

Aus der Klinik für Neurologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Zur Rolle des Epstein-Barr-Virus (EBV) bei der Multiplen Sklerose:

**Epitope Mapping EBV-spezifischer Antikörper mittels Peptid-Microarrays als
potentieller diagnostischer Ansatz bei Multipler Sklerose**

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät

Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Benjamin Wunderlich

aus Berlin

Datum der Promotion: 11.12.2015

Inhaltsverzeichnis

1. ZUSAMMENFASSUNG	- 1 -
2. EINLEITUNG.....	- 3 -
2.1 EPIDEMIOLOGIE UND KLINIK	- 3 -
2.2 DIE IMMUNPATHOGENESE DER MULTIPLLEN SKLEROSE.....	- 4 -
2.3 DAS EPSTEIN-BARR-VIRUS.....	- 6 -
2.4 DAS EPSTEIN-BARR-VIRUS ALS RISIKOFAKTOR DER MULTIPLLEN SKLEROSE	- 7 -
2.5 POTENTIELLE MECHANISMEN DER EPSTEIN-BARR-VIRUS INFEKTION BEI DER MS....	- 9 -
2.6 DIE HUMORALE IMMUNANTWORT GEGEN DAS EPSTEIN-BARR-VIRUS	- 10 -
3. ZIELSETZUNG DER VORLIEGENDEN ARBEIT	- 10 -
4. PATIENTEN UND METHODEN	- 11 -
4.1 STUDIENDESIGN UND ETHIK.....	- 11 -
4.2 STUDIENPATIENTEN UND GESUNDE KONTROLLEN	- 11 -
4.3 BLUTABNAHME UND GEWINNUNG DES SERUMS.....	- 12 -
4.4 EBNA1-ELISA UND WESTERN BLOT	- 12 -
4.5 PEPTID-MICROARRAY	- 12 -
4.6 MATERIALIEN, GERÄTE UND CHEMIKALIEN.....	- 14 -
4.7 SOFTWARE	- 14 -
4.8 STATISTISCHE ANALYSE	- 15 -
4.8.1 BONFERRONI-KORREKTUR	- 15 -
4.8.2 KRUSKAL-WALLIS-TEST	- 16 -
4.8.3 RECEIVER OPERATING CHARACTERISTIC	- 17 -
5. ERGEBNISSE	- 17 -
5.1. EBNA1-ELISA UND WESTERN BLOT	- 17 -
5.2 PEPTID-MICROARRAY	- 18 -
5.2.1 SIGNIFIKANTE PEPTIDE.....	- 18 -
5.2.2 MS-SUBGRUPPENANALYSE MEDIKATION.....	- 23 -
5.2.3 ANTIKÖRPER-ROC-ANALYSE	- 23 -
6. DISKUSSION	- 24 -
7. LITERATURVERZEICHNIS	- 30 -
8. EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG UND ANTEILSERKLÄRUNG	- 35 -
9. BIOGRAFIE	- 36 -
10. PUBLIKATIONSLISTE	- 38 -

1. Zusammenfassung

Hintergrund:

Sero-epidemiologische Daten belegen einen starken und konsistenten Zusammenhang zwischen Multipler Sklerose (MS) und einer Infektion mit dem Epstein-Barr-Virus (EBV). Auf Ebene der humoralen Immunantwort zeigen verschiedene Studien erhöhte Antikörperreaktivitäten gegen das EBV bei Patienten mit MS, wobei eine umfassende Analyse der Feinspezifität dieser Antikörper bislang nicht vorlag.

Zielsetzung und Methodik:

Mittels hoch auflösenden Peptid-Microarrays wurden IgG-Antikörperreaktivitäten gegen 1465 überlappende EBV-Peptide, die auf 8 EBV-Proteine (EBNA1, EBNA3, EBNA4, EBNA6, VP26, LMP1, BLRF2, BZLF1) zurückgehen bei Patienten mit schubförmiger MS (n=29) sowie gesunden Kontrollen (n=22) untersucht. Weiterhin sollten mögliche medikamentöse Einflussfaktoren auf EBV-Antikörperreaktivitäten sowie die klinische Anwendungsmöglichkeit von Antikörpermustern gegen EBV Peptide zur Unterscheidung von Erkrankten versus Gesunden anhand von Grenzwertoptimierungskurven (=Receiver Operating Characteristic, kurz „ROC“) untersucht werden.

Ergebnisse:

Bei einem Signifikanzniveau von $p \leq 10^{-3}$ konnten bei Patienten mit MS erhöhte humorale Immunantworten gegen 39 der untersuchten Peptide nachgewiesen werden, davon waren allein 13 im Glycin-Alanin reichen Bereich des EBNA1 Proteins lokalisiert. Weitere auffällige Peptide fanden sich in EBNA3, EBNA4, EBNA6 sowie VP26 und LMP1. Die gegen diese Peptide gerichtete erhöhte humorale Immunantwort war unabhängig von einer immunmodulatorischen Therapie. Eine kombinierte ROC-Kurve für die 3 signifikantesten Peptide zeigt eine area under the curve (AUC) von 0,9 und weist somit auf einen potentiell diagnostisch bedeutsamen Test hin.

Schlussfolgerung:

EBV spezifische Antikörper bei Patienten mit Multipler Sklerose zielen primär gegen den Glycin-Alanin reichen Bereich des EBNA1, sie sind jedoch nicht allein auf diesen beschränkt.

Abstract

Background:

Sero-epidemiological studies have shown a strong and consistent association between multiple sclerosis (MS) and Epstein-Barr-virus (EBV) infection. With regard to the humoral immune response, different studies demonstrated an enhanced reactivity against EBV in patients with MS but a comprehensive analysis of the fine specificity of these antibodies was hitherto not performed.

Objective and Methods:

To examine the IgG-antibody response in 29 MS-patients and 22 healthy controls we conducted a high density screen using peptide-microarrays with 1465 peptides representing 8 different EBV-proteins (EBNA1, EBNA3, EBNA4, EBNA6, VP26, LMP1, BLRF2, BZLF1). The influence of immunomodulatory treatment on antibody reactivities was studied by a subgroup analysis. The value of anti-EBV antibody pattern as diagnostic biomarker for MS was analysed by Receiver Operating Characteristic (ROC) curves.

Results:

At a significance threshold of $p \leq 10^{-3}$ elevated humoral immune responses against 39 peptides were found in patients with MS. 13 of these peptides were located within the glycin-alanin repeat of the EBNA1 protein. Other reactivities were directed against EBNA3, EBNA4, EBNA6, VP26 and LMP1. These findings were independent of treatment mode. Combined ROC-curve analysis of the 3 most significant peptides revealed an area under the curve (AUC) of 0,9 which indicates a potential value of altered EBV-antibody patterns as diagnostic biomarkers for MS.

Conclusion:

Antibodies against EBV in MS patients primarily target, but are not confined to, the glycine–alanine repeat of EBNA1.

2. Einleitung

2.1 Epidemiologie und Klinik

Mit einer Prävalenz von ca. 150 Fällen auf 100 000 Menschen in Deutschland handelt es sich bei der MS um eines der häufigsten neurologischen Krankheitsbilder im jüngeren Erwachsenenalter.¹ Die Erstdiagnose wird in der Regel zwischen dem 20. und 40. Lebensjahr gestellt. Dabei ist das Spektrum der Symptome, die mit der Krankheit einhergehen ausgesprochen vielfältig und umfasst u.a. Störungen des Visus und der Okulomotorik, der Sensibilität und Koordination, des Ganges sowie Depression und Fatigue. Hinsichtlich der Krankheitsverläufe der MS lassen sich drei Formen unterscheiden:

- Schubförmig remittierende MS (= Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis / RRMS)
- Sekundär chronisch progrediente MS (= Secondary-Progressive Multiple Sclerosis / SPMS)
- Primär chronisch progrediente MS (= Primary-Progressive Multiple Sclerosis / PPMS)

Die MS verläuft in etwa 85% zunächst schubförmig (RRMS), wobei ca. 65% der initial schubförmigen Formen im Verlauf innerhalb von ca. 10 Jahren in eine SPMS übergehen. Ein kleinerer Anteil der Patienten von etwa 15% weist von Beginn an einen progredienten Verlauf (PPMS) auf.² Während bei der RRMS einzelne Krankheitsschübe mit einer Verschlechterung der Symptomatik und einer oftmals inkompletten Rückbildung auftreten, präsentieren sich SPMS und PPMS dagegen mit einer kontinuierlicheren Verschlechterung mit oder ohne abgrenzbare Schubereignisse und einer zunehmenden Behinderung von Anfang an. MS Patienten müssen somit im Vergleich zu gleichaltrigen Gesunden deutlich häufiger frühberentet werden und weisen auch dadurch bedingt ein geringeres Lebens Einkommen auf.³ Die genannten Zusammenhänge unterstreichen die große sozio-ökonomische Bedeutung einer effektiven und frühzeitigen Diagnose sowie Behandlung bei MS Patienten, welche eine tiefere Kenntnis der Pathogenese voraussetzt.

2.2 Die Immunpathogenese der Multiplen Sklerose

Die MS ist eine chronisch entzündliche Erkrankung des zentralen Nervensystems (ZNS) mit einer bislang unbekanntem Ätiologie.

Ein zentraler Bestandteil in der Pathogenese ist die Bildung von multifokalen Plaques (MS-Läsionen) in der weißen Hirnsubstanz und dem Rückenmark. Ein Plaque ist in diesem Kontext definiert als umschriebener Bereich des Nervengewebes, reich an aktivierten Mikrogliazellen sowie Makrophagen und einer lokalen Zerstörung von Myelinscheiden der Nervenfortsätze. Bereits 1866 beschrieb der französische Neurologe Charcot auf Grundlage seiner makro- und mikroskopischen Studien das Krankheitsbild MS als „la sclerose en plaques“.⁴ Damit war es Charcot gelungen die typisch periventriculär auftretenden Läsionen der weißen Hirnsubstanz als wichtiges Merkmal der MS zu erkennen, welches noch heute - kernspintomographisch nachgewiesen – ein Hauptbestandteil der aktuellen Diagnosekriterien für die MS (sog. McDonald-Kriterien) ist. Darüber hinaus sind oligoklonale Banden (OKB) im Liquor cerebrospinalis als Zeichen einer unspezifischen intracerebralen B-Zell Aktivierung das konsistenteste Merkmal einer MS und bei über 95% der Patienten in der isoelektrischen Fokussierung nachweisbar.⁵

Eine notwendige Voraussetzung für die Entstehung von charakteristischen Läsionen und den OKB ist die Überwindung der Bluthirnschranke (BHS) durch Leukozyten sowie lösliche Faktoren des Immunsystems. Es kann angenommen werden, dass der Eintritt von pro-inflammatorischen Leukozyten in das ZNS bei MS ein frühes Ereignis in der Pathogenese darstellt und dass von ihnen sezernierte Zytokine die Integrität der BHS beeinträchtigen können. Beispielsweise ist der Tumornekrose-Faktor- α (TNF α) in mononukleären Zellen des peripheren Blutes von Patienten mit MS erhöht und kann im Tierversuch die Permeabilität der BHS steigern.^{6,7} Schließlich wird die Diapedese der Leukozyten über die BHS u.a. durch eine enge Interaktion zwischen Integrinen auf den Leukozyten, wie z.B. $\alpha 4\beta 1$ (= VLA4) und den entsprechenden Zelladhäsionsmolekülen (engl. Cell Adhesion Molecule = CAM) auf den Endothelzellen der BHS ermöglicht.⁸ Die Hemmung dieser Interaktion zwischen Integrinen und CAM ist ein potenter pharmakologischer Angriffspunkt und wird in Form des humanisierten monoklonalen Antikörpers Natalizumab seit 2004 zur MS-Therapie genutzt.⁹ Letztlich bleibt es jedoch unklar, ob primär eine Dysfunktion der BHS verantwortlich für die Migration der

Immunzellen ist oder ob dies eine konsekutive Erscheinung darstellt, welche auf das Wirken entzündlicher Immunreaktionen zurück zu führen ist.

Neuropathologisch ist eine MS-Läsion initial charakterisiert durch eine massive Aktivierung inflammatorischer Mikrogliazellen gefolgt von einer Invasion von hauptsächlich CD8+ als auch CD4+ T-Zellen, B-Zellen und Makrophagen.¹⁰

Während fokale aktive Läsionen in der weißen Hirnsubstanz mit inflammatorischer Demyelinisierung bei der RRMS im Mittelpunkt des pathologischen Geschehens stehen, zeichnen sich die Stadien SPMS und PPMS dagegen auch durch eine kortikale Demyelinisierung sowie eine diffuse Inflammation der weißen Hirnsubstanz aus, welche letztlich zu einer ausgeprägten Atrophie des ZNS führen.¹¹ Die Muster der ZNS Schädigung unterscheiden sich also abhängig vom Krankheitsstadium. Es gibt Hinweise dafür, dass die neurodegenerativen Vorgänge im Rahmen der SPMS zumindest teilweise zurückzuführen sind auf die Bildung von B-Zellen haltigen ektopen Lymphfollikel-artigen Strukturen in den Meningen, welche im Verdacht stehen kortikale Demyelinisierung und Atrophie zu fördern.^{12,13} Neuere Studienergebnisse belegen, dass bislang unbekannte Sekretionsprodukte von B-Zellen bei MS einen zytotoxischen Effekt auf Oligodendrozyten haben.¹⁴ Ein weiteres Indiz für die Unterschiede in den pathologischen Vorgängen der MS in verschiedenen Stadien ist die klinische Beobachtung, dass sich die bislang verfügbaren pharmakologischen Therapiemöglichkeiten vor allem bei RRMS bewährt haben, während sie bei PPMS und SPMS weitgehend wirkungslos sind. Ein Grund hierfür könnte sein, dass sich die pathogenen Vorgänge in progressiven Krankheitsstadien hinter einer wieder reparierten oder geschlossenen BHS abspielen, welche sich der Regulation durch periphere Immunmechanismen oder dem Wirken von Pharmaka entziehen. In späten Krankheitsstadien handelt es sich darüber hinaus häufiger um einen dauerhaften, irreparablen Schaden an Neuronen.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Immunpathogenese der MS ein hochgradig komplexer Vorgang ist, der nur partiell verstanden ist. Sowohl das adaptive wie auch das angeborene Immunsystems sind beteiligt und im Verlauf der Krankheit scheinen sich die Mechanismen der ZNS Schädigung zu verändern. Die derzeit vorhandenen Tiermodelle der MS, wie die Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis (EAE), können bislang nur Teilaspekte der Erkrankung vereinfacht darstellen.¹⁵

2.3 Das Epstein Barr Virus

Das Epstein-Barr-Virus (EBV) ist ein ubiquitäres doppelsträngiges DNA-Virus und gehört zu der Familie der lymphotropen Gamma-Herpesviren. Eine Infektion mit EBV findet oftmals bereits in der frühen Kindheit statt und verläuft in der Regel asymptomatisch, während sich eine Erstinfektion in der Adoleszenz häufiger unter dem klinischen Bild einer infektiösen Mononukleose (IM) manifestiert.¹⁶ Die IM zeichnet sich klinisch durch die Trias Pharyngitis, Fieber und Lymphadenopathie aus und ist vor allem in den entwickelten Industriestaaten mit hohen hygienischen Standards und einer - auf das Alter bezogen - verspäteten EBV-Erstinfektion anzutreffen. Durch Interaktion zwischen seinem Hüllprotein gp350 und dem CD21 Rezeptor auf B- Zellen gelangt das Virus in die Wirtszelle.¹⁷ Bei der Infektion von B-Zellen spielt der MHCII-Komplex zudem als Kofaktor eine wichtige Rolle.¹⁸ Im Rahmen einer IM kommt es zu einer Infektion der oropharyngealen Epithelzellen und B-Zellen mit einer lytischen Replikation des Virus, wodurch eine starke Immunantwort insbesondere von CD8+ T-Lymphozyten hervorgerufen wird. Das sich nachfolgend entwickelnde latente Stadium der Virusinfektion ist durch eine lebenslange Persistenz von EBV in memory-B-Zellen charakterisiert und geht mit einer deutlich eingeschränkten viralen Proteinexpression einher.¹⁹⁻²¹ Die Zahl der zirkulierenden EBV-infizierten B-Zellen in einem gesunden Erwachsenen im Latenzstadium lässt sich auf etwa 1-50 Zellen von 1 Million B-Zellen beziffern.²¹ In diesen Zellen wird nur ein Bruchteil der etwa 100 zählenden EBV Proteine exprimiert, es kann jedoch spontan zu einer lytischen Reaktivierung des als Episomen in der Zelle vorliegenden Virus kommen.²² Das Epstein-Barr-Nuclear-Antigen-1 (EBNA1) ist in verschiedener Hinsicht von herausragender Bedeutung: Einerseits ist es das einzige im Zellkern der infizierten Zelle exprimierte Protein, welches zumindest passager in jeder infizierten Zelle vorhanden ist, da es u.a. für die Regulation der viralen Replikation und die Weitergabe des Virus auf Tochterzellen verantwortlich ist.^{23,24} Andererseits fungiert EBNA1 als ein humorales und zelluläres Zielantigen der EBV-spezifischen Immunantwort. Auch wenn der serologische Nachweis von Antikörpern gegen EBV (EBNA1, VCA) indirekt beweisend für eine Infektion mit EBV ist, so obliegt die immunologische Kontrolle des Virus *in vivo* vor allem den spezifischen zytotoxischen T-Zellen.²⁵ Eine aktuelle Studie spricht zudem dafür, dass bei MS-Patienten eine verminderte Subpopulation von zytotoxischen (CD8⁺) T-Zellen vorliegt, charakterisiert als CD45RA⁻CD62L⁻ sowie CD45RA⁺CD62L⁻.²⁶ Ein Mangel an diesen „effector-memory“ T-Zellen könnte eine veränderte zelluläre

Immunkontrolle des EBV bei MS begründen. In diesem Zusammenhang wurde unlängst in einem Fallbericht über einen individuellen Heilversuch durch eine EBV-spezifische Immuntherapie bei einem australischen SPMS-Patienten mit *in vitro* hergestellten autologen gegen drei latente EBV-Proteine, darunter EBNA1, gerichtete CD8+ T-Zellen berichtet.²⁷ Nach adoptivem T-Zell-Transfer wurde in diesem Fall eine klinische Verbesserung, eine reduzierte Läsionslast sowie eine verminderte intrathekale Immunglobulinsynthese bei guter Verträglichkeit beschrieben.

Die B-Zell-Subpopulationen scheinen bei MS dagegen quantitativ nicht verändert zu sein.²⁸

2.4 Das Epstein Barr Virus als Risikofaktor der Multiplen Sklerose

Auch wenn die Ätiologie der MS nicht geklärt ist, geht man davon aus, dass sich die MS auf dem Boden einer Interaktion von genetischen Faktoren, z.B. in Form bestimmter Polymorphismen in Haupthistokompatibilitätskomplex II (engl. Major Histocompatibility Complex = MHC) codierenden Genen und verschiedenen Umweltfaktoren entwickelt. Diverse Befunde sprechen hierbei für eine besondere Rolle von EBV innerhalb der für die MS relevanten Umweltfaktoren:

- I. Praktisch alle Patienten mit MS sind EBV positiv. Eine aktuelle Metaanalyse konnte erneut zeigen, dass in umfangreichen Studien zur Prävalenz von anti-EBV-Antikörpern bei Erwachsenen Patienten mit MS in so gut wie allen Fällen eben diese nachweisbar sind, während sie in der Allgemeinbevölkerung bei ca. 95% nachgewiesen werden können.^{29,30}
- II. Durch umfangreiche Metaanalysen und Auswertung von Serumregistern mit mehr als 25.000 Patienten ist bekannt, dass im Vergleich zur asymptomatischen (frühen) die symptomatische Infektion mit EBV in Form einer IM das relative Risiko für die Entwicklung einer MS mehr als verdoppelt und dieses erhöhte relative Risiko für mindestens 30 Jahre bestehen bleibt.^{31,32}
- III. Durch prospektive serologische Studien mit Hilfe von „Serumbanken“ konnte nachgewiesen werden, dass Patienten, welche an MS erkrankten, immer zuvor eine EBV-Serokonversion entwickelten.³³ Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass bei MS-Patienten erhöhten IgG-Spiegel gegen bestimmte EBV Proteine, vor allem EBNA1, schon mindestens 5 Jahre vor der klinischen

Erstmanifestation nachweisbar sind und somit erhöhte anti-EBNA1-Antikörperspiegel mit einem erhöhten Risiko für eine MS einhergehen.^{34,35}

IV. Auch bei Kindern mit MS konnten signifikant erhöhte IgG-Spiegel gegen EBNA1 nachgewiesen werden.³⁶

Risikofaktor	Odds-Ratio
1. HLA-DRB1*15	3,19
2. Infektiöse Mononukleose	1,89
3. Hohe anti-EBNA1-IgG-Titer: Sequenzbereich 385-420	3,79
Kombination aus Risikofaktoren 1. + 2. + 3.	16,03

Tabelle 1: Darstellung der Assoziation verschiedener Risikofaktoren mit Multipler Sklerose³⁷

Tabelle 1 stellt die Ergebnisse einer Arbeit zusammen in der die komplexe Interaktion von genetischer Prädisposition in Form bestimmter Risiko-HLA-Polymorphismen und Umweltfaktoren wie der Infektion mit EBV in Bezug auf die Assoziation mit einer MS untersucht wurde.³⁷ Bemerkenswert ist, dass einzelne Risikofaktoren zumeist mit einem leicht bis moderat erhöhtem Quotenverhältnis einhergehen, während mehrere Risikofaktoren in Kombination zu einer deutlich erhöhten Odds-Ratio führen. Dieser Zusammenhang spricht zum einen für eine multifaktorielle Ätiologie der Erkrankung und zeigt zudem die Komplexität dieser auf.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass sehr starke Evidenzen für eine Assoziation zwischen der MS und einer vorausgegangenen EBV Infektion vorliegen. Unklar bleibt hierbei allerdings, wie EBV als ubiquitäres Virus bei manchen Menschen als „seltene Spätkomplikation“ MS hervorrufen kann, d.h. welche Mechanismen genau an der Pathogenese beteiligt sind.

2.5 Potentielle Mechanismen der Epstein-Barr-Virus Infektion bei der Multiplen Sklerose

Es gibt verschiedene Hypothesen wie Pathogene als Umweltfaktoren prinzipiell autoimmunologische Prozesse auslösen könnten:

Zu den bekanntesten Konzepten gehört die der Kreuzreaktivität („molecular mimicry“). Dabei werden z.B. T-Zellen durch einen Krankheitserreger aktiviert und reagieren dann sowohl gegen das aktivierende pathogene Antigen als auch mit strukturverwandten körpereigenen Oberflächen. Grundlage dieser Kreuzreaktivität ist damit einerseits das prinzipielle Vorhandensein von autoreaktiven Zellen und andererseits eine relative strukturelle Verwandtschaft von Teilen des aktivierenden Pathogens und seinen Peptiden mit körpereigenen Strukturen.³⁸ Lünemann et al. vermuteten, dass hohe Virusspiegel im Rahmen einer IM polyspezifische T-Zellen gegen EBNA1 aktivieren und zeigten, dass diese häufiger mit Myelinantigenen reagierten als mit anderen Autoantigenen, welche nicht mit MS assoziiert sind.^{39,40} Andererseits konnte die Studie eine Kreuzreaktivität der EBNA1-spezifischen T-Zellen auch bei gesunden Kontrollen nachweisen, wobei die Gesamtzahl der EBNA1-spezifischen T-Zellen bei MS in dieser Studie erhöht war. Auf humoraler Ebene gibt es ebenfalls Hinweise auf Kreuzreaktivität im Zusammenhang von MS mit EBV: Eine Studie konnte zeigen, dass Antikörper gegen EBNA1 (Sequenz 400-413) kreuzreagieren mit dem Myelin-basischen Protein (Sequenz 85-95).⁴¹ Andererseits konnte besagte Studie diesen Zusammenhang ebenfalls bei Antikörpern gegen das Mycobakterium avium nachweisen.

Eine andere Hypothese zur Entstehung von Autoimmunität durch Pathogene ist die „Bystander activation“. Hierbei wird vermutet, dass es im Rahmen eines inflammatorischen Prozesses, ausgelöst beispielsweise durch eine Virusinfektion, zu einer Aktivierung von Antigen-präsentierenden Zellen (APZ) kommt, welche daraufhin körpereigene Antigene präsentieren und somit zu einer Stimulierung autoreaktiver T- oder B-Zellen führen, die ihrerseits dann mit körpereigenen Strukturen reagieren.³⁹

Letztlich sind die verschiedenen Modelle zur Entstehung von Autoimmunität nicht einander ausschließend sondern eher ergänzend. Auch wenn in mehreren Tiermodellen zur Genese von autoimmunologischen Erkrankungen wie z.B. Typ-1 Diabetes und auch MS Kreuzreaktivität eine vermeintliche Rolle spielt, so sind die genauen Zusammenhänge jedoch weitgehend unbekannt.

Derzeit liegen kontroverse Studienergebnisse vor, welche die Anwesenheit von EBV infizierten B-Zellen im Gehirn bei MS sowohl belegen als auch widerlegen.⁴²⁻⁴⁴ Die Hypothese einer direkten ZNS-Infektion bedarf somit weiterer Untersuchungen.

2.6 Die humorale Immunantwort gegen das Epstein-Barr-Virus

Wie unter 2.3 und 2.4 in der Einleitung beschrieben ist EBNA1 ein humorales Zielantigen und MS Patienten weisen erhöhte anti-EBNA1-IgG-Spiegel auf. Der Sequenzbereich 88-323 mit Glycin und Alanin repetitiven Strukturen wurde bei Kindern mit MS als ein Ziel der humoralen Immunantwort beschrieben.³⁶ Andererseits konnte gezeigt werden, dass hohe anti-EBNA1-IgG-Spiegel gegen den Sequenzbereich 385-420 mit einem besonders hohen Risiko für MS einhergehen, siehe Tabelle 1.³⁷ Bislang wurden in den meisten Studien zur Untersuchung der Antikörper bei MS Patienten nur wenige EBV Proteine, vor allem EBNA1, untersucht und dies zumeist auch nur mit herkömmlicher ELISA-Technik. Es kann deshalb vermutet werden, dass neben EBNA1 weitere Peptide unter dem Gesichtspunkt einer veränderten humoralen Immunantwort bei MS von Interesse sein könnten. Darüber hinaus gibt es aktuell kontroverse Studienergebnisse zum Einfluss von immunmodulierenden Basistherapeutika wie Interferon- β auf die humorale Immunantwort bei MS.^{45,46} Die vorliegende Arbeit soll auch diesen möglichen Einflussfaktor untersuchen. Sofern bedeutende Unterschiede im Profil der Antikörper bei MS gegen EBV gefunden werden, stellt sich einerseits die Frage nach der klinischen Nutzbarkeit im Sinne eines diagnostischen Ansatzes und andererseits die Frage nach der Bedeutung dieser Befunde für die Assoziation von MS und EBV zu Grunde liegenden Pathomechanismen.

3. Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

In der vorliegenden Arbeit sollte die humorale Immunantwort bei Patienten mit schubförmig-remittierender MS gegen das Epstein Barr Virus untersucht werden. Dazu wurde in Kooperation mit JPT Peptide Technologies GmbH, Berlin, ein EBV-spezifischer Peptid-Microarray mit den Seren von MS Patienten und gesunden Kontrollen durchgeführt. Von Interesse mit Bezug zur aktuellen Diskussion sind dabei insbesondere folgende Fragestellungen:

- I. Gegen welche Sequenzbereiche von EBV-Proteinen richtet sich die humorale Immunantwort gegen EBV bei Patienten mit MS?

- II. Gibt es neben EBV-Peptiden oder Peptidbereichen die stärker erkannt werden auch solche, die im Vergleich zu gesunden Kontrollen weniger häufig erkannt werden?
- III. Hat eine medikamentöse immunmodulatorische Therapie mit Interferon- β oder Glatirameracetat einen Einfluss auf die EBV-spezifische humorale Immunantwort?
- IV. Könnten veränderte Antikörper-Muster als diagnostischer Ansatz bei der MS verwendet werden?

4. Patienten und Methoden

4.1 Studiendesign und Ethik

Bei der vorliegenden Arbeit handelt es sich um eine experimentelle Studie. Alle Studienteilnehmer haben der wissenschaftlichen Untersuchung ihres Blutes zu Forschungszwecken schriftlich zugestimmt und wurden davor sowohl mündlich wie auch schriftlich umfassend über alle Aspekte der Studie und einer Studienteilnahme von einem Arzt aufgeklärt. Die Blutproben wurden pseudoanonymisiert und die Dokumentation der im Rahmen der Studie erhobenen notwendigen Patientendaten wurden vor dem Zugriff unbefugter Dritter besonders geschützt. Für die Studie liegt ein erweitertes Ethikvotum (EA1/182/10): „Entwicklung diagnostischer Marker zur Abgrenzung von chronischem Erschöpfungssyndrom (CFS), Depression und Multipler Sklerose“ datiert vom 1.7.2010 bzw. 15.9.2010 (Addendum) vor. Gesunde Kontrollen wurden unter dem Laborpersonal bzw. Studierenden der Medizin rekrutiert und haben ebenfalls eine Einverständniserklärung abgegeben.

4.2 Studienpatienten und Gesunde Kontrollen

Im Zeitraum von 9/2010 bis 3/2011 wurden die Studienpatienten an der Charité rekrutiert. Einschlusskriterien waren volljährige, geschäftsfähige Patienten mit einer gesicherten schubförmig-remittierender Multiplen Sklerose nach den überarbeiteten McDonald-Kriterien, die weder chronische (HIV, HBV, HCV) noch akute Infektionen (z.B. grippaler Infekt) aufwiesen.⁴⁷ Des Weiteren wurden ausschließlich MS-Patienten rekrutiert, welche entweder keine pharmakologische MS-Therapie bekamen oder mit einer immunmodulatorischen Basistherapie mit Interferon- β -Präparaten oder aber Glatirameracetat behandelt wurden. Als spezielle Ausschlusskriterien wurden

Steroidtherapien definiert, welche weniger als 8 Wochen vor Rekrutierung durchgeführt wurden oder aber vorliegende Schwangerschaften.

4.3 Blutabnahme und Gewinnung des Serums

Im Rahmen der Blutentnahme wurde bei jedem Studienteilnehmer eine Sarstedt Serum-Monovette (9ml) abgenommen. Die Monovette wurden anschließend bis zur Bearbeitung im Labor bei Zimmertemperatur gelagert. Zur Gewinnung des Serums wurde der Inhalt der Serum-Monovette unter sterilen Arbeitsbedingungen in 50ml Falconröhrchen überführt. Anschließend wurde dieses bei 2000g 10min abzentrifugiert und der klare Überstand mit einer Pipette abgenommen und in ein beschriftetes 1,5 ml Eppendorfgefäß pipettiert, welches danach bei -20 Grad Celsius eingefroren wurde.

4.4 EBNA1-ELISA und Western Blot

Zunächst wurden die Seren aller Studienteilnehmer mittels kommerziellen ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay, Firma medac, Wedel, Deutschland) entsprechend Herstellerangaben auf anti-EBNA1-IgG-Antikörper untersucht. Proben mit fehlendem Nachweis wurden daraufhin mit einem kommerziellen Western Blot (Firma Mikrogen, Neuried, Deutschland) auf VCA- und EBNA1-IgG-Antikörper untersucht. Proben in denen weder EBNA1- noch VCA-Antikörper nachgewiesen werden konnten, wurden als EBV seronegativ bewertet und von dem anschließenden Peptid-Microarray ausgeschlossen.

4.5 Peptid-Microarray

Bei dem Peptid-Microarray wird das Funktionsprinzip eines ELISA genutzt: Bekannte Antigene aus einer Epitope-Bibliothek werden mit Sera von Patienten inkubiert, dabei binden – sofern vorhanden - Antikörper an ihr spezifische Antigen und werden im folgenden Waschschrift nicht entfernt. Die Bindung des Antikörpers wird anschließend mit einem Sekundärantikörper mit Fluoreszenzsignal nachgewiesen. Die Peptide wurden per SPOT-Synthese erzeugt und anschließend auf Glasplatten „gedruckt“.^{48,49} Auf der Glasplatte gespottet liegen die Peptidstücke als Antigene mit einer linearen Konformation vor, sodass für die Antigen-Antikörper Interaktion maßgeblich die Aminosäuresequenz ist und andere Strukturelemente von untergeordneter Rolle sind. Anhand der bei Uniprot hinterlegten Proteinsequenzen von 8 EBV (Zelllinie B95-8)-Proteinen wurde eine Peptid-Bibliothek angelegt.⁵⁰ Dabei wurden die Proteine als 15 Aminosäuren lange Peptidfragmente repräsentiert, welche sich fortlaufend in 11

Aminosäuren überlappen. Beispielhaft wird dieses Prinzip anhand der ersten 3 Peptide des EBNA1 Proteins verdeutlicht:

EBNA1-Sequenz 1-30: MSDEGPGTGPGNGLGEKGDTS GPEGSGGSG

EBNA1-Peptid 001: MSDEGPGTGPGNGLG

EBNA1-Peptid 002: GPGTGPGNGLGEKGD

EBNA1-Peptid 003: GPGNGLGEKGDTS GP

Entsprechend dieser Vorgehensweise wurden 1465 Peptide aus den folgenden 8 EBV-Proteinen erzeugt:

EBV Protein	UniProt ID⁵⁰	Länge des Proteins in Aminosäuren	Anzahl der Peptide im Array
EBNA1	EBNA1_EBVB9	641	210
EBNA3	EBNA3_EBVB9	944	311
EBNA4	EBNA4_EBVB9	938	309
EBNA6	EBNA6_EBVB9	992	327
LMP1	LMP1_EBVB9	386	125
VP26	VP26_EBVB9	176	55
BLRF2	BLRF2_EBVB9	162	50
BZLF1	BZLF1_EBVB9	245	78

Tabelle 2: Auflistung der in dem Peptid-Microarray verwendeten EBV-Proteine mit entsprechender UniProt ID sowie Angabe der Proteinlänge und Anzahl daraus abgeleiteter Peptide

Der Peptid-Microarray wurde in Kooperation mit der Firma JPT, Berlin, durchgeführt. Zunächst wurde das Serum mit proteinfreiem T20 (TBS) auf 1:200 verdünnt. Anschließend erfolgte die automatische Inkubation mit der Inkubierstation HS4900 der Firma Tecan. Durch fünf Waschvorgänge mit TBS wurden überschüssige, nicht gebundene Antikörper entfernt. Daraufhin wurden die Glasplatten mit einem sekundären anti-humanen Cy5-konjugierten IgG Maus-Antikörper inkubiert. Es folgten erneut jeweils fünf Waschvorgänge mit TBS und demineralisiertem Wasser um

Salzrückstände zu entfernen. Zuletzt erfolgte das Auslesen des Fluoreszenzsignals durch den Genepix 4200A Scanner.

4.6 Materialien, Geräte und Chemikalien

Anti-EBNA1-IgG-ELISA	Medac, Wedel
Anti-EBNA1-VCA-IgG Western Blot („recomBlot“)	Mikrogen, Neuried
„PepStar“Peptid- Microarray	JPT Peptide, Berlin
Vacutainer Systems, REF 367261	BD, Franklin Lakes, USA
Monovette Serum 9ml, REF 02.1063	Sarstedt AG & Co. Nümbrecht
Multi-Adapter für S-Monovetten REF 14.1205	Sarstedt AG & Co. Nümbrecht
Falconröhrchen 50ml	BD, Franklin Lakes, USA
Eppendorfpipette und –spitzen	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge „Heraeus Multifuge 3SR+“	Fischer Scientific, Schwerte
Eppendorfgefäß 1,5ml	Eppendorf, Hamburg
Bench „KS12“	Thermo Electron Corporation, Langenselbold
Tiefkühler „Premium No Frost“	Liebherr, Biberach an der Riss
Genepix 4200A Scanner	Molecular Devices, USA
Inkubierstation Tecan HS4800	Tecan Group Ltd, Schweiz
T20 (PBS) Blocking Buffer	Pierce, Thermo Fisher Scientific, USA
Cy5-Anti-IgG-Antikörper	Jackson Immuno Research, USA

Tabelle 3: Auflistung von Materialien, Geräten und Chemikalien

4.7 Software

Genepix Software 7.0	Molecular Devices, USA
R Statistikprogramm	The R Foundation for Statistical Computing

SPSS Statistics 21	IBM
Word und Excel 2010	Microsoft
Zotero 3.0.11.1	Roy Rosenzweig Center for History and New Media Department of History and Art History George Mason University

Tabelle 4: Auflistung der verwendeten Software

4.8 Statistische Analyse

Die Daten mehrerer Arrays wurden zur weiteren statistischen Analyse zunächst einer quantilen (inter-array) Normalisierung unterzogen. Hierbei wurde entsprechend der zu Grunde liegenden Idee des Verfahrens angenommen, dass die Histogramme aller Microarrays gleich aussehen.⁵¹ Das Ziel ist somit, dass etwaige Unterschiede in Hinblick auf die Farbstoffeffekte, Spotgröße und –form sowie Scanner - also insgesamt die technische Varianz - weitgehend egalisiert werden und nur noch die tatsächliche biologische Varianz verglichen wird. Dazu wurden die Daten, welche in der relativen Einheit „arbitrary fluorescence units“ (AFU) vorliegen, entsprechend mit der R Software bearbeitet. Die anschließende Auswertung der Daten erfolgte mit dem Programm SPSS 21. Es wurde ein Signifikanzniveau von $p \leq 10^{-3}$ für jedes untersuchte Peptid festgelegt und mittels nichtparametrischen Mann-Whitney-U-Test die Verteilungen der beiden Gruppen als Rangsummentest verglichen.

4.8.1 Bonferroni-Korrektur

Die große Anzahl von 1465 Peptiden und somit 1465 Werte pro Studienteilnehmer birgt bei der statistischen Auswertung die Gefahr der α -Fehler Kumulierung. Die Bezeichnung Alphafehler oder Fehler 1. Art wird in der Statistik verwandt, wenn ein falsch-positives Ergebnis vorliegt oder mit anderen Worten: Wenn eine Nullhypothese („Es gibt keinen Unterschied“) abgelehnt wurde, obwohl sie tatsächlich zutrifft. Durch multiple Testung erhöht sich die Gefahr, dass ein Testergebnis falsch-positiv im Sinne eines Fehlers 1. Art ausfällt. Eine näherungsweise Formel für die Berechnung der Gefahr eines Fehlers 1. Art in Abhängigkeit vom zu verwendenden Signifikanzniveau (α) und der Anzahl der Test ist:

$$\text{Wahrscheinlichkeit für einen Fehler 1. Art in \%} = [1 - (1 - \alpha)^{\text{Anzahl Testungen}}] \cdot 100$$

modifiziert nach Streiner et al. ⁵²

Würde man somit bei der Auswertung des Peptid-Microarrays ein übliches Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$ bestimmen, so würde man bei 1465 Testungen nach obiger Formel mit an Sicherheit grenzender Wahrscheinlichkeit einen Fehler 1. Art erhalten:

$$\begin{aligned} & [1 - (1-0,05)^{1465}] 100 \\ & = [1 - 2,317 \cdot 10^{-33}] 100 \\ & \approx 100 \% . \end{aligned}$$

Um nun eine Kumulierung des Alphafehlers bei umfangreicheren Testungen zu unterbinden gibt es verschiedene Möglichkeiten: Auf der einen Seite kann man das Signifikanzniveau a priori deutlich geringer ansetzen, wie auch in der vorliegenden Arbeit vorgenommen ($p \leq 10^{-3}$). Eine weitere einfach anzuwendende dafür aber vergleichsweise konservative Methode ist die Korrektur nach Carlo Emilio Bonferroni („Bonferroni-Methode“). Hierbei wird das (globale) α - Signifikanzniveau praktisch auf alle Testungen aufgeteilt, sodass es in der Summe aller positiven, d.h. signifikanten Tests, nicht überschritten werden kann. Berechnung des modifizierten α' - Niveaus nach Bonferroni :

$$\text{Neues } \alpha' \text{- Signifikanzniveau} = \text{Globales } \alpha \text{ Signifikanzniveau} \div \text{Anzahl der Testungen.}^{52}$$

bezogen auf die vorliegende Arbeit:

$$\text{Neues } \alpha' \text{- Signifikanzniveau} = 0,05 \div 1465$$

$$\text{Neues } \alpha' \text{- Signifikanzniveau} = 3,41 \cdot 10^{-5}$$

Die vorgestellte Bonferroni-Korrektur wurde bei der statistischen Auswertung der Ergebnisse ebenfalls im Rahmen des Mann-Whitney-U-Test angewandt.

4.8.2 Kruskal-Wallis-Test

Innerhalb der MS-Gruppe wurde mittels nicht-parametrischen Kruskal-Wallis-Tests eine Subgruppenanalyse bezüglich des Einflusses der immunmodulatorischen Therapie auf die signifikant veränderten EBV-Antikörper durchgeführt.

4.8.3 Receiver Operating Characteristic

Anhand von Grenzwertoptimierungskurven soll bei signifikant veränderten Antikörperreaktivitäten die Aussagefähigkeit und Wertigkeit eines diagnostischen Tests zur Unterscheidung von Patienten mit MS versus gesunden Kontrollen simuliert werden. Von entscheidender Bedeutung ist dabei für die Testqualität die Angabe der von der Kurve eingeschlossenen area under the curve (AUC). Die AUC kommt dabei ohne Angabe von konkreten cut-offs aus und kann Werte zwischen 0 und 1 annehmen. Werte um die 0,5 deuten auf einen Zufallsprozess hin und sind somit nicht zu verwerfen für einen diagnostischen Test.⁵³ AUC-Werte über 0,7 sind dagegen mit einer deutlich höheren Sensitivität und Spezifität verbunden und im Rahmen eines diagnostischen Tests von Nutzen.

5. Ergebnisse

Nach den oben aufgeführten Kriterien konnten 29 Patienten (21 Frauen, 8 Männer) und 24 gesunde Kontrollen (15 Frauen, 9 Männer) rekrutiert werden. Der Unterschied in der Geschlechterverteilung zwischen den Gruppen ist nach dem Fisher's exact test nicht signifikant ($p=0,56$). Dagegen zeigte sich der Alters-Median von 34 Jahren (Spannweite 19-53) bei der MS-Gruppe signifikant höher ($p=0,02$ nach Mann-Whitney-U-Test) als der der gesunden Kontrollen (28 Jahre, Spannweite 22-62). Von den 29 rekrutierten Patienten erhielten zum Zeitpunkt der Rekrutierung 12 eine Interferon- β -Therapie, 10 keine Therapie und 7 eine Glatirameracetat-Therapie.

5.1. EBNA1-ELISA und Western Blot

Alle 29 (100%) untersuchten Seren von MS-Patienten zeigten einen positiven EBNA1-ELISA und wurden somit als EBV positiv eingestuft. Hingegen zeigte sich bei den gesunden Kontrollen in 2 von 24 Proben sowohl im initialen EBNA1-ELISA als auch im Western Blot keine Antikörper gegen EBNA1 oder VCA, wodurch diese Proben als EBV negativ klassifiziert und folglich von der weiteren Untersuchung ausgeschlossen wurden. Somit ergibt sich in den untersuchten MS-Patienten eine 100 % EBV-Seropositivität versus einer 91,7% bei den gesunden Kontrollen ($p=0,20$ nach Fisher's exact test), dies bestätigt die in der Einleitung aufgeführten bekannten sero-epidemiologischen Erkenntnisse (vgl. 2.4).

Für den Vergleich der Antikörperreaktivitäten gegen die 1465 EBV Peptide des Microarrays wurden somit die 29 MS-Patienten mit 22 EBV-positiven gesunden Kontrollen verglichen.

5.2 Peptid-Microarray

5.2.1 Signifikante Peptide

Bei Analyse der AFU zwischen den Gruppen mit dem Mann-Whitney-U-Test und der oben beschriebenen Bonferroni Korrektur konnten 3 Peptide ausgemacht werden, welche unterhalb des Signifikanzniveaus von $p \leq 3,41 \cdot 10^{-5}$ lagen:

EBV-Peptid_ Sequenzbereich	Peptidsequenz	exakte Signifikanz
EBNA1_ 109-123	AGAGGGAGGAGGAGG	0,000003
EBNA1_ 214-228	GAGGAGAGGGAGGAG	0,000005
EBNA6_ 841-855	GHGQDQVSQFPHLQS	0,000005

Tabelle 5: Auflistung der Peptide mit signifikant ($p \leq 3,41 \cdot 10^{-5}$) veränderter humoralen Immunantwort bei MS

Diese Peptide zeigen in der MS Gruppe signifikant erhöhte Antikörperreaktivitäten. Die erhöhten Reaktivitäten gegen diese drei Peptide bei Patienten mit MS und gesunden Kontrollen sind in den Diagrammen 1-3 als Boxplots dargestellt.

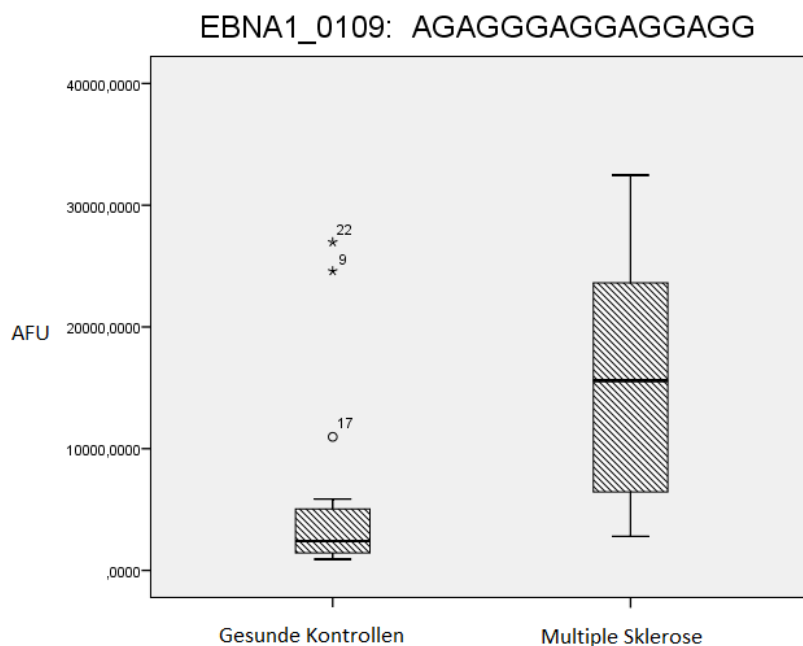


Diagramm 1

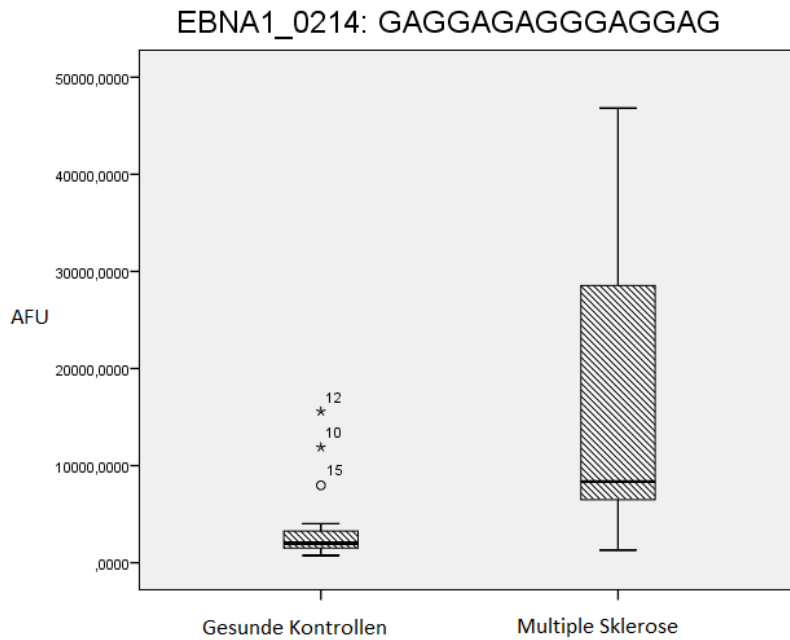


Diagramm 2

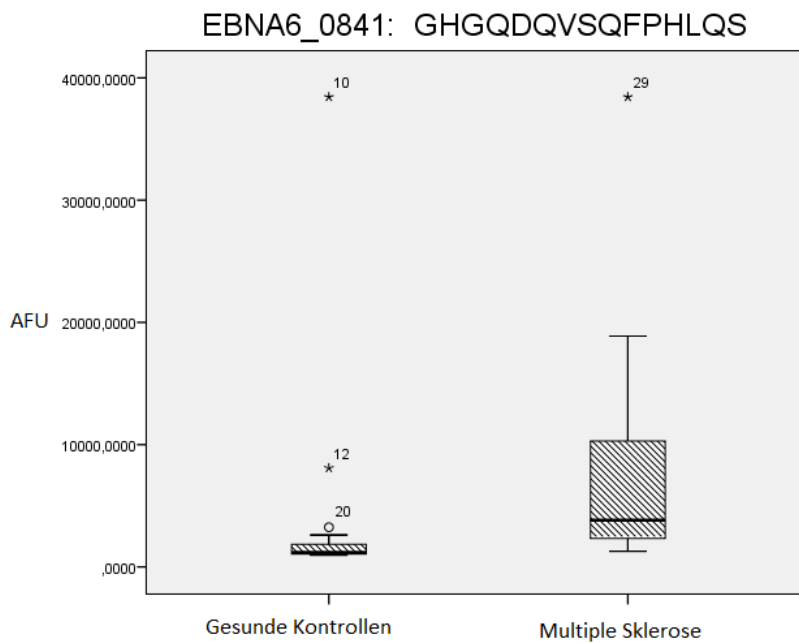


Diagramm 3

Diagramme 1-3: Boxplot-Darstellung der 3 signifikanten Peptide nach Mann-Whitney-U-Test und Bonferroni-Korrektur ($p \leq 3,41 \cdot 10^{-5}$); y-Achse zeigt arbitrary fluorescence units (AFU); x-Achse mit den Studiengruppen; Kreise kennzeichnen Ausreißerwerte, Sternchen Extremwerte; Diagramm 1: EBNA1_ 109-123; Diagramm 2: EBNA1_ 214-228; Diagramm 3: EBNA6_ 841-855.

Bei einer weniger konservativen statistischen Auswertung und einem Signifikanzniveau von $p \leq 10^{-3}$ konnten 39 Peptide mit einer veränderten Antikörperreaktivität bei der MS-Gruppe identifiziert werden, siehe Tabelle 6.

EBV-Peptid_ Sequenzbereich	Peptidsequenz	exakte Signifikanz
EBNA1_ 109-123	AGAGGGAGGAGGAGG	0,000003
EBNA1_ 214-228	GAGGAGAGGGAGGAG	0,000005
EBNA6_ 841-855	GHGQDQVSQFPHLQS	0,000005
EBNA3_ 064-078	RKRVDHDAGGSAPAR	0,000111
EBNA1_ 250-264	AGGAGAGGAGGAGAG	0,000119
EBNA1_ 142-156	AGAGGGAGAGGGAGG	0,000124
EBNA1_ 544-558	APGPGPQPGLRESI	0,000124
EBNA1_ 268-282	GAGAGGGAGGAGAGG	0,000143
VP26_ 016-030	ADFPDSPLLPKFQEL	0,000155
EBNA1_ 154-168	AGGAGAGGGAGGAGG	0,000176
EBNA3_ 400-414	EQGKEVLEKARGSTY	0,000184
EBNA6_ 154-168	DIRRGPLVAEGGVGW	0,000185
EBNA1_ 385-399	SSQSSSSGSPRRPP	0,000201
EBNA6_ 826-840	DPRAPHLPPQWDGSA	0,000206
EBNA3_ 421-435	VPKPRPEVPQSDETA	0,000208
EBNA1_ 157-171	AGAGGGAGGAGGAGA	0,000219
EBNA1_ 193-207	AGGAGAGGGAGAGGA	0,000228
EBNA1_ 355-369	GRGRERARGGSRERA	0,000241
EBNA3_ 898-912	RTPEWPVQGEQQNV	0,000244
EBNA3_ 652-666	DVVRAPGVPAMQPQY	0,000244
EBNA6_ 691-705	VMDAGKAQPIESSHL	0,000268
EBNA1_ 196-210	AGAGGGAGAGGAGGA	0,000293
EBNA1_ 271-285	AGGGAGGAGAGGGAG	0,00033
LMP1_ 367-381	SGSGGDDDDPHGPVQ	0,00035

EBNA3_ 859-873	DLSIHGRPCPQAPEW	0,00037
EBNA1_ 379-393	KRPRSPSSQSSSSGS	0,00038
EBNA4_ 601-615	QPSQTPDDPTKQSRP	0,00039
VP26_ 004-018	RLPKPTLQGRLEADF	0,00039
EBNA3_ 667-681	FDLPLIQPISQGAPV	0,00043
EBNA4_ 532-546	PRAGRRGPCVFTGDL	0,00047
EBNA6_ 820-834	HTQGPWDPRAPHLPP	0,00050
EBNA1_ 175-189	AGAGGGAGGAGAGGG	0,00050
EBNA6_ 151-165	RLQDIRRGPLVAEGG	0,00052
EBNA4_ 688-702	QWAPATMQTPPRAPT	0,00055
EBNA1_ 151-165	GGGAGGAGAGGGAGG	0,00061
EBNA4_ 769-783	KQILRQLLTGGVKKG	0,00066
EBNA4_ 469-483	LSVQARLEPWQPLPG	0,00071
EBNA1_ 232-246	AGGAGAGGAGAGGAG	0,00080
EBNA4_ 472-486	QARLEPWQPLPGPQV	0,00095

Tabelle 6: 39 EBV Peptide mit einer Signifikanz kleiner $p \leq 10^{-3}$

Von diesen 39 EBV Peptiden, welche bei MS allesamt erhöhte Reaktivitäten zeigen, sind zahlenmäßig die meisten aus dem EBNA1-Protein (n= 17; 44%), gefolgt von EBNA3 (n= 7), EBNA4 und EBNA6 (jeweils: n=6), VP26 (n=2) und LMP1 (n=1), siehe Diagramm 4.

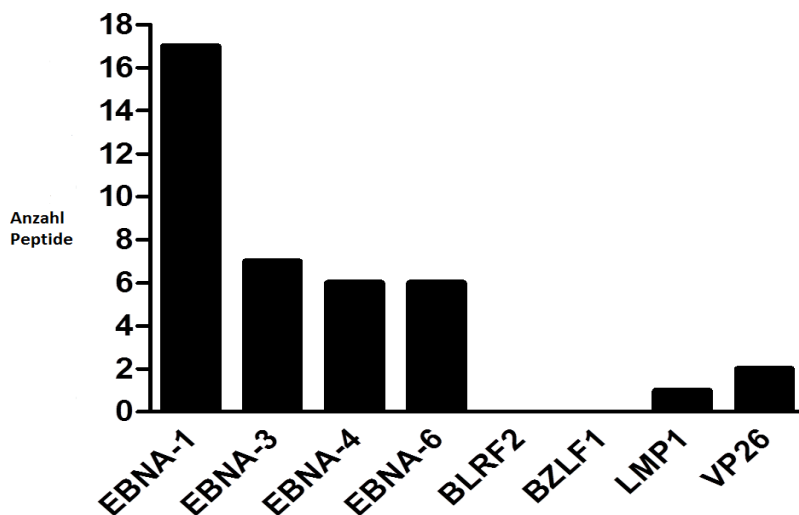


Diagramm 4: Zuordnung der 39 Peptide mit $p \leq 10^{-3}$ zum entsprechenden EBV Protein

Von den 17 signifikanten EBNA1-Peptiden sind wiederum 13 (76%) in dem Bereich mit vielen Glycin-Alanin-Wiederholungen (Sequenzbereich 90-328) lokalisiert und nur 4 im C-terminalen Bereich des Proteins (Sequenz 355-588), siehe Diagramm 5.

	<u>10</u>	<u>20</u>	<u>30</u>	<u>40</u>	<u>50</u>	<u>60</u>
EBNA-1	MSDEGPGTGP	GNGLGKGD	SGPEGSGGSG	PQRRGGDNHG	RGRGRGRGRG	GGRPGAPGGS
	<u>70</u>	<u>80</u>	<u>90</u>	<u>100</u>	<u>110</u>	<u>120</u>
	GSGPRHRDGV	RRPQKRPSCI	GCKGTHGGTG	AGAGAGGAGA	GGAGAGGGAG	AGGGAGGAGG
109-123					AG	AGGGAGGAGG
	<u>130</u>	<u>140</u>	<u>150</u>	<u>160</u>	<u>170</u>	<u>180</u>
	AGGAGAGGGA	GAGGGAGGAG	GAGAGGGAGA	GGGAGGAGAG	GGAGGAGGAG	AGGGAGGAGG
	AGG					
142-156			AGAGGGAGA	GGGAGG		
151-165				GGGAGGAGAG	GGAGG	
154-168				AGGAGAG	GGAGGAGG	
157-171				AGAG	GGAGGAGGAG	A
175-189						AGAGGG
	<u>190</u>	<u>200</u>	<u>210</u>	<u>220</u>	<u>230</u>	<u>240</u>
	AGGAGAGGGA	GGAGGAGAGG	GAGAGGAGGA	GGAGAGGAGA	GGGAGGAGGA	GAGGAGAGGA
	AGGAGAGGG					
193-207		AGGAGAGG	GAGAGGA			
196-210		AGAGG	GAGAGGAGGA			
214-228				GAGGAGA	GGGAGGAG	
232-246						AGGAGAGGA
	<u>250</u>	<u>260</u>	<u>270</u>	<u>280</u>	<u>290</u>	<u>300</u>
	GAGGAGAGGA	GGAGAGGAGG	AGAGGAGGAG	AGGGAGGAGA	GGGAGGAGAG	GAGGAGAGGA
	GAGGAG					
250-264	A	GGAGAGGAGG	AGAG			
268-282			GAG	AGGGAGGAGA	GG	
271-285				AGGGAGGAGA	GGGAG	
	<u>310</u>	<u>320</u>	<u>330</u>	<u>340</u>	<u>350</u>	<u>360</u>
	GGAGAGGAGG	AGAGGGAGAG	GAGAGGGGRRG	RGGSGGRGRG	GSGGRGRGGS	GRRRGRGRER
355-369						GRGRER
	<u>370</u>	<u>380</u>	<u>390</u>	<u>400</u>	<u>410</u>	<u>420</u>
	ARGGSRERAR	GRGRGRGEKR	PRSPSSQSSS	SGSPRRPPP	GRRPFFHPVG	EADYFEYHQE
	ARGGSRERA					
379-393		KR	PRSPSSQSSS	SGS		
385-399			SSQSSS	SGSPRRPP		
	<u>430</u>	<u>440</u>	<u>450</u>	<u>460</u>	<u>470</u>	<u>480</u>
	GGPDGEPDVP	PGAIEQGPAD	DPGEGPSTGP	RGQDGGRRK	KGGWFGKHRG	QGGSNPKFEN
	<u>490</u>	<u>500</u>	<u>510</u>	<u>520</u>	<u>530</u>	<u>540</u>
	IAEGLRALLA	RSHVERTTDE	GTWVAGVFVY	GGSKTSLYNL	RRGTALAIPIQ	CRLTPLSRLP
	<u>550</u>	<u>560</u>	<u>570</u>	<u>580</u>	<u>590</u>	<u>600</u>
	FGMAPGPGPQ	PGPLRESIVC	YFMVFLQTHI	FAEVLKDAIK	DLVMTKPAPT	CNIRVTVCSF
544-558	APGPGPQ	PGPLRESI				
	<u>610</u>	<u>620</u>	<u>630</u>	<u>640</u>		
	DDGVDLPPWF	PPMVEGAAAE	GDDGDDGDEG	GDGDEGEEGQ	E	

Diagramm 5: Darstellung der Lokalisation der 17 Peptide im EBNA1 Protein mit $p \leq 10^{-3}$. Der Bereich mit vielen Glycin-Alanin Wiederholungen ist unterstrichen.

Die Darstellung der Lokalisation der Peptide aus EBNA1 verdeutlicht, dass es sich zum Teil um überlappende Sequenzen handelt. Der Sequenzbereich 154-156 von EBNA1 wird von 3 der signifikanten Peptide eingeschlossen, ebenso 157-165. Weitere Überlappungen finden sich an Position 196-207 sowie 385-393.

5.2.2 MS-Subgruppenanalyse Medikation

In der Subgruppenanalyse der MS Patienten zeigt sich im Kruskal-Wallis-Test kein signifikanter Unterschied ($p \geq 0,05$) der Reaktivitäten für die in Tabelle 6 aufgeführten 39 Peptiden zwischen den Subgruppen von Patienten mit unterschiedlichen Therapien (keine/ β -Interferon/ Copaxone).

5.2.3 Antikörper-ROC-Analyse

Anhand der 3 hoch-signifikanten Peptide ($p \leq 3,41 \cdot 10^{-5}$) wurde folgende kombinierte ROC-Kurven erstellt:

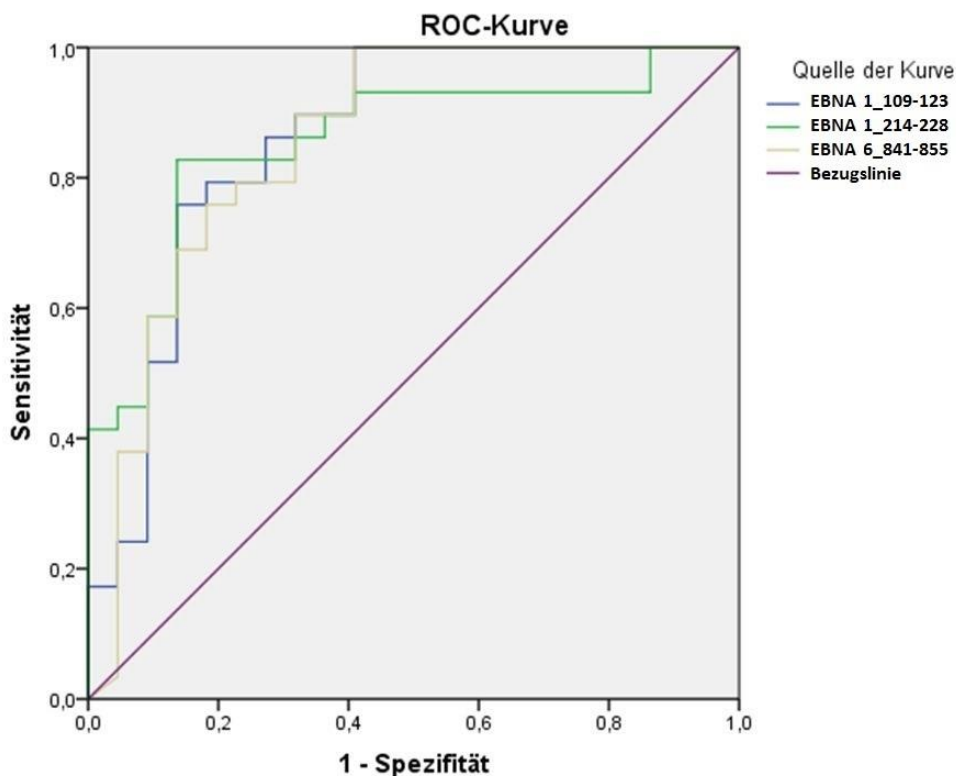


Diagramm 6: ROC-Kurven der 3 signifikantesten Peptide ($p \leq 3,41 \cdot 10^{-5}$)

Dabei ergeben sich folgende AUC -Werte:

Peptid_Sequenzbereich	AUC
EBNA1_109-123	0,861
EBNA1_214-228	0,856
EBNA6_841-855	0,855

Tabelle 7: AUC-Werte für die 3 signifikantesten Peptide

Durch die kombinierte Darstellung der 3 Peptide in Form einer Kurve ergibt sich folgendes Diagramm:

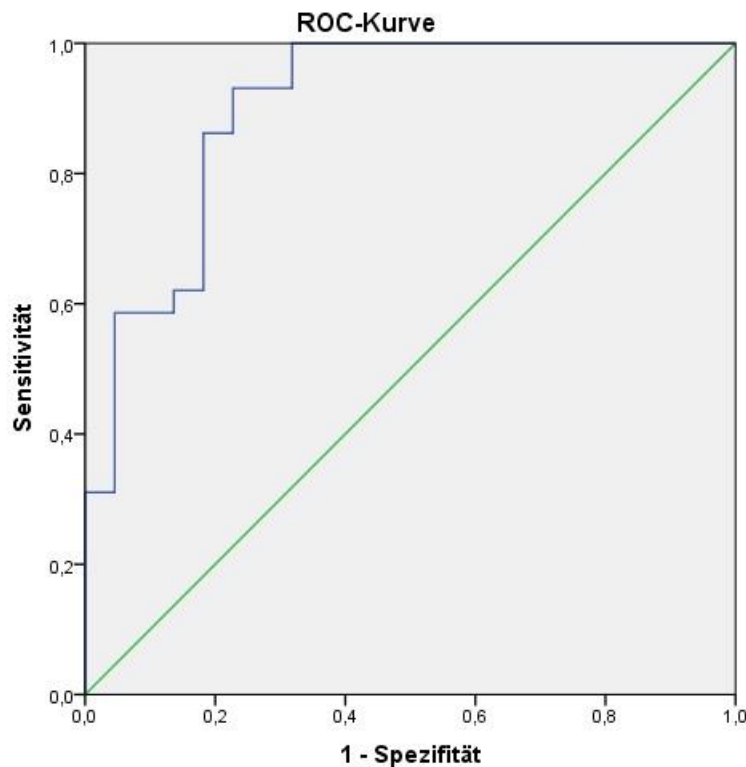


Diagramm 7: Kombinierte ROC-Kurve der 3 signifikantesten Peptide ($p \leq 3,41 \cdot 10^{-5}$) in blau dargestellt mit grüner Bezugslinie

Die kombinierte Kurve schließt eine AUC von 0,901 ein.

6. Diskussion

Die umfangreichen Daten aus dem durchgeführten EBV-Peptid-Microarray, bestehend aus 1465 EBV-Peptiden, geben einen bislang einzigartigen Einblick in die Feinspezifität der veränderten humoralen Immunantwort gegen EBV bei Patienten mit MS. In Abhängigkeit des angewandten Signifikanzniveaus konnten mittels konservativer

Bonferroni-Methode 3 signifikante Peptide und bei einem Signifikanzniveau von $p \leq 10^{-3}$ hingegen 39 signifikante Peptide mit erhöhter Antikörperreaktivität bei MS nachgewiesen werden. Auf Grund der Tatsache, dass mit der verwendeten Bonferroni-Methode zwar ein Fehler 1. Art eingedämmt werden kann, dies jedoch unweigerlich zu einem vermehrten Auftreten eines Fehlers 2. Art („falsch-negative Entscheidung“) führt, sollen im weiteren vorwiegend die Ergebnisse auf Grundlage des an sich schon konservativen Signifikanzniveaus von $p \leq 10^{-3}$ diskutiert werden:

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass bei MS eine erhöhte Antikörperreaktivität vorwiegend gegen EBNA1 gerichtet ist. Damit werden gleich lautende Studienergebnisse anderer Publikationen bestätigt.^{36,54-56} Neben EBNA1 zeigen die Daten jedoch darüber hinaus auch eine erhöhte Reaktivität gegen weitere EBV-Kernproteine, vor allem EBNA3, EBNA4 und EBNA6 sowie LMP1, welche bislang in diesem Umfang nicht bekannt gewesen sind. Passend zu diesen Daten, konnten Munger et al. zeigen, dass erhöhte Antikörpertiter gegen EBNA-Komplex, welcher die Kernproteine 1-6 enthält, mit einem 36fach erhöhten und solche gegen EBNA1 lediglich mit einem 8fach erhöhten MS-Risiko verbunden sind.⁵⁷ Weitere Studien kamen ebenso wie die vorliegende Arbeit zu dem Ergebnis, dass die humorale Reaktivität gegen VP26, bzw. das übergeordnete VCA-Protein bei MS erhöht ist.⁵⁵⁻⁵⁷ Wenngleich die Immunantwort bei MS gegen EBV somit gegen verschiedene Proteine erhöht ist, so gibt es dennoch „hot spots“ die im Focus der weiteren Ausführungen stehen. So sind von 39 signifikanten Peptiden ($p \leq 10^{-3}$) 17 in EBNA1 lokalisiert. Betrachtet man diese 17 Peptide, so sind von diesen nochmals 13 im Bereich der Glycin-Alanin-Wiederholungen zu finden und lediglich 4 im C-terminalen Bereich, vgl. Diagramm 5. Dies bestätigt eine vorangegangene Studie, welche den EBNA1 Bereich mit den Glycin-Alanin-Wiederholungen als bei MS bedeutsam verändert beschreibt hinsichtlich der Antikörperreaktivität.³⁶ Andere Studien kamen hingegen zu dem Ergebnis, dass der C-terminale EBNA1-Bereich von der humoralen Immunantwort bei MS vermehrt erkannt wird. So zeigten die Resultate von Mechelli et al. auf den Sequenzbereich 401-411, die von Jafari et al. auf 394-451 und die von Sundstrom et al. auf 385-420.⁵⁸⁻⁶⁰ Salzer et al. beschrieben, dass ein erhöhter Antikörpertiter gegen EBNA1, Sequenzbereich 385-420, mit einem größeren Risiko für MS verbunden ist als bei erhöhten Titern gegen das gesamte EBNA1-Protein. Auch in der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass der C-terminale Bereich um 379-399 relevante Peptide umfasst. Vor dem Hintergrund

verschiedener Studien ist es jedoch wichtig darauf hinzuweisen, dass die zitierten Arbeiten methodisch zumeist mit herkömmlicher ELISA-Technik durchgeführt wurden und somit meist nur wenige und kurze Sequenzbereiche vergleichen konnten, wohingegen in der vorliegenden Arbeit ein hochauflösendes Epitop-Mapping mit 8 kompletten EBV Proteinen durchgeführt wurde, sodass alle Bereiche der erfassten Proteine untersucht werden konnten. Letztlich kommt die vorliegende Arbeit somit zu dem Ergebnis, dass die humorale Immunantwort bei MS gegen EBV auf einer breiten Basis verändert ist, sich jedoch in der Gesamtheit betrachtet nicht fundamental von gesunden Kontrollen unterscheidet, bei denen EBNA1 ebenfalls das EBV-Zielantigen darstellt.⁶¹ Am auffälligsten sind diese Veränderungen bei EBNA1 und hierbei im Sequenzbereich der Glycin-Alanin-Wiederholungen um 142-285.

Hinsichtlich einer klinischen Relevanz der gewonnenen Erkenntnisse weist die auf Grundlage der 3 signifikantesten Peptide berechneten ROC-Kurve mit einer kombinierten AUC von 0,901 einen exzellenten Wert auf. Konkret könnte somit anhand eines fiktiven Grenzwertes beispielsweise mit einer 86% Sensitivität und einer 81% Spezifität zwischen Erkrankten und Gesunden unterschieden werden. Angesichts einer derartig hohen Testqualität stellt sich die Frage nach einem „MS-Biomarker“. Vor dem Hintergrund, dass retrospektive sero-epidemiologische Studien zeigen konnten, dass die gegen EBV veränderte Antikörperantwort bei MS bereits Jahre vor Diagnosestellung auffällig verändert ist, ergibt sich ein potentiell denkbarer diagnostischer Ansatz bei Patienten mit klinisch isoliertem Syndrom (CIS). Andererseits wurde die vorliegende Studie mit Patienten einer definitiv diagnostizierten schubförmigen MS durchgeführt und somit müssen weitere Studien zunächst belegen, dass die Ergebnisse auch auf frühere Erkrankungsphasen übertragbar sind. Sollte dies der Fall sein, so würde sich zweifelsohne ein weiterer Ansatzpunkt für die Therapie- und Risikostratifizierung ergeben, der primär auf den vermutlich zu Grunde liegenden immunologischen Veränderungen beruht und nicht, wie die aktuell geltenden Diagnosekriterien, hauptsächlich die organischen Folgen dieser im Verlauf heranzieht. Dazu muss angemerkt werden, dass auch die in dieser Studie erbrachten Erkenntnisse für sich genommen keine direkten Rückschlüsse auf die genaue Ursache der veränderten humoralen Immunität bei MS zulassen: Die klassische Theorie eines molecular mimicry also eines kreuzreagierenden Antikörper ist weiterhin prinzipiell denkbar. In diese Richtung zeigen auch aktuelle Forschungsergebnisse von Mameli et al., welche

belegen, dass bei MS erhöhte Antikörper gegen EBNA1, Sequenzbereich 400-413, vorliegen und dass diese mit dem Myelin-basischen Protein, Sequenzbereich 121-132, kreuzreagieren können.⁴¹ In der vorliegenden Arbeit konnten dagegen keine signifikanten Veränderungen für den genannten Bereich 400-413 gefunden werden (EBNA1_400-414; $p=0,12$). Im Kontext einer aktuellen Studie, wonach MS Patienten eine Defizienz von „effector-memory“ CD8+ T-Zellen bei normal verteilten CD4+ T-Zellen aufweisen, kann spekuliert werden, dass dies eine mögliche Erklärung für eine erhöhte Suszeptibilität von MS Patienten gegenüber EBV sein könnte und dass eine symptomatische Erstinfektion – mit damit verbundenen erhöhtem MS-Risiko - und anschließend vermehrte lytische Replikationszyklen von EBV im Körper eine Folge davon sind.²⁶ Folglich diesen Überlegungen müsste die Anzahl der EBV-infizierten Zellen bei MS erhöht sein. Genau zu dieser Schlussfolgerung kommt eine Studie, welche die durch EBV induzierten lymphoblastischen Transformationen in B-Zellen untersuchte und dabei bei MS eine signifikant erhöhte Inzidenz an Transformationen nachwies.²⁸ Diese Studie verwendete Cyclosporin zur Inhibierung der T-Zellen, sodass die erhöhte Anzahl an Transformationen hier nicht auf einen zellulären Mechanismus, sondern wahrscheinlich auf eine erhöhte Anzahl latent infizierter B-Zellen zurückzuführen war. Vor diesem Hintergrund lassen sich die Veränderungen hinsichtlich der humoralen Immunantwort gegen EBV möglicherweise begründen durch eine verminderte Immunkontrolle des Virus bei einer erhöhten Anzahl von latent infizierten Zellen und somit einer häufigeren Reaktivierung des Virus bei MS. Für letzteres gibt eine PCR-Studie von Yea et al. Hinweise, welche bei Kindern mit MS eine vermehrte orale Ausscheidung des Virus nachweisen konnte.⁶² Demzufolge wäre eine verstärkte humorale Immunantwort gegen EBV als Folge dieser Vorgänge kausal im Sinne eines Epiphänomens zu begründen. In wie weit die auffälligen Antikörper jedoch auch eine kausale Wirkung im Rahmen der Pathogenese haben bleibt kontrovers diskutiert. Während Farrell et al. einen signifikanten Zusammenhang zwischen erhöhten anti-EBNA1-IgG-Spiegeln und der Anzahl sowie dem Volumen der mit Gadolinium angereicherten Läsionen im ZNS fand, konnte Ingram et al. keinen Zusammenhang zwischen anti-EBNA1-IgG-Spiegeln und der Krankheitsdauer oder dem Grad der klinischen Behinderung feststellen.^{63,64} Eine neuere MRT-Studie konnte - ähnlich wie Farrell et al. - zeigen, dass die Krankheitsaktivität im Sinne einer vermehrten Läsionslast assoziiert ist mit hohen anti-EBNA1-IgG-Antikörperspiegeln, OR = 2.95 ($p=0.036$).⁶⁵

Sollten sich Antikörper gegen EBV somit als Biomarker für die MS selbst und auch für die Krankheitsaktivität als aussagekräftig erweisen, so wäre ihnen möglicherweise auch eine kausale Wirkung im Rahmen der Pathogenese der Erkrankung zuzuschreiben. Ein einfaches Epiphänomen, wie es lange Zeit favorisiert wurde, als Grundlage der Auffälligkeiten wäre dann unwahrscheinlicher. Prinzipiell könnten die Antikörper selbst eine pathogenetisch relevante Rolle spielen oder aber eng mit einem pathogenetisch relevanten Mechanismus korrelieren.

Gegen eine pathogenetisch relevante Rolle von EBV-Antikörpern spricht jedoch, dass solche im Liquor von MS Patienten nur sehr selten allein nachgewiesen werden, sondern meist als noch dazu verhältnismäßig kleinerer Anteil der bei MS in etwa 80% der Fälle vorhandenen polyspezifischen MRZ (Masern, Röteln, Zoster) -Reaktion anzutreffen sind.⁶⁶⁻⁶⁸ Warum gerade gegen EBV gerichtete Antikörper so selten bei MS im Nervenwasser nachgewiesen werden können, obwohl eine Autopsiestudie von Serafini et al. unlängst die Anwesenheit von EBV infizierten B-Zellen im ZNS von MS Patienten nachwies, welche unter anderem EBNA1 exprimierten, bleibt rätselhaft.⁶⁹ Dennoch kann angenommen werden, dass die Bildung von tertiären lymphfollikelartigen Strukturen die treibende Kraft einer intrathekalen Immunglobulinsynthese darstellt. Magliozzi et al. fanden eine solche Ansammlung von B-Zellen in etwa 40% der untersuchten SPMS-Fälle und brachten sie mit subpialen Läsionen in Verbindung, welche für sich genommen jedoch nicht MS-typisch sind.¹² Möglicherweise verlieren die im Gehirn akkumulierten EBV-infizierten B-Zellen die Eigenschaft zur Antikörperbildung gegen EBV.

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie werden limitiert durch die Anzahl der untersuchten Patienten, sodass nicht ausgeschlossen werden kann das bei Untersuchung größerer Kollektive weitere oder andere Peptide identifiziert werden könnten. Des Weiteren wurden lediglich 8 von über 100 zählenden EBV-Proteinen untersucht und dies auch nur auf Ebene der IgG-Klasse. Interessant wäre somit auch die Betrachtung von dem hier nicht untersuchten EBNA2 Kernprotein. Hinsichtlich der Verwendung der Ergebnisse als Ansatzpunkt für einen diagnostisch zu verwertenden Test müssen in weiteren Studien die Antikörper bei Patienten mit einem klinisch isoliertem Syndrom untersucht werden und andererseits muss gezeigt werden, dass eine Abgrenzung zu anderen relevanten (neuro-) immunologischen Erkrankungen, z.B. Neuromyelitis optica oder Sarkoidose gelingt. Weitere interessante Punkte im Kontext dieser Arbeit sind in Zukunft die Einbeziehung von immunogenetischen Mechanismen

in die gefundenen humoralen Veränderungen. Welche Rolle spielen dabei die mit MS-assoziierten HLA-Polymorphismen?

Wenngleich eine Infektion mit EBV als notwendige Voraussetzung für die Entwicklung einer MS angesehen werden kann, so ist sie für sich genommen nicht hinreichend. Weitere Studien sind notwendig um die in vielerlei Hinsicht nicht verstandenen Pathomechanismen weiter zu erforschen.

7. Literaturverzeichnis

1. Hein T, Hopfenmüller W. [Projection of the number of multiple sclerosis patients in Germany]. *Nervenarzt* 2000;71(4):288–94.
2. Compston A, Coles A. Multiple sclerosis. *Lancet* 2008;372(9648):1502–17.
3. Pflieger CCH, Flachs EM, Koch-Henriksen N. Social consequences of multiple sclerosis (1): early pension and temporary unemployment--a historical prospective cohort study. *Mult Scler* 2010;16(1):121–6.
4. Clanet M. Jean-Martin Charcot. 1825 to 1893. *Int MS J* 2008;15(2):59–61.
5. Link H, Huang Y-M. Oligoclonal bands in multiple sclerosis cerebrospinal fluid: An update on methodology and clinical usefulness. *Journal of Neuroimmunology* 2006;180(1–2):17–28.
6. Ensoli F, Fiorelli V, Lugaresi A, et al. Lymphomononuclear Cells from Multiple Sclerosis Patients Spontaneously Produce High Levels of Oncostatin M, Tumor Necrosis Factors A and B, and Interferon Γ . *Mult Scler* 2002;8(4):284–8.
7. Tsuge M, Yasui K, Ichiyawa T, et al. Increase of tumor necrosis factor- α in the blood induces early activation of matrix metalloproteinase-9 in the brain. *Microbiology and Immunology* 2010;54(7):417–24.
8. Engelhardt B. Molecular mechanisms involved in T cell migration across the blood-brain barrier. *J Neural Transm* 2006;113(4):477–85.
9. Polman CH, O'Connor PW, Havrdova E, et al. A randomized, placebo-controlled trial of natalizumab for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med* 2006;354(9):899–910.
10. Henderson APD, Barnett MH, Parratt JDE, Prineas JW. Multiple sclerosis: distribution of inflammatory cells in newly forming lesions. *Ann Neurol* 2009;66(6):739–53.
11. Kutzelnigg A, Lucchinetti CF, Stadelmann C, et al. Cortical Demyelination and Diffuse White Matter Injury in Multiple Sclerosis. *Brain* 2005;128(11):2705–12.
12. Magliozzi R, Howell O, Vora A, et al. Meningeal B-Cell Follicles in Secondary Progressive Multiple Sclerosis Associate with Early Onset of Disease and Severe Cortical Pathology. *Brain* 2007;130(4):1089–104.
13. Magliozzi R, Howell OW, Reeves C, et al. A Gradient of neuronal loss and meningeal inflammation in multiple sclerosis. *Annals of Neurology* 2010;68(4):477–93.
14. Lisak RP, Benjamins JA, Nedelkoska L, et al. Secretory products of multiple sclerosis B cells are cytotoxic to oligodendroglia in vitro. *Journal of Neuroimmunology* 2012;246(1–2):85–95.
15. Gold R, Linington C, Lassmann H. Understanding pathogenesis and therapy of multiple sclerosis via animal models: 70 years of merits and culprits in experimental autoimmune encephalomyelitis research. *Brain* 2006;129(Pt 8):1953–71.
16. Straus SE, Cohen JI, Tosato G, Meier J. NIH conference. Epstein-Barr virus infections: biology, pathogenesis, and management. *Ann Intern Med* 1993;118(1):45–58.

17. Fingeroth JD, Weis JJ, Tedder TF, Strominger JL, Biro PA, Fearon DT. Epstein-Barr virus receptor of human B lymphocytes is the C3d receptor CR2. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984;81(14):4510–4.
18. Li Q, Spriggs MK, Kovats S, et al. Epstein-Barr virus uses HLA class II as a cofactor for infection of B lymphocytes. *J Virol* 1997;71(6):4657–62.
19. Sixbey JW, Nedrud JG, Raab-Traub N, Hanes RA, Pagano JS. Epstein-Barr virus replication in oropharyngeal epithelial cells. *N Engl J Med* 1984;310(19):1225–30.
20. Callan MF, Tan L, Annels N, et al. Direct visualization of antigen-specific CD8+ T cells during the primary immune response to Epstein-Barr virus *In vivo*. *J Exp Med* 1998;187(9):1395–402.
21. Babcock GJ, Decker LL, Volk M, Thorley-Lawson DA. EBV persistence in memory B cells *in vivo*. *Immunity* 1998;9(3):395–404.
22. Cohen JI. Epstein-Barr virus infection. *N Engl J Med* 2000;343(7):481–92.
23. Sivachandran N, Wang X, Frappier L. Functions of the Epstein-Barr virus EBNA1 protein in viral reactivation and lytic infection. *J Virol* 2012;86(11):6146–58.
24. Young LS, Rickinson AB. Epstein-Barr virus: 40 years on. *Nat Rev Cancer* 2004;4(10):757–68.
25. Tan LC, Gudgeon N, Annels NE, et al. A re-evaluation of the frequency of CD8+ T cells specific for EBV in healthy virus carriers. *J Immunol* 1999;162(3):1827–35.
26. Pender MP, Csurhes PA, Pfluger CM, Burrows SR. Deficiency of CD8+ effector memory T cells is an early and persistent feature of multiple sclerosis. *Mult Scler* 2014;20(14):1825–32.
27. Pender MP, Csurhes PA, Smith C, et al. Epstein-Barr virus-specific adoptive immunotherapy for progressive multiple sclerosis. *Mult Scler*. 2014;20(11):1541–4.
28. Tørring C, Andreasen C, Gehr N, Bjerg L, Petersen T, Höllsberg P. Higher incidence of Epstein-Barr virus-induced lymphocyte transformation in multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand* 2014;130(2):90–6.
29. Deuschle K, Hofmann J, Otto C, et al. Are there Epstein-Barr virus seronegative patients with multiple sclerosis? *Mult Scler* 2013;19(9):1242–3.
30. Pakpoor J, Disanto G, Gerber JE, et al. The risk of developing multiple sclerosis in individuals seronegative for Epstein-Barr virus: a meta-analysis. *Mult Scler* 2013;19(2):162–6.
31. Thacker EL, Mirzaei F, Ascherio A. Infectious mononucleosis and risk for multiple sclerosis: A meta-analysis. *Annals of Neurology* 2006;59(3):499–503.
32. Nielsen TR, Rostgaard K, Nielsen NM, et al. Multiple sclerosis after infectious mononucleosis. *Arch Neurol* 2007;64(1):72–5.
33. Levin LI, Munger KL, O'Reilly EJ, Falk KI, Ascherio A. Primary infection with the Epstein-Barr virus and risk of multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2010;67(6):824–30.
34. Sundström P, Juto P, Wadell G, et al. An altered immune response to Epstein-Barr virus in multiple sclerosis: a prospective study. *Neurology* 2004;62(12):2277–82.

35. Levin LI, Munger KL, Rubertone MV, et al. Temporal relationship between elevation of epstein-barr virus antibody titers and initial onset of neurological symptoms in multiple sclerosis. *JAMA* 2005;293(20):2496–500.
36. Lünemann JD, Huppke P, Roberts S, Brück W, Gärtner J, Münz C. Broadened and elevated humoral immune response to EBNA1 in pediatric multiple sclerosis. *Neurology* 2008;71(13):1033–5.
37. Sundqvist E, Sundström P, Lindén M, et al. Epstein-Barr virus and multiple sclerosis: interaction with HLA. *Genes Immun* 2012;13(1):14–20.
38. Oldstone MBA. Molecular mimicry and immune-mediated diseases. *FASEB J* 1998;12(13):1255–65.
39. Munz C, Lunemann JD, Getts MT, Miller SD. Antiviral immune responses: triggers of or triggered by autoimmunity? *Nat Rev Immunol* 2009;9(4):246–58.
40. Lünemann JD, Jelčić I, Roberts S, et al. EBNA1-specific T cells from patients with multiple sclerosis cross react with myelin antigens and co-produce IFN-gamma and IL-2. *J Exp Med* 2008;205(8):1763–73.
41. Mameli G, Cossu D, Cocco E, et al. Epstein-Barr virus and Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis peptides are cross recognized by anti-myelin basic protein antibodies in multiple sclerosis patients. *J Neuroimmunol* 2014;270(1-2):51–5.
42. Serafini B, Rosicarelli B, Franciotta D, et al. Dysregulated Epstein-Barr virus infection in the multiple sclerosis brain. *J Exp Med* 2007;204(12):2899–912.
43. Willis SN, Stadelmann C, Rodig SJ, et al. Epstein-Barr virus infection is not a characteristic feature of multiple sclerosis brain. *Brain* 2009;132(Pt 12):3318–28.
44. Sargsyan SA, Shearer AJ, Ritchie AM, et al. Absence of Epstein-Barr virus in the brain and CSF of patients with multiple sclerosis. *Neurology* 2010;74(14):1127–35.
45. Comabella M, Kakalacheva K, Río J, Münz C, Montalban X, Lünemann JD. EBV-specific immune responses in patients with multiple sclerosis responding to IFN β therapy. *Mult Scler* 2012;18(5):605–9.
46. Petersen T, Møller-Larsen A, Ellermann-Eriksen S, Thiel S, Christensen T. Effects of interferon-beta therapy on elements in the antiviral immune response towards the human herpesviruses EBV, HSV, and VZV, and to the human endogenous retroviruses HERV-H and HERV-W in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 2012;249(1-2):105–8.
47. Polman CH, Reingold SC, Banwell B, et al. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the McDonald criteria. *Ann Neurol* 2011;69(2):292–302.
48. Wenschuh H, Volkmer-Engert R, Schmidt M, Schulz M, Schneider-Mergener J, Reineke U. Coherent membrane supports for parallel microsynthesis and screening of bioactive peptides. *Biopolymers* 2000;55(3):188–206.
49. Frank R. The SPOT-synthesis technique. Synthetic peptide arrays on membrane supports--principles and applications. *J Immunol Methods* 2002;267(1):13–26.
50. UniProt. (Zitiert am 06.10.2014; <http://www.uniprot.org/>).

51. Qiu X, Wu H, Hu R. The impact of quantile and rank normalization procedures on the testing power of gene differential expression analysis. *BMC Bioinformatics* 2013;14:124.
52. Streiner DL, Norman GR. Correction for multiple testing: is there a resolution? *Chest* 2011;140(1):16–8.
53. Fawcett T. An introduction to ROC analysis. *Pattern Recognition Letters* 2006;27(8):861–74.
54. Lindsey JW, Hatfield LM, Vu T. Epstein-Barr virus neutralizing and early antigen antibodies in multiple sclerosis. *Eur J Neurol* 2010;17(10):1263–9.
55. Larsen PD, Bloomer LC, Bray PF. Epstein-Barr nuclear antigen and viral capsid antigen antibody titers in multiple sclerosis. *Neurology* 1985;35(3):435–8.
56. Lucas RM, Ponsonby A-L, Dear K, et al. Current and past Epstein-Barr virus infection in risk of initial CNS demyelination. *Neurology* 2011;77(4):371–9.
57. Munger KL, Levin LI, O'Reilly EJ, Falk KI, Ascherio A. Anti-Epstein-Barr virus antibodies as serological markers of multiple sclerosis: a prospective study among United States military personnel. *Mult Scler* 2011;17(10):1185–93.
58. Mechelli R, Anderson J, Vittori D, et al. Epstein-Barr virus nuclear antigen-1 B-cell epitopes in multiple sclerosis twins. *Mult Scler* 2011;17(11):1290–4.
59. Jafari N, van Nierop GP, Verjans GMGM, Osterhaus ADME, Middelcorp JM, Hintzen RQ. No evidence for intrathecal IgG synthesis to Epstein Barr virus nuclear antigen-1 in multiple sclerosis. *J Clin Virol* 2010;49(1):26–31.
60. Sundström P, Nyström M, Ruuth K, Lundgren E. Antibodies to specific EBNA-1 domains and HLA DRB1*1501 interact as risk factors for multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 2009;215(1-2):102–7.
61. Rumpold H, Rhodes GH, Bloch PL, Carson DA, Vaughan JH. The glycine-alanine repeating region is the major epitope of the Epstein-Barr nuclear antigen-1 (EBNA-1). *J Immunol* 1987;138(2):593–9.
62. Yea C, Tellier R, Chong P, et al. Epstein-Barr virus in oral shedding of children with multiple sclerosis. *Neurology* 2013;81(16):1392–9.
63. Farrell RA, Antony D, Wall GR, et al. Humoral immune response to EBV in multiple sclerosis is associated with disease activity on MRI. *Neurology* 2009;73(1):32–8.
64. Ingram G, Bugert JJ, Loveless S, Robertson NP. Anti-EBNA-1 IgG is not a reliable marker of multiple sclerosis clinical disease activity. *Eur J Neurol* 2010;17(11):1386–9.
65. Kvistad S, Myhr K-M, Holmøy T, et al. Antibodies to Epstein-Barr virus and MRI disease activity in multiple sclerosis. *Mult Scler* 2014;
66. Otto C, Oltmann A, Stein A, et al. Intrathecal EBV antibodies are part of the polyspecific immune response in multiple sclerosis. *Neurology* 2011;76(15):1316–21.
67. Pohl D, Rostasy K, Jacobi C, et al. Intrathecal antibody production against Epstein-Barr and other neurotropic viruses in pediatric and adult onset multiple sclerosis. *J Neurol* 2010;257(2):212–6.

68. Castellazzi M, Tamborino C, Cani A, et al. Epstein-Barr virus-specific antibody response in cerebrospinal fluid and serum of patients with multiple sclerosis. *Mult Scler* 2010;16(7):883–7.
69. Serafini B, Severa M, Columba-Cabezas S, et al. Epstein-Barr virus latent infection and BAFF expression in B cells in the multiple sclerosis brain: implications for viral persistence and intrathecal B-cell activation. *J Neuropathol Exp Neurol* 2010;69(7):677–93.

8. Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Benjamin Wunderlich, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Zur Rolle des Epstein-Barr-Virus (EBV) bei der Multiplen Sklerose: Epitope Mapping EBV-spezifischer Antikörper mittels Peptid-Microarrays als potentieller diagnostischer Ansatz bei Multipler Sklerose“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Betreuer angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

B. Wunderlich

Anteilerklärung an der erfolgten Publikation

Benjamin Wunderlich hatte folgenden Anteil an der folgenden Publikation:

Publikation 1:

Ruprecht K*, Wunderlich B*, Gieß R, Meyer P, Loebel M, Lenz K, Hofmann J, Rosche B, Wengert O, Paul F, Reimer U, Scheibenbogen C.

Multiple sclerosis: The elevated antibody response to Epstein–Barr virus primarily targets, but is not confined to, the glycine–alanine repeat of Epstein–Barr nuclear antigen-1.

Journal of Neuroimmunology, 2014; 272:56-61

*Geteilte Erstautorenschaft

Beitrag im Einzelnen: Mitarbeit am Studiendesign, Rekrutierung der Studienteilnehmer, Aufarbeitung der Proben, statistische Auswertungen, Erstellung von Tabellen und Abbildungen, Mitarbeit am Manuskript

Unterschrift des Doktoranden:

B. Wunderlich

9. Biografie

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

10. Publikationsliste

Ruprecht K*, Wunderlich B*, Gieß R, Meyer P, Loebel M, Lenz K, Hofmann J, Rosche B, Wengert O, Paul F, Reimer U, Scheibenbogen C.: Multiple sclerosis: The elevated antibody response to Epstein–Barr virus primarily targets, but is not confined to, the glycine–alanine repeat of Epstein–Barr nuclear antigen-1. *Journal of Neuroimmunology*, 2014;272:56-61

*Geteilte Erstautorenschaft

Danksagung

Zunächst möchte ich mich herzlich bei Herrn PD. Dr. Ruprecht für die Überlassung des Promotionsthemas sowie die engagierte und zielführende Unterstützung des Promotionsvorhabens vielmals bedanken. Durch die Promotion wurde mein Interesse an neuroimmunologischen Fragestellungen geweckt und dies führte mit dazu, dass ich nun als Assistenzarzt in der Neurologie arbeite.

Des Weiteren möchte ich mich bei allen Mitarbeitern der Klinik für Neurologie, JPT Berlin, NeuroCure sowie dem Institut für medizinische Immunologie bedanken, welche mich bei der Promotion unterstütz haben. Darüber hinaus danke ich den Studienteilnehmern für Ihre Partizipation.

Zuletzt danke ich meiner ganzen Familie für die vielfältig gewährte Unterstützung.