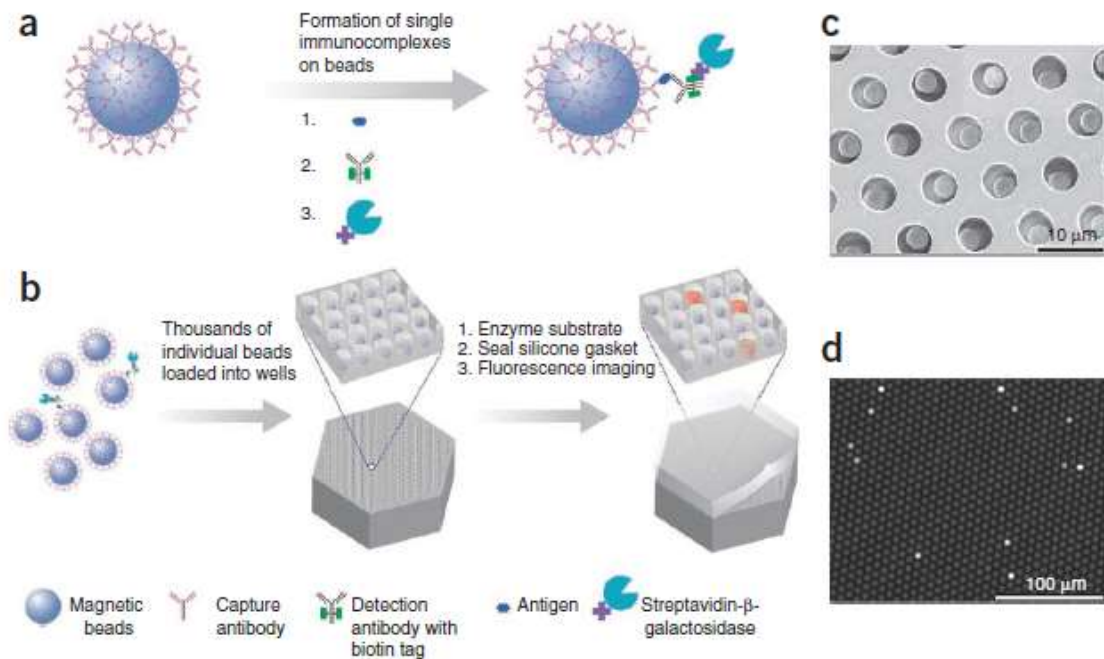
### **Grundlagen der SiMoA-Technologie**

Die technische Grundlage dieses Verfahrens bilden kleinste Reaktionskammern mit einem Fassungsvermögen von nur einem Femtoliter (fl) ( $1 \text{ fl} = 10^{-15}$  Liter), die sogenannten „single-molecule arrays“. Diese ermöglichen die Isolierung und Detektion einzelner Moleküle (32).

In einem ersten Schritt erfolgt, dem Prinzip eines klassischen Sandwich- „enzyme-linked immunosorbent assay“ (ELISA) folgend, eine Bindung der Zielmoleküle an Antikörper-besetzte magnetische Kugeln mit einem Durchmesser von  $2,7 \mu\text{m}$ . Die so entstandenen Komplexe werden durch einen zweiten Detektionsantikörper gebunden (**Abb. 2a**). In Proben, die nur eine sehr geringe Konzentration des Zielmoleküls enthalten, ist das Verhältnis von Zielmolekül (und den resultierenden Bindungskomplexen) zu Kugeln klein (typischerweise  $< 1:1$ ). Den Gesetzmäßigkeiten einer Poisson-Verteilung folgend, bindet die Mehrheit der Kugeln daher entweder ein oder kein Zielmolekül (33).

Im zweiten Schritt werden die Kugeln (sowohl Kugeln mit gebundenem Zielmolekül als auch freie Kugeln) auf eine Platte aufgetragen, welche die eingangs erwähnten Kammern, die „single molecule arrays“ enthält (**Abb. 2c**). Jede Kammer fasst dabei nur eine Kugel. Die Kammern werden mit einem fluoreszierenden Enzymsubstrat inkubiert und mit Silikon abgedichtet (**Abb. 2b**).

Schließlich erfolgt die Detektion der Kammern mit Zielmolekül-tragenden Kugeln durch die Erfassung der Fluoreszenzsignale (**Abb. 2d**). Die Zielmolekül-Konzentration in der Probe errechnet sich aus dem Verhältnis der Anzahl der Kammern mit Zielmolekül-tragenden Kugeln zu der Anzahl der Kammern mit Kugeln, an die kein Zielmolekül gebunden ist (34).



**Abbildung 2: Ablauf des Einzelmolekülnachweises mittels SiMoA**

Abbildung aus Rissin DM et al., Nat Biotechnol. 2010 (34)

## Literaturdiskussion

### **Einfluss verschiedener Liquorparameter auf Neurofilament**

Bisher veröffentlichte Untersuchungen zum Einfluss von pathologischen Liquorbefunden auf die Freisetzung von Neurofilament fokussierten sich vornehmlich auf Veränderungen der Neurofilament-Konzentration im Liquor. Erkenntnisse zur Assoziation von Liquorparametern auf die Konzentration von sNfL gibt es dagegen nur wenige.

Eine Übersicht früherer Studien zum Einfluss von Liquorveränderungen auf die Konzentrationen verschiedener Neurofilament-Subtypen bietet **Tabelle 1**. Um einen verständlichen Überblick zu ermöglichen, erfolgt eine Unterteilung der Liquorparameter in Marker, die eher akut-entzündliche ZNS-Prozesse reflektieren (Leukozyten im Liquor und QAlb, **Tabelle 1a**) und Marker, die auf chronisch-entzündliche Prozesse hindeuten (Intrathekale Immunglobuline und OKB, **Tabelle 1b**).

#### **1) Assoziation zwischen der Leukozytenzahl im Liquor und Neurofilament**

Eine frühe Arbeit von Norgren et al. aus dem Jahr 2004 beschäftigte sich mit dem Einfluss der Leukozytenzahl im Liquor auf die Konzentration von NfL im Liquor. Untersucht wurden 99 Patienten eines eher heterogenen MS-Kollektivs mit Einschluss von Patienten mit KIS, schubförmiger MS, sekundär progredienter MS (SPMS) und primär progredienter MS (PPMS). Es konnte eine Korrelation zwischen der Konzentration von NfL im Liquor und der Anzahl der Leukozyten im Liquor bei Patienten mit KIS und schubförmiger MS während eines akuten Schubereignisses festgestellt werden, nicht aber in stabilen Krankheitsphasen ohne akute Schubaktivität (35).

Ähnliche Ergebnisse fanden sich in der Arbeit von Kuhle et al. aus dem Jahr 2013, in der eine Korrelation von Leukozytenzahl im Liquor und NfL im Liquor bei Patienten mit KIS und schubförmiger MS nachgewiesen wurde. Bei Patienten mit chronischen Verlaufsformen (SPMS und PPMS) bestand dagegen keine Assoziation (36).

Auch in einer weiteren Kohorte von 50 Patienten mit einer PPMS fand sich keine Korrelation zwischen NfL im Liquor und der Leukozytenzahl im Liquor (37).

In der Arbeit von Olesen et al. wurden Patienten mit akuter Optikusneuritis (ON) abhängig von der NfL-Konzentration im Liquor in eine Gruppe mit NfL-

Konzentrationen, die über dem Median lagen und eine Gruppe mit NfL-Werten unterhalb des Medians unterteilt. Dabei wurde festgestellt, dass die Patienten aus der Gruppe mit höheren NfL-Werten auch höhere Leukozytenzahlen im Liquor aufwiesen als die Patienten aus der Gruppe mit niedrigeren NfL-Konzentrationen (38).

## **2) Assoziation zwischen dem Albumin-Quotienten und Neurofilament**

Das Ausmaß von Störungen der Integrität der Blut-Hirn-Schranke wird durch die Höhe des Liquor/Serum-Albumin-Quotienten QAlb ausgedrückt. Erkenntnisse aus Arbeiten zu anderen neurologischen Krankheitsbildern, wie etwa der mit dem Humanen Immundefizienz-Virus-(HIV-) assoziierten Enzephalopathie und der fortgeschrittenen vaskulären sowie spät einsetzenden Alzheimer-Demenz, deuten darauf hin, dass erst eine ausgeprägte Erhöhung von QAlb zu einem nennenswerten Anstieg von Neurofilament führt (39, 40). Wie eingangs erwähnt, kommt es bei der MS dagegen nur in Einzelfällen zu einem messbaren Anstieg von QAlb (15, 17).

Passend hierzu konnte in der überwiegenden Mehrheit bisheriger Untersuchungen zum Einfluss von QAlb auf die Neurofilament-Konzentration bei MS-Patienten kein signifikanter Zusammenhang festgestellt werden. Auch in den Subgruppenanalysen hinsichtlich der Verlaufsform der MS ergaben sich keine signifikanten Korrelationen (31, 41-43).

Ausnahmen hiervon bilden zwei Studien von Kuhle et al. aus den Jahren 2011 und 2013, bei denen eine Korrelation von QAlb und der Konzentration von NfH im Liquor während eines akuten Schubereignisses (44) und eine Assoziation von NfL im Liquor mit QAlb bei Patienten mit KIS, schubförmiger MS und SPMS, jedoch nicht bei Patienten mit PPMS, gefunden wurde (36).

## **3) Assoziation zwischen OKB-Status und Neurofilament**

Bisher gibt es erst zwei publizierte Studien, die sich mit der Assoziation zwischen OKB-Status und Neurofilament-Konzentration beschäftigt haben und die zu gegenläufigen Ergebnissen gekommen sind. Während OKB-positive MS-Patienten in einer Untersuchung von Farina et al. aus dem Jahr 2017 deutlich höhere Konzentrationen von NfL im Liquor aufwiesen als OKB-Negative (45), bestand in der Untersuchung von Kuhle et al. aus dem Jahr 2011 keine Assoziation zwischen der Konzentration von NfH im Liquor und dem OKB-Status (44).

#### **4) Assoziation zwischen intrathekalen Immunglobulinen und Neurofilament**

Drei Untersuchungen verschiedener Arbeitsgruppen, in die MS-Patienten mit unterschiedlichen Verlaufsformen eingeschlossen wurden, konnten übereinstimmend keine Assoziation zwischen der Konzentration von NfL bzw. NfH im Liquor und der Konzentration verschiedener Immunglobulin-Klassen im Liquor finden (35, 44, 46).



## Tabelle 1: Literaturübersicht

a) Überblick bisheriger Studien zur Assoziation von Neurofilament mit Liquormarkern akut-entzündlicher ZNS-Prozesse

Referenz (Nr.)	Erkrankung	Patienten- anzahl	Neurofilament- Typ	Ergebnisse
<b>Leukozyten im Liquor</b>				
Norgren et al., 2004 (35)	MS (schubförmige MS, SPMS, PPMS)	99	Liquor NfL	Korrelation mit Leukozytenzahl während Schubereignis
Kuhle et al., 2013 (36)	KIS und MS (schubförmige MS, SPMS, PPMS)	148	Liquor NfL	Korrelation mit Leukozytenzahl bei KIS und schubförmiger MS, aber nicht bei SPMS und PPMS
Olesen et al., 2019 (38)	ON	40	Liquor NfL	Patienten mit NfL-Konzentrationen über dem Median wiesen höhere Leukozytenzahlen auf als Patienten mit NfL-Konzentrationen unter dem Median
Pawlitcki et al., 2018 (37)	PPMS	50	Liquor NfL	Keine Korrelation mit der Leukozytenzahl
<b>Albumin-Quotient</b>				
Lycke et al., 1998 (41)	Schubförmige MS	60	Liquor NfL	Keine Korrelation mit QAlb
Malmeström et al., 2003 (42)	MS (schubförmige MS, SPMS)	66	Liquor NfL	Keine Korrelation mit QAlb
Petzold et al., 2005 (43)	MS (schubförmige MS, SPMS, PPMS)	29	Liquor NfH	Keine Korrelation mit QAlb

Novakova et al., 2017 (31)	MS	158	NfL in Liquor und Serum	Keine Korrelation mit QAlb
Steinacker et al., 2016 (47)	Motoneuronerkrankungen (ALS, PLS)	455	Liquor NfL	Keine Korrelation mit QAlb
Kalm et al., 2017 (48)	Patienten mit Blut-Hirn-Schrankenstörung uneinheitlicher Genese	43	Serum NfL	Keine Korrelation mit QAlb
Kuhle et al., 2011 (44)	KIS und MS (schubförmige MS, SPMS, PPMS)	150	Liquor NfH	Korrelation mit QAlb bei Patienten mit schubförmiger MS während Schubereignis
Kuhle et al., 2013 (36)	KIS und MS (schubförmige MS, SPMS, PPMS)	148	Liquor NfL	Korrelation mit QAlb bei Patienten mit KIS, schubförmiger MS und SPMS, keine Korrelation bei Patienten mit PPMS
Anesten et al., 2016 (39)	HIV-Infizierte	631	Liquor NfL	Korrelation mit QAlb
Skillbaeck et al., 2017 (40)	Demenzkrankungen	1590	Liquor NfL	Korrelation mit QAlb bei Patienten mit spät einsetzender Alzheimer-Demenz und bei Patienten mit vaskulärer Demenz

b) Überblick bisheriger Studien zur Assoziation von Neurofilament mit Liquormarkern chronisch-entzündlicher ZNS-Prozesse

Referenz (Nr.)	Erkrankung	Patienten- anzahl	Neurofilament- Typ	Ergebnisse
<b>OKB</b>				
Farina et al., 2017 (45)	MS, ohne Angaben zur Verlaufsform	90	Liquor NfL	Höhere NfL-Konzentration bei OKB-positiven Patienten im Vergleich zu OKB-negativen Patienten
Kuhle et al., 2011 (44)	KIS und MS (schubförmige MS, SPMS, PPMS)	150	Liquor NfH	Keine Assoziation mit OKB-Status
<b>Immunoglobulin-Konzentration im Liquor</b>				
Eikelenboom et al., 2003 (46)	MS (schubförmige MS, SPMS, PPMS)	51	Liquor NfH	Keine Korrelation mit QIgG
Norgren et al., 2004 (35)	MS (schubförmige MS, SPMS, PPMS)	99	Liquor NfL	Keine Korrelation mit QIgG
Kuhle et al., 2011 (44)	KIS und MS (schubförmige MS, SPMS, PPMS)	150	Liquor NfH	Keine Korrelation mit IgG-, IgA- und IgM-Konzentration im Liquor und keine Korrelation mit QIgG

## Material und Methoden

### Material

#### Laborgeräte

Automatisiertes Messinstrument für Single Molecule Arrays	Quanterix® Simoa™ HD-1 Analyzer®, Produktnummer 100438-R
Zentrifugen	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

#### Laborzubehör

Probenplatten für Single Molecule Arrays	Quanterix® Simoa™ Discs
Microwell 96-Well Polypropylen-Platten mit V-Boden	Nunc®
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®
Serologische Einwegpipetten 5-25ml	Greiner Bio-One™
Falcon Röhrchen 15ml	Greiner Bio-One™
Falcon Röhrchen 50ml	Greiner Bio-One™

#### Reagenzien und Lösungen

Bead Reagenz	enthalten in Quanterix® Simoa™ NF-light® Kit, Produktnummer 102246
Detektionsreagenz	enthalten in Quanterix® Simoa™ NF-light® Kit, Produktnummer 102248
Streptavidin-β-galactosidase Reagenz	enthalten in Quanterix® Simoa™ NF-light® Kit, Produktnummer 102250
Probenverdünnungspuffer	enthalten in Quanterix® Simoa™ NF-light® Kit, Produktnummer 102252

Kalibrierungsreagenz	enthalten in Quanterix® Simoa™ NF-light® Kit, Produktnummer 102255
Resorufin D-galactopyranoside Reagenz	enthalten in Quanterix® Simoa™ NF-light® Kit, Produktnummer 103159

## Methoden

### Studiendesign

In diese Querschnittstudie eingeschlossen wurden 112 unbehandelte Patienten der Klinik und Poliklinik für Neurologie der Universitätsmedizin Mainz zum Zeitpunkt der Erstdiagnosestellung eines KIS oder einer schubförmigen MS.

Einschlusskriterien waren:

1. Erstdiagnosestellung eines KIS oder einer schubförmigen MS zum Zeitpunkt des Studieneinschlusses gemäß den revidierten McDonald-Kriterien von 2017 (16)
2. Vorliegen von gleichzeitig gewonnenen Liquor- und Serumproben zum Zeitpunkt des Studieneinschlusses
3. Vorliegen einer Schädel-MRT (und vorzugsweise auch einer spinalen MRT) zum Zeitpunkt des Studieneinschlusses
4. Lebensalter von mindestens 18 Jahren

Ausschlusskriterien waren:

1. Steroidtherapie innerhalb von 90 Tagen vor dem Zeitpunkt der Probengewinnung
2. Immunsuppressive oder immunmodulatorische Therapie zum Zeitpunkt der Probengewinnung

Neben demographischen Daten (Alter und Geschlecht), wurden die folgenden klinischen und paraklinischen Parameter erhoben:

- Auftreten eines Schubereignisses innerhalb von 90 Tagen vor Studieneinschluss (ja/nein) > Bei Vorliegen eines Schubereignisses zusätzliche Erfassung von:
  - Zeitspanne zwischen Auftreten der Schubsymptomatik und Studieneinschluss
  - Schubmanifestation, kategorisiert in: Spinal / zerebral / ON
- Klinische Einschränkung zum Zeitpunkt des Studieneinschlusses, gemessen durch Erhebung des Expanded Disability Status Scale (EDSS)
- Anzahl und Lokalisation T2-hyperintenser MRT-Läsionen
- Anzahl und Lokalisation KM-aufnehmender MRT-Läsionen

Um eine Einordnung der Höhe der sNfL-Konzentration der Patientenkohorte zu ermöglichen, wurden darüber hinaus Serumproben von 62 gesunden Kontrollprobanden gewonnen.

Alle Patienten und Probanden stimmten dem Studieneinschluss schriftlich zu, und der Ethikantrag (Antragsnummer 837.019.10) wurde von der lokalen Ethikkommission bewilligt.

### **Bestimmung der Liquorparameter**

Die Bestimmung der Liquorparameter erfolgte zentralisiert und standardisiert als Teil der Routine-Diagnostik im Rahmen der Diagnosefindung.

Die Bestimmung der Liquorkonzentrationen von Albumin, Immunglobulin A (IgA), IgG und Immunglobulin M (IgM) erfolgten dabei mittels Immunnephelometrie.

Die Liquor/Serum-Quotienten von Albumin (QAlb), IgA (QIgA), IgG (QIgG) und IgM (QIgM) wurden definiert als das Verhältnis von Liquor- zur jeweils korrespondierenden Serumkonzentration.

Alle Referenzwerte beziehen sich auf die Definitionen gemäß Berlit (49). Um Patienten mit einer intrathekalen Synthese von IgA, IgG und IgM zu identifizieren, wurde für jede Immunglobulin-Klasse mittels folgender Formel eine hyperbolische Funktion berechnet:

$$Ig_{loc} = Q(Ig) - a / b * (QAlb^2 + b^2)^{0,5} - c$$

Dabei steht  $Ig_{loc}$  für die lokale Ig-Synthese,  $Q(Ig)$  für den jeweiligen Immunglobulin-Quotienten und  $QAlb$  für den Albumin-Quotienten. Die Konstanten  $a$ ,  $b$  und  $c$  entsprechen empirischen Werten.

Der Nachweis der OKB erfolgte mittels isoelektrischer Fokussierung auf Agarose-Gel mit nachfolgendem Immun-Blotting mittels IgG-spezifischer Antikörper-Färbung. Wenn im Folgenden von positiven OKB gesprochen wird, sind OKB vom Typ 2 gemeint.



**Abbildung 3: Liquorspezifische oligoklonale Banden Typ 2**

Man unterscheidet fünf Typen von OKB. Bei Typ 1 ist kein oligoklonales IgG nachweisbar. Bei Typ 2 wird oligoklonales IgG im Liquor, nicht aber im Serum nachgewiesen. OKB vom Typ 2 sind hinweisend auf eine intrathekale IgG-Synthese. Bei Typ 3 ist oligoklonales IgG im Liquor nachweisbar. Zusätzlich bestehen identische OKB in Serum und Liquor. Typ 3-OKB sprechen für eine Störung der Blut-Hirn-Schranke in Kombination mit einer intrathekalen IgG-Synthese. Bei Typ 4 sind identische Banden in Liquor und Serum nachweisbar, was auf eine Störung der Blut-Hirn-Schranke hindeutet. Bei Typ 5 ist monoklonales IgG im Liquor als Hinweis auf eine systemische Paraproteinämie nachweisbar (49).

Abkürzungen: CSF: cerebrospinal fluid, S: Serum

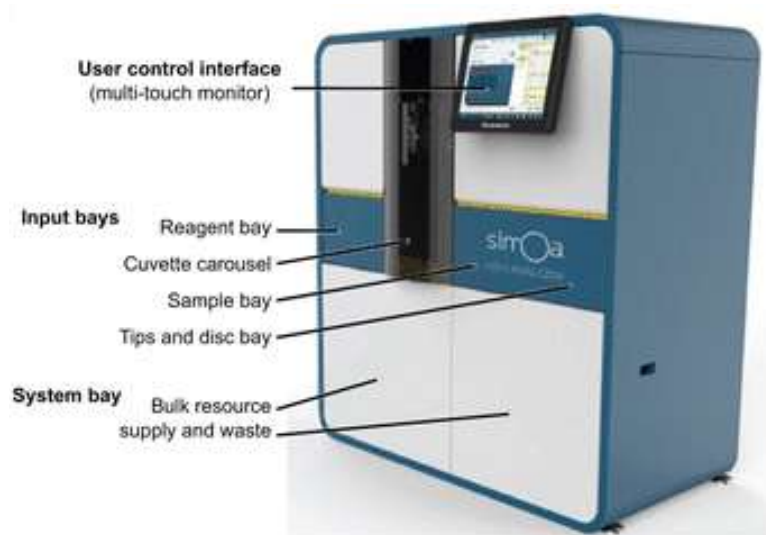
### **Bestimmung der sNfL-Konzentration mittels SiMoA**

Die Gewinnung von Serumproben der Patientenkohorte erfolgte parallel zur Lumbalpunktion. Darüber hinaus erfolgte die Entnahme von Serumproben von hinsichtlich Alter und Geschlecht gematchten gesunden Kontrollprobanden. Innerhalb von maximal 2 Stunden nach der Blutentnahme erfolgte eine Aufarbeitung der Serumproben mittels Zentrifugation bei 2000 g über 10 Minuten bei Raumtemperatur. Unmittelbar nach der Zentrifugation wurde das Serum gleichmäßig in Polypropylen-Tubes überführt (300–600 µl/tube) und bei -80 °C gelagert.

Wie bereits in früheren Publikationen beschrieben (25, 28), erfolgte die Bestimmung der sNfL-Konzentration gemäß den Anweisungen des Herstellers automatisiert mit dem Gerät SiMoA HD-1 (Quanterix, USA) unter Verwendung der NF-Light Advantage Kits (Quanterix, USA) aus der identischen Charge.

Die Berechnung des Variationskoeffizienten (CV, als Prozentsatz) jeder Probe erfolgte, indem die Standardabweichung beider Wiederholungen durch den Mittelwert beider Wiederholungen geteilt und anschließend mit 100 multipliziert wurde. Proben mit einem CV von mehr als 20% wurden zweimal gemessen, wie in früheren Veröffentlichungen beschrieben (26, 28). Der mittlere Intra-Assay-CV betrug 4,5%. Die sNfL-Messungen wurden gegenüber den klinischen Angaben verblindet durchgeführt.





**Abbildung 4: SiMoA HD-1-Analyser**

Der SiMoA HD-1-Analyser umfasst einen Bereich zur Einführung der Probenmaterialien, einen Touch-Monitor für die Einstellungen des Benutzers und einen Behälter zur Sammlung verbrauchter Materialien und der Überstände (50).

### **Auswertung der MRT-Befunde**

Die Durchführung der kernspintomographischen Untersuchungen erfolgte im Rahmen der klinischen Routinediagnostik bei Diagnosestellung. Die Beurteilung der Herdlast erfolgte durch die Bestimmung der Anzahl hyperintenser Läsionen in den T2-gewichteten Sequenzen sowie in den FLAIR- („fluid attenuated inversion recovery“-) Sequenzen. Zur Beurteilung der akuten MRT-Aktivität erfolgte die Bestimmung der Anzahl hyperintenser Läsionen in den kontrastmittelgestützten T1-gewichteten Aufnahmen.

### **Statistische Auswertung**

Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe von SPSS 23.0 (IBM Corp., USA) und Graph Pad Prism 7.0 (GraphPad Software, USA).

Kontinuierliche Variablen werden folgend durch ihren Median und den Interquartilsabstand beschrieben, kategoriale Variablen als ganze Zahlen und Prozentwerte.

Die Prüfung auf statistische Normalverteilung erfolgte mittels Kolmogorov-Smirnow- und Shapiro-Wilk-Test. Die sNfL-Konzentration und die Anzahl der Leukozyten im Liquor wurden für die folgenden Analysen logarithmiert, um eine bessere Normalverteilung zu erzielen.

Der Vergleich der sNfL-Konzentrationen zwischen zwei Gruppen erfolgte mittels Mann-Whitney U-Test und der Vergleich von mehr als zwei Gruppen mittels One-way ANOVA.

Korrelationen wurden mittels Korrelationsanalysen nach Spearman bestimmt.

Zur Bestimmung des Einflusses verschiedener klinischer, bildgebender und liquordiagnostischer Parameter auf die Höhe der sNfL-Konzentration erfolgte eine lineare Regressionsanalyse.

P-Werte  $< 0.05$  wurden als statistisch signifikant angesehen.

Aufgrund des explorativen Charakters dieser Studie wurde auf eine Korrektur für multiples Testen verzichtet.

# Ergebnisse

## Charakterisierung der Kohorte

### 1. Demographische Daten

#### a) Patientenkohorte

#### b) Gesunde Kontrollgruppe

Parameter	Anzahl (%)	Median (IQR)	Parameter	Anzahl (%)	Median (IQR)
<b>Alter</b> (Jahre)		33.5 (28-42)	<b>Alter</b> (Jahre)		30.0 (26-38)
<b>Geschlecht</b>			<b>Geschlecht</b>		
Männlich	36 (32.1%)		Männlich	21 (33.9%)	
Weiblich	76 (67.9%)		Weiblich	41 (66.1%)	

**Tabelle 2: Demographische Daten**

Es bestanden keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf Alter und Geschlechtsverteilung zwischen der Patientenkohorte und der Kontrollgruppe von gesunden Probanden.

### 2. Klinische Daten

Von den 112 in die Studie eingeschlossenen Patienten wurde bei 21 die Diagnose eines KIS und bei 91 die Diagnose einer schubförmigen MS gestellt.

70.5% der eingeschlossenen Patienten hatten innerhalb der letzten 90 Tage vor Studieneinschluss ein Schubereignis erlitten. Die mittlere Zeitspanne zwischen Einsetzen der Schubsymptomatik und Probengewinnung lag bei 14 Tagen.

26.6% der Patienten wurden in Form einer ON symptomatisch, 39.2% erlitten einen Schub mit zerebraler Manifestation und 34.2% einen Schub mit spinaler Symptomatik.

Der mittlere EDSS-Wert lag bei 2.0, was einer eher milden Beeinträchtigung entspricht.

**Tabelle 3: Übersicht klinischer Parameter**

Parameter	Anzahl (%)	Median (IQR)
<b>Diagnose</b>		
KIS	21 (18.8%)	
Schubförmige MS	91 (81.2%)	
<b>Schubereignis</b>		
Ja	79 (70.5%)	
Nein	33 (29.5%)	
<b>Zeitspanne zwischen Schub und Probengewinnung (Tage)</b>		14 (5-35)
<b>Schubmanifestation</b>		
Spinal	27 (34.2%)	
Zerebral	31 (39.2%)	
Optikusneuritis	21 (26.6%)	
<b>EDSS</b>		2.0 (1.0-2.5)

### 3. MRT Daten

Bei 44.6% der Patienten konnte zum Zeitpunkt der Probengewinnung mindestens eine KM-aufnehmende Läsion nachgewiesen werden.

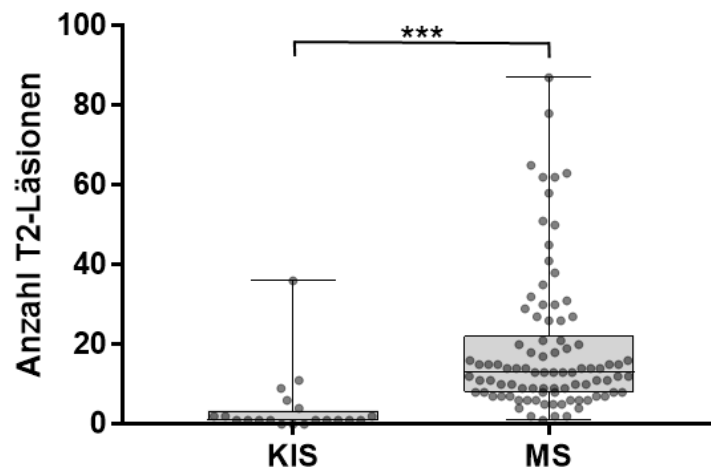
**Tabelle 4: Übersicht MRT-Befunde**

Parameter	Anzahl (%)	Median (IQR)
<b>KM-aufnehmende Läsionen</b>		
Ja	50 (44.6%)	
Nein	62 (55.4%)	

Fortsetzung Tabelle 4: Übersicht MRT-Befunde

Parameter	Anzahl (%)	Median (IQR)
<b>Anzahl KM-aufnehmender Läsionen</b>		
Alle Patienten		1 (0-2)
KIS		0 (0-1)
Schubförmige MS		1 (0-2)
<b>Anzahl T2-Läsionen</b>		
Alle Patienten		11 (6-22)
KIS		1 (1-5)
Schubförmige MS		13 (8-26)

Der Median der T2-hyperintensiven Läsionen aller Patienten lag bei 11, wobei die Patienten mit KIS (n=21, Median 1, IQR 1-5) deutlich weniger Läsionen aufwiesen als die Patienten mit schubförmiger MS (n=91, Median 13, IQR 8-26,  $p < 0.001$ ) (**Abb. 5**).



**Abbildung 5: Vergleich der T2-Läsionen zwischen KIS- und MS-Patienten**

Vergleich der T2-Läsionen zwischen Patienten mit KIS (n=21) und MS (n=91). Die horizontale Linie im Boxplot gibt den Median an. Die Boxen reichen von der 25. bis zur 75. Perzentile. Die Whisker geben Minimum und Maximum an. \*\*\*  $p < 0.001$ .

Abkürzungen: KIS: Klinisch isoliertes Syndrom, MS: Multiple Sklerose

#### 4. Liquorbefunde

In unserer Kohorte bestand im Mittel eine leichte Pleozytose von 6 Leukozyten/ $\mu$ l. Die Immunglobulin-Quotienten als Ausdruck der intrathekalen Immunglobulinsynthese waren ebenfalls leicht erhöht und die OKB waren bei 90.2% unserer Patienten positiv. Das Gesamteiweiß im Liquor und QAlb als Marker der Blut-Hirnschranken-Integrität lagen dagegen im Normalbereich.

In der Zusammenschau stimmen diese Ergebnisse mit den zu erwartenden Liquorveränderungen bei Patienten mit KIS und MS überein (15).

**Tabelle 5: Übersicht Liquorparameter**

Parameter	Anzahl (%)	Median (IQR)	Referenzwerte
<b>Leukozytenzahl</b> (/ $\mu$ l)		6 (4-10)	$\leq 4$
<b>Gesamteiweiß</b> (mg/dl)		34.1 (27.8-41.7)	15-40
<b>QAlb</b>		5.0 (3.8-6.1)	$\leq 6.5$ (<40 Jahre) $\leq 8$ (>40 Jahre)
<b>QIgG</b>		4.0 (2.8-5.4)	< 2.3
<b>QIgA</b>		1.5 (1.1-5.4)	< 1.3
<b>QIgM</b>		0.4 (0.2-0.9)	< 0.3
<b>OKB</b>			
Positiv	101 (90.2%)		
Negativ	11 (9.8%)		

## **Einfluss verschiedener Parameter auf die sNfL-Konzentration**

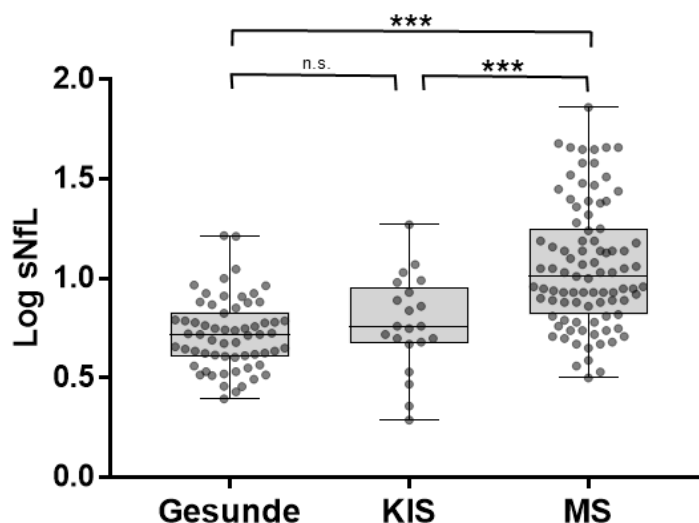
### **1. Demographische Parameter**

Innerhalb der Patientengruppe konnten keine geschlechtsabhängigen Unterschiede der sNfL-Konzentrationen festgestellt werden (männliche Patienten:  $n = 36$ , Median 10.95 pg/mL, IQR 6.93–16.82 pg/mL; weibliche Patienten:  $n = 76$ , Median 8.54 pg/mL, IQR 5.63–14.89 pg/mL;  $p = 0.350$ ).

Bei älteren Menschen muss prinzipiell das Alter als potentieller Einflussfaktor auf die sNfL-Konzentration berücksichtigt werden, da die Konzentration von sNfL insbesondere bei Menschen jenseits des 60. Lebensjahres, deutlich anzusteigen scheint (51). Im Gegensatz dazu finden sich bei jüngeren Patienten eher stabile sNfL-Werte. In Übereinstimmung dazu fanden wir in unserer Kohorte von jungen Patienten (medianes Alter 33.5 Jahre) keine Assoziation zwischen dem Alter der Patienten und der sNfL-Konzentration ( $r = -0.079$ ,  $p = 0.407$ ), sodass auf eine Alterskorrektur verzichtet werden konnte.

## 2. Klinische Parameter

Die sNfL-Konzentration von Patienten mit schubförmiger MS (n = 91, Median 10.13 pg/mL, IQR 6.67–17.77 pg/mL) war signifikant höher als die der hinsichtlich Alter und Geschlecht gematchten Kontrollprobanden (n = 62, Median 5.25 pg/mL, IQR 4.05–6.81 pg/mL,  $p < 0.001$ ) und die der Patienten mit KIS (n = 21, Median 5.69 pg/mL, IQR 4.73–9.07 pg/mL,  $p < 0.001$ ) (**Abb. 6**).



**Abbildung 6: Vergleich von sNfL zwischen Gesunden, KIS- und MS-Patienten**

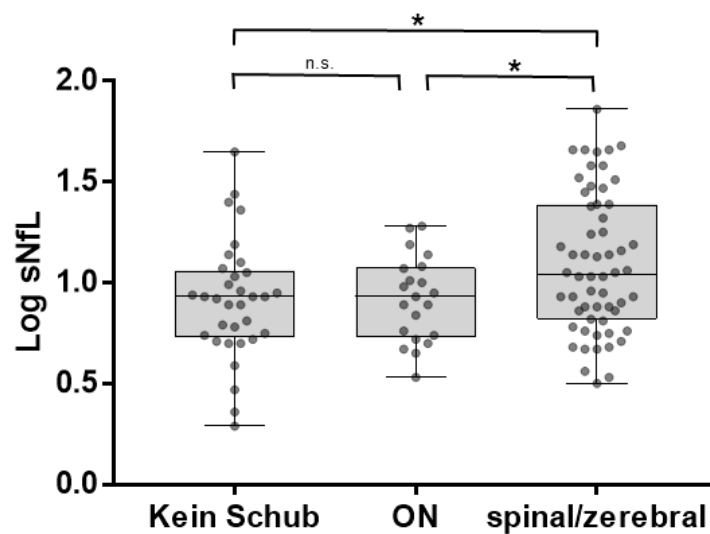
Vergleich der sNfL-Konzentration zwischen gesunden Kontrollprobanden (n=62), Patienten mit KIS (n=21) und Patienten mit MS (n=91). Die sNfL-Werte wurden in logarithmierter Form auf der Y-Achse aufgetragen. Die horizontale Linie im Boxplot gibt den Median an. Die Boxen reichen von der 25. bis zur 75. Perzentile. Die Whisker geben Minimum und Maximum an. \*\*\*  $p < 0.001$ .

Abkürzungen: KIS: Klinisch isoliertes Syndrom, MS: Multiple Sklerose, n.s.: nicht signifikant, sNfL: Neurofilament-Leichtketten im Serum

Verglichen mit klinisch stabilen Patienten (n = 33, Median 8.43 pg/mL, IQR 5.41–11.51 pg/mL) bestand bei Patienten mit Schubereignis (n = 79, Median 9.91 pg/mL, IQR 6.05–17.77 pg/mL) ein Trend zu etwas höheren sNfL-Konzentrationen, wobei die Unterschiede nicht signifikant ausfielen ( $p = 0.095$ ). Es bestanden ebenfalls keine signifikanten Korrelationen zwischen der Zeitspanne zwischen Beginn des Schubereignisses und Probengewinnung und der sNfL-Konzentration ( $r = 0.064$ ,  $p = 0.579$ ), sowie zwischen EDSS-Wert und sNfL-Konzentration ( $r = 0.114$ ,  $p = 0.233$ ).



Die Patienten mit Schub wurden hinsichtlich der klinischen Schubmanifestation in drei Kategorien unterteilt (zerebraler Schub, spinaler Schub und ON). In der Analyse dieser Subgruppen zeigte sich, dass Patienten mit zerebraler oder spinaler Schubmanifestation (n = 58, Median 10.95 pg/mL, IQR 6.62–24.61 pg/mL) höhere sNfL-Konzentrationen aufwiesen als Patienten mit ON (n = 21, Median 8.43 pg/mL, IQR 5.35–11.86 pg/mL, p = 0.022) und klinisch stabile Patienten (n = 33, Median 8.43 pg/mL, IQR 5.41–11.51 pg/m, p = 0.028) (**Abb. 7**).



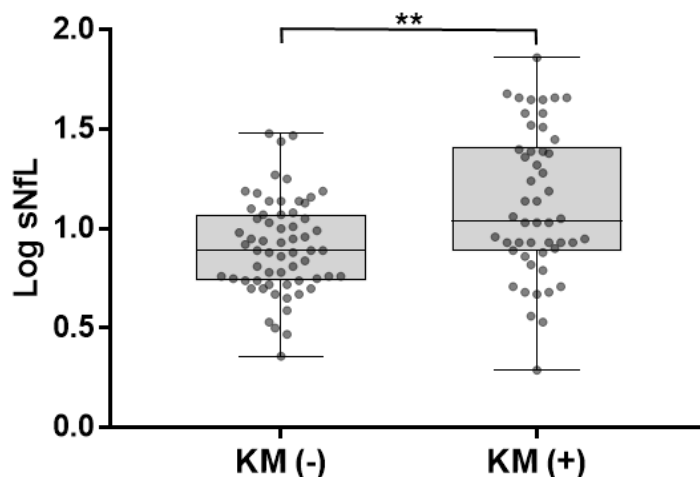
**Abbildung 7: Vergleich von sNfL abhängig von der Schubmanifestation**

Vergleich der sNfL-Konzentration zwischen drei Patientengruppen mit unterschiedlicher Schubmanifestation. Unterschieden wurde in Patienten ohne Schub (n=33), Patienten mit ON (n=21) und Patienten mit spinalem oder zerebralem Schubereignis (n=58). Die sNfL-Werte wurden in logarithmierter Form auf der Y-Achse aufgetragen. Die horizontale Linie im Boxplot gibt den Median an. Die Boxen reichen von der 25. bis zur 75. Perzentile. Die Whisker geben Minimum und Maximum an. \* p < 0.05.

Abkürzungen: n.s.: nicht signifikant, ON: Optikusneuritis, sNfL: Neurofilament-Leichtketten im Serum

### 3. Kernspintomographische Parameter

Das Vorliegen von KM-aufnehmenden MRT-Läsionen führte zu einem deutlichen Anstieg der sNfL-Konzentration (Patienten mit KM-Läsionen: n = 50, Median 10.98 pg/mL, IQR 7.67–26.11 pg/mL; Patienten ohne KM-Läsionen: n = 62, median 7.78 pg/mL, IQR 5.54–11.90 pg/mL, p = 0.001) (**Abb. 8**).

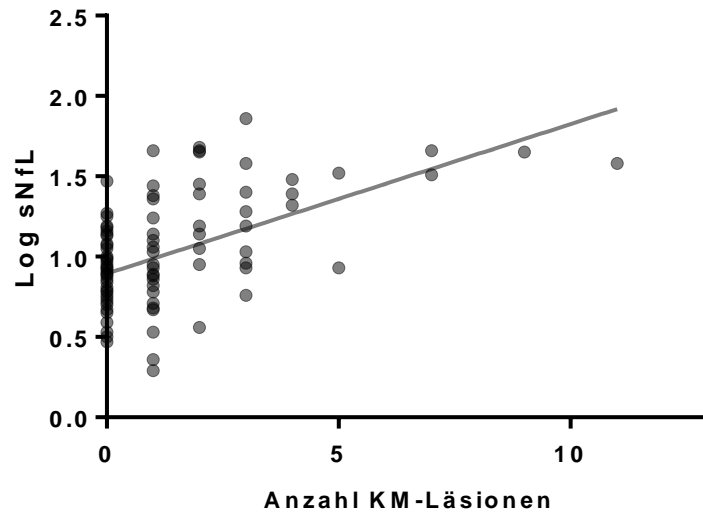


**Abbildung 8: Vergleich von sNfL abhängig von KM-aufnehmenden Läsionen**

Vergleich der sNfL-Konzentration zwischen Patienten mit (n=50) und ohne (n=62) Nachweis KM-aufnehmender MRT-Läsionen. Die sNfL-Werte wurden in logarithmierter Form auf der Y-Achse aufgetragen. Die horizontale Linie im Boxplot gibt den Median an. Die Boxen reichen von der 25. bis zur 75. Perzentile. Die Whisker geben Minimum und Maximum an. \*\* p < 0.01.

Abkürzungen: KM: Kontrastmittel, MRT: Magnetresonanztomographie, sNfL: Neurofilament-Leichtketten im Serum

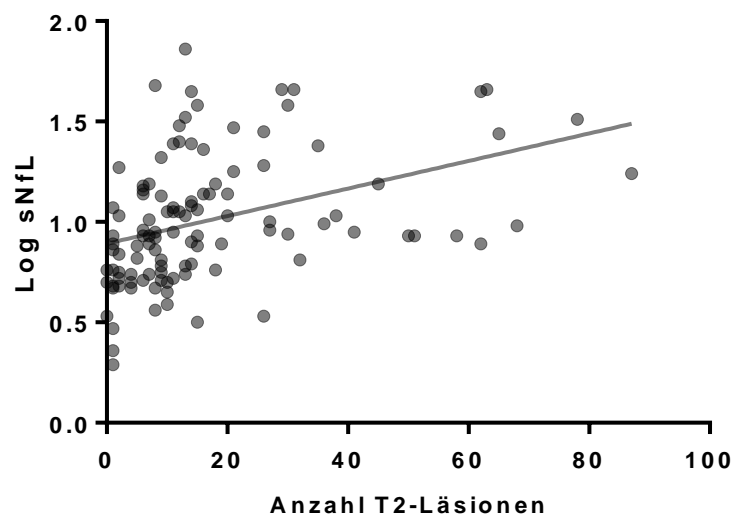
Darüber hinaus korrelierte die sNfL-Konzentration sowohl mit der Anzahl KM-aufnehmender Läsionen ( $r = 0.489$ ,  $p < 0.001$ ) (**Abb. 9**) als auch mit der Anzahl T2-hyperintenser Herde ( $r = 0.496$ ,  $p < 0.001$ ) (**Abb. 10**).



**Abbildung 9: Korrelation von sNfL und Anzahl KM-aufnehmender Läsionen**

Korrelation zwischen der sNfL-Konzentration und der Anzahl KM-aufnehmender MRT-Läsionen. Die sNfL-Werte wurden in logarithmierter Form auf der Y-Achse aufgetragen.

Abkürzungen: KM: Kontrastmittel, MRT: Magnetresonanztomographie, sNfL: Neurofilament-Leichtketten im Serum



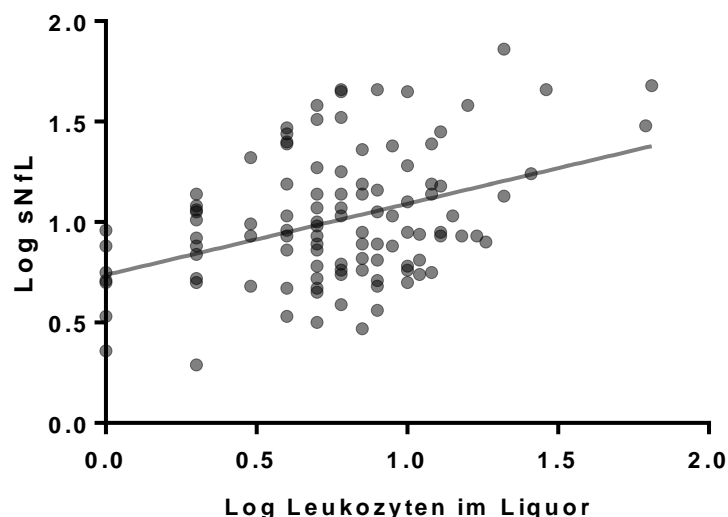
**Abbildung 10: Korrelation von sNfL und Anzahl der T2-Läsionen**

Korrelation zwischen der sNfL-Konzentration und der Anzahl der T2-Läsionen im der MRT. Die sNfL-Werte wurden in logarithmierter Form auf der Y-Achse aufgetragen.

Abkürzungen: MRT: Magnetresonanztomographie, sNfL: Neurofilament-Leichtketten im Serum

## 5. Liquorparameter der akuten ZNS-Entzündung

Die Anzahl der Leukozyten im Liquor wies eine signifikante Korrelation mit der Höhe der sNfL-Konzentration auf ( $r = 0.288$ ,  $p = 0.002$ ) (**Abb. 11**).



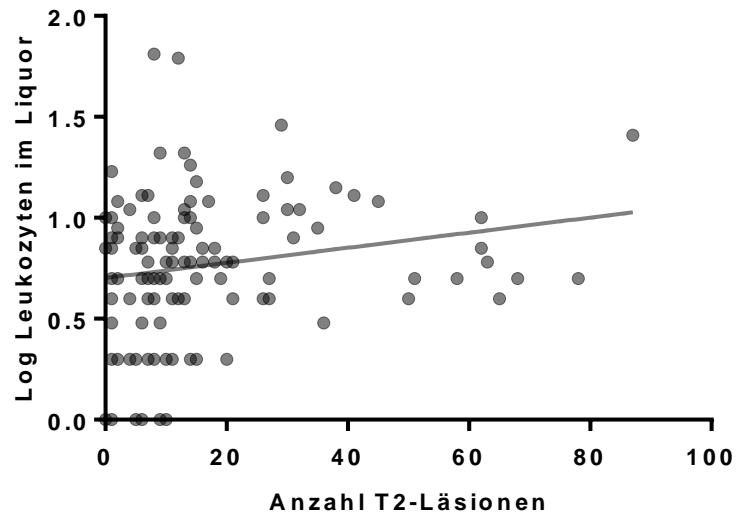
**Abbildung 11: Korrelation von sNfL und Leukozyten im Liquor**

Korrelation zwischen der sNfL-Konzentration und der Anzahl der Leukozyten im Liquor. Die sNfL-Werte wurden in logarithmierter Form auf der Y-Achse aufgetragen, die Leukozytenzahl in logarithmierter Form auf der X-Achse.

Abkürzungen: sNfL: Neurofilament-Leichtketten im Serum

Darüber hinaus bestand ebenfalls eine signifikante Korrelation zwischen der Leukozytenzahl im Liquor und der Anzahl T2-hyperintenser ( $r = 0.209$ ,  $p = 0.027$ ) (**Abb. 12**) sowie KM-aufnehmender MRT-Läsionen ( $r = 0.215$ ,  $p = 0.023$ ) (**Abb. 13**).

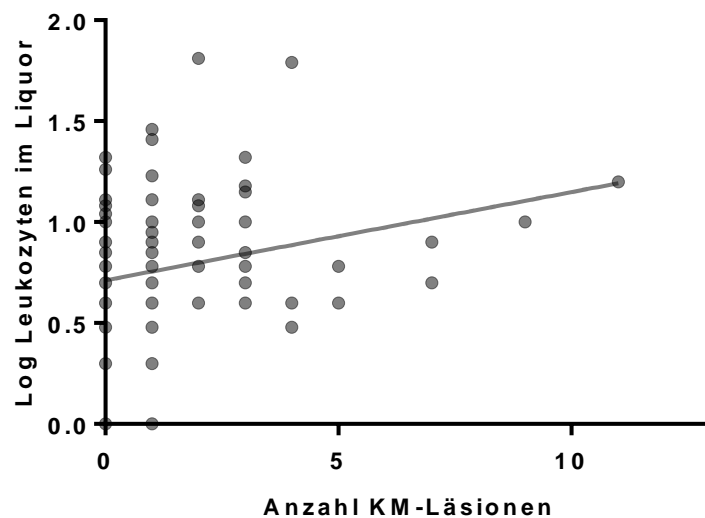
Insgesamt wiesen nur 13 Patienten eine Störung der Blut-Hirnschranke auf. Es zeigte sich weder eine Korrelation zwischen der Albuminkonzentration im Liquor mit der sNfL-Konzentration ( $r = -0.050$ ,  $p = 0.597$ ) noch zwischen deren Verhältnis zur Albuminkonzentration im Serum QAlb und sNfL ( $r = -0.055$ ,  $p = 0.562$ ).



**Abbildung 12: Korrelation von Leukozytenzahl und T2-Läsionen**

Korrelation zwischen der Anzahl der Leukozyten im Liquor und der Anzahl T2-hyperintenser Läsionen in der MRT. Die Leukozytenzahl wurde in logarithmierter Form auf der Y-Achse aufgetragen.

Abkürzungen: MRT: Magnetresonanztomographie



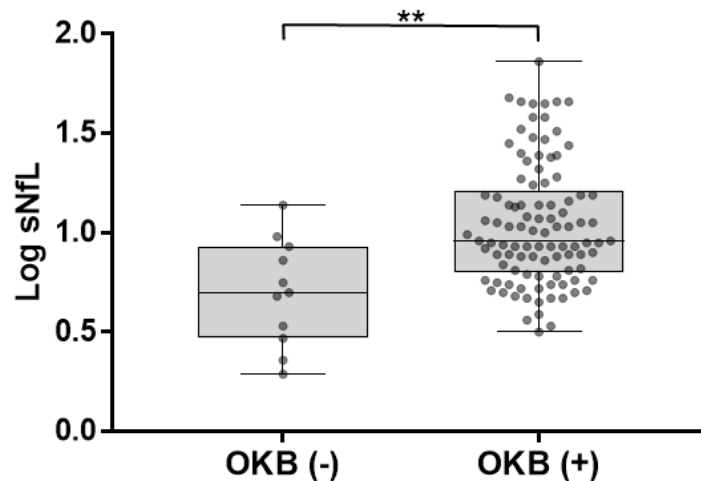
**Abbildung 13: Korrelation von Leukozytenzahl und KM-Läsionen**

Korrelation zwischen der Anzahl der Leukozyten im Liquor und der Anzahl KM-aufnehmender MRT-Läsionen. Die Leukozytenzahl wurde in logarithmierter Form auf der Y-Achse aufgetragen.

Abkürzungen: KM: Kontrastmittel, MRT: Magnetresonanztomographie

## 6. Liquorparameter der chronischen ZNS-Entzündung

Patienten mit positiven OKB wiesen deutlich höhere sNfL-Konzentrationen auf als OKB-negative Patienten (OKB-positive Patienten: n = 101, median 9.19 pg/mL, IQR 6.34–16.38 pg/mL; OKB-negative Patienten: n = 11, Median 5.93 pg/mL, IQR 2.93–8.56 pg/mL, p = 0.001) (**Abb. 14**).



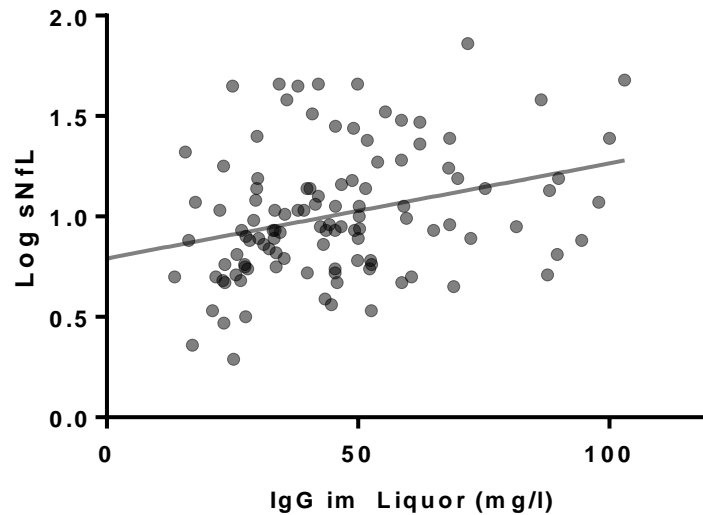
**Abbildung 14: Vergleich von sNfL abhängig vom OKB-Status**

Vergleich der sNfL-Konzentration zwischen OKB-negativen (n=11) und OKB-positiven Patienten (n=101). Die sNfL-Werte wurden in logarithmierter Form auf der Y-Achse aufgetragen. Die horizontale Linie im Boxplot gibt den Median an. Die Boxen reichen von der 25. bis zur 75. Perzentile. Die Whisker geben Minimum und Maximum an. \*\* p < 0.01.

Abkürzungen: OKB: Oligoklonale Banden, sNfL: Neurofilament-Leichtketten im Serum

Die IgG-Konzentration im Liquor (r = 0.317, p = 0.001) (**Abb. 15**) und der IgG-Quotient (QlgG) (r = 0.344, p < 0.001) (**Abb. 16**) zeigten eine moderate Korrelation mit der sNfL-Konzentration.

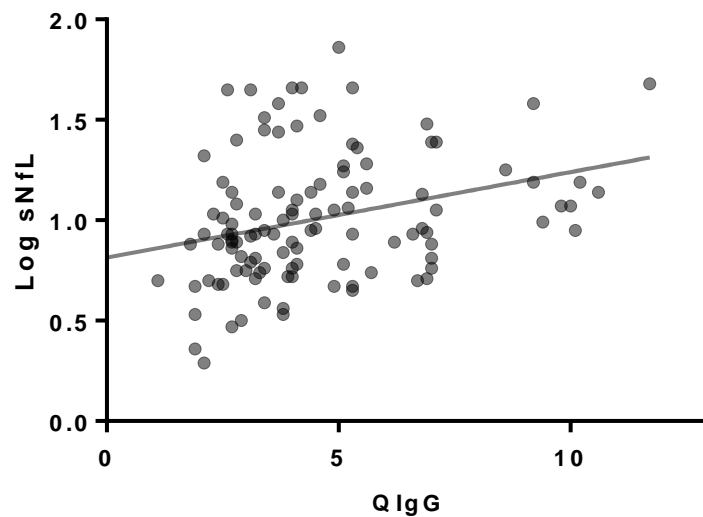
Weder die IgA-Konzentration im Liquor (r = -0.030, p = 0.753) noch die von IgM (r = 0.128, p = 0.182) korrelierten mit der sNfL-Konzentration. Ebenso bestand auch keine Assoziation zwischen der sNfL-Konzentration und den jeweiligen Liquor/Serum-Quotienten QlgA (r = 0.106, p = 0.267) und QlgM (r = 0.170, p = 0.072).



**Abbildung 15: Korrelation von sNfL und IgG im Liquor**

Korrelation zwischen der sNfL-Konzentration und der IgG-Konzentration im Liquor. Die sNfL-Werte wurden in logarithmierter Form auf der Y-Achse aufgetragen.

Abkürzungen: IgG: Immunglobulin G, sNfL: Neurofilament-Leichtketten im Serum



**Abbildung 16: Korrelation von sNfL und QIgG**

Korrelation zwischen der sNfL-Konzentration und dem Liquor/Serum-Quotienten von IgG. Die sNfL-Werte wurden in logarithmierter Form auf der Y-Achse aufgetragen.

Abkürzungen: IgG: Immunglobulin G, sNfL: Neurofilament-Leichtketten im Serum

## Regressionsanalyse

Die multiple Regressionsanalyse mit Variablenselektion zeigte auf, dass die Anzahl KM-aufnehmender Läsionen und die Anzahl der Leukozyten im Liquor am besten in der Lage waren, die sNfL-Konzentration vorherzusagen. Zusammengefasst führte eine Erhöhung der Leukozytenzahl im Liquor um eine Zelle zu einer absoluten Erhöhung der sNfL-Konzentration um 0.434 pg/ml und jede KM-aufnehmende Läsion zu einem Anstieg um 3.390 pg/ml. Bei Betrachtung des standardisierten Regressionskoeffizienten  $\beta$  fiel auf, dass sich der Effekt, der durch einen Anstieg der Leukozyten erklärt werden konnte, nur leicht von dem der KM-aufnehmenden MRT-Läsionen unterschied ( $\beta = 0.332$  gegenüber  $\beta = 0.532$ ).

**Tabelle 6: Ergebnisse der Regressionsanalyse**

Parameter	Regressionskoeffizient	Standardisierter Regressionskoeffizient $\beta$	P-Wert
(Konstante)	6.063		0.001
Leukozytenzahl	0.434	0.332	<0.001
Anzahl KM-aufnehmender Läsionen	3.390	0.532	<0.001



## Diskussion

Es ist anzunehmen, dass bei der MS eine Vielzahl pathologischer Prozesse zur Gesamtheit der neuroaxonalen Schädigung mit konsekutivem Anstieg der sNfL-Konzentration beitragen. Dazu gehören unter anderem oxidativer Stress, mitochondriale Schädigung, direkte T Zell-vermittelte neuronale Schädigung und die toxische Akkumulation synaptischer Proteine (10, 52, 53). Bisher war noch wenig darüber bekannt, ob das Ausmaß der sNfL-Erhöhung vornehmlich auf fokale akute Entzündungen zurückzuführen ist oder ob es vielmehr von anhaltenden, chronischen neurodegenerativen Prozessen bestimmt wird.

Die Analyse des Liquors erlaubt durch seine direkte Lagebeziehung zum Ort des Krankheitsgeschehens die bisher bestmögliche Beurteilung aktiver und chronischer Entzündungsprozesse des ZNS. In dieser Arbeit untersuchten wir daher den Zusammenhang verschiedener etablierter Liquorparameter mit Veränderungen der sNfL-Konzentration, um den Einfluss entzündlicher ZNS-Prozesse auf die sNfL-Konzentration bei MS-Patienten einzuschätzen. Wir konnten dabei aufzeigen, dass die sNfL-Konzentration sowohl mit Markern chronischer Entzündungen (intrathekale Immunglobulin G-Synthese) als auch mit Markern akuter Entzündungsreaktionen (Liquorpleozytose) korreliert. Da die sNfL-Konzentration das Ausmaß neuroaxonaler Schädigungen abbildet, erlaubt dies den Rückschluss, dass bei der MS beide Formen entzündlicher Aktivität an der Schädigung von Neuronen und deren Axonen beteiligt sind.

Die intrathekale IgG-Synthese ist ein etablierter Marker der chronischen ZNS-Inflammation. Sie wird abgebildet durch eine Erhöhung von QIgG, den Nachweis von OKB vom Typ 2 und durch eine positive Masern-Röteln-Zoster-(MRZ-)Reaktion. Einmal erworben, besteht sie im weiteren Krankheitsverlauf meist unverändert fort (20). In unserer Kohorte war die sNfL-Konzentration bei OKB-positiven Patienten im Vergleich zu OKB-Negativen deutlich erhöht, und es bestand eine Korrelation zwischen der sNfL-Konzentration und der IgG-Konzentration im Liquor sowie mit QIgG. Unsere Erkenntnis, dass OKB-Positivität mit höheren sNfL-Konzentrationen einhergeht, wird durch eine frühere Studie gestützt, die für NfL im Liquor zu dem gleichen Ergebnis gekommen war (45). Andere fanden dagegen keine Assoziation zwischen Neurofilament und der intrathekalen Immunglobulin-Synthese (44, 46). In den letztgenannten Studien wurde jedoch nicht NfL, sondern NfH im Liquor untersucht, sodass die gegenläufigen Resultate möglicherweise auf unterschiedliche

biochemische und pathophysiologische Eigenschaften von NfL und NfH zurückgeführt werden könnten.

Akute Entzündungsprozesse werden im Liquor durch einen Anstieg der Leukozytenzahl und des Albumin-Quotienten abgebildet. In der aktuellen Arbeit konnten wir eine signifikante Korrelation zwischen der sNfL-Konzentration und der Leukozytenzahl im Liquor nachweisen. Vergleichbares wurde bereits in früheren Studien für NfL im Liquor bestätigt (35, 38, 54). Bei Patienten, die mit dem monoklonalen B Zell-depletierenden Antikörper Ocrelizumab behandelt wurden, konnte zudem festgestellt werden, dass es nach Therapieinitiierung zu einer korrespondierenden Abnahme der Leukozytenzahl im Liquor und der Konzentration von Neurofilament im Serum gekommen war. Hieraus wurde die Hypothese abgeleitet, dass die Anzahl inflammatorischer Zellen im Liquor einen prädiktiven Wert für das Ausmaß axonaler Schäden aufweist (55). In Kohorten von Patienten mit chronisch verlaufender MS wurde dagegen keine Assoziation zwischen der Neurofilament-Konzentration und einer intrathekalen Pleozytose gefunden (37, 54). Übereinstimmend mit klinischen Erfahrungswerten, deutet dies darauf hin, dass die akute Entzündungsaktivität bei der chronischen MS weniger ins Gewicht fällt als beim KIS und bei der schubförmigen MS.

Albumin wird ausschließlich extrathekal synthetisiert, sodass seine Konzentration im Liquor nicht durch die neuronale Homeostase oder neurodegenerative Prozesse beeinflusst wird (56). Daher gilt QAlb als verlässlicher Indikator der Blut-Hirn-Schranken-Integrität (57, 58). In unserer Studie konnten wir keine Assoziation zwischen der Höhe von QAlb und der sNfL-Konzentration nachweisen. Allerdings lag QAlb bei der Mehrzahl unserer Patienten (88%), wie es für eine Kohorte junger MS-Patienten zu erwarten war, im Normalbereich. Auch in der überwiegenden Mehrheit der früher publizierten Studien fand sich kein Zusammenhang zwischen der Höhe von QAlb und der NfL-Konzentration von MS Patienten (31, 41-43). Bei Erkrankungen, die mit eher ausgeprägten Störungen der Blut-Hirn-Schranke einhergehen, wie etwa die schwere vaskuläre Demenz (40) und die HIV-Enzephalopathie (39), besteht dagegen eine Assoziation zwischen QAlb und der Konzentration von Neurofilament. Es ist daher zu vermuten, dass die Konzentration von NfL in der Peripherie erst durch ausgeprägte Störungen der Blut-Hirn-Schranken-Integrität beeinflusst wird.

Neben den bereits geschilderten Untersuchungen zur Assoziation von Liquorbefunden und der Konzentration von sNfL, wurde in dieser Arbeit auch eine Reihe von

demographischen, klinischen und bildgebenden Parametern berücksichtigt, um eine möglichst umfassende Interpretation der Einflussfaktoren auf Veränderungen der sNfL-Konzentration zu ermöglichen.

Wie bereits durch andere beschrieben (24, 26), wurde die sNfL-Konzentration auch in unserer Kohorte nicht durch das Geschlecht der Patienten beeinflusst. Auch das Lebensalter korrelierte nicht mit der sNfL-Konzentration, was wahrscheinlich durch das verhältnismäßig junge Durchschnittsalter der Patienten unserer Kohorte erklärt werden kann. Bei älteren Menschen ist jedoch davon auszugehen, dass die sNfL-Konzentration durch altersabhängige neurodegenerative Prozesse ansteigt (3).

Obwohl in unserer Arbeit weder das alleinige Vorliegen eines Schubereignisses noch die Höhe des EDSS-Wertes mit einer signifikanten Zunahme der sNfL-Konzentration verbunden waren, fanden wir dennoch, dass die sNfL-Konzentration von klinischen Parametern beeinflusst wird. So wiesen Patienten, die in Form einer ON symptomatisch wurden, deutlich niedrigere sNfL-Konzentrationen auf als Patienten mit zerebraler oder spinaler Schubmanifestation. Eine frühere Arbeit konnte ebenfalls einen Einfluss der Lokalisation des Entzündungsherd auf die Konzentration von NfL nachweisen. So wiesen Patienten mit einer spinalen Schubsymptomatik in dieser Untersuchung eine zweimal höhere Konzentration von NfH im Liquor auf als Patienten mit einem zerebralen Schub (44). Ein möglicher Erklärungsansatz für diese Ergebnisse könnte sein, dass ZNS-Kompartimente mit einem größeren Volumen nach Schädigung auch eine höhere absolute Menge von NfL freisetzen können.

Neben dem Einfluss von klinischen Befunden auf die sNfL-Konzentration, ist insbesondere auch der von (subklinischen) MRT-Veränderungen nicht zu unterschätzen. So bestand in unserer Arbeit eine deutliche Korrelation zwischen der Anzahl von T2-hyperintensiven MRT-Läsionen und der Höhe der sNfL-Konzentration. Patienten mit KM-aufnehmenden Läsionen wiesen deutlich höhere sNfL-Konzentrationen auf als Patienten ohne KM-aufnehmende Läsionen und auch die Anzahl der KM-aufnehmenden Läsionen korrelierte signifikant mit der sNfL-Konzentration. Diese Ergebnisse stimmen sowohl mit denen früherer eigener Arbeiten (28, 59) als auch mit denen anderer Arbeitsgruppen (25-27) überein. Interessanterweise bestand in unserer Arbeit ebenfalls eine signifikante Assoziation zwischen der Anzahl T2-hyperintenser sowie KM-aufnehmender Läsionen und der Leukozytenzahl im Liquor.

Zusammenfassend unterstützen die Ergebnisse unserer Studie zwar das Potential von sNfL als Biomarker bei der MS, machen aber auch deutlich, dass sNfL für sich allein genommen keine Differenzierung zwischen akuter und chronischer Entzündung erlaubt. Darüber hinaus wird seine Konzentration auch durch eine Reihe von klinischen und bildgebenden Faktoren beeinflusst. Eine alleinige Bewertung von sNfL ohne Berücksichtigung weiterer Befunde birgt somit die Gefahr einer Fehleinschätzung der Krankheitsaktivität.

Um festzustellen, welche der genannten Faktoren in unserer Kohorte den stärksten Einfluss auf die sNfL-Konzentration ausübten, erfolgte die Durchführung einer Regressionsanalyse. Hier zeigte sich, dass die Anzahl KM-aufnehmender MRT-Läsionen in Zusammenschau mit der Anzahl der Leukozyten im Liquor am besten dazu in der Lage war, den sNfL-Wert vorherzusagen. Sowohl bei den KM-aufnehmenden Läsionen als auch bei der Liquorpleozytose handelt es sich um Marker, die eher die akut-entzündliche Komponente der Erkrankung widerspiegeln. Dies deutet darauf hin, dass das Ausmaß akuter Nervenschäden jenes der chronischen Neurodegeneration, zumindest in frühen und aktiven Stadien der Erkrankung, wie sie durch unsere Kohorte abgebildet wird, deutlich übersteigt.

Abschließend ist somit festzustellen, dass eine Interpretation von sNfL nur in Zusammenschau mit weiteren klinischen, paraklinischen und auch laborchemischen Parametern möglich ist. In einer früheren Arbeit konnten wir beispielsweise aufzeigen, dass durch die Kombination von NfL im Serum oder Liquor und der CD20+/CD14+-Ratio im Liquor, einem Marker für intrathekale B-Zellen, zwischen Patienten mit kernspintomographisch determiniertem gutartigem und aggressivem Krankheitsverlauf unterschieden werden kann (59). Erstrebenswert wäre also die Etablierung eines kombinierten Biomarkers, der es ermöglicht, sowohl die aktuelle Krankheitsaktivität als auch die Prognose von MS-Patienten sicher einzuschätzen und hierdurch individuelle Therapiekonzepte zu ermöglichen.

## **Zusammenfassung**

Als wesentliche Ergebnisse dieser Arbeit konnte festgestellt werden, dass die Höhe der sNfL-Konzentration sowohl mit der Anzahl der Leukozyten im Liquor als auch mit dem Ausmaß der intrathekalen Immunglobulin G-Synthese assoziiert war. Patienten mit positiven OKB wiesen deutlich höhere sNfL-Werte auf als Patienten, bei denen keine OKB nachgewiesen werden konnten. In der Regressionsanalyse wies die Anzahl der Leukozyten im Liquor in Kombination mit der Anzahl KM-aufnehmender MRT-Läsionen den höchsten prädiktiven Wert für die Höhe der sNfL-Konzentration auf.

Daneben zeigte sich, dass die sNfL-Konzentrationen bei Patienten mit schubförmiger MS signifikant höher lagen als bei Patienten mit KIS und bei gesunden Kontrollprobanden. Patienten mit klinischem Schubereignis zum Zeitpunkt der Probengewinnung zeigten einen Trend zu höheren sNfL-Werten, wobei die Unterschiede hierbei nicht signifikant ausfielen. Unter Berücksichtigung der klinischen Schublokalisierung konnte dagegen festgestellt werden, dass Patienten mit zerebraler oder spinaler Schubmanifestation deutlich höhere sNfL-Werte aufwiesen als Patienten mit ON und Patienten mit klinisch stabilem Krankheitsverlauf. Auch die begleitend erhobenen MRT-Befunde zeigten einen signifikanten Einfluss auf die sNfL-Konzentration. Sowohl die Anzahl aktiver KM-aufnehmender Herde als auch die generelle Läsionslast korrelierten mit der Höhe der sNfL-Konzentration.

Zusammenfassend belegen diese Ergebnisse, dass die sNfL-Konzentration sowohl durch akute als auch durch chronische Entzündungsprozesse im Liquor beeinflusst wird. Darüber hinaus wird deutlich, dass eine Interpretation der sNfL-Konzentration bisher nur in Zusammenschau mit weiteren klinischen und paraklinischen Befunden zielführend ist. Ein kombinierter Biomarker, der alle genannten Aspekte berücksichtigt, könnte somit zur Optimierung der individuellen Patientenversorgung beitragen.

## Literaturverzeichnis

1. Correale J, Gaitan MI, Ysraelit MC, Fiol MP. Progressive multiple sclerosis: from pathogenic mechanisms to treatment. *Brain*. 2017;140(3):527-46.
2. Dendrou CA, Fugger L, Friese MA. Immunopathology of multiple sclerosis. *Nat Rev Immunol*. 2015;15(9):545-58.
3. Khalil M, Teunissen CE, Otto M, Piehl F, Sormani MP, Gattlinger T, et al. Neurofilaments as biomarkers in neurological disorders. *Nat Rev Neurol*. 2018;14(10):577-89.
4. Khalil M, Salzer J. CSF neurofilament light: A universal risk biomarker in multiple sclerosis? *Neurology*. 2016;87(11):1068-9.
5. Compston A, Coles A. Multiple sclerosis. *Lancet*. 2002;359(9313):1221-31.
6. Funfschilling U, Supplie LM, Mahad D, Boretius S, Saab AS, Edgar J, et al. Glycolytic oligodendrocytes maintain myelin and long-term axonal integrity. *Nature*. 2012;485(7399):517-21.
7. Lee Y, Morrison BM, Li Y, Lengacher S, Farah MH, Hoffman PN, et al. Oligodendroglia metabolically support axons and contribute to neurodegeneration. *Nature*. 2012;487(7408):443-8.
8. DeLuca GC, Williams K, Evangelou N, Ebers GC, Esiri MM. The contribution of demyelination to axonal loss in multiple sclerosis. *Brain*. 2006;129(Pt 6):1507-16.
9. Frischer JM, Bramow S, Dal-Bianco A, Lucchinetti CF, Rauschka H, Schmidbauer M, et al. The relation between inflammation and neurodegeneration in multiple sclerosis brains. *Brain*. 2009;132(Pt 5):1175-89.
10. Friese MA, Schattling B, Fugger L. Mechanisms of neurodegeneration and axonal dysfunction in multiple sclerosis. *Nat Rev Neurol*. 2014;10(4):225-38.
11. Popescu BF, Lucchinetti CF. Pathology of demyelinating diseases. *Annu Rev Pathol*. 2012;7:185-217.
12. Chard DT, Griffin CM, Parker GJ, Kapoor R, Thompson AJ, Miller DH. Brain atrophy in clinically early relapsing-remitting multiple sclerosis. *Brain*. 2002;125(Pt 2):327-37.
13. Miller DH, Barkhof F, Frank JA, Parker GJ, Thompson AJ. Measurement of atrophy in multiple sclerosis: pathological basis, methodological aspects and clinical relevance. *Brain*. 2002;125(Pt 8):1676-95.
14. Barkhof F, Calabresi PA, Miller DH, Reingold SC. Imaging outcomes for neuroprotection and repair in multiple sclerosis trials. *Nat Rev Neurol*. 2009;5(5):256-66.
15. Deisenhammer F, Zetterberg H, Fitzner B, Zettl UK. The Cerebrospinal Fluid in Multiple Sclerosis. *Front Immunol*. 2019;10:726.
16. Thompson AJ, Banwell BL, Barkhof F, Carroll WM, Coetzee T, Comi G, et al. Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria. *Lancet Neurol*. 2018;17(2):162-73.
17. Stangel M, Fredrikson S, Meinl E, Petzold A, Stuve O, Tumani H. The utility of cerebrospinal fluid analysis in patients with multiple sclerosis. *Nat Rev Neurol*. 2013;9(5):267-76.
18. Komori M, Blake A, Greenwood M, Lin YC, Kosa P, Ghazali D, et al. Cerebrospinal fluid markers reveal intrathecal inflammation in progressive multiple sclerosis. *Ann Neurol*. 2015;78(1):3-20.

19. Stuve O, Marra CM, Jerome KR, Cook L, Cravens PD, Cepok S, et al. Immune surveillance in multiple sclerosis patients treated with natalizumab. *Ann Neurol*. 2006;59(5):743-7.
20. Bonnan M. Intrathecal IgG synthesis: a resistant and valuable target for future multiple sclerosis treatments. *Mult Scler Int*. 2015;2015:296184.
21. Lucchinetti CF, Popescu BF, Bunyan RF, Moll NM, Roemer SF, Lassmann H, et al. Inflammatory cortical demyelination in early multiple sclerosis. *N Engl J Med*. 2011;365(23):2188-97.
22. Rocca MA, Battaglini M, Benedict RH, De Stefano N, Geurts JJ, Henry RG, et al. Brain MRI atrophy quantification in MS: From methods to clinical application. *Neurology*. 2017;88(4):403-13.
23. Kuhle J, Barro C, Disanto G, Mathias A, Sonesson C, Bonnier G, et al. Serum neurofilament light chain in early relapsing remitting MS is increased and correlates with CSF levels and with MRI measures of disease severity. *Mult Scler*. 2016;22(12):1550-9.
24. Disanto G, Adiutori R, Dobson R, Martinelli V, Dalla Costa G, Runia T, et al. Serum neurofilament light chain levels are increased in patients with a clinically isolated syndrome. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2016;87(2):126-9.
25. Disanto G, Barro C, Benkert P, Naegelin Y, Schadelin S, Giardiello A, et al. Serum Neurofilament light: A biomarker of neuronal damage in multiple sclerosis. *Ann Neurol*. 2017;81(6):857-70.
26. Barro C, Benkert P, Disanto G, Tsagkas C, Amann M, Naegelin Y, et al. Serum neurofilament as a predictor of disease worsening and brain and spinal cord atrophy in multiple sclerosis. *Brain*. 2018;141(8):2382-91.
27. Dalla Costa G, Martinelli V, Sangalli F, Muiola L, Colombo B, Radaelli M, et al. Prognostic value of serum neurofilaments in patients with clinically isolated syndromes. *Neurology*. 2019;92(7):e733-e41.
28. Siller N, Kuhle J, Muthuraman M, Barro C, Uphaus T, Groppa S, et al. Serum neurofilament light chain is a biomarker of acute and chronic neuronal damage in early multiple sclerosis. *Mult Scler*. 2019;25(5):678-86.
29. Kuhle J, Disanto G, Lorscheider J, Stites T, Chen Y, Dahlke F, et al. Fingolimod and CSF neurofilament light chain levels in relapsing-remitting multiple sclerosis. *Neurology*. 2015;84(16):1639-43.
30. Gunnarsson M, Malmstrom C, Axelsson M, Sundstrom P, Dahle C, Vrethem M, et al. Axonal damage in relapsing multiple sclerosis is markedly reduced by natalizumab. *Ann Neurol*. 2011;69(1):83-9.
31. Novakova L, Zetterberg H, Sundstrom P, Axelsson M, Khademi M, Gunnarsson M, et al. Monitoring disease activity in multiple sclerosis using serum neurofilament light protein. *Neurology*. 2017;89(22):2230-7.
32. Rissin DM, Walt DR. Digital readout of target binding with attomole detection limits via enzyme amplification in femtoliter arrays. *J Am Chem Soc*. 2006;128(19):6286-7.
33. Rissin DM, Walt DR. Digital concentration readout of single enzyme molecules using femtoliter arrays and Poisson statistics. *Nano Lett*. 2006;6(3):520-3.
34. Rissin DM, Kan CW, Campbell TG, Howes SC, Fournier DR, Song L, et al. Single-molecule enzyme-linked immunosorbent assay detects serum proteins at subfemtomolar concentrations. *Nat Biotechnol*. 2010;28(6):595-9.
35. Norgren N, Sundstrom P, Svenningsson A, Rosengren L, Stigbrand T, Gunnarsson M. Neurofilament and glial fibrillary acidic protein in multiple sclerosis. *Neurology*. 2004;63(9):1586-90.

36. Kuhle J, Plattner K, Bestwick JP, Lindberg RL, Ramagopalan SV, Norgren N, et al. A comparative study of CSF neurofilament light and heavy chain protein in MS. *Mult Scler*. 2013;19(12):1597-603.
37. Pawlitzki M, Schreiber S, Bittner D, Kreipe J, Leyboldt F, Rupprecht K, et al. CSF Neurofilament Light Chain Levels in Primary Progressive MS: Signs of Axonal Neurodegeneration. *Front Neurol*. 2018;9:1037.
38. Olesen MN, Soelberg K, Debrabant B, Nilsson AC, Lillevang ST, Grauslund J, et al. Cerebrospinal fluid biomarkers for predicting development of multiple sclerosis in acute optic neuritis: a population-based prospective cohort study. *J Neuroinflammation*. 2019;16(1):59.
39. Anesten B, Yilmaz A, Hagberg L, Zetterberg H, Nilsson S, Brew BJ, et al. Blood-brain barrier integrity, intrathecal immunoactivation, and neuronal injury in HIV. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm*. 2016;3(6):e300.
40. Skillback T, Mattsson N, Blennow K, Zetterberg H. Cerebrospinal fluid neurofilament light concentration in motor neuron disease and frontotemporal dementia predicts survival. *Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener*. 2017;18(5-6):397-403.
41. Lycke JN, Karlsson JE, Andersen O, Rosengren LE. Neurofilament protein in cerebrospinal fluid: a potential marker of activity in multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1998;64(3):402-4.
42. Malmstrom C, Haghighi S, Rosengren L, Andersen O, Lycke J. Neurofilament light protein and glial fibrillary acidic protein as biological markers in MS. *Neurology*. 2003;61(12):1720-5.
43. Petzold A, Eikelenboom MJ, Keir G, Grant D, Lazeron RH, Polman CH, et al. Axonal damage accumulates in the progressive phase of multiple sclerosis: three year follow up study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2005;76(2):206-11.
44. Kuhle J, Leppert D, Petzold A, Regeniter A, Schindler C, Mehling M, et al. Neurofilament heavy chain in CSF correlates with relapses and disability in multiple sclerosis. *Neurology*. 2011;76(14):1206-13.
45. Farina G, Magliozzi R, Pitteri M, Reynolds R, Rossi S, Gajofatto A, et al. Increased cortical lesion load and intrathecal inflammation is associated with oligoclonal bands in multiple sclerosis patients: a combined CSF and MRI study. *J Neuroinflammation*. 2017;14(1):40.
46. Eikelenboom MJ, Petzold A, Lazeron RH, Silber E, Sharief M, Thompson EJ, et al. Multiple sclerosis: Neurofilament light chain antibodies are correlated to cerebral atrophy. *Neurology*. 2003;60(2):219-23.
47. Steinacker P, Feneberg E, Weishaupt J, Brettschneider J, Tumani H, Andersen PM, et al. Neurofilaments in the diagnosis of motoneuron diseases: a prospective study on 455 patients. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2016;87(1):12-20.
48. Kalm M, Bostrom M, Sandelius A, Eriksson Y, Ek CJ, Blennow K, et al. Serum concentrations of the axonal injury marker neurofilament light protein are not influenced by blood-brain barrier permeability. *Brain Res*. 2017;1668:12-9.
49. Berlit P. *Klinische Neurologie*. Springer Verlag, Heidelberg. 2011.
50. Wilson DH, Rissin DM, Kan CW, Fournier DR, Piech T, Campbell TG, et al. The Simoa HD-1 Analyzer: A Novel Fully Automated Digital Immunoassay Analyzer with Single-Molecule Sensitivity and Multiplexing. *J Lab Autom*. 2016;21(4):533-47.
51. Gattringer T, Pinter D, Enzinger C, Seifert-Held T, Kneihsl M, Fandler S, et al. Serum neurofilament light is sensitive to active cerebral small vessel disease. *Neurology*. 2017;89(20):2108-14.



52. Siffrin V, Radbruch H, Glumm R, Niesner R, Paterka M, Herz J, et al. In vivo imaging of partially reversible th17 cell-induced neuronal dysfunction in the course of encephalomyelitis. *Immunity*. 2010;33(3):424-36.
53. Schattling B, Engler JB, Volkman C, Rothhammer N, Woo MS, Petersen M, et al. Bassoon proteinopathy drives neurodegeneration in multiple sclerosis. *Nat Neurosci*. 2019.
54. Gaiottino J, Norgren N, Dobson R, Topping J, Nissim A, Malaspina A, et al. Increased neurofilament light chain blood levels in neurodegenerative neurological diseases. *PLoS One*. 2013;8(9):e75091.
55. Bar-Or A, Gelfand J, Fiore D, Harp C, Ma Y, Herman A, et al. Interim Analysis of the OBOE (Ocrelizumab Biomarker Outcome Evaluation) Study in Multiple Sclerosis *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm*. 2018;90(15 Supplement).
56. Reiber H, Peter JB. Cerebrospinal fluid analysis: disease-related data patterns and evaluation programs. *J Neurol Sci*. 2001;184(2):101-22.
57. Blennow K, Fredman P, Wallin A, Gottfries CG, Karlsson I, Langstrom G, et al. Protein analysis in cerebrospinal fluid. II. Reference values derived from healthy individuals 18-88 years of age. *Eur Neurol*. 1993;33(2):129-33.
58. Tibbling G, Link H, Ohman S. Principles of albumin and IgG analyses in neurological disorders. I. Establishment of reference values. *Scand J Clin Lab Invest*. 1977;37(5):385-90.
59. Engel S, Friedrich M, Muthuraman M, Steffen F, Poplawski A, Groppa S, et al. Intrathecal B-cell accumulation and axonal damage distinguish MRI-based benign from aggressive onset in MS. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm*. 2019;6(5).

## **Danksagung**

Mein Dank gilt allen Ko-Autoren der Publikation, welche wesentliche Aspekte der hier vorgelegten Arbeit beinhaltet. Die stets konstruktiven und zielführenden Beiträge zum Projekt, habe ich in allen Phasen der Arbeit sehr wertgeschätzt.

Besonders danken möchte ich meinem Betreuer, durch dessen kontinuierliche Ermunterungen ich die Freude am wissenschaftlichen Arbeiten kennengelernt habe.

Und meiner Familie danke ich dafür, dass sie mich stets bei all meinen Vorsätzen unterstützt und insbesondere auch für ihre Nachsicht, wenn ich mal wieder ein Wochenende bei der Arbeit und nicht zu Hause verbringe.