

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

Biomarker für das Ansprechen auf eine Therapie mit
Dimethylfumarat bei Multipler Sklerose

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

Vorgelegt von

Daniel Körsgen
aus Köln

Mainz, 2022

Wissenschaftlicher Vorstand:

[REDACTED]

1. Gutachter:

[REDACTED]

2. Gutachter:

[REDACTED]

Tag der Promotion:

30. März 2023

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis	IV
1. Einleitung und Ziel der Dissertation	1
2. Literaturdiskussion	4
2.1. Multiple Sklerose	4
2.1.1. Epidemiologie	4
2.1.2. Ätiologie	4
2.1.3. Pathogenese.....	5
2.1.4. Verlaufsformen und Klinik	7
2.1.5. Diagnostik.....	8
2.1.6. Therapie	12
2.2. Dimethylfumarat	16
2.3. Biomarker für das Ansprechen auf eine Therapie mit DMF	19
2.3.1. Kortikalen Atrophie als Biomarker	19
2.3.2. Neurofilamente im Serum als Biomarker	22
2.3.3. Lymphozyten als Biomarker	23
3. Material und Methoden	28
3.1. Studiendesign.....	28
3.2. Bestimmung der kortikalen Schichtdicke und kortikalen Atrophie.....	32
3.3. Bestimmung der sNfL-Konzentration	33
3.4. Bestimmung der Lymphozytensubpopulationen.....	34
3.5. Auswertung der MRT-Befunde	36
3.6. Statistische Auswertung	36
4. Ergebnisse	37
4.1. Deskription der Kohorten	37
4.1.1. Demographische Daten	37
4.1.2. Klinische Daten.....	38
4.1.3. MRT-Daten	42

4.2. Auswertung der Biomarker	45
4.2.1. Veränderungen des kortikalen Volumens.....	45
4.2.2. Veränderungen der sNfL-Konzentration.....	46
4.2.3. Veränderungen der Lymphozytensubpopulationen	47
4.2.3.1. T _C 17-Zellen	47
4.2.3.2. tT _{reg} -Zellen	48
4.2.3.3. T _H 17-Zellen	49
4.2.3.4. Zytokin-produzierende CD8 ⁺ -Lymphozyten	50
5. Diskussion	52
5.1. Kortikales Volumen als Biomarker	52
5.2. sNfL als Biomarker	53
5.3. Lymphozyten als Biomarker.....	54
6. Zusammenfassung	56
7. Literaturverzeichnis.....	V
8. Danksagung.....	XIII
9. Curriculum Vitae.....	XIV

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzungen

Abb.	Abbildung	IL	Interleukin
Abk.	Abkürzung	IVIG	Intravenöse Immunglobuline
APC	Antigen-presenting cell („Antigenpräsentierende Zelle“)	KM	Kontrastmittel
ARMSS-Score	Age Related Multiple Sclerosis Severity Score	LH	Left hemisphere („linke Hemisphäre“)
BL	Baseline („Ausgangspunkt“)	MEP	Motorisch evozierte Potentiale
bzw.	beziehungsweise	MeV	Masernvirus
CD	Cluster of differentiation	MMF	Monomethylfumarat
CI	Confidence interval (Konfidenzintervall)	MP-RAGE	Magnetization prepared rapid gradient-echo
CV	Coefficient of variation („Variationskoeffizient“)	MRS	Magnetresonanztomographie
DMD	Disease modifying drug („Krankheitsverlauf-modifizierendes Medikament“)	MRT	Magnetresonanztomographie
DMF	Dimethylfumarat	MRZ-Reaktion	Masern-Röteln-Zoster-Reaktion
DNS	Desoxyribonukleinsäure	MS	Multiple Sklerose
DWI	Diffusion-weighted imaging	MSFC	Multiple Sclerosis Functional Composite
EBV	Epstein-Barr-Virus	MSIS-29	Multiple Sclerosis Impact Scale
EDSS	Expanded Disability Status Scale	MUSIC	Multiple Sclerosis Inventory of Cognition
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay	n	Anzahl
EMA	European Medicines Agency („Europäische Arzneimittel-Agentur“)	NAA	N-Acetyl-Aspartat
FACS	Fluorescence-activated cell sorting („Fluoreszenz-Durchflusssy-tometrie“)	NEDA	No evidence of disease activity („Kein Hinweis auf Krankheitsaktivität“)
FDA	U.S. Food and Drug Administration („amerikanische Behörde für Lebens- und Arzneimittel“)	NEDA-3	No evidence of disease activity-3 (Krankheitsschub, EDSS, radiologische Aktivität)
FLAIR	Fluid attenuated inversion recovery	NEDA-4	No evidence of disease activity-4 (Krankheitsschub, EDSS, radiologische Aktivität, kortikale Atrophie)
FoxP3	Forkhead-Box-Protein P3	NfH	Neurofilament-Schwerketten („heavy“)
FU	Follow up („Verlaufskontrolle“)	NfL	Neurofilament-Leichtketten („light“)
GM	Grey matter („graue Substanz“)	NfM	Neurofilament-Mittelketten („medium“)
GM-CSF	Granulocyte macrophage colony-stimulating factor	NF-κB	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells
HERV	Humane endogene Retroviren	NKZ	Natürliche Killerzelle
HHV-6	Humanes Herpesvirus 6	NRF2	Nuclear factor erythroid 2-related factor 2
HLA	Human leukocyte antigen („Humanes Leukozyten-Antigen“)	ns	nicht signifikant
IFN	Interferon	OKB	Oligoklonale Banden
IgG	Immunglobulin G	p	Signifikanzwert

Abkürzungsverzeichnis

PBMC	Peripheral blood mononuclear cell („mononukleäre Zelle des peripheren Blutes“)	SPMS	Secondary progressive Multiple Sclerosis („Sekundär progrediente Multiple Sklerose“)
PPMS	Primary progressive Multiple Sclerosis („Primär progrediente Multiple Sklerose“)	STAT5	Signal transducer and activator of transcription 5
Q	Quartil	T _C 17-Zellen	IL17-produzierende CD8 ⁺ -T-Zellen
RH	Right hemisphere („rechte Hemisphäre“)	T _{CM} -Zellen	Central memory T cells („Zentrale T-Gedächtniszellen“)
RIS	Radiologisch isoliertes Syndrom	TCR	T-cell receptor („T-Zell-Rezeptor“)
RNS	Ribonukleinsäure	TGF-β	Transforming growth factor-β
ROC	Receiver operating characteristic	T _H 17-Zellen	IL17-produzierende CD4 ⁺ -T-Zellen
RORγt	RAR-related orphan receptor γ-t	T _H -Zellen	T-Helferzellen
ROS	Reactive oxygen species („reaktive Sauerstoffspezies“)	TNF-α	Tumornekrosefaktor-α
RRMS	Relapsing-remitting Multiple Sclerosis („Schubförmig remittierende Multiple Sklerose“)	T _{reg} -Zellen	Regulatorische T-Zelle
RUBV	Rubellavirus	tT _{reg} -Zellen	Regulatorische T-Zelle des Thymus
S.	Seite	UV-B	Ultraviolettstrahlung der Wellenlänge 315 nm – 280 nm
S1P	Sphingosin-1-Phosphat	VEP	Visuell evozierte Potentiale
SD	Standard deviation („Standardabweichung“)	vgl.	vergleiche
SEP	Somatosensorisch evozierte Potentiale	VZV	Varizella-Zoster-Virus
SiMoA	Single molecule array	ZNS	Zentrales Nervensystem
sNFL	Neurofilament-Leichtketten im Serum		

Formelzeichen und Einheiten

°C	Grad Celsius	ml	Milliliter
%	Prozent	mm	Millimeter
μl	Mikroliter	nm	Nanometer
G	Gravitationskonstante	pg	Pikogramm
kg	Kilogramm		

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Diagnosekriterien nach McDonald (2017) (83).....	9
Abbildung 2: Medikamente in der MS-Therapie (112).....	14
Abbildung 3: Veränderung von Lymphozytensubpopulationen durch DMF (15).....	18
Abbildung 4: Kortikale Atrophie und Modularität unter der DMF-Therapie (27).....	21
Abbildung 5: ROC-Analyse verschiedener Immunzellen (33)	24
Abbildung 6: T _{H1} /T _{H17} Zellen unter DMF-Therapie (20)	26
Abbildung 7: T _C 17-Zellen und T _{H17} -Zellen unter DMF-Therapie (36)	27
Abbildung 8: Parameter der „German National MS Cohort“ (161).....	29
Abbildung 9: Studiendesign	31
Abbildung 10: Veränderung der kortikalen Schichtdicke unter DMF-Therapie	45
Abbildung 11: Veränderung der sNfL-Konzentration unter DMF-Therapie	46
Abbildung 12: Veränderung der T _C 17-Zellen unter DMF-Therapie.....	47
Abbildung 13: Veränderung der tT _{reg} -Zellen unter DMF-Therapie	48
Abbildung 14: Veränderung der T _{H17} -Zellen unter DMF-Therapie.....	49
Abbildung 15: Veränderungen von Zytokin-produzierenden CD8 ⁺ -Lymphozyten.....	51

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Antikörper bei der FACS-Analyse	35
Tabelle 2: Demographie – MRT-Kohorte	37
Tabelle 3: Demographie – sNfL-Kohorte	37
Tabelle 4: Demographie – FACS-Kohorte	38
Tabelle 5: Klinische Daten – MRT-Kohorte.....	39
Tabelle 6: Klinische Daten – sNfL-Kohorte	40
Tabelle 7: Klinische Daten – FACS-Kohorte	41
Tabelle 8: MRT-Daten – MRT-Kohorte	42
Tabelle 9: MRT-Daten – sNfL-Kohorte	43
Tabelle 10: MRT-Daten – FACS-Kohorte	44

1. Einleitung und Ziel der Dissertation

Die Multiple Sklerose (MS) ist eine chronisch-entzündliche Autoimmunerkrankung des zentralen Nervensystems (ZNS). Die hervorgerufenen Entzündungsprozesse führen durch Demyelinisierung zu einer axonalen Schädigung und einer fortschreitenden Neurodegeneration. Weltweit leiden über 2,5 Millionen Menschen an einer MS. Mit einem Häufigkeitsgipfel zwischen dem 25. und 35. Lebensjahr erkranken vor allem jüngere Erwachsene (1, 2). In der großen Mehrheit der Fälle handelt es sich bei der MS um eine Krankheit mit einem schubförmigen Verlauf (3). Im Rahmen dieser Schübe kann ein breites Spektrum an neurologischen Symptomen auftreten, abhängig davon in welchem Bereich des ZNS sich eine entzündliche Läsion ausbildet. Zu den häufigsten Symptomen zählen Sehstörungen, Parästhesien und Paresen (4, 5). Die neurologischen Defizite sind in den krankheitsfreien Intervallen zunächst noch reversibel, im weiteren Verlauf kommt es zur Manifestation der Beschwerden und zur Ausbildung von körperlichen Beeinträchtigungen. Die MS gilt als die häufigste nicht-traumatische Ursache für körperliche Beeinträchtigung im jungen Erwachsenenalter (6, 7). Aufgrund des progredienten Charakters ist die MS mit einer erheblichen Einschränkung des Alltagslebens und der Lebensqualität verbunden. Darüber hinaus haben MS-Patienten eine dreifach höhere Mortalität und eine um bis zu 14 Jahre reduzierte Lebenserwartung im Vergleich mit der gesunden Allgemeinbevölkerung (8, 9).

Für die adäquate Behandlung der Patienten und die Entwicklung neuer Therapien stellt die Forschung einen unerlässlichen Ankerpunkt in der Patientenversorgung dar. So konnte im Jahr 2012 erstmals belegt werden, dass der Wirkstoff Dimethylfumarat (DMF) bei der MS die Schubrate signifikant reduziert und den Abstand zwischen den einzelnen Schubereignissen relevant verlängert (10, 11).

Der Wirkstoff DMF zählt zu der Gruppe der Krankheitsverlauf-modifizierenden Medikamente („Disease modifying drug“, DMD). Die meisten Medikamente dieser Gruppe führen, aufgrund ihrer immunsuppressiven Wirkung, lediglich zu einer Reduktion der Entzündungsaktivität (12). DMF hingegen wirkt immunsuppressiv durch eine Depletion von T- und B-Lymphozyten und gleichzeitig reduziert es über die Aktivierung des NRF2-Transkriptionsfaktors die zytotoxischen Effekte von oxidativem Stress auf neuronale Zellen (10, 13-19). Dementsprechend reduziert DMF nicht nur die Entzündungsaktivität, sondern verlangsamt auch effektiv die Neurodegeneration bei Patienten mit MS. Der Wirkstoff DMF wird zu den vielversprechendsten, neuen Medikamenten in der Therapie der MS gezählt, allerdings ist der genaue Wirkmechanismus von DMF weiterhin ungeklärt (10, 16). Außerdem profitieren nicht alle Patienten von einer Behandlung mit diesem Wirkstoff. Insbesondere gibt es einen Anteil an Patienten, der nicht auf eine Therapie mit DMF anspricht und die Therapieziele nicht erreicht werden (20). Die Folgen einer Therapie mit einem ineffektiven Medikament sind vielfältig. Unmittelbar für den Patienten ergibt sich hieraus eine Verzögerung bis zum Beginn einer wirksamen Therapie.

Damit verbunden steigt das Risiko einer Krankheitsprogression. Jeder weitere Schub ist für den Patienten mit der Gefahr von irreversiblen neurologischen Defiziten verbunden. Daneben überwiegen bei Patienten, die nicht auf ein Medikament ansprechen, die unerwünschten Arzneimittelwirkungen. Nicht zuletzt erhöht eine ineffektive Therapie auch die volkswirtschaftlichen Kosten und stellt eine zusätzliche Belastung für das Gesundheitssystem dar (7, 17, 20, 21). Zur Identifikation von Patienten, die maximal von einer Therapie mit DMF profitieren, ist die Verwendung von Surrogatparametern, welche ein Therapieansprechen vorhersagen können, notwendig. Die Identifikation und Validierung von Biomarkern bei der Therapie mit DMF trägt damit maßgeblich zur Therapiefindung und dem Therapieerfolg bei Patienten mit MS bei.

Vor dem beschriebenen Problemhintergrund hat die vorliegende Arbeit das Ziel Biomarker zu identifizieren, welche eine Aussage über das Ansprechen auf eine Therapie mit DMF bei MS treffen können. Bei der Analyse in dieser multizentrischen, prospektiven Längsschnittstudie wurden Biomarker ausgewählt, die sowohl die Immunsuppression als auch die Neurodegeneration widerspiegeln. Als zu untersuchende Surrogatparameter wurden die kortikale Atrophie, die Konzentration der Neurofilament-Leichtketten im Serum (sNfL) und pathogenetisch relevante Lymphozyten ausgewählt.

Im Verlauf der MS kommt es zu einem zunehmenden Verlust der strukturellen neuronalen Integrität und einer Reduktion des Hirnvolumens. Das Ausmaß der kortikalen Atrophie korreliert dabei mit der Neurodegeneration und dem Ausmaß der körperlichen Beeinträchtigung (22-25). In einer Metaanalyse aus dem Jahr 2015 wurde die kortikale Atrophie von Patienten unter der Therapie mit DMDs ausgewertet. Es zeigte sich, dass die behandelten Patienten signifikant niedrigere Atrophie-Raten aufwiesen als die unbehandelten Patienten (26). Auch im klinischen Alltag gewinnt die Bestimmung der kortikalen Atrophie zunehmend an Bedeutung. Durch die stetige Verbesserung der technischen Möglichkeiten in der Bildgebung mittels Magnetresonanztomographie (MRT) kann die Bestimmung der Atrophie-Rate bereits heute für die Einstufung der Patienten in Hinblick auf ihre Krankheitsaktivität verwendet werden (33, 34). Die Ergebnisse aus aktuellen Studien legen nahe, dass das Ausmaß der kortikalen Atrophie ein potenzieller Biomarker für ein Therapieansprechen auf DMF sein könnte (26-28). Durch die vermehrte Verwendung der Atrophie-Daten im klinischen Alltag ist zukünftig eine standardisierte Erfassung der kortikalen Atrophie denkbar, wodurch ein nicht-invasiver Biomarker für ein Therapiemonitoring zur Verfügung stünde.

Als weiterer möglicher Biomarker wurde die sNfL-Konzentration in Betracht gezogen (29). Neurofilamente sind Intermediärfilamente und entscheidend für den Strukturhalt von Neuronen und Axonen. Bei entzündlichen Prozessen im ZNS oder einer neuronalen Schädigung werden die Neurofilamente in den Liquor und das Blut freigesetzt. Die sNfL-Konzentration steigt während eines Schubereignisses signifikant an und die Höhe der sNfL-Konzentration korreliert mit der Anzahl und der Größe von Läsionen im ZNS (30-32). Durch die Messung der sNfL-Konzentration können dementsprechend Rückschlüsse auf die neuronale Integrität und

somit auch auf die Effektivität der Therapie mit einem DMD gezogen werden.

Als weitere potenzielle Biomarker für ein Therapieansprechen wurden unterschiedliche Lymphozytensubpopulationen ausgewählt. In Studien zum Wirkmechanismus von DMF konnte bereits dargestellt werden, dass DMF verschiedene Immunzellen in unterschiedlichem Ausmaß beeinflusst (33, 34). Darüber hinaus ergaben sich in mehreren Studien bereits Hinweise darauf, dass die Veränderung von bestimmten Lymphozytensubpopulationen als Therapiemonitoring bei der Verwendung von DMF geeignet sein könnte (14, 17, 27, 35, 36). Dies stärkt die Überlegung durch die standardisierte Erfassung von Lymphozytensubpopulationen frühzeitig ein Ansprechen auf eine Therapie mit DMF zu prognostizieren.

Das Ergebnis dieser Arbeit soll die Auswahl der richtigen Therapie für den richtigen Patienten unterstützen und zur Reduktion der Krankheitsprogression sowie zu einer Verbesserung der Lebensqualität beitragen.

2. Literaturdiskussion

2.1. Multiple Sklerose

Die MS ist eine chronisch-entzündliche, autoimmunvermittelte Erkrankung des ZNS, die insbesondere bei Menschen im jüngeren Erwachsenenalter auftritt. Die hervorgerufenen Entzündungsprozesse führen durch Demyelinisierung zu einer axonalen Schädigung und einer fortschreitenden Neurodegeneration. In der histologischen Untersuchung zeigt sich ein Verlust der neuronalen strukturellen Integrität (28). Als ein wichtiger Bestandteil der Pathogenese gelten Myelin-spezifische, autoreaktive T-Zellen (37, 38). Im Rahmen des üblicherweise schubartigen Krankheitsverlaufs macht sich die MS mit fokalen und zu Beginn noch reversiblen, neurologischen Funktionsausfällen bemerkbar (39). Die MS gilt dabei als die häufigste nicht-traumatische Ursache für körperliche Beeinträchtigung im jungen Erwachsenenalter (6, 7) Im Vergleich zur gesunden Bevölkerung ist die Mortalität von MS-Patienten dreifach höher und die Lebenserwartung um 7 – 14 Jahre reduziert (8, 9). Trotz intensiver Forschung sind die Ätiologie und die Pathogenese der Erkrankung nicht abschließend geklärt und auch eine Heilung ist zum jetzigen Zeitpunkt nicht möglich.

2.1.1. Epidemiologie

Weltweit sind über 2,5 Millionen Menschen von einer MS betroffen (2). Mit einem Häufigkeitsgipfel zwischen dem 25. und 35. Lebensjahr ist die MS dabei vor allem eine Erkrankung des jüngeren Erwachsenenalters (1). Frauen sind zwei bis dreimal häufiger betroffen als Männer (40, 41). Die Prävalenz der MS weist ein deutliches Nord-Süd-Gefälle auf und nimmt mit Entfernung zum Äquator zu. In Europa und Nordamerika wird eine durchschnittliche Prävalenz von 108 bzw. 140 pro 100.000 Einwohner angegeben, wohingegen die Prävalenz in Afrika und Asien bei 2,1 bzw. 2,2 pro 100.000 Einwohner liegt (41, 42). Für Deutschland wird die Prävalenz der MS mit 289 pro 100.000 Einwohner angegeben (40).

2.1.2. Ätiologie

Die Ätiologie der MS ist noch nicht vollständig geklärt und weiterhin Gegenstand aktueller Forschungen. Allgemein wird von einer multifaktoriellen Genese ausgegangen. Diverse Risikofaktoren wurden bereits in unterschiedlichen Studien untersucht und diskutiert.

Eine genetische Prädisposition gilt als ein wichtiger Faktor in der Ätiologie der MS. Bei der Analyse von Genomen wurden bis heute über 200 verschiedene genetische Varianten identifiziert, welche mit der Entstehung einer MS im Zusammenhang stehen (7). So ist zum Beispiel das Auftreten einer MS mit den Allelen HLA-DR2 und HLA-DRB1*1501 assoziiert (7, 42). In Studien zur Häufigkeit bei monozygoten Zwillingen konnten Konkordanz-Raten zwischen

25 – 30 % festgestellt werden (43-45).

Des Weiteren gilt eine Vielzahl von Umwelteinflüssen als Risikofaktor für das Auftreten einer MS. Die Infektionen mit dem Epstein-Barr-Virus (EBV) und dem humanen Herpesvirus 6 (HHV-6) sowie die Expression von humanen endogenen Retroviren (HERV) begünstigen die Entstehung einer MS (1, 46). Insbesondere eine Infektion mit dem EBV ist mit einer deutlichen Risikosteigerung assoziiert. Eine EBV-Infektion in der Kindheit erhöht das Risiko an einer MS zu erkranken um den Faktor 15. Bei einer Infektion im Erwachsenenalter erhöht sich das Risiko um den Faktor 30 (1). Darüber hinaus besteht eine Korrelation zwischen dem Auftreten einer MS und einer geringen Exposition gegenüber UV-B-Strahlung und dem damit verbundenen Mangel an Cholecalciferol (Vitamin D₃) (47). Des Weiteren besteht ein Zusammenhang zwischen einer MS und Adipositas sowie einem Nikotinabusus (41, 47).

2.1.3. Pathogenese

Bei der MS handelt es sich um eine chronisch-entzündliche Autoimmunerkrankung des ZNS. Durch demyelinisierende Entzündungsprozesse kommt es zu einer axonalen Schädigung und einer fortschreitenden Neurodegeneration. Es lassen sich fokale Läsionen im ZNS nachweisen, die sowohl in der aus den Axonen bestehenden weißen Substanz als auch in der aus den Zellkörpern bestehenden grauen Substanz auftreten (28, 48). Schlussendlich führt die Kombination aus Inflammation und Neurodegeneration zu irreversiblen, neurologischen Defiziten.

Eine grundlegende Rolle in der Entstehung einer MS stellen in das ZNS eingewanderte Lymphozyten dar. Ging man früher davon aus, dass die MS eine ausschließlich T-Zell-vermittelte Autoimmunkrankheit war, gibt es heutzutage die Erkenntnis, dass auch aktivierte B-Zellen entscheidend in der Pathogenese mitwirken (37, 38).

Die Hauptakteure in der Pathogenese der MS sind Myelin-spezifische, autoreaktive T-Zellen. Die autoreaktiven T-Zellen können durch eine fehlregulierte Interaktion mit Krankheitserregern oder durch andere Umwelteinflüsse entstehen. Durch eine Störung in der Apoptose können diese dysfunktionalen Immunzellen im Organismus überdauern und entsprechende autoimmune Prozesse auslösen (49-51). Zunächst erfolgt bei der MS über die Präsentation von Myelinfragmenten durch antigenpräsentierende Zellen („Antigen-presenting cell“, APC) die Aktivierung von T-Zellen in der Peripherie. Es folgt die Proliferation und Ausdifferenzierung der T-Zellen zu verschiedenen proinflammatorischen Effektor-T-Zellen. Anschließend findet eine Migration dieser Zellen über die Blut-Hirn-Schranke in das ZNS statt (52). Die zwei wichtigsten Effektor-T-Zellen, die im Zuge dieser Differenzierungsprozesse entstehen, sind die T_H1-Zellen und die IL-17-produzierenden T-Zellen. Beide Zelllinien tragen maßgeblich zu Entzündungsreaktionen im Körper bei. Die T_H1-Zellen sind gekennzeichnet durch die Sekretion des Zytokins Interferon- γ (IFN- γ). Die IL-17-produzierenden T-Zellen werden noch einmal unterteilt in CD4⁺-T-Zellen (T_H17-Zellen) und CD8⁺-T-Zellen (T_C17-Zellen) (36, 53, 54). Sowohl die

T_H17-Zellen als auch die T_C17-Zellen konnten in signifikant erhöhten Mengen in aktiven und chronischen Läsionen im ZNS bei MS-Patienten nachgewiesen werden (55). Zusätzlich konnten T_C17-Zellen in erhöhter Konzentration im Liquor nachgewiesen werden. Dabei korrelierte eine höhere Anzahl der T_C17-Zellen mit dem Grad der körperlichen Beeinträchtigung (36). Den Gegenspieler zu den proinflammatorischen T-Zellen bildet die Gruppe der T_H2-Zellen. Neben ihrer Funktion als B-Zell-Aktivator können sie über die Sekretion von IL-10 und des *Transforming growth factor β* (TGF-β) hemmend auf T_H1-Zellen und dadurch antiinflammatorisch wirken (56). Es konnte gezeigt werden, dass bei MS-Patienten signifikant weniger T_H2-Zellen vorhanden waren und eine Dysbalance zwischen antiinflammatorischer und proinflammatorischer Immunantwort vorlag (57, 58).

Durch die Freisetzung von Zytokinen werden im weiteren Verlauf der Pathogenese zusätzliche Immunzellen angelockt und aktiviert. Dabei steht vor allem die Interaktion mit B-Zellen, Makrophagen, Mikroglia (Hortega-Zellen) und Astrozyten im Vordergrund (59, 60). Durch die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies („Reactive oxygen species“, ROS), Glutamat-induzierter Exzitotoxizität und die direkte Wirkung von proinflammatorischen Zytokinen werden die Myelinscheiden der Nervenzellen geschädigt und die Myelin-produzierenden Oligodendrozyten zerstört (49, 61). Die im Rahmen der Entzündungsprozesse auftretende Störung der Blut-Hirnschranke begünstigt das Einwandern weiterer Immunzellen in das ZNS (28, 62).

Nach neueren Erkenntnissen sind neben den T-Zellen auch die B-Zellen an der Pathogenese der MS beteiligt (37, 38). Die B-Zellen sind ein Bestandteil der humoralen Immunabwehr und durch die Produktion von Immunglobulinen gekennzeichnet. Darüber hinaus können B-Zellen über die Sekretion von Zytokinen auch proinflammatorisch (IL-6) oder antiinflammatorisch (IL-10) wirken (63). Besonders eine vermehrte Produktion des Tumornekrosefaktors-α (TNF-α) durch B-Gedächtniszellen wirkt verstärkend auf Entzündungsprozesse im Körper (64, 65). In mehreren Studien konnte mittlerweile gezeigt werden, dass über Antigenpräsentation und Zytokinproduktion durch B-Zellen die Krankheitsaktivität bei einer MS signifikant gesteigert wird (37, 64-70). Bei der Therapie mit einem monoklonalen CD20-Antikörper konnte eine signifikante Reduktion der fokalen Läsionen im ZNS sowie eine Abnahme der Schubrate bei MS-Patienten beobachtet werden (65, 71, 72). Der stabilere Krankheitsverlauf unter der selektiven Depletion von CD20⁺-B-Zellen bestärkt nochmal die Relevanz der B-Zellen in der Pathogenese der MS.

Das Auftreten einer MS ist durch ein komplexes Zusammenspiel zwischen verschiedenen Immunzellen auf unterschiedlichen Ebenen bedingt. Dabei stehen eine fehlgeleitete Immunantwort, ein Versagen von regulatorischen Mechanismen und eine Dysbalance zwischen pro- und antiinflammatorischen Immunzellen im Zentrum der Pathogenese.

2.1.4. Verlaufsformen und Klinik

Die Symptome und der Krankheitsverlauf sind bei Patienten mit MS sehr variabel. Dadurch, dass entzündliche Läsionen an prinzipiell jeder Stelle im ZNS entstehen können, bietet sich ein heterogenes Bild an fokal-neurologischen Symptomen (5). Charakteristisch sind zu Beginn eine Verminderung des Visus im Rahmen einer Neuritis nervi optici und sensomotorische Defizite (Parästhesien, Paresen) (4, 73, 74). Im späteren Verlauf überwiegen Spastiken und Ataxien durch die Schädigung des oberen Motoneurons (4, 5). Darüber hinaus sind chronische Schmerzen, Blasen- und Mastdarmfunktionsstörungen sowie eine Dysarthrie typische Beschwerdebilder, die im Rahmen der Erkrankung auftreten (39, 75). Des Weiteren leiden viele Patienten unter Fatigue, Depressionen und kognitiven Defiziten (5, 39, 73).

Bei der MS sind unterschiedliche Formen bekannt. Die Einteilung richtet sich dabei nach dem Krankheitsverlauf und dem zeitlichen Auftreten der Krankheitsschübe.

I. Klinisch isoliertes Syndrom (KIS)

Das KIS stellt sich in den meisten Fällen als eine erste klinische Manifestation einer MS dar. Typischerweise zeigen die Patienten fokal-neurologische Symptome, welche den Verdacht auf einen entzündlichen, demyelinisierenden Prozess im ZNS nahelegen, ohne dass zu diesem Zeitpunkt alle Diagnosekriterien einer MS erfüllt sind (vgl. Abbildung 1, S.9) (76).

II. Radiologisch isoliertes Syndrom (RIS)

Das RIS ist der ausschließliche Nachweis von MS-typischen Läsionen im ZNS in einem bildgebenden Verfahren (vgl. Kapitel 2.1.5, S. 10). Der Befund wird in der Regel zufällig erhoben und die Patienten zeigen keine korrelierenden klinischen Symptome. Bei der MS wird davon ausgegangen, dass im Durchschnitt nur jede zehnte Läsion im ZNS zu einer klinischen Manifestation führt (6, 76, 77).

III. Relapsing-remitting MS (RRMS)

Die RRMS ist die mit Abstand häufigste Form der MS. Insgesamt sind 80 – 85 % der Patienten zu Beginn der Erkrankung hiervon betroffen. Bei der RRMS zeigt sich ein Verlauf, der durch wiederholte Krankheitsschübe gekennzeichnet ist. Im Rahmen dieser Schübe treten entzündliche Läsionen im ZNS auf und es kommt zur Ausbildung entsprechender fokal-neurologischer Defizite. In den schubfreien Intervallen bilden sich diese Symptome zu Beginn der Erkrankung noch ganz, im späteren Stadium nur noch teilweise oder gar nicht mehr zurück (3, 6, 39, 75).

IV. Secondary progressive MS (SPMS)

Bei der SPMS handelt es um eine späte Verlaufsform der RRMS. In bis zu 70 % der Fälle kommt es zu einer Progression von einer RRMS zu einer SPMS. Die SPMS ist gekennzeichnet durch eine kontinuierliche Krankheitsprogression, bei der zusätzlich Schubereignisse auftreten können (75, 78).

V. Primary progressive MS (PPMS)

Bei der PPMS treten von Beginn an der Erkrankung fortschreitende, neurologische Symptome auf. Schübe oder krankheitsfreie Intervalle werden bei dieser Form nicht beobachtet. Von der PPMS sind vor allem Menschen ab dem 40. Lebensjahr betroffen. Ein geschlechtsbezogener Prävalenzunterschied findet sich bei dieser Form nicht (39, 75).

2.1.5. Diagnostik

Die Diagnose einer MS wird anhand der Diagnosekriterien nach McDonald gestellt. Die McDonald-Kriterien wurden ursprünglich 2001 eingeführt und seitdem mehrfach revidiert, zuletzt im Jahr 2017 (79-83). Die McDonald-Kriterien basieren auf dem Nachweis einer örtlichen und einer zeitlichen Dissemination der entzündlichen Läsionen. Dafür werden das klinische Beschwerdebild, die Bildgebung mittels MRT sowie die laborchemische Analyse des Liquors herangezogen. Das Kriterium der örtlichen Dissemination ist erfüllt, sobald zwei oder mehr T2-hyperintense Läsionen in unterschiedlichen MS-typischen Regionen in der MRT nachgewiesen werden (vgl. Kapitel 2.1.5, S. 10). Außerdem kann dieses Kriterium durch das Auftreten eines zweiten MS-Schubs, dessen klinische Präsentation auf eine andere Lokalisation im ZNS als der erste Schub schließen lässt, erfüllt sein (80, 82). Das Kriterium der zeitlichen Dissemination ist erfüllt, wenn in der MRT mindestens eine Läsion mit Kontrastmittel (KM) -Aufnahme und eine Läsion ohne KM-Aufnahme nachgewiesen werden. Alternativ ist dieses Kriterium auch erfüllt, wenn sich der Patient klinisch mit einem zweiten Schubereignis präsentiert (80, 82). Als weiterer Nachweis einer zeitlichen Dissemination gilt das Vorliegen von positiven oligoklonalen Banden (OKB). Als positive OKB wird der Nachweis einer intrathekale Synthese von klonalen Immunglobulinen G (IgG) im Liquor bezeichnet. Dies erfolgt über die Darstellung der Immunglobuline in der isoelektrischen Fokussierung oder durch die Berechnung des Quotientendiagramms (82, 84, 85).

Clinical Presentation	Additional Data Needed for Diagnosis
≥ 2 clinical attacks and objective evidence of ≥ 2 lesions	None
≥ 2 clinical attacks and objective evidence of 1 lesion	DIS: an additional attack implicating a different CNS site OR by MRI ^a
1 clinical attack and objective clinical evidence of ≥ 2 lesions	DIT: an additional clinical attack OR by MRI ^b OR CSF-specific oligoclonal bands
1 clinical attack and objective evidence of 1 lesion	DIS: an additional clinical attack implicating a different CNS site OR by MRI ^a OR DIT: an additional clinical attack OR by MRI ^b OR CSF-specific oligoclonal bands

Abbreviations: CNS, central nervous system; CSF, cerebrospinal fluid; DIS, disseminated in space; DIT, disseminated in time; MRI, magnetic resonance imaging.
^aDIS by MRI: new lesions on follow-up imaging or both gadolinium-enhancing and non-enhancing lesions on single MRI.
^bDIS by MRI: ≥ 1 symptomatic or asymptomatic lesion in ≥ 2 areas including cortical/juxtacortical, periventricular, infratentorial, or spinal.

Abbildung 1: Diagnosekriterien nach McDonald (2017) (83)

Neben der Anwendung der McDonald-Kriterien können im klinischen Alltag weitere laborchemische, elektrophysiologische und radiologische Verfahren zur Diagnosesicherung und zum Ausschluss von Differenzialdiagnosen zum Einsatz kommen.

I. Klinische Untersuchung

Der klinischen Untersuchung fällt ein besonderer Stellenwert in der Diagnostik der MS zu. Durch die Erhebung charakteristischer Befunde kann schnell die Verdachtsdiagnose einer entzündlichen, demyelinisierenden Erkrankung des ZNS gestellt werden. In der Anamnese sollten gezielt bereits vorausgegangene Schubereignisse erfragt werden und in der körperlichen Untersuchung die neurologischen Beschwerden objektiviert werden. Für die Einschätzung der körperlichen Einschränkung durch die neurologischen Funktionsausfälle steht die „Expanded Disability Status Scale“ (EDSS) zur Verfügung. In der EDSS werden sieben Funktionssysteme bewertet. Zu den Funktionssystemen gehören die Pyramidenbahn, das Kleinhirn, der

Hirnstamm, die zerebrale Funktion, das Sensorium, die Sehfunktion und die Blasen- und Mastdarmfunktion. Die EDSS reicht von Grad 0 bis Grad 10, wobei 0 einer normalen neurologischen Funktion entspricht und 10 den Tod infolge einer MS bedeutet (86). Darüber hinaus existieren weitere Messinstrumente für die Bewertung von neurologischen Funktionssystemen („Multiple Sclerosis Functional Composite“ (MSFC), „Multiple Sclerosis Inventory of Cognition“ (MUSIC)). Für die Darstellung von strukturell geschädigten Nervenfasern und den damit verbundenen Leitungsstörungen wird die Elektrophysiologie verwendet. Hierbei werden insbesondere die visuell evozierten Potenziale (VEP), die somatosensorisch evozierten Potenziale (SEP) und die motorisch evozierten Potenziale (MEP) abgeleitet. Des Weiteren werden routinemäßige Blut- und Urinuntersuchungen durchgeführt. Darüber hinaus sollte eine Infektion mit Borrelien oder *Treponema pallidum* ausgeschlossen werden.

II. Magnetresonanztomographie

Für die Diagnosesicherung und als wichtiger Bestandteil der McDonald-Kriterien ist die Darstellung von entzündlichen Prozessen im ZNS mittels MRT unerlässlich. Besteht der Verdacht auf eine MS werden Aufnahmen vom Gehirn und Rückenmark in folgenden Sequenzen angefertigt:

- T1 (mit und ohne KM)
- T2
- FLAIR („Fluid attenuated inversion recovery“)
- DWI („Diffusion-weighted imaging“)

Beim Vorliegen einer MS zeigen sich in den T2-gewichteten Aufnahmen MS-typische, hyperintense, multifokale Läsionen unterschiedlichen Alters. Sie sind das Korrelat des entzündlichen und demyelinisierenden Krankheitsprozesses. Häufig befinden sich diese Läsionen periventrikulär, juxtakortikal, infratentoriell oder spinal. Im Rahmen einer akuten Inflammation und einer damit verbundenen Schädigung der Blut-Hirn-Schranke lassen sich KM-aufnehmende, hyperintense Läsionen in den T1-gewichteten Sequenzen finden. Zudem können in den T1-gewichteten Aufnahmen hypointense Läsionen dargestellt werden. Diese sogenannten „black holes“ sind Zeichen einer irreversiblen Gewebedestruktion und mit einer ungünstigen Prognose verbunden. Die Anzahl und Größe der Läsionen korrelieren nicht in jedem Fall mit den klinischen Symptomen des Patienten und können auch als Zufallsbefund erhoben werden (vgl. Kapitel 2.1.4, S.7) (75, 87, 88).

III. Liquor

Die Liquordiagnostik wird zum Nachweis von entzündlichen Prozessen im ZNS und zum Ausschluss von speziellen Differenzialdiagnosen herangezogen. Bei der laborchemischen Analyse des Liquors stellt sich die Zellzahl, das Albumin, die Glucose und das Laktat in der Regel normwertig oder nur leicht oberhalb des Referenzwerts dar. Wie bereits beschrieben, kann außerdem durch die Bestimmung der OKB im Liquor das Kriterium der zeitlichen Dissemination erfüllt werden (vgl. Abbildung 1, S.9). Zusätzlich kommt es bei der MS in 80 – 100 % der Fälle zur Bildung von Immunglobulinen gegen neurotrope Viren. Insbesondere treten Antikörper gegen das Masernvirus (MeV), das Rubellavirus (RUBV) und das Varizella-Zoster-Virus (VZV) auf. Werden im Liquor die entsprechenden Immunglobuline nachgewiesen, wird von einer positiven Masern-Röteln-Zoster-Reaktion (MRZ-Reaktion) gesprochen. Eine positive MRZ-Reaktion ist dabei nicht pathognomonisch für eine MS und ist nur Anhaltspunkt für eine chronische Entzündung im ZNS. Allerdings gilt eine positive MRZ-Reaktion als ein spezifischerer Marker für eine MS als der Nachweis von OKB (32, 75, 82, 84, 89).

IV. Magnetresonanztomographie

Die Magnetresonanztomographie (MRS) ist ein Verfahren zur Quantifizierung von Stoffwechselfvorgängen und Metaboliten im menschlichen Körper. In der Neurologie von Bedeutung ist dabei vor allem das N-Acetyl-Aspartat (NAA). Das NAA entsteht im Rahmen des Aminosäurestoffwechsels und wird hauptsächlich in den Mitochondrien der Neuronen gebildet. Über die Quantifizierung von NAA kann somit eine Aussage über die Stoffwechselfvorgänge im ZNS getroffen werden. Eine hohe NAA-Konzentration spiegelt dabei eine gute metabolische Funktion der Neuronen wider. Eine verminderte NAA-Konzentration wird mit einer reduzierten zellulären Stoffwechselfleistung in Verbindung gebracht und gilt als ein Marker für Neurodegeneration. Bei Patienten mit MS korreliert ein niedriger NAA-Spiegel mit einem vermehrten axonalen Schaden und der Progression der körperlichen Beeinträchtigung. Im Verlauf einer MS kann eine kontinuierliche Reduktion des NAA-Spiegels beobachtet werden (25, 90-92).

2.1.6. Therapie

Die Therapie der MS folgt einem multimodalen Ansatz und gliedert sich in akute Schubtherapie, Krankheitsverlauf-modifizierende Therapie und symptomatische Therapie. Letztere umfasst alle Maßnahmen zur Reduktion der körperlichen Funktionseinschränkung und beinhaltet unter anderem eine antispastische Therapie, eine Schmerztherapie, Physio- und Ergotherapie sowie Psychotherapie. Eine endgültige Heilung der MS kann zum jetzigen Zeitpunkt nicht erzielt werden.

Präsentiert sich ein Patient mit einem akuten Schubereignis, ist die Therapie der ersten Wahl eine Kortison-Stoßtherapie. Hierbei wird Methylprednisolon in einer Dosierung von 1000 mg/d über 3 – 5 Tage intravenös verabreicht (39, 93). Bei einem therapierefraktären Schub ist eine Eskalation auf 2000 mg/d oder eine Verlängerung der Therapie auf bis zu 10 Tage möglich. Alternativ kann eine Plasmaseparation mittels Plasmapherese oder Immunadsorption erfolgen (39, 94, 95). Das Ziel der Akuttherapie ist eine schnellstmögliche Remission der aufgetretenen Symptome.

Um die Schubrate zu senken und die Progression der körperlichen Beeinträchtigung zu verlangsamen werden langfristig in der Therapie von MS-Patienten DMDs verwendet. In Abhängigkeit von der Verlaufsform und der Krankheitsaktivität werden unterschiedliche DMDs eingesetzt (vgl. Abbildung 2, S.14).

Bereits beim Auftreten eines KIS kann eine immunmodulatorische Therapie bei Patienten begonnen werden. Hierfür zugelassen sind Interferon- β -1a (IFN- β -1a) und Interferon- β -1b (IFN- β -1b) (96).

Bei einer RRMS mit einem milden Krankheitsverlauf werden bevorzugt DMF, Glatirameracetat, Interferon (IFN) oder Teriflunomid eingesetzt (96). DMF wirkt antiinflammatorisch und neuroprotektiv durch Modulation von zellulären Signalwegen (vgl. Kapitel 2.2, S. 16) (10). Glatirameracetat reduziert die T-Zellproliferation und bewirkt über die Induktion der Apoptose eine Depletion von Lymphozyten. Darüber hinaus führt Glatirameracetat zu einem Wechsel von einer T_H1 -dominierten Immunantwort zu einer T_H2 -geprägten Immunantwort (97, 98). IFN zählt zu der Gruppe der Zytokine und bewirkt eine Hemmung der T-Zell-Aktivierung und -Migration. Zusätzlich führt es zu einer Veränderung im pro- und antiinflammatorischen Zytokinprofil des Körpers (28, 99). Teriflunomid supprimiert den zellulären Nukleotidstoffwechsel und die De-novo-Synthese von Pyrimidinbasen durch Hemmung der Dihydroorotat-Dehydrogenase. Dadurch wirkt Teriflunomid antiproliferativ auf Lymphozyten. Zusätzlich werden unterschiedliche Signalwege von Lymphozyten durch die Inhibition von Tyrosin-Kinasen unterdrückt (28, 100). Der Wirkstoff Azathioprin ist zwar in der Therapie der MS zugelassen, dennoch wird dieses Medikament nur noch selten angewendet und zählt seit der Zulassung von IFN nicht mehr zur Erstlinientherapie der MS. (96, 101).

Bei einer hochaktiven RRMS wird zwischen einer kontinuierlichen und einer diskontinuierlichen Therapie unterschieden. Bei der kontinuierlichen Therapie werden Natalizumab,

Ofatumumab oder Sphingosin-1-Phosphat (S1P) -Rezeptor-Modulatoren eingesetzt. Natalizumab ist ein gegen das zelluläre Adhäsionsmolekül α 4-Integrin gerichteter, humanisierter Antikörper. Das Adhäsionsmolekül α 4-Integrin wird insbesondere von T- und B-Lymphozyten sowie Monozyten exprimiert und unterstützt die Migration von Lymphozyten in das ZNS. Dementsprechend hemmt Natalizumab den Übertritt von Lymphozyten über die Blut-Hirn-Schranke und reduziert die Entzündungsaktivität im ZNS (13, 62). Bei Patienten mit einem positiven JC-Virus-Titer besteht unter der Verwendung von Natalizumab ein erhöhtes Risiko des Auftretens einer progressiven multifokalen Leukenzephalopathie (PML) (102). Das Medikament Ofatumumab ist ein seit dem Jahr 2020 zugelassener, monoklonaler CD20-Antikörper. Das Strukturprotein CD20 wird auf der Oberfläche von Prä-B-Zellen, reifen B-Zellen und B-Gedächtniszellen exprimiert. Durch die Interaktion mit dieser Oberflächenstruktur kommt es zu einer selektiven Depletion von B-Zellen mit einem Schwerpunkt auf den Antigen-präsentierenden und Zytokin-produzierenden B-Zellen (103). Zu den S1P-Rezeptor-Modulatoren zählen Fingolimod, Ozanimod und Ponesimod. Als Signalmolekül vermittelt S1P die Proliferation sowie die Migration von Lymphozyten. Durch eine Modifikation des S1P-Rezeptors wird sowohl der Übertritt von CD4⁺-T-Zellen über die Blut-Hirn-Schranke als auch die Freisetzung von Lymphozyten aus den sekundär lymphatischen Organen gehemmt (28, 96, 104, 105).

Bei der diskontinuierlichen Therapie werden Alemtuzumab, Cladribin und Ocrelizumab eingesetzt. Alemtuzumab ist ein gegen die Oberflächenstruktur CD52 gerichteter Antikörper. CD52 wird von reifen Lymphozyten exprimiert. Durch die Interaktion mit dieser Oberflächenstruktur führt Alemtuzumab zu einer Depletion von Immunzellen durch die Apoptose von T- und B-Lymphozyten. Die Therapie mit Alemtuzumab ist sehr nebenwirkungsreich und die Anwendung kann zu einer ausgeprägten Panzytopenie und einer Autoimmunhepatitis führen. Darüber hinaus wirkt Alemtuzumab kardiotoxisch (28, 106-108). Bei Cladribin handelt es sich um ein Purinanalogon. Dieses Medikament hemmt die Nukleotidsynthese und beeinträchtigt die DNS- und RNS-Synthese. Ähnlich wie Teriflunomid wirkt es somit antiproliferativ auf Lymphozyten (28, 109). Der monoklonale Antikörper Ocrelizumab ist seit dem Jahr 2017 in der Therapie der MS zugelassen. Dieser Antikörper ist ebenfalls gegen die Oberflächenstruktur CD20 gerichtet und folgt damit einem vergleichbaren Wirkmechanismus wie Ofatumumab (107, 110). Neben der Behandlung der RRMS ist Ocrelizumab aktuell der einzige zugelassene Wirkstoff in der Therapie der PPMS (110). In der Therapie der SPMS können bei aufgesetzten Schüben viele der Medikamente eingesetzt werden, welche auch ihre Anwendung bei der RRMS finden (vgl. Abbildung 2, S.14). Zusätzlich kann in der Therapie der SPMS auch Mitoxantron eingesetzt werden. Hierbei handelt es sich um ein zytotoxisches Antibiotikum aus der Gruppe der Anthracendione. Mitoxantron lagert sich in die DNS ein und bewirkt eine Hemmung des Topoisomerase-II-DNS-Komplexes. Die hieraus resultierenden DNS-Doppelstrangbrüche führen zur Inhibition der DNS- und RNS-Synthese (13, 111). Aufgrund der unerwünschten Arzneimittelwirkungen, gilt Mitoxantron nur noch als Medikament der zweiten Wahl (13).

	CIS	McDonald MS: Relapsing MS (RMS)		Progressive MS (PMS)	
		RRMS	SPMS	SPMS	PPMS
Disease-modifying therapy		<p>(highly-) active first- and second-line therapies</p> <p>Pulsed therapies</p> <ul style="list-style-type: none"> • Alemtuzumab • Cladribine • Ocrelizumab <p>Continuous therapies</p> <ul style="list-style-type: none"> • Natalizumab • Ofatumumab • S1P-modulators (Fingolimod, Ozanimod, Ponesimod) 	<p>with relapses</p> <ul style="list-style-type: none"> • Cladribine • Interferon-b-1b s.c. • Ocrelizumab • Ofatumumab • Ponesimod • Siponimod • (Mitoxantrone) 	<p>without relapses, with MRI activity</p> <ul style="list-style-type: none"> • Siponimod 	<p>with clinical / MRI activity</p> <ul style="list-style-type: none"> • Ocrelizumab
	<ul style="list-style-type: none"> • Interferon-b-1a i.m. • Interferon-b-1a s.c. • Interferon-b-1b s.c. 	<p>mild / moderate</p> <ul style="list-style-type: none"> • Dimethyl fumarate • Glatiramer acetate • Interferons • Teriflunomide • (Azathioprine) 			

Abbildung 2: Medikamente in der MS-Therapie (112)

Das Ziel der immunmodulatorischen Therapie ist die Vermeidung weiterer klinischer oder radiologischer Krankheitsaktivität (7, 113). Patienten, die unter einer Therapie keine Anzeichen für eine Krankheitsprogression zeigen, können unter dem Begriff „No evidence of disease activity“ (NEDA) zusammengefasst werden. Zusätzlich werden die zum Nachweis dieses Status erhobenen drei Parameter als Zahl hinter das Akronym geschrieben (NEDA-3) (113, 114).

- **1. Ausbleiben von neuen Schüben**

Ein Schub ist definiert als das Auftreten von neurologischen Symptomen mit einer Dauer von mehr als 24 Stunden, die nicht durch Fieber ausgelöst sind und nach einer klinisch stabilen Phase von mehr als 30 Tagen auftreten (107, 115, 116).

- **2. Ausbleiben einer klinischen Progression**

Die klinische Krankheitsprogression wird mit Hilfe der EDSS evaluiert. Dabei ist eine Progression als eine Erhöhung des EDSS-Werts um 1,5 Punkte gegenüber eines Ausgangswerts von 0 Punkten, um 1,0 Punkte gegenüber eines Ausgangswerts von mehr als 1,0 Punkten oder um 0,5 Punkte gegenüber eines Ausgangswerts von mehr als 5,0 Punkten definiert (107, 114, 117, 118).

- **3. Ausbleiben einer radiologischen Progression**

Zu einer radiologischen Progression zählen neue oder zunehmende Läsionen in den T2-gewichteten Sequenzen oder das Auftreten von KM-aufnehmenden Läsionen in den T1-gewichteten Sequenzen. (107, 114).

Bei Patienten, die in mindestens einem der drei aufgeführten Parameter einen pathologischen Befund aufweisen, spricht man von „Ongoing disease activity“ (ODA) (20).

Neben den klassischen drei Parametern, die für die Erhebung der Krankheitsaktivität nach NEDA-3 verwendet werden, kann zusätzlich das Ausmaß der kortikalen Atrophie mit in die Bewertung aufgenommen werden. In diesem Fall spricht man von NEDA-4. Damit das Kriterium der kortikalen Atrophie als physiologisch eingestuft wird, darf eine jährliche Atrophie des Gehirns von 0,4 % nicht überschritten werden (107, 114). Auf Grund von technischen und logistischen Hürden wird die Erhebung des NEDA-4 noch nicht standardmäßig im klinischen Alltag angewendet (113).

Im Zusammenhang mit einer Erhöhung der Körpertemperatur durch beispielsweise Fieber oder einer höheren Umgebungstemperatur kann es zum Auftreten eines sogenannten Pseudoschubs kommen. Diese auch als Uthoff-Phänomen bezeichnete Reaktion hängt mit temperaturabhängigen Schwankungen der axonalen Leitungsfähigkeit zusammen. Bei höherer Körpertemperatur kommt es zur Inaktivierung von spannungsabhängigen Natriumkanälen und dadurch zu einer Verzögerung der Depolarisation. An Axonen mit einer geschädigten Myelinschicht wird dieser Effekt durch einen zusätzlichen Ausstrom von Kalium-Ionen verstärkt und führt somit zum Auftreten von fokal-neurologischen Symptomen. Hierbei handelt es sich um keine entzündliche Krankheitsaktivität mit morphologischem Korrelat und die Symptome bilden sich in der Regel innerhalb von 24 Stunden und bei einer Normalisierung der Körpertemperatur wieder zurück (119, 120).

2.2. Dimethylfumarat

Der Wirkstoff DMF wird in der Therapie der RRMS und der Autoimmunerkrankung Psoriasis vulgaris eingesetzt. Bei DMF handelt es sich um eine Esterverbindung zwischen einem Molekül Fumarsäure und zwei Molekülen Methanol. Bereits im Jahr 1959 gab es erste Versuche mit Fumarsäurederivaten in der Therapie von Autoimmunerkrankungen. So behandelte der deutsche Chemiker Dr. Walter Schweckendiek in einem Selbstversuch erfolgreich Psoriasis vulgaris mit Fumarsäureestern (121, 122). Seit 1994 ist eine Kombination von DMF und Monomethylfumarat (MMF) zur Behandlung der Psoriasis vulgaris in Deutschland zugelassen (123). Ganz ähnlich einer MS handelt es sich bei der Psoriasis vulgaris um eine Krankheit mit einer Dysfunktion der T_H17-Zellen und der T_H1-Immunantwort (123, 124). Schon ab dem Jahr 2006 wurden Studien durchgeführt, um die Wirksamkeit von Fumarsäure auch in der Behandlung von MS-Patienten nachzuweisen (125-127). Im Jahr 2012 konnte in zwei randomisierten, doppelt verblindeten Phase-3-Studien (DEFINE, CONFIRM) belegt werden, dass Patienten unter der Therapie mit DMF eine signifikant niedrigere klinische und radiologische Krankheitsaktivität aufwiesen. Dabei konnte eine Reduktion der jährlichen Schubrate um 49 % bzw. 53 % im Vergleich mit der Kontrollgruppe festgestellt werden (10, 11). In der MRT zeigte sich unter der Therapie mit DMF eine Abnahme sowohl der KM-aufnehmenden T1-gewichteten Läsionen als auch der T2-gewichteten Läsionen (10, 11). Bei dem Vergleich von DMF und Glatirameracetat konnte darüber hinaus kein signifikanter Unterschied in der Wirksamkeit beider Medikamente festgestellt werden (11). Im Jahr 2013 erfolgte dann die Zulassung von DMF in der Erstlinientherapie der RRMS durch die amerikanische Behörde für Lebens- und Arzneimittel („U.S. Food and Drug Administration“, FDA) und die Europäische Arzneimittel-Agentur („European Medicines Agency“, EMA) (13, 128).

Die Einnahme von DMF erfolgt in der Regel zweimal täglich mit jeweils 240 mg per os (10, 11, 128). In der Mukosa des Dünndarms wird DMF zu seinem aktiven Metabolit MMF hydrolysiert und resorbiert (123, 129). Nach der Initiation der Therapie sollte nach 6 – 8 Wochen eine Kontrolle der absoluten Lymphozytenzahl erfolgen. Anschließend sind halbjährliche Blutbild- und klinisch-neurologische Kontrollen für das Therapiemonitoring ausreichend. Die häufigsten Nebenwirkungen unter der Therapie sind eine Flush-Symptomatik und gastrointestinale Beschwerden (13). Entsprechend der immunsupprimierenden Wirkung von DMF treten mit zunehmender Therapiedauer Lymphopenien auf. Hierbei entwickeln etwa 14 – 17 % der Patienten im Verlauf eine Lymphopenie 2. oder 3. Grades (21, 130, 131). In sehr seltenen Fällen und unter anhaltender Lymphopenie kann es zum Auftreten einer PML kommen (13). Als Kontraindikationen für eine Therapie mit DMF gelten Schwangerschaft und Stillzeit, chronische Magen-Darm-Erkrankungen sowie schwere Leber- und Nierenfunktionsstörungen (129, 132).

Trotz zahlreicher Studien zu Fumarsäurederivaten ist der molekulare Wirkmechanismus noch nicht abschließend geklärt (121). Dem Wirkstoff DMF werden antiinflammatorische und neuroprotektive Effekte zugeschrieben (10, 16). Die Neuroprotektion erfolgt über eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors *Nuclear factor erythroid 2-related factor 2* (NRF2), welcher die zytotoxischen Effekte von oxidativem Stress auf neuronale Zellen reduziert (10, 17-19, 133, 134). Außerdem bewirkt DMF die Hemmung des Transkriptionsfaktors *Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells* (NF- κ B). Der Transkriptionsfaktor NF- κ B spielt eine wichtige Rolle in der Regulation der Immunantwort sowie der Zellproliferation und Apoptose. Die Hemmung von NF- κ B führt zu einer T_H2-geprägten Immunantwort und einer verminderten Migration von Lymphozyten in das ZNS (17, 54, 133, 135).

Auf zellulärer Ebene konnte festgestellt werden, dass DMF eine Reduktion der absoluten Lymphozyten um 20 – 30 % bewirkt (13, 126, 134). Im Vergleich zu Patienten, die kein DMF einnahmen, kam es speziell zu einer Reduktion der CD3⁺-T-Zellen und hier insbesondere der CD4⁺-T-Zellen und CD8⁺-T-Zellen, wobei die Abnahme der CD8⁺-T-Zellen signifikant höher ausfiel (17, 33, 35, 136). Diese Veränderung der T-Zellen spiegelt sich auch in einem erhöhten CD4/CD8-Quotienten wider (15, 33, 34, 136). Von der Reduktion ausgenommen zeigten sich die naiven T-Zellen. Hier war sogar eine leichte Zunahme der Zellzahl zu verzeichnen (34). In einer Arbeit von Mrowietz et. al. aus dem Jahr 2012 wurde darüber hinaus berichtet, dass DMF die Differenzierung von CD4⁺-T-Zellen zu T_H1-Zellen und T_H17-Zellen unterdrückt und die Ausbildung von antiinflammatorischen IL-4-produzierenden T_H2-Zellen induziert (124). Bei Untersuchungen der B-Zellreihe konnte ebenfalls eine allgemeine Reduktion der Zellzahl unter der Therapie mit DMF registriert werden. Lediglich bei den Übergangs-B-Zellen konnte eine Zunahme festgestellt werden (15, 71, 136). Bei den natürlichen Killerzellen (NKZ) konnte eine Verminderung der zytotoxischen CD56^{dim}-NKZ und eine Zunahme der regulatorischen CD56^{bright}-NKZ beobachtet werden (15, 17, 20). Auch wurde berichtet, dass DMF einen hemmenden Einfluss auf die Ausdifferenzierung von dendritischen Zellen hat (127, 137).

Zusätzlich bewirkt DMF eine Unterdrückung weiterer Zytokin-produzierender Lymphozyten (10, 38, 138, 139). Hier konnte im Einzelnen eine Reduktion der IFN- γ -produzierenden CD4⁺-T-Zellen und CD8⁺-T-Zellen, der TNF- α -produzierenden CD8⁺-T-Zellen und der GM-CSF-produzierenden CD8⁺-T-Zellen nachgewiesen werden (17).

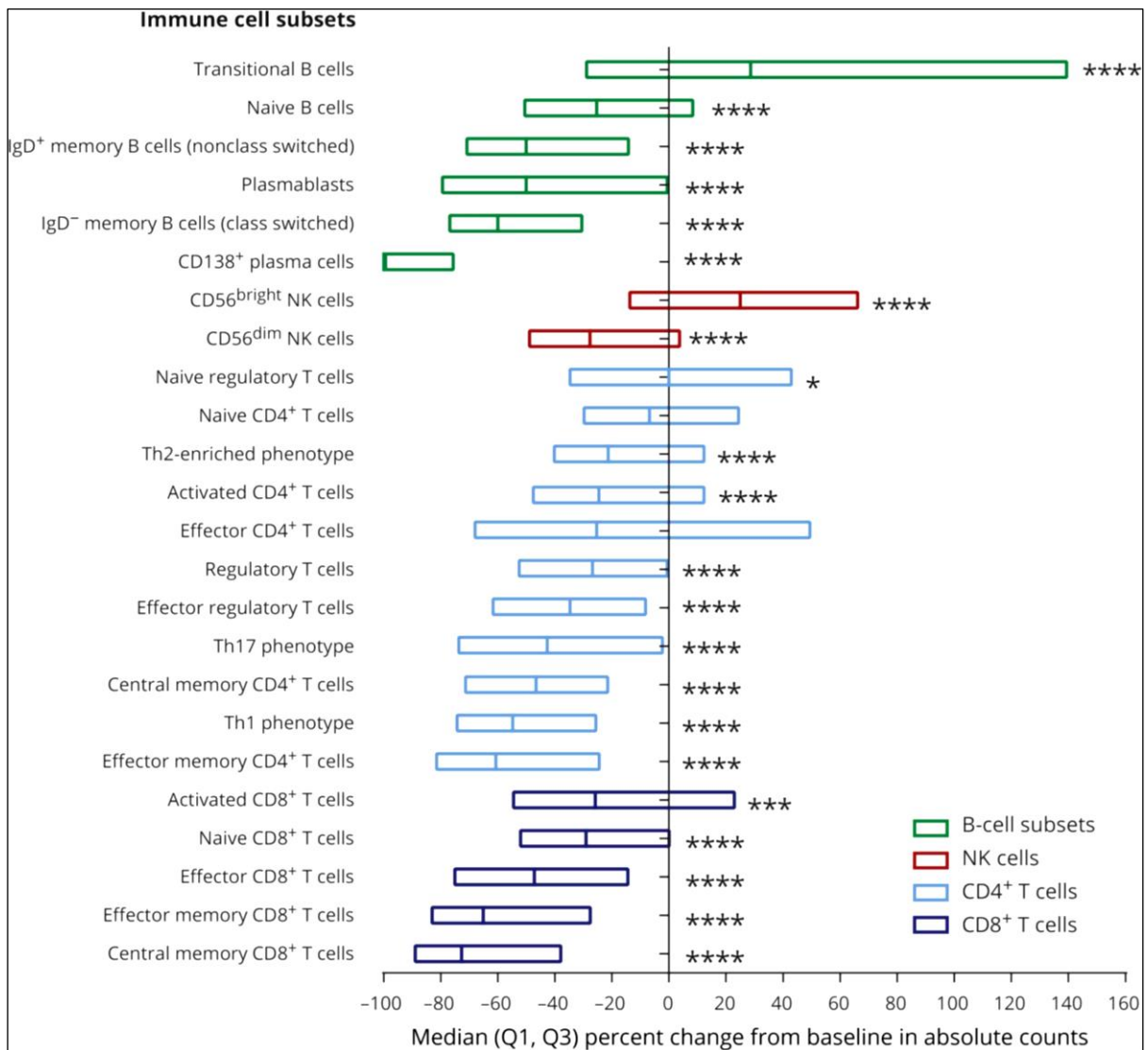


Abbildung 3: Veränderung von Lymphozytensubpopulationen durch DMF (15)

Dargestellt ist die prozentuale Veränderung verschiedener Lymphozytensubpopulationen nach 24 Wochen Therapie mit DMF. Der linke bzw. rechte Rand jeder Box entspricht dem 1. bzw. 3. Quartil. Die mittlere Linie in jeder Box entspricht dem Median.

Für die Signifikanz p gilt: *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001; ****p < 0,0001 (15)

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass DMF sowohl immunsuppressiv als auch neuroprotektiv wirkt und damit zugleich an den beiden wichtigsten pathogenetischen Mechanismen der MS ansetzt. Die Neuroprotektion erfolgt dabei über die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, welche zum Schutz vor oxidativem Stress beitragen. Die Immunsuppression erfolgt durch weitreichende Veränderungen in der Zusammensetzung der Lymphozyten mit einer Verschiebung von einer proinflammatorischen, T_{H1}-dominierten Immunantwort zu einer antiinflammatorisch geprägten T_{H2}-Immunantwort (15, 17).

2.3. Biomarker für das Ansprechen auf eine Therapie mit DMF

Die wachsende Vielfalt an Medikamenten in der MS-Therapie macht es zunehmend schwieriger die richtige Therapie für den individuellen Patienten auszuwählen. Beim Einsatz von DMDs ist bekannt, dass Patienten unterschiedlich gut auf das jeweilige Präparat ansprechen (21). Der Wirkstoff DMF wird zu den vielversprechendsten, neuen Medikamenten in der Therapie der MS gezählt, dennoch profitieren nicht alle Patienten von einer Behandlung mit diesem Wirkstoff. Insbesondere gibt es einen Anteil an Patienten, der nicht auf eine Therapie mit DMF anspricht und die Therapieziele nicht erreicht werden (20). Die Folgen einer Therapie mit einem ineffektiven Medikament sind vielfältig. Unmittelbar für den Patienten ergibt sich hieraus eine Verzögerung bis zum Beginn einer wirksamen Therapie. Damit verbunden steigt das Risiko einer Krankheitsprogression. Jeder weitere Schub ist für den Patienten mit der Gefahr von irreversiblen neurologischen Defiziten verbunden. Daneben überwiegen bei Patienten, die nicht auf ein Medikament ansprechen, die unerwünschten Arzneimittelwirkungen. Nicht zuletzt erhöht eine ineffektive Therapie auch die volkswirtschaftlichen Kosten und stellt eine zusätzliche Belastung für das Gesundheitssystem dar (7, 17, 20, 21). Zur Identifikation von Patienten, welche maximal von einer Therapie mit DMF profitieren, ist die Verwendung von Surrogatparametern, welche ein Therapieansprechen vorhersagen können, notwendig. Mit Hilfe dieser Biomarker kann zur Reduktion der Krankheitsprogression sowie zur Verbesserung der Lebensqualität beitragen werden. Die Identifikation und Validierung von Biomarkern bei der Therapie mit DMF trägt somit maßgeblich zur Therapiefindung und dem Therapieerfolg bei Patienten mit MS bei. Für DMF wurden bereits in verschiedenen Studien mögliche Biomarker untersucht und als potenzielle Surrogatparameter in Erwägung gezogen (27).

2.3.1. Kortikalen Atrophie als Biomarker

Durch die Inflammation und Demyelinisierung im Rahmen der MS kommt es, neben den klinisch im Vordergrund stehenden fokal-neurologischen Defiziten, zu einem Verlust der strukturellen neuronalen Integrität im ZNS und zu einer Abnahme des Hirnvolumens. Die vermehrte kortikale Atrophie steht dabei in enger Verbindung mit der Krankheitsaktivität. Es wurde gezeigt, dass das Ausmaß der kortikalen Atrophie mit der Neurodegeneration und dem Grad der körperlichen Beeinträchtigung korreliert (22-25, 27). Außerdem konnte in Studien dargestellt werden, dass Veränderungen im neuronalen Netzwerk bei Patienten mit MS ebenfalls im direkten Zusammenhang mit der Progression der Erkrankung stehen (140, 141). Im klinischen Alltag gewinnt die Bestimmung der kortikalen Atrophie zunehmend an Bedeutung. Durch technische Verbesserung und breitere Verfügbarkeit der MRT-Bildgebung kann die Bestimmung der kortikalen Atrophie heutzutage auch für die Einstufung der Patienten in Hinblick auf ihre Krankheitsaktivität (NEDA-4) genutzt werden (vgl. Kapitel 2.1.6 S.15) (107, 113, 114, 142). In einer Metaanalyse aus dem Jahr 2015 wurden die Daten von 4 Studien mit insgesamt 1819

RRMS-Patienten in Bezug auf die Veränderung der kortikalen Atrophie unter der Therapie mit DMDs ausgewertet. Es zeigte sich, dass Patienten, die eine Therapie mit DMDs erhielten, signifikant niedrigere Atrophie-Raten aufwiesen als unbehandelte Patienten. Somit konnte gezeigt werden, dass der Einsatz von DMDs das Ausmaß der kortikalen Atrophie positiv beeinflussen kann (26). Die Erkenntnisse dieser Metaanalyse geben einen ersten Hinweis darauf, durch die Bestimmung der kortikalen Atrophie die Effektivität des eingesetzten Medikamentes zu bewerten (26-28).

In einer Studie von Dupuy et. al. wurde die Atrophie der grauen Substanz unter der Therapie mit DMF über einen Beobachtungszeitraum von 12 Monaten untersucht. Die therapierten Patienten zeigten eine signifikant niedrigere Atrophie als Patienten, die keine Therapie erhielten. Im Weiteren wurden unterschiedliche Hirnareale genauer betrachtet (Thalamus, Nucleus caudatus, Putamen, Globus pallidus). Es wurde festgestellt, dass behandelte Patienten speziell im Bereich des Putamens eine signifikant niedrigere Atrophie-Rate aufwiesen (142). In dieser Studie wurde allerdings kein Vergleich von Patientengruppen durchgeführt, die nach ihrer Krankheitsaktivität stratifiziert wurden. Somit konnte kein Rückschluss gezogen werden, ob das Ausmaß der kortikalen Atrophie auch eine Aussage über das Therapieansprechen auf DMF geben könnte. Mit dieser Fragestellung wurde sich in einer Arbeit von Ciolac et. al. beschäftigt. Hier wurden die Atrophie-Raten von Patienten mit stabilem und aktiven Krankheitsverlauf unter der Therapie mit DMF über einen Beobachtungszeitraum von 16 Monaten verglichen. In der gesamten Kohorte konnte zunächst festgestellt werden, dass die kortikale Atrophie überwiegend im frontalen, temporalen und parietalen Cortex gleichermaßen auf beiden Hemisphären ausgeprägt war. Bei der Stratifizierung nach der Krankheitsaktivität zeigte sich bei den stabilen Patienten eine signifikant niedrigere durchschnittliche Atrophie-Rate als bei den Patienten mit einer aktiven MS. Zusätzlich zu der Auswertung der kortikalen Atrophie wurde in dieser Studie auch ein kleiner Anteil der Lymphozytensubpopulationen analysiert. Es stellte sich heraus, dass eine niedrige Atrophie-Rate mit einer größeren Abnahme der CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen verbunden war. Dieser Zusammenhang war allerdings nur für die Atrophie in bestimmten Arealen des Gehirns signifikant (27). Neben den Atrophie-Raten wurden auch die neuronalen Netze in der grauen und weißen Substanz untersucht. Die Untersuchung der neuronalen Netze im Gehirn gibt einen Aufschluss über die MS-assozierten Reorganisationsprozesse im ZNS (140, 141). Dabei beschreibt die Modularität bei dieser Art der Analyse die Aufteilung des Netzwerkes in einzelne Einheiten. Die Modularität repräsentiert die funktionelle Integration von miteinander agierenden Hirnregionen und ist ein sensibler Marker für die strukturelle Integrität des Gehirns (141, 143, 144). Mit dem Fortschreiten der MS kommt es bei Patienten zur Reorganisation der Gehirnstruktur mit einer Zunahme der Modularität und einer Abnahme der lokalen Vernetzung (27, 140, 143). Unter der Therapie mit DMF konnte bei der Analyse der neuronalen Netze und der Bestimmung der Modularität für die graue Substanz festgestellt werden, dass die stabilen Patienten unter der Therapie eine signifikant niedrigere

Modularität aufwiesen als vor der Therapie. Im Gegensatz dazu zeigten die Patienten mit einer aktiven MS trotz Therapie eine signifikant höhere Modularität als vor Beginn der Therapie. Bei der Analyse der neuronalen Netze und der Bestimmung der Modularität für die weiße Substanz wurde ebenfalls eine signifikant niedrigere Modularität bei den stabilen Patienten gefunden. Ciolac et. al. schließen aus diesen Ergebnissen, dass eine niedrige Atrophie-Rate in Kombination mit einer Abnahme der CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen als ein potenzieller Surrogatparameter für ein Therapieansprechen auf DMF geeignet sein könnte. Darüber hinaus könnte eine Verminderung der neuronalen Reorganisationsprozesse eine Auskunft über den Therapieerfolg geben (27).

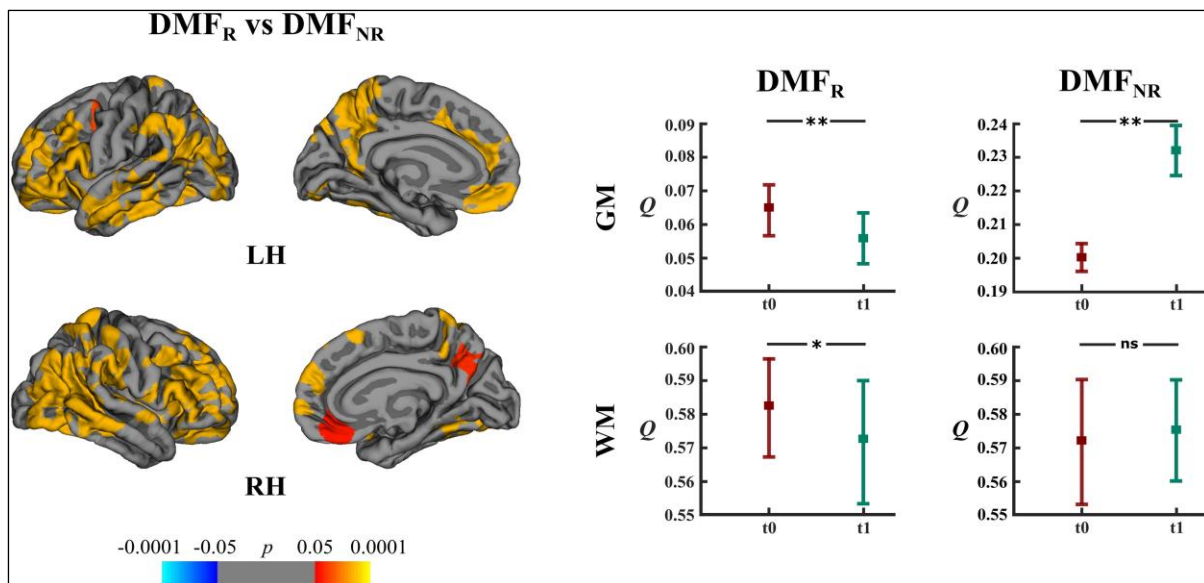


Abbildung 4: Kortikale Atrophie und Modularität unter der DMF-Therapie (27)

Links: Dargestellt ist der Vergleich der Atrophie zwischen stabilen (DMF_R) und aktiven (DMF_{NR}) Krankheitsverläufen unter der Therapie mit DMF. Gezeigt werden die laterale und mediale Oberfläche der linken (LH) und rechten (RH) Hemisphäre. Positive Werte (gelb, rot) zeigen Bereiche, die in der stabilen Patientengruppe eine signifikant niedrigere kortikale Atrophie aufwiesen als in der aktiven Patientengruppe.

Rechts: Vergleich der Modularität (Q) zwischen stabilen (DMF_R) und aktiven (DMF_{NR}) Krankheitsverläufen in der grauen (GM) und weißen (WM) Substanz zu Beginn (t0) und nach 16 Monaten (t1) Therapie. Für die Signifikanz p gilt: *p < 0,05; **p < 0,0001; ns = nicht signifikant (27).

2.3.2. Neurofilamente im Serum als Biomarker

Neurofilamente sind Proteinbestandteile des Zytoskeletts von Neuronen. Sie zählen zu der Gruppe der Intermediärfilamente und sind maßgeblich für den Strukturerhalt der Axonen verantwortlich (145). Unterteilt werden die Neurofilamente in fünf verschiedene Gruppen: Neurofilament-Leichtketten (NfL), Neurofilament-Mittelketten (NfM), Neurofilament-Schwerketten (NfH), α -Internexin und Peripherin (146). Bei entzündlichen Prozessen im ZNS oder bei einer neuroaxonalen Schädigung kommt es zur Freisetzung von Neurofilamenten in den Liquor und das Blut. Das relevanteste Neurofilament und ein möglicher Biomarker in der Diagnostik und Verlaufsbeurteilung der MS ist das NfL (29, 85). Aufgrund einer engen Korrelation zwischen den NfL-Konzentrationen im Serum (sNfL) und im Liquor können durch Blutuntersuchungen Rückschlüsse auf Prozesse im ZNS gezogen werden, ohne dass Patienten einer Lumbalpunktion unterzogen werden müssen (147). Die Bestimmung von sehr niedrigen sNfL-Konzentrationen ist durch die Verwendung des „Single molecule array“ (SiMoA) im klinischen Alltag möglich geworden (148-150).

Zahlreiche Studien beschäftigten sich bereits mit der Veränderung der NfL-Konzentration im Blut und Liquor bei MS-Patienten. Allgemein konnte im Vergleich mit einer gesunden Kontrollgruppe festgestellt werden, dass bei Patienten mit einer MS die NfL-Konzentrationen sowohl im Liquor als auch im Serum signifikant höher waren (147, 151, 152). Des Weiteren bestand bei Patienten mit MS ein Zusammenhang zwischen hohen sNfL-Werten und einer schlechteren kognitiven Leistung (153). Außerdem kam es zu einem signifikanten Anstieg der sNfL-Konzentration während eines Krankheitsschubs und die Höhe des sNfL-Werts korrelierte mit der Anzahl und Größe der Läsionen im ZNS (30-32, 154). Aus Ergebnissen der früheren Studien wird geschlossen, dass die Bestimmung der sNfL-Konzentration ein geeigneter Biomarker für die Quantifizierung des axonalen Schadens und der Entzündungsaktivität bei MS-Patienten sein könnte (31, 32, 147, 149, 155). Dementsprechend könnte die sNfL-Konzentration ebenfalls für die Beurteilung des Therapieerfolges herangezogen werden (151, 152). In Studien, welche die Wirkung von DMDs auf die Neurofilament-Konzentrationen untersuchten, wurde gezeigt, dass nach dem Therapiebeginn eine Abnahme der Konzentration von Neurofilamenten im Serum und im Liquor stattfand. Im Gegensatz dazu zeigten Patienten mit anhaltender klinischer oder radiologischer Krankheitsaktivität unter der Therapie signifikant höhere Konzentrationen von Neurofilamenten im Liquor und Serum (148, 149, 156, 157). Eine Studie von Sejbaek et. al. untersuchte spezifisch die Veränderungen der NfL-Konzentrationen im Blut und Liquor bei Patienten unter der Therapie mit DMF. Nach 6 Monaten zeigte sich bei den Patienten eine signifikante Reduktion der NfL-Konzentration sowohl im Blut als auch im Liquor. Zusätzlich konnte nachgewiesen werden, dass eine höhere NfL-Konzentration mit einer stärkeren klinischen und radiologischen Krankheitsaktivität assoziiert war (148).

Ausgehend von den Studien bietet die Bestimmung der sNfL-Konzentration das Potenzial zur Beurteilung einer Therapie mit DMF und bedarf einer zusätzlichen Evaluation.

2.3.3. Lymphozyten als Biomarker

Wie schon beschrieben, bewirkt DMF eine Depletion der Lymphozyten um bis zu 30 % (13, 126, 134). Es konnte auch festgestellt werden, dass durch DMF verschiedene Lymphozyten-subpopulationen in unterschiedlichem Ausmaß beeinflusst werden (vgl. Abbildung 3, S. 18) (15, 33, 34). Aus diesen Beobachtungen ergibt sich die Überlegung, die Veränderung von Lymphozyten-subpopulationen als Surrogatparameter für ein Therapieansprechen auf DMF zu verwenden (14, 17, 27, 35, 36).

In einer Studie von Mani et. al. wurden die Lymphozyten von 338 MS-Patienten unter der Therapie mit DMF über einen Beobachtungszeitraum von 12 Monaten analysiert. Die Patienten mit einem aktiven Krankheitsverlauf zeigten signifikant höhere Lymphozytenzahlen als die Patienten mit einem stabilen Krankheitsverlauf. Eine hohe Anzahl an Lymphozyten korrelierte dabei mit dem Ausmaß der klinischen Krankheitsaktivität. Des Weiteren wurde in dieser Studie der Median der absoluten Lymphozytenzahl aller Patienten gebildet. Anschließend wurden die Patienten entsprechend der Anzahl ihrer Lymphozyten, oberhalb oder unterhalb des Medians eingeteilt und der Zusammenhang mit der radiologischen Krankheitsaktivität beurteilt. Patienten mit einer Lymphozytenzahl oberhalb des Medians zeigten ein signifikant höheres Risiko für neue T2-hyperintense Läsionen sowie für neue KM-aufnehmende Läsionen. Somit konnte gezeigt werden, dass die radiologische und klinische Krankheitsaktivität in einem engen Zusammenhang mit der Menge an Lymphozyten im peripheren Blut steht. Von den Autoren wurde festgehalten, dass die Anzahl der Lymphozyten eine Aussage über den Krankheitsverlauf unter einer Therapie mit DMF geben könnte (21). Allerdings steht diese Aussage im Widerspruch zu den Ergebnissen einer Studie von Longbrake et. al. In dieser Untersuchung wurde ebenfalls die Lymphozytenzahl von 221 mit DMF behandelten MS-Patienten analysiert. Es zeigte sich, dass Patienten mit sehr wenigen Lymphozyten genauso häufig Krankheitsaktivität aufwiesen wie Patienten mit Lymphozyten im Normbereich (131). Die widersprüchlichen Ergebnisse dieser beiden Studien zeigen, dass die ausschließliche Exploration der Lymphozytenzahl nicht ausreichend ist, um ein Ansprechen auf eine Therapie mit DMF zu prognostizieren (27).

In einer Arbeit von Fleischer et. al. wurden neben der Lymphozytenzahl auch zusätzlich verschiedene Lymphozyten-subpopulationen unter der Therapie mit DMF ausgewertet. Es konnte festgestellt werden, dass bei den Patienten mit einem stabilen Krankheitsverlauf die Anzahl der Lymphozyten, die Anzahl der CD8⁺-T-Zellen und die Anzahl der CD19⁺-B-Zellen signifikant niedriger waren als bei den Patienten mit einer aktiven MS (33). Zur Bestimmung des prädiktiven diskriminierenden Werts der ermittelten Parameter, wurde eine ROC-Analyse („Receiver operating characteristic“) der absoluten Zahlen der Lymphozyten, der CD8⁺-T-Zellen und der CD19⁺-B-Zellen durchgeführt. Den besten Vorhersagewert lieferte dabei die Reduktion der CD8⁺-T-Zellen.

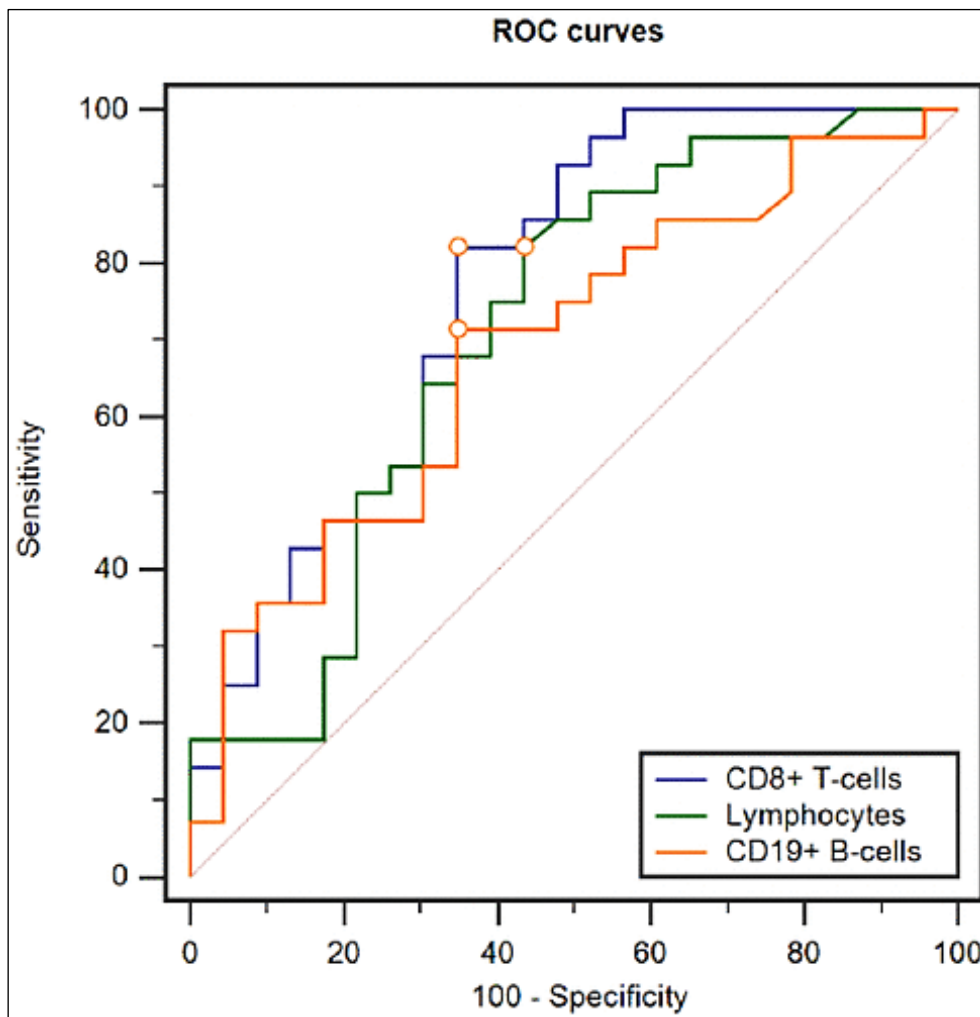


Abbildung 5: ROC-Analyse verschiedener Immunzellen (33)

Dargestellt sind die ROC-Kurven der CD8⁺-T-Zellen, der Lymphozyten und der CD19⁺-B-Zellen 6 Monate nach Beginn einer Therapie mit DMF (33).

In einer Studie von Medina et. al. aus dem Jahr 2017 wurden ebenfalls Lymphozytensubpopulationen analysiert, mit dem Ziel einen stabilen Krankheitsverlauf unter der Therapie mit DMF zu prognostizieren. Der Beobachtungszeitraum in dieser Studie betrug 6 Monate. Die Auswertung der T-Zellen ergab bei stabilen Patienten eine signifikante Reduktion der CD8⁺-T-Zellen sowie der CD4⁺- und CD8⁺-Zentralen-T-Gedächtniszellen („Central memory T cells“, T_{CM}-Zellen). Die Analyse der B-Zellen zeigte bei den stabilen Patienten eine signifikante Abnahme der B-Gedächtniszellen im Vergleich zu den Patienten mit einer aktiven MS (17). Bereits in einer anderen Arbeit aus dem Jahr 2016 konnte die Abnahme der B-Gedächtniszellen mit einem positiven Therapieverlauf unter der Einnahme von DMF in Verbindung gebracht werden (158). Bei der zusätzlichen Analyse von Zytokin-produzierenden Lymphozyten wurde eine signifikante Reduktion der IFN- γ -produzierenden CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen, der TNF- α -produzierenden CD8⁺-T-Zellen und der TNF- α -produzierenden CD19⁺-B-Zellen bei stabilen MS-Patienten nachgewiesen. Es zeigte sich darüber hinaus eine negative Korrelation

zwischen der Abnahme der genannten Zytokin-produzierenden Zellen und einer Zunahme der regulatorischen CD56^{bright}-NKZ. (17). Abschließend schreiben Medina et. al., dass die genannten Veränderungen der B-Gedächtniszellen sowie eine Reduktion bestimmter Zytokin-produzierender Zellen als potenzielle Biomarker zur frühen Identifikation eines Therapieerfolges geeignet sein könnten (17).

Eine weitere Evaluation der Lymphozytensubpopulationen als Surrogatparameter für eine effektive DMF-Therapie wurde von Mansilla et. al. im Jahr 2019 durchgeführt. Die 22 untersuchten Patienten zeigten bei einem stabilen Krankheitsverlauf unter der Einnahme von DMF eine signifikante Abnahme der CD4⁺-T-Zellen. Zudem waren in dieser Gruppe auch die CD4⁺- und CD8⁺-T_{CM}-Zellen signifikant reduziert. Darüber hinaus konnte bei den stabilen Patienten eine signifikante Abnahme der B-Gedächtniszellen sowie eine Zunahme der naiven B-Zellen und der Übergangs-B-Zellen gefunden werden. Die schubfreien Patienten wiesen außerdem einen signifikanten Anstieg der CD56^{bright}-NKZ auf. Zu den aufgeführten Zellreihen konnte in der Gruppe der Patienten mit weiterer Krankheitsaktivität keine signifikante Veränderung beobachtet werden. Die Ergebnisse decken sich damit zum Großteil mit den Resultaten aus den bereits beschriebenen Studien. Als neue Erkenntnis konnte zusätzlich bei den stabilen Patienten eine signifikante Reduktion der T_H1/T_H17-Zellen festgestellt werden (20). Die T_H1/T_H17-Zellen differenzieren sich ausgehend von den CD4⁺-T-Zellen und stellen eine Untergruppe der T_H17-Zellen dar. Als Besonderheit haben sie die Eigenschaften von T_H1-Zellen als auch von T_H17-Zellen und können sowohl IFN- γ als auch IL-17 sezernieren (159). Des Weiteren sind T_H1/T_H17-Zellen in der Lage α 4 β 1-Integrin zu exprimieren, wodurch eine vereinfachte Migration in das ZNS möglich ist (160). Zusätzlich können sie zytotoxische CD8⁺-T-Zellen und B-Zellen aktivieren (20, 54). Wie schon beschrieben, spielen sowohl T_H1-Zellen als auch T_H17-Zellen eine wichtige Rolle in der Pathogenese der MS. Durch ihre Fähigkeit der Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen und ihrer Möglichkeit die Blut-Hirn-Schranke zu passieren, tragen diese Zellen maßgeblich zu Entzündungsreaktionen bei. Aufgrund der signifikanten Abnahme der T_H1/T_H17-Zellen und der Relevanz in der Pathogenese der MS wurden die T_H1/T_H17-Zellen von Mansilla et. al. als aussichtsreicher Biomarker für eine erfolgreiche Therapie mit DMF angesehen. (20).

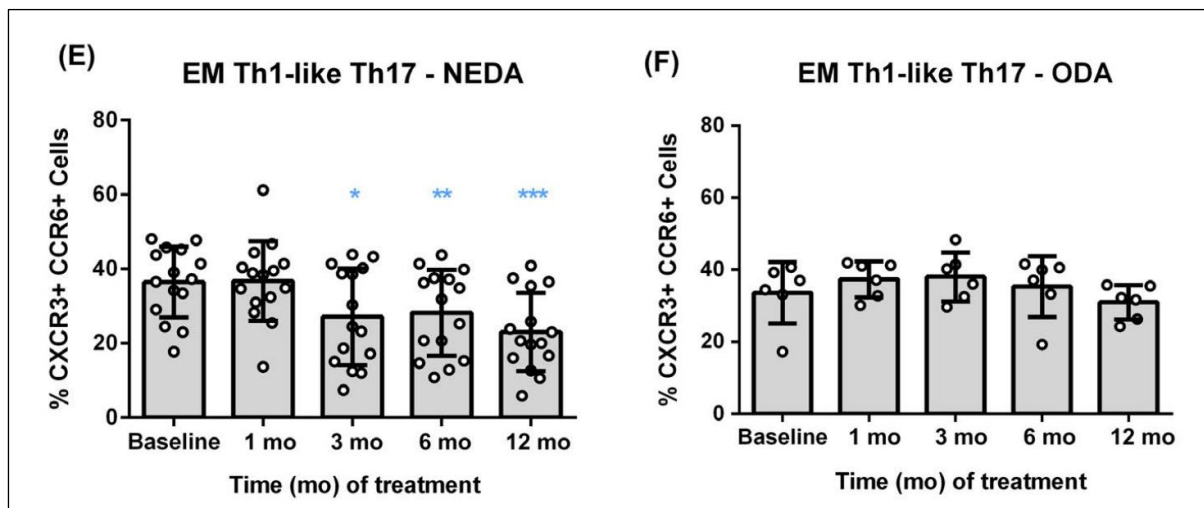


Abbildung 6: T_H1/T_H17 Zellen unter DMF-Therapie (20)

Dargestellt ist der Vergleich des prozentualen Anteils der T_H1/T_H17 Zellen (% CXCR3+ CCR6+ Zellen) bei NEDA-3-Patienten (E) und ODA-Patienten (F) nach unterschiedlichen Zeiträumen unter der Therapie mit DMF. Die Daten sind als Mittelwert und mit der Standardabweichung („Standard deviation“, SD) angegeben. Jeder Punkt entspricht den einzelnen Werten der Patienten.

Für die Signifikanz p gilt: *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001 (20)

Eine andere Studie von Quirant-Sánchez et. al. konnte ebenfalls einen Zusammenhang zwischen den T_H1/T_H17-Zellen und der Krankheitsaktivität unter der Therapie mit DMF feststellen. In einem Beobachtungszeitraum von 12 Monaten konnte gezeigt werden, dass Patienten, die zu Beginn der Therapie mit DMF bereits eine erhöhte Anzahl an T_H1/T_H17-Zellen aufwiesen, im Verlauf ein höheres Risiko für weitere klinische Krankheitsaktivität hatten. Gleiche Beobachtungen konnten auch bei der Auswertung der T_H1-Zellen gemacht werden. Darüber hinaus zeigten Patienten mit radiologischer Krankheitsaktivität signifikant höhere Zahlen an T_H1/T_H17-Zellen als stabile Patienten zu Beginn der Therapie. Die Ergebnisse dieser Studie bestärken die Vermutung, dass die T_H1/T_H17-Zellen ein geeigneter Parameter für die Vorhersage der Krankheitsaktivität unter der Therapie mit DMF sein könnten (54).

In einer Studie von Luckel et. al. wurden ebenfalls die Lymphozytensubpopulationen unter der Therapie mit DMF in Abhängigkeit von der Krankheitsaktivität untersucht. Es zeigte sich, dass Patienten mit einem stabilen Verlauf eine signifikante Abnahme der an der Pathogenese der MS beteiligten T_C17-Zellen aufwiesen. Es wurde gezeigt, dass diese Reduktion auf eine verstärkte Aktivierung des PI3K-AKT-FOXO1-T-BET-Signalwegs zurückzuführen ist. Hierdurch wird die IL-17- und ROR γ t-Expression (*RAR-related orphan receptor γ -t*) sowie die STAT5-Signalübertragung (*Signal transducer and activator of transcription 5*) in Abhängigkeit von Glutathion gehemmt. Bei der Betrachtung der ebenfalls pathogenetisch relevanten T_H17-Zellen konnte bei dem Vergleich von Patienten mit stabilen und aktiven Krankheitsverläufen keine signifikante Veränderung festgestellt werden. Die Ergebnisse aus dieser Studie deuten darauf hin, dass die Wirksamkeit von DMF über die Suppression von T_C17-Zellen vermittelt wird und

diese Zellpopulationen ein Surrogatparameter für ein Therapieansprechen auf DMF sein könnte (36).

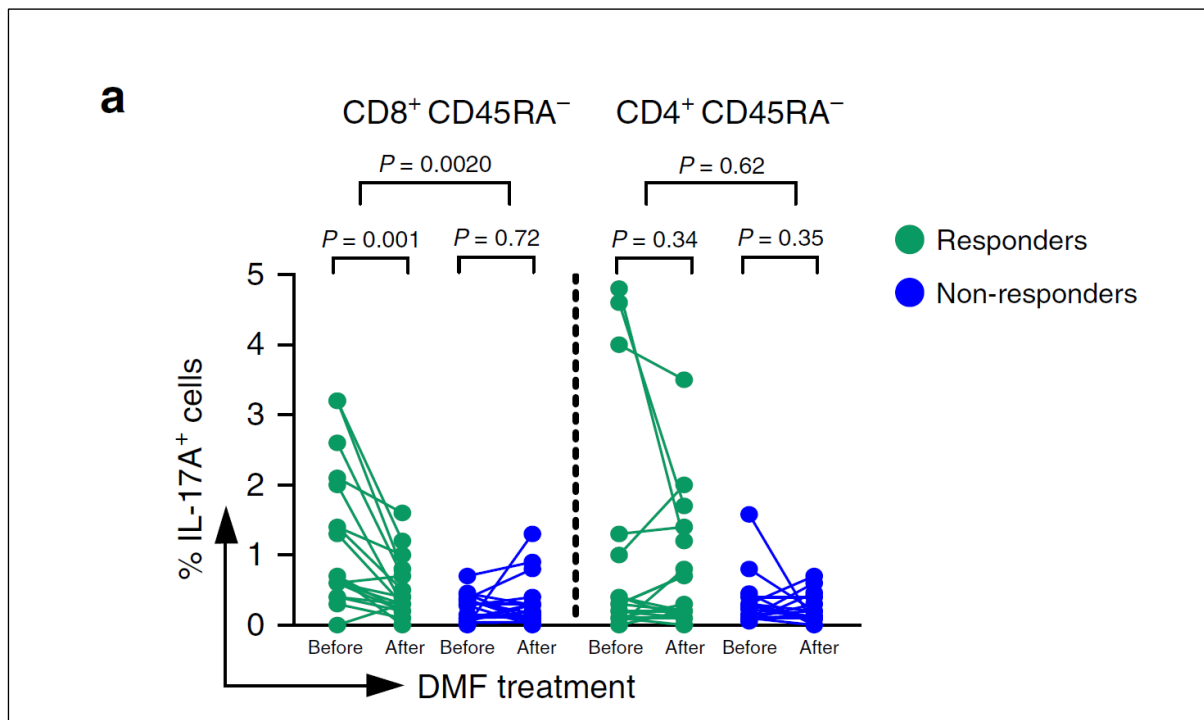


Abbildung 7: T_C17-Zellen und T_H17-Zellen unter DMF-Therapie (36)

Vergleich des prozentualen Anteils der T_C17-Zellen (CD8⁺ CD45RA⁻-Zellen) und der T_H17-Zellen (CD4⁺ CD45RA⁻-Zellen) bei NEDA-3-Patienten (grün) und ODA-Patienten (blau) vor und unter der Therapie mit DMF. Jeder Punkt entspricht den einzelnen Werten der Patienten (36).

In der Durchsicht der Studien zeigt sich, dass die ausschließliche Bestimmung der absoluten Lymphozyten keine eindeutige und ausreichende Auskunft über das Ansprechen auf eine Therapie mit DMF geben kann. Vielmehr ist eine detaillierte Auswertung der Lymphozytensubpopulationen nötig. Hierbei scheinen vor allem die an der Pathogenese der MS beteiligten Lymphozyten besonders im Vordergrund zu stehen, um zwischen einem stabilen oder aktiven Krankheitsverlauf zu differenzieren. In einigen der aufgeführten Studien wurde dieser Ansatz bereits verfolgt, dennoch zeigen sich zwischen den Studien zum Teil abweichende Ergebnisse. So ist noch nicht abschließend geklärt, welche Lymphozytensubpopulation der geeignetste Surrogatparameter für ein Ansprechen auf eine Therapie mit DMF sein könnte. Als weiterer Nachteil der zitierten Studien ist zu nennen, dass die Beobachtungszeiträume der einzelnen Studien sowie die Anzahl der Patienten sehr unterschiedlich ausfielen.

3. Material und Methoden

3.1. Studiendesign

Für die Durchführung dieser multizentrischen, prospektiven Längsschnittstudie erfolgte die Datenerhebung in Zusammenarbeit mit dem Krankheitsbezogenen Kompetenznetz Multiple Sklerose (KKNMS). Das KKNMS ist ein nationales Forschungsnetzwerk und umfasst 22 Zentren in ganz Deutschland. Zum Aufgabenspektrum des KKNMS gehören die Durchführung von klinischen Studien und die Grundlagenforschung im Bereich der MS. Seit dem Jahr 2010 wird unter dem Namen „German National MS Cohort“ eine Kohorte geführt, welche speziell für Studien an MS-Patienten unter der Therapie mit DMDs gebildet wurde (161). Als Einschlusskriterien für die „German National MS Cohort“ gelten ein Alter von über 18 Jahren und die Diagnose eines KIS oder einer RRMS. Im Rahmen dieser Kohorten erhalten die Patienten zum Zeitpunkt des Einschlusses eine klinisch-neurologische Untersuchung sowie eine Erhebung des EDSS-Werts. Außerdem erfolgen standardisierte MRT-Aufnahmen und Blutentnahmen. Zusätzlich werden weitere demografische und klinische Parameter erhoben (vgl. Abbildung 8, S.29). Wiederholt werden diese Untersuchungen nach dem ersten und zweiten Jahr und anschließend jeweils im Abstand von zwei Jahren (161).

Für die hier vorliegende Studie wurden 68 Patienten aus der „German National MS Cohort“ mit folgenden Einschlusskriterien ermittelt:

1. Diagnose einer RRMS (entsprechend den McDonalds-Kriterien von 2005)
2. Regelmäßige Einnahme von DMF für mindestens 12 Monaten (Tecfidera[®], 240 mg, zweimal täglich)
3. Keine oder nur milde Vortherapie (Interferon- β , Glatirameracetat)
4. Erhebung des Ausgangswerts innerhalb von drei Monaten vor Beginn der Therapie mit DMF

Als weitere demographische und klinische Parameter wurden folgende Daten in die Studie aufgenommen:

- Alter
- Geschlecht
- Krankheitsdauer
- Art der Vortherapie
- Grad der körperlichen Einschränkung (EDSS)
- Anzahl der Schubereignisse
- Anzahl, Größe und Lokalisation der T2-hyperintensiven MRT-Läsionen
- Anzahl, Größe und Lokalisation der KM-aufnehmenden MRT-Läsionen

Table 2 Assessment plan of the German National MS Cohort	
Data obtained/updated in every visit	
1) Sociodemographic data	
	Age, sex, and ethnicity
	Education, employment status, and social situation
2) General medical history and examination	
	Concomitant diseases, allergies, and medication
	BMI (kg/m ²), blood pressure, heart rate, and physical examination
	Smoking status (no, occasionally, regularly [up to 5, 6–10, 11–20, and >20], and unknown)
	Alcohol use (no, occasionally, regularly, and unknown)
	Family history
3) MS disease history	
	Date of onset, date of diagnosis, and diagnostic criteria
	Symptoms of the first attack
	Detailed relapse assessment including relapse treatment
4) Neurologic status and assessments	
	Expanded Disability Status Scale (EDSS) ¹⁸
	Multiple Sclerosis Functional Composite (MSFC) ¹⁹
	Multiple Sclerosis Inventory of Cognition (MUSIC) ²²
5) Patient questionnaires (self-reported)	
	Fatigue Scale for Motor and Cognitive Functions (FSMC) ²⁰
	Beck Depression Inventory-II (BDI-II) ²¹
	PainDETECT Questionnaire (PD-Q) ³⁵
6) Paraclinical investigations	
	Standardized cranial MRI
	Standardized collection of biomaterial (plasma, serum, DNA, RNA, in subsets: PBMC, CSF)
Abbreviations: BMI = body mass index; PBMC = peripheral blood mononuclear cell.	

Abbildung 8: Parameter der „German National MS Cohort“ (161)

Zunächst erfolgte eine Stratifizierung der gesamten Patienten entsprechend den klinischen und radiologischen Befunden in die Kategorie NEDA-3 oder ODA (vgl. Kapitel 2.1.6, S. 15). Für die weitere Analyse wurden anschließend aus dem gesamten Patientenkollektiv (n = 68) drei einzelne Kohorten gebildet.

1. MRT-Kohorte (n = 62)

Bei den Patienten in dieser Kohorte wurden 3-Tesla MRT-Aufnahmen des Gehirns durchgeführt und das kortikale Volumen sowie das Maß der kortikalen Atrophie berechnet.

2. sNfL-Kohorte (n = 39)

Bei den Patienten in dieser Kohorte wurde die sNfL-Konzentration gemessen.

3. FACS-Kohorte (n = 25)

Bei den Patienten in dieser Kohorte wurden unterschiedliche Lymphozytensubpopulationen bestimmt.

Die jeweils in den Kohorten erhobenen Parameter wurden zu einem Zeitpunkt vor Beginn der Therapie mit DMF („Baseline“, BL) und nach dem entsprechenden Beobachtungszeitraum der jeweiligen Gruppen unter der Therapie mit DMF („Follow up“, FU) erhoben.

Alle Patienten stimmten dem Studieneinschluss vor der Teilnahme schriftlich zu. Der Ethikantrag (Antragsnummer: 3714-10) wurde von der Ethikkommission der Ruhr-Universität Bochum und den lokalen Ethikkommissionen der jeweils mitwirkenden Zentren bewilligt.

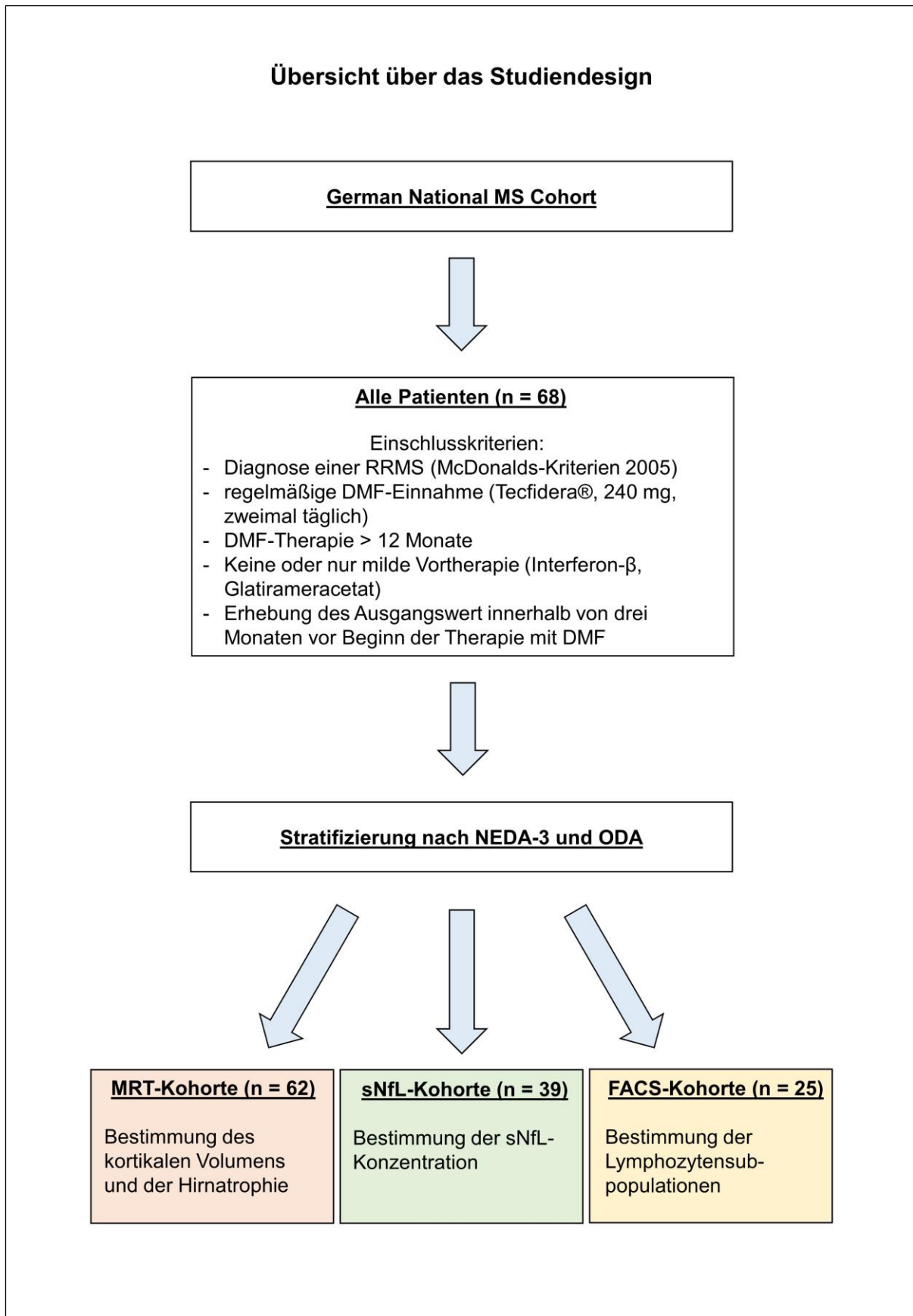


Abbildung 9: Studiendesign

3.2. Bestimmung der kortikalen Schichtdicke und kortikalen Atrophie

Für die Berechnung der kortikalen Schichtdicke und der Bestimmung der kortikalen Atrophie wurden sagittale, T1-gewichtete MRT-Aufnahmen des Gehirns verwendet. Für die Rekonstruktion der kortikalen Oberfläche und die segmentale Einteilung des Hirnvolumens wurde die Software FreeSurfer 5.3.0 verwendet (162). Zur Vermeidung einer falschen Klassifikation von Gewebe durch vorhandene Läsionen wurden hypointense Läsionen vor der Segmentierung der grauen Substanz aufgefüllt. Um eine konsistente Einschätzung der kortikalen Schichtdicke zu erhalten, erfolgte die Analyse der MRT-Bilder automatisch. In mehreren Verarbeitungsschritten (Entfernung des Schädelknochens, Talairach-Transformation, Atlasregistrierung und Parzellierung) wurde das Volumen des Gehirns bestimmt (163-165). Die kortikale Schichtdicke (in mm) wurde dann für jede Stelle der tessellierten Oberfläche quantifiziert. Dafür wurde zum einen der Durchschnitt des kürzesten Abstandes zwischen der Grenze der grauen Substanz und der weißen Substanz und zum anderen der Durchschnitt des kürzesten Abstandes zwischen der Grenze der grauen Substanz und des Liquors gebildet. Die kortikale Oberfläche und alle segmentalen Abschnitte wurden vor der Auswertung manuell auf Fehler geprüft.

Für die statistische Analyse der Datensätze wurden die erhobenen Werte des kortikalen Volumens zum Zeitpunkt BL mit den Werten zum Zeitpunkt FU verglichen. Außerdem wurde aus den Datensätzen die Veränderung der kortikalen Schichtdicke zwischen der Baseline und dem Follow up und somit das Maß der kortikalen Atrophie berechnet. Für die Berechnung der relativen kortikalen Atrophie wurde folgende Formel verwendet:

$$\text{relative kortikale Atrophie} = \frac{\left(\frac{\text{Volumen}_{\text{FU}} - \text{Volumen}_{\text{BL}}}{\text{Volumen}_{\text{BL}}} \right) * 100}{\text{Zeitintervall}} \quad (1)$$

3.3. Bestimmung der sNfL-Konzentration

Für die Bestimmung der sNfL-Konzentration wurde den Patienten Blut entnommen. Die Verarbeitung der Blutproben erfolgte innerhalb von 90 Minuten nach der Abnahme. Zunächst wurden die Proben bei Raumtemperatur für 10 Minuten bei 2000 G zentrifugiert. Anschließend wurde das überstehende Serum in Polypropylen-Röhrchen (300 – 600 µl) übertragen und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C konserviert. Die Messung der sNfL-Konzentrationen erfolgte durch den SiMoA HD-1 Analyzer (Quanterix, USA) (32, 151, 154). Bei dieser automatisierten Form des Enzymimmunoassays („Enzyme-linked Immunosorbent Assay“, ELISA) können einzelne Moleküle in einem Medium isoliert und quantifiziert werden.

Die Proben wurden unter Verwendung des „NF-Light Advantage Kits“ (Quanterix, USA) entsprechend den Vorgaben des Herstellers gemessen. Zur Berechnung des Variationskoeffizienten („Coefficient of variation“, CV) wurde jede der Proben zweimal gemessen und die Standardabweichung beider Messungen durch den Mittelwert der Messungen geteilt und mit 100 multipliziert. Die Proben mit einem CV von mehr als 20 % wurden erneut gemessen (30, 32). Für zwei verwendete Kontrollproben betrug der Inter-Assay-CV 2 % und 6 % bei entsprechend bestimmten Konzentrationen von 259,9 pg/ml und 12,8 pg/ml. Der mittlere Inter-Assay-CV betrug 4 %.

Die Bestimmung der sNfL-Konzentrationen erfolgte verblindet gegenüber den klinischen Daten.

Für die statistische Auswertung der Datensätze wurden die erhobenen Werte der sNfL-Konzentration zum Zeitpunkt BL mit den Werten zum Zeitpunkt FU verglichen. Zudem wurde die relative Veränderung der sNfL-Konzentration zwischen der Baseline und dem Follow up in der NEDA-3- und der ODA-Gruppe ausgewertet. Um die relative Veränderung zu bestimmen, wurde folgende Formel verwendet:

$$\text{relative Änderung} = \left(1 - \frac{\text{WERT}_{\text{FU}}}{\text{WERT}_{\text{BL}}}\right) * 100 \quad (2)$$

3.4. Bestimmung der Lymphozytensubpopulationen

Zur qualitativen und quantitativen Bestimmung der Lymphozytensubpopulationen wurde die Fluoreszenz-Durchflusszytometrie („Fluorescence-activated cell sorting“, FACS) verwendet. Bei der Durchflusszytometrie wird eine Zellsuspension durch eine Messkammer geleitet und jede Zelle einzeln von einem Laser angestrahlt. Entsprechend ihrer Morphologie erzeugt jede Zellpopulation ein charakteristisches Streulicht, das von einem Photometer gemessen wird und anschließend eine Aussage über das Verteilungsmuster der Zellpopulationen in der Suspension getroffen werden kann (166). Bei der FACS-Analyse werden zusätzlich fluorochrom-markierte, monoklonale Antikörper eingesetzt. Die Antikörper richten sich gegen bestimmte Oberflächenmerkmale, welche charakterisierend für die jeweilig zu bestimmende Zellpopulation sind. Nach der Markierung mit den Antikörpern und der Belichtung mit einem Laser wird das emittierte Licht wiederum von einem Photometer erfasst. Die Zellen können dabei entsprechend ihrer Oberflächendifferenzierung sortiert und ausgewertet werden. Durch diese Methode werden zusätzliche Informationen aus der analysierten Zellsuspension gewonnen. Unter anderem können die absoluten Zahlen von Lymphozytensubpopulationen und die Menge der Zytokin-produzierenden Zellen erfasst werden (166, 167).

Für die Bestimmung der Lymphozytensubpopulationen in dieser Studie wurde den Patienten Blut abgenommen und die mononukleären Zellen des peripheren Blutes („Peripheral blood mononuclear cell“, PBMC) isoliert. Die Isolation der PBMCs erfolgte durch Dichtegradientenzentrifugation. Als Trennlösung wurden Polymere aus Saccharose (Ficoll) verwendet (168, 169). Bis zur weiteren Verarbeitung erfolgte eine Konservierung der Proben bei -80 °C.

Die Aufarbeitung der Proben erfolgte entsprechend den Standardanweisungen des KKNMS. Für die Analyse wurden die Zellen aufgetaut und zur Reduktion der Inter-Assay-Variabilität zusammen verarbeitet. Die Analyse erfolgte, wie bereits in früheren Studien durchgeführt, mit dem Navios Durchflusszytometer (Beckman-Coulter, USA) (170).

Die Bestimmung der Lymphozytensubpopulationen erfolgte verblindet gegenüber den klinischen Daten.

Für die statistische Auswertung der Datensätze wurden die erhobenen Werte der Lymphozytensubpopulationen zum Zeitpunkt BL mit den Werten zum Zeitpunkt FU verglichen. Zudem wurde die relative Veränderung von Lymphozytensubpopulationen zwischen der Baseline und dem Follow up in der NEDA-3- und der ODA-Gruppe ausgewertet. Um die relative Veränderung zu bestimmen, wurde folgende Formel verwendet:

$$\text{relative Änderung} = \left(1 - \frac{\text{WERT}_{\text{FU}}}{\text{WERT}_{\text{BL}}}\right) * 100 \quad (3)$$

Bei der FACS-Analyse wurden folgende fluorochrom-markierte Antikörper verwendet:

Tabelle 1: Antikörper bei der FACS-Analyse

Basis-Panel	CD56-PC7, CD14-KO525, CD16-APC-A750, CD1c-FITC, CD19-APC-A700, CD3-Violet660, Va24-Ja18-PC5.5, CD8-PB450, CD4-APC, CD69-PE, HLA-DR-ECD
T-Zellen (Zytokin-Panel)	CD56-APC, CD3-APC-A750, CD8-APC-A700, CD4-ECD, CD45RO-Violet610, CD27-Violet660, CD146-KO525, CD27-Violet660, IFN- γ -PC7, TNF- α -PC5.5, IL-17A-FITC, IL-22- PE, GM-CSF-PB450, IL-4-Violet780
T_H-Zellen (1. Panel)	CD3-APC-A750, CD56-PC7, CD8-PB450, CD4-KO525, CD45RO-PC5.5, CD45RA-FITC, CD27-Violet660, CD197-Violet610, CD62L-Violet780, CD226-APC, CD31-ECD
T_H-Zellen (2. Panel)	CD3-APC-A750, CD56-ECD, CD8-APC-A700, CD4-APC, CD45RO-PB450, CD27-Violet660, CD194-PD5.5, CD196-PC7, CD146-KO525, CD183-FITC, CD161-Violet780, CD195-Violet610, CD183-FITC, CD27-Violet660, IL-23R-PE
T_{reg}-Panel	CD56-ECD, CD3-APC-A750, CD8-KO525, CD4-Violet780, CD45RO-Violet610, CD31-PC5.5, FOXP3-PE, CD127-APC-A700, CD25-Violet660, Helios-FITC, TIGIT-PC7

3.5. Auswertung der MRT-Befunde

Entsprechend dem Protokoll der „German National MS Cohort“ wurden bei den teilnehmenden Patienten in regelmäßigen Abständen 3-Tesla MRT-Aufnahmen des Gehirns angefertigt. Folgende bildgebende Sequenzen wurden im Rahmen dieser Studie ausgewertet:

- MP-RAGE („Magnetization prepared rapid gradient echo“) (sagittal)
- FLAIR (sagittal)
- T1-gewichtete Sequenz mit KM (axial, frontal, sagittal)

Im Hinblick auf die radiologische Krankheitsaktivität wurden die Anzahl, die Größe und die Lokalisation der hyperintensiven Läsionen in den T2-gewichteten Aufnahmen ermittelt. Zusätzlich wurde auch die Anzahl, die Größe und die Lokalisation der KM-aufnehmenden Läsionen in den T1-gewichteten Aufnahmen bestimmt.

Die Auswertung der MRT-Befunde erfolgte verblindet gegenüber den klinischen Daten.

3.6. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Daten wurde mit der Software SPSS 23.0 (IBM Corp., USA) durchgeführt. Die Anfertigung der Abbildung erfolgte mit der Software Graph Pad Prism 8.0 (GraphPad Software, USA).

Kontinuierliche Variablen wurden als Median und mit dem Interquartilsabstand („Interquartile range“, IQR) dargestellt. Kategoriale Variablen wurden als ganze Zahlen und in Prozentwerten angegeben. Die statistische Normalverteilung aller Variablen wurde durch den Kolmogorov-Smirnov-Test geprüft.

Für die statistische Analyse der kortikalen Schichtdicke, der sNfL-Konzentration und der Lymphozytensubpopulationen wurde für normalverteilte Variablen ein gepaarter T-Test verwendet. Für nicht-normalverteilte Variablen wurde ein Wilcoxon-Test verwendet.

Für die statistische Analyse der relativen Veränderung der Parameter und dem Vergleich zwischen dem NEDA-3- und dem ODA-Status wurde für normalverteilte Variablen ein gepaarter T-Test verwendet. Für nicht-normalverteilte Variablen wurde ein nicht-parametrischer Mann-Whitney-U-Test verwendet.

Alle erhobenen Ergebnisse mit einem p-Wert von $< 0,05$ wurden als statistisch signifikant angesehen.

4. Ergebnisse

4.1. Deskription der Kohorten

4.1.1. Demographische Daten

1. MRT-Kohorte

Tabelle 2: Demographie – MRT-Kohorte

Parameter	NEDA-3	ODA
Anzahl (n)	31	31
Alter (Jahre)		
Median (IQR)	29 (23 – 38)	31 (22 – 39)
Geschlecht		
Anzahl (%)		
- männlich	9 (29 %)	7 (22,6 %)
- weiblich	22 (71 %)	24 (77,4 %)

2. sNfL-Kohorte

Tabelle 3: Demographie – sNfL-Kohorte

Parameter	NEDA-3	ODA
Anzahl (n)	17	22
Alter (Jahre)		
Median (IQR)	27 (21 – 31,5)	32,5 (23 – 36)
Geschlecht		
Anzahl (%)		
- männlich	4 (23,5 %)	8 (36,4 %)
- weiblich	13 (76,5 %)	14 (63,6 %)

3. FACS-Kohorte**Tabelle 4: Demographie – FACS-Kohorte**

Parameter	NEDA-3	ODA
Anzahl (n)	13	12
Alter (Jahre) Median (IQR)	34 (21 – 42,5)	33,5 (21 – 36)
Geschlecht Anzahl (%)		
- männlich	3 (23,1 %)	3 (25 %)
- weiblich	10 (76,1 %)	9 (75 %)

In keiner Kohorte bestand ein signifikanter Unterschied in Bezug auf die Verteilung des Alters und des Geschlechts zwischen der NEDA-3- und der ODA-Gruppe.

4.1.2. Klinische Daten**1. MRT-Kohorte**

In der NEDA-3-Gruppe betrug die mediane Krankheitsdauer 7 Jahre. Der Beobachtungszeitraum betrug 13 Monate. Ein Anteil von 35,5 % der Patienten war zuvor unbehandelt gewesen. Die mediane jährliche Schubrate betrug 0,33 und 67,7 % der Patienten hatten im Jahr vor Studienbeginn ein Schubereignis. Der Wert der EDSS lag zu Beginn bei 1,0 und änderte sich unter der Therapie nicht relevant.

In der ODA-Gruppe betrug die mediane Krankheitsdauer 8 Jahre. Der Beobachtungszeitraum betrug 12 Monate. Ein Anteil von 45,2 % der Patienten war zuvor unbehandelt gewesen. Die mediane jährliche Schubrate betrug 0,33 und 67,7 % der Patienten hatten im Jahr vor Studienbeginn ein Schubereignis. Während des Beobachtungszeitraums zeigten 35,5 % der Patienten mindestens einen weiteren Schub. Der Wert der EDSS lag zu Beginn bei 1,0 und änderte sich unter der Therapie nicht relevant.

In Bezug auf die aufgeführten Parameter ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen der NEDA-3- und der ODA-Gruppe.

Tabelle 5: Klinische Daten – MRT-Kohorte

Parameter	NEDA-3	ODA
Krankheitsdauer (Jahre)		
Median (IQR)	7 (5 – 8)	8 (6 – 9)
Zeitraum BL – FU (Monate)		
Median (IQR)	13 (6 – 18)	12 (7 – 18)
Vortherapie		
Anzahl (%)		
- unbehandelt	11 (35,5 %)	4 (45,2 %)
- Interferon- β	12 (38,7 %)	10 (32,2 %)
- Glatirameracetat	8 (25,8 %)	7 (22,6 %)
Jährliche Schubrate		
Median (IQR)	0,33 (0,2 – 0,37)	0,33 (0,16 – 0,43)
Schubrate BL		
Anzahl (%)	21 (67,7 %)	21 (67,7 %)
Schubrate FU		
Anzahl (%)	-----	11 (35,5 %)
EDSS BL		
Median (IQR)	1,0 (0 – 2,0)	1,0 (0 – 1,5)
EDSS FU		
Median (IQR)	1,0 (0,5 – 1,5)	1,0 (0 – 1,5)

2. sNfL-Kohorte

In der NEDA-3-Gruppe betrug die mediane Krankheitsdauer 7 Jahre. Der Beobachtungszeitraum betrug 24 Monate. Ein Anteil von 47 % der Patienten war zuvor unbehandelt gewesen. Die mediane jährliche Schubrate betrug 0,33 und 65 % der Patienten hatten im Jahr vor Studienbeginn ein Schubereignis. Der Wert der EDSS lag zu Beginn bei 1,0 und änderte sich unter der Therapie nicht relevant.

In der ODA-Gruppe betrug die mediane Krankheitsdauer 7 Jahre. Der Beobachtungszeitraum betrug 23 Monate. Ein Anteil von 68,2 % der Patienten war zuvor unbehandelt gewesen. Die mediane jährliche Schubrate betrug 0,33 und 72,7 % der Patienten hatten im Jahr vor Studienbeginn ein Schubereignis. Während des Beobachtungszeitraums zeigten 18,2 % der Patienten mindestens einen weiteren Schub. Der Wert der EDSS lag zu Beginn bei 1,0 und

änderte sich unter der Therapie nicht relevant.

In Bezug auf die aufgeführten Parameter ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen der NEDA-3- und der ODA-Gruppe.

Tabelle 6: Klinische Daten – sNfL-Kohorte

Parameter	NEDA-3	ODA
Krankheitsdauer (Jahre)		
Median (IQR)	7 (5 – 7,5)	7 (6 – 8,25)
Zeitraum BL – FU (Monate)		
Median (IQR)	24 (23,5 – 26)	23 (22 – 24,25)
Vortherapie		
Anzahl (%)		
- unbehandelt	8 (47 %)	15 (68,2 %)
- Interferon-β	5 (29,4 %)	3 (13,6 %)
- Glatirameracetat	4 (23,6 %)	4 (18,2 %)
Jährliche Schubrate		
Median (IQR)	0,33 (0,2 – 0,37)	0,33 (0,16 – 0,38)
Schubrate BL		
Anzahl (%)	11 (65 %)	16 (72,7 %)
Schubrate FU		
Anzahl (%)	-----	4 (18,2 %)
EDSS BL		
Median (IQR)	1,0 (0,5 – 2,75)	1,0 (0,5 – 2,0)
EDSS FU		
Median (IQR)	1,0 (0 – 1,5)	1,0 (0 – 1,5)

3. FACS-Kohorte

In der NEDA-3-Gruppe betrug die mediane Krankheitsdauer 7 Jahre. Der Beobachtungszeitraum betrug 12 Monate. Ein Anteil von 38,5 % der Patienten war zuvor unbehandelt gewesen. Die mediane jährliche Schubrate betrug 0,33 und 69 % der Patienten hatten im Jahr vor Studienbeginn ein Schubereignis. Der Wert der EDSS lag zu Beginn bei 2,0 und reduzierte sich unter der Therapie leicht.

In der ODA-Gruppe betrug die mediane Krankheitsdauer 8 Jahre. Der Beobachtungszeitraum betrug 12,5 Monate. Ein Anteil von 66,6 % der Patienten waren zuvor unbehandelt gewesen.

Die mediane jährliche Schubrate betrug 0,33 und 75 % der Patienten hatten im Jahr vor Studienbeginn ein Schubereignis. Während des Beobachtungszeitraums zeigten 33,3 % der Patienten mindestens einen weiteren Schub. Der Wert der EDSS lag zu Beginn bei 0,5 und änderte sich unter der Therapie nicht relevant.

In Bezug auf die aufgeführten Parameter ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen der NEDA-3- und der ODA-Gruppe.

Tabelle 7: Klinische Daten – FACS-Kohorte

Parameter	NEDA-3	ODA
Krankheitsdauer (Jahre)		
Median (IQR)	7 (6 – 8)	8 (6 – 9)
Zeitraum BL – FU (Monate)		
Median (IQR)	12 (6,5 – 18)	12,5 (10 – 13)
Vortherapie		
Anzahl (%)		
- unbehandelt	5 (38,5 %)	8 (66,6 %)
- Interferon- β	5 (38,5 %)	2 (16,6 %)
- Glatirameracetat	3 (23 %)	2 (16,6 %)
Jährliche Schubrate		
Median (IQR)	0,33 (0,2 – 0,37)	0,33 (0,16 – 0,5)
Schubrate BL		
Anzahl (%)	9 (69 %)	9 (75 %)
Schubrate FU		
Anzahl (%)	-----	4 (33,3 %)
EDSS BL		
Median (IQR)	2,0 (1,0 – 2,25)	0,5 (0 – 1,5)
EDSS FU		
Median (IQR)	1,5 (0,5 – 2,0)	0,5 (0 – 1,375)

4.1.3. MRT-Daten

1. MRT-Kohorte

In der NEDA-3-Gruppe zeigten 84 % der Patienten vor Beginn der Therapie mehr als 9 Läsionen in der kranialen Bildgebung. Darüber hinaus konnten bei 35 % der Patienten mindestens eine KM-aufnehmende Läsion nachgewiesen werden.

In der ODA-Gruppe zeigten 71 % der Patienten vor Beginn der Therapie mehr als 9 Läsionen in der kranialen Bildgebung. Darüber hinaus konnten bei 39 % der Patienten mindestens eine KM-aufnehmende Läsion nachgewiesen werden. Während des Beobachtungszeitraums wiesen 61 % der Patienten mindestens eine neue T2-Läsion und 13 % mindestens eine neue KM-aufnehmende Läsion auf.

In Bezug auf die aufgeführten Parameter ergaben sich keine signifikanten Unterschiede bei der Stratifizierung in die Gruppen NEDA-3 und ODA.

Tabelle 8: MRT-Daten – MRT-Kohorte

Parameter	NEDA-3	ODA
T2-Läsionen BL		
Anzahl (%)		
- < 9 Läsionen	5 (16 %)	9 (29 %)
- > 9 Läsionen	26 (84 %)	22 (71 %)
T2-Läsionen FU		
Anzahl (%)	-----	19 (61 %)
KM-Läsionen BL		
Anzahl (%)	11 (35 %)	12 (39 %)
KM-Läsionen FU		
Anzahl (%)	-----	4 (13 %)

2. sNfL-Kohorte

In der NEDA-3-Gruppe zeigten 76 % der Patienten vor Beginn der Therapie mehr als 9 Läsionen in der kranialen Bildgebung. Darüber hinaus konnten bei 35 % der Patienten mindestens eine KM-aufnehmende Läsion nachgewiesen werden.

In der ODA-Gruppe zeigten 68 % der Patienten vor Beginn der Therapie mehr als 9 Läsionen in der kranialen Bildgebung. Darüber hinaus konnten bei 41 % der Patienten mindestens eine KM-aufnehmende Läsion nachgewiesen werden. Während des Beobachtungszeitraums wiesen 45 % der Patienten mindestens eine neue T2-Läsion und 9 % mindestens eine neue KM-aufnehmende Läsion auf.

In Bezug auf die aufgeführten Parameter ergaben sich keine signifikanten Unterschiede bei der Stratifizierung in die Gruppen NEDA-3 und ODA.

Tabelle 9: MRT-Daten – sNfL-Kohorte

Parameter	NEDA-3	ODA
T2-Läsionen BL		
Anzahl (%)		
- < 9 Läsionen	4 (24 %)	7 (32 %)
- > 9 Läsionen	13 (76 %)	15 (68 %)
T2-Läsionen FU		
Anzahl (%)	-----	10 (45 %)
KM-Läsionen BL		
Anzahl (%)	6 (35 %)	9 (41 %)
KM-Läsionen FU		
Anzahl (%)	-----	2 (9 %)

3. FACS-Kohorte

In der NEDA-3-Gruppe zeigten 77 % der Patienten vor Beginn der Therapie mehr als 9 Läsionen in der kranialen Bildgebung. Darüber hinaus konnten bei 23 % der Patienten mindestens eine KM-aufnehmende Läsion nachgewiesen werden.

In der ODA-Gruppe zeigten 75 % der Patienten vor Beginn der Therapie mehr als 9 Läsionen in der kranialen Bildgebung. Darüber hinaus konnten bei 50 % der Patienten mindestens eine KM-aufnehmende Läsion nachgewiesen werden. Während des Beobachtungszeitraums wiesen 25 % der Patienten mindestens eine neue T2-Läsion und 25 % mindestens eine neue KM-aufnehmende Läsion auf.

In Bezug auf die aufgeführten Parameter ergaben sich keine signifikanten Unterschiede bei der Stratifizierung in die Gruppen NEDA-3 und ODA.

Tabelle 10: MRT-Daten – FACS-Kohorte

Parameter	NEDA-3	ODA
T2-Läsionen BL		
Anzahl (%)		
- < 9 Läsionen	3 (23 %)	3 (25 %)
- > 9 Läsionen	10 (77 %)	9 (75 %)
T2-Läsionen FU		
Anzahl (%)	-----	3 (25 %)
KM-Läsionen BL		
Anzahl (%)	3 (23 %)	6 (50 %)
KM-Läsionen FU		
Anzahl (%)	-----	3 (25 %)

4.2. Auswertung der Biomarker

4.2.1. Veränderungen des kortikalen Volumens

Bei der Untersuchung der kortikalen Schichtdicke konnten sowohl bei den Patienten der NEDA-3-Gruppe als auch der ODA-Gruppe keine signifikanten Veränderungen festgestellt werden. Die Patienten in der NEDA-3-Gruppe zeigten vor Beginn der Therapie eine durchschnittliche kortikale Schichtdicke von 2,465 mm (SD 0,142). Nach der Therapie mit DMF betrug die durchschnittliche kortikale Schichtdicke 2,468 mm (SD 0,124) ($p = 0,755$). Die Patienten in der ODA-Gruppe wiesen vor Beginn der Therapie eine durchschnittliche kortikale Schichtdicke von 2,457 mm (SD 0,136) auf. Nach der Therapie mit DMF betrug die durchschnittliche kortikale Schichtdicke 2,453 mm (SD 0,121) ($p = 0,596$).

Bei der Analyse der relativen kortikalen Atrophie nach der Therapie mit DMF konnte zwischen den beiden Gruppen NEDA-3 und ODA kein signifikanter Unterschied ermittelt werden. Die mittlere relative Atrophie betrug in der NEDA-3-Gruppe 0,02 % und in der ODA-Gruppe 0,08 % ($p = 0,761$).

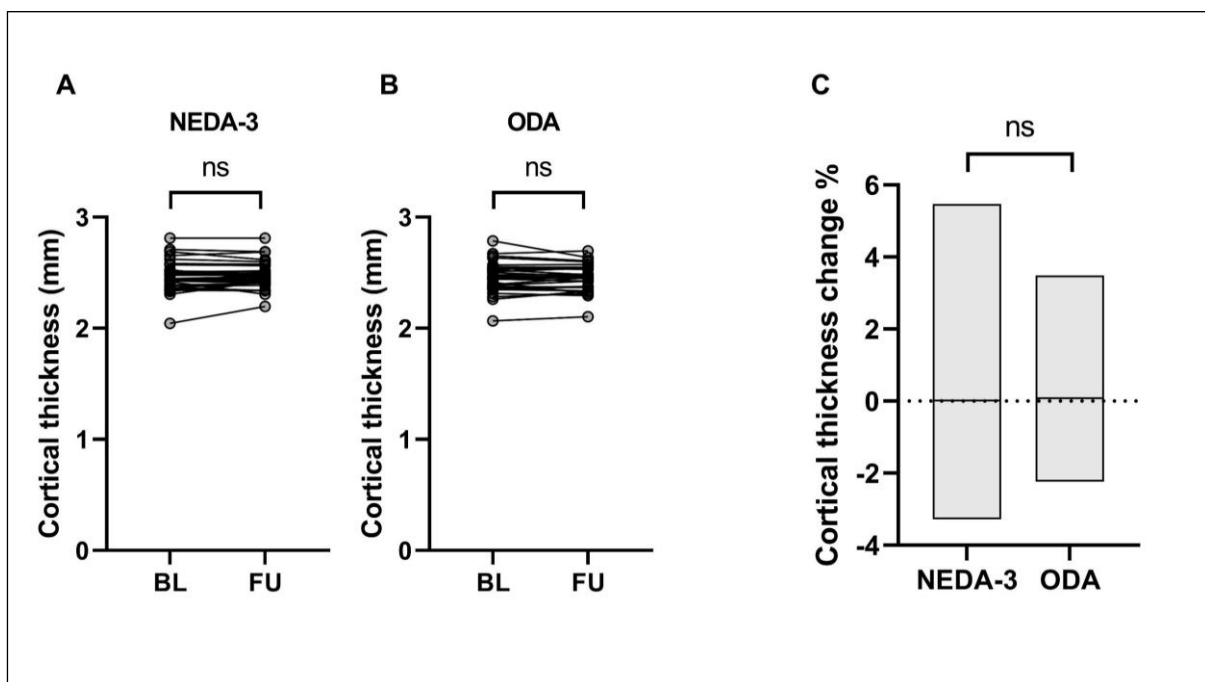


Abbildung 10: Veränderung der kortikalen Schichtdicke unter DMF-Therapie

Dargestellt sind die Veränderungen der kortikalen Schichtdicke (mm) bei NEDA-3- (A) und ODA-Patienten (B) zum Zeitpunkt vor der Therapie (BL) und nach der Therapie mit DMF (FU). Jeder Datenpunkt entspricht den einzelnen Werten der Patienten. Zusätzlich ist die Veränderung der relativen kortikalen Atrophie (C) bei Patienten der NEDA-3- und ODA-Gruppe gezeigt. Für die Boxen entsprechen der obere bzw. untere Rand der oberen bzw. unteren Standardabweichung und die mittlere Linie dem Mittelwert. Für die Signifikanz gilt: ns = nicht signifikant

4.2.2. Veränderungen der sNfL-Konzentration

Bei der Untersuchung der sNfL-Konzentration konnte sowohl bei den Patienten der NEDA-3-Gruppe als auch der ODA-Gruppe eine signifikante Abnahme der sNfL-Konzentration festgestellt werden. Die Patienten in der NEDA-3-Gruppe zeigten vor Beginn der Therapie eine durchschnittliche sNfL-Konzentration von 19,34 pg/ml (SD 22,86). Nach der Therapie mit DMF betrug die mittlere sNfL-Konzentration noch 6,99 pg/ml (SD 5,22) ($p = 0,025$). Die Patienten in der ODA-Gruppe wiesen vor Beginn der Therapie eine durchschnittliche sNfL-Konzentration von 10,79 pg/ml (SD 6,12) auf. Nach der Therapie mit DMF betrug die mittlere sNfL-Konzentration noch 7,78 pg/ml (SD 5,42) ($p = 0,016$).

Bei der Analyse der relativen Änderung der sNfL-Konzentration konnte jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen den Patienten beider Gruppen ermittelt werden. Die mittlere relative Abnahme betrug in der NEDA-3-Gruppe -22,73 % und in der ODA-Gruppe -10,56 % ($p = 0,624$).

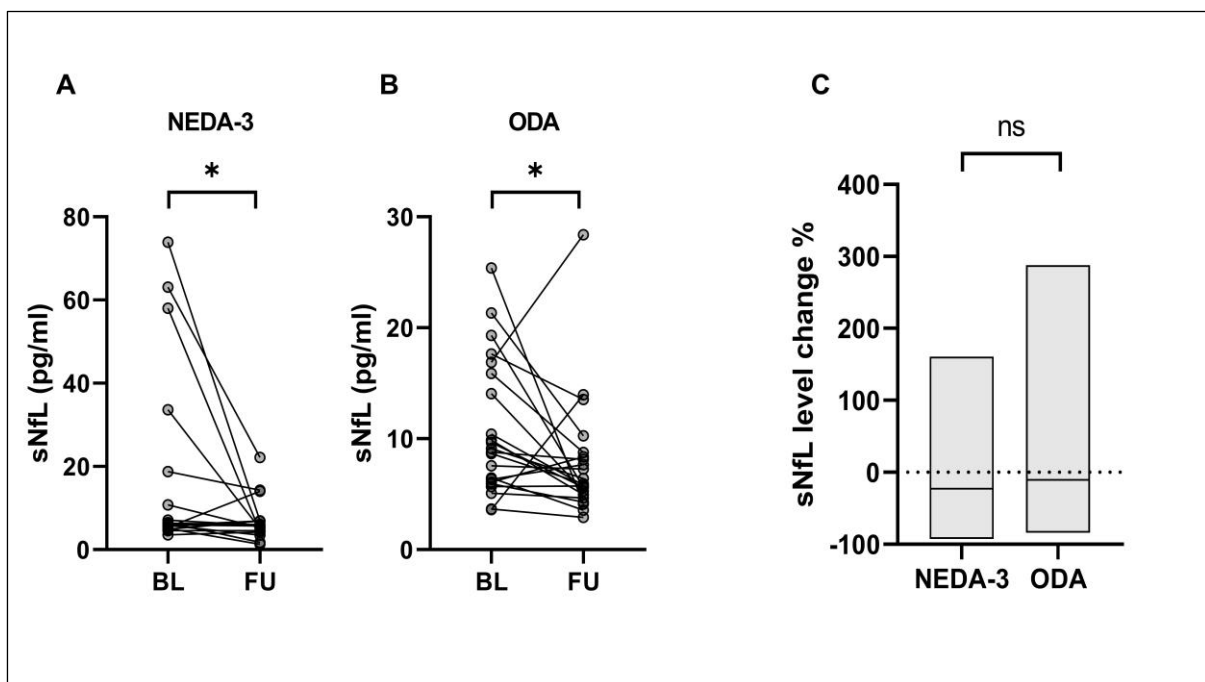


Abbildung 11: Veränderung der sNfL-Konzentration unter DMF-Therapie

Dargestellt sind die Veränderungen der sNfL-Konzentration bei NEDA-3- (A) und ODA-Patienten (B) zum Zeitpunkt vor der Therapie (BL) und nach der Therapie mit DMF (FU). Jeder Datenpunkt entspricht den einzelnen Werten der Patienten. Zusätzlich ist die prozentuale Veränderung der sNfL-Konzentration (C) bei Patienten der NEDA-3- und ODA-Gruppe gezeigt. Für die Boxen entsprechen der obere bzw. untere Rand der oberen bzw. unteren Standardabweichung und die mittlere Linie dem Mittelwert. Für die Signifikanz gilt: * $p < 0,05$; ns = nicht signifikant

4.2.3. Veränderungen der Lymphozytensubpopulationen

4.2.3.1. T_C17-Zellen

Im FACS-Gating stellen sich die T_C17-Zellen als der prozentuale Anteil der CD8⁺ CD27⁺ CD45RO⁺ IL-17A⁺-Zellen an den CD8⁺ CD27⁺ CD45RO⁺-Zellen dar. Bei der Analyse dieser Lymphozytensubpopulation zeigte sich bei den Patienten in der NEDA-3-Gruppe eine signifikante Reduktion der proinflammatorischen T_C17-Zellen unter der Therapie mit DMF. In der ODA-Gruppe konnte dieser Effekt nicht nachgewiesen werden.

Vor Beginn der Therapie fand sich bei den NEDA-3-Patienten im Durchschnitt ein Anteil von 0,274 (SD 0,153) T_C17-Zellen und unter der Therapie sank dieser Anteil auf 0,099 (SD 0,119) ($p = 0,006$). Bei den Patienten in der ODA-Gruppe fand sich vor der Therapie ein mittlerer Anteil von 0,229 (SD 0,204) T_C17-Zellen und unter der Therapie stieg dieser Anteil auf 0,240 (SD 0,198) ($p = 0,984$).

Bei der Analyse der prozentualen Veränderung des Anteils der T_C17-Zellen konnte jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen den Patienten beider Gruppen ermittelt werden. Die mittlere relative Abnahme in der NEDA-3-Gruppe betrug -40,26 % (SD 91,53) und in der ODA-Gruppe eine relative Zunahme von 8,14 % (SD 55,17) ($p = 0,104$).

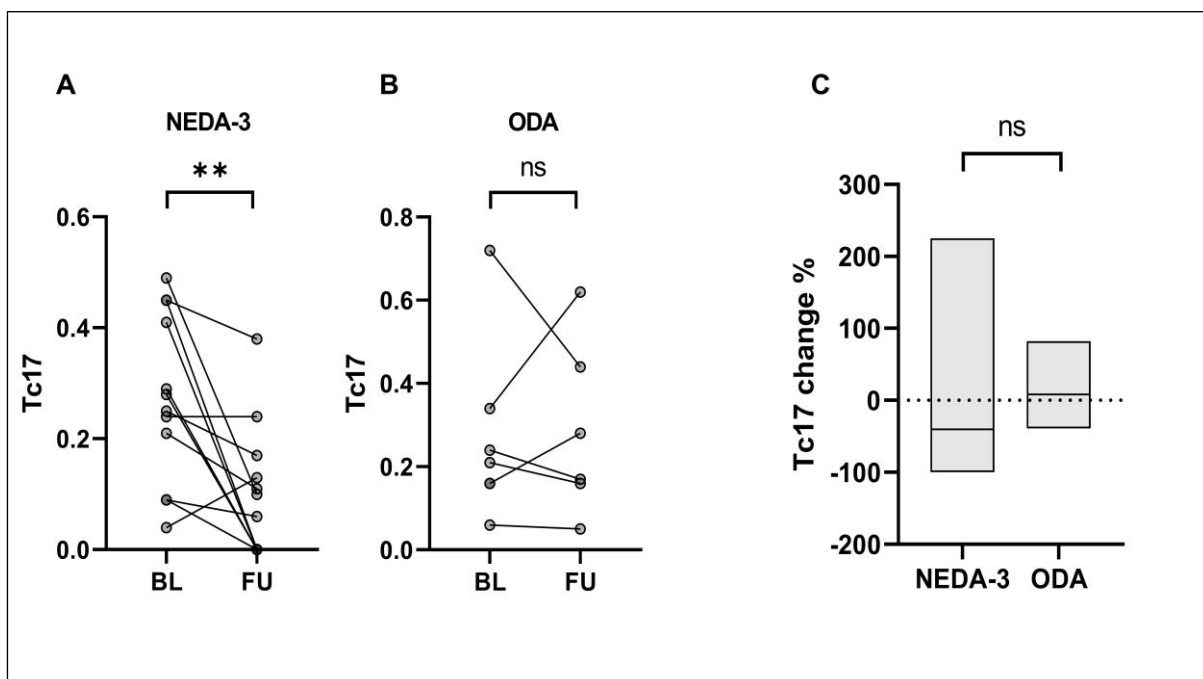


Abbildung 12: Veränderung der T_C17-Zellen unter DMF-Therapie

Dargestellt sind die Veränderungen der T_C17-Zellen bei NEDA-3- (A) und ODA-Patienten (B) zum Zeitpunkt vor der Therapie (BL) und nach der Therapie mit DMF (FU). Jeder Datenpunkt entspricht den einzelnen Werten der Patienten. Zusätzlich ist die prozentuale Veränderung der T_C17-Zellen (C) bei Patienten der NEDA-3- und ODA-Gruppe gezeigt. Für die Boxen entsprechen der obere bzw. untere Rand der oberen bzw. unteren Standardabweichung und die mittlere Linie dem Mittelwert. Für die Signifikanz gilt: ** $p < 0,01$; ns = nicht signifikant

4.2.3.2. tT_{reg}-Zellen

Im FACS-Gating stellen sich die im Thymus gebildeten, regulatorischen T-Zellen (tT_{reg}-Zellen) als der prozentuale Anteil der CD4⁺ FoxP3⁺ CD127^{low} CD25⁺ Helios⁺-Zellen an den CD4⁺ FoxP3⁺ CD127^{low} CD25⁺-Zellen dar. Bei der Analyse dieser Lymphozytensubpopulation zeigte sich bei den Patienten in der NEDA-3-Gruppe eine signifikante Zunahme der tT_{reg}-Zellen unter der Therapie mit DMF. In der ODA-Gruppe konnte dieser Effekt nicht nachgewiesen werden.

Vor Beginn der Therapie fand sich bei den NEDA-3-Patienten im Durchschnitt ein Anteil von 86,34 (SD 3,23) tT_{reg}-Zellen und unter der Therapie stieg dieser Anteil auf 89,25 (SD 3,28) ($p = 0,007$) an. Bei den Patienten in der ODA-Gruppe fand sich vor der Therapie ein mittlerer Anteil von 85,29 (SD 4,67) tT_{reg}-Zellen und unter der Therapie sank dieser Anteil auf 84,86 (SD 5,69) ($p = 0,921$).

Bei der Analyse der prozentualen Veränderung des Anteils der tT_{reg}-Zellen konnte ebenfalls ein signifikanter Unterschied zwischen den Patienten beider Gruppen ermittelt werden. Die mittlere relative Veränderung der tT_{reg}-Zellen zeigte in der NEDA-3-Gruppe eine Zunahme von 3,56 % (SD 3,95) und in der ODA-Gruppe eine Abnahme von -0,53 % (SD 4,84) ($p = 0,041$).

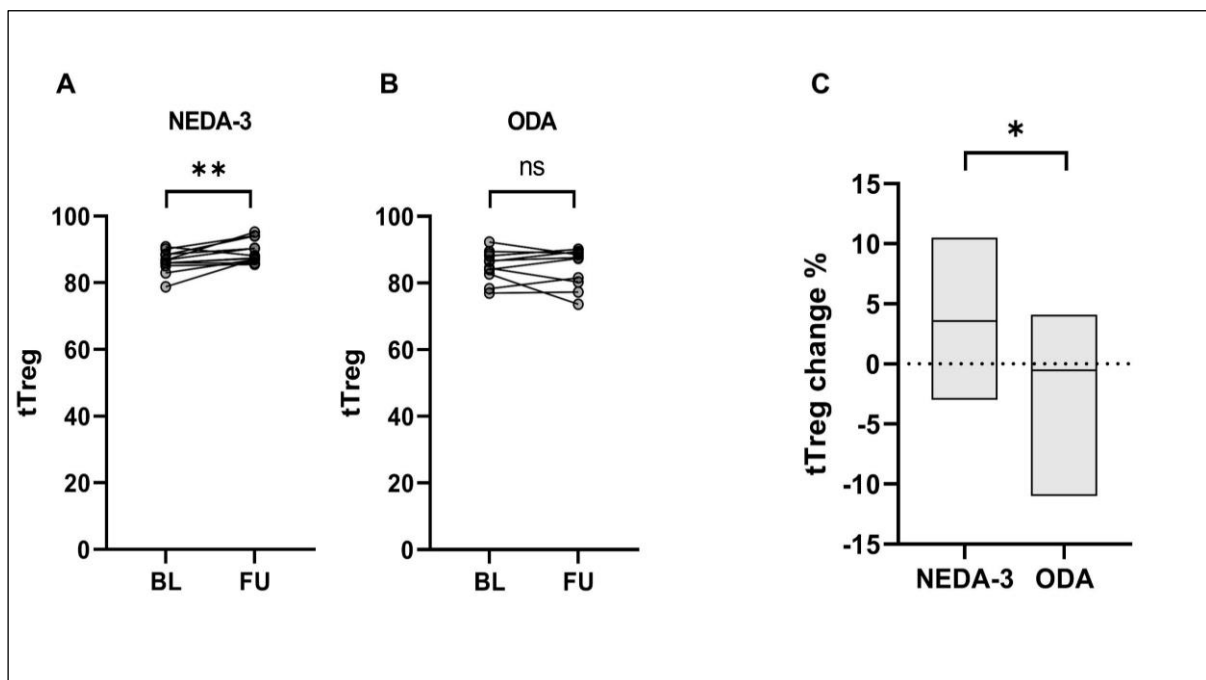


Abbildung 13: Veränderung der tT_{reg}-Zellen unter DMF-Therapie

Dargestellt sind die Veränderungen der tT_{reg}-Zellen bei NEDA-3- (A) und ODA-Patienten (B) zum Zeitpunkt vor der Therapie (BL) und nach der Therapie mit DMF (FU). Jeder Datenpunkt entspricht den einzelnen Werten der Patienten. Zusätzlich ist die durchschnittliche Veränderung der tT_{reg}-Zellen (C) in Prozent gezeigt. Für die Boxen entsprechen der obere bzw. untere Rand der oberen bzw. unteren Standardabweichung und die mittlere Linie dem Mittelwert.

Für die Signifikanz p gilt: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; ns = nicht signifikant

4.2.3.3. T_H17-Zellen

Im FACS-Gating stellen sich die T_H17-Zellen als der prozentuale Anteil der CD4⁺ CD27⁺ CD45RO⁺ IL-17A⁺-Zellen an den CD4⁺ CD27⁺ CD45RO⁺-Zellen dar. Bei der Analyse dieser Lymphozytensubpopulation konnten bei den Patienten der jeweiligen Gruppen NEDA-3 und ODA keine signifikanten Unterschiede zwischen dem Zeitpunkt vor der Therapie und nach dem Beobachtungszeitraum unter der Therapie mit DMF beobachtet werden.

Vor Beginn der Therapie fand sich bei den NEDA-3-Patienten im Durchschnitt ein Anteil von 1,543 (SD 0,763) T_H17-Zellen und unter der Therapie sank dieser Anteil auf 1,277 (SD 0,451) ($p = 0,220$). Bei den Patienten in der ODA-Gruppe fand sich vor der Therapie ein mittlerer Anteil von 1,342 (SD 0,596) T_H17-Zellen und unter der Therapie sank dieser Anteil auf 1,217 (SD 0,447) ($p = 0,338$).

Bei der Analyse der prozentualen Veränderung des Anteils der T_H17-Zellen konnte ebenfalls kein signifikanter Unterschied zwischen den Patienten beider Gruppen ermittelt werden. Die mittlere relative Veränderung der T_H17-Zellen zeigte in der NEDA-3-Gruppe eine Zunahme von 5,245 % (SD 8,28) und in der ODA-Gruppe eine Abnahme von -6,72 % (SD 18,99) ($p = 0,480$).

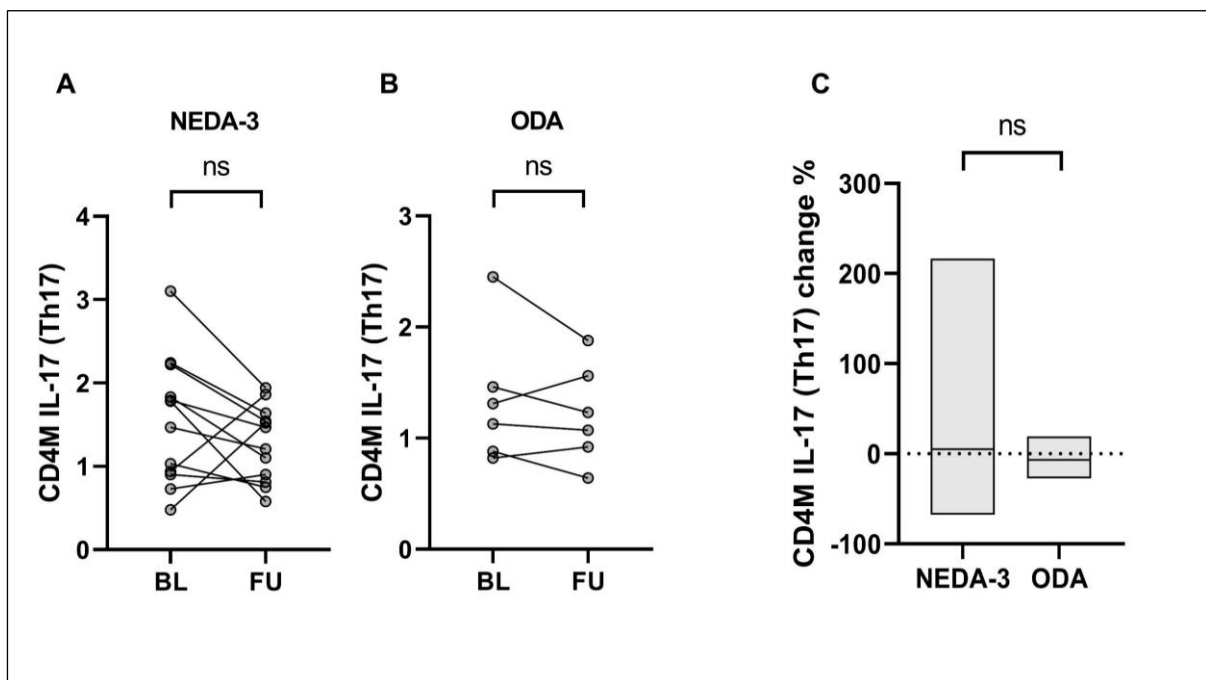


Abbildung 14: Veränderung der T_H17-Zellen unter DMF-Therapie

Dargestellt sind die Veränderungen der T_H17-Zellen bei NEDA-3- (A) und ODA-Patienten (B) zum Zeitpunkt vor der Therapie (BL) und nach der Therapie mit DMF (FU). Jeder Datenpunkt entspricht den einzelnen Werten der Patienten. Zusätzlich ist die durchschnittliche Veränderung der T_H17-Zellen (C) in Prozent gezeigt. Für die Box entsprechen der obere und untere Rand der Standardabweichung und die mittlere Linie dem Mittelwert.

Für die Signifikanz gilt: ns = nicht signifikant

4.2.3.4. Zytokin-produzierende CD8⁺-Lymphozyten

Zusätzlich wurden in dieser Studie weitere Zytokin-produzierende CD8⁺-Lymphozyten analysiert. Folgende Zellpopulationen wurden ausgewertet:

CD8⁺IL17-Zellen: prozentualer Anteil der CD8⁺ IL-17⁺-Zellen an den CD8⁺-Zellen

CD8⁺M IL4-Zellen: prozentualer Anteil der CD8⁺ CD27⁺ CD45RO⁺ IL-4⁺-Zellen an den CD8⁺ CD27⁺ CD45RO⁺-Zellen

CD8⁺M IL22-Zellen: prozentualer Anteil der CD8⁺ CD27⁺ CD45RO⁺ IL-22⁺-Zellen an den CD8⁺ CD27⁺ CD45RO⁺-Zellen

CD8⁺M TNF α -Zellen: prozentualer Anteil der CD8⁺ CD27⁺ CD45RO⁺ TNF α ⁺-Zellen an den CD8⁺ CD27⁺ CD45RO⁺-Zellen

CD8⁺M IFN- γ -Zellen: prozentualer Anteil der CD8⁺ CD27⁺ CD45RO⁺ IFN- γ ⁺-Zellen an den CD8⁺ CD27⁺ CD45RO⁺-Zellen

CD8⁺M GM-CSF-Zellen: prozentualer Anteil der CD8⁺ CD27⁺ CD45RO⁺ GM-CSF⁺-Zellen an den CD8⁺ CD27⁺ CD45RO⁺-Zellen

Erwähnenswert ist eine signifikante Abnahme der CD8⁺ IL17-Zellen in der NEDA-3-Gruppe (vgl. Abbildung 15, Grafik A, S. 51). Hier zeigte sich vor der Therapie im Durchschnitt ein Anteil der CD8⁺ IL17-Zellen von 0,132 (SD 0,079). Nach der Therapie betrug der mittlere Anteil dieser Zellpopulation noch 0,076 (SD 0,053) ($p = 0,021$). Im Gegensatz konnte bei den Patienten der ODA-Gruppe für die CD8⁺ IL17-Zellen keine signifikante Veränderung festgestellt werden (vgl. Abbildung 15, Grafik B, S. 51). Hier wiesen die Patienten vor der Therapie einen Anteil der CD8⁺ IL17-Zellen von 0,2 (SD 0,257) auf. Nach 12 Monaten Therapie mit DMF betrug dieser Wert noch 0,123 (SD 0,133) ($p = 0,254$).

Des Weiteren war eine signifikante Abnahme der CD8⁺M IFN- γ -Zellen in der NEDA-3-Gruppe (vgl. Abbildung 15, Grafik M, S. 51) zu verzeichnen. Hier zeigte sich vor der Therapie im Durchschnitt ein Anteil der CD8⁺M IFN- γ -Zellen von 20,04 (SD 23,31). Nach der Therapie betrug der mittlere Anteil dieser Zellpopulation noch 6,987 (SD 5,222) ($p = 0,041$). Im Gegensatz konnte bei den Patienten der ODA-Gruppe für die CD8⁺M IFN- γ -Zellen keine signifikante Veränderung festgestellt werden (vgl. Abbildung 15, Grafik N, S. 51). Hier wiesen die Patienten vor der Therapie einen Anteil der CD8⁺M IFN- γ -Zellen von 56,12 (SD 19,94) auf. Nach der Therapie mit DMF betrug dieser Wert noch 48,07 (SD 12,40) ($p = 0,346$).

Die Veränderungen aller anderen untersuchten Lymphozytensubpopulationen waren in der Auswertung statistisch nicht signifikant.

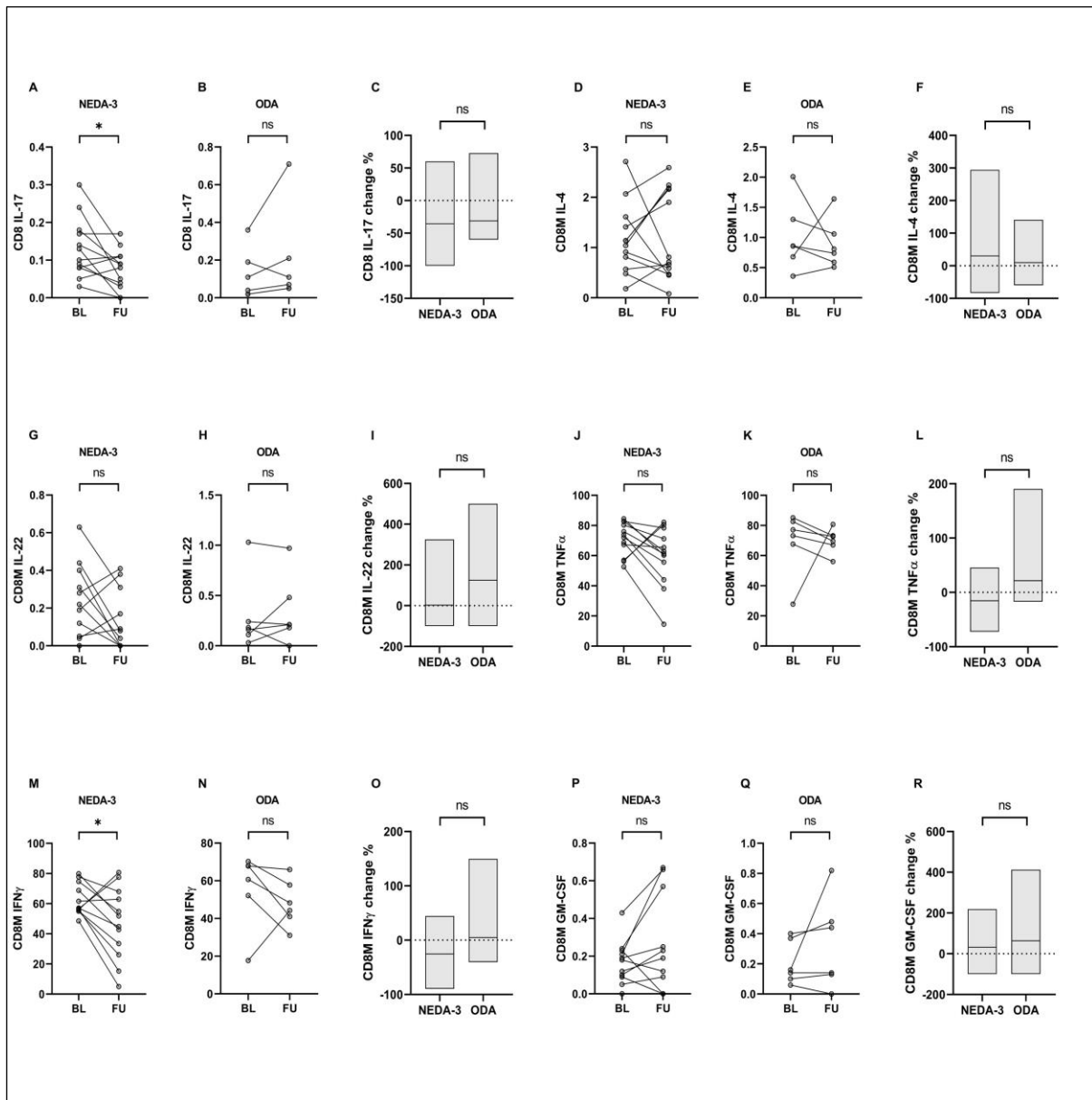


Abbildung 15: Veränderungen von Zytokin-produzierenden CD8⁺-Lymphozyten

Dargestellt sind die Veränderungen verschiedener Zytokin-produzierender CD8⁺-Lymphozyten bei NEDA-3- und ODA-Patienten zum Zeitpunkt vor der Therapie (BL) und nach der Therapie mit DMF (FU). Jeder Datenpunkt entspricht den einzelnen Werten der Patienten. Zusätzlich ist die durchschnittliche Veränderung unterschiedlicher Zytokin-produzierender Lymphozytensubpopulationen in Prozent gezeigt. Für die Boxen entsprechen der obere bzw. untere Rand der oberen bzw. unteren Standardabweichung und die mittlere Linie dem Mittelwert.

Für die Signifikanz gilt: * $p < 0,05$; ns = nicht signifikant

5. Diskussion

Die Krankheitsprogression der MS wird im Wesentlichen durch die Ausbildung von entzündlichen Läsionen und durch neurodegenerative Prozesse im ZNS bedingt (90). Eine ideale Therapie würde beide dieser pathogenetischen Mechanismen inhibieren und das Fortschreiten der Krankheit verlangsamen. Die meisten DMDs führen, aufgrund ihrer ausschließlich immunsuppressiven Wirkung, lediglich zu einer Reduktion der Entzündungsaktivität (12). Wie beschrieben, bewirkt der Wirkstoff DMF eine Aktivierung des NRF2-Transkriptionsfaktors und reduziert dadurch die zytotoxischen Effekte von oxidativem Stress auf neuronale Zellen (10, 17-19). Dementsprechend kann DMF, neben seiner antiinflammatorischen Wirkung, auch effektiv die Neurodegeneration bei Patienten mit MS verlangsamen. Nicht zuletzt deshalb wird DMF zu den vielversprechendsten, neuen Medikamenten in der Therapie der MS gezählt (20). Allerdings ist der genaue Wirkmechanismus von DMF weiterhin ungeklärt (121). Zusätzlich ist unklar, wie das Ansprechen auf eine Therapie mit DMF frühzeitig ermittelt und bewertet werden kann. Um Biomarker für das Ansprechen auf die Behandlung mit DMF zu identifizieren, wurden in dieser multizentrischen, prospektiven Längsschnittstudie verschiedene Surrogatparameter auf ihren Vorhersagewert geprüft. Bei der Analyse wurden Biomarker ausgewählt, die sowohl die Immunsuppression als auch die Neurodegeneration widerspiegeln. Für den Bereich Immunsuppression wurde sich auf pathogenetisch relevante Lymphozytensubpopulationen konzentriert. Für den Bereich der Neurodegeneration wurde sich auf die sNfL-Konzentration und die kortikale Schichtdicke fokussiert.

5.1. Kortikales Volumen als Biomarker

Die Bestimmung des kortikalen Volumens und das Maß der kortikalen Atrophie stellen einen aktuellen Ansatz zur Verlaufskontrolle der MS dar. Zwischen einer vermehrten kortikalen Atrophie und der Krankheitsprogression besteht eine enge Verbindung. Dabei korreliert die kortikale Atrophie mit dem Ausmaß der Neurodegeneration und dem Grad der körperlichen Beeinträchtigung (22-25). Darüber hinaus kann die kortikale Atrophie bereits zur erweiterten Bestimmung der Krankheitsaktivität (NEDA-4) herangezogen werden (107, 113, 114, 142). In einer monozentrischen Studie mit 20 RRMS-Patienten konnte bereits zuvor gezeigt werden, dass Patienten unter der Therapie mit DMF nach einem Jahr eine geringere Atrophie der grauen Substanz aufwiesen als unbehandelte Patienten (142). Zusätzlich hatten Ciolac et. al. in ihrer Studie zeigen können, dass bei stabilen MS-Patienten eine signifikant niedrigere durchschnittliche Atrophie-Rate auftrat als bei Patienten mit einem aktiven Krankheitsverlauf (27).

Um den Einfluss von DMF auf die Neurodegeneration und die Veränderung der grauen Substanz zu untersuchen und daraus Rückschlüsse auf ein mögliches Therapieansprechen zu ziehen, wurde in dieser Studie eine Analyse der kortikalen Schichtdicke sowie der relativen Atrophie-Rate durchgeführt. In diesem Zusammenhang konnten keine signifikanten

Ergebnisse gefunden werden. Weder Patienten mit einem stabilen Verlauf noch Patienten mit weiterer Krankheitsaktivität zeigten eine signifikante Veränderung des kortikalen Volumens unter der Therapie mit DMF. Auch bei dem Vergleich der Atrophie-Rate nach 12 Monaten Therapie mit DMF konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den NEDA-3- und ODA-Patienten festgestellt werden. Diese Ergebnisse stehen im Kontrast zu den Resultaten der oben zitierten Studien.

Anzumerken ist, dass die zu erwartende Abnahme der kortikalen Schichtdicke bei einem Beobachtungszeitraum von 12 Monaten nur geringfügig ist und dadurch möglicherweise eine aussagekräftige Veränderung der kortikalen Schichtdicke nicht zu beobachten war (171). Trotz der Verwendung eines einheitlichen Studienprotokolls könnte zusätzlich eine methodische Heterogenität der einzelnen, an dieser Studie beteiligten Zentren eine mögliche signifikante Veränderung überlagert haben.

Zum aktuellen Stand lässt sich festhalten, dass die Messung des kortikalen Volumens und der Atrophie-Raten noch nicht zuverlässig in den klinischen Alltag integriert werden kann. Dafür ist die Bestimmung der kortikalen Schichtdicke über mehrere Zentren hinweg zu fehleranfällig und führt zu einem Mangel an Sensitivität und Spezifität. Zudem sind der benötigte Zeitaufwand und die Kosten für eine MRT-Untersuchung aktuell nicht effizient im Klinikalltag zu etablieren. Es wird empfohlen abseits von Studien zunächst ein standardisiertes Verfahren zur Bestimmung des Hirnvolumens im klinischen Alltag zu etablieren, sodass die Messung der kortikalen Atrophie einheitlich und zuverlässig erfolgen kann (172).

5.2. sNfL als Biomarker

Die Analyse der sNfL-Konzentration zur Verlaufskontrolle einer MS steht seit einiger Zeit im Fokus von wissenschaftlichen Arbeiten. Seit der Einführung des SiMoA stellt auch die Bestimmung von sehr niedrigen sNfL-Konzentrationen keine Schwierigkeit mehr dar (148-150). Wie bereits beschrieben, steigt die Konzentration von sNfL während eines akuten Schubs signifikant an (30-32). Darüber hinaus besteht eine Korrelation zwischen einem hohen sNfL-Wert und der Größe der Läsionen im ZNS sowie einer schlechteren kognitiven Leistung (153, 154). Unter der Einnahme von DMDs konnte gezeigt werden, dass die sNfL-Konzentration signifikant abnimmt und auch bei Patienten mit einem stabilen Krankheitsverlauf signifikant niedriger ist (148, 149, 156, 157). Außerdem besteht eine Korrelation zwischen der Abnahme der sNfL-Konzentration und einer Verbesserung in unterschiedlichen Krankheits-Scores (EDSS, ARMSS-Score, MSIS-29) (173). In vielen der zitierten Arbeiten wird die Messung der sNfL-Konzentration als Biomarker für das Ansprechen auf die Behandlung mit einem DMD empfohlen (31, 32, 147, 149, 155, 174). Aus diesem Grund wurde jeweils die sNfL-Konzentration vor der Therapie und nach 24 Monaten unter der Therapie mit DMF ausgewertet. Es konnte eine signifikante Abnahme der sNfL-Konzentration sowohl in der NEDA-3- als auch in der ODA-

Gruppe festgestellt werden, dabei war die Abnahme der sNfL-Konzentration in der NEDA-3-Gruppe deutlicher ausgeprägt. Dieses Ergebnis ist vergleichbar mit den Resultaten einer prospektiven Phase-IV-Studie von Sejbaek et. al. In dieser Studie mit 52 RRMS-Patienten konnte eine signifikante Abnahme der sNfL-Konzentration bereits nach 6 Monaten unter der Therapie mit DMF nachgewiesen werden (148).

Die gefundenen Ergebnisse stimmen mit den aufgeführten Studien überein und stützen die Annahme, dass eine stärkere Abnahme der sNfL-Konzentration eine geringere Krankheitsaktivität bei einer MS widerspiegelt und somit ein geeigneter Surrogatparameter für ein Therapieansprechen sein könnte. Die ausgeprägtere Reduktion der sNfL-Konzentration in der NEDA-3-Gruppe könnte zusätzlich darauf hinweisen, dass eine longitudinale Verlaufskontrolle der sNfL-Werte einen Rückschluss über den Therapieverlauf geben könnte. Trotzdem konnte in dieser Studie kein Anhalt dafür gefunden werden, dass durch die Messung der sNfL-Konzentration zwischen dem NEDA-3-Status und dem ODA-Status statistisch signifikant differenziert werden kann. Darüber hinaus ist zu beachten, dass NfL bei jeder Art von neuroaxonaler Schädigung freigesetzt wird, wodurch die Verwendung der sNfL-Konzentration als Surrogatparameter fehleranfällig wird und nicht als spezifischer Marker für eine MS angesehen werden kann.

5.3. Lymphozyten als Biomarker

Neben der Untersuchung der kortikalen Schichtdicke und der sNfL-Konzentration wurde die Auswirkung von DMF auf unterschiedliche Lymphozytensubpopulationen ausgewertet. Dabei wurde sich auf wichtige, an der Pathogenese der MS beteiligte Lymphozyten fokussiert. Diese ausgewählten Zellpopulationen wurden auf ihr Potenzial als Surrogatparameter für das Therapieansprechen auf eine Behandlung mit DMF untersucht. Wie erwartet und auch in früheren Studien beschrieben, führte die Therapie mit DMF zu einer Abnahme der T-Gedächtniszellen und der T-Effektor-Gedächtniszellen. Hiervon waren überwiegend die CD8⁺-T-Zellen betroffen (15, 17, 33, 35, 136).

In der weiteren Auswertung zeigte sich eine signifikante Abnahme der T_C17-Zellen in der Gruppe der NEDA-3-Patienten. Dieser Effekt konnte bei Patienten mit einem aktiven Krankheitsverlauf nicht nachgewiesen werden. Diese Feststellung stützen die Ergebnisse einer von Luckel et. al. im Jahr 2019 durchgeführten prospektiven Kohortenstudie, wonach die Suppression von T_C17-Zellen mit dem Ansprechen auf die Behandlung mit DMF assoziiert ist (36). Auf molekularer Ebene konnte bereits gezeigt werden, dass DMF den PI3K-AKT-FOXO1-T-BET-Weg verstärkt, wodurch die IL-17- und ROR γ t-Expression sowie die STAT5-Signalübertragung in Abhängigkeit von Glutathion gehemmt werden (36). Somit passen die gefundenen Ergebnisse zu den in der Literatur vorbeschriebenen Auswirkungen einer Einnahme von DMF. Darüber hinaus weist dieses Ergebnis darauf hin, dass die Wirksamkeit von DMF entscheidend

von einer Abnahme der T_C17-Zellen abhängt.

Zusätzlich konnte nur bei den Patienten der NEDA-3-Gruppe ein signifikanter Anstieg der tT_{reg}-Zellen ermittelt werden. Auch bei der Betrachtung der relativen Veränderung dieser Subpopulation konnte ebenfalls eine signifikant höhere Zunahme der tT_{reg}-Zellen bei den NEDA-3-Patienten im Vergleich mit den ODA-Patienten ermittelt werden. tT_{reg}-Zellen sind im Thymus entwickelte, regulatorische T-Zellen. Sie sind entscheidend für die Regulation des Immunsystems und stehen im direkten Zusammenhang mit der Reaktion des Körpers auf Autoantigene. Über die Expression des Forkhead-Box-Protein P3 (FoxP3) tragen sie maßgeblich zur Aufrechterhaltung der Toleranz gegenüber körpereigenen Strukturen bei und unterdrücken das Auftreten von Autoimmunerkrankungen (175, 176). Darüber hinaus besitzen tT_{reg}-Zellen eine hohe Anzahl an selbstreaktiven T-Zell-Rezeptoren („T-cell receptor“, TCR), welche ebenfalls für die Aufrechterhaltung der Selbsttoleranz entscheidend sind (175). Eine Erhöhung von tT_{reg}-Zellen unter der Therapie mit DMF ist in der aktuellen Literatur noch nicht beschrieben worden. Über den Funktionsmechanismus der tT_{reg}-Zellen und der Zunahme unter der Therapie lässt sich schließen, dass eine Einnahme von DMF dazu beiträgt, autoreaktive T-Zellen zu unterdrücken und mit einer Verbesserung der Toleranz gegenüber Myelin-haltiger, körpereigener Strukturen einhergeht.

Aus der Literatur ist bekannt, dass es unter der Therapie mit DMF zu einer signifikanten Abnahme der T_H17-Zellen bei stabilen MS-Patienten kommt und diese Zellpopulation als Surrogatparameter geeignet sein könnte (36). Dieses Ergebnis konnte in dieser Studie nicht reproduziert werden. Weder in der Gruppe der NEDA-3-Patienten noch in der Gruppe der ODA-Patienten zeigte sich eine statistisch signifikante Veränderung der T_H17-Zellen.

In der Auswertung von weiteren Zytokin-produzierenden Zellen konnte in der Gruppe der NEDA-3-Patienten eine signifikante Reduktion des Anteils der CD8⁺ IL17-Zellen und der CD8⁺M IFN- γ -Zellen gefunden werden. Die Abnahme der CD8⁺ IL17-Zellen, als übergeordnete Zellgruppe der IL-17-produzierenden CD8⁺-Zellen, bestärkt noch einmal die Bedeutung dieser Zytokin-produzierenden Zellenreihe in der Evaluation eines Therapieansprechens auf DMF. Die gefundene Abnahme der CD8⁺M IFN- γ -Zellen stimmt mit den Ergebnissen aus der zitierten Studie von Medina et.al. überein (17).

Bei der Interpretation der Ergebnisse dieser Studie ist zu berücksichtigen, dass die Anzahl der verfügbaren, eingefrorenen PBMCs gering war. Zusätzlich ist bekannt, dass es bei der Verarbeitung und Stimulation von PBMCs zu einer veränderten Expression von Chemokinrezeptoren kommen kann, wodurch die Ergebnisse in dieser Studie beeinflusst worden sein könnten (20).

6. Zusammenfassung

Als wichtigstes Ergebnis dieser multizentrischen, prospektiven Längsschnittstudie konnte festgestellt werden, dass eine erfolgreiche Therapie mit DMF bei Patienten mit MS mit einer signifikanten Abnahme der T_C17-Zellen sowie einem signifikanten Anstieg der tT_{reg}-Zellen verbunden war. Insbesondere der signifikante Anstieg der Selbsttoleranz-vermittelnden tT_{reg}-Zellen wurde in der Literatur noch nicht beschrieben und konnte als zusätzliche, neue Erkenntnis gewonnen werden.

Die sNfL-Konzentration erwies sich in der NEDA-3- und in der ODA-Gruppe als signifikant erniedrigt. Bei den Patienten ohne weitere Krankheitsaktivität war diese Abnahme stärker ausgeprägt. Eine Aussage über das Therapieansprechen konnte allerdings nicht getroffen werden.

Die Messung der kortikalen Schichtdicke sowie das Maß der kortikalen Atrophie zeigten in dieser Studie in allen Auswertungen keine statistisch signifikanten Veränderungen. Dadurch waren diese Parameter nicht dazu geeignet eine Aussage über das Therapieansprechen zu treffen.

Zusammenfassend stützen die gefundenen Ergebnisse die These, dass insbesondere die Bestimmung von ausgewählten Lymphozytensubpopulationen einen schubfreien Krankheitsverlauf unter der Therapie mit DMF prognostizieren kann. Speziell die Rolle der T_C17-Zellen als Surrogatparameter in der Therapieevaluation konnte gefestigt werden. Darüber hinaus konnte ein Anstieg der tT_{reg}-Zellen als weiterer potenzieller, neuer Surrogatparameter gefunden werden. Möglicherweise kann eine Kombination von zwei oder mehr Surrogatparametern eine noch detailliertere Auskunft über das Therapieansprechen auf den Wirkstoff DMF geben und somit zur optimalen Therapie bei Patienten mit MS beitragen. Dies gilt es in zukünftigen Studien und an einem größeren Patientenkollektiv zu untersuchen.

7. Literaturverzeichnis

1. Ascherio A, Munger KL. Environmental risk factors for multiple sclerosis. Part I: the role of infection. *Ann Neurol*. 2007;61(4):288-99.
2. Files DK, Jausurawong T, Katrajian R, Danoff R. Multiple sclerosis. Primary care. 2015;42(2):159-75.
3. Saleem S, Anwar A, Fayyaz M, Anwer F, Anwar F. An Overview of Therapeutic Options in Relapsing-remitting Multiple Sclerosis. *Cureus*. 2019;11(7):e5246.
4. Calabresi PA. Diagnosis and management of multiple sclerosis. *Am Fam Physician*. 2004;70(10):1935-44.
5. Yamout BI, Alroughani R. Multiple Sclerosis. *Semin Neurol*. 2018;38(2):212-25.
6. Dobson R, Giovannoni G. Multiple sclerosis - a review. *Eur J Neurol*. 2019;26(1):27-40.
7. Coyle PK. Pharmacogenetic Biomarkers to Predict Treatment Response in Multiple Sclerosis: Current and Future Perspectives. *Multiple sclerosis international*. 2017;2017:6198530.
8. Scafari A, Knappertz V, Cutter G, Goodin DS, Ashton R, Ebers GC. Mortality in patients with multiple sclerosis. *Neurology*. 2013;81(2):184-92.
9. Lunde HMB, Assmus J, Myhr KM, Bø L, Grytten N. Survival and cause of death in multiple sclerosis: a 60-year longitudinal population study. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*. 2017;88(8):621-5.
10. Gold R, Kappos L, Arnold DL, Bar-Or A, Giovannoni G, Selmaj K, et al. Placebo-controlled phase 3 study of oral BG-12 for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med*. 2012;367(12):1098-107.
11. Fox RJ, Miller DH, Phillips JT, Hutchinson M, Havrdova E, Kita M, et al. Placebo-controlled phase 3 study of oral BG-12 or glatiramer in multiple sclerosis. *N Engl J Med*. 2012;367(12):1087-97.
12. Pardo G, Jones DE. The sequence of disease-modifying therapies in relapsing multiple sclerosis: safety and immunologic considerations. *J Neurol*. 2017;264(12):2351-74.
13. Wingerchuk DM, Weinshenker BG. Disease modifying therapies for relapsing multiple sclerosis. *BMJ*. 2016;354:i3518.
14. Longbrake EE, Cantoni C, Chahin S, Cignarella F, Cross AH, Piccio L. Dimethyl fumarate induces changes in B- and T-lymphocyte function independent of the effects on absolute lymphocyte count. *Mult Scler*. 2018;24(6):728-38.
15. Mehta D, Miller C, Arnold DL, Bame E, Bar-Or A, Gold R, et al. Effect of dimethyl fumarate on lymphocytes in RRMS: Implications for clinical practice. *Neurology*. 2019;92(15):e1724-e38.
16. Schilling S, Goelz S, Linker R, Luehder F, Gold R. Fumaric acid esters are effective in chronic experimental autoimmune encephalomyelitis and suppress macrophage infiltration. *Clin Exp Immunol*. 2006;145(1):101-7.
17. Medina S, Villarrubia N, Sainz de la Maza S, Lifante J, Costa-Frossard L, Roldan E, et al. Optimal response to dimethyl fumarate associates in MS with a shift from an inflammatory to a tolerogenic blood cell profile. *Mult Scler*. 2018;24(10):1317-27.
18. Linker RA, Lee DH, Ryan S, van Dam AM, Conrad R, Bista P, et al. Fumaric acid esters exert neuroprotective effects in neuroinflammation via activation of the Nrf2 antioxidant pathway. *Brain*. 2011;134(Pt 3):678-92.
19. Scannevin RH, Chollate S, Jung MY, Shackett M, Patel H, Bista P, et al. Fumarates promote cytoprotection of central nervous system cells against oxidative stress via the nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 pathway. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 2012;341(1):274-84.
20. Mansilla MJ, Navarro-Barriuso J, Presas-Rodríguez S, Teniente-Serra A, Quirant-Sánchez B, Ramo-Tello C, et al. Optimal response to dimethyl fumarate is mediated by a reduction of Th1-like Th17 cells after 3 months of treatment. *CNS Neurosci Ther*. 2019;25(9):995-1005.
21. Manni A, Iaffaldano A, Lucisano G, D'Onghia M, Mezzapesa DM, Felica V, et al. Lymphocyte Count and Body Mass Index as Biomarkers of Early Treatment Response in a Multiple Sclerosis Dimethyl Fumarate-Treated Cohort. *Front Immunol*. 2019;10:1343.
22. Fisher E, Lee JC, Nakamura K, Rudick RA. Gray matter atrophy in multiple sclerosis: a longitudinal study. *Ann Neurol*. 2008;64(3):255-65.
23. Jacobsen C, Hagemeyer J, Myhr KM, Nyland H, Lode K, Bergsland N, et al. Brain atrophy and disability progression in multiple sclerosis patients: a 10-year follow-up study. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*. 2014;85(10):1109-15.
24. Uher T, Horakova D, Bergsland N, Tyblova M, Ramasamy DP, Seidl Z, et al. MRI correlates of disability progression in patients with CIS over 48 months. *NeuroImage Clinical*. 2014;6:312-9.
25. Zipp F, Gold R, Wiendl H. Identification of inflammatory neuronal injury and prevention of neuronal damage in multiple sclerosis: hope for novel therapies? *JAMA Neurol*. 2013;70(12):1569-74.

26. Tsivgoulis G, Katsanos AH, Grigoriadis N, Hadjigeorgiou GM, Heliopoulos I, Kilidireas C, et al. The effect of disease modifying therapies on brain atrophy in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis: a systematic review and meta-analysis. *PLoS one*. 2015;10(3):e0116511-e.
27. Ciolac D, Luessi F, Gonzalez-Escamilla G, Koirala N, Riedel C, Fleischer V, et al. Selective Brain Network and Cellular Responses Upon Dimethyl Fumarate Immunomodulation in Multiple Sclerosis. *Front Immunol*. 2019;10:1779.
28. Luessi F, Siffrin V, Zipp F. Neurodegeneration in multiple sclerosis: novel treatment strategies. *Expert Rev Neurother*. 2012;12(9):1061-76; quiz 77.
29. Khalil M, Teunissen CE, Otto M, Piehl F, Sormani MP, Gatteringer T, et al. Neurofilaments as biomarkers in neurological disorders. *Nat Rev Neurol*. 2018;14(10):577-89.
30. 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.
31. Dalla Costa G, Martinelli V, Sangalli F, Moiola L, Colombo B, Radaelli M, et al. Prognostic value of serum neurofilaments in patients with clinically isolated syndromes. *Neurology*. 2019;92(7):e733-e41.
32. 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.
33. Fleischer V, Friedrich M, Rezk A, Buhler U, Witsch E, Uphaus T, et al. Treatment response to dimethyl fumarate is characterized by disproportionate CD8+ T cell reduction in MS. *Mult Scler*. 2018;24(5):632-41.
34. Montes Diaz G, Fraussen J, Van Wijmeersch B, Hupperts R, Somers V. Dimethyl fumarate induces a persistent change in the composition of the innate and adaptive immune system in multiple sclerosis patients. *Sci Rep*. 2018;8(1):8194.
35. Ghadiri M, Rezk A, Li R, Evans A, Luessi F, Zipp F, et al. Dimethyl fumarate-induced lymphopenia in MS due to differential T-cell subset apoptosis. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm*. 2017;4(3):e340.
36. Luckel C, Picard F, Raifer H, Campos Carrascosa L, Guralnik A, Zhang Y, et al. IL-17(+) CD8(+) T cell suppression by dimethyl fumarate associates with clinical response in multiple sclerosis. *Nat Commun*. 2019;10(1):5722.
37. Li R, Rezk A, Healy LM, Muirhead G, Prat A, Gommerman JL, et al. Cytokine-Defined B Cell Responses as Therapeutic Targets in Multiple Sclerosis. *Front Immunol*. 2015;6:626.
38. Smith MD, Martin KA, Calabresi PA, Bhargava P. Dimethyl fumarate alters B-cell memory and cytokine production in MS patients. *Annals of clinical and translational neurology*. 2017;4(5):351-5.
39. Doshi A, Chataway J. Multiple sclerosis, a treatable disease *Clinical medicine (London, England)*. 2017;17(6):530-6.
40. Petersen G, Wittmann R, Arndt V, Gopffarth D. [Epidemiology of multiple sclerosis in Germany: regional differences and drug prescription in the claims data of the statutory health insurance]. *Nervenarzt*. 2014;85(8):990-8.
41. Oh J, Vidal-Jordana A, Montalban X. Multiple sclerosis: clinical aspects. *Current opinion in neurology*. 2018;31(6):752-9.
42. Amato MP, Derfuss T, Hemmer B, Liblau R, Montalban X, Soelberg Sørensen P, et al. Environmental modifiable risk factors for multiple sclerosis: Report from the 2016ECTRIMS focused workshop. *Mult Scler*. 2018;24(5):590-603.
43. Sadovnick AD, Armstrong H, Rice GP, Bulman D, Hashimoto L, Paty DW, et al. A population-based study of multiple sclerosis in twins: update. *Ann Neurol*. 1993;33(3):281-5.
44. Hawkes CH, Macgregor AJ. Twin studies and the heritability of MS: a conclusion. *Mult Scler*. 2009;15(6):661-7.
45. Kantarci OH. Genetics and natural history of multiple sclerosis. *Semin Neurol*. 2008;28(1):7-16.
46. Tao C, Simpson S, Jr., Taylor BV, van der Mei I. Association between human herpesvirus & human endogenous retrovirus and MS onset & progression. *Journal of the neurological sciences*. 2017;372:239-49.
47. Ascherio A, Munger KL. Environmental risk factors for multiple sclerosis. Part II: Noninfectious factors. *Ann Neurol*. 2007;61(6):504-13.
48. Zipp F, Aktas O. The brain as a target of inflammation: common pathways link inflammatory and neurodegenerative diseases. *Trends in neurosciences*. 2006;29(9):518-27.
49. O'Connor P. Key issues in the diagnosis and treatment of multiple sclerosis. An overview. *Neurology*. 2002;59(6 Suppl 3):S1-33.
50. Zang YC, Kozovska MM, Hong J, Li S, Mann S, Killian JM, et al. Impaired apoptotic deletion of myelin basic protein-reactive T cells in patients with multiple sclerosis. *Eur J Immunol*. 1999;29(5):1692-700.

51. Zipp F, Otzelberger K, Dichgans J, Martin R, Weller M. Serum CD95 of relapsing remitting multiple sclerosis patients protects from CD95-mediated apoptosis. *J Neuroimmunol.* 1998;86(2):151-4.
52. Lenardo M, Chan KM, Hornung F, McFarland H, Siegel R, Wang J, et al. Mature T lymphocyte apoptosis--immune regulation in a dynamic and unpredictable antigenic environment. *Annual review of immunology.* 1999;17:221-53.
53. Lovett-Racke AE, Yang Y, Racke MK. Th1 versus Th17: are T cell cytokines relevant in multiple sclerosis? *Biochimica et biophysica acta.* 2011;1812(2):246-51.
54. Quirant-Sanchez B, Presas-Rodriguez S, Mansilla MJ, Teniente-Serra A, Hervas-Garcia JV, Brieva L, et al. Th1Th17CM Lymphocyte Subpopulation as a Predictive Biomarker of Disease Activity in Multiple Sclerosis Patients under Dimethyl Fumarate or Fingolimod Treatment. *Mediators Inflamm.* 2019;2019:8147803.
55. Tzartos JS, Friese MA, Craner MJ, Palace J, Newcombe J, Esiri MM, et al. Interleukin-17 production in central nervous system-infiltrating T cells and glial cells is associated with active disease in multiple sclerosis. *The American journal of pathology.* 2008;172(1):146-55.
56. Kidd P. Th1/Th2 balance: the hypothesis, its limitations, and implications for health and disease. *Altern Med Rev.* 2003;8(3):223-46.
57. Oreja-Guevara C, Ramos-Cejudo J, Aroeira LS, Chamorro B, Diez-Tejedor E. TH1/TH2 Cytokine profile in relapsing-remitting multiple sclerosis patients treated with Glatiramer acetate or Natalizumab. *BMC Neurol.* 2012;12:95.
58. Hedegaard CJ, Krakauer M, Bendtzen K, Lund H, Sellebjerg F, Nielsen CH. T helper cell type 1 (Th1), Th2 and Th17 responses to myelin basic protein and disease activity in multiple sclerosis. *Immunology.* 2008;125(2):161-9.
59. Wekerle H. Lessons from multiple sclerosis: models, concepts, observations. *Ann Rheum Dis.* 2008;67 Suppl 3:iii56-60.
60. Traugott U, Reinherz EL, Raine CS. Multiple sclerosis. Distribution of T cells, T cell subsets and Ia-positive macrophages in lesions of different ages. *J Neuroimmunol.* 1983;4(3):201-21.
61. Herz J, Zipp F, Siffrin V. Neurodegeneration in autoimmune CNS inflammation. *Exp Neurol.* 2010;225(1):9-17.
62. Liblau RS, Gonzalez-Dunia D, Wiendl H, Zipp F. Neurons as targets for T cells in the nervous system. *Trends in neurosciences.* 2013;36(6):315-24.
63. Krumbholz M, Derfuss T, Hohlfeld R, Meinl E. B cells and antibodies in multiple sclerosis pathogenesis and therapy. *Nat Rev Neurol.* 2012;8(11):613-23.
64. Duddy M, Niino M, Adata F, Hebert S, Freedman M, Atkins H, et al. Distinct effector cytokine profiles of memory and naive human B cell subsets and implication in multiple sclerosis. *J Immunol.* 2007;178(10):6092-9.
65. Bar-Or A, Fawaz L, Fan B, Darlington PJ, Rieger A, Ghorayeb C, et al. Abnormal B-cell cytokine responses a trigger of T-cell-mediated disease in MS? *Ann Neurol.* 2010;67(4):452-61.
66. Barr TA, Shen P, Brown S, Lampropoulou V, Roch T, Lawrie S, et al. B cell depletion therapy ameliorates autoimmune disease through ablation of IL-6-producing B cells. *The Journal of experimental medicine.* 2012;209(5):1001-10.
67. Duddy ME, Alter A, Bar-Or A. Distinct profiles of human B cell effector cytokines: a role in immune regulation? *J Immunol.* 2004;172(6):3422-7.
68. Li R, Rezk A, Miyazaki Y, Hilgenberg E, Touil H, Shen P, et al. Proinflammatory GM-CSF-producing B cells in multiple sclerosis and B cell depletion therapy. *Sci Transl Med.* 2015;7(310):310ra166.
69. Molnarfi N, Schulze-Topphoff U, Weber MS, Patarroyo JC, Prod'homme T, Varrin-Doyer M, et al. MHC class II-dependent B cell APC function is required for induction of CNS autoimmunity independent of myelin-specific antibodies. *The Journal of experimental medicine.* 2013;210(13):2921-37.
70. Shen P, Roch T, Lampropoulou V, O'Connor RA, Stervbo U, Hilgenberg E, et al. IL-35-producing B cells are critical regulators of immunity during autoimmune and infectious diseases. *Nature.* 2014;507(7492):366-70.
71. Li R, Rezk A, Ghadiri M, Luessi F, Zipp F, Li H, et al. Dimethyl Fumarate Treatment Mediates an Anti-Inflammatory Shift in B Cell Subsets of Patients with Multiple Sclerosis. *J Immunol.* 2017;198(2):691-8.
72. Hauser SL, Waubant E, Arnold DL, Vollmer T, Antel J, Fox RJ, et al. B-cell depletion with rituximab in relapsing-remitting multiple sclerosis. *N Engl J Med.* 2008;358(7):676-88.
73. Schiess N, Calabresi PA. Multiple Sclerosis. *Semin Neurol.* 2016;36(4):350-6.
74. Gelfand JM. Multiple sclerosis: diagnosis, differential diagnosis, and clinical presentation. *Handb Clin Neurol.* 2014;122:269-90.
75. Noseworthy JH, Lucchinetti C, Rodriguez M, Weinshenker BG. Multiple sclerosis. *N Engl J Med.* 2000;343(13):938-52.

76. 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.
77. Siva A, Saip S, Altintas A, Jacob A, Keegan BM, Kantarci OH. Multiple sclerosis risk in radiologically uncovered asymptomatic possible inflammatory-demyelinating disease. *Mult Scler*. 2009;15(8):918-27.
78. Lassmann H, Brück W, Lucchinetti CF. The immunopathology of multiple sclerosis: an overview. *Brain pathology (Zurich, Switzerland)*. 2007;17(2):210-8.
79. McDonald WI, Compston A, Edan G, Goodkin D, Hartung HP, Lublin FD, et al. Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the diagnosis of multiple sclerosis. *Ann Neurol*. 2001;50(1):121-7.
80. Polman CH, Reingold SC, Banwell B, Clanet M, Cohen JA, Filippi M, et al. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the McDonald criteria. *Ann Neurol*. 2011;69(2):292-302.
81. Polman CH, Reingold SC, Edan G, Filippi M, Hartung HP, Kappos L, et al. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2005 revisions to the "McDonald Criteria". *Ann Neurol*. 2005;58(6):840-6.
82. 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.
83. Bradshaw M, Houtchens M. *Neurology Board Review: Multiple Sclerosis*. 2018.
84. Brettschneider J, Tumani H, Kiechle U, Mücke R, Richards G, Lehmsiek V, et al. IgG antibodies against measles, rubella, and varicella zoster virus predict conversion to multiple sclerosis in clinically isolated syndrome. *PLoS One*. 2009;4(11):e7638.
85. Alifirova VM, Kamenskikh EM, Koroleva ES. [Evaluation of serum neurofilament light chains levels for diagnosis, treatment monitoring and prognosis in multiple sclerosis]. *Zhurnal neurologii i psikiatrii imeni SS Korsakova*. 2019;119(10. Vyp. 2):7-13.
86. Sen S. Neurostatus and EDSS Calculation with Cases. *Noro Psikiyatrs Ars*. 2018;55(Suppl 1):S80-s3.
87. Aktas O, Ullrich O, Infante-Duarte C, Nitsch R, Zipp F. Neuronal damage in brain inflammation. *Archives of neurology*. 2007;64(2):185-9.
88. Sailer M, Fischl B, Salat D, Tempelmann C, Schönfeld MA, Busa E, et al. Focal thinning of the cerebral cortex in multiple sclerosis. *Brain*. 2003;126(Pt 8):1734-44.
89. Jarius S, Eichhorn P, Franciotta D, Peterleit HF, Akman-Demir G, Wick M, et al. The MRZ reaction as a highly specific marker of multiple sclerosis: re-evaluation and structured review of the literature. *J Neurol*. 2017;264(3):453-66.
90. Siffrin V, Vogt J, Radbruch H, Nitsch R, Zipp F. Multiple sclerosis - candidate mechanisms underlying CNS atrophy. *Trends in neurosciences*. 2010;33(4):202-10.
91. Khan O, Shen Y, Bao F, Caon C, Tselis A, Latif Z, et al. Long-term study of brain 1H-MRS study in multiple sclerosis: effect of glatiramer acetate therapy on axonal metabolic function and feasibility of long-Term H-MRS monitoring in multiple sclerosis. *Journal of neuroimaging : official journal of the American Society of Neuroimaging*. 2008;18(3):314-9.
92. De Stefano N, Narayanan S, Francis GS, Arnaoutelis R, Tartaglia MC, Antel JP, et al. Evidence of axonal damage in the early stages of multiple sclerosis and its relevance to disability. *Archives of neurology*. 2001;58(1):65-70.
93. Frohman EM, Shah A, Eggenberger E, Metz L, Zivadinov R, Stüve O. Corticosteroids for multiple sclerosis: I. Application for treating exacerbations. *Neurotherapeutics : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*. 2007;4(4):618-26.
94. Oji S, Nomura K. Immunoabsorption in neurological disorders. *Transfus Apher Sci*. 2017;56(5):671-6.
95. Le Page E, Veillard D, Laplaud DA, Hamonic S, Wardi R, Lebrun C, et al. Oral versus intravenous high-dose methylprednisolone for treatment of relapses in patients with multiple sclerosis (COPOUSEP): a randomised, controlled, double-blind, non-inferiority trial. *Lancet (London, England)*. 2015;386(9997):974-81.
96. Wiendl H, Gold R, Zipp F. Multiple sclerosis therapy consensus group (MSTCG): answers to the discussion questions. *Neurological research and practice*. 2021;3(1):44.
97. Neuhaus O, Farina C, Yassouridis A, Wiendl H, Then Bergh F, Dose T, et al. Multiple sclerosis: comparison of copolymer-1-reactive T cell lines from treated and untreated subjects reveals cytokine shift from T helper 1 to T helper 2 cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2000;97(13):7452-7.
98. Aharoni R, Teitelbaum D, Sela M, Arnon R. Copolymer 1 induces T cells of the T helper type 2 that crossreact with myelin basic protein and suppress experimental autoimmune encephalomyelitis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1997;94(20):10821-6.
99. Yong VW. Differential mechanisms of action of interferon-beta and glatiramer acetate in MS. *Neurology*. 2002;59(6):802-8.

100. Claussen MC, Korn T. Immune mechanisms of new therapeutic strategies in MS: teriflunomide. *Clin Immunol.* 2012;142(1):49-56.
101. Massacesi L, Tramacere I, Amoroso S, Battaglia MA, Benedetti MD, Filippini G, et al. Azathioprine versus beta interferons for relapsing-remitting multiple sclerosis: a multicentre randomized non-inferiority trial. *PLoS One.* 2014;9(11):e113371.
102. Ryerson LZ, Foley J, Chang I, Kister I, Cutter G, Metzger RR, et al. Risk of natalizumab-associated PML in patients with MS is reduced with extended interval dosing. *Neurology.* 2019;93(15):e1452-e62.
103. Florou D, Katsara M, Feehan J, Dardiotis E, Apostolopoulos V. Anti-CD20 Agents for Multiple Sclerosis: Spotlight on Ocrelizumab and Ofatumumab. *Brain sciences.* 2020;10(10).
104. Rosen H, Goetzl EJ. Sphingosine 1-phosphate and its receptors: an autocrine and paracrine network. *Nature reviews Immunology.* 2005;5(7):560-70.
105. Song ZY, Yamasaki R, Kawano Y, Sato S, Masaki K, Yoshimura S, et al. Peripheral blood T cell dynamics predict relapse in multiple sclerosis patients on fingolimod. *PLoS One.* 2014;10(4):e0124923.
106. Moreau T, Coles A, Wing M, Thorpe J, Miller D, Moseley I, et al. CAMPATH-1H in multiple sclerosis. *Mult Scler.* 1996;1(6):357-65.
107. Wong B, Cahill J, Rizvi S. Moving Towards a Cure for MS: Increased Immunosuppression and Striving for No Evidence of Disease Activity (NEDA). *Rhode Island medical journal* (2013). 2018;101(2):26-9.
108. di Iorio M, Di Stefano V, Farina D, Di Tommaso V, Travaglini D, Pietrolongo E, et al. Data of safety in a single-center alemtuzumab treated population. *Data in brief.* 2020;29:105341.
109. Giovannoni G, Comi G, Cook S, Rammohan K, Rieckmann P, Soelberg Sørensen P, et al. A placebo-controlled trial of oral cladribine for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med.* 2010;362(5):416-26.
110. Abdelhak A, Weber MS, Tumani H. Primary Progressive Multiple Sclerosis: Putting Together the Puzzle. *Front Neurol.* 2017;8:234.
111. Evison BJ, Sleebs BE, Watson KG, Phillips DR, Cutts SM. Mitoxantrone, More than Just Another Topoisomerase II Poison. *Medicinal research reviews.* 2016;36(2):248-99.
112. Wiendl H, Gold R, Berger T, Derfuss T, Linker R, Mäurer M, et al. [Multiple sclerosis treatment consensus group (MSTCG): position paper on disease-modifying treatment of multiple sclerosis 2021 (white paper)]. *Nervenarzt.* 2021;92(8):773-801.
113. Lu G, Beadnall HN, Barton J, Hardy TA, Wang C, Barnett MH. The evolution of "No Evidence of Disease Activity" in multiple sclerosis. *Multiple sclerosis and related disorders.* 2018;20:231-8.
114. Kappos L, De Stefano N, Freedman MS, Cree BA, Radue EW, Sprenger T, et al. Inclusion of brain volume loss in a revised measure of 'no evidence of disease activity' (NEDA-4) in relapsing-remitting multiple sclerosis. *Mult Scler.* 2016;22(10):1297-305.
115. Giovannoni G, Cook S, Rammohan K, Rieckmann P, Sørensen PS, Vermersch P, et al. Sustained disease-activity-free status in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis treated with cladribine tablets in the CLARITY study: a post-hoc and subgroup analysis. *Lancet Neurol.* 2011;10(4):329-37.
116. Trojano M, Tintore M, Montalban X, Hillert J, Kalincik T, Iaffaldano P, et al. Treatment decisions in multiple sclerosis - insights from real-world observational studies. *Nat Rev Neurol.* 2017;13(2):105-18.
117. Havrdova E, Galetta S, Hutchinson M, Stefoski D, Bates D, Polman CH, et al. Effect of natalizumab on clinical and radiological disease activity in multiple sclerosis: a retrospective analysis of the Natalizumab Safety and Efficacy in Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis (AFFIRM) study. *Lancet Neurol.* 2009;8(3):254-60.
118. Bevan CJ, Cree BA. Disease activity free status: a new end point for a new era in multiple sclerosis clinical research? *JAMA Neurol.* 2014;71(3):269-70.
119. Jain A, Rosso M, Santoro JD. Wilhelm Uhthoff and Uhthoff's phenomenon. *Mult Scler.* 2020;26(13):1790-6.
120. Frohman TC, Davis SL, Beh S, Greenberg BM, Remington G, Frohman EM. Uhthoff's phenomena in MS—clinical features and pathophysiology. *Nature Reviews Neurology.* 2013;9(9):535-40.
121. Lehmann JC, Listopad JJ, Rentzsch CU, Igney FH, von Bonin A, Hennekes HH, et al. Dimethylfumarate induces immunosuppression via glutathione depletion and subsequent induction of heme oxygenase 1. *J Invest Dermatol.* 2007;127(4):835-45.
122. Schweckendiek W. [Treatment of psoriasis vulgaris]. *Medizinische Monatsschrift.* 1959;13(2):103-4.
123. Meissner M, Valesky EM, Kippenberger S, Kaufmann R. Dimethyl fumarate - only an anti-psoriatic medication? *J Dtsch Dermatol Ges.* 2012;10(11):793-801.

124. Mrowietz U, Altmeyer P, Augustin M, Boehncke WH, Bonnekoh B, Frambach Y, et al. [New insights into fumaric acid esters (Fumaderm®):results of the 2nd Expert Workshops]. *J Dtsch Dermatol Ges.* 2012;10 Suppl 8:1-15.
125. Kappos L, Gold R, Miller DH, Macmanus DG, Havrdova E, Limmroth V, et al. Efficacy and safety of oral fumarate in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis: a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled phase IIb study. *Lancet (London, England).* 2008;372(9648):1463-72.
126. Schimrigk S, Brune N, Hellwig K, Lukas C, Bellenberg B, Rieks M, et al. Oral fumaric acid esters for the treatment of active multiple sclerosis: an open-label, baseline-controlled pilot study. *Eur J Neurol.* 2006;13(6):604-10.
127. Ghoreschi K, Brück J, Kellerer C, Deng C, Peng H, Rothfuss O, et al. Fumarates improve psoriasis and multiple sclerosis by inducing type II dendritic cells. *The Journal of experimental medicine.* 2011;208(11):2291-303.
128. 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.
129. Bompreszi R. Dimethyl fumarate in the treatment of relapsing-remitting multiple sclerosis: an overview. *Therapeutic advances in neurological disorders.* 2015;8(1):20-30.
130. Longbrake EE, Cross AH. Dimethyl fumarate associated lymphopenia in clinical practice. *Mult Scler.* 2015;21(6):796-7.
131. Longbrake EE, Naismith RT, Parks BJ, Wu GF, Cross AH. Dimethyl fumarate-associated lymphopenia: Risk factors and clinical significance. *Multiple sclerosis journal - experimental, translational and clinical.* 2015;1.
132. Roll A, Reich K, Boer A. Use of fumaric acid esters in psoriasis. *Indian journal of dermatology, venereology and leprology.* 2007;73(2):133-7.
133. Gillard GO, Collette B, Anderson J, Chao J, Scannevin RH, Huss DJ, et al. DMF, but not other fumarates, inhibits NF- κ B activity in vitro in an Nrf2-independent manner. *J Neuroimmunol.* 2015;283:74-85.
134. Treumer F, Zhu K, Gläser R, Mrowietz U. Dimethylfumarate is a potent inducer of apoptosis in human T cells. *J Invest Dermatol.* 2003;121(6):1383-8.
135. Gold R, Linker RA, Stangel M. Fumaric acid and its esters: an emerging treatment for multiple sclerosis with antioxidative mechanism of action. *Clin Immunol.* 2012;142(1):44-8.
136. Spencer CM, Crabtree-Hartman EC, Lehmann-Horn K, Cree BA, Zamvil SS. Reduction of CD8(+) T lymphocytes in multiple sclerosis patients treated with dimethyl fumarate. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm.* 2015;2(3):e76.
137. Vandermeeren M, Janssens S, Borgers M, Geysen J. Dimethylfumarate is an inhibitor of cytokine-induced E-selectin, VCAM-1, and ICAM-1 expression in human endothelial cells. *Biochemical and biophysical research communications.* 1997;234(1):19-23.
138. Loewe R, Holthoner W, Gröger M, Pillinger M, Gruber F, Mechtcheriakova D, et al. Dimethylfumarate inhibits TNF-induced nuclear entry of NF-kappa B/p65 in human endothelial cells. *J Immunol.* 2002;168(9):4781-7.
139. McGuire VA, Ruiz-Zorrilla Diez T, Emmerich CH, Strickson S, Ritorto MS, Sutavani RV, et al. Dimethyl fumarate blocks pro-inflammatory cytokine production via inhibition of TLR induced M1 and K63 ubiquitin chain formation. *Sci Rep.* 2016;6:31159.
140. Fleischer V, Gröger A, Koirala N, Droby A, Muthuraman M, Kolber P, et al. Increased structural white and grey matter network connectivity compensates for functional decline in early multiple sclerosis. *Mult Scler.* 2017;23(3):432-41.
141. Muthuraman M, Fleischer V, Kolber P, Luessi F, Zipp F, Groppa S. Structural Brain Network Characteristics Can Differentiate CIS from Early RRMS. *Frontiers in neuroscience.* 2016;10:14.
142. Dupuy SL, Tauhid S, Hurwitz S, Chu R, Yousuf F, Bakshi R. The Effect of Dimethyl Fumarate on Cerebral Gray Matter Atrophy in Multiple Sclerosis. *Neurology and therapy.* 2016;5(2):215-29.
143. Gamboa OL, Tagliazucchi E, von Wegner F, Jurcoane A, Wahl M, Laufs H, et al. Working memory performance of early MS patients correlates inversely with modularity increases in resting state functional connectivity networks. *NeuroImage.* 2014;94:385-95.
144. Shu N, Duan Y, Xia M, Schoonheim MM, Huang J, Ren Z, et al. Disrupted topological organization of structural and functional brain connectomes in clinically isolated syndrome and multiple sclerosis. *Sci Rep.* 2016;6:29383.
145. Gentil BJ, Tibshirani M, Durham HD. Neurofilament dynamics and involvement in neurological disorders. *Cell and tissue research.* 2015;360(3):609-20.
146. Yuan A, Rao MV, Veeranna, Nixon RA. Neurofilaments and Neurofilament Proteins in Health and Disease. *Cold Spring Harbor perspectives in biology.* 2017;9(4).
147. 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. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry.* 2016;87(2):126-9.

148. Sejbaek T, Nielsen HH, Penner N, Plavina T, Mendoza JP, Martin NA, et al. Dimethyl fumarate decreases neurofilament light chain in CSF and blood of treatment naïve relapsing MS patients. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*. 2019;90(12):1324-30.
149. Novakova L, Zetterberg H, Sundström 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.
150. Engel S, Steffen F, Uphaus T, Scholz-Kreisel P, Zipp F, Bittner S, et al. Association of intrathecal pleocytosis and IgG synthesis with axonal damage in early MS. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm*. 2020;7(3).
151. Disanto G, Barro C, Benkert P, Naegelin Y, Schädelin S, Giardiello A, et al. Serum Neurofilament light: A biomarker of neuronal damage in multiple sclerosis. *Ann Neurol*. 2017;81(6):857-70.
152. 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.
153. Jakimovski D, Zivadinov R, Ramanathan M, Hagemeyer J, Weinstock-Guttman B, Tomic D, et al. Serum neurofilament light chain level associations with clinical and cognitive performance in multiple sclerosis: A longitudinal retrospective 5-year study. *Mult Scler*. 2019:1352458519881428.
154. 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).
155. Bsteh G, Berek K, Hegen H, Teuchner B, Buchmann A, Voortman MM, et al. Serum neurofilament levels correlate with retinal nerve fiber layer thinning in multiple sclerosis. *Mult Scler*. 2019:1352458519882279.
156. Gunnarsson M, Malmeström C, Axelsson M, Sundström 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.
157. 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.
158. Rizzo F, Giacomini E, Mechelli R, Buscarinu MC, Salvetti M, Severa M, et al. Interferon- β therapy specifically reduces pathogenic memory B cells in multiple sclerosis patients by inducing a FAS-mediated apoptosis. *Immunology and cell biology*. 2016;94(9):886-94.
159. Cohen CJ, Crome SQ, MacDonald KG, Dai EL, Mager DL, Levings MK. Human Th1 and Th17 cells exhibit epigenetic stability at signature cytokine and transcription factor loci. *J Immunol*. 2011;187(11):5615-26.
160. van Langelaar J, van der Vuurst de Vries RM, Janssen M, Wierenga-Wolf AF, Spilt IM, Siepmann TA, et al. T helper 17.1 cells associate with multiple sclerosis disease activity: perspectives for early intervention. *Brain*. 2018;141(5):1334-49.
161. von Bismarck O, Dankowski T, Ambrosius B, Hessler N, Antony G, Ziegler A, et al. Treatment choices and neuropsychological symptoms of a large cohort of early MS. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm*. 2018;5(3):e446.
162. Fischl B, Salat DH, Busa E, Albert M, Dieterich M, Haselgrove C, et al. Whole brain segmentation: automated labeling of neuroanatomical structures in the human brain. *Neuron*. 2002;33(3):341-55.
163. Reuter M, Fischl B. Avoiding asymmetry-induced bias in longitudinal image processing. *NeuroImage*. 2011;57(1):19-21.
164. Reuter M, Rosas HD, Fischl B. Highly accurate inverse consistent registration: a robust approach. *NeuroImage*. 2010;53(4):1181-96.
165. Reuter M, Schmansky NJ, Rosas HD, Fischl B. Within-subject template estimation for unbiased longitudinal image analysis. *NeuroImage*. 2012;61(4):1402-18.
166. Adan A, Alizada G, Kiraz Y, Baran Y, Nalbant A. Flow cytometry: basic principles and applications. *Crit Rev Biotechnol*. 2017;37(2):163-76.
167. Perfetto SP, Chattopadhyay PK, Roederer M. Seventeen-colour flow cytometry: unravelling the immune system. *Nature reviews Immunology*. 2004;4(8):648-55.
168. Jia Y, Xu H, Li Y, Wei C, Guo R, Wang F, et al. A Modified Ficoll-Paque Gradient Method for Isolating Mononuclear Cells from the Peripheral and Umbilical Cord Blood of Humans for Biobanks and Clinical Laboratories. *Biopreservation and biobanking*. 2018;16(2):82-91.
169. Öberg CM, Groszek JJ, Roy S, Fissell WH, Rippe B. A distributed solute model: an extended two-pore model with application to the glomerular sieving of Ficoll. *American journal of physiology Renal physiology*. 2018;314(6):F1108-f16.

170. Gross CC, Schulte-Mecklenbeck A, Hanning U, Posevitz-Fejfar A, Korsukewitz C, Schwab N, et al. Distinct pattern of lesion distribution in multiple sclerosis is associated with different circulating T-helper and helper-like innate lymphoid cell subsets. *Mult Scler.* 2017;23(7):1025-30.
171. Miller DH, Fox RJ, Phillips JT, Hutchinson M, Havrdova E, Kita M, et al. Effects of delayed-release dimethyl fumarate on MRI measures in the phase 3 CONFIRM study. *Neurology.* 2015;84(11):1145-52.
172. 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.
173. Delcoigne B, Manouchehrinia A, Barro C, Benkert P, Michalak Z, Kappos L, et al. Blood neurofilament light levels segregate treatment effects in multiple sclerosis. *Neurology.* 2020;94(11):e1201-e12.
174. Kuhle J, Kropshofer H, Haering DA, Kundu U, Meinert R, Barro C, et al. Blood neurofilament light chain as a biomarker of MS disease activity and treatment response. *Neurology.* 2019;92(10):e1007-e15.
175. Caramalho Í, Nunes-Cabaço H, Foxall RB, Sousa AE. Regulatory T-Cell Development in the Human Thymus. 2015;6(395).
176. Shevach EM, Thornton AM. tTregs, pTregs, and iTregs: similarities and differences. *Immunological reviews.* 2014;259(1):88-102.

8. Danksagung

Mein besonderer Dank geht an [REDACTED] für die Betreuung und die Unterstützung bei dieser Dissertation. Zwischen seinen Verpflichtungen als Oberarzt und seiner Verantwortung der Wissenschaft gegenüber fand er stets die Zeit mir unterstützend zur Seite zu stehen.

Ich bedanke mich herzlich bei allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des KKNMS für die freundliche und kollegiale Zusammenarbeit und den regen Austausch an Informationen. Die stets konstruktiven und zielführenden Beiträge haben maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Ich danke [REDACTED] für seine Ratschläge und das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Zuletzt danke ich meinen Eltern [REDACTED]. Ihre uneingeschränkte Unterstützung bei allen meiner Vorsätze machten das Studium der Medizin und diese Dissertation erst möglich.

9. Curriculum Vitae

Persönliche Angaben

Name	Daniel Körsgen
Geburtstag	13.11.1994
Geburtsort	Köln
Staatsangehörigkeit	deutsch

Akademische Laufbahn

08/2022	Erhalt der Approbation als Arzt
04/2016 – 05/2022	Studium der Humanmedizin an der Johannes Gutenberg-Universität Mainz
05/2022	Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung, Note 2,0
04/2021	Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung, Note 2,0
03/2018	Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung, Note 2,0

Beruflicher Werdegang

07/2015 - 03/2016	Bundesfreiwilligendienst im St. Franziskus-Hospital in Köln
08/2014 - 07/2015	RaiP bei der Berufsfeuerwehr Köln Abschluss: Rettungsassistent
02/2014 - 07/2014	Ausbildung zum Rettungsassistenten an der Medakademie Köln
10/2013 - 02/2014	Ausbildung zum Rettungssanitäter an der Medakademie Köln

Schulbildung

2005 - 2013	Städtisches Hölderlin-Gymnasium Köln in Köln Mülheim Abschluss: Allgemeine Hochschulreife
2001 - 2005	Katholische Grundschule Dellbrück in Köln Dellbrück

Nebenerwerbstätigkeiten

07/2019 - 12/2020	Anstellung als wissenschaftliche Hilfskraft in der Klinik und Poliklinik für Neurologie der Universitätsmedizin Mainz
-------------------	---
