

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

**Genetische Determinanten longitudinaler Outcome-Parameter
optischer Kohärenztomographie bei Multipler Sklerose**

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

Vorgelegt von

Veronica Clara Schottler

aus Viersen

Mainz, 2025

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

Tag der Promotion: 02. April 2025

Widmung

Meiner Familie.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	I
Abbildungsverzeichnis.....	III
Tabellenverzeichnis.....	III
1. Einleitung / Ziel der Dissertation	1
2. Grundlagen der Multiplen Sklerose	3
2.1 Epidemiologie.....	3
2.2 Klinische Krankheitsaspekte und Phänotypen der MS.....	4
2.3 Ätiologie und Pathogenese.....	5
2.3.1 Theorien zur Pathophysiologie der MS nach aktueller Studienlage.....	7
2.4 Erst- und Verlaufsdiagnostik.....	9
2.5 Therapieprinzipien und Prognose.....	10
2.5.1 EDSS-Score.....	11
3. Allgemeine Grundlagen der Genetik.....	13
3.1 HapMap Datenbank	14
3.2 Genomweite Assoziationsstudien	15
4. Grundlagen der Optischen Kohärenztomographie	17
4.1 Funktionsweise und Messverfahren.....	17
4.2 Einsatzgebiet der OCT bei MS.....	20
4.3 Limitationen	22
5. Multiple Sklerose im Kontext dieser Arbeit	24
5.1 Einfluss der Genetik auf MS.....	24
5.2 MS-assoziierte Erkrankung: Neuritis nervi optici	25
6. Material und Methoden	27
6.1 Studiendesign und Gewinnung genetischer Daten.....	27
6.2 OCT-Messungen	28
6.2.1 OSCAR-IB-Kriterien	29
6.2.2 Datenauswahl und Selektion	30

6.3	Genotypisierung	30
6.3.1	Qualitätskontrolle.....	31
6.3.2	Genome-wide association study (GWAS) workflow	31
7.	Ergebnisse	35
7.1	Deskriptive Statistik des Studienkollektivs	35
7.1.1	Alters- und Geschlechtsverteilung.....	35
7.1.2	MS-Subtyp und EDSS	36
7.1.3	Zeitpunkte der OCT-Untersuchungen.....	36
7.1.4	Vorliegen einer RBN-Krankheitshistorie	38
7.2	OCT-Daten	39
7.3	PLINK-Analyse.....	45
7.3.1	Beschreibung der SNP-Haupttreffer	49
8.	Diskussion	51
8.1	Diskussion der SNP-Haupttreffer.....	51
8.2	GWAS	53
8.3	Patientenkollektiv.....	55
8.4	Diskussion der OCT-Daten	55
9.	Zusammenfassung.....	58
10.	Literaturverzeichnis.....	61
11.	Anhang	V
11.1	Ancestry check protocol	V
11.2	GWAS Protokoll	VI
11.3	Skript für OCT-GWAS bei imputiertem MS_array Datensatz	VIII
11.4	Auszüge aus den Teststatistiken.....	X
11.4.1	t-Test TRVb	X
11.4.2	t-Test TRVfu	X
	Danksagung.....	X
	Curriculum Vitae	XI

Abkürzungsverzeichnis

AION	Anteriore ischämische Optikusneuropathie
APC	Antigen-präsentierende Zelle
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
cGRS	Kumulativer genetischer Risikoscore (cumulated genetic risk score)
CHR	Chromosom
CIS	Klinisch-isoliertes Syndrom
DMT	Krankheits-modifizierende Therapie (disease-modifying therapy)
DNA	Desoxyribonucleinsäure
EBNA	Eppstein-Barr Nuklear Antigen
EBV	Eppstein-Barr-Virus
EDSS	Expanded Disability Status Scale
GCIPL	Ganglienzellen innere plexiforme Schicht
GCL	Ganglienzell-Schicht
CRION	Chronisch rezidivierende Immunooptikusneuropathie
GWAS	Genomweite Assoziationsstudie
IgG	Immunglobulin G (genauso IgA, IgM, IgE)
IPL	Innere plexiforme Schicht
MAF	Mindestallel-Frequenz
MHC-I/-II	Major Histokompatibilitätskomplex I/II
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
MRT	Magnetresonanztomographie (cMRT entsprechend kraniale MRT)
MS	Multiple Sklerose
n	Anzahl
NEDA	No evidence of disease activity, sinngemäß: kein Anhalt für Krankheitsaktivität
NfL	Neurofilament leichte Kette
NIH	National Institute of Health
OCT	Optische Kohärenztomographie

OKB	Oligoklonale Banden
OPL	Äußere plexiforme Schicht
PPMS	Primär progrediente Multiple Sklerose
QC	Qualitätskontrolle
RBN	Retrobulbärneuritis
RIS	Radiologisch-isoliertes Syndrom
RNFL	Retinale Nervenfasern-Schicht
RRMS	schubförmig-remittierende Multiple Sklerose
SNP	single nucleotid polymorphism, sinngemäß: Einzelner Nucleotid-Polymorphismus
SPMS	Sekundär-progrediente Multiple Sklerose
TRV	Totales Retinavolumen
UM Mainz	Universitätsmedizin Mainz
VEP	Visuell evozierte Potenziale
ZNS	Zentrales Nervensystem

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Funktionsweise und Messverfahren einer OCT (Bildquellen: nach (49, 55))	19
Abbildung 2: Zusammensetzung und Ausschlüsse aus dem Studienkollektiv nach Personen	27
Abbildung 3: Häufigkeitsverteilung der OCT-Messungen nach Zeitdifferenz in Clustern à je 6 Monate, . Legende der Cluster in Monaten an der Seite angegeben	36
Abbildung 4: Häufigkeitsverteilung aller 170 SNPs mit p-Werten $<10e^{-06}$ nach Chromosomen	46
Abbildung 5: Identifizierbare SNPs (55% aller SNPs mit p-Werten $<10e^{-06}$), Darstellung nach Genen .	47

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Epidemiologische Daten	35
Tabelle 2: Deskriptive Statistik des Patientenalters (y) bei OCT_baseline und OCT_follow-up.....	36
Tabelle 3: Klinische Parameter des Patientenkollektivs	36
Tabelle 4: Retrobulbärneuritiden.....	38
Tabelle 5: OCT-Mittelwerte absolut (alle Messwerte haben die Einheit mm^3)	39
Tabelle 6: SPSS-Gruppenstatistiken (Mittelwert, Standardabweichung, Standardfehler des	
Mittelwerts): oben: TRVb_all, unten: TRVfu_all.....	39
Tabelle 7: SNP-Verteilung nach RBN-Historie	48
Tabelle 8: Anzahl der SNPs nach OCT-Schicht (baseline vs. follow-up)	48
Tabelle 9: SNPs mit p-Werten $<10e^{-07}$	50

1. Einleitung / Ziel der Dissertation

Die Multiple Sklerose (MS) ist eine chronisch-inflammatorische, neurodegenerative Erkrankung des Zentralen Nervensystems (ZNS), die in Europa mit einer Prävalenz von 30-80 Personen/ 100 000 Einwohner auftritt (1). Klinisch zeigt sich bei den Betroffenen ein sehr heterogenes Bild durch die unterschiedlichen Lokalisationen und Ausprägungen der im Rahmen der Erkrankung auftretenden Läsionen. Daher leitet sich auch der lateinische Name der Erkrankung „Encephalomyelitis disseminata“ ab.

Die Frühphase der Erkrankung ist bereits durch die Folgen deutlicher axonaler Schädigungen gekennzeichnet, die durch fokal-entzündliche und nachfolgend regenerative Vorgänge auftreten. In der Spätphase kommt es zu fortschreitenden axonalen Schädigungen, Degeneration und Demyelinisierung durch diffuse Aktivierung neuronaler Mikroglia. Durch noch nicht genauer verstandene Pathomechanismen ist die Krankheit trotz fehlender florider Entzündung progredient. Visualisierbar ist dies durch die Magnetresonanztomographie (MRT), wo sich Zunahmen der Läsionsvolumina sowohl in Größe als auch in der Anzahl zeigen (2–4).

Die MRT stellt heutzutage den Goldstandard der bildgebenden Diagnostik bei MS-Patienten dar, die in Zusammenschau mit den klinischen Befunden unter Berücksichtigung der McDonald-Kriterien die Stellung einer Diagnose MS erlauben (2–4).

Sowohl die genaue Pathogenese der MS als auch die Ätiologie sind nach heutigem Stand noch Gegenstand und Ziel der Forschung. In großen Genom-weiten Assoziationsstudien (GWAS) konnten 233 Risikogene in Zusammenhang mit der Entstehung von MS identifiziert werden (5). Ein besonderes Augenmerk fällt dabei auf kleinste, interindividuell unterschiedliche Genabschnitte, die single nucleotide polymorphisms (SNPs) genannt werden. In anderen Studien wird von mehr als 300 mutmaßlich MS-suszeptiblen SNPs gesprochen. Auch die Retina, als ausgelagerter Teil des Dienzephalons, ist von der Demyelinisierung betroffen. Durch ihre exponierte Lage bietet sie die Möglichkeit, Unterschiede in der Dicke nicht-invasiv per optischer Kohärenztomographie (OCT) zu untersuchen und auch im Verlauf zu beobachten. Bezüglich der Dickeabnahme der Retina sind in Studien ebenfalls Risikogene identifiziert worden, allerdings meist im Kontext anderer primär ophthalmologischer Erkrankungsbilder oder Erkrankungen mit ophthalmologischen Folgeschäden (6). Die OCT

wird mittlerweile aber auch als intravaskuläres OCT in der Kardiologie oder endoskopisch in der Gastroenterologie zur Krebsfrüherkennung eingesetzt (6–9).

Ziel der Dissertation ist die Untersuchung des Zusammenhangs zwischen dem Auftreten von MS-Risikogenen in unserem Patientenkollektiv im Vergleich zur genetischen Ausstattung der Normalbevölkerung und der per OCT gemessenen Abnahme der Retina-Dicke bei unseren Patienten mit MS. Da die OCT-Messungen im Vergleich zu MRT-Aufnahmen kostengünstig und schnell durchführbar sind, bieten sie die Möglichkeit, sie mehr in den klinischen Alltag in der Untersuchung von MS-Patienten zu integrieren. Aus der Dicke bzw. Dickeabnahme der Retina in Zusammenschau mit einem kumulativen genetischen Risikoscore könnten prognostisch relevante Rückschlüsse über die erwartbare Schwere des Krankheitsverlaufs gezogen werden, die dann gegebenenfalls intensiverer Therapien bedürften. Assoziationen von Erkrankungsdauer, EDSS-Score (Extended Disability Status Scale), Geschlecht und Alter bei Erkrankungsmanifestation werden ebenfalls betrachtet.

2. Grundlagen der Multiplen Sklerose

Die MS ist eine chronisch-entzündliche Erkrankung des Zentralen Nervensystems, die vor allem Frauen betrifft. Der allgemeine Verlauf der MS wird in drei Phasen unterteilt:

1. Die präklinische Phase, in der eine Kombination aus genetischen und Umweltfaktoren als Erkrankungstrigger wirken;
2. Die klinische Phase, die meistens als schubförmig-remittierende MS (RRMS) mit zeitlich limitierten neurologischen Symptomen – sogenannten Schüben – gefolgt von Phasen der Symptomverbesserung verläuft;
3. Die sekundär progressive Phase (SPMS) der Erkrankung mit bleibender und schleichender Verschlechterung der neurologischen Symptomatik.

2.1 Epidemiologie

Die Multiple Sklerose ist seit langem eine weltweit zunehmende Erkrankung. Sie stellt die häufigste Ursache Behinderungen junger Erwachsener dar (10, 11). Mit einem durchschnittlichen Erkrankungsalter von 25-40 Jahren betrifft sie vor allem Menschen, die sich in ihrer produktivsten sowie auch in der reproduktiven Phase des Lebens befinden (10). Die Altersspanne des Erkrankungsbeginns reicht jedoch von der Kindheit bis ins höhere Erwachsenenalter (10). Frauen sind weltweit im Schnitt doppelt so häufig betroffen wie Männer. In den meisten entwickelten Ländern hat sich das Geschlechterverhältnis auf bis zu 3:1 zu Ungunsten der Frauen verschlechtert (11). Schätzungen zufolge wird gesamtglobal alle fünf Minuten die Diagnose MS gestellt (12). Aus diesem Grund hat die Erkrankung einen signifikanten sowohl individuellen als auch gesamtgesellschaftlichen Stellenwert.

In ihrer Studie aus dem Jahre 2020 haben Walton et al. epidemiologische Daten aus 115 Ländern gesammelt, die 87% der Weltbevölkerung einschließen (12, 10). Aus diesen Daten schätzen sie die weltweite Prävalenz von MS-Erkrankten im Jahre 2020 auf 2,8 Millionen und können damit einen Prävalenzanstieg um 30% im Vergleich zum Jahr 2013 verzeichnen. Die Inzidenzrate pro 100 000 Personen/ Jahr wird damit über alle Länder auf 2,1 gepoolt (12). In den Daten konnte für Europa eine mit 6,8 pro 100 000 Personen/ Jahr weit über dem weltweiten Schnitt liegende Inzidenzrate ermittelt werden (12). Generell zeichnet sich ein Trend ansteigender Prävalenzen mit zunehmender Entfernung vom Äquator ab. Auch in

Deutschland ist die Zahl ambulant versorgter MS-Patienten zwischen den Jahren 2015 und 2017 um 29% angestiegen, wie das Zentralinstitut der kassenärztlichen Versorgung veröffentlichte (13). Schätzungsweise leben aktuell ca. 240.000 Menschen mit MS in Deutschland (13, 1). Dass weltweit ein Prävalenzanstieg zu verzeichnen ist, wird vor allem auf die verbesserten Diagnosekriterien, die zu einer früheren Erstdiagnosestellung führen, aber auch auf die verbesserten Therapiemöglichkeiten zurückgeführt (14).

2.2 Klinische Krankheitsaspekte und Phänotypen der MS

Durch die generalisierte Entzündungsreaktion im zentralen Nervensystem weist die Erkrankung ein heterogenes Spektrum neurologischer Symptome auf. Neben Motorik und Sensorik sind häufig auch das visuelle und das autonome Nervensystem betroffen. Typisch sind eine Optikusneuritis, das Uthoff-Phänomen – eine Verschlechterung von MS-Symptomen mit Anstieg der Körpertemperatur durch Fieber oder meteorologische Einflüsse – oder auch ein positives Lhermitte-Zeichen: elektrisch einschießende Schmerzen im Bereich der Wirbelsäule oder Beine bei Flexion des Kopfes (14, 15).

Im Verlauf der Erkrankung treten bei vielen Patienten zudem meist Bein-betonte Spastiken, eine Blasenschwäche im Sinne einer neurogenen Detrusorhyperaktivität mit Harninkontinenz, chronische Fatigue und auch kognitive Defizite auf (14). Insgesamt ist die Multiple Sklerose eine Erkrankung, die sich innerhalb eines Spektrums zwischen akuten Schüben mit dominanter inflammatorischer Komponente bis hin zu chronisch-progredienten Formen mit kontinuierlicher Verschlechterung im Sinne einer permanenten Neurodegeneration bewegt.

Die häufigste Verlaufsform bei mehr als 85% der Erkrankten ist die RRMS, die durch wiederholte Schübe, >24h anhaltend, mit neurologischen Defiziten im Sinne eines akut-inflammatorischen Geschehens gefolgt von Symptombesserung bis hin zur vollen Rekonvaleszenz gekennzeichnet ist (16). Diese wird jedoch von der Mehrheit der Patienten meist nicht dauerhaft erreicht (14). Die Symptome eines Schubs manifestieren sich in der Regel subakut über Stunden bis Tage, bleiben unbehandelt bis zu mehreren Wochen bestehen und verbessern sich anschließend im Laufe der Zeit (11, 15). Das Auftreten von Schüben ist insgesamt eng mit dem Patienten-Outcome sowie neurologischen Defiziten vergesellschaftet. Erstmanifestation stellt bei den Patienten mit RRMS in der Regel ein klinisch-isoliertes Syndrom (KIS bzw. CIS) dar, das sich meist als Optikusneuritis, inkomplette Myelitis oder

Hirnstammsyndrom mit u.a. motorischen Störungen, Lähmungserscheinungen, Sprech- und/oder Schluckstörungen oder Ataxien präsentiert. Beim CIS sind noch keine räumliche und/oder zeitliche Dissemination nachweisbar, weswegen die Diagnose MS noch nicht gestellt werden kann. Generell ist seit der Revision der McDonald-Kriterien 2017 die Diagnosestellung eines CIS seltener geworden, da die MS-Diagnosestellung erleichtert worden ist (17). Vor der Revision ging man von einer Transformation hin zu einer definitiven MS bei 43% der Patienten innerhalb der ersten fünf Jahre aus, nach zehn Jahren wurde ein Anstieg der Rate auf bis zu 59% prognostiziert (14).

Innerhalb von 15 Jahren entwickeln 24-40% der RRMS-Patienten mit schleichendem Übergang eine SPMS, die sich durch progressiv schlechter werdende Symptome äußert. Der Übergang der schubförmigen in die progressive Phase wird vor allem auf ein vermindertes Kompensationsvermögen reparativer Mechanismen zurückgeführt, wodurch es zu immer weiter fortschreitenden neuronalen Schädigungen kommt. B- und T-Zellen scheinen ursächlich an beiden Stadien der Krankheitsaktivität beteiligt zu sein (18). Meist ist dieser Übergang in eine SPMS nur retrospektiv feststellbar. Auch während der Phase der SPMS können neben der kontinuierlichen Krankheitsprogression noch Schübe auftreten.

Bei 10-15% der Patienten hingegen wird eine primär-progrediente MS (PPMS) beobachtet, die sich durch von Beginn an kontinuierliche neurologische Verschlechterungen ohne signifikante Besserungen in der Zwischenzeit auszeichnet, zudem sich meist erst in einem Alter >40 Jahren manifestiert und einen höheren Anteil männlicher Patienten aufweist (14, 15). Beachtenswert ist hierbei eine voranschreitende Behinderung, die sich häufig auf einen bestimmten Anteil des zentralen Nervensystems konzentriert (11).

Eine weitere frühe Verlaufsform stellt das radiologisch-isolierte Syndrom (RIS) dar, bei dem die Patienten stark auf MS hindeutende MRT-Befunde aufweisen, jedoch die klinische Symptomatik fehlt und es sich per definitionem so nicht um eine Form der MS handelt (10, 2).

2.3 Ätiologie und Pathogenese

Die genauen Entstehungsursachen der MS sind bis heute nicht vollständig geklärt. Es ist davon auszugehen, dass neben genetischen Faktoren diverse Umwelt- und Sozialfaktoren, wie der Einfluss von Zigarettenrauch, Vitamin D, Migration oder Infektion mit dem Epstein-Barr-Virus

(EBV) eine Rolle in der Ätiologie und Pathogenese der MS spielen. Die Folge ist eine Dysregulation des Immunsystems, die letztendlich die Erkrankung zu verursachen scheint.

Der genetische Einfluss der MS wird in dem Moment deutlich, wenn man sich den familiären Hintergrund MS-Erkrankter ansieht: 12,5% der Patienten haben eine positive Familienanamnese für MS und auch die Konkordanzrate weiblicher monozygoter Zwillinge liegt bei bis zu 30% (11). In GWAS konnte des Weiteren eine Assoziation zum regionalen Vorhandensein der HLA-DRB1*15-Variante in der Klasse II der Histokompatibilitätskomplexe (MHC-II) nachgewiesen werden, wobei die genauen Pathomechanismen noch aktueller Gegenstand der Forschung sind (11, 15). Gleichzeitig gibt es kaum Hinweise darauf, dass die MHC die MS-Ausprägung im Sinne des „Krankheitsphänotyps“ (individuelle neurologische Symptomatik) beeinflussen würden (19, 20), im Gegensatz zum teilweise als multigenetisch-bedingt beschriebenen Risiko für MS-Schübe (16). In anderen Forschungskreisen ist auch letzteres nicht uneingeschränkt anerkannt. Die Studienergebnisse der GWAS-Analysen verstärken jedoch die Vermutung zum Einfluss der Antigen-Präsentation auf die Entstehung von MS. Damit ist jedoch nicht die Rolle der CD8+ T-Zellen erklärt, die mit MHC-I-Molekülen interagieren und auch wesentlich zur Entzündungsreaktion im Rahmen der MS beitragen. In Subsequenz-GWAS-Analysen konnten zudem die Alpha-Gene der Rezeptoren der Interleukine 2 und 7 (IL2RA, IL7R) als Risikofaktoren identifiziert werden (15). MHC-Klasse I Allele, allen voran HLA-A-Allele, scheinen einen protektiven Einfluss einer europäischen GWAS-Analyse zufolge zu haben (19).

EBV-Infektionen sind mit dem Auftreten einer MS assoziiert, wie in der KKNMS-Studie nachgewiesen werden konnte (21, 22). Nahezu alle MS-Patienten hatten eine EBV-Infektion, sodass bei einer Seronegativität gegen Epstein-Barr Nuklear Antigen 1 die Diagnose MS in Frage zu stellen sei¹ (22). Eine symptomatische EBV-Erkrankung verdoppelt nahezu das MS-Risiko. Neben molekularem mimikry wird eine EBV-induzierte B-Zell-Immortalisation oder Einfluss auf andere immunregulatorische Elemente durch EBV für den Effekt verantwortlich gemacht (22–24, 14).

Auch der Mangel von UVB-Strahlung und Vitamin D wirken sich negativ auf die Entstehung der MS aus. Im Bereich des Immunsystems unterliegt die Unterdrückung von B- und

¹ Dr. Lisa Gerdes, Neurologin und MS-Forscherin an der Ludwig-Maximilians-Universität München in einem Interview mit Amboss Mamed

T-Zell-Proliferation sowie die Modulation der T-Zell-Antwort Vitamin D-abhängigen genomischen Effekten (23). Vitamin-D-Mangel spielt aus den genannten Gründen eine allgemeine Rolle in der Entstehung von Autoimmunkrankheiten wie auch z.B. der rheumatoiden Arthritis, Diabetes mellitus Typ I oder Systemischem Lupus erythematodes. Korrespondierend zum Einfluss des Vitamin-D-Mangels passt der Gradient der geographischen Breite: die Prävalenz der MS steigt mit größerer Entfernung zum Äquator an (23).

Diese Umweltfaktoren scheinen die MS-Suszeptibilität vor allem innerhalb der ersten beiden Lebensdekaden zu beeinflussen, wie Migrationsstudien aufzeigen konnten (23). Aktuelle Studienergebnisse aus Dänemark und Schweden weisen darauf hin, dass insbesondere Migration im Kindes- und Jugendalter und von Ländern mit niedrigerer zu höherer Prävalenz das MS-Risiko steigert, was den Einfluss von Umweltfaktoren unterstreicht (19, 25, 26).

Zigarettenrauch wirkt sich negativ sowohl auf die Entstehung als auch den Verlauf der MS aus: Raucher haben ein bis zu 50% höheres Risiko, an MS zu erkranken (11). Auch hier wird als Hypothese eine Beeinflussung des Immunsystems im Sinne einer durch Zigarettenrauch in den Lungen ausgelösten posttranslationalen Modifikation durch Antigen-präsentierende Zellen angesehen (11).

Ein weiterer, unabhängiger Risikofaktor stellt die Adipositas dar (26). Protektiv für Frauen ist eine aktive bzw. kürzlich durch eine Geburt abgeschlossene Schwangerschaft, die einen relativen Schutz vor MS für die nächsten 5 Jahre bietet (23). Bei einer bereits manifesten MS ist das Schubrisiko im ersten Post-Partum-Trimester jedoch signifikant erhöht, wohingegen das Schubrisiko gegen Ende der Schwangerschaft geringer ist (16).

2.3.1 Theorien zur Pathophysiologie der MS nach aktueller Studienlage

Die genauen pathophysiologischen Mechanismen sind zwar bislang nicht geklärt, jedoch lassen sich in den frühen Phasen der MS starke inflammatorische Reaktionen des zentralen Nervensystems nachweisen.

Aktuell in der Literatur favorisierte Hypothese stellt die Folgende dar: Die Autoinflammation beginne mit einer Migration peripherer CD4+ T-Lymphozyten durch die Blut-Hirn-Schranke einhergehend mit der Sezernierung von Interferon- γ sowie Interleukin-7 (23). Diese T-Lymphozyten richteten sich autoreaktiv gegen die Myelinscheiden und andere Antigene des

ZNS (14). Vor Ort im ZNS scheine es zu einer Reaktivierung dieser T-Zellen durch lokale MHC-II-positive Antigen-präsentierende Zellen zu kommen, wodurch dann eine Inflammationskaskade mit klonaler Expansion inflammatorischer CD20+ B-Lymphozyten, CD8+ und CD4+ T-Zellen induziert sowie die Ausschüttung zahlreicher Zytokine und Chemokine in Gang gesetzt würde (14, 15, 18, 23). Zusätzlich finde parallel eine Aktivierung von Mikroglia statt. Diese griffen Myelinscheiden sowie Oligodendrozyten an und trage somit zur Demyelinisierung bei (14). Die axonalen Schäden träten sowohl während der akuten Entzündungsreaktion mit hohen Konzentrationen proinflammatorischer Zytokine wie TNF- α als auch durch die permanente Mikroglia-Aktivierung auf (14, 16).

Alternativen Hypothesen zufolge hingegen werde die MS durch eine primäre Apoptose von Oligodendrozyten ausgelöst, die wahrscheinlich ursächlich durch Mitochondrien-Dysfunktion initiiert werde. Direkte Folge davon seien axonale Schäden und eine Aktivierung von Mikroglia. Erst anschließend komme es zu einer autoimmunen Reaktion mit Einwanderung von Immunzellen durch die Blut-Hirn-Schranke, die ihrerseits den Circulus vitiosus durch die ausgelöste Immunreaktion gegen Oligodendrozyten verstärkten (18). Demzufolge sei also die Neurodegeneration nicht nur Folge der Entzündung, sondern maßgeblich als Ursache beteiligt.

Demyelinisierung, Schädigung von Oligodendrozyten und Axonen sind Folgen dieser Entzündungsprozesse und führen zu neurologischer Dysfunktion. Eine Remyelinisierung ist parallel in allen Stadien der MS zu beobachten, vor allem jedoch in den Phasen akuter Inflammation (11). Diese Remyelinisierung ist teilweise für die Remission im Anschluss an einen aktiven Schub verantwortlich (23).

Die Krankheitsaktivität kann signifikant durch B-Zell-Depletion via anti-CD20-Antikörper wie Rituximab gemindert werden. Gleichzeitig ist in der MS-Diagnostik der Nachweis oligoklonaler Banden (OKB) im Liquor cerebrospinalis, die bei >95% der Patienten nachweisbar sind, zwar hochsensitiv jedoch nicht spezifisch. Die OKB stellen das Korrelat der sezernierten Immunglobuline G (IgG) dar, die von Plasmazellen sezerniert werden, welche sich wiederum aus B-Zellen entwickelten. CD20-depletierende Therapien führen bei langfristiger Anwendung zu einer Hypogammaglobulinämie. Plasmazellen bleiben durch CD20-depletierende Therapien primär unberührt; ein Plasmazellabfall wäre erst nach einigen Jahren Therapiedauer erwartbar (23).

2.4 Erst- und Verlaufsdiagnostik

Die Diagnosestellung der Multiplen Sklerose (RRMS) erfolgt anhand der 2017 revidierten McDonald-Kriterien klinisch sowie durch ergänzende Liquor- und MRT-Diagnostik (17). Voraussetzung zur Diagnosestellung ist immer eine Dissemination in Ort und Zeit (2–4). Insgesamt stellt die Diagnose MS eine Ausschlussdiagnose dar, die McDonald-Kriterien erlauben jedoch eine ausreichend sichere Diagnosestellung anhand klinischer und paraklinischer Befunde (10, 17).

Rein klinisch ist eine MS-Diagnose nach zwei klinisch eindeutigen Schüben mit mindestens 24 Stunden andauernden Symptomen und mit einem zeitlichen Mindestabstand von 30 Tagen zwischen den einzelnen Schüben zu stellen. Alternativ kann radiologisch via MRT auch bereits bei einem Schub die Diagnose gestellt werden, indem ein simultaner Nachweis frischer, aktiv-entzündlicher Läsionen mit Gadolinium-Kontrastmittel-Enhancement parallel zu abgelaufenen, kein Kontrastmittel aufnehmenden Läsionen, geführt werden kann. Letztere Läsionen stellen das radiologische Korrelat vergangener Schübe dar (2, 27).

Die MRT-Diagnostik ist hochsensitiv und wird heutzutage bevorzugt zum Nachweis der Dissoziation in Ort und Zeit parallel zur klinischen Untersuchung angewendet, da sie einen Beweis eines multifokalen und wiederholenden ZNS-Prozesses liefert. In den Leitlinien haben sie als MAGNIMS-consensus-Kriterien Eingang gefunden (4, 27). Die per MRT nachgewiesenen Läsionen müssen sich an mindestens zwei der MS-typischen Lokalisationen befinden, nämlich periventrikulär, (juxta-) kortikal, infratentoriell oder spinal (2, 14, 28). Alternativ zu einer neuen aktiven Läsion ist der Nachweis einer akuten Blut-Hirn-Schrankenstörung oder chronisch-inflammatorischer Geschehen durch ein MS-typisches Liquorprofil. Dieses weist u.a. bis zu 50 Leukozyten/ μl Liquor, positive OKB oder ein erhöhtes IgG auf (3). Ein weiteres Dogma der Diagnostik ist, dass die Symptomatik durch keine andere Erkrankung mit einer höheren Wahrscheinlichkeit ausgelöst sein darf – „no better explanation than MS“ (2, 10, 28).

Zur Diagnosestellung einer PPMS erfordern die Kriterien eine Krankheitsprogression von mehr als einem Jahr unabhängig von klinischen Schüben und zwei von drei nachfolgenden Kriterien: mehr als eine T2-hyperintense Läsionen an MS-typischen Lokalisationen in mehr als einem ZNS-Bereich, mehr als zwei T2-hyperintense spinale Läsionen oder der isolierte Nachweis von OKB im Liquor (2, 17).

Noch keinen Eingang in die McDonald-Kriterien haben folgende Aspekte gefunden: weitere Auffälligkeiten im Bereich der Bildgebung in der OCT – u.a. mit Ausdünnung spezifischer Retinaschichten –, neurophysiologische Untersuchungen wie P100-Latenzverlängerungen in den visuell-evozierten Potentialen (VEP) oder relevante afferente Pupillendefizite (2). Spezifische serologische Biomarker, durch deren Nachweis eine MS-Diagnose einfacher gestellt werden könnte, existieren bislang ebenfalls nicht. Vielversprechend erscheint in der aktuellen Forschung ein erhöhtes Neurofilament light-chain (NfL), das als Biomarker axonaler Schäden erforscht wird (3, 28). Die weiteren Forschungsergebnisse bleiben so ein interessanter Ausblick für die Zukunft.

2.5 Therapieprinzipien und Prognose

Im Laufe der Zeit wurden viele spezifische Therapeutika entwickelt, die eine immer bessere Symptomkontrolle und Reduktion der Krankheitsprogression zulassen: die disease-modifying therapy (DMT) ist Bestandteil eines personalisierten Therapiekonzeptes. Grundlage der MS-Therapie stellt aktuell das NEDA-Konzept – „no evidence of disease activity“ – dar (10, 29, 30). Eine „stable disease“ liegt jedoch nur vor, wenn in der MRT weder aktive Läsionen noch eine Zunahme von Läsionen oder Läsionsvolumina nachweisbar sind, keine klinischen Schübe vorliegen und keine durch den EDSS-Score quantifizierte Verschlechterungen auftreten (18). Die Patienten sollten eng an ein MS-Zentrum angebunden werden, um eventuell zeitnah DMT-Schemata wechseln zu können. Patienten profitieren hier von multidisziplinären, hochspezialisierten Zentren und speziell auf MS geschulten Neurologen (30, 31).

Essentiell in der DMT sind ein frühzeitiger Therapiebeginn sowie die Auswahl eines personalisierten Therapieschemas (29). Beide DMT-Bestandteile gehen ebenfalls eng mit prognostischen und prädiktiven Faktoren einher (31). Die Therapeutika-Wahl richtet sich vor allem nach der Krankheitsschwere zu Beginn. Dieser Begriff der Krankheitsschwere beinhaltet sowohl Krankheitsaktivität als auch Krankheitsprogression. Früher Therapiebeginn ist nachweislich mit einer geringeren Langzeitbehinderung assoziiert (14). Innerhalb der DMT werden Induktions- und Eskalations-Therapiekonzepte unterschieden. Vor allem bei jungen Patienten, die eine hohe initiale Krankheitsaktivität und negative prädiktive Faktoren aufweisen, sollte eine aggressive immunsuppressive Induktionstherapie angestrebt werden, um frühe neurologische Langzeitfolgen effektiv abzuwenden und auch das

Transformationsrisiko einer RRMS in eine SPMS zu senken (29, 32). Auch den mittlerweile nur noch selten als solche diagnostizierten CIS-Patienten sollte bereits eine DMT angeboten werden, um das Risiko einer Konversion in eine definitive MS zu senken (14).

Additiv ist in jedem Krankheitsstadium der MS eine Vitamin-D-Supplementation empfehlenswert, da bereits ein Serumlevel-Anstieg um 10 nmol/l das Schubrisiko um 9% senken konnte, wie bereits in einer Studie 2010 nachgewiesen wurde (16, 33).

Wichtig für das Therapiemonitoring und das Erreichen von NEDA sind dabei akkurate follow-up-Methoden, die nach Wahl so minimal-invasiv wie möglich, dabei aber sensitiv, spezifisch, reliabel reproduzierbar, kostengünstig, wenig zeitaufwändig und ubiquitär verfügbar sein sollten (18, 30). Auch aus diesem Grund wird im Bereich von Biomarkern weiter geforscht. Eine vielversprechende Alternative Messmethode zur MRT stellt die OCT dar, auf deren Nutzen vor allem auch unter Berücksichtigung genetischer Hintergründe und Einflussfaktoren im Besonderen eingegangen werden wird.

2.5.1 EDSS-Score

Das Behandlungsziel unterscheidet sich je nach Grad der Behinderung des Patienten gemessen am EDSS-Score. Der EDSS ist ein klinisch erhobener Score, der unterschiedliche funktionelle Systeme bei Multipler Sklerose widerspiegelt, in 0.5-Punkte-Schritten angegeben wird und mit dessen Hilfe die Effektivität klinischer Therapien und die Krankheitsprogression überwacht werden können (34). Die funktionellen Systeme umfassen hierbei höhere zerebrale Funktionen, Pyramidenbahn, Kleinhirn, Hirnstamm, Sensorik, Sehfunktion sowie Blasen- und Mastdarmfunktion. Der EDSS dient somit als Skala, die den Grad der Behinderung durch MS zum Erhebungszeitpunkt angibt. Die Punktwerte reichen von 0 = normaler neurologischer Befund in allen funktionellen Systemen bis hin zu 10 = Tod durch MS (34, 35).

Primäres Ziel bei weniger betroffenen Patienten mit einem EDSS = 0-3 sind die Aufrechterhaltung normaler körperlicher Aktivität sowie soziale und berufliche Teilhabe. Das Augenmerk verschiebt sich bei bereits stärker behinderten Patienten mit einem EDSS = >3-6 vor allem auf die Aufrechterhaltung der sozialen Aktionsfähigkeit sowie Arbeitsfähigkeit mit Anschluss an den Arbeitsmarkt (31). Der EDSS-Score von >3 stellt in der Literatur einen signifikanten Wendepunkt hin zu irreversiblen neurologischen Schäden dar, weswegen sich ab diesem Wert die Therapieziele ändern (18). Ab einem EDSS >6 sollte das primäre Ziel die Wahrung der Patientenautonomie, Lebensqualität und das Management krankheitsbedingter

Komplikationen sein (31). Neueren Studien zufolge erreichen jedoch nach 16 Jahren Krankheitsdauer nur noch <10% der Patienten einen entsprechenden Grad der Behinderung (10, 36).

Beachtenswert ist die Veränderung der klinischen Folgen der Schübe über den Verlauf der Krankheit hinweg: visuelle und sensorische Ausfälle kennzeichnen die Schübe zu Krankheitsbeginn, wohingegen zerebelläre Ausfälle, pyramidale Störungen, insbesondere der unteren Extremitäten, sowie Sphinkterfunktionsstörungen in den späteren Stadien vermehrt auftreten (16). Letztere neigen in der Mehrheit zu inkompletten Remissionen, woraus sich auch die Zunahme an bleibenden Behinderungen mit Einschränkungen im Krankheitsverlauf ergibt. Mehrheitlich sind bei den Patienten daher Gang- und Stand- sowie Feinmotorik eingeschränkt, was einen großen Einfluss auf den Alltag, die Autonomie aber auch die Selbstwahrnehmung der Betroffenen ausübt. Pro Schub konnte eine Funktionsverschlechterung von mindestens 0.5 Punkten im EDSS bei 42-49% der Schübe festgestellt werden, bei 28-33% der Schübe verschlechterte sich der EDSS sogar um 1.0 oder mehr Punkte (16). In Studien konnte zudem gezeigt werden, dass Regionen mit vorangegangener Demyelinisierung im Rahmen eines Schubes auch in Zukunft häufiger Zentren der Demyelinisierung und damit neuer Schübe sein können. Es wird in diesem Zusammenhang von einer vermutlich polygenetischen – vor allem die MS-Suszeptibilitätsgene betreffenden – Ursache hierfür gesprochen (16).

Die Prognose der MS wird kontinuierlich durch verbesserte Diagnostik und Therapien besser. Auch die alterskorrigierte MS-bedingte Mortalität sinkt stetig. Als prognostisch ungünstig gelten ein männliches Geschlecht, ein später Krankheitsbeginn, inkomplette remittierende Schübe sowie eine hohe Schubfrequenz zu Beginn (10).

3. Allgemeine Grundlagen der Genetik

Die Genetik eines Menschen stellt die allumfassende Grundlage dar. Die individuellen genetischen Informationen eines Organismus werden in Form von Nukleinsäuren und deren einzigartiger Reihenfolge gespeichert. Die Grundeinheit der Genetik stellt die auf Chromosomen aufgeteilte DNA – Desoxyribonucleinsäure (engl.: acid) – dar, die in jedem Zellkern des Organismus zu finden ist. Der Mensch besitzt 22 Autosomen-Paare und ein Gonosomen-Paar, die im Rahmen der Befruchtung je zur Hälfte von Vater und Mutter vererbt werden (37).

Auf molekularer Ebene stellt das Gen als informationstragender Abschnitt die Grundeinheit der Erbinformationen dar. Die DNA selbst besteht aus einem Pentose-Phosphat-Rückgrat, an das je Zucker eine der vier Purin- oder Pyrimidin-Nukleinsäurebasen gebunden ist. Dabei ist die Reihenfolge der Basen entscheidend für die Codierung der genetischen Information. Im Rahmen der Proteinbiosynthese wird die Basenreihenfolge der DNA abgelesen (Transkription) und in eine spezifische Aminosäuresequenz übersetzt (Translation), die die Grundlage für das fertige Protein bildet. Dieses wird im Anschluss noch auf vielfältige Weise posttranslational modifiziert, z.B. via Methylierung, bevor es seine Funktionalität voll erhält. Die proteincodierenden Anteile der DNA werden als Exons, die dazwischenliegenden, nicht-codierenden Anteile als Introns bezeichnet. Letztere haben vor allem regulatorische Funktionen und stellen einen Teil der Epigenetik dar, die die interindividuellen Unterschiede bedingen. Der Genlocus beschreibt die physikalische Lage eines Gens auf einem Chromosom. Allele stellen mögliche DNA-Sequenzen dar, die an einem spezifischen Genlocus auftreten. Als Polymorphismen werden hierunter seltene Allele innerhalb einer Population bezeichnet. SNPs stellen innerhalb einer Population auftretende Sequenzvarianten eines Allels dar, die sich nur in einem einzigen Basenpaar unterscheiden (37, 38). SNPs werden in der Literatur als Ursachen interindividueller Unterschiede in Bezug auf physische und psychische Merkmale, genomische Evolution und auch interindividuelle Unterschiede in der Entstehung von Krankheiten oder der Wirkung von Medikamenten diskutiert (39, 40). Häufig finden sie sich im Bereich der regulatorischen bzw. nicht-codierenden DNA-Anteile.

Polymorphismen liegen per definitionem mit einer Häufigkeit >1% in Abgrenzung zu Mutationen (<1%) in einer höheren Frequenz in der Bevölkerung vor. Eine auf diesen Umstand beruhende Hypothese besagt, dass seltene Mutationen mit seltenen Erkrankungen assoziiert

seien, wohingegen SNP-Variationen zur Entstehung häufiger Krankheiten beitragen (32). Weitere Formen der Basenvariation stellen neben SNPs auch Insertion und Deletion, also Hinzugewinn bzw. Verlust einer oder mehrerer Basen, dar. Beim Basenaustausch unterscheidet man zwischen ca. 25% synonymen und nicht-synonymen Polymorphismen bzw. Mutationen, da durch die Redundanz des genetischen Codes nicht jeder Austausch einer Base eine Veränderung der Aminosäure in der Translation zur Folge hat. Weiter ist für die Auswirkungen von SNPs oder Mutationen entscheidend, in welchem Bereich der DNA, ob Intron oder Exon, sie sich befinden und auch, ob das entstehende Protein in seiner Funktion dadurch qualitativ verändert oder beeinträchtigt bzw. seine Quantität verändert wird. Viele SNPs liegen jedoch nicht im Bereich Protein-codierender Exons, sondern häufiger in Promotorabschnitten und Introns, Bereichen der Genexpression und Modulation. Dies erschwert die Interpretation der Auswirkung bei Veränderungen des entsprechenden SNP, da Genexpression und Gen-Gen-Interaktion in ihrer Komplexität und Vielfalt bis heute nicht vollständig verstanden sind und häufig viele Effekte hierbei zusammenspielen.

3.1 HapMap Datenbank

In Bezug auf interindividuelle Unterschiede der DNA bei Menschen ist es immer wieder erstaunlich, dass sich die Erbinformationen nur zu 0,1% von Individuum zu Individuum unterscheiden. Diese Unterschiede haben jedoch einen großen Einfluss auf u.a. interindividuelle Krankheitsrisiken sowie Medikamentenwirkungen. Seit der Erforschung des genetischen Codes interessieren vor allem auch die häufigen genetischen Variationen, die mit einer Mindesthäufigkeit von >5% als Allele in der Bevölkerung vorkommen. Diese genotypischen Daten wurden durch das Internationale HapMap Consortium seit 2002 gesammelt (41), um eine Datenbank häufiger Sequenzvariationen zum Vergleich anzubieten und damit die Grundlage Genom-weiter Assoziationsstudien zu bilden (40). Bei HapMap werden Haplotypen auf abweichende SNPs hin verglichen. Genetische Sequenzen verschiedener Individuen konnten gesammelt und mithilfe der SNPs die chromosomalen Regionen identifiziert werden (40). Bereits im Jahre 2010 wurden auch die DNA-Varianten mit einer geringeren Allelfrequenz, nämlich <5% MAF (minor allele frequency) ebenfalls als Risikofaktor häufiger Krankheiten erkannt und auch diese SNPs in die HapMap-Datenbank eingefügt, um ganzheitlichere Analysen zu ermöglichen (41).

3.2 Genomweite Assoziationsstudien

GWAS haben zum Ziel, genetische Varianten, die an der Entstehung von Krankheiten beteiligt sind, zu identifizieren. Dies geschieht in dem Verständnis, dass in der Ursachenforschung von Krankheiten die Genotypen eine wichtige Rolle spielen. Ein besonderer Fokus liegt hierbei auf der Analyse von Polymorphismen und SNPs, die in der Bevölkerung mit einer Frequenz $>1\%$, vorkommen. Hierbei scheinen jedoch vor allem Allele mit einer niedrigen MAF $<5\%$ einen essentiellen Beitrag zum hereditären Risiko von Gesellschaftskrankheiten zu haben (42). Weiter verbreitete DNA-Varianten mit einer MAF $>5\%$ wurden bereits ausführlicher untersucht, wobei keine mono- oder oligogenetischen Ursachen für jene „common diseases“ gefunden werden konnten (42). SNPs kommen mit einer geschätzten Frequenz von 500-1.000 base pairs (bp) über das Genom hinweg verteilt vor. Durch ihren vermuteten Einfluss auf Promotoraktivitäten, mRNA-Stabilität sowie subzelluläre mRNA-Positionsbeeinflussung stellen sie einen vielversprechenden Ausgangspunkt medizinischer Forschung vor allem hinsichtlich großer Volkskrankheiten dar (43), um verbesserte und individuellere Therapien entwickeln und eine höhere Therapiesicherheit erreichen zu können. Auch soll die interindividuell unterschiedliche Krankheits-Suszeptibilität daraus erklärt werden können, um unterschiedliche Risikoprofile mit sich daraus ableitenden Strategien entwickeln zu können (43). SNPs bieten sich des Weiteren an, da sie als genetisch stabil betrachtet werden und zu 50% in nicht-kodierenden DNA-Abschnitten vorkommen. Lediglich 25% der SNPs resultieren in Miss-sense-Mutationen (43).

Ein großer Vorteil von GWAS ist die hohe statistische Power, die durch die Analyse sehr großer Populationen entsteht, bei der verbreitete genetische Varianten aus großen Mengen genomweit gesammelter Daten als Vergleichsgrundlage gespeichert werden. Die Häufigkeiten des Individuums werden im Anschluss mit denen der Bevölkerungsgesamtheit verglichen. Auf diese Art und Weise können Rückschlüsse auf Risikoallele gezogen werden, die mit einem erhöhten Erkrankungsrisiko einhergehen (44). Diese werden als sogenannte Suszeptibilitätsgene bezeichnet. Häufig sind diese identifizierten genetischen Varianten jedoch in regulatorischen Genregionen lokalisiert, was eine genaue Zuordnung zur Pathophysiologie der einzelnen Erkrankung erschwert, da die funktionellen Regionen und regulatorischen Elemente viele unterschiedliche Gene sowie wiederum ihrerseits andere genexpressive Mechanismen beeinflussen können (44, 45). Von besonderem wissenschaftlichen Interesse ist in diesem Kontext unter anderem die Zuordnung von

neurobiologischen Korrelaten – sogenannten Endophänotypen – zu Genotypen, um eine verbesserte individuelle Krankheitsprognose abgeben zu können (44, 46).

Ein weiterer Vorteil von GWAS stellt die Analyse gesamt-genomischer Marker dar, sodass kein Datenverlust durch präanalytisch zu treffende Auswahl bestimmter Marker oder Allele geschieht (32). Es kann somit direkt nach neuen Risikoallelen gesucht werden. Zur Bestimmung von Umwelteinflüssen zusätzlich zur individuellen genetischen Ausstattung konnten GWAS bereits in der Vergangenheit erfolgreich zur Risikovorhersage genutzt werden (47); an dieser Stelle besteht also Forschungsbedarf in Bezug auf viele Gesellschaftskrankheiten. Je höher die Anzahl affektierter Genloci, je größer die Stichprobe, je umfangreicher das zur GWAS genutzte Panel und je einheitlicher die Krankheitsausprägung, desto aussagekräftiger sind die Ergebnisse von GWAS (47). Hieraus ergeben sich Limitationen in Bezug auf den Einsatz von GWAS bei seltenen und heterogenen Krankheiten wie MS. Dennoch ist dieses neue Forschungsmodul ein vielversprechender Ansatz, mehr über Ätiologie und Pathophysiologie verstehen zu lernen. Des Weiteren wurden gerade bei MS schon über 300 Risikogene mit Hilfe von GWAS bestimmt (5). Durch die Pleiotropie des Genoms sind die gleichen genetischen Variationen oftmals mit unterschiedlichen Krankheiten bei verschiedenen Personen assoziiert. Bei Autoimmunerkrankungen, zu denen die MS mitunter auch gezählt wird, scheinen zum Teil die gleichen genetischen Varianten für unterschiedliche Autoimmunkrankheiten mit auslösend zu sein (45, 47).

4. Grundlagen der Optischen Kohärenztomographie

Die OCT stellt ein bildgebendes Verfahren dar, das minimal-invasiv und berührungslos arbeitet. Primäre Anwendungsfelder in der medizinischen Diagnostik liegen im Fachbereich der Augenheilkunde, die OCT wird jedoch mittlerweile auch endovaskulär in der Kardiologie sowie endoskopisch in der gastroenterologischen Diagnostik eingesetzt (6, 11). Abgeleitet vom OCT-Einsatz bei der Messung neuronaler Schäden beim Erkrankungsbild einer diabetischen Retinopathie, wird die OCT zunehmend auch zur Messung der Neurodegeneration bei MS eingesetzt (48). Es konnte ein Zusammenhang zwischen Retina-Atrophie im Rahmen von MS und physischer Behinderung, kognitiven Defiziten sowie cerebraler Atrophie belegt werden (18), was neben den strukturellen Vorzügen die Bedeutung der OCT als bildgebendes Verfahren zum direkten Monitoring bei MS hervorhebt.

Als strukturelle Vorteile der OCT sind neben der Minimal-Invasivität auch eine schnelle Durchführbarkeit sowie vergleichsweise kostengünstige und ubiquitär vorkommende Geräte zu nennen (18, 49). Auch die Messungen selbst sind für Patient und Untersucher weniger zeitaufwändig als eine MRT-Untersuchung, was zu einer höheren follow-up-Compliance der Patienten bei geringeren Kosten für das Gesundheitssystem beitragen könnte.

In der Augenheilkunde wird die OCT im Rahmen der Hinterabschnittsdiagnostik eingesetzt, wobei Atrophien oder Ödeme u.a. im Rahmen von Erkrankungen wie diabetischer Retinopathie oder Chorioretinopathia centralis serosa nachgewiesen werden. Die Schichten der Netzhaut lassen sich hierbei deutlich voneinander abgrenzen (50). So lassen sich auch Informationen über die strukturelle Retinabeschaffenheit erheben. Da der Einsatz der OCT in der Neurologie noch neuer ist, finden sich hierbei weniger Publikationen als zu Krankheitsbildern der Augenheilkunde, wo die OCT bereits seit Anfang der 1990er Jahre etabliert ist.

4.1 Funktionsweise und Messverfahren

Grundlage der OCT stellen Reflexionen von Lichtstrahlen an Grenzflächen mit unterschiedlichen Brechungsindices dar. Die Funktionsweise der OCT ist in diesem Sinne analog zu der der Sonographie. Unterschiedlich sind die eingesetzten Signaltechniken: Bei der OCT werden statt Schallquellen als Signale Lichtquellen im nah-infraroten Bereich verwendet.

Das genutzte Verfahren nennt sich Weißlichtinterferometrie. Die Geschwindigkeit der Lichtstrahlen beträgt dabei circa 300.000 km/s wodurch eine genaue Messung von Entfernung und Dicke gewährleistet werden kann (48). Hierbei wird die Interferenz von Referenzlicht und zurückgestreutem Licht gemessen, um eine Abbildung des Tiefenprofils der Messprobe mit möglichst guter Auflösung im μm -Bereich zu erhalten (51). Weißes Licht reagiert besonders empfindlich auf Veränderungen von Brechungsindices. Neben dem gesamten Retinavolumen (total retina volume, TRV) können die einzelnen Retinaschichten in ihrer Dicke differenziert betrachtet werden. Heutzutage wird vor allem die viel messgenauere Form der OCT, SD-OCT – spectral-domain optical coherence tomography – bevorzugt (48). Bei dieser Messform sind sowohl die Aufnahmedauer kürzer als auch die Auflösung höher. Daraus resultiert ein genaueres Bild und auch die Reproduzierbarkeit wird erhöht. Deswegen ist die SD-OCT vor allem im Bereich der Diagnostik und Verlaufskontrolle von Krankheiten des Sehnerven von Vorteil (48, 52), obwohl die TD-OCT – time-domain OCT – das verbreitetere Verfahren darstellt. In-vivo-Messungen des Corneavolumens oder des vorderen Augenabschnitts scheinen adäquat via SD-OCT-Messungen abgebildet werden zu können, die retinalen Schichten werden besser mittels TD-OCT-Messungen dargestellt (6).

Das genutzte Messverfahren nennt sich low-coherence interferometry-Messung. Es werden die Zeitverzögerung und die Intensität des reflektierten Lichts im Vergleich zur einem Referenzstrahl gemessen.

Der ausgesendete Lichtstrahl wird zunächst geteilt, um zeitgleich auf zu messendes Objekt sowie Referenzobjekt gesendet werden zu können. Beide Lichtstrahlen werden vom gleichen Photodetektor aufgefangen, nachdem sie reflektiert worden sind (53). Hier werden dann Zeit- sowie Intensitätsunterschiede gemessen und schließlich als Interferogramm graphisch abgebildet (54). Das Interferogramm beschreibt den Vergleich der Reflexionszeiten des Lichts mit einem anderen Lichtstrahl als Referenzzeit und -Medium, da durch die hohe Geschwindigkeit von Licht keine direkten Zeitunterschiede technisch messbar sind (53). Umso mehr Lichtphotonen nicht vom Gewebe absorbiert wurden und dementsprechend durch den Photodetektor nach der Reflexion detektiert werden konnten, desto höher ist die Tiefenauflösung des Bildes (53). Die Stärke des Referenzstrahls muss umgekehrt angepasst werden, da dieser ohne Photonenverlust in jedem Fall stärker als der reflektierte Probenstrahl ist, damit das Bild weder verrauscht noch überstrahlt wird, je nach zu schwacher bzw. starker

Referenz (50). In der Regel erfolgt diese Anpassung automatisiert bei den klinisch eingesetzten Geräten.

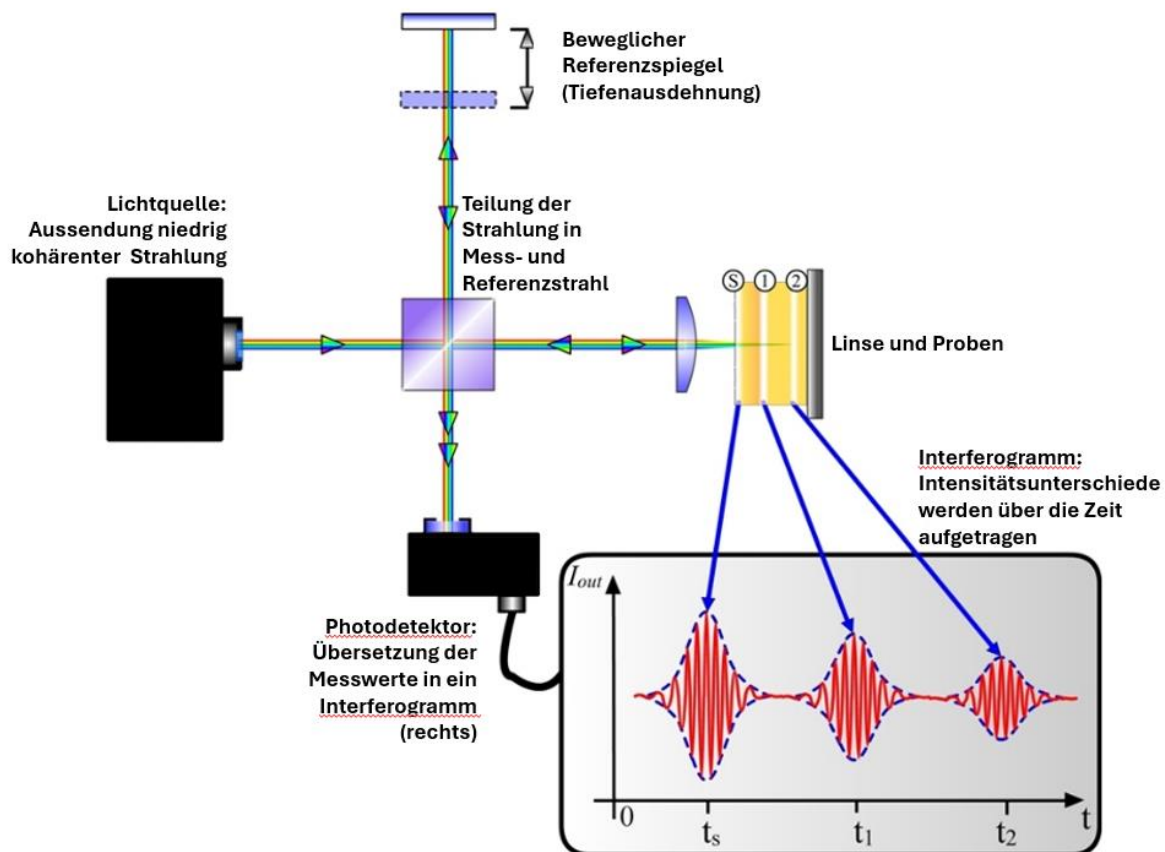


Abbildung 1: Funktionsweise und Messverfahren einer OCT (Bildquellen: nach (49, 55))

Damit die Lichtstrahlen für die OCT nutzbar sind, müssen sie kohärent sein. Das heißt sie müssen in definierten zeitlichen und räumlichen Beziehungen zueinander stehen, um eine möglichst große messbare Interferenz zu erzeugen (53). Interferenz entsteht durch die Spaltung des Lichtstrahls in die beiden Teilarme in Referenz- und Messstrahl.

Das OCT-Signal besteht schlussendlich aus orts- und wellenlängenabhängiger Interferenz, die zwischen dem reflektierten Licht aus der Probe und vom Referenzspiegel gemessen werden kann (53). Über eine Fourier-Transformation kann die Tiefe aus der Reflexion der Photonen bestimmt und so eine Tiefenmessung gemacht werden. Bei den auch in dieser Studie verwendeten Messgerät wurde ein SD-OCT verwendet, wobei das Interferometer noch durch ein optisches Gitter ergänzt wurde. Hierdurch werden die Wellenlängen innerhalb des Lichtstrahls je nach Wellenlänge abgelenkt, wodurch ein präziseres Bild am Ende erfasst werden kann (53).

Diese Messungen werden an unterschiedlichen Stellen wiederholt, um ein Schnittbild zu erstellen (53). Dieses wird schließlich in die uns bekannte Darstellungsform übersetzt, woraus medizinische Daten erhoben und ausgewertet werden können.

Analog zum Ultraschall wird auch bei der OCT eine Tiefenmessung als A-Scan und ein Schnittbild als B-Scan bezeichnet (53), wodurch aus vielen benachbarten Schnittbildern auch dreidimensionale Volumenaufnahmen generiert werden können. OCT-Scans werden in der Regel als B-Scans ausgewertet (53). Vereinfacht gesagt: Durch Zusammenfügung der oben beschriebenen Tiefenmessungen an verschiedenen Stellen der Netzhaut (A-Scans) entstehen im Anschluss Schnittbilder (B-Scans) bei Geräten dieser technischen Ausstattung, wie sie auch hier verwendet wurden (50, 53, 56, 57).

Die Auswertung der Bilder und die Angabe der Ergebnisse in geläufigen Zahlen wird automatisch durch eine geräteinterne oder durch eine hierfür programmierte und eingespeiste Software durchgeführt. So können bei gleichem Messobjekt je nach Verrechnung der Daten unterschiedliche Werte entstehen. Wichtig bei der Betrachtung von longitudinal erhobenen Daten ist dabei vor allem, dass die Auswertung immer anhand der gleichen Berechnungssoftware durchgeführt wird, um eine Vergleichbarkeit der Daten gewährleisten zu können.

4.2 Einsatzgebiet der OCT bei MS

50% der Patienten mit MS erleben im Laufe der Erkrankung mindestens einmal eine Episode einer Retrobulbärneuritis (RBN), bei 25% der Patienten stellt sie eines der initialen Symptome dar. Die hohe Prävalenz innerhalb der Erkrankten unterstreicht den Stellenwert der OCT-Bildgebung. Studien zufolge sind bei Patienten mit MS sowohl die Ganglienzell-Schicht (GCL) als auch die innere plexiforme Schicht (IPL) signifikant dünner, wobei die Ausdünnung der IPL relativ akkurat mit dem Ausmaß der Neurodegeneration zu korrelieren scheint (57). Beide Schichten werden häufig zusammengefasst als GCIPL. Eine weitere Korrelation konnte zwischen der Höhe des EDSS – bzw. dem Grad der Behinderung bei MS-Patienten – und der Dicke der inneren Retinaschichten sowie des vaskulären Netzwerkes gefunden werden (57). Vor allem die RNFL-Atrophie (retinal nerve fiber layer) korreliert Studien zufolge mit klinisch-neurologischer Einschränkung sowie per MRT dargestellter Atrophie. Diese Neurodegeneration der Augen konnte bei 80% der Patienten post-mortem verifiziert werden

(58). Einer koreanischen Zwillings- und Familienstudie aus dem Jahr 2020 zufolge, ist die RNFL-Dicke der Makula signifikant durch genetische Faktoren bedingt. Die Autoren konnten jedoch eine hohe Variabilität innerhalb der einzelnen Makulaabschnitte feststellen, wobei die höchste Vererbbarkeit im Bereich des zentralen Unterfelds und die geringste in den inneren Bereichen festgestellt werden konnte (59). Ähnliche Ergebnisse konnten auch für andere Netzhautschichten wie GCIPL ebenfalls bei koreanischen Studienpopulationen gewonnen werden (60). Die Vergleichbarkeit zum kaukasischen Patientenkollektiv in unserer Studie ist hierbei nur bedingt gegeben, andererseits können auch hier ähnliche Ergebnisse vermutet werden. Auch in der UK Biobank Analyse konnten genetische Risikofaktoren für die Entstehung einer altersabhängigen Makuladegeneration gefunden werden, die vor allem die Dicke der äußeren Retinaschichten beeinflussten (61).

Im Rahmen entzündlicher Erkrankungen der Retina schwellen hauptsächlich die Schichten IPL und OPL, im Rahmen neurodegenerativer Prozesse atrophieren am stärksten die Schichten RNFL sowie GCIPL (62, 63). Die Autoren schlossen aus ihren Forschungsergebnissen, dass anhand der GCIPL-Atrophie vor allem die kontinuierliche Neurodegeneration bei Patienten mit frühen MS-Stadien gemessen werden kann. Der anhaltende axonale Verlust kann hingegen anhand des mRNFL-Volumenrückgangs gemessen werden. Dieser sei durch stattgehabte RBN induzierbar (63). Die OCT bietet hier ein einfaches, nicht-invasives Verfahren, um diese Unterschiede nachzuweisen, wenn Patienten klinisch stumm bleibende RBN erleiden, die einen Indikator für eine höhere Krankheitsaktivität darstellen. So konnte in einer longitudinal angelegten Studie eine moderate Korrelation zwischen RNFL-Ausdünnung und Zunahme des EDSS nachgewiesen werden (43, 64, 65).

In einer Fall-Kontroll-Studie konnte bei Patienten mit frühen Krankheitsstadien von MS im Vergleich zu gesunden Probanden via OCT eine signifikante Atrophie des TRV festgestellt werden (63). In Subgruppenanalysen konnte weiterhin anhand der Atrophie unterschiedlicher Retinaschichten zwischen Patienten mit und ohne stattgehabter RBN differenziert werden: bei den Patienten mit einer RBN in der Historie nahm neben dem TRV signifikant das Volumen der mRNFL ab, bei Patienten ohne RBN hingegen fand sich eine Atrophie der GCIPL (63).

4.3 Limitationen

Seit der Einführung der OCT-Angiographie im Jahre 2015 sind Studiendaten einer bislang immer noch nur kleinen Population vorhanden, weswegen Validität und Evidenz der Studienergebnisse kritisch betrachtet werden müssen (57). Dies trifft jedoch weitaus weniger auf die herkömmliche OCT zu, die schon seit 1993 immer verbreiteter eingesetzt wird (6, 48). Eine weitere Limitation ergibt sich aus dem Untersuchungsablauf selbst, bei dem die Patienten aktiv mitarbeiten und so ein hohes Maß an Compliance für die Messung zeigen müssen. Schlechte Scan-Qualität ist in den meisten Fällen auf eine ungenügende Signalstärke oder eine Dezentralisation des Messpunktes um die Makula durch (unwillkürliche Eigen-) Bewegung des Auges zurückzuführen (58). Vor allem TD-OCT-Messungen sind anfällig für Letzteres, weswegen zur Gewinnung der vorliegenden Daten ein SD-OCT-Gerät verwendet wurde. Da OCT-Technik häufig bei Erkrankungsbildern eingesetzt wird, die mit Neurodegeneration und verminderter zerebraler und zerebellärer Kapazität einhergehen, können teilweise keine guten Bilddaten generiert und daraus folgend auch keine akkuraten Dateninterpretationen gewährleistet werden (57). Hierfür ist der Einsatz von Geräten mit Eye-Tracking empfehlenswert, da die Eigenbewegungen des Auges automatisch mit einberechnet und das Bild und die Messung angepasst werden (50). Andererseits erhöhen sich durch den Einsatz des Eye-Trackings die Untersuchungsdauer und dadurch ebenfalls indirekt die Kosten der Messung.

Häufige Begleiterkrankungen wie diabetische oder hypertensive Retinopathien stellen Limitationen in Bezug auf den spezifischen Einsatz der OCT-Angiographie bei MS dar (57), die OCT an sich wird hiervon weniger affektiert. Die Prävalenz dieser Erkrankungen nimmt mit steigendem Alter zu, wohingegen sich der Erkrankungsbeginn bei MS in einem viel früheren Lebensabschnitt befindet. Für die OCT muss zudem die ophthalmologische Historie eines jeden Patienten präzise erfasst werden (48), um Confounder erkennen zu können. So ist auch eine fortgeschrittene Katarakt als Limitation der OCT bei der Messung des hinteren Augenabschnitts zu werten, da durch die Trübung der Linse auch die Streuung der Photonen bei der Messung zunimmt, wodurch ein schwächeres Probensignal generiert wird und ggf. die Tiefenmessung ungenau ist (53). Der Einsatz der OCT zur Beurteilung des hinteren Augenabschnitts ist somit besser bei jungen Patienten, da die Linsentrübung physiologisch im Rahmen des natürlichen Alterungsprozesses zunimmt. Es ist des Weiteren in Frage zu stellen, inwieweit der Einsatz hochdosierter Glucocorticoide vor allem über einen längeren Zeitraum

hinweg eine Linsentrübung verursachen und so die Messergebnisse verändern. Hierüber gibt es jedoch keine Erkenntnisse in der aktuellen Fachliteratur.

Die Aufnahme mehrerer Messungen an einem Bildpunkt und die Berechnung eines Mittelwerts erhöhen die Messgenauigkeit, verlängern jedoch die Untersuchungsdauer (50, 53).

Generell ist zu sagen, dass die Messgenauigkeit und Vergleichbarkeit der Daten durch Nutzung des selben Geräts im longitudinalen Verlauf erhöht wird (53) und daher follow-up-Untersuchungen entsprechend am selben Gerät durchgeführt werden sollten. Dies ist auch in Bezug auf die Daten-Auswertungssoftware, wie oben beschrieben, sinnvoll.

5. Literaturdiskussion

5.1 Einfluss der Genetik auf MS

In einer international angelegten Studie konnten durch eine GWAS-Analyse von 47.429 MS-Patienten im Vergleich zu 68.374 gesunden Kontroll-Patienten 233 genomweit signifikante Risikoallele für MS identifiziert werden (66). Weitere 416 Varianten konnten nicht das genomweite Signifikanzniveau erreichen, dennoch fanden sich statistische Hinweise auf geringere Signifikanz (66). Im Rahmen der Studie wurden auf diese Art und Weise circa 7,8 Mio. SNPs mit einer MAF >1% analysiert (66). In einer weiteren longitudinal angelegten Studie und unter Verwendung eines kumulativen genetischen Risikoscores (cGRS) konnten Pan et al. einen signifikanten Zusammenhang zwischen sieben bekannten Risikogenen und deren prädiktiver Aussagekraft bezüglich Schubfrequenz und/oder Krankheitsprogression nachweisen (46, 67). Kritisch zu betrachten ist jedoch, dass keine der in den Analysen gefundenen SNPs alleine, d.h. ohne cGRS, eine Assoziation zum EDSS zeigte (67), was die Notwendigkeit einer Suche nach weiteren klinisch signifikanten Parametern unterstreicht. Die Autoren schließen daraus, dass die Konversion eines CIS in eine MS und auch Schübe durch andere pathogenetische Prozesse bedingt sein könnten als der Fortschritt der Behinderung selbst (67). Auch der Einfluss des bereits im Rahmen der Ätiopathogenese beschriebenen HLA-DRB1*15-Allels wurde kritisch hinterfragt: in einigen Studien konnte lediglich eine Assoziation zu einem früheren Erkrankungsbeginn festgestellt werden (67, 68), andere wiederum konnten einen Einfluss auf die MS-Schwere statistisch nachweisen (67, 69). Sawcer et al. beschreiben die meist familiär gehäuft auftretenden Variationen innerhalb des MHC-Komplexes als den größten Einflussfaktor auf das individuelle MS-Risiko (56). In ihrer Analyse konnten sie vor allem immunologisch relevante Gene hinsichtlich der HLA-DRB1-Risikoallele bestätigen und weiter die ätiopathogenetische These der T-Helfer-Zell-Differenzierung stützen (56). Beachtenswert bei diesen Studienergebnissen ist die Panel-Auswahl der GWAS hinsichtlich europäischer Abstammung, wie es auch in der hier vorliegenden Arbeit der Fall war. Dadurch gewinnen die Ergebnisse an Vergleichbarkeit.

Insgesamt wurden bis 2022 diverse MS-Suszeptibilitätsgene nachgewiesen, 32 genetische Signale, den MHC-Komplex betreffend, und circa 200 autosomale Genloci sowie auch ein Genlocus auf dem X-Chromosom (19). Bis 2024 haben sich die Daten hierzu nur wenig geändert. Diese Gene machen die zuvor beschriebenen knapp 50% der Erbllichkeit von

Multipler Sklerose aus (19). Die mehrheitlich für das genetische Suszeptibilitätsrisiko relevanten Gene finden sich jedoch vorwiegend an Gen-Orten für die adaptive Immunantwort und nahezu nicht im Bereich neuronaler Gene (70, 71). Als beachtenswert heben die Autoren hervor, dass 78% der in GWAS eingespeisten genetischen Daten europäischer Abstammung sind, was eine Unterrepräsentation anderer Abstammungslinien auf der einen Seite bedeutet, für die hier vorliegende Studie jedoch die Vergleichbarkeit erhöht. Aus ethischer und wissenschaftlicher Hinsicht wird daher eine erweiterte GWAS-Analyse mit Schwerpunkt auf der nicht-europäischen Bevölkerung gefordert (19).

Analysen zufolge erklären die bis jetzt bekannten genetischen Mechanismen jedoch höchstens 48% der MS-Erblichkeit (45, 71). Die andere Hälfte entfällt auf epigenetische Faktoren, Gen-Gen-Interaktionen, Gen-Umwelt-Interaktionen und noch unbekannte Begleiteffekte (45, 71). So bleibt die Rolle von beeinflussenden Umwelt- und epigenetischen Faktoren wie Vitamin D, EBV, Nikotin, Alter, Komorbiditäten oder MS-Therapie, die als mögliche Confounder fungieren können, weiter zu beachten (44, 46, 67). Auch hier sei noch einmal auf das oben beschriebene Phänomen der Multikausalität von genetischen Varianten auf verschiedene Autoimmunkrankheiten hingewiesen (45).

5.2 MS-assoziierte Erkrankung: Neuritis nervi optici

Nachfolgend wird auf die Neuritis nervi optici als Auswahl MS-assoziiierter Erkrankungsbilder eingegangen, die für die durchgeführte Studie inklusive Datenerhebungen und Untersuchungen besondere Relevanz besitzt. Andere, im Kapitel 2 beispielhaft beschriebene Erkrankungen, werden hier nicht detailliert dargestellt, da sie nicht Gegenstand der Analyse sind und auch nur geringen Einfluss auf durchgeführte Datenerhebung und Messungen haben.

Eine Neuritis nervi optici – oder synonym RBN – kann Ausdruck entzündlicher Systemerkrankungen sein und tritt insbesondere bei Multipler Sklerose in 20-30% der Erkrankungsfälle als Erstmanifestation auf (72, 73). Aus diesem Grund wurde bei der Auswertung der Krankenakten besonderen Wert auf die Erhebung der Krankheitsgeschichte bezüglich einer RBN gelegt. Aufgrund des häufig assoziierten Auftretens der beiden Erkrankungen gehört zur Standarddiagnostik bei Verdacht auf eine Neuritis nervi optici eine cMRT, um in der Bildgebung direkt auch eine Aussage bezüglich des Vorliegens einer MS treffen zu können. Zusätzlich kann eine Lumbalpunktion die Diagnostik hinsichtlich der

Diagnosestellung MS ergänzen (72, 73). Je stärker die Hinweise auf eine entzündliche Systemerkrankung, desto früher kann eine immunmodulatorische Therapie eingeleitet werden, wodurch sich das Outcome der Patienten maßgeblich verbessert.

Klinisch manifestiert sich die Neuritis nervi optici bei MS meist in Form einer schmerzhaften, progressiven Visusminderung, teilweise auch nur in einer Farbentsättigung oder einem Nebelsehen. Die RBN ist ein- oder beidseitig, nachfolgend oder simultan auftretend und bei MS häufig mit einem Bulbusbewegungsschmerz assoziiert (73). Bei einseitiger Schädigung ist im Swinging-Flashlight-Test ein relativer afferenter Pupillendefekt nachweisbar. Der Funduskopiebefund ist bei MS-Patienten mit einer RBN meist unauffällig. Im Gegensatz ist bei einer anterioren ischämischen Optikusneuropathie (AION) in der Funduskopie hingegen in der Regel ein Papillenödem auffällig. Im Verlauf entwickelt sich bei MS-bedingter RBN meist eine temporalseitige Atrophie von Nervenfasern des Nervus opticus (73). Unter hochdosierter Glucocorticoidgabe ist die Visusminderung regelhaft vollständig im Verlauf von Wochen rückläufig, unter Steroidreduktion steigt jedoch das Risiko von Rezidiven (72, 73). Kontrastschärfe, Farbsehen und Tiefenwahrnehmung hingegen erholen sich hingegen meist nicht vollständig (11). Der Grad der Visusminderung ist nicht prognostisch (11, 72, 73).

Patienten mit stattgehabter RBN konnten in einer randomisierten Studie von Patienten mit einer negativen Historie bezüglich einer RBN anhand veränderter Retinaschicht-Dicken im OCT unterschieden werden (63). Es konnten signifikant verminderte TRV- sowie mRNFL- und GCIPL-Werte bei den Patienten mit stattgehabter RBN nachgewiesen werden. In dieser Studie konnte ebenfalls bereits gezeigt werden, dass das TRV bei allen MS-Patienten – unabhängig von einer positiven oder negativen RBN-Historie – im Laufe der Zeit abnahm (63).

6. Material und Methoden

6.1 Studiendesign und Gewinnung genetischer Daten

In die Datenerhebung wurden ursprünglich 112 Personen eingeschlossen, von denen OCTs erstellt wurden. Für die vorliegende Studie mussten jedoch nachträglich neun Personen ausgeschlossen werden. Bei davon fünf Patienten fanden sich andere Differentialdiagnosen von MS wie beispielsweise die chronisch rezidivierende Immun-Optikusneuropathie (CRION), Neuromyelitis optica-Spektrum-Erkrankungen, eine Raumforderung am N. opticus oder eine beidseitige Uveitis. Die anderen vier Personen mussten aufgrund abweichender genetischer Herkunft aus der Analyse ausgeschlossen werden.

Grundlage für den Einschluss der verbleibenden 103 Personen waren somit ausschließlich nach den 2017 revidierten McDonald-Kriterien diagnostizierte Fälle von MS (CIS/RRMS/SPMS/PPMS). Alle Studienteilnehmer hatten vorab einer Teilnahme an der Studie inklusive Erhebung wissenschaftlicher Gesundheitsdaten in diesem Rahmen, einer anschließenden Pseudonymisierung der Daten, Speicherung sowie Auswertung und Datenweitergabe an Dritte schriftlich zugestimmt. Im Falle einer Publikation der aus der Studie erhobenen Daten erfolgt dies ausschließlich in anonymisierter Form.

Der genetische Hintergrund aller Personen wurde überprüft, sodass nur Personen kaukasischen Erbguts in die Analyse eingeschlossen wurden. So konnte eine größere Vergleichbarkeit der Daten im Querschnittsdesign ermöglicht werden. Dieser Schritt ist notwendig, da unterschiedliche Risiken für MS je nach genetischer Ausstattung bestehen. Des Weiteren wurde geringere Effektivität für cross-population Analysen beschrieben, da v.a. niederfrequente Allele in solchen Studien unterrepräsentiert wären (56).

Der non-european ancestry check der Haplotypen wurde per HapMap3 durchgeführt. Von den 103 Patienten der Universitätsmedizin (UM) Mainz, konnte von sieben Personen keine DNA gewonnen werden, wodurch keine Auswertung der genetischen Daten durch das Max-Planck-Institut für experimentelle Medizin in Göttingen möglich war, sodass auch diese Teilnehmer aus der Studie nachträglich exkludiert wurden. Die finale Studie umfasst somit 96 Teilnehmer (n=96), deren Diagnosen gesicherte Formen von MS sind, deren genetischer Hintergrund europäischer Abstammung ist, deren Daten genomweit analysiert werden konnten und von denen OCT-Messwerte vorlagen.

Das Max-Planck-Institut für experimentelle Medizin genotypisierte mithilfe eines genomweiten Array-Chips die aus dem Patientenblut extrahierte DNA, um SNP-Daten zu erhalten. Initial wurden den Patienten hierfür EDTA-Blut in der UM Mainz abgenommen. Weitere Patientendaten wie Alter, Geschlecht, Diagnosezeitpunkt der MS, Krankheitsdauer und EDSS-Score zu verschiedenen Zeitpunkten konnten der Anamnese oder den Krankenakten der Patienten entnommen werden. Mit dem Analysetool PLINK 1.9 (Purcell et al., 2019) konnten die SNPs dieser Kohorte analysiert werden.

Die finale Studie selbst ist schlussendlich aus verschiedenen Studientypen aufgebaut: die OCT-Messungen werden als longitudinale Datenanalyse verstanden. Messungen der Retinadicke wurden an mindestens zwei verschiedenen Zeitpunkten durchgeführt und die Messwerte im Verlauf der Zeit betrachtet. Die Analyse der genetischen Daten gleicht jedoch einer Querschnittsstudie, da das Genom eines Menschen als konstant betrachtet wird. Hier werden die genetischen Daten des Patientenkollektivs im Vergleich zur Allgemeinbevölkerung betrachtet. Eine genaue Zuordnung der SNPs zu den einzelnen Personen sowie eine Korrelation der persönlichen OCT-Messdaten findet nicht statt.

In der Auswertung werden somit Längsschnittdaten mit Querschnittsdaten korreliert. Dies dient dem Zweck, Erklärungen in den genetischen Hintergründen und den analysierten SNPs für Unterschiede innerhalb der OCT-Messergebnisse des Patientenkollektivs im Vergleich zur Normalbevölkerung im Verlauf zu finden.

Die weitere Auswertung der Daten erfolgte mittels IBM® SPSS 27.0.1 und ist in nachfolgenden Kapiteln genauer dargestellt.

6.2 OCT-Messungen

Bei dem in dieser Studie verwendeten SD-OCT-Gerät der Firma Heidelberg Engineering Germany erfolgte die Messung mit einer Abbildung von 11,38 μm Retina pro Pixel als Ringscan um die Austrittsstelle des Nervus opticus, woraus sich 768 x 496 Pixel pro Retinascan ergaben. Durch einen Scanwinkel von 30° x 25° konnten neben 2D- auch 3D-Abbildungen erzeugt werden. Eine bessere Signalerfassung konnte durch die Verwendung des aktiven eye-tracking Systems TruTrack™ gewährleistet werden (51, 55, 57). Die Messgenauigkeit wurde bei den vorliegenden Daten zusätzlich noch durch die Aktivierung des automatic real time-Modus erhöht, wodurch pro Bildpunkt circa 100 Bilder erzeugt, gemessen und so ein

durchschnittliches Messsignal abgeleitet werden konnte (51, 55). Ausgerichtet sind die Messpunkte auf die für Neurodegeneration sensibelsten Anteile der Retina: die Fovea centralis sowie die Austrittsstelle des Nervus opticus, was als posterior pole- bzw. optical-nerve-head-Messung bezeichnet wird.

In dieser Studie werden neben dem gesamten Retinavolumen Messergebnisse für die folgenden einzelnen Schichten erhoben: mRNFL und GCIPL, des Weiteren INL, OPL und ONL. Die Segmentierung der B-Scans in die einzelnen Schichten erfolgt automatisiert via einer von einem Informatiker der UM programmierten Software (Spectralis Viewing Module Version 6.9.5.0 des Heidelberg Eye Explorer (Version 1.10.2.0.)). Je nach eingesetzter Software können sich hier die numerischen Messergebnisse voneinander unterscheiden, obwohl dieselbe Probe verwendet und die gleiche Messung durchgeführt wurde.

Generell wurden die Messungen in einem abgedunkelten Raum bei ambienter Beleuchtung ohne Pupillendilatation durch geschulte Untersucher durchgeführt. Den APOSTEL-Empfehlungen (Advised Protocol for OCT Study and Terminology Elements) wurde zur Erhöhung der Studienqualität Folge geleistet (63, 75).

6.2.1 OSCAR-IB-Kriterien

Die Messergebnisse wurden anhand der OSCAR-IB Kriterien validiert, um Qualitätskontrollen (QC) mit hoher Interrater-Reliabilität und damit validen Outcome-Parametern garantieren zu können. Der Begriff OSCAR-IB ist ein Akronym, das für die einzelnen Bestandteile, Kriterien und möglichen Fehlerquellen der OCT-Messungen steht (57):

- (O) obvious problems including violation of the protocol
- (S) poor signal strength defined as <15 dB
- (C) wrong centration of scan
- (A) algorithm failure
- (R) retinal pathology other than MS-related
- (I) illumination
- (B) beam placement

Diese Kriterien sollen im klinischen Alltag zur Beurteilung und QC von Ringscans des Nervus opticus nutzerfreundlich herangezogen werden können. Aus diesem Grund wurden auch nur

validierte, einwandfreie, den OSCAR-IB-Kriterien entsprechende OCT-Messungen in die Studie aufgenommen.

6.2.2 Datenauswahl und Selektion

Um eine Vereinheitlichung der Daten zu Auswertungs- und Vergleichszwecken zu erreichen, mittelten wir die Werte der gemessenen OCT-Daten je nach Subgruppe. Bei den Patienten *ohne* stattgehabte Retrobulbärneuritis (RBNneg) wurden die Mittelwerte beider Augen als je ein Messpunkt betrachtet, genauso wurden bei den Patienten mit *bilateralen* RBN (RBNpos) verfahren. Bei den Patienten mit *einseitig* stattgehabter RBN (RBNpos) wurden nur die Messungen des affizierten Auges berücksichtigt.

Je Patient floss so ein Messpunkt in die statistische Analyse ein. Dieses Vorgehen fand auch bei anderen, ähnlichen Studien bereits Anwendung (62, 63).

6.3 Genotypisierung

Den in der Studie aufgenommenen Patienten wurde venös EDTA-Blut abgenommen, um daraus nach einem erprobten, standardisierten Protokoll der Klinik für Neurologie der UM Mainz Zellen zu isolieren und daraus deren DNA zu gewinnen. In Sinne eines multizentrischen Studiendesigns wurde anschließend im Max-Planck-Institut für experimentelle Medizin in Göttingen die Genotypisierung der DNA-Proben durchgeführt, um genomweite SNP-Daten zu generieren. Dies geschah gemäß Herstellerangaben der Firma ThermoFisher Scientific, deren Affymetrix Axiom® myDesign™ GW Array Chip hierbei

verwendet wurde. Dieser ist speziell auf neurowissenschaftliche Forschungsansätze zugeschnitten. Der verwendete Chip wurde auf das vorliegende kaukasische Patientengut angepasst, um eventuelle genetische Nebeneffekte zu vermindern. Aus diesem Grund erfolgte der non-european ancestry check via HapMap3, um das Patientenkollektiv hinsichtlich der genetischen Abstammung zwecks Vergleichbarkeit vorzuselektieren (siehe Kapitel 6.1). Der verwendete Array-Chip umfasst 610.849 SNPs, die bei den DNA-Daten der Patienten getestet wurden.

Die eigentliche Genotypisierung erfolgt zunächst nach dem Prinzip der DNA-Amplifikation sowie anschließend der DNA-Sequenzierung, deren Grundprinzip von Sanger bereits 1975 entwickelt wurde: Nach Fragmentierung der DNA in Stücke von mit einer Länge von 25 bis 125 bp werden diese aufgereinigt, suspendiert und auf die Axiome Genome-Wide Human Array Plate aufgebracht. Daraufhin erfolgt die Hybridisierung mit Primern sowie ein anschließender Waschvorgang, um überschüssige Primer zu entfernen. Diese Waschung dient der Reduktion unspezifischer Signale durch zufällige Bindungsereignisse der Primer mit DNA-Fragmenten. Die an der Array-Oberfläche gebundenen unterschiedlichen Nukleotide werden mit farblich kodierten Markern versehen – Ligation genannt –, angefärbt und am Schluss durch das GeneTitan™ Multi-Channel Instrument ausgelesen und abgebildet.

6.3.1 Qualitätskontrolle

Via PLINK 1.9 erfolgte die standardisierte Qualitätskontrolle der genotypisierten sowie klinischen Daten nach deren Einlesen inklusive Plausibilitätsprüfung. PLINK ist als kostenfreies und erprobtes Toolset für genomweite Assoziationsanalysen etabliert. Im nachfolgenden Kapitel wird ausführlich auf das Vorgehen bei einer genomweiten Assoziationsanalyse im Allgemeinen sowie auf das Vorgehen bei der hier vorliegenden GWAS eingegangen.

6.3.2 Genome-wide association study (GWAS) workflow

Entlang des durch Reed et al. graphisch dargestellten Workflows wird bei einer genomweiten Assoziationsanalyse im Allgemeinen vorgegangen (74). Auch in dieser Studie wurde sich an einem analogen Schema orientiert: Zunächst wurden im Schritt Data pre-processing die Dateien zum Einlesen aus den Messdaten und Krankenakten der Teilnehmer erstellt und in PLINK in die entsprechenden binären .fam-Dateien (enthalten Informationen über die Probanden), .bim-Dateien (Codierung von Informationen zu den genetischen Markern: SNPs) und .bed-Dateien (Verschlüsselung von Probanden-ID sowie Genotyp) konvertiert (74, 75). Parallel wurden auch bei unserer Studie separat Datensätze der klinischen Parameter mithilfe von R eingepflegt (74).

Bei der Filterung nach SNP-Leveln wurde zunächst hierfür die Call Rate < 95% festgelegt, wodurch SNPs ausgeschlossen wurden, die bei > 5% der Patienten keine Treffer erzielten

konnten.

Um einer Verfälschung der Analyseergebnisse vorzubeugen, wurde zeitgleich die $MAF \geq 5\%$ festgelegt. Das heißt, die Frequenz seltener Allele muss mindestens 5% betragen. Dieser Schritt ist notwendig, da Genotypisierungsfehler einen höheren Einfluss auf seltenere Allele haben (76). Beide Schritte sind auch im Schema von Reed et al. dargestellt und bei herkömmlichen GWAS üblich (74).

Anschließend wurde die sample-level Filterung vorgenommen, bei der die Daten auf Ebene der DNA-Proben kontrolliert und (aus-) sortiert wurden. Hierbei wurde eine Call Rate $< 99\%$ festgelegt, um Proben auszuschließen, bei denen weniger als 99% der SNPs vorkamen, daher die strengere Begrenzung der Call Rate. Weiter wurden die Probandaten auf zu hohe Heterozygotie – stellvertretend für schlechte Probenqualität stehend –, Verwandtschaft und genetischen Hintergrund geprüft. Proben mit mehr als drei Standardabweichungen an genetischer Heterozygotie wurden eliminiert. Das verwendete GWAS-Protokoll findet sich im Anhang (siehe Kapitel 11.2).

Die Auswahl an Studienteilnehmern aus dem Patientengut der UM Mainz stellt eine Kohorte regional ausgewählter Teilnehmer dar. Im Falle der Verwandtschaft zweier Proben wurde nur die DNA mit der höheren Call Rate behalten, um die Qualität der Proben zu bereinigen. Der genetische Hintergrund wurde, wie bereits zuvor beschrieben, mithilfe des Referenzpaneels HapMap3 nach dem AncenstryCheck.pdf² überprüft, um den Teilnehmerkreis auf kaukasisches Erbgut zu begrenzen. Das hier verwendete Protokoll findet sich ebenfalls im Anhang (siehe Kapitel 11.1). Aus der Kontrollkohorte wurden hierdurch in einem vorherigen Schritt 459 Individuen entfernt.

In der PLINK-Analyse verblieben 327 Personen nach der ersten Selektion auf Läsionsvolumina. Auch ein Check des Geschlechts via homozygote X-Chromosomen wurde mittels F-Statistik in R vorgenommen, um die Gültigkeit der Regressionsfunktion zu überprüfen. Die Analyse wurde insgesamt auf die Autosomen begrenzt (siehe Kapitel 11.2). Für die Gonosomen wäre eine gesonderte Betrachtung vonnöten gewesen. Nach diesem Schritt verblieben 594.024 Varianten von 327 Kontrollindividuen in der PLINK-Analyse, die alle Filterungen sowie die QC der Proben bis dahin überstanden hatten.

² Hannah Meyer, Stand 08.02.2021

Im Schritt der eigentlichen QC wurden 61.549 Varianten aufgrund fehlender genetischer Daten sowie 47.121 Varianten wegen einer zu geringen MAF ($MAF < 5\%$) entfernt, woraus sich schlussendlich 485.345 verbleibende Varianten ergaben (siehe Kapitel 11.2).

In folgenden Schritten innerhalb des GWAS-workflows wurden die SNPs gestrichen, die eine zu starke Abweichung vom Hardy-Weinberg-Equilibrium aufwiesen. Darunter versteht sich eine zu stark von der theoretischen Idealpopulation abweichende Allelfrequenz des Individuums. In der Idealpopulation werden Allelfrequenz und Phänotyp als generationsbergreifend konstantes Gleichgewicht betrachtet (77). SNPs, bei denen in der HWE-Teststatistik ein p-Wert $< 1 \times 10^{-6}$ ermittelt wurde, wurden gestrichen. In unserer Stichprobe war dies bei 316 SNP-Varianten der Fall (siehe Kapitel 11.2). Schlussendlich konnten somit 485.038 Varianten von 315 Kontrollpersonen in die finalen Analysen und Regressionen eingehen (siehe Kapitel 11.2). Dies entspricht 81,65% der ursprünglich zur Analyse bereitstehenden genetischen Varianten.

Mittels PLINK wurde anschließend die finale lineare Regression durchgeführt. Ein Beispiel für den Aufbau von PLINK-Kommandos geben Marees et al. in ihrem Artikel aus dem Jahr 2018 (75). Daran wurde sich auch im hier vorliegenden Fall orientiert. Die Regression wurde dabei dreimal für die Gesamtheit der Studienpopulation durchgeführt: Eingang fanden die baseline-Daten, die follow-up-Daten sowie die absolute Differenz der Phänotypen. Unter Phänotyp wird hierbei die per OCT in mm^3 gemessenen Volumina der Retina verstanden. SNPs wurden hierbei für das TRV sowie die einzelnen Schichten GCL, IPL, GCIPL, RNFL separat analysiert. Anschließend wurde in doppelter Ausführung – baseline und follow-up – die SNPs nach unterschiedlichen Kovariaten der Teilnehmer adjustiert, um eine Unterscheidung zwischen den Kohorten mit und ohne stattgehabter RBN treffen zu können (Protokoll siehe Kapitel 11.3). Unter Kovariaten werden in der Statistik Variablen verstanden, die die Beziehung zwischen der unabhängigen und der abhängigen Variable beeinflussen, jedoch nicht von direktem Interesse bei der Analyse sind.

Visualisierung und QC sowie Auswertung und Bedeutung der GWAS-Datenberechnung sind im Kapitel Ergebnisse nachfolgend detailliert beschrieben.

Eine Korrektur für multiples Testen wurde durchgeführt und gemäß der Genomic-Control-Korrektur durch PLINK p-Werte $< 5 \times 10^{-8}$ als genomweit-signifikant sowie p-Werte $< 5 \times 10^{-6}$ als suggestiv definiert, sodass nach diesen Grenzwerten ausgewertet wurde (75, 78).

7. Ergebnisse

7.1 Deskriptive Statistik des Studienkollektivs

7.1.1 Alters- und Geschlechtsverteilung

In die Auswertung der Daten flossen insgesamt 96 Studienteilnehmer (n=96) ein, von denen genetische Daten sowie OCT-Messwerte erhoben werden konnten. Auf die Auswahl- und Diagnosekriterien wurde bereits in vorangegangenen Kapiteln ausführlich eingegangen.

62,5% der Patienten (n=60) sind weiblich, woraus sich eine Ratio von 1,67 : 1 im Geschlechterverhältnis Frauen : Männer ergibt. Damit liegt die Geschlechterverteilung in unserem Studienkollektiv ein wenig unter dem statistischen Durchschnitt von 2 : 1 weltweit (9).

Parameter	Anzahl (%)	Median (IQR)
Alter (Jahre)		33,5 (26,8-43)
Alle Geschlechter	96 (100%)	
- Männlich	36 (37,5%)	
- Weiblich	60 (62,5%)	

Tabelle 1: Epidemiologische Daten

Das Durchschnittsalter bei Erhebung des ersten OCT war 35,73 Jahre (OCT_baseline). Dieses OCT wurde im Patientenkollektiv nach durchschnittlich 3,4 Jahren Erkrankungsdauer durchgeführt. Der Begriff Erkrankungsdauer ist hierbei als Zeitabstand zwischen dokumentiertem Diagnosezeitpunkt und OCT_baseline zu verstehen und nicht auf die Dauer der eigentlichen Erkrankung bezogen. Wie in den Kapiteln 2.3 Ätiologie und Pathogenese sowie 2.4 Erst- und Verlaufsdagnostik beschrieben, ist die Krankheitsmanifestation ein zunächst schleichender Prozess, dessen immunologischer Beginn im Nachhinein kaum feststellbar ist. Die Diagnosestellung MS hingegen ist unter anderem an zeitliche Kriterien gebunden. Des Weiteren hat auch die medizinische Infrastruktur mit Anbindung der Patienten an einen Neurologen bzw. eine Klinik für Neurologie zwecks Diagnostik Einfluss auf den Zeitpunkt der Diagnosestellung.

Beim OCT_follow-up lag der Altersmittelwert bei 39,09 Jahren. Der jüngste Patient war bei den ersten OCT-Messungen 21,09 Jahre alt, wohingegen der älteste Patient 67,93 Jahre alt

war. Hierdurch ergibt sich eine Altersspanne von 46,85 Jahren. Beim OCT_follow-up wuchs die Altersspanne sogar auf 49,09 Jahre an.

	n	Minimum	Maximum	Mittelwert	Spannweite
Alter bei OCT_b	96	21,09 y	67,93 y	35,73 y	46,85 y
Alter bei OCT_fu	96	21,95 y	71,04 y	39,08 y	49,08 y

Tabelle 2: Deskriptive Statistik des Patientenalters (y) bei OCT_baseline und OCT_follow-up

7.1.2 Zeitpunkte der OCT-Untersuchungen

Zwischen OCT_baseline und OCT_follow-up vergingen durchschnittlich 40,2 Monate (Cluster 7), das heißt etwa 3,35 Jahre. Im Median vergingen 44,5 Monate (Cluster 8). Grafisch ist dies im Folgenden nach Clustern à je 6 Monate dargestellt:

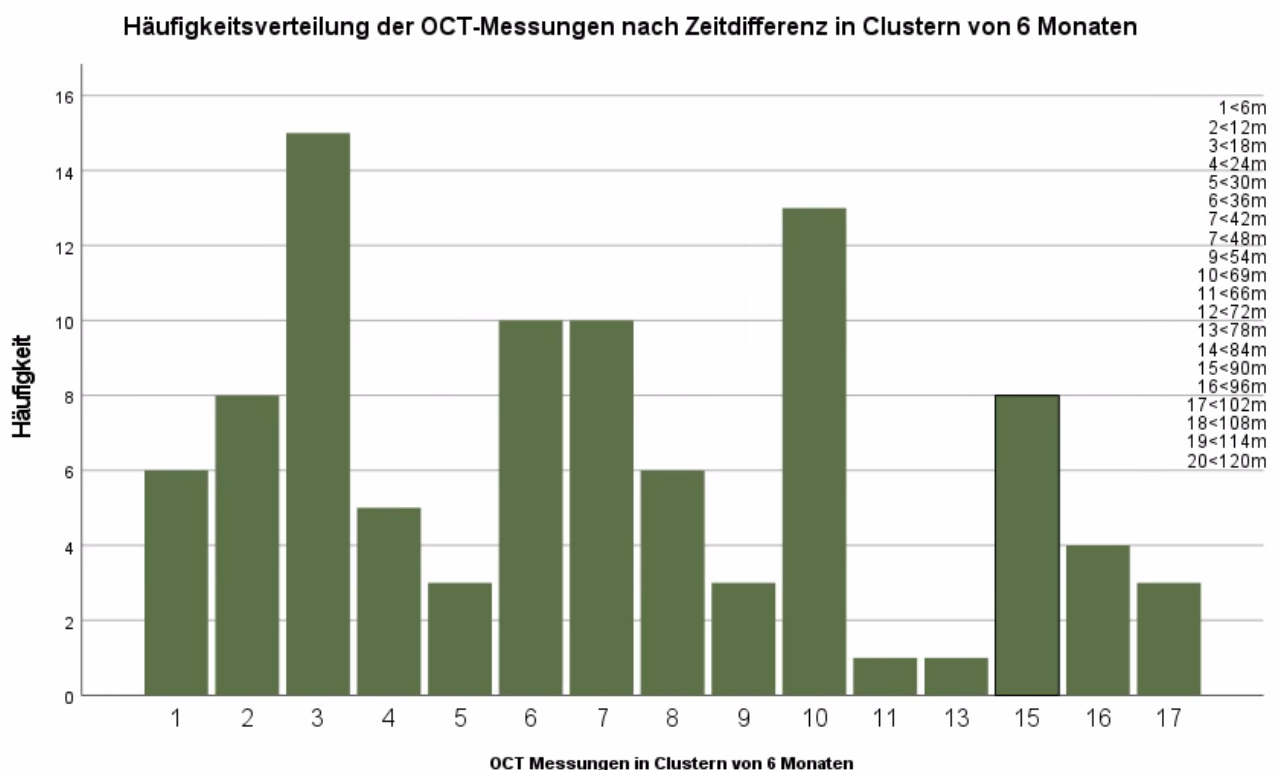


Abbildung 3: Häufigkeitsverteilung der OCT-Messungen nach Zeitdifferenz in Clustern à je 6 Monate, Legende der Cluster in Monaten an der Seite angegeben

Bei einigen Patienten wurden bis zu sieben OCT-Untersuchungen über die Zeit hinweg durchgeführt. In die Auswertung der Daten sind daher bei allen Patienten die Werte der ersten

und letzten OCT-Messung eingeflossen, um eine größtmögliche Veränderung longitudinal abbilden zu können. Diese Auswahl der in die Datenanalyse einfließenden Werte geschah unabhängig davon, wie viele Zwischenmessungen es zusätzlich gab. Das in die Auswertung eingehende OCT_follow-up ist im Mittel 6,7 Jahre nach Erstdiagnose durchgeführt worden.

Zwischen OCT_baseline und OCT_follow-up verschlechterte sich der EDSS des durchschnittlichen Patienten von einem Ausgangswert von 1,11 auf 1,74 im Mittelwert. Bei drei Patienten verbesserte sich der EDSS im Laufe der Zeit über den Erhebungszeitraum hinweg jeweils um 0,5 Punkte. Dies legt die Vermutung nahe, dass zum Zeitpunkt der ersten Datenerhebung ein akut entzündliches Geschehen im Bereich von Sehnerv bzw. Retina in Gang war. Diese temporäre Verschlechterung wurde in einem höheren EDSS abgebildet im Vergleich zur follow-up-Untersuchung im Rahmen des letzten OCTs. Allerdings ist auch eine Untersucher-bezogene Abweichung des EDSS nicht ausgeschlossen, da der Score wesentlich von der klinischen Untersuchung sowie der Einordnung des Untersuchungsbefundes abhängt. Diese Unschärfe ist retrospektiv nicht abschließend zu ermitteln.

7.1.3 MS-Subtyp

Zu den weiteren Kovariatendaten: 89,58% (n=86) der Patienten haben die Diagnose RRMS, zu denen man wahrscheinlich heute auch zusätzlich die n=2 Patienten zählen kann, bei denen zu den Untersuchungszeitpunkten lediglich die Diagnose eines CIS gestellt wurde. Weitere n=5 Patienten hatten bereits die Diagnose SPMS erhalten, davon sind n=2 Patienten weiblich. Auch hier ist statistisch zum jetzigen Zeitpunkt ein Übertritt von RRMS-Patienten in eine SPMS nach längerer Erkrankungsdauer zu erwarten. Bei n=3 Patienten wurde die Diagnose PPMS gestellt, hiervon ist nur n=1 Patient männlichen Geschlechts.

Parameter		Anzahl (%)	Median (IQR)	Mittelwert
Diagnose	RRMS	86 (89,58%)		
	SPMS	5 (5,21%)		
	PPMS	3 (3,13%)		
	CIS	2 (2,08%)		
Alter bei OCT-Messungen (Jahre)	Bei OCT_baseline		33,5 (26,8-41)	35,72
	Bei OCT_follow-up		37 (31-46,7)	39,09

EDSS	Bei OCT_baseline	1,0 (0-1,75)	1,11
	Bei OCT_follow-up	1,5 (0-2,5)	1,74
Erkrankungsdauer	Bei OCT_baseline	1,0 (0-5)	3,41
bei OCTs (Jahre)	Bei OCT_follow-up	5 (2-9,75)	6,72

Tabelle 3: Klinische Parameter des Patientenkollektivs

7.1.4 Vorliegen einer RBN-Krankheitsgeschichte

Innerhalb des Studienkollektivs wurde zur Subgruppenanalyse zwischen zwei Patientengruppen unterschieden, je nachdem, ob sie in ihrer Krankheitsgeschichte eine RBN aufwiesen oder nicht. 67,71% aller Patienten hatten keine RBN zum Erhebungszeitpunkt gehabt (RBNneg: n=65), davon sind n=40 (61,54%) Frauen.

Innerhalb der Gruppe der Patienten mit einer stattgehabten RBN (RBNpos: n=31) waren bei vier der 31 Patienten (12,90%) sogar mehrmalige Ereignisse dokumentiert. Bei n=7 (22,58%) der RBNpos-Patienten war eine beidseitige RBN dokumentiert. Hierbei spielt keine Rolle, ob die RBN zeitgleich oder zeitversetzt an beiden Augen aufgetreten sind.

Zusammenfassend flossen also von jedem Patienten der erste und der letzte Mittelwert in die Analyse ein. Bei den Patienten mit einem affektierten Auge (RBNpos einseitig) wurden keine Mittelwerte berechnet, sondern lediglich das jeweils affektierte Auge zum ersten und letzten Messzeitpunkt berücksichtigt. Genauer wurde das Vorgehen zur Ermittlung der Messpunkte für die Datenanalyse in Kapitel 6.2.2 beschrieben.

	Gesamt=96 (100%)	davon Männer	davon Frauen
RBNneg	65 (67,71%)	25 (26,04%)	40 (41,67%)
RBNpos	31 (32,29%)	11 (11,46%)	20 (20,83%)
- Ein Auge	24 (25,00%)	8 (25,00%)	16 (16,67%)
- Beide Augen	7 (7,29%)	3 (3,13%)	4 (4,17%)

Tabelle 4: Retrobulbärneuritiden

Kritisch betrachtet werden muss, dass aus den Akten keine Daten zum aktuellen klinischen Zustand des Auges zum Zeitpunkt der OCT-Messungen erhoben werden und auch die Patienten darüber keine valide Aussage retrospektiv treffen konnten. Daher ist es nicht

ausgeschlossen, dass bei einigen Patienten subklinische entzündliche Prozesse am Sehnerven abliefen, die die Patienten zunächst oder auch im Verlauf gar nicht bemerkten. Unsicher ist dabei, inwieweit die Messergebnisse in diesem Fall durch mögliche subklinische Entzündungen verändert wurden. Bei Erhebung der Daten wurde jedoch auf Plausibilität der Messergebnisse sowie ein hohes Maß an Messqualität geachtet, um entsprechenden Effekten vorzubeugen.

7.2 OCT-Daten

Pro Patienten wurden nach Möglichkeit mindestens zwei Messwerte zu verschiedenen Zeitpunkten erhoben. Die Beachtung der ophthalmologischen Historie der Patienten ist zur korrekten Einordnung und Interpretation der OCT-Messwerte wichtig.

Zunächst betrachten wir das TRV und vergleichen die durchschnittlichen Messwerte vom ersten OCT (OCT_b) mit denen des letzten follow-ups (OCT_fu). Des Weiteren werden die Mittelwerte für das TRV je nach Subgruppe (RBNneg bzw. RBNpos) verglichen. Die Angabe aller OCT-Messwerte erfolgt in der Einheit mm^3 .

	TRV	GCIPL	mRNFL	TRV RBNneg	TRV RBNpos
OCT_b	3,03	0,76	0,20	3,06	2,97
OCT_fu	3,04	0,78	0,21	3,07	2,97

Tabelle 5: OCT-Mittelwerte absolut (alle Messwerte haben die Einheit mm^3)

Durch SPSS wurden die Werte für die folgenden Berechnungen mit dem Faktor 100 erweitert, weswegen die Werte in der Einheit $\text{mm}^3 \cdot 10^{-3}$ stehen. Unterschieden wurde in den Gruppenstatistiken jeweils zwischen Gruppe 1 (RBNneg) und Gruppe 2 (RBNpos).

Gruppenstatistiken

	1 neg, 2 pos	N	Mittelwert	Std.- Abweichung	Standardfehler des Mittelwertes
TRVb_all	1	64	306,2188	16,01633	2,00204
	2	32	297,2555	17,93532	3,17055
TRVfu_all	1	55	307,2909	16,96639	2,28775
	2	26	400,7308	525,53573	103,06604

Tabelle 6: SPSS-Gruppenstatistiken: oben: TRVb_all, unten: TRVfu_all

Beim Vergleich der deskriptiven Statistik der TRV-Werte zu Beginn (TRVb_all, Tabelle oben) und der TRV-Werte beim follow-up (TRVfu_all, Tabelle unten) fällt zunächst auf, dass von den ursprünglichen 96 Studienteilnehmern beim follow-up nur noch 81 Werte vorliegen. Dies entspricht einem Ausscheiden von 15,6% der Teilnehmer aus der Studie im Verlauf der Messungen. Auffallend ist außerdem, dass die Mittelwerte für das TRVfu ($M_{RBNneg} = 307,29$, $M_{RBNpos} = 400,73$) in beiden Gruppen im follow-up höher sind als die Mittelwerte bei TRVb ($M_{RBNneg} = 306,21$, $M_{RBNpos} = 297,26$). Allen gemessenen Werten gemeinsam ist, dass sie kleiner als die in der Literatur in Studien ermittelten Normalwerte für das TRV von 4,3-11,5 μm sind (79). Für TRVb kann eine vorliegende Varianzhomogenität bestätigt werden. -
= 1=

7.3 Zunächst wird die Signifikanz als Größe betrachtet, um eine Angabe über einen vorhandenen Effekt treffen zu können. Je nach Subgruppe wurden ungepaarte t-Teste für das TRV zu Beginn und zu Ende des Messzeitraums durchgeführt, um eine Aussage über den Vergleich der Mittelwerte treffen zu können.

		Levene-Test der Varianzgleichheit			
		F	Sig.	T	df
TRVb_all	Varianzen sind gleich	,122	,728	2,483	94
	Varianzen sind nicht gleich			2,390	56,249

Zur besseren Lesbarkeit der Werte wurde die Tabelle geteilt und vergrößert:

7.4

Tabelle 7: t-Test TRVb

Stichproben

Sig. (2-seitig)	Mittlere Differenz	Differenz für Standardfehler	95% Konfidenzintervall der Differenz	
			Unterer Wert	Oberer Wert
,015	8,96321	3,60994	1,79558	16,13083
,020	8,96321	3,74974	1,45231	16,47410

7.5

Im Levene-Test werden die beiden Subgruppen zunächst auf Varianzhomogenität getestet. Diese Voraussetzung des ungepaarten t-Tests kann für die TRVb-Berechnung positiv bestätigt werden und der Standardfehler kann problemlos berechnet werden. Dieser beträgt $3,61 \cdot 10^{-2} \text{ mm}^3$. Es gibt einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den TRVb-Werten der beiden Subgruppen, wobei die mittlere Differenz des TRV der beiden Subgruppen $8,96 \cdot 10^{-2} \text{ mm}^3$ beträgt (95%-CI $[1,80; 16,13] \cdot 10^{-2} \text{ mm}^3$), $t(94) = 2,483, p > 0,05$.

Da der Levene-Test nicht signifikant wurde, wird hier die obere Zeile innerhalb der Tabelle, „Varianzen sind gleich“, betrachtet.

Test bei unabhängigen

		Levene-Test der Varianzgleichheit			
		F	Sig.	T	df
TRVfu_all	Varianzen sind gleich	8,112	,006	-1,327	79
	Varianzen sind nicht gleich			-,906	25,025

Stichproben

t-Test für die Mittelwertgleichheit

Sig. (2-seitig)	Mittlere Differenz	Differenz für Standardfehler r	95% Konfidenzintervall der Differenz	
			Unterer Wert	Oberer Wert
,188	-93,43986	70,44035	-233,64787	46,76815
,373	-93,43986	103,09142	-305,75002	118,87030

7.6

Tabelle 8: t-Test TRVfu

7.7

Im Vergleich werden die Werte des t-Tests des TRVfu aller Patienten betrachtet. Auch hier wurde die Tabelle zur besseren Lesbarkeit geteilt und vergrößert. Es zeigte sich ein signifikant gewordener Levene-Test, woraus sich eine fehlende Varianzhomogenität innerhalb der Gruppen ableiten lässt. Im Folgenden muss also, im Gegensatz zu Tabelle 7, die untere Tabellenzeile, „Varianzen sind nicht gleich“, betrachtet werden.

Bei mangelnder Varianzhomogenität wird in solchen Fällen der Welch-Test (untere Zeile von Tabelle 8) berechnet, der Experten zufolge generell robuster und daher dem t-Test vorzuziehen ist (80). Hier zeigte sich keine statistische Signifikanz bezüglich der Unterschiede des TRVfu zwischen den beiden Subgruppen, $t(79) = -0,906, p < 0,373$.

7.8 Im Anschluss wird die Effektstärke als das Maß betrachtet, das die Stärke und Relevanz des vorhandenen Effekts angibt, bzw. die Größe des Zusammenhangs zwischen Variablen in Studien. Auch Ergebnisse unterschiedlicher Studien können anhand der Effektstärke besser verglichen werden. Über die Betrachtung der Größe des Zusammenhangs kann auch die Bedeutung von Ergebnissen unabhängig von der Stichprobengröße bewertet

Effektgrößen bei unabhängigen Stichproben

		Standardisierer ^a	Punktschätzung	95% Konfidenzintervall		ß
				Unterer Wert	Oberer Wert	
TRVb_all	Cohen's d	16,67361	,538	,105	,967	
	Hedges' Korrektur	16,80814	,533	,104	,960	
	Glass' Delta	17,93532	,500	,054	,938	
TRVfu_all	Cohen's d	295,96954	-,316	-,784	,154	
	Hedges' Korrektur	298,81692	-,313	-,776	,153	
	Glass' Delta	525,53573	-,178	-,645	,293	

- a. Der bei der Schätzung der Effektgrößen verwendete Nenner.
 Cohen's d verwendet die zusammengefasste Standardabweichung.
 Hedges' Korrektur verwendet die zusammengefasste Standardabweichung und einen Korrekturfaktor.
 Glass' Delta verwendet die Standardabweichung einer Stichprobe von der Kontrollgruppe.

7.14

7.15

7.16

Tabelle 9: Effektstärke Cohen's d für TRVb_all und TRVfu_all

7.17

Um die Effektstärke von TRVb und TRVfu zu vergleichen, betrachten wir Cohen's d als Maß derselben. Die Größe des Effekts wird durch Cohen's d standardisiert und damit vergleichbar gemacht. Je größer Cohen's d, desto stärker der Effekt.

Für TRVb_all wurde mit einem Cohen's d = 0,538 eine mittlere Effektstärke für einen positiven Zusammenhang nachgewiesen. Bei einem Cohen's d = -0,316 ergab sich für TRVfu_all eine geringe-mittlere Effektstärke für einen negativen Zusammenhang.

7.18

7.19 PLINK-Analyse

In der PLINK-Analyse wurden multiple statistische Tests durchgeführt, unter anderem nach Bonferroni, Sidak und Holm. Durch uns wurden im Anschluss die genomic-control corrected p-Werte als statistische Referenz zusammen mit Chromosomennummer und SNP-Identifizier verglichen. Die p-Werte werden hierbei als negative dekadische Logarithmen angegeben: Je kleiner die Zahl, desto höher die Signifikanz. Als genomweit signifikant definierten wir p-Werte $<10e^{-08}$, als suggestiv bereits p-Werte $<10e^{-06}$. Die Analyse wurde zudem anhand der Kovariaten in Subgruppen mit/ohne stattgehabter RBN (RBNpos bzw. RBNneg), nach den einzelnen OCT-Schichten (TRV, RNFL, GCL, IPL, GCIPL) sowie den unterschiedlichen OCT-Erhebungszeitpunkten differenziert.

Insgesamt konnten 170 SNPs mit p-Werten $<10e^{-06}$ identifiziert werden, davon 19 mit p-Werten $<10e^{-07}$ und ein SNP mit einem p-Wert $<10e^{-08}$, das somit genomweite Signifikanz besitzt.

Die Häufigkeitsverteilung der SNPs je nach Lokalisation auf den Chromosomen ist nachfolgend dargestellt. Chromosom 7 ist hierbei mit Abstand am häufigsten vertreten mit n=28 Treffern (16,47%).

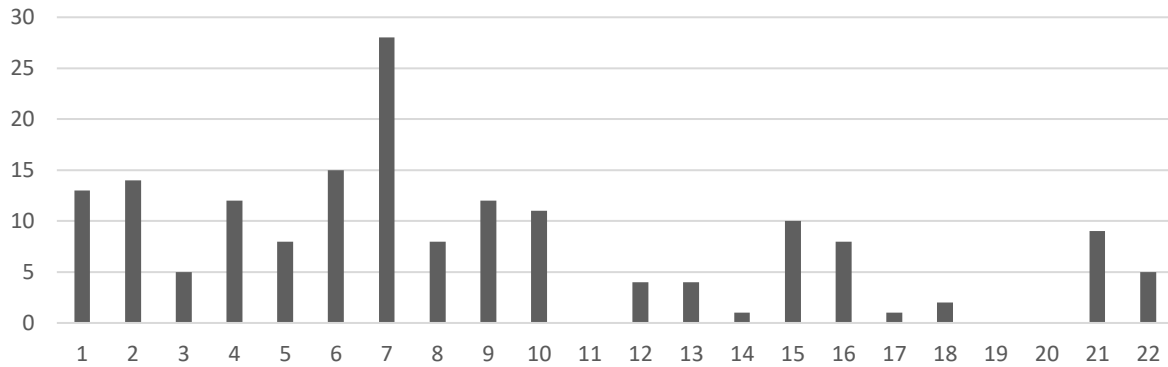


Abbildung 4: Häufigkeitsverteilung aller SNPs mit p-Werten $<10e-06$ nach Chromosomen

Das genomweit signifikante SNP mit dem Namen rs2243468 (p-Wert $2.848e^{-09}$) liegt auf Chromosom 21. Die Hälfte der acht SNP-Treffer auf Chromosom 21 weisen p-Werte $<10e^{-07}$ auf. Die anderen SNPs mit suggestiveren p-Werten $<10e^{-07}$ sind auf Chromosom 6 (n=2), Chromosom 7 (n=3), Chromosom 10 (n=3), Chromosom 13 (n=1), Chromosom 15 (n=5) sowie Chromosom 22 (n=1) lokalisiert.

Bei Eingabe der SNP-Identifizier in die gängige Datenbank des National Institute of Health (NIH), der National Library of Medicine des National Center for Biotechnology Information finden sich nur circa 55% der SNP als Treffer auf Introns, Exons oder anderweitig bekannten Genomabschnitten wieder. Diese werden in der folgenden Abbildung 4 veranschaulicht. Die restlichen 45% der SNPs liegen auf bislang noch unbekanntem Genabschnitt und sind folglich weder in Position noch Funktion oder Nähe zu funktionellen Einheiten des Genoms bekannt. Hieran wird deutlich, dass bei der Genotypisierung sowie bei der Identifikation der Genabschnitte noch vielfältige Forschungsmöglichkeiten bestehen. Die Analyse muss daher zum aktuellen Zeitpunkt auf diese 55% bekannter SNPs beschränkt werden.

Die Beschreibung der 19 SNP-Haupttreffer mit p-Werten $<10e^{-07}$ erfolgt gesondert in einem eigenen Kapitel (siehe Kapitel 7.3.1), die Diskussion erfolgt anschließend in Kapitel 8.1., wenn auch diese nicht alle das genomweite Signifikanzniveau erreichen konnten

Die Beschreibung aller SNPs mit suggestiver Signifikanz bei p-Werten $<10e^{-06}$ würde an dieser Stelle den Umfang der Arbeit sprengen, weswegen sich auf die SNP mit einer höheren (p-Werten $<10e^{-07}$), wenn auch noch nicht genomweiten Signifikanz beschränkt wurde.

Abbildung 4 gibt eine orientierende Übersicht über die Häufigkeitsverteilung der einzelnen genotypisierbaren SNPs. Dargestellt werden jedoch nur die 55% der SNPs mit p-Werten $<10e^{-06}$, die, wie oben beschrieben, bereits bekannt sind und identifiziert werden konnten:

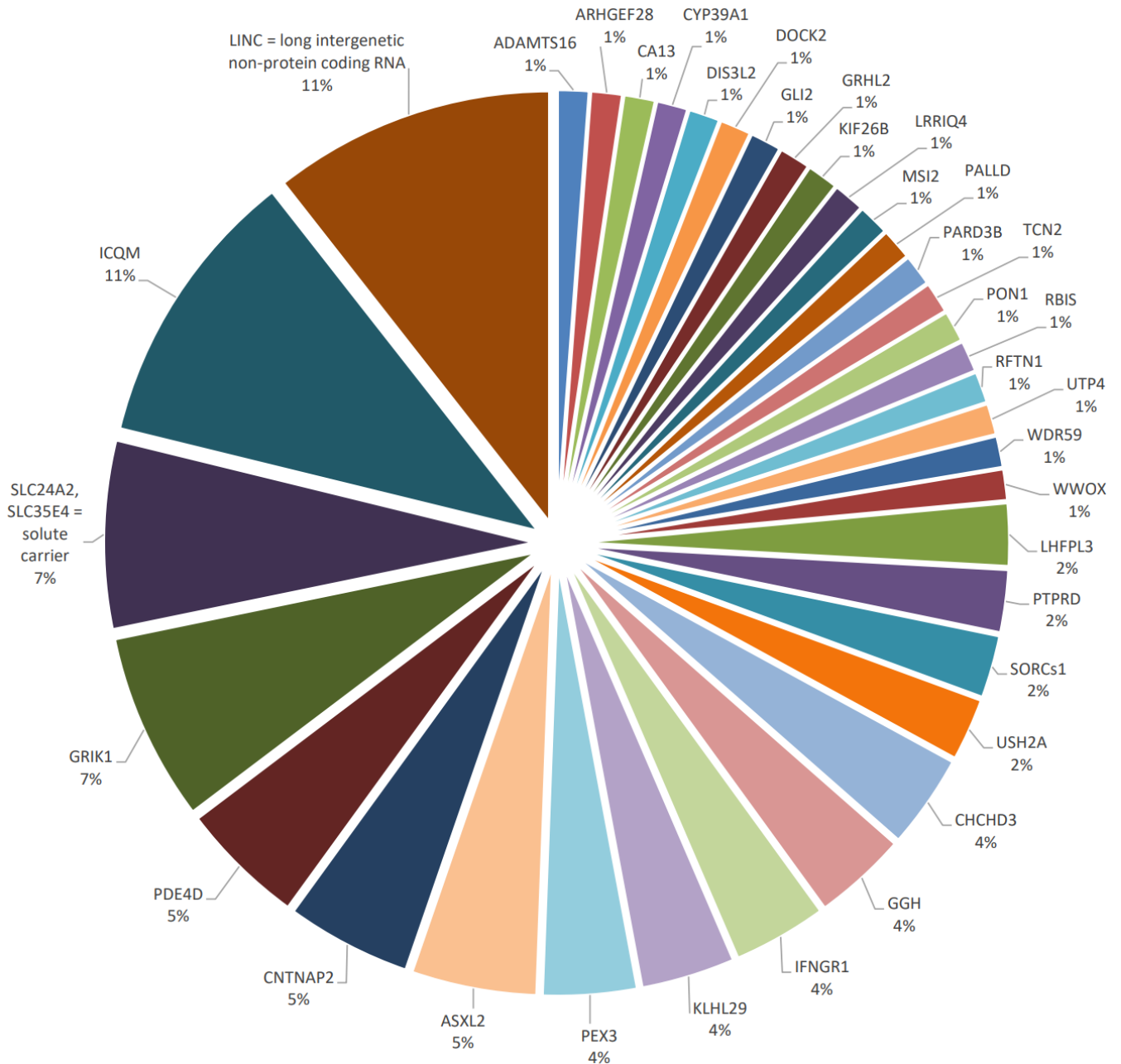


Abbildung 5: Häufigkeitsverteilung identifizierbarer SNPs (55% aller SNPs mit p-Werten $<10e^{-06}$)

Die SNPs auf den Genen LINC und ICQM wiesen allesamt nur p- Werte $<10e^{-06}$ auf, weswegen diese im folgenden Kapitel 7.3.1 keinen Eingang in die Tabelle 9 gefunden haben. Dort wurde sich auf die SNPs mit p-Werten $<10e^{-07}$ beschränkt.

Bei Kumulation der Werte der Subgruppenanalyse nach RBN-Historie, so finden sich n=57 (33,5%) SNP-Treffer bei RBNneg-OCTs, bei der Gruppe der RBNpos-OCTs wurden n=49 (28,8%) Treffer gefunden und entsprechend zusätzlich n=64 (37,6%) SNPs bei Analyse aller Daten unabhängig von stattgehabten Opticusneuritiden. Diese Verteilung entspricht grob einer Drittelung der Werte.

	ALL (%)	RBNpos (%)	RBNneg (%)
Anzahl SNPs mit p-Wert $<10e^{-06}$	64 (37,6%)	49 (28,8%)	57 (33,5%)

Tabelle 7: SNP-Verteilung nach RBN-Historie

Durch Differenzierung der gefundenen SNPs je nach per OCT gemessener Retinaschicht unabhängig von der RBN-Historie wird die Verteilung der in Tabelle 8 dargestellt: SNP-Treffer

Schichten	OCT_b (%)	OCT_fu (%)
TRV	15 (8,8%)	11 (6,5%)
RNFL	24 (14,1%)	20 (11,7%)
GCL	21 (12,4%)	11 (6,5%)
IPL	22 (12,9%)	10 (5,9%)
GCIPL	23 (13,5%)	13 (7,6%)

Tabelle 8: Anzahl der SNPs nach OCT-Schicht (baseline vs. follow-up)

In der Literatur werden die Schichten GCL und IPL meist gemeinsam betrachtet. Aus diesem Grund ist eine PLINK-Analyse für die Schichtkombination durchgeführt worden. Zum Teil sind unterschiedliche SNPs in den verschiedenen OCT-Schichten GCL und IPL mit unterschiedlichen p-Werten doppelt (siehe Tabelle 9, z.B. rs28361472, rs218123 und rs2025458) vertreten. Im Bezug auf die Auswertung der OCT-Daten, in der die Schicht GCIPL Eingang findet, werden alle verfügbaren SNP-Daten aus allen drei Subanalysen hiermit korreliert.

7.19.1 Beschreibung der SNP-Haupttreffer

Tabellarisch werden nachfolgend die 19 SNPs mit p-Werten $<10e^{-07}$ beschrieben, dazu die Position, das Chromosom (CHR), die MAF und der p-Wert, der nach genomic consequence in der PLINK-Analyse berechnet wurde. Alle Funktionen und „Charaktereigenschaften“ der SNPs wurden der SNP-Datenbank des NIH entnommen. Die MAF wurde nach der HapMap-Analyse angegeben, nach deren Protokoll auch die ursprüngliche GWAS durchgeführt worden war. Ausgewählte Gene in der SNP-Umgebung werden in Klammern angegeben. Des Weiteren wird die Retina-Schicht angegeben, der OCT-Messzeitpunkt (b: baseline, fu: follow-up) sowie die Patientensubgruppe.

Wie bereits erwähnt wiesen den Genen nur ⁶ auf und werden deswegen nachfolgend nicht mit aufgeführt, omit suggestiven p-Werten

SNP	CHR	Position [kbp]	Gen	Funktion	Allel	MAF (HapMap)	p-Wert	Messzeitpunkt und Subgruppe, OCT-Schicht
rs2243468	21	29594472	GRIK1	Intron	T>C	0.3619	2.848e-09	RBNpos_fu RNFL
rs2243508	21	29594843	GRIK1	Intron	T>A,C	0.178	2.725e-07	RBNpos_fu RNFL
rs2832407	21	29595188	GRIK1	Intron	C>A,G,T	0.3599	2.725e-07	RBNpos_fu RNFL
rs2243474	21	29594693	GRIK1	Intron	C>G,T	0.486275 (alfa)	2.725e-07	RBNpos_fu RNFL
rs978164	6	164751626	None		G>A,C	0.374	2.814e-07	RBNneg_fu TRV
rs7994907	13	102434212	None (FGF14)		T>A,C,G	0.494	3.838e-07	RBNpos_fu RNFL
rs868389	6	164694232	None		G>A,T	0.2997	4.108e-07	RBNneg_fu TRV
rs7176450	15	24787630	None (SNRPN)		C>T	0.2527	7.282e-07	RBNpos_b GCIPL
rs7176450	15	24787630	None (SNRPN)		C>T	0.2527	9.793e-07	RBNpos_b IPL
rs218123	7	31440043	None		G>A	0.2767	2.213e-07	RBNneg_b GCIPL
rs2025458	10	87645841	None		G>C	0.118	2.294e-07	RBNneg_fu

(PAPSS2)						GCL		
rs2025458						6.652e-07	RBNneg_fu	GCIPL
rs28361472	15	55121010	None	A>G	0.08100 (alfa)	2.317e-07	RBNneg_b	GCIPL
rs28361472						2.799e-07	RBNneg_b	IPL
rs28361472						3.583e-07	RBNneg_b	GCL
rs218123	7	31440043	None	G>A	0.2767	3.044e-07	RBNneg_b	GCL
rs218123						3.187e-07	RBNneg_b	IPL
rs12411709	10	87652036	None (PAPSS2)	C>T	0.09980 (alfa)	8.814e-07	RBNneg_fu	GCL
rs4820891	22	30636322	SLC35E4	5 Prime UTR Variant	C>G,T	0.3536	9.112e-07	ALL_fu RNFL

Tabelle 9: SNPs mit p-Werten $<10e^{-07}$

Auffallend ist, dass nur n=8 (42,1 %) der SNPs in der Baseline-Gruppe gefunden werden konnten. Bemerkenswert ist des Weiteren, dass die Mehrheit der SNPs in der RBN-naiven Gruppe signifikant wurde. Die durchschnittliche MAF beträgt 0.23236. Am häufigsten ist Chromosom 4 mit n=4 Treffern vertreten.

8. Diskussion

8.1 Diskussion der SNP-Haupttreffer

Das GRIK1-Intron codiert für einen ionotropen Glutamat-Rezeptor vom Kainat-Typ, Subunit 1, der eine weit verbreitete Rezeptorgattung im ZNS darstellt und prä- sowie postsynaptisch exprimiert wird (81). Besonders vertreten sind diese Rezeptoren im Bereich des Hippocampus sowie in den Basalganglien. Hier werden diese Rezeptoren als Angriffspunkte neuer Pharmakotherapien diskutiert, die vor allem bei Bewegungsstörungen zum Einsatz kommen sollen, weil die Kainat-Rezeptoren direkten Einfluss auf die intrinsische Zellaktivität haben (81). In der Literatur finden Veränderungen in der Glutamat-Rezeptor-Ausstattung vom Kainat-Typ verschiedene Erwähnungen bei unterschiedlichsten Krankheitsbildern, unter anderem im Zusammenhang mit ADHS (Aufmerksamkeits-Defizit-Hyperaktivitäts-Störung), beim kolorektalen Karzinom oder im Zusammenhang mit schweren Depressionen, Schizophrenie und erhöhter Suizidalität (81–84). Bei ADHS konnte eine signifikant herunterregulierte GRIK1-Expression nachgewiesen werden (83), wohingegen die Hirnregionen eine höhere Expression aufweisen (sollten), die für Lernen und Gedächtnis relevant sind. Auch beim kolorektalen Karzinom war die GRIK1-Expression signifikant herunterreguliert. Diese Erkenntnis und die Korrelation zwischen Ausmaß der Downregulation mit Lymphknotenstatus und Tumorgröße unterstreicht laut Ren et al. den Einfluss von GRIK1 als Tumorsuppressor (84).

In unserer Studie wurden vier SNPs (rs2243468, rs2243508, rs2832407, rs2243474) mit p-Werten $<10e^{-07}$ im Bereich dieses Gens ermittelt.

Das SNP mit dem Identifier rs2832407 wird in 14 Publikationen zitiert, beispielsweise in zwei Publikationen aus dem Jahr 2022 zu den Themen Opioid- und Alkoholabhängigkeit (85, 86). Unter anderem konnten dem SNP rs2832407 moderierende Effekte beim Einsatz von Topiramaten bei Alkoholabhängigkeit nachgewiesen werden, sodass die Menge getrunkenen Alkohols unter Therapie geringer war. In einer zweiten randomisiert-kontrollierten Studie konnten diese Therapieeffekte jedoch nicht erneut bestätigt werden (85). Der Einfluss der SNP-Expression auf die Wirkung von Topiramaten scheint im Bereich der Pharmakogenetik zu liegen (85). Weitere Studienergebnisse bleiben abzuwarten, ob die Expression von rs2832407 auch andere Medikamentenwirkungen

positiv beeinflussen kann. Bei einer Opioidabhängigkeit scheint die dopaminerge Homöostase ebenfalls SNP-abhängig zu sein (86). Daraus lässt sich ableiten, dass unterschiedliche Risiken zur Entwicklung einer Abhängigkeit selbst vom Vorhandensein des entsprechenden SNPs beeinflusst werden (86).

Andere SNPs, die nicht genau auf einem Gen liegen, befinden sich teilweise in der Nähe anderer Gene: Zum Beispiel befindet sich rs7994907 nahe dem FGF14-Gen, das einen Fibroblasten-Wachstumsfaktor codiert. In einer kanadischen Studie konnte für eine Expansion eines GAA-Nukleotid-Triplets >250 Wiederholungen eine Assoziation zur autosomal dominant vererbten late-onset zerebellären Ataxie nachgewiesen werden (87, 88). In einer anderen Studie konnten die Autoren FGF14-AS2, einer Antisense-long-coding-RNA zu FGF14, eine supprimierende Wirkung in der ossären Metastasierung bei Brustkrebs nachweisen. Die genaue Wirkung von FGF14 besteht darin, die Translation von RUNX2 zu supprimieren, dadurch diverse Zwischenschritte der Genregulation zu inhibieren und schlussendlich die Transkription von RANKL, dem Osteoklasten-stimulierenden Protein, zu vermindern (89).

rs7176450 und rs7176450 liegen in der Nähe des SNRPN-Gens, das im Primaten-Tiermodell die axonale Regeneration retinaler Ganglionzellen reguliert (90). Dieses Gen codiert das Neuronen-spezifische humane Ribonukleoprotein N. Bei einer Up-Regulation konnte ein Abfall neuroregeneratorischer Fähigkeiten beobachtet werden, wohingegen durch den SNPRN-Knockout ex vivo die Regenerationsfähigkeit der Axone reaktiviert werden konnte (90). Bei Säugetieren, so die Autoren, gehe diese Zellregenerationsfähigkeit im Laufe des Aufwachsens verloren (90). Damit eröffnet das Neuronen-spezifische humane Ribonukleoprotein N (90) vielfältige Forschungsansätze für alle Erkrankungen, die mit axonalen Schäden verbunden sind, so unter anderem auch die Multiple Sklerose.

Das auf Chromosom 22 gelegene SNP rs4820891 liegt auf dem SLC35E4-Gen bzw. auf der 5' Prime untranslated variant. Diese RNA-Regionen sind direkt upstream der Initiationscodons auf der mRNA gelegen, regulieren damit maßgeblich die Translation und so auch Proteinexpression (91). Obwohl für andere SNPs in der ClinVar-Datenbank weitere Informationen hinterlegt sind, findet sich bei dem hiesigen SNP kein Eintrag. Vielfältige Effekte sind anzunehmen, da die Initiationscodons häufig diverse Gene epigenetisch beeinflussen. Zwei SNPs – rs2025458 und rs12411709 – finden sich in Nachbarschaft zum PAPSS2-Gen auf Chromosom 10, das eine 3'-Phosphoadenosin-5'-Phosphosulfat-Synthase 2

codiert. Damit verwandte Zellsignalwege sind Peptidkettenverlängerungen sowie die Sulfonierung kleiner Moleküle im Zytosol. Das Sulfonieren endogener Lipide, Proteine und Kohlenhydrate sowie exogener Xenobiotika und Medikamente unter der Verwendung von ATP (Adenosintriphosphat) ist ein alltäglicher zellinterner Prozess, der von zwei PAPS-Synthetasen durchgeführt wird und für etliche Stoffwechselwege, Zell-Zell-Interaktionen oder auch Zellregeneration relevant ist. Der vielfältige Einfluss bei einem Defekt oder einer Modulation dieser Enzyme kann in diesem Falle wenn überhaupt nur annähernd abgeschätzt werden.

Ein Defekt im Bereich dieser Gene löst den pakistanischen Typ der spondyloepimetaphysären Dysplasie oder auch eine Juvenile Polyposis coli sowie Harmatome aus, wie in der NIH-Datenbank des NCBI zu lesen ist³.

8.2 GWAS

Der Vorteil von GWAS ist der Vergleich gesamt-genomischer Daten auf Basis einer breiten Bevölkerungsgruppe mit einer Vergleichsgruppe. Diese stellt in unserem Fall das Patientenkollektiv nach voran beschriebener Auswahl an MS-Patienten der UM Mainz dar. Demnach entspricht die Auswahl der Patienten objektiven Kriterien, wie Diagnosestellung und genetischer Herkunft, jedoch auch zufälligen Kriterien wie dem Wohnort und der Klinikzugehörigkeit, die statistisch nicht beeinflussbar sind.

Im Rahmen der GWAS-Analyse kann eine durchschnittliche Häufigkeit sämtlicher Gene und SNPs angegeben werden, anhand derer in unserer Studie das Patientenkollektiv mit dem Durchschnitt der Allgemeinheit verglichen werden kann. Von der Allgemeinheit wurden in vorliegendem Fall jedoch keine OCT-Daten erhoben, sondern sich auf Referenzwerte dieser Daten in der Literatur berufen.

Schlussendlich erfolgte die Analyse der Daten nach Folgendem Prinzip: Die OCT-Daten des Patientenkollektivs wurden analysiert und auf Veränderungen im longitudinalen Verlauf innerhalb des Kollektivs hin ausgewertet. Zeitgleich wurden die genetischen Daten dieses Kollektivs mit denen der Allgemeinbevölkerung verglichen. Im Anschluss wurden die signifikant vom Gesamtkollektiv abweichenden SNPs in der Literatur recherchiert, ob deren

³ (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/9060#gene-expression>, Zugriff am 01.05.2023, 14:29

Vorkommen in der Patientengruppe die gemessenen Veränderungen der OCT-Werte im Verlauf erklären können. Es fand keine Korrelation persönlicher genetischer Daten zu entsprechenden individuellen OCT-Messwerten statt. Dies kann in einer zukünftigen Studie weiter verfeinerte Auswertungen ermöglichen, um noch präzisere Aussagen treffen zu können.

Die in unserer Studie im Vergleich zur Allgemeinbevölkerung abweichenden SNPs haben bis dato keinen bekannten Einfluss auf MS oder sind noch nicht in diesem Zusammenhang beschrieben. Die verwendete Datenbank zur Einordnung dieser signifikanten bzw. suggestiven SNPs stellt die der National Library of Medicine des National Center for Biotechnology Information des NIH dar.

Bei der Einordnung der SNPs ist es von Bedeutung, dass die Funktionen und Interaktionen von Promotoren untereinander weiterhin Gegenstand aktueller und zukünftiger Forschung sind. Daher sind diesbezüglich nur Deutungen bzw. Erklärungsversuche möglich. Nichtsdestotrotz bilden solche Ergebnisse häufig die Ausgangspunkte neuer Forschungsansätze.

Generell ist die Zuordnung von SNP zu Pathophysiologie durch die Heterogenität der Erkrankung erschwert. Die Ausprägung der MS ist durch den unterschiedlichen individuellen Ort der Läsionen zerebral bzw. zerebellär sowie durch persönliche Lern- und Kompensationsmechanismen interindividuell sehr verschieden. Bei Studien, die genetische Hinweise zum verbesserten Verständnis der entsprechenden Pathophysiologie finden wollen, stellt diese Heterogenität hierdurch eine Limitation dar. Gleichzeitig macht genau dieser Aspekt die Krankheit in ihrer klinischen Ausprägung hierdurch unter anderem interessant. Herausfordernd ist zusätzlich die Ausprägung der Krankheit in unterschiedlichen „Phänotypen“ (RRMS/SPMS/PPMS) sowie der teils fließende Übergang zwischen den einzelnen Ausprägungsformen der Erkrankung. Ein spannender Ausblick für die Zukunft ist so sicher auch die Differenzierung innerhalb der Genetik, ob anhand der genetischen Ausstattung unterschieden werden kann, welcher Erkrankungsphänotyp vorliegt und ob, wann, auch eine Transformation z.B. einer RRMS in eine SPMS stattfindet. Hieraus könnten sich neue pharmakogenetische Forschungsansätze ergeben, um das Transitionsrisiko zu senken oder zumindest den Zeitpunkt hinauszuschieben.

8.3 Patientenkollektiv

Aufgrund der geringen Fallzahl sind bei unserer Studie nicht alle numerischen Ergebnisse zu den in der Literatur beschriebenen durchschnittlichen Verteilungen passend. Als Beispiele hierfür sind unter anderem das Geschlechterverhältnis bei der Diagnose MS 1,67 : 1 in unserem Kollektiv im Vergleich zum weltweiten statistischen Schnitt von 2 : 1 zu nennen. Des Weiteren ist bei uns nur einer von drei Betroffenen einer PPMS männlich, was ebenfalls nicht der in der Literatur beschriebenen Verteilung entspricht.

Belastbarere Ergebnisse könnten durch eine Ausweitung der Studie mit einer größeren Fallzahl gewonnen werden. Die statistische Power steigt mit der Anzahl der Studienteilnehmer. Limitierend ist hierfür im vorliegenden Fall die Beschränkung in der Auswahl der Patienten auf das Kollektiv der UM Mainz. Gerade in Bezug auf genetische Daten bieten sich beispielsweise multizentrische Studiendesigns an, da diese eine höhere Power aufweisen.

8.4 Diskussion der OCT-Daten

Die automatisierte Auswertung der OCT-Messungen erfolgte anhand einer eigens durch einen Informatiker der UM programmierten Auswertungssoftware, die auf das verwendete Messgerät von Heidelberg Ingeneering aufgespielt wurde. Im Gegensatz zur geräteinternen Software sind durch den programmierten Algorithmus hierdurch andere numerische Werte berechnet worden. Dies erschwert die direkte Vergleichbarkeit unserer numerischen Daten mit denen anderer Studien, bei denen die geräteinterne Software desselben Geräts oder sogar eine dritte Software verwendet wurden. Die statistische Signifikanz der Werte wird hingegen nicht beeinflusst.

Kritisch zu betrachten ist bei unseren Werten, dass sie über alle Schichten hinweg kleinere numerische Werte im Vergleich zu durch andere Auswertungssoftwares gemessene Werten aufweisen. Dies erschwert etwas die Betrachtung kleinerer Unterschiede im longitudinalen Verlauf, da sich diese Unterschiede schnell im Rahmen der Messgenauigkeit befinden. Dies kann u.a. als limitierender Faktor angesehen werden. Die Vergleichbarkeit der internen Daten steigt durch die Verwendung desselben Geräts bei allen Messungen.

Generell war auffallend, dass die für das TRV gemessenen Werte allesamt geringer als für ein allgemeines Kollektiv in der Literatur ausfielen. Das kann nicht mit Sicherheit beweisend auf die Gemeinsamkeit des Kollektivs, an MS erkrankt zu sein, zurückgeführt werden. Dennoch scheint dies die naheliegendste logische Erklärung zu sein. Auch pathophysiologisch ist die TRV-Reduktion durch die Nervenfaseratrophie erklärbar. Unbestritten ist, dass sowohl bei gesunden Personen als auch vor allem bei Patienten mit MS im Laufe des Lebens die Dicke der Retina abnimmt.

Die Abweichung bei der Berechnung von TRV-Unterschieden innerhalb der Subgruppe RBNneg bewegt sich mit umgerechnet $0,01 \text{ mm}^3$ hierbei im Rahmen der Messgenauigkeit. Dass bei den RBNpos eine höhere Abweichung vorliegt, kann dadurch erklärt werden, dass durch die Entzündung von retinalen Nervenfasern bzw. dem Sehnerv es zu einer Ödembildung innerhalb der Netzhaut kommt, was in einem höheren TRV abgebildet wird. Alle Patienten, die jemals eine RBN hatten, wurden der Gruppe RBNpos zugeteilt, unabhängig davon, zu welchem Zeitpunkt die RBN stattgefunden hatte. Entsprechende Zeitpunkte sind retrospektiv nicht eindeutig festzustellen und von der Mitarbeit, Motivation und dem Erinnerungsvermögen der Patienten abhängig.

Diverse mögliche Quellen für inhaltliche Fehler und statistische Unschärfe liegen bekanntermaßen in einer entsprechenden Abhängigkeit in der Informationsgewinnung von Patienten. Messinstrumente, deren Messergebnisse im Bereich der Messgenauigkeit liegen, eignen nicht zum präzisen Monitoring. Eine Entscheidung z.B. bzgl. Therapiefortsetzung oder -Umstellung abhängig von entsprechend fehleranfälligen Messmethoden wäre geradezu fahrlässig. Auch wenn die OCT strukturelle Vorteile mit sich bringt, sollte zum aktuellen Zeitpunkt auf die präziseren Messtechniken von MRT beim Monitoring zurückgegriffen werden. Die Hypothese, per OCT könnte nicht-invasives, kostengünstiges und schnell durchzuführendes Monitoring langfristig durchgeführt werden, kann an dieser Stelle nicht angenommen werden.

Durch genaue Anamnese wurde versucht, die Messzeitpunkte nicht während einer aktiven RBN vorzunehmen. Jedoch ist nicht auszuschließen, dass trotz negativer Anamnese eine beginnende oder vom Patienten unbemerkte RBN vorlag. MS-Patienten sind aufgrund ihrer Erkrankung nicht immer in der Lage, akute Verschlechterungen von einer chronischen Progredienz zu unterscheiden, sodass sich hierdurch Fehler in die Statistik einschleichen konnten.muss

Die Differenz der TRV-Werte von baseline sowie follow-up waren gemäß dem Shapiro-Wilk-Test nicht normalverteilt ($p=0.001$). Da die Stichprobengröße jedoch weitaus größer als 30 ist, kann von einer Normalverteilung ausgegangen werden⁴. Des Weiteren ist der gepaarte t-Test relativ robust gegenüber Verletzungen der Normalverteilungsannahme, sodass er durchgeführt werden konnte.

⁴ (Stone, E. R. (2010). t Test, Paired Samples. In N. J. Salkind (Ed.), *Encyclopedia of research design* (pp. 1560–1565

9. Zusammenfassung

Dieser Arbeit liegt die Hypothese zugrunde, dass bei MS Patienten im Rahmen der Erkrankung die Retina stärker als bei der Normalbevölkerung atrophiert. Ziel der Arbeit ist es, hierfür eine Erklärung in der genetischen Ausstattung dieses Patientenkollektivs im Vergleich zur Genetik der Allgemeinbevölkerung zu finden. Referenzwerte für den Vergleich des Genoms bietet die HapMap-Datenbank, in der seit 2002 genetische Daten in Form von SNPs gespeichert werden. So stellt diese Datenbank die Grundlage vieler Genom-weiter Assoziationsstudien dar. Als Sekundärhypothese sollte in dieser Studie erforscht werden, ob via OCT ein präzises, nicht-invasives Monitoring der Krankheitsaktivität durch wiederholte Messungen der Retinadicke möglich sein könnte.

Für die Studie konnten 96 Personen rekrutiert werden, die sämtlichen Einschlusskriterien entsprachen. Den Patienten wurde Blut abgenommen, um daraus DNA zu extrahieren, und es wurden mehrere Messungen der Dicke des Augenhintergrundes via OCT durchgeführt, um die Retinadicke beurteilen zu können. Es fand keine Zuordnung von genetischen Daten zu entsprechend individuell gemessenen OCT-Werten statt, es erfolgte jedoch eine Gruppierung der Patienten in Gruppen mit und ohne stattgehabte RBN. Dies geschah unter der Prämisse, dass diese Erkrankung von hohem Stellenwert für sowohl die Diagnostik der MS als auch die Messung der Retinadicke ist.

Im Rahmen der Auswertung der genetischen Daten wurde eine ausführliche Analyse mittels PLINK durchgeführt, die im Anschluss noch durch multiple statistische Tests ergänzt wurde. Hierdurch konnten 170 SNPs identifiziert werden, die zumindest suggestiv für eine genomweite Signifikanz sind. In der NIH Datenbank der National Library of Medicine des National Center for Biotechnology Information konnten für 19 dieser SNPs mit p-Werten $<10e^{-07}$ genetische Informationen zur Lage in Bezug auf codierende Genabschnitte oder Promotoren gefunden werden.

Keiner dieser SNPs gibt eine direkte Erklärung für die beobachtete stärkere Atrophie der Retina bei MS-Patienten in früherem Alter als im Vergleich zur Normalbevölkerung. Unsere Hypothese kann daher nicht eindeutig bestätigt bzw. begründet werden.

Beispielsweise konnte jedoch ein ionotroper Glutamat-Rezeptor identifiziert werden, der in unterschiedlichen Zusammenhängen mit anderen neurologischen Erkrankungen oder auch

zellulärer Dysregulation im Rahmen der Karzinogenese steht. Ein anderer signifikanter SNP mit der Bezeichnung rs2832407 wurde bereits in anderen Studien im Zusammenhang mit veränderter Pharmakogenetik und verbesserten Therapieeffekten von Medikamenten beschrieben. Ob diese genetische Ausstattung auch zu einer besseren Wirkung von im Rahmen der MS-Therapie eingesetzten Medikamenten führt, kann ein interessanter neuer Ansatzpunkt für zukünftige Forschungsprojekte darstellen.

Bis heute ist die genaue Pathogenese der MS durch ihre Komplexität nicht vollständig verstanden. Im Rahmen unserer Studie wurden jedoch zwei SNPs in der Nachbarschaft zu einer an vielen Zellsignalwegen beteiligten 3'-Phosphoadenosin-5'-Phosphosulfat-Synthetase 2 gefunden. Da diese Enzyme bei diversen zellinternen Prozessen permanent beteiligt sind, kann eine Veränderung dieser Proteine kaum ansatzweise in der vollständigen Auswirkung erahnt werden. So kann eine Assoziation zur Pathogenese einer komplexen Erkrankung wie MS vermutet werden.

In vorherigen Studien konnte bereits eine moderate Korrelation zwischen RNFL-Ausdünnung und Zunahme des EDSS nachgewiesen werden. Des Weiteren konnten in anderen Studien bereits Patienten mit stattgehabter RBN von Patienten mit einer negativen RBN-Historie anhand veränderter Retinaschichtdicken, nämlich signifikant verminderten Werten für TRV, RNFL und GCIPL, differenziert werden.

Auch in unserem Patientenkollektiv zeigte sich, dass bei der Baseline-Untersuchung das TRV in der Gruppe der RBNneg-Patienten $0,09 \text{ mm}^3$ größer war als bei den Patienten mit stattgehabter RBN. Bei der Follow-up-Untersuchung wies jedoch die Gruppe der RBNpos-Patienten höhere Werte für das TRV auf. Dies erklärten wir unter dem Gesichtspunkt, dass im Rahmen einer aktiven RBN eine ödematöse Schwellung der Retina bzw. des Nervus opticus auftritt, was zu einer temporären Erhöhung der Werte für das TRV führt. Ob eine Verlängerung des Beobachtungszeitraums zu anderen Ergebnissen geführt hätte, kann nicht sicher beantwortet werden.

Passend zu den in der Literatur angegebenen Werten, verschlechterte sich auch in unserer Patientengruppe der EDSS über den Verlauf der Zeit im Mittelwert um 0,63 Punkte.

Im Rahmen der Auswertung der OCT-Messwerte ist kritisch zu betrachten, dass die verwendete Software zur Auswertung der Messdaten und Transformation derselben in Zahlen von der in den meisten Studien verwendeten Software abweicht, woraus sich andere

numerische Werte ergeben. Dies erschwert den direkten Vergleich, jedoch wird die statistische Signifikanz nicht beeinflusst. Limitierend in Bezug auf die Messungen per OCT ist sicherlich auch die Anamnesefähigkeit der Patienten, ob sich hinsichtlich einer stattgehabten RBN korrekt erinnert wird, ob diese ggf. subklinisch ablief oder durch fehlenden Arztkontakt unerkannt blieb. Gegenüber Confoundern dieser Art ist die Untersuchung per cMRT robuster als das OCT. Es ist daher zum aktuellen Zeitpunkt nicht zu erwarten, dass die cMRT zur klinischen Verlaufskontrolle in nächster Zeit durch Untersuchungen per OCT abgelöst werden wird. Auch die Hypothese, OCT-Messungen könnten zum Follow-up als Monitoring-Instrument unter Therapie fungieren, musste abgelehnt werden, da sich die Messergebnisse teils im Bereich der Messgenauigkeit befanden. Ergänzende OCT-Messungen in Korrelation mit klinischer Untersuchung sowie Bildgebung per cMRT können jedoch sicherlich weiter interessante Einblicke in die Dynamik dieser vielfältigen Erkrankung bieten.

10. Literaturverzeichnis

Literature Cited

1. Aktas O, Wattjes MP, Stangel M, Hartung H-P. Diagnosis of multiple sclerosis: revision of the McDonald criteria 2017. *Nervenarzt* 2018; 89(12):1344–54.
2. Deisenhammer F, Zetterberg H, Fitzner B, Zettl UK. The Cerebrospinal Fluid in Multiple Sclerosis. *Front Immunol* 2019; 10:726.
3. Filippi M, Rocca MA, Ciccarelli O, Stefano N de, Evangelou N, Kappos L et al. MRI criteria for the diagnosis of multiple sclerosis: MAGNIMS consensus guidelines. *Lancet Neurol* 2016; 15(3):292–303.
4. Fitzgerald KC, Kim K, Smith MD, Aston SA, Fioravante N, Rothman AM et al. Early complement genes are associated with visual system degeneration in multiple sclerosis. *Brain* 2019; 142(9):2722–36.
5. Zeppieri M, Marsili S, Enaholo ES, Shuaibu AO, Uwagboe N, Salati C et al. Optical Coherence Tomography (OCT): A Brief Look at the Uses and Technological Evolution of Ophthalmology. *Medicina (Kaunas)* 2023; 59(12).
6. Margeta MA, Yin Z, Madore C, Pitts KM, Letcher SM, Tang J et al. Apolipoprotein E4 impairs the response of neurodegenerative retinal microglia and prevents neuronal loss in glaucoma. *Immunity* 2022; 55(9):1627-1644.e7.
7. Wong YH, Wong SH, Wong XT, Yap QY, Yip KY, Wong LZ et al. Genetic associated complications of type 2 diabetes mellitus. *Panminerva Med* 2022; 64(2):274–88.
8. Bouma BE, Boer JF de, Huang D, Jang I-K, Yonetsu T, Leggett CL et al. Optical coherence tomography. *Nature Reviews Methods Primers* 2022; 2(1):79.
9. Dobson R, Giovannoni G. Multiple sclerosis - a review. *Eur J Neurol* 2019; 26(1):27–40.
10. Walton C, King R, Rechtman L, Kaye W, Leray E, Marrie RA et al. Rising prevalence of multiple sclerosis worldwide: Insights from the Atlas of MS, third edition. *Mult Scler* 2020; 26(14):1816–21.
11. Dzmityr. 030050_LL_Multiple_Sklerose_2021 [cited 2022 Mar 6]. Available from: URL: https://dgn.org/wp-content/uploads/2021/04/030050_LL_Multiple_Sklerose_2021.pdf.

12. Yamout BI, Alroughani R. Multiple Sclerosis. *Semin Neurol* 2018; 38(2):212–25.
13. Multiple Sklerose: Zahl der Patienten steigt erheblich. Springer Medizin Verlag GmbH, Ärzte Zeitung 2017 Dec 8 [cited 2022 Feb 25]. Available from: URL: <https://www.aerztezeitung.de/Medizin/Zahl-der-Patienten-steigt-erheblich-299585.html>.
14. Doshi A, Chataway J. Multiple sclerosis, a treatable disease. *Clin Med (Lond)* 2016; 16(Suppl 6):s53-s59.
15. Kalincik T. Multiple Sclerosis Relapses: Epidemiology, Outcomes and Management. A Systematic Review. *Neuroepidemiology* 2015; 44(4):199–214.
16. Thompson AJ, Banwell BL, Barkhof F, Carroll WM, Coetzee T, Comi G et al. Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria. *Lancet Neurol* 2018; 17(2):162–73.
17. Sandi D, Friczka-Nagy Z, Bencsik K, Vécsei L. Neurodegeneration in Multiple Sclerosis: Symptoms of Silent Progression, Biomarkers and Neuroprotective Therapy-Kynurenines Are Important Players. *Molecules* 2021; 26(11).
18. Jacobs BM, Peter M, Giovannoni G, Noyce AJ, Morris HR, Dobson R. Towards a global view of multiple sclerosis genetics. *Nat Rev Neurol* 2022; 18(10):613–23.
19. Jokubaitis VG, Ibrahim O, Stankovich J, Kleinova P, Matesanz F, Hui D et al. Not all roads lead to the immune system: The Genetic Basis of Multiple Sclerosis Severity Implicates Central Nervous System and Mitochondrial Involvement. *medRxiv* 2022:2022.02.04.22270362.
20. Abrahamyan S, Eberspächer B, Hoshi M-M, Aly L, Luessi F, Groppa S et al. Complete Epstein-Barr virus seropositivity in a large cohort of patients with early multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2020; 91(7):681–6.
21. Schneider-Hohendorf T, Gerdes LA, Pignolet B, Gittelman R, Ostkamp P, Rubelt F et al. Broader Epstein-Barr virus-specific T cell receptor repertoire in patients with multiple sclerosis. *J Exp Med* 2022; 219(11).
22. Baecher-Allan C, Kaskow BJ, Weiner HL. Multiple Sclerosis: Mechanisms and Immunotherapy. *Neuron* 2018; 97(4):742–68.

23. Cencioni MT, Mattosio M, Magliozzi R, Bar-Or A, Muraro PA. B cells in multiple sclerosis - from targeted depletion to immune reconstitution therapies. *Nat Rev Neurol* 2021; 17(7):399–414.
24. Munk Nielsen N, Corn G, Frisch M, Stenager E, Koch-Henriksen N, Wohlfahrt J et al. Multiple sclerosis among first- and second-generation immigrants in Denmark: a population-based cohort study. *Brain* 2019; 142(6):1587–97.
25. Olsson T, Barcellos LF, Alfredsson L. Interactions between genetic, lifestyle and environmental risk factors for multiple sclerosis. *Nat Rev Neurol* 2017; 13(1):25–36.
26. Filippi M, Rocca MA, Ciccarelli O, Stefano N de, Evangelou N, Kappos L et al. MRI criteria for the diagnosis of multiple sclerosis: MAGNIMS consensus guidelines. *Lancet Neurol* 2016; 15(3):292–303. Available from: URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1474442215003932>.
27. Wildner P, Stasiotek M, Matysiak M. Differential diagnosis of multiple sclerosis and other inflammatory CNS diseases. *Mult Scler Relat Disord* 2020; 37:101452.
28. Le Page E, Edan G. Induction or escalation therapy for patients with multiple sclerosis? *Rev Neurol (Paris)* 2018; 174(6):449–57.
29. Ziemssen T, Derfuss T, Stefano N de, Giovannoni G, Palavra F, Tomic D et al. Optimizing treatment success in multiple sclerosis. *J Neurol* 2016; 263(6):1053–65.
30. Soelberg Sorensen P, Giovannoni G, Montalban X, Thalheim C, Zaratin P, Comi G. The Multiple Sclerosis Care Unit. *Mult Scler* 2019; 25(5):627–36.
31. Kim JH, editor. *Genome Data Analysis*. Singapore: Springer Singapore; 2019.
32. Meyer-Moock S, Feng Y-S, Maeurer M, Dippel F-W, Kohlmann T. Systematic literature review and validity evaluation of the Expanded Disability Status Scale (EDSS) and the Multiple Sclerosis Functional Composite (MSFC) in patients with multiple sclerosis. *BMC Neurol* 2014; 14:58.
33. Humangenetik (Vorklinik) - AMBOSS; 2022 [cited 2022 Mar 6]. Available from: URL: <https://next.amboss.com/de/article/DK01iS?q=genetik#Z1caa222b6c9103ecfbd3dff631f006ad>.

34. Kurtzke JF. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). *Neurology* 1983; 33(11):1444–52.
35. Tintore M, Rovira À, Río J, Otero-Romero S, Arrambide G, Tur C et al. Defining high, medium and low impact prognostic factors for developing multiple sclerosis. *Brain* 2015; 138(Pt 7):1863–74.
36. Simpson S, JR, Taylor B, Blizzard L, Ponsonby A-L, Pittas F, Tremlett H et al. Higher 25-hydroxyvitamin D is associated with lower relapse risk in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2010; 68(2):193–203.
37. Aufbau von DNA und RNA - AMBOSS; 2022 [cited 2022 Mar 6]. Available from: URL: <https://next.amboss.com/de/article/RK0ITS#Ze8c710d82556371b5e9117ebba824641>.
38. Komar AA, editor. *Single Nucleotide Polymorphisms: Methods and Protocols*. 2nd ed. Totowa, NJ: Humana Press; 2009. (SpringerLink Bücher; vol 578).
39. Shastry BS. SNPs: Impact on Gene Function and Phenotype. In: Komar AA, editor. *Single Nucleotide Polymorphisms: Methods and Protocols*. 2nd ed. Totowa, NJ: Humana Press; 2009. p. 3–22 (SpringerLink Bücher; vol. 578).
40. Altshuler DM, Gibbs RA, Peltonen L, Dermitzakis E, Schaffner SF, Yu F et al. Integrating common and rare genetic variation in diverse human populations. *Nature* 2010 [cited 2022 Mar 17]; 467(7311):52–8. Available from: URL: <https://www.nature.com/articles/nature09298.pdf>.
41. Buchanan CC, Torstenson ES, Bush WS, Ritchie MD. A comparison of cataloged variation between International HapMap Consortium and 1000 Genomes Project data. *J Am Med Inform Assoc* 2012; 19(2):289–94.
42. Ding C, Jin S. High-throughput methods for SNP genotyping. *Methods Mol Biol* 2009; 578:245–54.
43. La Starza S, Ferraldeschi M, Buscarinu MC, Romano S, Fornasiero A, Mechelli R et al. Genome-Wide Multiple Sclerosis Association Data and Coagulation. *Front Neurol* 2019; 10:95.
44. Ellinghaus D, Jostins L, Spain SL, Cortes A, Bethune J, Han B et al. Analysis of five chronic inflammatory diseases identifies 27 new associations and highlights disease-specific patterns at shared loci. *Nat Genet* 2016; 48(5):510–8.

45. Jokubaitis VG, Zhou Y, Butzkueven H, Taylor BV. Genotype and Phenotype in Multiple Sclerosis-Potential for Disease Course Prediction? *Curr Treat Options Neurol* 2018; 20(6):18.
46. Visscher PM, Wray NR, Zhang Q, Sklar P, McCarthy MI, Brown MA et al. 10 Years of GWAS Discovery: Biology, Function, and Translation. *Am J Hum Genet* 2017; 101(1):5–22.
47. Mehmood A, Ali W, Song S, Din ZU, Guo R-Y, Shah W et al. Optical coherence tomography monitoring and diagnosing retinal changes in multiple sclerosis. *Brain Behav* 2021; 11(10):e2302.
48. Fercher A, Drexler W, Hitzenberger C, Lasser T. Optical Coherence Tomography—Principles and Applications. *Rep. Prog. Phys* 2003; 66.
49. Horstmann J, Siebelmann S, Schulz-Hildebrandt H, Glasunow I, Schadschneider A, Hüttmann G. OCT verstehen – Teil 2: Praktische Aspekte und Anwendung. *Klinische Monatsblätter für Augenheilkunde* 2017; 234(2):233–47.
50. Prof. Dr. rer. nat. Edmund Koch. Optische Kohärenztomographie (OCT) Versuchsanleitung Fortgeschrittenenpraktikum Physik; 2012.
51. Bock M, Brandt AU, Dörr J, Pfueller CF, Ohlraun S, Zipp F et al. Time domain and spectral domain optical coherence tomography in multiple sclerosis: a comparative cross-sectional study. *Multiple Sclerosis Journal* 2010; 16(7):893–6.
52. Optical Coherence Tomography - RECENDT | Research Center for Non-Destructive Testing GmbH; 2023 [cited 2023 Apr 26]. Available from: URL: <https://www.recendt.at/en/OCT.html>.
53. Fujimoto JG, Pitris C, Boppart SA, Brezinski ME. Optical coherence tomography: an emerging technology for biomedical imaging and optical biopsy. *Neoplasia* 2000; 2(1-2):9–25.
54. Tsokolas G, Tsaousis KT, Diakonis VF, Matsou A, Tyradellis S. Optical Coherence Tomography Angiography in Neurodegenerative Diseases: A Review. *Eye Brain* 2020; 12:73–87.
55. Horstmann J, Siebelmann S, Schulz-Hildebrandt H, Glasunow I, Schadschneider A, Hüttmann G. OCT verstehen – Teil 1: Physikalische Grundlagen. *Klinische Monatsblätter für Augenheilkunde* 2017; 234(1):131–43. Available from: URL: <https://research.uni-luebeck.de/en/publications/oct-verstehen-teil-1-physikalische-grundlagen>.

56. Tintore M, Arrambide G, Otero-Romero S, Carbonell-Mirabent P, Río J, Tur C et al. The long-term outcomes of CIS patients in the Barcelona inception cohort: Looking back to recognize aggressive MS. *Mult Scler* 2020; 26(13):1658–69.
57. Tawarie P, Balk L, Costello F, Green A, Martin R, Schippling S et al. The OSCAR-IB consensus criteria for retinal OCT quality assessment. *PLoS One* 2012; 7(4):e34823.
58. Hwang S, Kong M, Ko H, Ham D-I, Song Y-M. Genetic influence on macular retinal nerve fibre layer thickness according to retinal subfield. *Br J Ophthalmol* 2020; 104(10):1448–52.
59. Kong M, Hwang S, Ko H, Lee G-I, Kang M, Sung J et al. Heritability of macular ganglion cell inner plexiform layer thickness as determined by optical coherence tomography: the Healthy Twin Study. *Br J Ophthalmol* 2021; 105(7):1011–5.
60. Kaye RA, Patasova K, Patel PJ, Hysi P, Lotery AJ. Macular thickness varies with age-related macular degeneration genetic risk variants in the UK Biobank cohort. *Sci Rep* 2021; 11(1):23255.
61. Seitz CB, Steffen F, Muthuraman M, Uphaus T, Krämer J, Meuth SG et al. Serum neurofilament levels reflect outer retinal layer changes in multiple sclerosis. *Ther Adv Neurol Disord* 2021; 14:17562864211003478.
62. Seitz CB, Droby A, Zaubitzer L, Krämer J, Paradis M, Klotz L et al. Discriminative power of intra-retinal layers in early multiple sclerosis using 3D OCT imaging. *J Neurol* 2018; 265(10):2284–94.
63. Garcia-Martin E, Ara JR, Martin J, Almarcegui C, Dolz I, Vilades E et al. Retinal and Optic Nerve Degeneration in Patients with Multiple Sclerosis Followed up for 5 Years. *Ophthalmology* 2017; 124(5):688–96. Available from: URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0161642016313744>.
64. Martinez-Lapiscina EH, Arnow S, Wilson JA, Saidha S, Preiningerova JL, Oberwahrenbrock T et al. Retinal thickness measured with optical coherence tomography and risk of disability worsening in multiple sclerosis: a cohort study. *Lancet Neurol* 2016; 15(6):574–84. Available from: URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1474442216000685>.
65. Multiple sclerosis genomic map implicates peripheral immune cells and microglia in susceptibility. *Science* 2019; 365(6460).

66. Pan G, Simpson S, JR, van der Mei I, Charlesworth JC, Lucas R, Ponsonby A-L et al. Role of genetic susceptibility variants in predicting clinical course in multiple sclerosis: a cohort study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2016; 87(11):1204–11.
67. George MF, Briggs FBS, Shao X, Gianfrancesco MA, Kockum I, Harbo HF et al. Multiple sclerosis risk loci and disease severity in 7,125 individuals from 10 studies. *Neurol Genet* 2016; 2(4):e87.
68. Liguori M, Healy BC, Glanz BI, Khoury SJ, Moscufo N, Weiner HL et al. HLA (A-B-C and -DRB1) alleles and brain MRI changes in multiple sclerosis: a longitudinal study. *Genes Immun* 2011; 12(3):183–90. Available from: URL: <https://www.nature.com/articles/gene201058>.
69. Sawcer S, Hellenthal G, Pirinen M, Spencer CCA, Patsopoulos NA, Moutsianas L et al. Genetic risk and a primary role for cell-mediated immune mechanisms in multiple sclerosis. *Nature* 2011; 476(7359):214–9.
70. Celarain N, Tomas-Roig J. Changes in Deoxyribonucleic Acid Methylation Contribute to the Pathophysiology of Multiple Sclerosis. *Front Genet* 2019; 10:1138.
71. Lang GK, Lang GE, Cursiefen C, Heiligenhaus A, editors. Schlaglicht Augenheilkunde: Entzündliche Erkrankungen. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2016. (Schlaglicht Augenheilkunde).
72. 9.3 Die Neuritis nervi optici. In: Lang GK, Lang GE, Cursiefen C, Heiligenhaus A, editors. Schlaglicht Augenheilkunde: Entzündliche Erkrankungen. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2016 (Schlaglicht Augenheilkunde).
73. Cruz-Herranz A, Balk LJ, Oberwahrenbrock T, Saidha S, Martinez-Lapiscina EH, Lagreze WA et al. The APOSTEL recommendations for reporting quantitative optical coherence tomography studies. *Neurology* 2016; 86(24):2303–9.
74. Reed E, Nunez S, Kulp D, Qian J, Reilly MP, Foulkes AS. A guide to genome-wide association analysis and post-analytic interrogation. *Stat Med* 2015; 34(28):3769–92.
75. Marees AT, Kluiver H de, Stringer S, Vorspan F, Curis E, Marie-Claire C et al. A tutorial on conducting genome-wide association studies: Quality control and statistical analysis. *Int J Methods Psychiatr Res* 2018; 27(2):e1608.
76. Manolio TA, Collins FS, Cox NJ, Goldstein DB, Hindorff LA, Hunter DJ et al. Finding the missing heritability of complex diseases. *Nature* 2009; 461(7265):747–53.

77. Aryal S. Hardy-Weinberg Equilibrium. Sagar Aryal 2022 Jun 26 [cited 2023 Jan 5]. Available from: URL: <https://thebiologynotes.com/hardy-weinberg-equilibrium/>.
78. Dudbridge F, Gusnanto A. Estimation of significance thresholds for genomewide association scans. *Genet Epidemiol* 2008; 32(3):227–34.
79. Lee SH, Kim SH, Kim T-W, Park KH, Kim DM. Reproducibility of retinal nerve fiber thickness measurements using the test-retest function of spectral OCT/SLO in normal and glaucomatous eyes. *J Glaucoma* 2010; 19(9):637–42.
80. Ruxton GD. The unequal variance t-test is an underused alternative to Student's t-test and the Mann–Whitney U test. *Behav Ecol* 2006; 17(4):688–90.
81. Jin X-T, Smith Y. Localization and functions of kainate receptors in the basal ganglia. *Adv Exp Med Biol* 2011; 717:27–37.
82. Gray AL, Hyde TM, Deep-Soboslay A, Kleinman JE, Sodhi MS. Sex differences in glutamate receptor gene expression in major depression and suicide. *Mol Psychiatry* 2015; 20(9):1139.
83. Chatterjee M, Saha S, Dutta N, Sinha S, Mukhopadhyay K. Kainate receptor subunit 1 (GRIK1) risk variants and GRIK1 deficiency were detected in the Indian ADHD probands. *Sci Rep* 2022; 12(1):18449.
84. Ren Z, Liu J, Yao L, Li J, Qi Z, Li B. Glutamate receptor ionotropic, kainate 1 serves as a novel tumor suppressor of colorectal carcinoma and predicts clinical prognosis. *Exp Ther Med* 2020; 20(6):167.
85. Kranzler HR, Feinn R, Pond T, Hartwell E, Gelernter J, Crist RC et al. Post-treatment effects of topiramate on alcohol-related outcomes: A combined analysis of two placebo-controlled trials. *Addict Biol* 2022; 27(2):e13130.
86. Gondré-Lewis MC, Elman I, Alim T, Chapman E, Settles-Reaves B, Galvao C et al. Frequency of the Dopamine Receptor D3 (rs6280) vs. Opioid Receptor μ 1 (rs1799971) Polymorphic Risk Alleles in Patients with Opioid Use Disorder: A Preponderance of Dopaminergic Mechanisms? *Biomedicines* 2022; 10(4).
87. Pellerin D, Danzi M, Renaud M, Houlden H, Synofzik M, Zuchner S et al. GAA-FGF14-Related Ataxia. In: Adam MP, Feldman J, Mirzaa GM, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJH et al., editors. *GeneReviews*(®). Seattle (WA); 1993.

88. Wilke C, Pellerin D, Mengel D, Träschütz A, Danzi MC, Dicaire M-J et al. GAA-FGF14 ataxia (SCA27B): phenotypic profile, natural history progression and 4-aminopyridine treatment response. *Brain* 2023; 146(10):4144–57.
89. Zhang M, Wang J, Jin Y, Zheng Q, Xing M, Tang Y et al. YTHDF2-mediated FGF14-AS2 decay promotes osteolytic metastasis of breast cancer by enhancing RUNX2 mRNA translation. *Br J Cancer* 2022; 127(12):2141–53.
90. Mertsch S, Schlicht K, Melkonyan H, Schlatt S, Thanos S. snRPN controls the ability of neurons to regenerate axons. *Restor Neurol Neurosci* 2018; 36(1):31–43.
91. Sample PJ, Wang B, Reid DW, Presnyak V, McFadyen IJ, Morris DR et al. Human 5' UTR design and variant effect prediction from a massively parallel translation assay. *Nat Biotechnol* 2019; 37(7):803–9.

11. Anhang

11.1 Ancestry check protocol

1. Perform QC on original data set („sample“)

```
plink --bfile sample --maf 0.05 --geno 0.01 --mind 0.05 --write-snp-list --make-just-fam --out sample.QC
```

```
plink --bfile sample --keep sample.QC.fam --extract sample.QC.snplist --indep-pairwise 200 50 0.25 --out sample.QC
```

```
dat <- read.table("C:/Users/eng5s/Desktop/Ancestry/sample.QC.het",
                 header=T)
m <- mean(dat$F)
s <- sd(dat$F)
valid <- subset(dat, F <= m+3*s & F >= m-3*s)
print(head(valid))
write.table(valid[,c(1,2)],
            "C:/Users/eng5s/Desktop/Ancestry/sample.QC.valid.sample", quote=F, row.names=F)
```

```
plink --bfile sample --extract sample.QC.prune.in --keep sample.QC.valid.sample --check-sex -
-out sample.QC
```

```
valid <- read.table("C:/Users/eng5s/Desktop/Ancestry/sample.QC.valid.sample", header=T)
dat <- read.table("C:/Users/eng5s/Desktop/Ancestry/sample.QC.sexcheck", header=T)
valid <- subset(dat, STATUS=="OK" & FID %in% valid$FID)
write.table(valid[,c("FID", "IID")], "C:/Users/eng5s/Desktop/Ancestry/sample.QC.valid",
            row.names=F, col.names=F, sep="\t", quote=F)
```

```
plink --bfile sample --extract sample.QC.prune.in --keep sample.QC.valid --rel-cutoff 0.125 --
out sample.QC
```

```
plink --bfile sample --make-bed --keep sample.QC.rel.id --out sample.QC --extract
sample.QC.snplist
```

2. Perform Ancestry check using AncestryCheck.pdf by Hannah Meyer
3. Exclude subjects of non-European origin

```
plink --bfile sample.QC --remove nonEurop.txt --make-bed --out sample.QC.eu
```

4. Check for HWE

```
plink --bfile sample.QC.eu --hwe 1e-6 --make-bed --out sample.QC.final
```

11.2 GWAS Protokoll

Analog dieses nachfolgenden Protokolls wurde die GWAS für unsere Studie durchgeführt. Angegeben sind die einzelnen Arbeitsschritte (#) mit Zwischenergebnissen sowie die parallel durchzuführenden Arbeitsanweisungen für R.

Pat. mit Läsionsvolumen selektieren

```
plink --bfile MS_array --keep LesionCohortIDs.txt --make-bed --out lesion
```

-> 327 people remaining (non-European ancestry already excluded in previous analysis), no duplicated SNPs

Analysen nur mit Chromosomen 1-22, da gesonderte Betrachtung von X/Y erforderlich wäre

```
plink --bfile lesion --chr 1-22 --make-bed --out lesionAuto
```

only include autosomal chromosomes

594.024 variants and 327 people pass filters and QC

QC (siehe auch: <https://choishingwan.github.io/PRS-Tutorial/target/>)

```
plink --bfile lesionAuto --maf 0.05 --geno 0.01 --mind 0.05 --write-snplist --make-just-fam --out lesion.QC
```

61.549 variants removed due to missing genotype data (--geno).

47.121 variants removed due to minor allele threshold(s)

485.354 variants and 327 people pass filters and QC.

```
plink --bfile lesionAuto --keep lesion.QC.fam --extract lesion.QC.snplist --indep-pairwise 200 50 0.25 --out lesion.QC
```

```
plink --bfile lesionAuto --extract lesion.QC.prune.in --keep lesion.QC.fam --het --out lesion.QC
```

Schritte in grüner Schrift in R:

```
dat <- read.table("C:/Users/eng5s/Desktop/LesionGWAS/lesion.QC.het",  
                header=T)
```

```
m <- mean(dat$F)
s <- sd(dat$F)
valid <- subset(dat, F <= m+3*s & F >= m-3*s)
print(head(valid))
write.table(valid[,c(1,2)],
            "C:/Users/eng5s/Desktop/LesionGWAS/lesion.QC.valid.sample", quote=F,
            row.names=F)
```

```
plink --bfile lesionAuto --extract lesion.QC.prune.in --keep lesion.QC.valid.sample --rel-cutoff
0.125 --out lesion.QC
```

```
plink --bfile lesionAuto --make-bed --keep lesion.QC.rel.id --out lesion.QC --extract
lesion.QC.snplist
```

485.354 variants and 315 people pass filters and QC.

```
plink --bfile lesion.QC --hwe 1e-6 --make-bed --out lesion.QC.final
```

316 variants removed due to Hardy-Weinberg exact test.

485.038 variants and 315 people pass filters and QC.

Calculate PCs:

```
plink --bfile lesion.QC.final --indep-pairwise 200 50 0.25 --out lesion.QC.final
```

```
plink -- bfile lesion.QC.final --extract lesion.QC.final.prune.in --pca 10 --out lesion-QC.final
```

Formatieren der Kovariaten- und Phänotyp-Datei in R

Lineare Regression in Plink:

```
plink --bfile lesion.QC.final --linear --pheno phenotype.txt --covar covariates.txt --hide-covar
```

11.3 Skript für OCT-GWAS bei imputiertem MS_array Datensatz

1. *Plink v1.9beta in den Ordner kopieren*

2. *UMich Imputation von Chr12 von MS_array in den Ordner kopieren*

3. *total_chromosomes.vcf.gz entpacken*

4. *.ped und .map Dateien erstellen:*

```
plink --vcf total_chromosomes.vcf --out total_chromosomes --recode --double-id
```

5. *.bed, .bim und .fam Dateien erstellen:*

```
plink --file total_chromosomes --make-bed --out total_chromosomes
```

6. *Hardy-Weinberg exact test Überprüfung:*

```
plink --bfile total_chromosomes --hwe 1e-6 --make-bed --out sample.HW
```

7. *non-EU Patienten entfernen:*

```
plink --bfile sample.HW --remove nonEU.txt --make-bed --out OCT
```

8. *Standard QC-Filterung:*

```
plink --bfile OCT --hwe 0.05 --maf 0.01 --geno 0.10 --mind 0.10 --chr 1-22 --genome --min 0.20 --out cryptic --recode
```

9. *GWAS für alle Phänotypen:*

```
plink --file cryptic --linear --all-pheno --pheno 221106_phenoALLbaseline.txt --covar covariates.txt --hide-covar --adjust --allow-no-sex
```

```
plink --file cryptic --linear --all-pheno --pheno 221106_phenoALLbaseline.txt --covar covariates.txt --hide-covar --adjust --allow-no-sex
```

```
plink --file cryptic --linear --all-pheno --pheno 221107_phenoALLfollow-up.txt --covar covariates.txt --hide-covar --adjust --allow-no-sex
```

```
plink --file cryptic --linear --all-pheno --pheno 221106_phenoRBNnegbaseline.txt --covar covariates.txt --hide-covar --adjust --allow-no-sex
```

```
plink --file cryptic --linear --all-pheno --pheno 221107_phenoRBNnegfollow-up.txt --covar covariates.txt --hide-covar --adjust --allow-no-sex
```

```
plink --file cryptic --linear --all-pheno --pheno 221106_phenoRBNposbaseline.txt --covar covariates.txt --hide-covar --adjust --allow-no-sex
```

```
plink --file cryptic --linear --all-pheno --pheno  
221107_phenoRBNposfollow-up.txt --covar covariates.txt --  
hide-covar --adjust --allow-no-sex
```

Danksagung

Test bei unabhängigen r die immerwährende

Levene-Test der
Varianzgleichheit

erstellung dieser Arbeit

Stichproben

t-Test für die Mittelwertgleichheit

TRVfu_all	Levene-Test der Varianzgleichheit		t-Test für die Mittelwertgleichheit				
	Varianzen sind gleich	Varianzen sind nicht gleich	Sig. (2-seitig)	Mittlere Differenz	Differenz für Standardfehler	95% Konfidenzintervall der Differenz	
						Unterer Wert	Oberer Wert
Absprachen, Treffen und sonsti			,188	-93,43986	70,44035	-233,64787	46,76815
			,373	-93,43986	103,09142	-305,75002	118,87030

Curriculum Vitae

VERONICA CLARA SCHOTTLER

BERUFSTÄTIGKEIT

07/2024 – heute

**Assistenzärztin in der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Gefäßchirurgie
ViDia Christliche Kliniken Karlsruhe**

STUDIUM

07/2020 – heute

Promotion: Klinik für Neurologie, Universitätsmedizin Mainz, Prof. Dr. med. F. Lüssi

- „Genetische Determinanten longitudinaler Outcome-Parameter
Optischer Kohärenztomographie bei Multipler Sklerose“

10/2017 – 05/2024

Studium der Humanmedizin an der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz

- 1. Staatsexamen (08/2019)
- 2. Staatsexamen (11/2022)
- 3. Staatsexamen (05/2024)

Veronica Schottler