

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

DISSERTATION
Epstein-Barr-Virus und Multiple Sklerose

-

Zur Rolle von Immunglobulin-G-Antikörpern gegen Epstein-Barr Nuclear
Antigen-1 und anderen EBV-spezifischen Laborparametern
als diagnostische, prognostische und krankheitsaktivitätsbezogene
Biomarker bei Patienten mit klinisch isoliertem Syndrom und früher
Multipler Sklerose

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

René Markus Gieß
aus Frankfurt am Main

Datum der Promotion: 07. Dezember 2018

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	4
1. Abstract.....	5
1.1 Abstract auf Deutsch	5
1.2 Abstract in English.....	7
2. Dissertation	9
2.1 Einführung und Zielsetzung.....	9
2.2 Methoden	11
2.2.1 Studie 1.....	12
2.2.2 Studie 2.....	13
2.2.3 Studie 3.....	15
2.3 Ergebnisse	16
2.3.1 Studie 1.....	16
2.3.2 Studie 2.....	21
2.3.3 Studie 3.....	24
2.4 Diskussion	26
2.5 Literaturverzeichnis	33
3. Liste der ausgewählten Publikationen.....	41
4. Ausführliche Anteilserklärung an den erfolgten Publikationen	43
4.1 Publikation 1	43
4.2 Publikation 2.....	44
4.3 Publikation 3.....	45
5. Eidesstattliche Versicherung.....	47
6. Druckexemplare der ausgewählten Publikationen	49
6.1 Publikation 1	49
6.2 Publikation 2.....	65
6.3 Publikation 3.....	71

7. Lebenslauf	77
8. Vollständige Publikationsliste	78
9. Danksagung	79

Abkürzungsverzeichnis

CLIA	Chemilumineszenz-Immunoassay
CDMS	Clinically Definite Multiple Sclerosis (klinisch gesicherte MS)
CIS	Clinically Isolated Syndrome (klinisch isoliertes Syndrom)
CSF	Cerebrospinal Fluid (Liquor cerebrospinalis)
DNA	Desoxyribonucleic Acid (Desoxyribonukleinsäure)
EBNA1	Epstein-Barr Nuclear Antigen 1
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
EBV	Epstein-Barr-Virus
EDSS	Extended Disability Status Scale
Ig	Immunglobulin
IgG	Immunglobulin G
MRT	Magnetresonanztomographie
MS	Multiple Sklerose
NCRC	NeuroCure Clinical Research Center
PCR	Polymerase Chain Reaction
RRMS	Relapsing-remitting MS (schubförmig-remittierende MS)
VCA	(Epstein-Barr) Viral Capside Antigen
VZV	Varizella-zoster-Virus

1. Abstract

1.1 Abstract auf Deutsch

Es besteht eine starke Assoziation einer Epstein-Barr-Virus (EBV)-Infektion mit der Multiplen Sklerose (MS), einer chronisch-entzündlichen Erkrankung des zentralen Nervensystems, jedoch sind die dieser Assoziation zugrundeliegenden Mechanismen weitgehend unverstanden. Die Prävalenz und die Konzentration von Antikörpern gegen EBV im Serum ist bei MS-Patienten im Vergleich zu Gesunden erhöht. Wir untersuchten Parameter einer EBV Infektion bei Patienten mit klinisch isoliertem Syndrom (CIS) und früher MS und analysierten deren Wertigkeit als diagnostische und prognostische Biomarker in einer prospektiven Kohortenstudie.

Wir bestimmten einerseits die Serumkonzentrationen von Immunglobulin (Ig)G gegen die EBV-Antigene EBNA1 und VCA bei 100 Patienten mit CIS und früher MS und 60 gesunden Kontrollen und andererseits die EBV-Viruslast im Speichel bei 48 Patienten mit CIS/MS und 50 gesunden Kontrollen. Diese Laborparameter wurden mit EDSS-Werten und mit Anzahl und der MRT-Läsionslast sowie mit der Konversion von CIS in eine klinisch gesicherte MS korreliert. In einer weiteren Arbeit untersuchten wir die Assoziation von im Liquor gebildetem Gesamt-IgG mit IgG-Serumantikörpern gegen EBV, Varizella-Zoster-Virus und Rötelnvirus. Schließlich evaluierten wir Unterschiede in der Reaktivität von Serum-IgG gegen EBV bei Patienten und gesunden Kontrollen mit Hilfe eines Microarrays mit 1486 EBV-Peptiden.

IgG-Titer gegen EBV waren im Serum von Patienten signifikant höher als bei Gesunden, jedoch zeigte sich kein Gruppenunterschied in der EBV-DNA-Konzentration im Speichel. Serum-IgG-Titer oder EBV-DNA im Speichel waren nicht mit EDSS-Werten oder mit der MRT-Läsionslast bei Baseline- bzw. Follow-up-Untersuchungen oder mit Konversionsrisiko von CIS zu klinisch gesicherter MS korreliert. Die Serumkonzentrationen von Anti-EBNA1-IgG, nicht aber von Anti-Varizella-Zoster-Virus- und Anti-Rötelnvirus-IgG, korrelierten mit der Konzentration von intrathekal gebildetem Gesamt-IgG. Schließlich zeigte sich bei Patienten mit MS eine erhöhte Reaktivität von Antikörpern gegen die Glycin-Alanin-Repeatsequenz von EBNA1 und in geringerem Ausmaß gegen EBV-Proteine des EBNA-Core-Komplexes sowie gegen die EBV-Proteine Vp26 und LMP1.

Die Ergebnisse bestätigen die Assoziation von EBV mit MS und zeigen, dass erhöhte Antikörper gegen EBV bereits in frühen Stadien der Erkrankung vorliegen. Antikörper gegen EBNA1 sind bei Patienten mit MS hauptsächlich, aber nicht ausschließlich gegen die Glycin-Alanin-Repeatsequenz von EBNA1 gerichtet. Wir fanden eine Assoziation der humoralen Immunantwort gegen EBNA1 mit der intrathekalen Synthese von IgG bei Patienten mit CIS/MS. Dagegen scheinen Serum-IgG gegen EBNA1 oder VCA oder EBV-DNA im Speichel keine Biomarker für Krankheitsaktivität zu sein. Insgesamt fügen sich unsere Ergebnisse in das bisherige Verständnis der Zusammenhänge zwischen EBV und MS ein und unterstreichen die Notwendigkeit, die zugrunde liegenden Mechanismen weiter zu erforschen.

1.2 Abstract in English

There is a strong association of infection with Epstein-Barr virus (EBV) and Multiple Sclerosis (MS), a chronic inflammatory disease of the central nervous system. However, the underlying mechanisms remain poorly understood. Here, we studied parameters of EBV infection in a cohort of patients with early MS or clinically isolated syndrome (CIS) suggestive of MS as well as healthy controls and determined the role of these parameters as diagnostic and prognostic biomarkers for MS.

We measured the concentrations of immunoglobulin (Ig)G antibodies against the EBV proteins EBNA1 and VCA in serum samples of 100 patients with CIS or early RRMS and 60 healthy controls. The concentration of EBV DNA was measured in saliva of 48 patients and 50 controls. We also analyzed the association of the amount of intrathecally synthesized IgG with serum IgG antibodies against EBV, varicella zoster virus and rubella virus. In a third project, we studied the fine specificity of the humoral immune response to EBV in CIS/MS patients using microarrays representing 1486 EBV peptides.

Antibody levels against EBNA1 and VCA were significantly higher in CIS/MS patients when compared to healthy controls, however, there was no group difference regarding the concentration of EBV DNA in saliva. Neither EBV antibody levels nor salivary EBV load were associated with EDSS, or with MRI lesion load at baseline or follow-up, or with the risk of conversion from CIS to clinically definite MS. Serum levels of IgG against EBNA1, but not against VZV or rubella virus were correlated with intrathecal IgG synthesis in patients with MS. IgG antibodies from patients were predominantly, but not exclusively directed against the glycine-alanine repeat sequence of EBNA1. Other EBV peptides to which patient antibodies showed higher affinity were located in the EBNA core complex and in the Vp26 and LMP1 proteins.

Our results confirm the association of elevated antibody levels against EBV with MS already in the earliest stages of the disease. The glycine-alanine repeat of EBNA1 is a major target of the humoral immune response to EBV in patients with MS and serum levels of anti-EBNA1 IgG are associated with intrathecal immunoglobulin synthesis. On the other hand, EBV specific antibody levels in patient serum or EBV DNA load in saliva do not appear to be useful markers for disease activity or risk of clinical progress in CIS and early MS. In summary, our results fit into the current understanding of the association of EBV with MS and highlight the need for continuing research in this field.

2. Dissertation

2.1 Einführung und Zielsetzung

Eine Infektion mit dem Epstein-Barr-Virus (EBV) gilt als gesicherter Risikofaktor für die Entstehung einer Multiplen Sklerose (MS), auch wenn die genauen zugrundeliegenden Mechanismen bislang unbekannt sind¹. EBV ist ein humanpathogenes Doppelstrang-DNA-Virus aus der Familie der Herpesviridae (Humanes Herpesvirus 4 / HHV-4) und wird primär durch Speichelkontakt übertragen. Das Virus repliziert sich zunächst überwiegend in Epithelzellen der Mund- und Rachenschleimhaut und infiziert schließlich naive B-Lymphozyten über Interaktion mit dem B-lymphozytären Oberflächenprotein CD21². Infizierte B-Zellen differenzieren sich zu proliferierenden B-Lymphoblasten und schließlich zu B-Gedächtniszellen in denen EBV persistiert. Ruhende infizierte B-Gedächtniszellen können nach Aktivierung und Einwanderung in den Waldeyer'schen Rachenring zur erneuten Freisetzung von infektiösen EB-Viren beitragen und somit den Infektionszyklus schließen. EBV-positive Personen können auf diese Weise lebenslang Viruspartikel über den Speichel freisetzen und EBV-seronegative Mitmenschen infizieren².

Die weltweite Durchseuchung mit EBV beträgt über 90%, wobei die Infektion in der Regel im Kindesalter stattfindet und meist asymptomatisch oder klinisch blande verläuft³. Eine Erstinfektion mit EBV im Adoleszenten- oder frühen Erwachsenenalter verläuft jedoch in über der Hälfte der Fälle unter dem klinischem Bild einer infektiösen Mononukleose (IM) mit Fieber, Lymphadenopathie und Angina⁴.

Für eine Rolle von EBV in der Pathogenese der MS spricht, dass bei praktisch allen Patienten mit MS bereits vor Auftreten der Erkrankung Antikörper gegen EBV im Serum nachgewiesen werden können, während in der gesunden Normalbevölkerung von einem Anteil von 5 - 10% komplett EBV-seronegativen Personen ausgegangen werden kann^{5,6}. MS-Patienten weisen zudem höhere Konzentrationen von Serumantikörpern gegen EBV auf als Gesunde, zusätzlich korreliert bei gesunden EBV-positiven Erwachsenen die Serumkonzentration von Antikörpern gegen EBV mit dem Risiko, im Verlauf an MS zu erkranken^{7,8}. Eine symptomatische EBV-Erstinfektion in Form einer IM ist darüber hinaus mit einem etwa zweifach erhöhten Risiko für die spätere Entwicklung einer MS assoziiert^{9,10}.

Während der Zusammenhang zwischen EBV und Multipler Sklerose als gesichert angesehen werden kann, ist die Aussagekraft von Antikörperantworten gegen EBV als prognostische und Krankheitsaktivitäts-Biomarker nicht eindeutig geklärt. Ein wichtiges Zielantigen der Antikörperantwort gegen EBV das Epstein-Barr Nuclear Antigen 1 (EBNA1). Die Länge von EBNA1 kann sich zwischen ca. 460 und 641 Aminosäuren bewegen; Grund hierfür ist eine charakteristische Glycin-Alanin-Repeatsequenz am C-Terminus, deren Länge und Abfolge nicht streng determiniert ist^{11,12}. Eine wesentliche Funktion von EBNA1 ist die Stabilisierung der EBV-DNA in episomaler Form außerhalb des Wirtsgenoms, indem es als Verbindungsglied zwischen chromosomaler DNA der Wirtszelle und episomaler Virus-DNA fungiert¹³. EBNA1 kommt damit eine wichtige Funktion in der Aufrechterhaltung der Latenzphase des Virus zu und ist eines der wenigen EBV-Proteine, das in dieser Phase exprimiert wird. Dadurch stellt EBNA1 ein wichtiges Antigen dar, gegen das sich die Immunantwort von ansonsten gesunden EBV-positiven Personen üblicherweise richtet^{14,15}. Ergebnisse mehrerer prospektiver Studien haben gezeigt, dass Antikörper gegen EBNA1 den stärksten bekannten externen Risikofaktor für die Entwicklung einer MS darstellen^{16,17}. Hinsichtlich der Eignung von Antikörpern gegen EBNA1 und anderen EBV-spezifischen Biomarkern als Prädiktoren für Krankheitsaktivität und -verlauf bei Patienten mit MS ist die Datenlage jedoch heterogen: Während einige Studien Indizien für eine Korrelation von Anti-EBNA1-IgG und Krankheitsaktivität bzw. dem "Konversionsrisiko" von Patienten nach einem erstmaligem Schubereignis (sog. klinisch isoliertes Syndrom) für die Entwicklung einer definiten MS aufzeigten^{18,19}, fanden andere Arbeiten keine solchen Zusammenhänge²⁰. Vor diesem Hintergrund war eine zentrale Fragestellung der vorliegenden Studienprojekte, die Zusammenhänge zwischen EBV-spezifischen Laborparametern und klinischen und kernspintomographischen Markern der Krankheitsaktivität in einer longitudinalen Kohorte von Patienten mit klinisch isoliertem Syndrom (*clinically isolated syndrome*, CIS) und früher MS (Berliner CIS-Kohorte) zu untersuchen.

In Studie 1 bewerteten wir die Konzentration von Serum-IgG gegen EBNA1 und VCA sowie die EBV-Last im Speichel von CIS/MS-Patienten im Vergleich mit gesunden Kontrollen und untersuchten die Assoziation dieser Laborparameter mit klinischen und MRT-bildmorphologischen Markern der Krankheitsaktivität bei Patienten mit CIS und früher MS.

Studie 2 befasst sich mit der Assoziation eines charakteristischen Laborbefundes bei Patienten mit MS, der intrathekalen IgG-Synthese, mit Antikörperantworten gegen EBV und andere Viren.

Studie 3 untersuchte die Reaktivität von IgG-Antikörpern in Serumproben von CIS/MS-Patienten und gesunden Kontrollen gegen spezifische Epitope von EBV-Proteinen mittels eines Peptid-Arrays mit 1486 EBV-Peptiden.

2.2 Methoden

Alle in dieser Arbeit zusammengefassten Studienprojekte entstanden im Rahmen der Studie „Berliner CIS-Kohorte“ (NCT01371071), einer prospektiven, longitudinalen Kohortenstudie von Patienten mit einem CIS oder früher MS, welche vom NeuroCure Clinical Research Center und der Klinik für Neurologie der Charité Universitätsmedizin Berlin durchgeführt wird. Es liegt ein positives Votum der Ethikkommission der Charité Campus Mitte für diese Studie vor. Alle Teilnehmer willigten nach ausführlicher Aufklärung in mündlicher und schriftlicher Form in die Studienteilnahme ein. Die CIS-Kohortenstudie beobachtet den Krankheitsverlauf bei Patienten mit CIS und früher MS über einen Zeitraum von bis zu 10 Jahren. Einschlusskriterien in die Studien sind ein Mindestalter von 18 Jahren sowie ein erstmaliges klinisches Schubereignis innerhalb von 12 Monaten vor Studieneinschluss, das mit einer entzündlich-demyelinisierenden Erkrankung des zentralen Nervensystems vereinbar ist. Zusätzlich wurden 60 gesunde Probanden als Kontrollgruppe rekrutiert, die ebenfalls ein Mindestalter von 18 Jahren aufweisen mussten und keine chronischen Erkrankungen (neurologisch oder anderweitig) in ihrer Vorgeschichte hatten. Alle Probanden willigten nach ausführlicher Aufklärung in mündlicher und schriftlicher Form in die Studienteilnahme ein. Bei den Studienteilnehmern wurde eine peripher venöse Blutentnahme durchgeführt, zusätzlich wurde eine Speichelprobe von ca. 1 ml gesammelt. Die Labormaterialien wurden in den Räumlichkeiten des NeuroCure Clinical Research Centers aufbereitet und bis unmittelbar vor den Laboranalysen bei -80 °C bzw. -20 °C gelagert. Die während vorangegangener stationärer Aufenthalte erhobenen Liquordaten wurden aus den Patientenakten zusammengetragen.

2.2.1 Studie 1

Epstein-Barr virus antibodies in serum and DNA load in saliva are not associated with radiological or clinical disease activity in patients with early multiple sclerosis; PLoS ONE (2017)

Die Konzentrationen von Serum-IgG gegen EBNA1 und VCA wurden mittels Chemilumineszens-Assay (CLIA) bestimmt (Liaison®, Fa. DiaSorin, Saluggia, Italien). Gemäß den Empfehlungen des Herstellers werteten wir IgG-Titer kleiner als 5 U/ml als negativ, Titer zwischen 5 und 20 U/ml als grenzwertig und Titer von mindestens 20 U/ml als positiv. Konzentrationen von Anti-VCA-IgG unter 20 U/ml wurden als negativ gewertet und Konzentrationen von mindestens 20 U/ml als positiv. Patienten, deren Serumkonzentrationen von sowohl Anti-EBNA1-IgG als auch Anti-VCA-IgG unterhalb des Grenzwertes lagen, wurden als EBV-seronegativ eingestuft. Sobald mindestens einer der getesteten EBV IgG-Antikörper mittels CLIA nachgewiesen werden konnte, werteten wir den Befund als EBV-positiv. Die Bestimmung von EBV-DNA in Speichel und Blutproben wurde mittels Real-time Polymerase-Kettenreaktion (real-time PCR) gegen das EBV-spezifische BNRF1 p143-Gen durchgeführt. Die DNA wurde mit dem QIAamp DNA Mini Kit® (Fa. Qiagen, Germany) aus dem Speichel extrahiert.

Alle Patienten erhielten bei den jeweiligen Studienvisiten eine klinisch-neurologische Untersuchung mit Bestimmung der Extended Disability Status Scale (EDSS)^{21,22} durch ärztliche Mitarbeiter, die ein entsprechendes Training absolviert hatten.

Im Rahmen der Studienvisite wurde bei allen Patienten außerdem eine umfassende bildgebende Untersuchung mittels Magnetresonanztomographie (MRT) durchgeführt. Als Scanner diente ein Ganzkörperscanner mit einer Feldstärke von 3 Tesla (Magnetom Trio, Fa. Siemens Healthcare AG, Erlangen, Deutschland) mit 12-Kanal-Kopfspule. Die Aufnahmen wurden in Form von hochauflösenden dreidimensionalen Bilddatensätzen von Gehirn und Rückenmark mit einer Voxelgröße von 1mm³ prozessiert. Für T1-gewichtete Aufnahmen wurden MPRAGE-Sequenzen (*magnetization-prepared rapid acquisition and multiple gradient echo*, TE 3.03 ms, TR 1900 ms, TI 900 ms, Flip-Winkel 9°) und für Aufnahmen in der T2-Wichtung FLAIR-Sequenzen (*fluid inversion recovery pulse*, TE 502 ms, TR 5000 ms, TI 2100 ms, Flip-Winkel 120°) verwendet und ausgewertet. Zur Darstellung von entzündlich aktiven MS-Läsionen wurde den Patienten Gadolinium-haltiges Kontrastmittel (Gadovist®, Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Deutschland) intravenös verabreicht (0,1 mmol pro

Kilogramm Körpergewicht). Die Anzahl und das Gesamtvolumen von T2-Läsionen und kontrastmittelaufnehmenden T1-Läsionen sowie die Auswertung der MRT-Befunde hinsichtlich der Barkhof-Kriterien²³ wurde von spezialisierten Fachkräften durchgeführt, die hinsichtlich der laboranalytischen und klinischen Untersuchungsergebnisse verblindet waren.

Gruppenspezifische Unterschiede in der Häufigkeitsverteilung von Merkmalen wurden mittels Fisher-Exact-Test auf Signifikanz überprüft. Unterschiede in der Werteverteilung von Serum-IgG-Titern und EBV DNA-Konzentrationen im Speichel im Vergleich zwischen der Patienten- und Kontrollgruppe wurden mittels Mann-Whitney-U-Test bewertet. Für den Vergleich der Verteilung der Antikörpertiter zwischen den Gruppen von unbehandelten, mit Interferon beta bzw. mit Glatirameracetat behandelten Patienten wandten wir eine Varianzanalyse nach Kruskal und Wallis an. Zur Korrelationsanalyse zwischen den bestimmten Laborparametern und EDSS-Werten bzw. MRT-Parametern berechneten wir jeweils die Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman (Spearman-Rho). Um die Korrelation der EBV-spezifischen Laborparameter mit der Konversion von CIS und früher MS nach McDonald (mit einmaligem Schubereignis vor Baseline-Untersuchung) zur klinisch gesicherten MS (CDMS) zu untersuchen, stratifizierten wir die jeweiligen Patienten in Tertile gemäß ihrem Antikörperstatus für jeweils Anti-EBNA1- und Anti-VCA-IgG ("niedrig", "mittel", "hoch"), bzw. in "positiv" und "negativ" bezüglich nachweisbarer EBV-DNA im Speichel. Für die jeweiligen Subgruppen erfolgte die Auftragung der Zeitpunkte, an denen Patienten ein zweites Schubereignis erfuhren, das zur Erfüllung der McDonald-Kriterien (2010) hinreichend war, in einem Kaplan-Meier-Diagramm.

Alle statistischen Analysen für dieses Studienprojekt wurden mit GraphPad Prism durchgeführt (GraphPad Prism for Windows, Version 6.01, GraphPad Software, La Jolla, California, USA). Das statistische Signifikanzniveau wurde mit $p < 0,05$ definiert.

2.2.2 Studie 2

Association of serum Epstein-Barr nuclear antigen-1 antibodies and intrathecal immunoglobulin synthesis in early multiple sclerosis; J Neuroimmunol. (2015)

Die Gesamtkonzentrationen von Albumin und IgG wurden nephelometrisch sowohl in Liquor- als auch in Serumproben von Patienten bestimmt, die jeweils am selben Tag ihres stationären Aufenthaltes in einer der neurologischen Kliniken der Charité Berlin

gewonnen wurden. Liquorspezifische oligoklonale Banden (OKB) wurden durch isoelektrische Fokussierung auf Agarose-Gel mit anschließender Immunfixation nachgewiesen. Wir berechneten die prozentuale Fraktion des intrathekal produzierten IgGs (IgG_{IF}) anhand der Formel

$$IgG_{IF} = \frac{IgG_{loc}}{IgG_{CSF}} \times 100,$$

wobei IgG_{loc} die Konzentration von lokal (im Liquorraum) synthetisierten IgG darstellt und IgG_{CSF} die Gesamtkonzentration von IgG im Liquor. Die Berechnung von IgG_{loc} erfolgte mit der Formel

$$IgG_{loc} = (Q_{IgG} - Q_{Lim}) \times IgG_{Serum}.$$

Q_{IgG} bezeichnet dabei den Quotienten aus Liquor-IgG und Serum-IgG (mg/l).

$Q_{Lim(IgG)}$ ist die Obergrenze des Referenzbereichs für Q_{IgG} in Abhängigkeit von Q_{Alb} als Referenzwert, den man berechnet mit

$$Q_{Lim} = (0,93 \times (Q_{Alb}^2 + 6)^{0,5} - 1,7) \times 10^{-3} = Q_{mean} + 3SD$$

Von einer intrathekalen IgG-Synthese ist mit hoher Spezifität auszugehen, wenn Q_{IgG} größer ist als $Q_{Lim(IgG)}$ bzw. wenn der Quotient aus Liquor- zu Serum-IgG-Konzentration mehr als drei Standardabweichungen über dem mittlerem IgG Quotienten ($Q_{mean(IgG)}$) bezogen auf den Albuminquotienten liegt (Reiber, 1998; Reiber et al., 2009). Eine höhere Sensitivität liefert der Ansatz, die Obergrenze des Referenzbereichs für Q_{IgG} als $Q_{mean(IgG)} + 2SD$ zu definieren:

$$Q_{Lim} = (0,65 \times (Q_{Alb}^2 + 8)^{0,5} - 1,4) \times 10^{-3} = Q_{mean} + 2SD.$$

Die Konzentration von Serum-IgG-Antikörper gegen EBNA1, VCA und Varizella-zoster-Virus (VZV) wurde analog zur vorhergehenden Studie durch Liaison® CLIA bestimmt. IgG-Antikörper gegen Rötelnvirus (RV) wurde analog mittels Mikropartikel-Chemilumineszens-Assay analysiert (Architect®, Fa. Abbott, Wiesbaden, Deutschland). Gemäß den Herstellerempfehlungen wurden Serumproben mit IgG-Konzentrationen oberhalb des Messbereiches in einer Verdünnung von 1:20 (für EBNA1 und VCA) bzw. 1:10 (VZV und RV) erneut gemessen.

Die statistische Signifikanz von Häufigkeitsverteilungen wurde durch den Fisher-Exact-Test bestimmt. Alter und EDSS-Wert von Patienten mit CIS und RRMS sowie die Verteilung der virusspezifischen IgG-Konzentrationen zwischen Patienten mit und

ohne liquorspezifische oligoklonale Banden bzw. intrathekaler IgG-Synthese wurde mittels Mann-Whitney-U-Test bewertet. Für die Analyse von Korrelationen zwischen IgG-Titern gegen EBV-Antigene und der berechneten intrathekalen IgG-Synthese wurden Korrelationskoeffizienten nach Spearman berechnet. P-Werte kleiner als 0,05 wurden als statistisch signifikant gewertet. Alle Berechnungen und graphischen Darstellungen wurde mit GraphPad Prism erstellt (GraphPad Prism for Windows, Version 5.04, GraphPad Software, La Jolla, California, USA).

2.2.3 Studie 3

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, J. Neuroimmunol. (2014)

Um nur Proben von EBV-seropositiven Patienten in die Analyse einzubeziehen, wurden zunächst alle Serumproben mittels enzymgebundenen Immunosorbent-Assay (*enzyme-linked immunosorbent assay / ELISA; Fa. medac, Germany*) bzw. mittels Western Blot hinsichtlich IgG-Antikörpern gegen EBNA1 und VCA untersucht. Personen, deren Serumproben keine nachweisbaren Antikörper gegen EBNA1 oder VCA enthielten, wurden als EBV-seronegativ angesehen und in der weiteren Analyse nicht berücksichtigt. Die kompletten Aminosäuresequenzen der EBV-Proteine EBNA1, EBNA-3, EBNA-4, EBNA-6, BLRF2, BZLF1, LMP1 und VP26 wurden durch eine Abfrage der Uniprot Knowledge Base²⁴ beschafft. Diese Proteine wurden in Form von insgesamt 1486 überlappenden Peptiden aus jeweils 15 Aminosäuren synthetisiert und per SPOT-Synthese²⁵ chemoselektiv auf Glasträgerplatten („Peptid-Microarrays“) fixiert. Die Serumproben wurden im Verhältnis 1:200 in proteinfreier Pufferlösung verdünnt und mit 24 parallelen Inkubationen per Durchlauf inkubiert. Der Nachweis von gebundenen Antikörpern erfolgte mit Cy5-konjugierten murinen Antikörpern gegen humanes IgG und darauffolgender Auslesung der Trägerplatten mit einem GenePix 4200A Scanner. Das Ausmaß der Antikörperbindung an die unterschiedlichen Peptide wurde quantitativ in *arbitrary fluorescent units* (AFU) dargestellt.

Die statistische Auswertung dieses Projektes wurde mit SPSS Statistics 21 durchgeführt (IBM SPSS Statistics for Windows, Version 21.0, IBM Corp., Armonk, New York, USA). Unterschiede in der Reaktivität der untersuchten Antikörper gegen EBV-spezifische Peptide zwischen Patienten- und Kontrollgruppe wurden jeweils

mittels Mann-Whitney-U Test untersucht. P-Werte $< 10^{-3}$ wurden als statistisch signifikant gewertet. Mit Hinblick auf eine etwaige Abhängigkeit der Reaktivität gegen EBNA1-Peptide von den IgG-Titern gegen EBNA1-Gesamtprotein korrigierten wir die p-Werte mit Hilfe einer generalisierten linearen Modells. Als Korrektur für multiples Testen wurde das lokale Signifikanzniveau mittels Bonferroni-Methode auf $p < 3.41 \times 10^{-5}$ herabgesetzt. Unterschiede zwischen den Subgruppen von unbehandelten, mit Interferon beta bzw. mit Glatirameracetat behandelten Patienten wurden durch Kruskal-Wallis-Analyse bewertet.

2.3 Ergebnisse

2.3.1 Studie 1

Epstein-Barr virus antibodies in serum and DNA load in saliva are not associated with radiological or clinical disease activity in patients with early multiple sclerosis; PLoS ONE (2017)

Die demographischen Daten der Patientenkohorte für diese Studie sowie EDSS Scores, Therapiestatus und MRT-Befunde zum Zeitpunkt der Baseline-Visite sind in Tabelle 1 zusammengefasst. Während sich die Geschlechterzusammensetzung zwischen den Patienten und der Kontrollgruppe nicht signifikant unterschied, waren gesunde Kontrollprobanden im Durchschnitt etwa 3 Jahre jünger als die Probanden aus der Patientengruppe. 11 der 24 MS-Patienten erfüllten die Kriterien einer klinisch manifesten RRMS (CDMS) nach den McDonald-Kriterien von 2010 bereits vor Studieneinschluss, die übrigen 13 Patienten erfüllten die Kriterien anhand von räumlicher und/oder zeitlicher Dissemination nach MRT-Kriterien. Insgesamt hatten damit 89 der untersuchten Patienten (CIS und RRMS) ein einzelnes Schubereignis vor Studieneinschluss.

Serum-IgG gegen EBNA1 war bei 96/100 (96%) der Patienten und 44/60 (73%) der gesunden Kontrollen nachweisbar ($p < 0.0001$), Serum-IgG gegen VCA fand sich bei 98/100 (98%) der Patienten und 57/60 (95%) der Kontrollprobanden ($p = 0.36$). Insgesamt wiesen sämtliche Patienten Antikörper gegen zumindest eines der EBV-Proteine auf, während 3 der Kontrollprobanden (5%) für sowohl EBNA1 als auch VCA seronegativ waren. In der Patientengruppe waren die Serumtiter von sowohl Anti-

EBNA1 IgG als auch Anti-VCA IgG signifikant höher als in der Kontrollgruppe (jeweils $p < 0.0001$; Abb. 1). Die Untergruppen von Patienten mit CIS oder RRMS unterschieden sich hingegen nicht signifikant hinsichtlich der Serumlevel von IgG gegen EBNA1 ($p = 0.07$) oder VCA ($p = 0.42$). Es gab keinen signifikanten Unterschied der jeweiligen Serumentiter in Abhängigkeit vom Therapiestatus der Patienten (behandelt mit Glatirameracetat, mit einem Beta-Interferon-Präparat, oder unbehandelt, vgl. Tabelle 1). Es zeigten sich keine Korrelationen zwischen Serum-IgG-Leveln gegen EBNA1 bzw. VCA und dem Patientenalter zum Zeitpunkt des klinischen Erstereignisses, dem EDSS Score, der Läsionslast (Anzahl und Gesamtvolumen der Läsionen) in T2-gewichteten nativen MRT-Aufnahmen bzw. T1-gewichteten MRT-Aufnahmen nach Gabe von gadoliniumhaltigen Kontrastmittel, oder der Anzahl der erfüllten Barkhof-Kriterien zum Zeitpunkt der Baseline-Visite (Tabelle 2).

	CIS (n = 76)	Early RRMS (n = 24)	Controls (n = 60)
Females/Males (% Female)	53/23 (70)	15/9 (62.5)	33/27 (55)
Median (range) age, years	32 (19–56)	30 (18–53)	27 (20–54)
Median (range) EDSS	1.5 (0–3.5)	1.5 (0–4)	n.a.
Immunomodulatory treatment (number)	<ul style="list-style-type: none"> • None (58) • Glatiramer acetate (6) • Interferon-beta-1a i.m. (3) • Interferon-beta-1a s.c. (7) • Interferon-beta-1b s.c. (2) 	<ul style="list-style-type: none"> • None (12) • Glatiramer acetate (8) • Interferon-beta-1a i.m. (2) • Interferon-beta-1a s.c. (1) • Immunoglobulins i.v. (1) 	n.a.
Mean (SD) number T2w lesions	15.6 (25.5)	31.7 (38.8)	n.a.
Mean (SD) T2w lesion volume (cm ³)	1.3 (2.3)	3 (3.7)	n.a.
Mean (SD) CEL number	0.03 (0.18)	1.5 (1.8)	n.a.
Mean (SD) CEL volume (cm ³)	0.0012 (0.007)	0.14 (0.3)	n.a.
0 BC, number (%)	14 (19)	1 (4)	n.a.
1–2 BC, number (%)	30 (41)	5 (22)	n.a.
3–4 BC, number (%)	29 (40)	17 (74)	n.a.
Mean (SD) Anti-EBNA1 IgG (AU/ml)	1120 (1530)	750 (1230)	485.7 (972.9)
Mean (SD) Anti-VCA IgG (AU/ml)	498.2 (468.3)	449.1 (492.7)	283.4 (481.2)
Mean (SD) EBV DNA (copies/ml)	32713 (98294) n = 37	164107 (448831) n = 11	28370 (107671) n = 47
AU = arbitrary units, BC = Barkhof criteria, CEL = contrast enhancing lesions, CIS = clinically isolated syndrome, EBNA-1 = Epstein-Bar nuclear antigen-1, EDSS = Expanded Disability Status Scale, RRMS = relapsing-remitting multiple sclerosis, SD = standard deviation, VCA = viral capsid antigen			
https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175279.t001			

Tabelle 1. Demographische Daten von Patienten und gesunden Kontrollen sowie Angaben zu serologischen EBV-Parametern, EDSS-Werten, Therapiestatus und MRT-Parameter

	Number of T2w lesions (baseline)	Total volume of T2w lesions (baseline)	Number of contrast-enhancing lesions (baseline)	Total volume of contrast-enhancing lesions (baseline)	Number of Barkhof criteria (baseline)	EDSS (baseline)	Age at onset of first symptoms
Anti-EBNA1 IgG	• n = 99 • r = 0.003 • p = 0.978	• n = 99 • r = 0.004 • p = 0.972	• n = 82 • r = -0.066 • p = 0.558	• n = 82 • r = -0.041 • p = 0.713	• n = 96 • r = 0.036 • p = 0.728	• n = 100 • r = -0.196 • p = 0.051	• n = 100 • r = 0.148 • p = 0.141
Anti-VCA IgG	• n = 99 • r = 0.074 • p = 0.465	• n = 99 • r = 0.045 • p = 0.660	• n = 82 • r = -0.083 • p = 0.456	• n = 82 • r = -0.064 • p = 0.568	• n = 96 • r = 0.071 • p = 0.494	• n = 100 • r = 0.007 • p = 0.945	• n = 100 • r = 0.145 • p = 0.151
EBV DNA (saliva)	• n = 48 • r = 0.082 • p = 0.577	• n = 48 • r = 0.052 • p = 0.724	• n = 41 • r = 0.036 • p = 0.823	• n = 41 • r = 0.102 • p = 0.527	• n = 48 • r = 0.131 • p = 0.374	• n = 48 • r = 0.154 • p = 0.294	• n = 48 • r = 0.028 • p = 0.848

Association of baseline EBNA-1 and VCA IgG levels in serum and EBV DNA load in saliva with radiological and clinical disease activity markers at baseline. EBV = Epstein-Barr virus, EBNA-1 = Epstein-Barr nuclear antigen-1, EDSS = Expanded Disability Status Scale, IgG = immunoglobulin G, n = number of pairs, r = Spearman's r, T2w = T2-weighted, VCA = viral capsid antigen

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175279.t002>

Tabelle 2. Korrelationswerte von EBV-spezifischen Parametern und klinischen bzw. bildgebenden Markern der Krankheitsaktivität zur Baseline-Untersuchung

	Number of T2w lesions (follow-up)	Total volume of T2w lesions (follow-up)	Number of contrast-enhancing lesions (follow-up)	Total volume of contrast-enhancing lesions (follow-up)	Number of new T2w lesions (follow-up)	Volume change in T2w lesions (follow-up)	Number of Barkhof criteria (follow-up)	EDSS (follow-up)	EDSS change (follow-up)
Anti-EBNA1 IgG	• n = 63 • r = -0.097 • p = 0.448	• n = 63 • r = -0.134 • p = 0.295	• n = 58 • r = -0.109 • p = 0.414	• n = 58 • r = -0.124 • p = 0.356	• n = 63 • r = -0.148 • p = 0.246	• n = 63 • r = -0.121 • p = 0.345	• n = 63 • r = -0.010 • p = 0.939	• n = 71 • r = -0.196 • p = 0.101	• n = 71 • r = -0.052 • p = 0.669
Anti-VCA IgG	• n = 63 • r = 0.073 • p = 0.568	• n = 63 • r = 0.022 • p = 0.863	• n = 58 • r = -0.243 • p = 0.066	• n = 58 • r = -0.248 • p = 0.060	• n = 63 • r = -0.025 • p = 0.849	• n = 63 • r = -0.064 • p = 0.617	• n = 63 • r = 0.007 • p = 0.954	• n = 71 • r = 0.122 • p = 0.312	• n = 71 • r = 0.090 • p = 0.455
EBV DNA (saliva)	• n = 28 • r = -0.012 • p = 0.951	• n = 28 • r = -0.067 • p = 0.735	• n = 24 • r = 0.038 • p = 0.860	• n = 24 • r = 0.038 • p = 0.860	• n = 28 • r = -0.102 • p = 0.604	• n = 28 • r = 0.016 • p = 0.935	• n = 28 • r = 0.010 • p = 0.959	• n = 32 • r = 0.300 • p = 0.096	• n = 32 • r = -0.021 • p = 0.907

Association of baseline EBNA-1 and VCA IgG levels in serum and EBV DNA load in saliva with radiological and clinical disease activity markers at follow-up examinations performed a median of 20 (range 12 to 29) months after baseline examination. EBV = Epstein-Barr virus, EBNA-1 = Epstein-Barr nuclear antigen-1, EDSS = Expanded Disability Status Scale, IgG = immunoglobulin G, n = number of pairs, r = Spearman's r, T2w = T2-weighted, VCA = viral capsid antigen

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175279.t003>

Tabelle 3. Korrelationswerte von EBV-spezifischen Parametern und klinischen bzw. bildgebenden Markern der Krankheitsaktivität zur Follow-up-Untersuchung

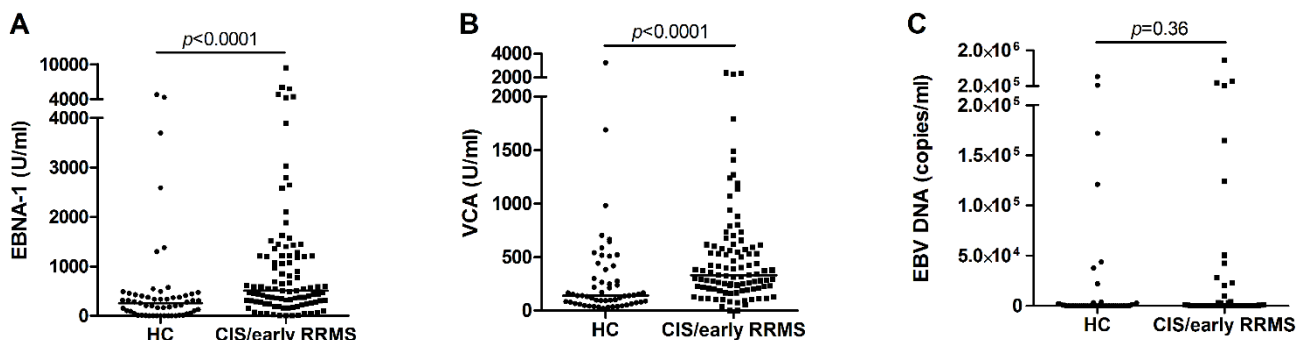


Abb. 1. Vergleich der Konzentrationswerte von EBV-spezifischen IgG-Antikörpern (Anti-EBNA1, Anti-VCA) in Serum sowie von EBV-DANN in Speichelproben von Patienten und gesunden Kontrollen

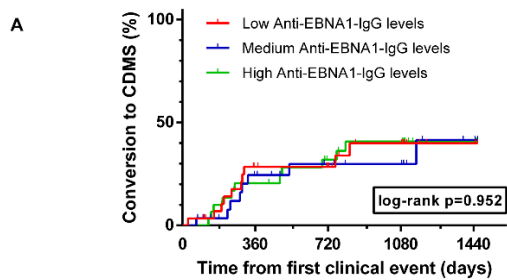
Von insgesamt 63 Patienten (63%) waren MRT-Aufnahmen aus Follow-up-Visiten mit einer Mindestbeobachtungszeit von 12 Monaten verfügbar (12 bis 29 Monate, Median 20 Monate). In den Aufnahmen von 41 dieser Patienten (41/63, 65%) war mindestens eine neu aufgetretene T2-Läsion vorhanden (1 - 47 neue Läsionen, Median 5 Läsionen). EDSS-Scores von diesen Studienvsiten waren für 71 Patienten erhoben worden. Bezüglich der MRT-Parameter aus Follow-up-Untersuchungen (Anzahl und Gesamtvolumen von T2-Läsionen bzw. kontrastmittel-anreichernde T1-Läsionen sowie Anzahl der erfüllten Barkhof-Kriterien) gab es jeweils keine signifikante Korrelation zu den Antikörpertitern für Anti-VCA- und Anti-EBNA1 IgG. Ebenso zeigte sich keine Korrelation zwischen EDSS-Score zur Follow-up-Untersuchung oder der Differenz zwischen Baseline- und Follow-up EDSS Scores mit den EBV-IgG-Titern (Tabelle 3).

Jeweils 50 Patienten mit CIS/RRMS und 50 für Geschlecht und Alter gematchte gesunde Probanden stellten Speichelproben für die Bestimmung der salivären EBV-Last mittels PCR zur Verfügung. Zwei der Patientenproben mussten wegen Verunreinigungen verworfen werden. Drei der gesunden Kontrollen waren seronegativ für EBNA1 und VCA; erwartungsgemäß war in ihren Speichelproben keine EBV-DNA nachweisbar. Diese Proben wurden von der weiteren Analyse ausgeschlossen. EBV-DNA oberhalb der Nachweisgrenze von 1000 Kopien/ml war in den Speichelproben von 18 Patienten (18/48, 37.5%) und 14 gesunden Kontrollen (14/47, 30%; $p = 0.52$) nachweisbar. Die Verteilung der Viruslast im Speichel (Absolutwerte der DNA-Konzentration) wies im Gruppenvergleich keine signifikante Unterschiedlichkeit auf ($p = 0.36$; Abb. 1). Weder bei Patienten noch bei den Kontrollprobanden war eine Korrelation zwischen EBV-Viruslast im Speichel und IgG gegen EBNA1 (Patienten: $r = 0.069$, $p = 0.64$; Kontrollen: $r = 0.232$, $p = 0.116$) bzw. VCA (Patienten: $r = 0.076$, $p = 0.61$; Kontrollen: $r = 0.11$, $p = 0.475$) im Serum nachzuweisen.

Wie auch die EBV-IgG Antikörpertiter im Serum korrelierte die Konzentration von EBV-DNA im Speichel der Patienten nicht mit den EDSS-Scores oder mit den untersuchten MRT-Parametern (Läsionszahl und Gesamtvolumen in nativen T2-Läsionen und kontrastmittel-aufnehmenden T1-Läsionen sowie den erfüllten Barkhofkriterien) von Baseline (Tabelle 2) und Follow-up-Untersuchungen (Tabelle 3).

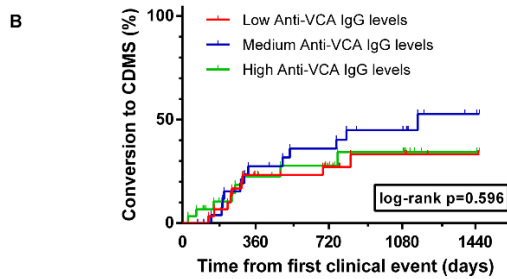
Die Gruppe der 89 Patienten mit einem einzelnen klinischen Schubereignis vor Studieneinschluss wurde mittels Kaplan-Meier-Analyse hinsichtlich der prädiktiven

Eigenschaften der untersuchten EBV-spezifischen Laborparameter untersucht. Als Beobachtungszeit wurde ein Zeitraum von vier Jahren gewählt. Innerhalb dieses Zeitraums erlitten 28 der 89 Patienten (31.5%) einen erneuten Schub und erfüllte damit die Diagnosekriterien einer klinisch gesicherten MS (CDMS). Die mediane zeitliche Differenz zwischen den zwei Schubereignissen betrug für diese Patienten 35 (2 - 51) Monate. Abhängig von ihrem Serostatus für Anti-EBNA1- und Anti-VCA-IgG wurden die Patienten, die im Verlauf eine CDMS entwickelten, in Tertilgruppen eingeteilt (hohe, mittlere und niedrige Antikörperlevel). Für EBV-DNA im Speichel erfolgte die Unterteilung dichotom ("EBV-DNA nachweisbar" und "nicht nachweisbar"). Weder die Serumkonzentration von Anti-EBNA1 IgG (p log-rank = 0.952) oder von Anti-VCA IgG (p log-rank = 0.596) noch die Nachweisbarkeit von EBV DNA im Speichel (p log-rank = 0.561) wiesen eine Korrelation mit der Entwicklung einer CDMS im Beobachtungszeitraum auf (Abb. 2).



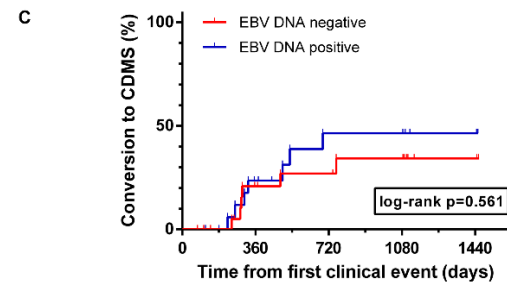
Patients at risk

Low antibody levels	30	18	15	9	3
Medium antibody levels	29	17	12	10	3
High antibody levels	30	22	16	13	7



Patients at risk

Low antibody levels	30	22	15	11	7
Medium antibody levels	29	18	15	11	4
High antibody levels	30	17	13	10	2



Patients at risk

EBV DNA negative	23	14	11	9	4
EBV DNA positive	19	12	7	7	3

Abb. 2.

EBV-spezifische Antikörper in Patientenserum bzw. Konzentration von EBV-DNA und Risiko der „Konversion“ zu klinisch definierter MS

2.3.2 Studie 2

Association of serum Epstein-Barr nuclear antigen-1 antibodies and intrathecal immunoglobulin synthesis in early multiple sclerosis; J Neuroimmunol. (2015)

Die Untergruppen der Patienten mit CIS und RRMS (n = 96) wiesen keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich Geschlecht, Alter, EDSS, Vorhandensein einer intrathekalen IgG-Synthese oder von OKB auf; lediglich die Anzahl der Patienten, die mit einem immunmodulatorischen Medikament behandelt wurden, war in der Untergruppe mit MS-Patienten höher. Das mediane Intervall zwischen der Liquoruntersuchung im

Rahmen der klinischen Routinediagnostik und dem Zeitpunkt der Blutentnahme für die Studiendiagnostik betrug 2,5 (0-30) Monate. Am Tag der Blutentnahme wurden jeweils auch die klinische Untersuchung und die MRT-Messungen durchgeführt. 84 der insgesamt 96 eingeschlossenen Patienten hatten im Befund der T2-gewichteten MRT-Aufnahmen mindestens 2 hyperintense Läsionen in Gehirn und/oder Rückenmark. Der Medianwert der T2-hyperintensiven MRT-Läsionen aller Patienten betrug 8 (0–176) Läsionen. Liquorspezifische OKB waren bei 84 von 96 (88%) Patienten nachweisbar. Von 90 Patienten lagen Laborbefunde mit Angabe von liquorspezifischen IgG-Konzentrationen vor. Bei 37 von 90 (41%) Patienten zeigte sich eine intrathekale IgG-Synthese im Reiber-Diagramm. Das Vorliegen einer intrathekalen IgG-Synthese korrelierte mit höheren IgG-Serumantikörpern gegen EBNA1 ($p = 0,03$), nicht jedoch gegen VCA ($p = 0,56$), Rötelnvirus ($p = 0,76$) oder Varizella-zoster-Virus ($p = 0,12$) (Abb. 3, obere Reihe). Ebenso zeigte sich eine Korrelation zwischen der prozentualen intrathekalen IgG Synthese und der Höhe der Serumtiter von Anti-EBNA1 IgG ($r = 0,27$, $p = 0,009$), aber nicht von Serum-IgG gegen VCA ($r = 0,07$, $p = 0,54$), RV ($r = 0,005$, $p = 0,96$) oder VZV ($r = 0,17$, $p = 0,12$) (Abb. 3, mittlere Reihe). Im Vergleich der Patientengruppen mit und ohne liquor-spezifische OKB gab es keine statistisch signifikante Korrelation zwischen Gruppenzugehörigkeit und Höhe der Serumkonzentrationen von IgG gegen EBNA1 ($p = 0,12$), VCA ($p = 0,24$), Rötelnvirus ($p = 0,43$), und VZV ($p = 0,54$), wobei ein korrelativer Trend zwischen Anti-EBNA1 IgG-Serumtitern und positiven OKB sichtbar ist (Abb. 3, untere Reihe). Zur genaueren Analyse wurde die Patientengruppe mit positiven OKB weiter unterteilt in Patienten mit zusätzlich vorhandener oder nicht vorhandener intrathekaler IgG-Synthese. Im Vergleich der nunmehr drei Gruppen war der Trend einer Korrelation zwischen intrathekaler IgG-Synthese und erhöhten Serumantikörpern gegen EBNA1 ebenfalls sichtbar, jedoch ebenfalls ohne statistische Signifikanz ($p = 0,07$ für den Vergleich der Gruppen ohne OKB bzw. ohne intrathekale IgG-Synthese und mit OKB / mit intrathekaler IgG-Synthese; Abb. 4).

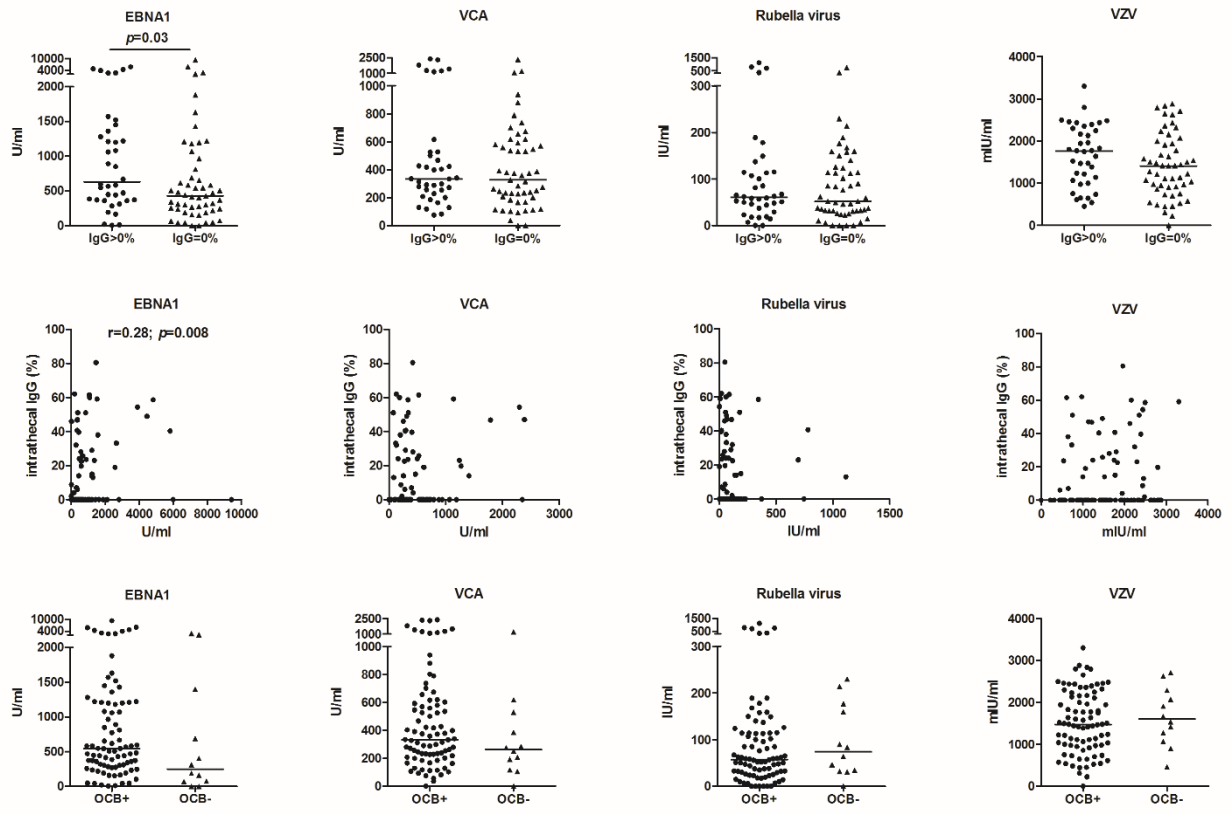


Abb. 3. Serumkonzentrationen von IgG gegen angegebene Viruspartikel im Vergleich zwischen Patienten mit positivem und negativem Liquorstatus bezüglich oligoklonaler Banden

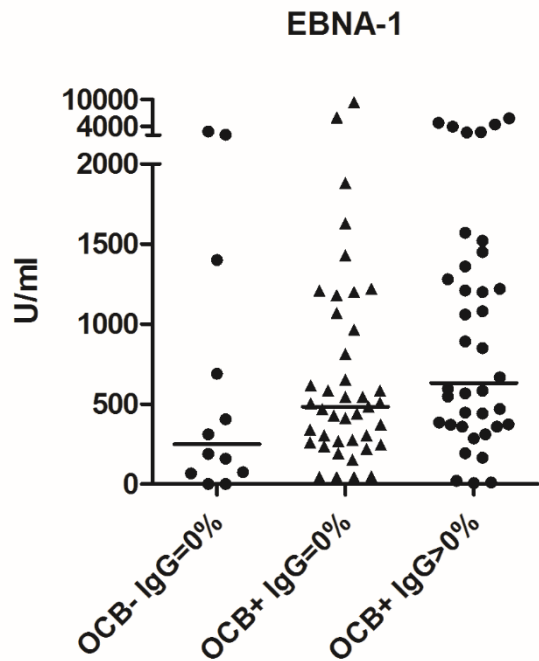


Abb. 4. Serumkonzentrationen von Anti-EBNA1-IgG bei Patienten ohne OKB i. L. (n=12), Patienten mit OKB i. L. ohne intrathekale IgG-Synthese (n=41) und Patienten mit OKB i. L. mit intrathekaler IgG-Synthese (n=37)

2.3.3 Studie 3

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, J. Neuroimmunol. (2014)

IgG-Antikörper gegen EBNA1 waren im Serum aller 29 Patienten nachweisbar, jedoch nur bei von 22 der 24 gesunden Kontrollprobanden (91,7%). Beide EBNA1-seronegativen Kontrollproben wiesen ebenfalls keine IgG-Antikörper gegen VCA auf und wurden daher als EBV-seronegativ gewertet und von der weiteren Auswertung ausgeschlossen. Die Reaktivität der untersuchten Serumantikörper gegen die auf dem Micro-Array aufgetragenen Peptide wurden zwischen Patienten und den verbleibenden 22 EBV-positiven gesunden Kontrollen verglichen. Insgesamt konnten 39 Peptide identifiziert werden, gegenüber denen IgG aus Patientensera eine höhere Reaktivität aufwies als IgG in Seren von Kontrollen; 17 dieser Peptide (44%) entstammten der Sequenz für das EBNA1-Protein (Abb. 5), von denen wiederum 13 Peptide aus der Glycin-Alanin-Repeatsequenz von EBNA1 abgeleitet waren und die verbleibenden vier Peptide der C-terminalen Region entstammen. In geringerem Ausmaße zeigten IgG-Antikörper aus Patientenserum im Vergleich zu Antikörpern von gesunden Kontrollen auch eine erhöhte Reaktivität mit Peptiden der EBV-Proteine EBNA3, EBNA4, EBNA6, VP26 und LMP1 (Abb. 5), jedoch nicht mit BLRF2 und BZLF1. Kontrolliert man die statistisch signifikanten Werte für die Konzentration von IgG gegen das EBNA1-Gesamtprotein in den jeweiligen Serumproben verbleiben neun Peptide, gegen die sich eine signifikant höhere Reaktivität von IgG aus Patientenserum zeigte. Die Korrektur für multiples Testen nach Bonferroni erforderte ein Signifikanzniveau von $p < 3.41 \times 10^{-5}$, wodurch drei Peptide mit signifikanten IgG-Reaktivitätsunterschieden zwischen Patienten und gesunden Kontrollen abgegrenzt werden konnten, davon zwei Peptide aus der Sequenz von EBNA1 und eines von EBNA6. Hinsichtlich Sensitivität und Spezifität zur Unterscheidung zwischen Patienten und gesunden Kontrollen anhand der Antikörper-Reaktivitäten gegen diese drei Peptide wurden diese Werte in einer Receiver-Operating-Characteristic-Kurve für die einzelnen Peptide und für die drei Peptide kombiniert aufgetragen. Die Fläche unterhalb der Kurve („Area under curve“, ROC AUC) betrug hierbei jeweils gleichermaßen 0,86 für EBNA1_109–123, für EBNA1_214–228 bzw. für EBNA-6_841–855, und 0.9 für die drei Peptide zusammengenommen (Abb. 6).

Um für einen möglichen Effekt von immunmodulatorischen Therapeutika auf den Antikörperstatus in der Patientengruppe zu korrigieren, stratifizierten wir die Patienten gemäß ihrer medikamentösen Therapie (Interferon beta, Glatirameracetat oder keine immunmodulatorische Therapie) und verglichen diese Untergruppen mittels Kruskal-Wallis-Analyse. Es zeigten sich hinsichtlich der Antikörperreaktivität keine signifikanten Unterschiede zwischen den Untergruppen (jeweils $p > 0,05$), sodass nicht von einem Einfluss der immunmodulatorischen Behandlung auf die Antikörperreaktivität gegen EBV-peptide ausgegangen werden kann.

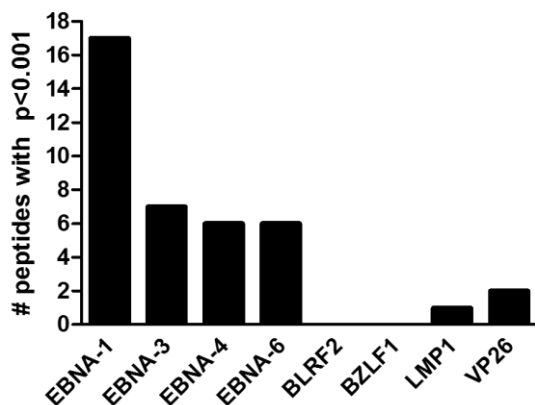


Abb. 5. Anzahl von Peptiden mit signifikant erhöhter Antikörperreaktivität bei Patienten nach zugehörigem EBV-spezifischen Protein

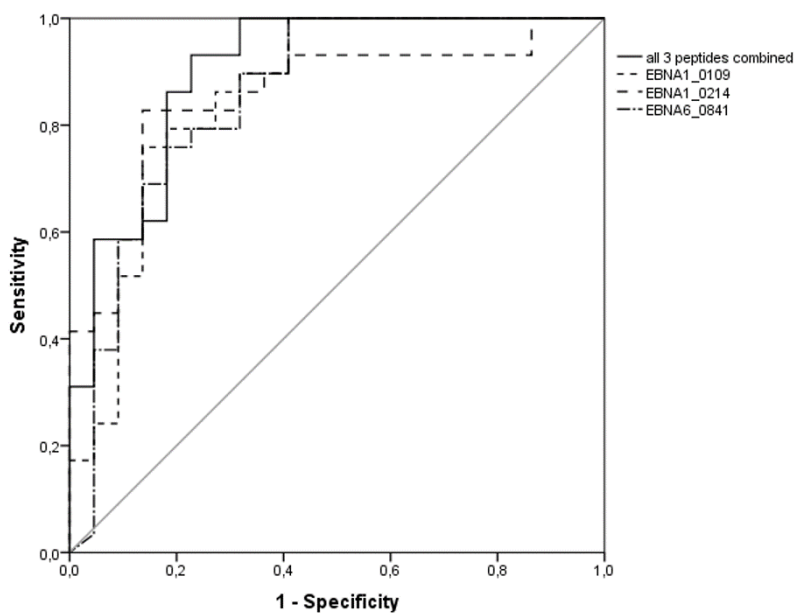


Abb. 6. Receiver-Operating-Characteristic-Kurve für Sensitivität vs. Spezifität für EBV-Peptide mit signifikant erhöhter Antikörperreaktivität bei Patienten (nach Bonferroni-Korrektur)

2.4 Diskussion

Auch wenn die zugrundeliegenden Mechanismen nicht hinreichend bekannt sind, gilt eine Infektion mit EBV als gesicherter Risikofaktor für die Entstehung der MS^{26,27}. Die hier zusammengefassten Studien befassten sich mit der Rolle von Parametern einer EBV Infektion, insbesondere Antikörperantworten gegen EBV, als diagnostisch, prognostische und Krankheitsaktivitäts-Biomarker bei Patienten mit CIS bzw. früher MS.

Wir untersuchten chronologisch zunächst in der bislang umfassendsten Analyse dieser Art die Reaktivität von Antikörpern gegen Epitope von acht verschiedenen EBV-Proteinen im Gruppenvergleich von Patienten und Kontrollprobanden. Es zeigte sich eine stärkere Reaktivität vor allem gegen EBV-Proteine, die während der latenten Infektionsphase des Virus exprimiert werden. Antikörper gegen EBNA1 nahmen hierbei in Übereinstimmung zu früheren Studien^{7,18,28} den größten Stellenwert ein. Vorhergehende Untersuchungen dieser Art beschreiben bei MS-Patienten eine höhere Reaktivität von IgG-Antikörpern gegen C-terminale Regionen von EBNA1 im Vergleich zu Kontrollprobanden von Gesunden²⁹⁻³¹. Unsere Ergebnisse, bei denen sich 25% der Antikörper, die bei MS-Patienten eine höhere Reaktivität zeigten als bei Gesunden, gegen C-terminale Aminosäuresequenzen richteten, unterstützen diese Befunde. Der weitaus größere Anteil der bei Patienten stärker gegen EBNA1 reaktiven IgG-Antikörper richtete sich in unseren Untersuchungen gegen Peptide aus der Glycin-Alanin-Repeatsequenz von EBNA1. Ähnliche Ergebnisse sind bisher aus einer kleineren Studie bekannt, die Serumproben von Kindern mit chronisch inflammatorischer demyelinisierender Polyradikuloneuropathie (CIDP) untersuchte³², einer Erkrankung, bei der es ebenfalls zu einer autoimmun bedingten Demyelinisierung von Nerven kommt³³. Sieht man jedoch von den Unterschieden in der Antikörperreaktivität zwischen Patienten und Kontrollen ab, so stellen das Glycin-Alanin-Repeat und das C-terminale Ende von EBNA1 auch bei Personen ohne MS die prädominanten Epitope für die antikörpervermittelte Immunantwort gegen EBNA1 dar³⁴. Eine ursächliche Beteiligung von Antikörpern gegen EBNA1 in der Pathogenese von MS erscheint damit unwahrscheinlich, zumal eine EBV-spezifische Antikörpersynthese innerhalb des ZNS bei Patienten mit MS nur selten vorkommt^{35,36,30}. Es wäre jedoch denkbar, dass die erhöhte Reaktivität der jeweiligen Antikörper im Serum von Patienten mit MS das Korrelat einer veränderten Immunantwort gegen EBV

ist, deren Ursache in weiteren Studien nachgegangen werden sollte. Ebenso weist die Fläche unterhalb der ROC-Kurve (ROC AUC) von 0,9 für die drei bei Patienten am signifikantesten erhöhten Antikörperreaktivitäten darauf hin, dass Antikörper gegen spezielle EBV-Epitope einen möglichen Stellenwert als diagnostische Biomarker bei der MS erlangen könnten.

Ein Charakteristikum der MS-Erkrankung und in der Diagnostik weithin genutzter Sachverhalt ist eine intrathekale Synthese von IgG, welche bei >90% von Patienten mit MS nachweisbar ist³⁷. Die Zielantigene der intrathekal synthetisierten Immunglobuline sind unbekannt³⁸, jedoch zeigte sich in einer großen multizentrischen Studie eine positive Korrelation zwischen dem Vorhandensein von oligoklonalen Banden im Liquor und der Serumkonzentration von IgG-Antikörpern gegen EBNA1³⁹. Analog fanden wir in unserer Studie eine Assoziation zwischen Anti-EBNA1-IgG Serumspiegeln und der berechneten prozentualen intrathekalen IgG-Synthese. Wie unsere und vorhergehende Ergebnisse zeigen, können OKB im Liquor bereits in den frühesten Krankheitsstadien (CIS) nachgewiesen werden und spielen daher in der Differentialdiagnostik des klinischen Erstereignisses eine wichtige Rolle⁴⁰.

Da bei MS-Patienten eine intrathekale Synthese von direkt gegen EBV gerichteten Immunglobulinen nur selten nachweisbar ist^{35,36,30}, liegt auch hier die Annahme nahe, dass erhöhte Serumspiegel von Anti-EBNA1-IgG und die intrathekale Synthese von IgG durch einen gemeinsamen übergeordneten Faktor beeinflusst werden könnten. So ist beispielsweise aus retrospektiven Analysen bekannt, dass der Serumspiegel von Anti-EBNA1 IgG bei MS-Patienten bereits ansteigt, bevor es zu klinischen Symptomen kommt²⁷, während initial EBV-negative Patienten in allen bekannten Fällen noch vor dem ersten Schubereignis eine Serokonversion durchmachen⁶. Angesichts des Replikationszyklus von EBV in naiven B-Zellen, die durch die Infektion eine polyklonale Aktivierung erfahren und sich ohne adäquate Antigenpräsentation differenzieren können⁴¹, und der Herkunft von Immunglobulinen aus differenzierten B-Zellen (d. h. aus Plasmazellen), könnte hier eine Verbindung zwischen intrathekalen IgG-Synthese und erhöhten Serumspiegeln von IgG gegen EBNA1 zu suchen sein.

In unserer Studie waren die Serumtitere von IgG gegen EBNA1 und VCA sowie die Speichelkonzentration EBV-DNA bei Patienten mit CIS und früher MS nicht mit klinischen und MRT-bildgebenden Markern der Krankheitsaktivität korreliert. Die Studienlage bezüglich der Eignung von Serumantikörpern gegen EBNA1 und VCA als

prognostische Parameter für die Krankheitsaktivität bei CIS und früher MS ist uneinheitlich. Eine Übersicht über relevante Studienergebnisse ist in der folgenden Tabelle dargestellt:

Publikation	Patienten	Ergebnisse
Farrell et al. (2009) ⁴²	CIS (n=50) RRMS (n=25) PPMS (n=25)	Assoziation von IgG gegen EBNA1 mit EDSS und MRT-Parametern (Anzahl von KM-anreichernden T1-Läsionen; Zunahme von Gesamtvolumen von T2-Läsionen) Keine derartigen Korrelationen bei Anti-VCA-IgG
Lünemann et al. (2010) ¹⁸	CIS (n=147)	Assoziation von Anti-EBNA1-IgG mit MRT-Parametern (T2-Läsionen und Anzahl der Barkhof-Kriterien) bei Baseline und Follow-up (1 - 5 Jahren) sowie Follow-up EDSS Assoziation von Anti-EBNA1-IgG mit Konversion von CIS zu MS
Ingram et al. (2010) ⁴³	RRMS (n=50) PPMS (n=25) Gesunde Kontrollen (n=25)	Keine Assoziation von Anti-EBNA1-IgG zu Patientengruppe, Krankheitsdauer oder EDSS
Munger et al. (2011) ²⁷	RRMS (n=222) Gesunde Kontrollen (n=444)	Assoziation von Anti-EBNA1- und Anti-EBNAc-IgG Titer mit Erkrankungsrisiko (MS)
Horakova et al. (2013) ⁴⁴	CIS-Patienten, behandelt mit Interferon beta (n=211)	keine Korrelation von IgG gegen EBNA1 oder VCA und Konversion von CIS zu CDMS Assoziation von Anti-VCA-IgG mit EDSS-Progression sowie der Anzahl von T2- und kontrastmittel-anreichernden T1-Läsionen im MRT
Kvistad et al. (2014) ⁴⁵	RRMS (n=87)	Korrelation von Anti-EBNA1-IgG und Gesamtzahl von KM-aufnehmenden T1-Läsionen sowie neuen bzw. größtenprogredienten T2-Läsionen Keine Korrelation von Anti-VCA-IgG mit MRT-Parametern
Kuhle et al. (2015) ³⁹	CIS (n=1047)	Keine Assoziation von IgG gegen EBNA1 und Konversion von CIS zu CDMS

Munger et a. (2015) ²⁰	CIS (n=469)	Keine Assoziation zwischen Anti-EBV-IgG (EBNA1, VCA) und Konversion von CIS zu MS bzw. Krankheitsprogression (EDSS, MRT-Läsionslast)
Zivadinov et al. (2016) ⁴⁶	CIS (n=66) RRMS (n=539)	Keine Assoziation von IgG gegen EBNA1 und MRT-Parametern Assoziation von Anti-VCA-IgG mit Gesamtvolumen von T2-Läsionen und Anzahl von KM-anreichernden T1-Läsionen im MRT (bei MS, nicht bei CIS)

Analog zu unseren Ergebnissen gibt es folglich diverse Studien, die insgesamt keinen Zusammenhang zwischen Serumkonzentration von Antikörpern gegen EBV und Krankheitsaktivität bei MS-Patienten finden. Besonders zu nennen sind in diesem Zusammenhang die beiden Studien mit den bislang größten untersuchten Fallzahlen zu dieser Thematik: Eine im Rahmen der multizentrischen BENEFIT-Studie an 469 Patienten mit CIS durchgeführte Beobachtung über 24 Monate konnte keinen Zusammenhang zwischen IgG gegen EBV (Anti-EBNA1 und Anti-VCA) und Konversionsrisiko von CIS zu MS oder Krankheitsprogression (Änderungen in EDSS, Hirnvolumen oder Läsionslast im MRT) aufzeigen²⁰. Ähnliches ergab sich in einer weiteren groß angelegten Studie mit 1047 CIS-Patienten, in denen die Serumkonzentrationen von IgG gegen EBNA1 nicht mit der Läsionslast in T2-gewichteten MRT-Aufnahmen und dem Risiko zur Konversion von CIS zu MS in einem Beobachtungszeitraum von 24 Monaten korrelierten³⁹. Zusammenfassend sprechen unsere Ergebnisse im Einklang mit den genannten groß angelegten Studien gegen eine Assoziation von EBV-Parametern mit der Krankheitsaktivität bei MS.

Im Gegensatz zur Antikörperantwort gegen EBV ist EBV-DNA im Speichel bislang nicht systematisch bei erwachsenen Patienten mit MS untersucht worden. Unsere Ergebnisse zeigten keine Prävalenzunterschiede hinsichtlich salivärer EBV-DNA zwischen Patienten und gesunden Kontrollen. Ebenso zeigte sich keine Assoziation zwischen Viruslast und Krankheitsaktivität oder Konversionsrisiko bei früher MS bzw. bei CIS. Die hohe Variabilität der Viruslast in beiden untersuchten Gruppen könnte

durch eine periodische Einwanderung von B-Lymphozyten in den Waldeyer'schen Rachenring und somit zu gesteigerter EBV-Freisetzung in den Speichel erklärt werden, die nicht mit dem Verlauf der MS-Erkrankung zusammenhängt^{47,48}. Insgesamt sprechen unsere Ergebnisse gegen eine Eignung von Serumantikörpern gegen EBV und von EBV-DNA in Speichelproben als prognostische Biomarker bei MS.

Zu den Stärken der zusammengefassten Studienprojekte, die im Rahmen der CIS-Kohortenstudie durchgeführt wurden, gehört der prospektive Aufbau der Studie, die standardisierte Durchführung von klinischen Studienvisiten an einer auf MS spezialisierten Hochschulambulanz, die standardisierte Entnahme, Aufbereitung und Lagerung von Biomaterialien und die einheitliche Durchführung von 3-Tesla MRT-Messungen in festgelegten Intervallen. Auch wenn die Anzahl der untersuchten Patienten vergleichsweise hoch war, unterliegen die untersuchten Patientenkohorten aufgrund der monozentrischen Studiendurchführung einer entsprechenden Größenbeschränkung. Da die CIS-Kohortenstudie ein aktuell andauerndes Projekt ist und nicht alle Patienten zu den geplanten Follow-up-Visiten erschienen, standen zudem nicht bzw. noch nicht von allen Patienten Datensätze für eine longitudinale Beurteilung zur Verfügung. Für die cross-sektionale Beurteilung von Kohorten mit CIS-Patienten muss außerdem bedacht werden, dass ein klinisch isoliertes Syndrom nicht immer Ausdruck einer beginnenden MS sein muss; bei einer geringen Anzahl von Patienten, deren klinische Präsentation ursprünglich als CIS gewertet worden war, ist es daher möglich, dass im zeitlichen Verlauf eine andere Diagnose als MS gestellt werden kann, oder dass es zu keinen weiteren Ereignissen kommt, durch welche letztendlich die McDonald-Kriterien⁴⁹ für eine MS-Diagnose erfüllt wären.

Zusammenfassend unterstützen die Resultate unserer Untersuchungen die Hypothese, dass es eine frühzeitige Verbindung zwischen der Immunantwort gegen EBV und der Entwicklung einer MS gibt, jedoch nicht in dem Ausmaße, dass serologische EBV-spezifische Parameter als prognostische Parameter für den Krankheitsverlauf bei MS herangezogen werden könnten. Wir fanden eine Seroprävalenz von 100% für Antikörper gegen EBV bei Patienten mit CIS und früher MS, jedoch keine Assoziation zwischen der Antikörperkonzentration im Serum oder der EBV-Viruslast im Speichel mit klinischen oder bildgebenden Markern der Krankheitsaktivität. Hingegen konnten wir zeigen, dass Serumantikörper gegen EBNA1 mit dem Vorhandensein, der prozentualen Fraktion und der

Gesamtkonzentration von intrathekal gebildetem IgG im Liquor von Patienten korreliert sind. EBNA1 war in einer von uns durchgeführten Studie eines der hauptsächlichen Ziele von Anti-EBV-Immunglobulinen, welche sich zu einem großen Teil gegen dessen Glycin-Alanin-Repeatsequenz richteten.

Es ist davon auszugehen, dass die weitere Erforschung der Mechanismen, durch die EBV bei der MS eine Rolle spielt, wichtige Erkenntnisse über die Pathogenese der Multiplen Sklerose erbringen dürfte.

2.5 Literaturverzeichnis

1. Ascherio, A. & Munger, K. L. Epidemiology of Multiple Sclerosis: From Risk Factors to Prevention—An Update. *Semin Neurol* **36**, 103–114 (2016).
2. Thorley-Lawson, D. A. EBV Persistence—Introducing the Virus. *Curr Top Microbiol Immunol* **390**, 151–209 (2015).
3. Fields, B. N., Knipe, D. M., Howley, P. M. & Griffin, D. E. *Fields virology*. (Lippincott Williams & Wilkins, 2001).
4. Balfour, H. H., Dunmire, S. K. & Hogquist, K. A. Infectious mononucleosis. *Clin Transl Immunology* **4**, e33 (2015).
5. Pakpoor, J., Disanto, G., Gerber, J. E., Dobson, R., Meier, U. C., Giovannoni, G. & Ramagopalan, S. V. The risk of developing multiple sclerosis in individuals seronegative for Epstein-Barr virus: a meta-analysis. *Mult. Scler.* **19**, 162–166 (2013).
6. Levin, L. I., Munger, K. L., O'Reilly, E. J., Falk, K. I. & Ascherio, A. Primary infection with the Epstein-Barr virus and risk of multiple sclerosis. *Ann Neurol.* **67**, 824–830 (2010).
7. Lucas, R. M., Ponsonby, A.-L., Dear, K., Valery, P., Pender, M. P., Burrows, J. M., Burrows, S. R., Chapman, C., Coulthard, A., Dwyer, D. E., Dwyer, T., Kilpatrick, T., Lay, M.-L. J., McMichael, A. J., Taylor, B. V., Mei, I. A. F. van der & Williams, D. Current and past Epstein-Barr virus infection in risk of initial CNS demyelination. *Neurology* **77**, 371–379 (2011).
8. Ascherio, A. & Munger, K. L. Environmental risk factors for multiple sclerosis. Part I: The role of infection. *Ann Neurol.* **61**, 288–299 (2007).
9. Sundqvist, E., Sundström, P., Lindén, M., Hedström, A. K., Aloisi, F., Hillert, J., Kockum, I., Alfredsson, L. & Olsson, T. Epstein-Barr virus and multiple sclerosis: interaction with HLA. *Genes Immun* **13**, 14–20 (2012).

10. Handel, A. E., Williamson, A. J., Disanto, G., Handunnetthi, L., Giovannoni, G. & Ramagopalan, S. V. An Updated Meta-Analysis of Risk of Multiple Sclerosis following Infectious Mononucleosis. *PLOS ONE* **5**, e12496 (2010).
11. Falk, K., Gratama, J. W., Rowe, M., Zou, J. Z., Khanim, F., Young, L. S., Oosterveer, M. A. P. & Ernberg, I. The role of repetitive DNA sequences in the size variation of Epstein—Barr virus (EBV) nuclear antigens, and the identification of different EBV isolates using RFLP and PCR analysis. *Journal of General Virology* **76**, 779–790 (1995).
12. Ambinder, R. F., Mullen, M. A., Chang, Y. N., Hayward, G. S. & Hayward, S. D. Functional domains of Epstein-Barr virus nuclear antigen EBNA-1. *J. Virol.* **65**, 1466–1478 (1991).
13. Frappier, L. in *Epstein Barr Virus Volume 2* 3–34 (Springer, Cham, 2015). doi:10.1007/978-3-319-22834-1_1
14. Hislop, A. D., Taylor, G. S., Sauce, D. & Rickinson, A. B. Cellular Responses to Viral Infection in Humans: Lessons from Epstein-Barr Virus. *Annual Review of Immunology* **25**, 587–617 (2007).
15. Münz, C., Bickham, K. L., Subklewe, M., Tsang, M. L., Chahroudi, A., Kurilla, M. G., Zhang, D., O'Donnell, M. & Steinman, R. M. Human Cd4+ T Lymphocytes Consistently Respond to the Latent Epstein-Barr Virus Nuclear Antigen Ebna1. *J Exp Med* **191**, 1649–1660 (2000).
16. Levin, L. I., Munger, K. L., Rubertone, M. V., Peck, C. A., Lennette, E. T., Spiegelman, D. & Ascherio, A. Temporal Relationship Between Elevation of Epstein-Barr Virus Antibody Titers and Initial Onset of Neurological Symptoms in Multiple Sclerosis. *JAMA* **293**, 2496–2500 (2005).

17. Sundström, P., Juto, P., Wadell, G., Hallmans, G., Svenningsson, A., Nyström, L., Dillner, J. & Forsgren, L. An altered immune response to Epstein-Barr virus in multiple sclerosis: a prospective study. *Neurology* **62**, 2277–2282 (2004).
18. Lünemann, J. D., Tintoré, M., Messmer, B., Strowig, T., Rovira, A., Perkal, H., Caballero, E., Münz, C., Montalban, X. & Comabella, M. Elevated Epstein-Barr virus-encoded nuclear antigen-1 immune responses predict conversion to multiple sclerosis. *Ann. Neurol.* **67**, 159–169 (2010).
19. Buljevac, D., Doornum, G. J. J. van, Flach, H. Z., Groen, J., Osterhaus, A. D. M. E., Hop, W., Doorn, P. A. van, Meché, F. G. A. van der & Hintzen, R. Q. Epstein-Barr virus and disease activity in multiple sclerosis. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* **76**, 1377–1381 (2005).
20. Munger, K. L., Fitzgerald, K. C., Freedman, M. S., Hartung, H.-P., Miller, D. H., Montalbán, X., Edan, G., Barkhof, F., Suarez, G., Radue, E.-W., Sandbrink, R., Kappos, L., Pohl, C. & Ascherio, A. No association of multiple sclerosis activity and progression with EBV or tobacco use in BENEFIT. *Neurology* **85**, 1694–1701 (2015).
21. Kurtzke, J. F. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). *Neurology* **33**, 1444–1452 (1983).
22. Kappos, L., D'Souza, M., Lechner-Scott, J. & Lienert, C. On the origin of Neurostatus. *Multiple Sclerosis and Related Disorders* **4**, 182–185 (2015).
23. Barkhof, F., Filippi, M., Miller, D. H., Scheltens, P., Campi, A., Polman, C. H., Comi, G., Adèr, H. J., Losseff, N. & Valk, J. Comparison of MRI criteria at first presentation to predict conversion to clinically definite multiple sclerosis. *Brain* **120** (Pt 11), 2059–2069 (1997).
24. UniProt. at <http://www.uniprot.org>

25. 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* **55**, 188–206 (2000).
26. Bernitsas, E., Khan, O., Razmjou, S., Tselis, A., Bao, F., Caon, C., Millis, S. & Seraji-Bozorgzad, N. Cerebrospinal fluid humoral immunity in the differential diagnosis of multiple sclerosis. *PLoS One* **12**, (2017).
27. Munger, K., Levin, L., O'Reilly, E., Falk, K. & Ascherio, A. Anti-Epstein–Barr virus antibodies as serological markers of multiple sclerosis: a prospective study among United States military personnel. *Mult Scler* **17**, 1185–1193 (2011).
28. Lindsey, J. W., Hatfield, L. M. & Vu, T. Epstein–Barr virus neutralizing and early antigen antibodies in multiple sclerosis. *European Journal of Neurology* **17**, 1263–1269 (2010).
29. Mechelli, R., Anderson, J., Vittori, D., Coarelli, G., Annibaldi, V., Cannoni, S., Aloisi, F., Salvetti, M., James, J. A. & Ristori, G. Epstein–Barr virus nuclear antigen-1 B-cell epitopes in multiple sclerosis twins. *Mult Scler* **17**, 1290–1294 (2011).
30. Jafari, N., Nierop, G. P. van, Verjans, G. M. G. M., Osterhaus, A. D. M. E., Middeldorp, J. M. & Hintzen, R. Q. No evidence for intrathecal IgG synthesis to Epstein Barr virus nuclear antigen-1 in multiple sclerosis. *Journal of Clinical Virology* **49**, 26–31 (2010).
31. 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. *Journal of Neuroimmunology* **215**, 102–107 (2009).
32. Lünemann, J. D., Tackenberg, B., Stein, A., Wandinger, K. P., Oertel, W. H., Wagner, H. J., Münz, C., Meisel, H., Sommer, N. & Zipp, F. Dysregulated Epstein-Barr virus infection in patients with CIDP. *Journal of Neuroimmunology* **218**, 107–111 (2010).

33. Spalice, A., Parisi, P., Papetti, L., Nicita, F., Ursitti, F., Del Balzo, F., Properzi, E., Verrotti, A., Ruggieri, M. & Iannetti, P. Clinical and Pharmacological Aspects of Inflammatory Demyelinating Diseases in Childhood: An Update. *Curr Neuropharmacol* **8**, 135–148 (2010).
34. Rumpold, H., Rhodes, G. H., Bloch, P. L., Carson, D. A. & Vaughan, J. H. The glycine-alanine repeating region is the major epitope of the Epstein-Barr nuclear antigen-1 (EBNA-1). *The Journal of Immunology* **138**, 593–599 (1987).
35. Otto, C., Hofmann, J. & Ruprecht, K. Antibody producing B lineage cells invade the central nervous system predominantly at the time of and triggered by acute Epstein–Barr virus infection: A hypothesis on the origin of intrathecal immunoglobulin synthesis in multiple sclerosis. *Medical Hypotheses* **91**, 109–113 (2016).
36. Pohl, D., Rostasy, K., Jacobi, C., Lange, P., Nau, R., Krone, B. & Hanefeld, F. Intrathecal antibody production against Epstein-Barr and other neurotropic viruses in pediatric and adult onset multiple sclerosis. *J Neurol* **257**, 212–216 (2010).
37. Reiber, H., Ungefehr, S. & Jacobi, C. The intrathecal, polyspecific and oligoclonal immune response in multiple sclerosis. *Mult Scler* **4**, 111–117 (1998).
38. Owens, G. P., Bennett, J. L., Lassmann, H., O'Connor, K. C., Ritchie, A. M., Shearer, A., Lam, C., Yu, X., Birlea, M., DuPree, C., Williamson, R. A., Hafler, D. A., Burgoon, M. P. & Gilten, D. Antibodies Produced by Clonally Expanded Plasma Cells in Multiple Sclerosis Cerebrospinal Fluid. *Ann Neurol* **65**, 639–649 (2009).
39. Kuhle, J., Disanto, G., Dobson, R., Adutori, R., Bianchi, L., Topping, J., Bestwick, J., Meier, U.-C., Marta, M., Costa, G. D., Runia, T., Evdoshenko, E., Lazareva, N., Thouvenot, E., Iaffaldano, P., Drenzo, V., Khademi, M., Piehl, F., Comabella, M., Sombekke, M., Killestein, J., Hegen, H., Rauch, S., D'Alfonso, S., Alvarez-Cermeño, J., Kleinová, P., Horáková, D., Roesler, R., Lauda, F., Llufríu, S., Avsar,

T., Uygunoglu, U., Altintas, A., Saip, S., Menge, T., Rajda, C., Bergamaschi, R., Moll, N., Khalil, M., Marignier, R., Dujmovic, I., Larsson, H., Malmestrom, C., Scarpini, E., Fenoglio, C., Wergeland, S., Laroni, A., Annibaldi, V., Romano, S., Martínez, A., Carra, A., Salvetti, M., Uccelli, A., Torkildsen, Ø., Myhr, K., Galimberti, D., Rejdak, K., Lycke, J., Frederiksen, J., Drulovic, J., Confavreux, C., Brassat, D., Enzinger, C., Fuchs, S., Bosca, I., Pelletier, J., Picard, C., Colombo, E., Franciotta, D., Derfuss, T., Lindberg, R., Yaldizli, Ö., Vécsei, L., Kieseier, B., Hartung, H., Villoslada, P., Siva, A., Saiz, A., Tumani, H., Havrdová, E., Villar, L., Leone, M., Barizzone, N., Deisenhammer, F., Teunissen, C., Montalban, X., Tintoré, M., Olsson, T., Trojano, M., Lehmann, S., Castelnovo, G., Lapin, S., Hintzen, R., Kappos, L., Furlan, R., Martinelli, V., Comi, G., Ramagopalan, S. & Giovannoni, G. Conversion from clinically isolated syndrome to multiple sclerosis: A large multicentre study. *Mult Scler* **21**, 1013–1024 (2015).

40. Schwenkenbecher, P., Sarikidi, A., Bönig, L., Wurster, U., Bronzlik, P., Sühs, K.-W., Pul, R., Stangel, M. & Skripuletz, T. Clinically Isolated Syndrome According to McDonald 2010: Intrathecal IgG Synthesis Still Predictive for Conversion to Multiple Sclerosis. *Int J Mol Sci* **18**, (2017).
41. Kieff, E. & Rickinson, A. B. in *Fields Virology* (eds. Fields, B. N., Knipe, D. M., Howley, P. M. & Griffin, D. E.) (Lippincott Williams & Wilkins, 2001).
42. Farrell, R. A., Antony, D., Wall, G. R., Clark, D. A., Fisniku, L., Swanton, J., Khaleeli, Z., Schmierer, K., Miller, D. H. & Giovannoni, G. Humoral immune response to EBV in multiple sclerosis is associated with disease activity on MRI. *Neurology* **73**, 32–38 (2009).
43. Ingram, G., Bugert, J. J., Loveless, S. & Robertson, N. P. Anti-EBNA-1 IgG is not a reliable marker of multiple sclerosis clinical disease activity. *European Journal of Neurology* **17**, 1386–1389 (2010).

44. Horakova, D., Zivadinov, R., Weinstock-Guttman, B., Havrdova, E., Qu, J., Tamaño-Blanco, M., Badgett, D., Tyblova, M., Bergsland, N., Hussein, S., Willis, L., Krasensky, J., Vaneckova, M., Seidl, Z., Lelkova, P., Dwyer, M. G., Zhang, M., Yu, H., Duan, X., Kalincik, T. & Ramanathan, M. Environmental Factors Associated with Disease Progression after the First Demyelinating Event: Results from the Multi-Center SET Study. *PLOS ONE* **8**, e53996 (2013).
45. Kvistad, S., Myhr, K.-M., Holmøy, T., Bakke, S., Beiske, A. G., Bjerve, K. S., Hovdal, H., Løken-Amsrud, K. I., Lilleås, F., Midgard, R., Njølstad, G., Pedersen, T., Benth, J. Š., Wergeland, S. & Torkildsen, Ø. Antibodies to Epstein-Barr virus and MRI disease activity in multiple sclerosis. *Mult Scler* **20**, 1833–1840 (2014).
46. Zivadinov, R., Cerza, N., Hagemeyer, J., Carl, E., Badgett, D., Ramasamy, D. P., Weinstock-Guttman, B. & Ramanathan, M. Humoral response to EBV is associated with cortical atrophy and lesion burden in patients with MS. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm* **3**, (2016).
47. Lünemann, A., Rowe, M. & Nadal, D. in *Epstein Barr Virus Volume 2* (ed. Münz, C.) **391**, 265–287 (Springer International Publishing, 2015).
48. Kato, A., Hulse, K. E., Tan, B. K. & Schleimer, R. P. B lymphocyte lineage cells and the respiratory system. *J Allergy Clin Immunol* **131**, 933–957 (2013).
49. Polman, C. H., Reingold, S. C., Banwell, B., Clanet, M., Cohen, J. A., Filippi, M., Fujihara, K., Havrdova, E., Hutchinson, M., Kappos, L., Lublin, F. D., Montalban, X., O'Connor, P., Sandberg-Wollheim, M., Thompson, A. J., Waubant, E., Weinshenker, B. & Wolinsky, J. S. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 Revisions to the McDonald criteria. *Ann Neurol* **69**, 292–302 (2011).

3. Liste der ausgewählten Publikationen

Giess RM, Pfuhl C, Behrens JB, Rasche L, Freitag E, Khalighy N, Otto K, Würfel J, Brandt AU, Hofmann J, Eberspächer B, Bellmann-Strobl J, Paul F, Ruprecht K:

Epstein-Barr virus antibodies in serum and DNA load in saliva are not associated with radiological or clinical disease activity in patients with early multiple sclerosis;

PLoS ONE (2017); doi:10.1371/journal.pone.0175279

Total cites 508.238 (2016); Impact factor without self cites 2,806 (2016); Eigenfactor Score 1,92176 (2016)

Pfuhl C*, Oechtering J*, Rasche L*, **Giess RM**, Behrens JR, Wakonig K, Freitag E, Pache FC, Otto C, Hofmann J, Eberspächer B, Bellmann-Strobl J, Paul F, Ruprecht K:

Association of serum Epstein-Barr nuclear antigen-1 antibodies and intrathecal immunoglobulin synthesis in early multiple sclerosis;

J Neuroimmunol. (2015); doi:10.1016/j.jneuroim.2015.06.012

Total cites 9.420 (2016); Impact factor without self cites 2.720 (2016); Eigenfactor Score 0.01061 (2016)

Ruprecht K*, Wunderlich B*, **Giess RM**, 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;

J. Neuroimmunol. (2014); doi:10.1016/j.jneuroim.2014.04.005

Total cites 9.420 (2016); Impact factor without self cites 2.720 (2016); Eigenfactor Score 0.01061 (2016)

4. Ausführliche Anteilserklärung an den erfolgten Publikationen

4.1 Publikation 1

Giess RM, Pfuhl C, Behrens JB, Rasche L, Freitag E, Khalighy N, Otto K, Würfel J, Brandt AU, Hofmann J, Eberspächer B, Bellmann-Strobl J, Paul F, Ruprecht K :

Epstein-Barr virus antibodies in serum and DNA load in saliva are not associated with radiological or clinical disease activity in patients with early multiple sclerosis;

PLoS ONE (2017); doi:10.1371/journal.pone.0175279

Beitrag im Einzelnen:

Maßgebliche Mitarbeit an der Durchführung von klinischen Studienvisiten mit Durchführung von peripher-venösen Blutentnahmen sowie Sammlung von Speichelproben und Erhebung von klinischen Scores (EDSS, MSFC) im Rahmen der Berliner CIS-Kohortenstudie am NeuroCure Clinical Research Center der Charité Universitätsmedizin Berlin (NCRC).

Eigenständige Rekrutierung von gesunden Kontrollprobanden, Organisation und Durchführung der Visitermine mit klinischer Datenerhebung und Sammlung von Biomaterialien (venöses Blut, Speichelproben) bei gesunden Kontrollen.

Eigenständige Arbeit im prä-analytischen Labor des NCRC für die Aufbereitung der Serum- und Speichelproben zur weiteren Analyse.

Angeleitete Durchführung von Speichelanalysen mittels Polymerase-Chain-Reaction (PCR) am Institut für Virologie, Charité Universitätsmedizin Berlin, Campus Mitte.

Angeleitete Durchführung der Bestimmung von Antikörperkonzentration in Serumproben mittels Chemilumineszenz-Immunoassay (CLIA) im Labor Berlin, Charité Vivantes GmbH, Sylter Str. 2, 13353 Berlin.

Eigenständige Berechnung von Antikörper- und DNA-Konzentrationswerten gemäß Herstellerangaben und Erstellung der Datenmatrix für die statistische Auswertung.

Maßgebliche Mitarbeit an der statistischen Auswertung (Durchführung statistischer Tests, Erstellung der Diagramme für die Publikationsschrift) mittels GraphPad Prism.

Erstellung und Bearbeitung des Entwurfs für das Publikationsmanuskript. Revision und Überarbeitung des Manuskripts.

4.2 Publikation 2

Pfuhl C*, Oechtering J*, Rasche L*, **Giess RM**, Behrens JR, Wakonig K, Freitag E, Pache FC, Otto C, Hofmann J, Eberspächer B, Bellmann-Strobl J, Paul F, Ruprecht K :

Association of serum Epstein-Barr nuclear antigen-1 antibodies and intrathecal immunoglobulin synthesis in early multiple sclerosis;

J Neuroimmunol. (2015); doi:10.1016/j.jneuroim.2015.06.012

Beitrag im Einzelnen:

Maßgebliche Mitarbeit an der Durchführung von klinischen Studienvisiten mit Durchführung von peripher-venösen Blutentnahmen und Erhebung von klinischen Scores (EDSS, MSFC) im Rahmen der Berliner CIS-Kohortenstudie am NeuroCure Clinical Research Center der Charité Universitätsmedizin Berlin (NCRC).

Mitarbeit im prä-analytischen Labor des NCRC bei der Aufbereitung von Serumproben und Vorbereitung der Durchführung von ELISA.

Eigenständige Berechnung der ELISA-Messwerte (Arbitrary Units, AU) aus Rohwerten gemäß Herstellerinformationen und Erstellung der Datenmatrix für die statistische Auswertung.

Mitarbeit an der Durchführung der statistischen Auswertung mittels IBM SPSS.

Revision und Überarbeitung des Manuskripts für die Publikation.

4.3 Publikation 3

Ruprecht K*, Wunderlich B*, **Giess RM**, 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;

J. Neuroimmunol. (2014); doi:10.1016/j.jneuroim.2014.04.005

Beitrag im Einzelnen:

Maßgebliche Mitarbeit an der Durchführung von klinischen Studienvisiten mit Durchführung von peripher-venösen Blutentnahmen und Erhebung von klinischen Scores (EDSS, MSFC) im Rahmen der Berliner CIS-Kohortenstudie am NeuroCure Clinical Research Center der Charité Universitätsmedizin Berlin (NCRC).

Mitarbeit im Labor bei der Aufbereitung von Serumproben. Eigenständige Berechnung der ELISA-Messwerte (Arbitrary Units, AU) gemäß Herstellerinformationen aus den gemessenen Rohwerten und Erstellung der Datenmatrix für die statistische Auswertung in Microsoft Excel.

Mitarbeit an der Durchführung der statistischen Auswertung mittels IBM SPSS.

Revision und Überarbeitung des Manuskripts für die Publikation.

5. Eidesstattliche Versicherung

„Ich, René Markus Gieß, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema

„Epstein-Barr-Virus und Multiple Sklerose - Zur Rolle von Immunglobulin-G-Antikörpern gegen Epstein-Barr Nuclear Antigen-1 und anderen EBV-spezifischen Laborparametern als diagnostische, prognostische und krankheitsaktivitätsbezogene Biomarker bei Patienten mit klinisch isoliertem Syndrom und früher 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.

Mein Anteil an der ausgewählten Publikation entspricht dem, der in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Betreuer angegeben ist.

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

Berlin, den 18.03.2018

6. Druckexemplare der ausgewählten Publikationen

6.1 Publikation 1

Autoren:

Giess RM, Pfuhl C, Behrens JB, Rasche L, Freitag E, Khalighy N, Otto K, Würfel J, Brandt AU, Hofmann J, Eberspächer B, Bellmann-Strobl J, Paul F, Ruprecht K.

Titel:

Epstein-Barr virus antibodies in serum and DNA load in saliva are not associated with radiological or clinical disease activity in patients with early multiple sclerosis.

Journal:

PLOS ONE. 2017 Apr 7;12(4):e0175279.

<https://journals.plos.org/plosone/>

Online-Veröffentlichung:

07. April 2017. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175279>

Die Nutzung und Veröffentlichung dieses Artikels auf den nachfolgenden Seiten erfolgt in unveränderter Form gemäß der *Creative Commons Attribution (CC BY)* - Lizenz, Version 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>)

RESEARCH ARTICLE

Epstein-Barr virus antibodies in serum and DNA load in saliva are not associated with radiological or clinical disease activity in patients with early multiple sclerosis

René M. Gieß^{1,2,3}, Catherina Pfuhl^{1,2,3}, Janina R. Behrens^{1,2,3}, Ludwig Rasche^{1,2,3}, Erik Freitag^{1,2,3}, Nima Khalighy¹, Carolin Otto⁴, Jens Wuerfel^{2,5}, Alexander U. Brandt^{2,3}, Jörg Hofmann^{6,7}, Bettina Eberspächer^{6,8}, Judith Bellmann-Strobl^{2,3,9}, Friedemann Paul^{1,2,3,9}, Klemens Ruprecht^{1,3*}

1 Department of Neurology, Charité - Universitätsmedizin Berlin, Berlin, Germany, **2** NeuroCure Clinical Research Center, Charité - Universitätsmedizin Berlin, Berlin, Germany, **3** Clinical and Experimental Multiple Sclerosis Research Center, Charité - Universitätsmedizin Berlin, Berlin, Germany, **4** St. Josefs-Krankenhaus, Potsdam, Germany, **5** MIAC AG and Dep. for Biomedical Engineering, University of Basel, Basel, Switzerland, **6** Labor Berlin Charité-Vivantes GmbH, Berlin, Germany, **7** Institute of Medical Virology, Charité – Universitätsmedizin Berlin, Berlin, Germany, **8** Vivantes Klinikum Neukölln, Berlin, Germany, **9** Experimental and Clinical Research Center, Charité - Universitätsmedizin Berlin and Max Delbrück Center for Molecular Medicine, Berlin-Buch, Germany

* klemens.ruprecht@charite.de



OPEN ACCESS

Citation: Gieß RM, Pfuhl C, Behrens JR, Rasche L, Freitag E, Khalighy N, et al. (2017) Epstein-Barr virus antibodies in serum and DNA load in saliva are not associated with radiological or clinical disease activity in patients with early multiple sclerosis. PLoS ONE 12(4): e0175279. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175279>

Editor: Gulfaraz Khan, United Arab Emirates University, UNITED ARAB EMIRATES

Received: February 19, 2017

Accepted: March 23, 2017

Published: April 7, 2017

Copyright: © 2017 Gieß et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: The data included in this work were collected in an ongoing longitudinal study (Berlin CIS cohort), which was approved by the institutional review board of Charité – Universitätsmedizin Berlin. According to the data protection requirements of this institutional review board, we need explicit approval by the institutional review board in each case data from the study are provided to external researchers. Thus, if external researchers will request data from the present study, we will obtain approval for distribution of

Abstract

Objective

To investigate the association of Epstein-Barr virus (EBV) nuclear antigen-1 (EBNA-1) and viral capsid antigen (VCA) immunoglobulin (Ig)G antibodies in serum as well as EBV DNA load in saliva with radiological and clinical disease activity in patients with clinically isolated syndrome (CIS) and early relapsing-remitting MS (RRMS).

Methods

EBNA-1 and VCA immunoglobulin (Ig)G antibodies were determined in serum of 100 patients with CIS/early RRMS and 60 healthy controls. EBV DNA load was measured in saliva of 48 patients and 50 controls. Patients underwent clinical assessment with the Expanded Disability Status Scale (EDSS) and 3 Tesla magnetic resonance imaging at baseline and after a median of 20 months of follow-up (n = 63 for MRI, n = 71 for EDSS). The association of EBV parameters with occurrence of a second relapse, indicating conversion to clinically definite MS (CDMS), was evaluated over a median of 35 months of follow-up after the first clinical event (n = 89).

Results

EBNA-1 IgG antibody frequency ($p = 0.00005$) and EBNA-1 and VCA IgG antibody levels ($p < 0.0001$ for both) were higher in patients than in controls. EBV DNA load in saliva did not differ between groups. Neither EBV antibody levels nor DNA load in saliva were associated

these data by the institutional review board of Charité – Universitätsmedizin Berlin and subsequently provide the external researchers with the data. We confirm that data will be available upon request to all interested researchers. Please contact the corresponding author (klemens.ruprecht@charite.de) to request data.

Funding: Support was provided by the German Ministry of Education and Research (BMBF/KKNMS, Competence Network Multiple Sclerosis, grant number 01G11312) and the Charité Research Fund. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript. JH and BE are affiliated to Labor Berlin Charité-Vivantes GmbH but do not receive salaries from Labor Berlin Charité-Vivantes GmbH. The funders did not have any role in the study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript. The specific roles of the authors are articulated in the 'author contributions' section."

Competing interests: RMG received financial support for travel and congress attendance from Novartis. CP received financial support for travel and congress attendance from sanofi-aventis/Genzyme. JW is CEO of MIAC AG, Switzerland. He served on advisory boards for Biogen, Genzyme, Novartis, Roche and Teva. In the past, he received research grants from Novartis, and speaker honoraria from Bayer, Biogen Genzyme, Novartis, and Teva Pharmaceuticals; and was supported by the German Ministry of Education and Research (BMBF/KKNMS, Competence Network Multiple Sclerosis), the German Ministry of Economy (BMW/EXIST) and the EU (HORIZON2020). AUB is cofounder and director of Motognosis. He received research grants from Novartis; travel support from Novartis and Biogen Idec; speaker honoraria from Heidelberg Engineering, Novartis, Bayer and Biogen Idec. He serves on the VISION study advisory board from Biogen Idec. JBS has received speaking fees and travel grants from Bayer Healthcare, sanofi-aventis/Genzyme, and Teva Pharmaceuticals. FP has received research support from Deutsche Forschungsgemeinschaft, the German Ministry of Education and Research (BMBF/KKNMS, Competence Network Multiple Sclerosis), BMWi, Guthy Jackson Charitable Foundation, Arthur Arnstein Foundation, and speaker honoraria and travel reimbursement from BiogenIdec, Bayer, Teva, MerckSerono, Novartis and Genzyme. KR has received research support from the German Ministry of Education and Research (BMBF/KKNMS, Competence Network Multiple Sclerosis) and Novartis as well as speaking fees and travel grants from Bayer

with baseline or follow-up number or volume of T2-weighted (T2w) or contrast enhancing lesions, number of Barkhof criteria or the EDSS, or with the number of new T2w lesions, T2w lesion volume change or EDSS change on follow-up. Likewise, levels of EBV IgG antibodies in serum and DNA load in saliva were not associated with conversion to CDMS.

Conclusions

While these findings confirm the association of EBV infection with early MS, neither EBNA-1 nor VCA IgG antibodies in serum nor EBV DNA load in saliva were associated with radiological or clinical disease activity in patients with CIS/early RRMS. These data are compatible with the concept that EBV may be a trigger for MS acting very early during the development of the disease.

Introduction

Infection with the Epstein-Barr virus (EBV) is a strong risk factor for multiple sclerosis (MS), a chronic inflammatory demyelinating disease of the central nervous system [1, 2]. EBV seroprevalence in patients with MS is practically universal, indicating that MS risk among EBV seronegatives is extremely low [1, 3–5]. Symptomatic primary EBV infection (infectious mononucleosis) increases the relative risk of MS about twofold [6]. Initially seronegative persons, which went on to develop MS, seroconverted to EBV positivity before the onset of MS [7]. Among healthy individuals infected with EBV, MS risk increases with increasing serum titers of antibodies to Epstein-Barr nuclear antigen-1 (EBNA-1) and the EBV nuclear antigen complex (EBNAc) [8–12]. Accordingly, patients with MS or with a clinically isolated syndrome (CIS, i.e. a first clinical event suggestive of MS) have elevated levels of antibodies against EBV, in particular against EBNA-1 [13–18].

Although the association of EBV and MS risk is thus very robust, the association of parameters of EBV infection, such as serum levels of immunoglobulin (Ig)G antibodies to EBV, with disease activity in patients with CIS or MS is less clear-cut. While previous reports described associations of EBV antibodies in serum with certain radiological and clinical markers of MS disease activity, results were not always consistent across those studies [15, 19–26]. Furthermore, a recent large prospective study did not identify an association of EBV IgG antibodies in serum with risk of CIS conversion to MS, or MS activity or progression [27].

EBV is transmitted via oral secretions, enters through the epithelium that lines the oropharynx (Waldeyer's ring) and infects naïve B cells, which differentiate through a germinal center reaction into memory B cells, where EBV persists for the lifetime of the host [28]. Upon returning of EBV-infected memory B cells to the oropharynx these can differentiate into plasma cells that subsequently initiate viral replication and release virions that are shed into the saliva [29]. However, the role of EBV DNA load in saliva as a biomarker for disease activity in adults with early MS has not been examined so far.

In this study, we investigated whether EBNA-1 and viral capsid antigen (VCA) IgG antibody levels in serum, as well as EBV DNA load in saliva, are associated with clinical and magnetic resonance imaging (MRI) markers of disease activity, severity and progression in a cohort of 100 patients with CIS or early relapsing-remitting MS (RRMS).

Patients and methods

The study was approved by the institutional review board of Charité - Universitätsmedizin Berlin (EA1/182/10). All participants provided written informed consent.

Healthcare, Biogen Idec, Merck Serono, sanofi-aventis/Genzyme, Teva Pharmaceuticals, and Novartis. All other authors declare that there is no conflict of interest. The affiliation of JH and BE to Labor Berlin Charité-Vivantes GmbH does not alter our adherence to PLOS ONE policies on sharing data and materials.

Patients and healthy controls

The Berlin CIS cohort (NCT01371071) is an ongoing prospective observational study of patients with a first clinical event suggestive of inflammatory demyelination (i.e. a CIS [30]) or early RRMS that started recruitment in January 2011. Inclusion criteria are age >18 years, a first clinical event suggestive of central nervous system demyelination within 6 months before inclusion into the study or a diagnosis of RRMS according to the McDonald 2010 criteria [31] within 24 months before inclusion into the study. Exclusion criteria are inability or unwillingness to provide informed consent, a history of alcohol or drug abuse, any ocular diseases precluding performance of optical coherence tomography, and any conditions (e.g. allergies) or devices (e.g. cardiac pacemaker) precluding MRI examinations. At the baseline visit, all patients underwent a thorough clinical assessment, including Expanded Disability Status Scale (EDSS) score, and were studied by cerebral and spinal MRI. Additionally, serum, and whole blood samples were obtained by peripheral venipuncture and about 1 ml of saliva was collected in sterile cups. In 95 of 99 (86%) patients who underwent MRI blood and saliva was withdrawn on the day of the MRI examination. The median (range) delay between the blood/saliva withdrawal and MRI in the remaining 14 patients was 9 (1–49) days. Clinical and MRI assessments were repeated on follow-up visits every 12 months after onset of first clinical symptoms. Serum and saliva samples were also obtained from 60 healthy controls, matched by sex and age to the first 60 patients with CIS/RRMS enrolled in the study. All serum samples were processed at the NeuroCure Clinical Research Center, Charité – Universitätsmedizin Berlin, according to standard operating procedures. Saliva samples and aliquoted sera were stored at -20°C and -80°C, respectively.

Magnetic resonance imaging

High-resolution three-dimensional isotropic whole brain datasets (1mm³) were acquired on a 3 Tesla whole-body MRI (Magnetom Trio with TIM, Siemens Healthcare AG, Erlangen, Germany), using a clinical routine 12-channel head coil. For anatomical T1-weighted imaging, a magnetization-prepared rapid acquisition and multiple gradient echo technique (MPRAGE, TE 3.03 ms, TR 1900 ms, TI 900 ms, flip angle 9°) was applied. For T2-weighted imaging (T2w), a single slab three-dimensional T2w turbo-spin-echo (TSE) sequence with high sampling efficiency (SPACE) was selected without (T2; TE 388 ms, TR 6000 ms, flip angle 120°) or with fluid inversion recovery pulse (FLAIR; TE 502 ms, TR 5000 ms, TI 2100 ms, flip angle 120°). To rule out brain stem and infratentorial artifacts, an axial double-echo proton density/T2w sequence was added (TE 14/87 ms, TR 3400 ms, flip angle 120°, voxel resolution 1 x 1 x 3 mm³, no gap). Contrast enhanced images were acquired by a volumetric interpolated brain examination sequence optimized for short acquisition time with asymmetric k-space sampling and interpolation (VIBE; 1 mm³, TE 2.2 ms, TR 4.85 ms, flip 9°) 8 min after body weight adapted 1 mmol Gadobutrol injection). The number of T2w lesions, contrast-enhancing lesions (CEL), and number of Barkhof criteria were scored. CEL as well as T1w and T2w lesion load was calculated using the OsiriX software toolbox (OsiriX foundation, Geneva, Switzerland) and in-house applications. All MRI data were analyzed by investigators blinded to the results of laboratory studies.

Anti-EBV antibodies

Serum immunoglobulin (Ig)G antibodies to EBNA-1 and to the EBV viral capsid antigen (VCA) were measured by Liaison® (DiaSorin, Saluggia, Italy) automated chemiluminescent assays at Labor Berlin GmbH in serum samples collected at the baseline visit. According to the manufacturer's recommendations, EBNA-1 IgG levels <5 U/ml were considered negative, levels between 5–20 U/ml were considered equivocal, and levels ≥20 U/ml were considered

positive. VCA IgG levels <20 U/ml were considered negative and VCA IgG levels ≥ 20 U/ml were considered positive. Samples with values above the upper detection limit were re-measured at a dilution of 1:20, as suggested by the manufacturer. The upper detection limit following dilution was 12,000 U/ml for EBNA-1 IgG and 15,000 U/ml for VCA IgG. Persons with positive antibodies to either EBNA-1 or VCA or both were considered EBV-seropositive. EBNA-1- and VCA-IgG-negative persons were considered EBV-seronegative.

Quantitation of EBV-DNA in whole blood and saliva samples

EBV DNA was quantitated in whole blood and saliva collected at the baseline visit by a real time PCR for the BNRF1 p143 gene using primers and probes described elsewhere [32]. DNA was extracted from 200 μ l of whole blood or undiluted saliva using the QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Germany) according to the manufacturer's instructions. All samples were controlled for the presence of inhibiting factors by the use of an internal co-amplified DNA. The 95% detection limit of the assay is 1000 copies/ml. In case small amounts of EBV DNA below this level could be detected these were reported as <1000 EBV DNA copies/ml.

Statistical analysis

Statistical significance of frequencies was assessed by Fisher's exact test. Significance of different antibody levels and DNA load in saliva in patients and controls was assessed by Mann Whitney test. Significance of different antibody levels in the groups of untreated, glatiramer-acetate-treated, and interferon-beta-treated patients with MS were assessed by Kruskal-Wallis test. Associations between EBV parameters and clinical (EDSS) and MRI disease activity measures at baseline and a minimum of 12 months of follow-up were assessed by Spearman correlations. Associations of EBV parameters with conversion to clinically definite MS (CDMS) were assessed by Kaplan-Meier curves in all patients with only one clinical event before inclusion into the cohort. For Kaplan-Meier analyses, patients were grouped into tertiles of low, medium and high EBNA-1 or VCA IgG levels in serum as well as into those with and without EBV DNA in saliva. All statistical analyses were performed with GraphPad Prism Version 6.01. *P*-values <0.05 were considered statistically significant.

Results

Participants

The demographics, baseline EDSS values, immunomodulatory treatments and baseline MRI findings of the 100 patients with CIS ($n = 76$) or early RRMS ($n = 24$) analyzed in this study were typical of patients with early MS and are summarized in Table 1. While the gender distribution was not significantly different between the patient and the healthy control group ($p = 0.13$), healthy controls were on average about 3 years younger than CIS/RRMS patients ($p = 0.01$). Of the 24 patients with a diagnosis of RRMS, 11 had experienced two relapses prior to inclusion into the cohort, thus meeting criteria for clinically definite MS (CDMS), and 13 had a diagnosis of RRMS based on one clinical relapse and fulfilment of MRI criteria for RRMS [31]. Thus, 89 patients had experienced one single event suggestive of inflammatory demyelination at the time of entering the prospective cohort.

EBV seroprevalence and EBNA-1 and VCA IgG antibody levels in patients and controls

IgG antibodies to EBNA-1 above the cut-off level of 20 U/ml were detectable in 96/100 (96%) of patients with CIS/RRMS and 44/60 (73%) of healthy controls ($p = 0.00005$). VCA IgG

Table 1. Demographics, clinical and MRI findings and EBV parameters at baseline of patients and healthy controls analyzed in this study.

	CIS (n = 76)	Early RRMS (n = 24)	Controls (n = 60)
Females/Males (% Female)	53/23 (70)	15/9 (62.5)	33/27 (55)
Median (range) age, years	32 (19–56)	30 (18–53)	27 (20–54)
Median (range) EDSS	1.5 (0–3.5)	1.5 (0–4)	n.a.
Immunomodulatory treatment (number)	<ul style="list-style-type: none"> • None (58) • Glatiramer acetate (6) • Interferon-beta-1a i.m. (3) • Interferon-beta-1a s.c. (7) • Interferon-beta-1b s.c. (2) 	<ul style="list-style-type: none"> • None (12) • Glatiramer acetate (8) • Interferon-beta-1a i.m. (2) • Interferon-beta-1a s.c. (1) • Immunoglobulins i.v. (1) 	n.a.
Mean (SD) number T2w lesions	15.6 (25.5)	31.7 (38.8)	n.a.
Mean (SD) T2w lesion volume (cm ³)	1.3 (2.3)	3 (3.7)	n.a.
Mean (SD) CEL number	0.03 (0.18)	1.5 (1.8)	n.a.
Mean (SD) CEL volume (cm ³)	0.0012 (0.007)	0.14 (0.3)	n.a.
0 BC, number (%)	14 (19)	1 (4)	n.a.
1–2 BC, number (%)	30 (41)	5 (22)	n.a.
3–4 BC, number (%)	29 (40)	17 (74)	n.a.
Mean (SD) Anti-EBNA1 IgG (AU/ml)	1120 (1530)	750 (1230)	485.7 (972.9)
Mean (SD) Anti-VCA IgG (AU/ml)	498.2 (468.3)	449.1 (492.7)	283.4 (481.2)
Mean (SD) EBV DNA (copies/ml)	32713 (98294) n = 37	164107 (448831) n = 11	28370 (107671) n = 47

AU = arbitrary units, BC = Barkhof criteria, CEL = contrast enhancing lesions, CIS = clinically isolated syndrome, EBNA-1 = Epstein-Bar nuclear antigen-1, EDSS = Expanded Disability Status Scale, RRMS = relapsing-remitting multiple sclerosis, SD = standard deviation, VCA = viral capsid antigen

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175279.t001>

antibodies above the cut-off level of 20 U/ml were detected in 98/100 (98%) patients with CIS/RRMS and 57/60 (95%) of healthy controls ($p = 0.36$). All EBNA-1 IgG seronegative patients had antibodies to VCA and all VCA IgG seronegative patients had antibodies to EBNA-1. However, the three VCA IgG seronegative healthy controls neither had antibodies to EBNA-1. Thus, all patients with MS (100%) but only 57/60 (95%) of the healthy controls had serologic evidence of prior EBV infection ($p = 0.051$). EBNA-1 and VCA IgG antibody levels were significantly higher ($p < 0.0001$ for both) in patients with CIS/RRMS ($n = 100$) than in EBV-seropositive healthy controls ($n = 57$; Fig 1). There were no significant differences of EBNA-1 ($p = 0.07$) or VCA ($p = 0.42$) antibody levels in patients with CIS or RRMS. EBNA-1 ($p = 0.39$)

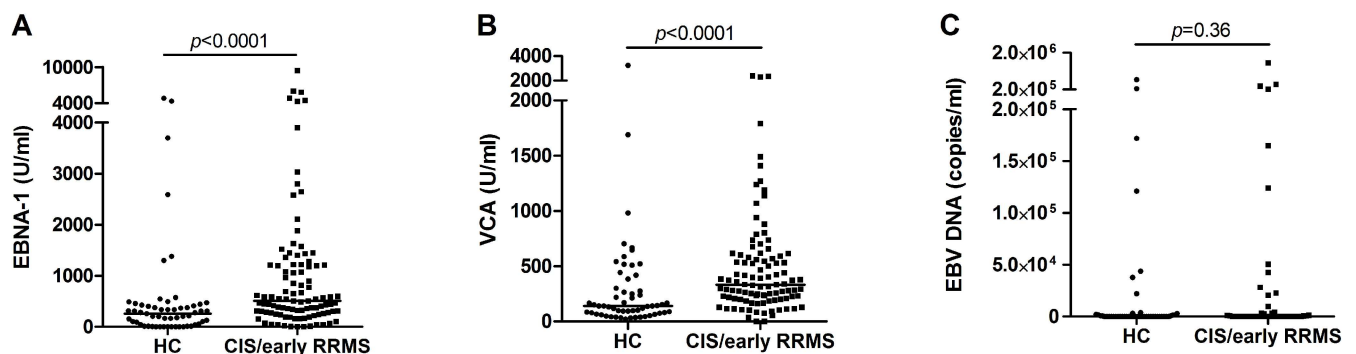


Fig 1. EBV antibodies in serum and DNA load in saliva in healthy controls and patients with early MS. Levels of Immunoglobulin (Ig)G antibodies to Epstein-Barr nuclear antigen-1 (EBNA-1, A) and viral capsid antigen (VCA, B) in serum of healthy controls (HC, $n = 57$) and patients with clinically isolated syndrome (CIS) and early relapsing-remitting MS (RRMS, $n = 100$). (C) EBV DNA copy number in saliva of healthy controls ($n = 47$) and patients with CIS/early RRMS ($n = 48$). The horizontal lines indicate the median (median EBV DNA load was 0 in HC and CIS/early RRMS).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175279.g001>

Table 2. Association of EBV parameters with radiological and clinical disease activity at baseline.

	Number of T2w lesions (baseline)	Total volume of T2w lesions (baseline)	Number of contrast-enhancing lesions (baseline)	Total volume of contrast-enhancing lesions (baseline)	Number of Barkhof criteria (baseline)	EDSS (baseline)	Age at onset of first symptoms
Anti-EBNA1 IgG	• n = 99 • r = 0.003 • p = 0.978	• n = 99 • r = 0.004 • p = 0.972	• n = 82 • r = -0.066 • p = 0.558	• n = 82 • r = -0.041 • p = 0.713	• n = 96 • r = 0.036 • p = 0.728	• n = 100 • r = -0.196 • p = 0.051	• n = 100 • r = 0.148 • p = 0.141
Anti-VCA IgG	• n = 99 • r = 0.074 • p = 0.465	• n = 99 • r = 0.045 • p = 0.660	• n = 82 • r = -0.083 • p = 0.456	• n = 82 • r = -0.064 • p = 0.568	• n = 96 • r = 0.071 • p = 0.494	• n = 100 • r = 0.007 • p = 0.945	• n = 100 • r = 0.145 • p = 0.151
EBV DNA (saliva)	• n = 48 • r = 0.082 • p = 0.577	• n = 48 • r = 0.052 • p = 0.724	• n = 41 • r = 0.036 • p = 0.823	• n = 41 • r = 0.102 • p = 0.527	• n = 48 • r = 0.131 • p = 0.374	• n = 48 • r = 0.154 • p = 0.294	• n = 48 • r = 0.028 • p = 0.848

Association of baseline EBNA-1 and VCA IgG levels in serum and EBV DNA load in saliva with radiological and clinical disease activity markers at baseline. EBV = Epstein-Barr virus, EBNA-1 = Epstein-Barr nuclear antigen-1, EDSS = Expanded Disability Status Scale, IgG = immunoglobulin G, n = number of pairs, r = Spearman's r, T2w = T2-weighted, VCA = viral capsid antigen

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175279.t002>

and VCA ($p = 0.67$) antibody levels did not differ between the groups of untreated ($n = 70$), glatiramer acetate-treated ($n = 14$), and interferon-beta-treated ($n = 15$) patients with CIS/early RRMS.

EBNA-1 and VCA antibodies and radiological and clinical markers of disease activity

At baseline, neither EBNA-1 nor VCA antibody levels showed any significant associations with the number or volume of T2 lesions, number or volume of CEL, or the number of Barkhof criteria (Table 2). Neither EBNA-1 nor VCA IgG antibodies correlated with EDSS at baseline or age at first symptoms.

Follow-up 3T MRI data, obtained at least 12 months after the baseline visit (median 20, range 12 to 29 months), was available from a total of 63/100 patients. 41 of these 63 patients showed new T2w lesions on follow-up MRI (median 5, range 1 to 47 new lesions). There were no significant associations between baseline EBNA-1 or VCA IgG antibody levels and the number or volume of T2w or CEL, the number of new T2w lesions, the volume change of T2w lesions and the number of Barkhof criteria on follow-up MRIs.

Follow-up EDSS data, obtained at least 12 months after the baseline visit (median 20, range 12 to 29 months), was available from a total of 71/100 patients. Neither EBNA-1 nor VCA IgG antibody levels were associated with the EDSS or changes in the EDSS (EDSS on follow-up minus EDSS at baseline) on follow-up (Table 3).

EBV DNA load in whole blood

EBV DNA load was measured in whole blood samples of 82 patients with CIS/RRMS. One sample could not be evaluated for technical reasons. In only 2 of the remaining 81 patients (2.5%) small amounts of EBV DNA (<1000 copies/ml) could be detected. The low number of EBV DNA positive plasma samples precluded correlations with clinical or MRI markers of disease activity.

EBV DNA in saliva of patients and controls

EBV DNA load in saliva was determined in 48 patients with CIS/RRMS and 50 healthy controls. The age ($p = 0.63$) and sex ($p = 1$) distribution did not differ between both groups. There

Table 3. Association of EBV parameters with radiological and clinical disease activity on follow-up.

	Number of T2w lesions (follow-up)	Total volume of T2w lesions (follow-up)	Number of contrast-enhancing lesions (follow-up)	Total volume of contrast-enhancing lesions (follow-up)	Number of new T2w lesions (follow-up)	Volume change in T2w lesions (follow-up)	Number of Barkhof criteria (follow-up)	EDSS (follow-up)	EDSS change (follow-up)
Anti-EBNA1 IgG	• n = 63 • r = -0.097 • p = 0.448	• n = 63 • r = -0.134 • p = 0.295	• n = 58 • r = -0.109 • p = 0.414	• n = 58 • r = -0.124 • p = 0.356	• n = 63 • r = -0.148 • p = 0.246	• n = 63 • r = -0.121 • p = 0.345	• n = 63 • r = -0.010 • p = 0.939	• n = 71 • r = -0.196 • p = 0.101	• n = 71 • r = -0.052 • p = 0.669
Anti-VCA IgG	• n = 63 • r = 0.073 • p = 0.568	• n = 63 • r = 0.022 • p = 0.863	• n = 58 • r = -0.243 • p = 0.066	• n = 58 • r = -0.248 • p = 0.060	• n = 63 • r = -0.025 • p = 0.849	• n = 63 • r = -0.064 • p = 0.617	• n = 63 • r = 0.007 • p = 0.954	• n = 71 • r = 0.122 • p = 0.312	• n = 71 • r = 0.090 • p = 0.455
EBV DNA (saliva)	• n = 28 • r = -0.012 • p = 0.951	• n = 28 • r = -0.067 • p = 0.735	• n = 24 • r = 0.038 • p = 0.860	• n = 24 • r = 0.038 • p = 0.860	• n = 28 • r = -0.102 • p = 0.604	• n = 28 • r = 0.016 • p = 0.935	• n = 28 • r = 0.010 • p = 0.959	• n = 32 • r = 0.300 • p = 0.096	• n = 32 • r = -0.021 • p = 0.907

Association of baseline EBNA-1 and VCA IgG levels in serum and EBV DNA load in saliva with radiological and clinical disease activity markers at follow-up examinations performed a median of 20 (range 12 to 29) months after baseline examination.

EBV = Epstein-Barr virus, EBNA-1 = Epstein-Barr nuclear antigen-1, EDSS = Expanded Disability Status Scale, IgG = immunoglobulin G, n = number of pairs, r = Spearman's r, T2w = T2-weighted, VCA = viral capsid antigen

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175279.t003>

were 3 EBV seronegative persons (see above) among the 50 healthy controls, who expectedly had no EBV DNA in their saliva. These 3 EBV seronegative healthy controls were excluded from further evaluations. EBV DNA above the cut-off of 1000 copies/ml was detectable with a similar frequency in saliva of patients with CIS/RRMS (18/48, 37.5%) and of healthy controls (14/47, 30%; $p = 0.52$). Likewise, although quite substantial numbers of EBV DNA copies (maximum 1,506,000 copies/ml) could be detected in some individuals, the absolute amounts of EBV DNA in patients with CIS/RRMS and healthy controls did not differ ($p = 0.36$; Fig 1). Neither in patients with MS nor in healthy controls did salivary EBV DNA load show any associations with levels of antibodies to EBNA-1 (patients: $r = 0.069$, $p = 0.64$; controls: $r = 0.232$, $p = 0.116$) or VCA (patients: $r = 0.076$, $p = 0.61$; controls: $r = 0.11$, $p = 0.475$).

EBV DNA load in saliva and markers of radiological and clinical disease activity

EBV DNA load in saliva was not associated with the number or volume of T2w or CEL, the number of Barkhof criteria, the EDSS or the age at baseline examination (Table 2). Likewise, EBV DNA load in saliva was not associated with the number or volume of T2w or CEL, the number of new T2w lesions, the volume change of T2w lesions on follow-up MRIs and the EDSS or the EDSS change on follow-up (Table 3).

EBV parameters and conversion to clinically definite MS

We next analyzed whether parameters of EBV infection might predict the occurrence of a second relapse, and thus conversion to CDMS, in all 89 patients who had only one clinical event before inclusion into the study. The median (range) follow-up time from onset of the first clinical event was 35 (2–51) months. During this period, 28 of 89 patients (31.5%) experienced a second relapse. A cut-off for the analysis was set at 4 years (1460 days) after the first clinical event. Patients were split into tertiles of low, medium or high serum levels of EBNA1 IgG or VCA IgG or were dichotomized into those with and those without EBV DNA in saliva. Neither EBNA1 IgG ($p_{\log\text{-rank}} = 0.952$) nor VCA IgG ($p_{\log\text{-rank}} = 0.596$) levels in serum nor presence of EBV DNA in saliva ($p_{\log\text{-rank}} = 0.561$) were associated with conversion to CDMS (Fig 2).

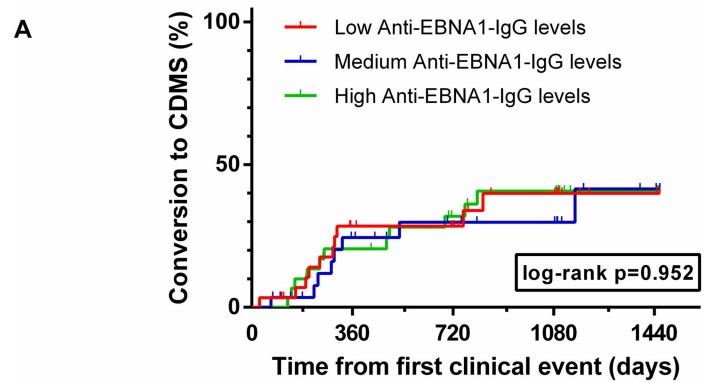
Discussion

In this prospective study of 100 patients in the earliest clinical stages of MS, neither EBNA-1 nor VCA IgG antibody levels in serum nor EBV DNA load in saliva were associated with established MRI and clinical markers of disease activity at baseline and over a median of 20 months of follow-up. Likewise, EBNA-1 and VCA IgG antibodies as well as EBV DNA load in saliva were not associated with conversion to CDMS over a median follow-up of 35 months after the first clinical event.

These findings are consistent with results from a large prospective study of 448 patients enrolled in the BENEFIT (Betaferon/Betaseron in Newly Emerging Multiple Sclerosis for Initial Treatment) trial, in which no association of EBNA-1 or VCA IgG levels in serum with conversion to CDMS, MRI activity markers of MS or clinical progression could be observed over a 5-year follow-up [27]. Similarly, in a large multicentre study of 1047 patients with a CIS, baseline levels of EBNA-1 IgG were not associated with T2w lesion load and were not predictive of conversion to CDMS over two years [33]. Furthermore, a prospective cohort study of 198 patients with MS found no associations between anti EBV early antigen (restricted) IgG, an EBV reactivation parameter, with subsequent MS relapse hazard or progression in disability [34]. Finally, another previous study did not observe correlations between EBNA-1 IgG in serum and EDSS or age at onset in patients with RRMS ($n = 50$) and primary progressive MS (PPMS, $n = 25$) [35].

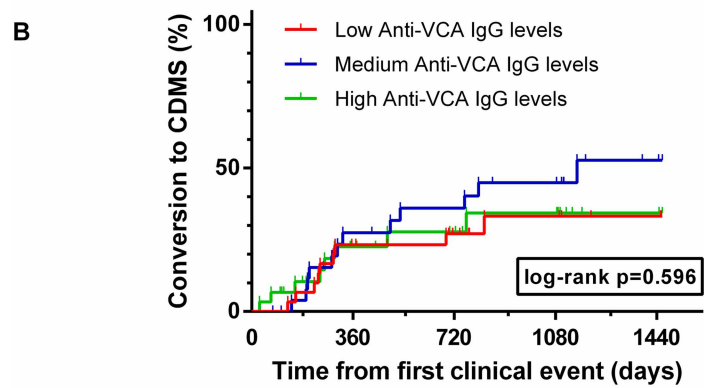
In contrast, other studies have observed positive associations [15, 19–25, 36]. Among the studies that, similar to ours, focused on patients with CIS/early MS [15, 22, 23], a prospective study of 147 patients with a CIS found associations of EBNA-1 IgG in serum with the number of T2w lesions and Barkhof criteria at baseline, and with the number of T2w lesions, number of new T2w lesions and the EDSS after 1 and 5 years of follow-up, while EBNA-1 antibodies were not associated with conversion to CDMS in a multivariate model [15]. Likewise, and similar to our findings, in 211 interferon-beta treated patients with CIS enrolled in the SET study, EBNA-1 and VCA antibodies were not associated with conversion to CDMS over two years. However, unlike our findings, VCA IgG antibodies were associated with EDSS progression and the cumulative number of CEL and T2w lesions [23]. Conversely, another study of 50 patients with CIS, 25 with RRMS and 25 with PPMS observed associations of EBNA-1 IgG, but not of VCA IgG, with the number of CEL, change in T2w lesion volume and EDSS. Furthermore, CIS patients converting to CDMS within 5 years had higher levels of antibodies to EBNA-1 [22]. However, a recent cross-sectional study involving 539 patients with MS and 66 patients with CIS observed no associations of EBNA-1 IgG with any of the investigated MRI parameters, but again found associations of VCA IgG with T2w lesion volume and the number and volume of CEL in patients with MS, but not with CIS [26]. Nevertheless, a study that followed 87 patients with RRMS over two years showed no significant association of VCA IgG with MRI measures, but an association between EBNA-1 IgG in serum and the sum of CEL and new or enlarging T2w lesions [24].

Reasons for the diverging findings across studies may include different clinical and paraclinical characteristics of the analyzed cohorts, in particular rates and types of immunomodulatory treatment, or differences in the rates of patients with established parameters for MS disease activity, such as the presence of supernumerary oligoclonal bands in cerebrospinal fluid [37]. Furthermore, lack of correction of p -values for multiple testing in some of the studies may have resulted in a bias for positive associations. Finally, it has previously been pointed out that because of the elevated EBNA-1 IgG levels in patients with CIS/RRMS as compared to healthy controls (see Fig 1), inclusion in cohorts of patients with CIS of even few individuals who do not have MS and who thus will not have MRI or clinical disease activity on follow-up,



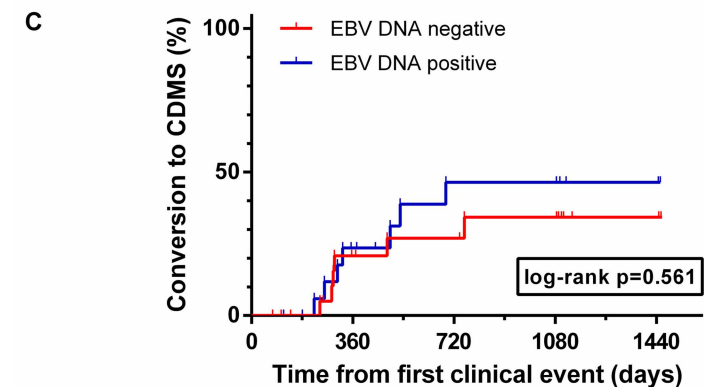
Patients at risk

Low antibody levels	30	18	15	9	3
Medium antibody levels	29	17	12	10	3
High antibody levels	30	22	16	13	7



Patients at risk

Low antibody levels	30	22	15	11	7
Medium antibody levels	29	18	15	11	4
High antibody levels	30	17	13	10	2



Patients at risk

EBV DNA negative	23	14	11	9	4
EBV DNA positive	19	12	7	7	3

Fig 2. EBV antibodies in serum and DNA load in saliva and risk of conversion to CDMS. Risk of conversion to clinically definite multiple sclerosis (CDMS; Kaplan-Meier curves) by tertiles of immunoglobulin

(Ig)G antibodies to Epstein-Barr nuclear antigen 1 (EBNA-1, A) or viral capsid antigen (VCA, B) and presence or absence of Epstein-Barr virus (EBV) DNA in saliva (C).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175279.g002>

will likely cause a spurious association between EBNA-1 levels and MS disease activity parameters [27]. Altogether, our present study confirms and reproduces previous findings, including those of 2 large previous prospective studies [27, 33], in an independent cohort, further corroborating the notion that IgG antibodies to EBV in serum are not associated with disease activity in early MS. This and the overall heterogeneous results of previous studies that described positive associations likewise suggest that EBNA-1 and VCA IgG levels in serum do not have the potential to serve as clinically meaningful disease activity biomarkers in patients with CIS/early RRMS.

To the best of our knowledge, this is the first study to systematically compare EBV DNA levels in saliva in adult patients with CIS/early RRMS and healthy controls. The similar frequencies and levels of EBV DNA in saliva of patients and controls do not support the hypothesis that a dysregulated EBV infection in patients with early MS may result in increased EBV DNA levels in saliva. A pediatric study detected EBV DNA more frequently in mouth swabs of children with MS (10/17; 59%) than of healthy pediatric controls (7/35; 20%) [38]. Reasons for the different findings may include different case numbers, patient age, and sampling techniques (saliva vs. mouth swabs). While a former study suggested an association of both EBV and human herpesvirus-6B DNA in saliva with clinical disease activity [39], the lack of an association of EBV DNA in saliva with disease activity in the present study suggests that, similar to EBV antibodies in serum, EBV DNA in saliva does not appear to be a promising disease activity biomarker for MS.

In keeping with previous findings [20, 22, 40, 41], EBV DNA was only very rarely detectable in whole blood of patients with CIS/early RRMS, again arguing against an impaired immunological control of EBV in patients with early MS.

The absence of significant associations between EBV antibodies and DNA in saliva with MS disease activity suggests that those parameters are not directly involved in the processes that determine radiological and clinical disease activity once the disease is established. Nevertheless, consistent with previous work [1, 3–5, 7], EBV seroprevalence in our cohort of patients in the earliest clinical phase of MS was 100%. Furthermore, and again consistent with previous work [13–18], levels of EBNA-1 and VCA IgG antibodies in serum were higher in patients with CIS/early RRMS than in healthy controls. These findings are compatible with the concept that EBV infection may be involved in the aetiology of MS at a very early point in time during development of the disease [42, 43]. While the precise mechanism underlying the association of EBV and MS currently remains unknown, future concepts and studies aiming to clarify this mechanism should therefore take into account that EBV may exert its role during the earliest phase of MS.

Among the strengths of this study are its prospective design, the comprehensive acquisition of clinical and 3T MRI data and the highly standardized biospecimen collection and storage. A limitation of our study is that MRI and EDSS follow-up data of at least 12 months were not available from all patients. Still, as the lack of an association of EBV parameters with follow-up MRI and EDSS data was very consistent, we consider it unlikely that our results would change substantially in a larger sample. This conclusion is likewise suggested by the study of Munger et al., which did not observe associations of EBV IgG with MRI activity measures on follow-up in a large number ($n = 448$) of patients. While we did not detect an association of EBV DNA load in saliva and whole blood with MS disease activity, we cannot exclude that EBV reactivation in secondary lymphoid organs or within the brain could be associated with disease activity

in MS. Nevertheless, patients with MS do not show increased frequencies or levels of EBV DNA in their cerebrospinal fluid [40, 41], rather arguing against the possibility that EBV reactivation in the CNS may predict MS disease activity. As we measured EBV IgG in serum and DNA in saliva only at a single point in time, our study does not permit to draw conclusions on the temporal dynamics of EBV parameters (i.e. increase or decreases over time) and disease activity in MS. Finally, we cannot exclude that other parameters of EBV infection not addressed in the present work, such as cellular immune responses to EBV [44], might be associated with MS disease activity.

Altogether, this prospective study indicates that in patients with early MS levels of EBNA-1 and VCA IgG in serum and of EBV DNA in saliva are not associated with MRI and clinical markers of disease activity or with conversion to CDMS. Thus, these parameters of EBV infection do not appear to be promising disease activity biomarkers in patients with early MS. The universal EBV seroprevalence and an elevated humoral immune response to EBV in patients with CIS/early RRMS are compatible with the concept that EBV is involved in MS at a very early point in time during development of the disease.

Acknowledgments

The authors are grateful to all patients and healthy volunteers who donated blood. We thank Ulrike Grittner, Institute for Biometry and Clinical Epidemiology, Charité – Universitätsmedizin Berlin, for statistical advice. This work was supported by the Charité Research Fund. FP, JW and KR were supported by the German Ministry of Education and Research (BMBF/KKNMS, Competence Network Multiple Sclerosis).

Author Contributions

Conceptualization: RMG JW AUB JBS FP KR.

Data curation: RMG CP JRB LR EF.

Formal analysis: RMG AUB JW FP KR.

Funding acquisition: JW AUB FP KR.

Investigation: RMG CP JRB LR EF NK CO JH BE.

Methodology: RMG JW AUB KR.

Project administration: JBS FP KR.

Supervision: JBS FP KR.

Writing – original draft: KR.

Writing – review & editing: RMG CP JRB LR EF NK CO JW AUB JH BE JBS FP.

References

1. Ascherio A, Munger KL. Environmental risk factors for multiple sclerosis. part I: the role of infection. *Ann Neurol*. 2007; 61:288–99. <https://doi.org/10.1002/ana.21117> PMID: 17444504
2. Ascherio A, Munger KL, Lunemann JD. The initiation and prevention of multiple sclerosis. *Nat Rev Neurol*. 2012; 8(11):602–12. <https://doi.org/10.1038/nrneuro.2012.198> PMID: 23045241
3. Goodin DS. The causal cascade to multiple sclerosis: a model for MS pathogenesis. *PLoS One*. 2009; 4(2):e4565. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004565> PMID: 19242548

4. Pakpoor J, Disanto G, Gerber JE, Dobson R, Meier UC, Giovannoni G, et al. The risk of developing multiple sclerosis in individuals seronegative for Epstein-Barr virus: a meta-analysis. *Mult Scler*. 2012; 19:162–6. <https://doi.org/10.1177/1352458512449682> PMID: 22740437
5. Deuschle K, Hofmann J, Otto C, Bellmann-Strobl J, Scherner O, Klumbies K, et al. Are there Epstein-Barr virus seronegative patients with multiple sclerosis? *Mult Scler*. 2013; 19:1242–3. <https://doi.org/10.1177/1352458512472751> PMID: 23307904
6. Handel AE, Williamson AJ, Disanto G, Handunnetthi L, Giovannoni G, Ramagopalan SV. An updated meta-analysis of risk of multiple sclerosis following infectious mononucleosis. *PLoS One*. 2010; 5(9): e12496. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012496> PMID: 20824132
7. 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. <https://doi.org/10.1002/ana.21978> PMID: 20517945
8. Ascherio A, Munger KL, Lennette ET, Spiegelman D, Hernan MA, Olek MJ, et al. Epstein-Barr virus antibodies and risk of multiple sclerosis: a prospective study. *JAMA*. 2001; 286(24):3083–8. PMID: 11754673
9. Sundstrom P, Juto P, Wadell G, Hallmans G, Svenningsson A, Nystrom L, et al. An altered immune response to Epstein-Barr virus in multiple sclerosis: a prospective study. *Neurology*. 2004; 62(12):2277–82. PMID: 15210894
10. Levin LI, Munger KL, Rubertone MV, Peck CA, Lennette ET, Spiegelman D, 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. <https://doi.org/10.1001/jama.293.20.2496> PMID: 15914750
11. Delorenze GN, Munger KL, Lennette ET, Orentreich N, Vogelmann JH, Ascherio A. Epstein-Barr virus and multiple sclerosis: evidence of association from a prospective study with long-term follow-up. *Arch Neurol*. 2006; 63:839–44. <https://doi.org/10.1001/archneur.63.6.noc50328> PMID: 16606758
12. 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. <https://doi.org/10.1177/1352458511408991> PMID: 21685232
13. 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. PMID: 2983262
14. 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. <https://doi.org/10.1111/j.1468-1331.2010.03005.x> PMID: 20402753
15. Lunemann JD, Tintore M, Messmer B, Strowig T, Rovira A, Perkal H, et al. Elevated Epstein-Barr virus-encoded nuclear antigen-1 immune responses predict conversion to multiple sclerosis. *Ann Neurol*. 2010; 67(2):159–69. <https://doi.org/10.1002/ana.21886> PMID: 20225269
16. Lucas RM, Ponsonby AL, Dear K, Valery P, Pender MP, Burrows JM, et al. Current and past Epstein-Barr virus infection in risk of initial CNS demyelination. *Neurology*. 2011; 77(4):371–9. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e318227062a> PMID: 21753179
17. Ruprecht K, Wunderlich B, Giess R, Meyer P, Loebel M, Lenz K, et al. 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. *J Neuroimmunol*. 2014; 272(1–2):56–61. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2014.04.005> PMID: 24798244
18. Schlemm L, Giess RM, Rasche L, Pfuhl C, Wakonig K, Behrens JR, et al. Fine specificity of the antibody response to Epstein-Barr nuclear antigen-2 and other Epstein-Barr virus proteins in patients with clinically isolated syndrome: A peptide microarray-based case-control study. *J Neuroimmunol*. 2016; 297:56–62. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2016.05.012> PMID: 27397076
19. Wandinger KP, Jabs W, Siekhaus A, Bubel S, Trillenber P, Wagner H-J, et al. Association between clinical disease activity and Epstein-Barr virus reactivation in MS. *Neurology*. 2000; 55:178–84. PMID: 10908887
20. Buljevac D, van Doornum GJ, Flach HZ, Groen J, Osterhaus AD, Hop W, et al. Epstein-Barr virus and disease activity in multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2005; 76(10):1377–81. <https://doi.org/10.1136/jnnp.2004.048504> PMID: 16170080
21. Zivadinov R, Zorzon M, Weinstock-Guttman B, Serafin M, Bosco A, Bratina A, et al. Epstein-Barr virus is associated with grey matter atrophy in multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2009; 80(6):620–5. <https://doi.org/10.1136/jnnp.2008.154906> PMID: 19168469
22. Farrell RA, Antony D, Wall GR, Clark DA, Fisniku L, Swanton J, et al. Humoral immune response to EBV in multiple sclerosis is associated with disease activity on MRI. *Neurology*. 2009; 73(1):32–8. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e3181aa29fe> PMID: 19458321

23. Horakova D, Zivadinov R, Weinstock-Guttman B, Havrdova E, Qu J, Tamano-Blanco M, et al. Environmental Factors Associated with Disease Progression after the First Demyelinating Event: Results from the Multi-Center SET Study. *PLoS One*. 2013; 8(1):e53996. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0053996> PMID: 23320113
24. Kvistad S, Myhr KM, Holmoy T, Bakke S, Beiske AG, Bjerve KS, et al. Antibodies to Epstein-Barr virus and MRI disease activity in multiple sclerosis. *Mult Scler*. 2014.
25. Zivadinov R, Chin J, Horakova D, Bergsland N, Weinstock-Guttman B, Tamano-Blanco M, et al. Humoral responses to herpesviruses are associated with neurodegeneration after a demyelinating event: results from the multi-center set study. *J Neuroimmunol*. 2014; 273(1–2):58–64. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2014.04.012> PMID: 24907902
26. Zivadinov R, Cerza N, Hagemeier J, Carl E, Badgett D, Ramasamy DP, et al. Humoral response to EBV is associated with cortical atrophy and lesion burden in patients with MS. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm*. 2016; 3(1):e190. <https://doi.org/10.1212/NXI.000000000000190> PMID: 26770996
27. Munger KL, Fitzgerald KC, Freedman MS, Hartung HP, Miller DH, Montalban X, et al. No association of multiple sclerosis activity and progression with EBV or tobacco use in BENEFIT. *Neurology*. 2015; 85(19):1694–701. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000002099> PMID: 26453645
28. Thorley-Lawson DA. EBV persistence and latent infection in vivo. In: Robertson ES, editor. *Epstein-Barr Virus*. Wymondham: Caister Academic Press; 2005. p. 309–58.
29. Laichalk LL, Thorley-Lawson DA. Terminal differentiation into plasma cells initiates the replicative cycle of Epstein-Barr virus in vivo. *J Virol*. 2005; 79(2):1296–307. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.2.1296-1307.2005> PMID: 15613356
30. Montalban X. CIS diagnostics and predictors of conversion to CDMS. *Mult Scler Relat Disord*. 2014; 3(6):764.
31. Polman CH, Reingold SC, Banwell B, Clanet M, Cohen JA, Filippi M, et al. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the McDonald criteria. *Ann Neurol*. 2011; 69(2):292–302. <https://doi.org/10.1002/ana.22366> PMID: 21387374
32. Niesters HG, van Esser J, Fries E, Wolthers KC, Cornelissen J, Osterhaus AD. Development of a real-time quantitative assay for detection of Epstein-Barr virus. *J Clin Microbiol*. 2000; 38(2):712–5. PMID: 10655372
33. Kuhle J, Disanto G, Dobson R, Adiatori R, Bianchi L, Topping J, et al. Conversion from clinically isolated syndrome to multiple sclerosis: A large multicentre study. *Mult Scler*. 2015.
34. Simpson S Jr., Taylor B, Burrows J, Burrows S, Dwyer DE, Taylor J, et al. EBV & HHV6 reactivation is infrequent and not associated with MS clinical course. *Acta Neurol Scand*. 2014; 130(5):328–37. <https://doi.org/10.1111/ane.12268> PMID: 24893674
35. 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. <https://doi.org/10.1111/j.1468-1331.2010.03083.x> PMID: 20482607
36. Zivadinov R, Weinstock-Guttman B, Zorzon M, Uxa L, Serafin M, Bosco A, et al. Gene-environment interactions between HLA B7/A2, EBV antibodies are associated with MRI injury in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol*. 2009; 209(1–2):123–30. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2009.01.023> PMID: 19232441
37. Tintore M, Rovira A, Rio J, Tur C, Pelayo R, Nos C, et al. Do oligoclonal bands add information to MRI in first attacks of multiple sclerosis? *Neurology*. 2008; 70(13 Pt 2):1079–83.
38. Yea C, Tellier R, Chong P, Westmacott G, Marrie RA, Bar-Or A, et al. Epstein-Barr virus in oral shedding of children with multiple sclerosis. *Neurology*. 2013; 81(16):1392–9. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e3182a841e4> PMID: 24014504
39. Hollsberg P, Kusk M, Bech E, Hansen HJ, Jakobsen J, Haahr S. Presence of Epstein-Barr virus and human herpesvirus 6B DNA in multiple sclerosis patients: associations with disease activity. *Acta Neurol Scand*. 2005; 112(6):395–402. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0404.2005.00516.x> PMID: 16281923
40. Franciotta D, Bestetti A, Sala S, Perucca P, Jarius S, Price RW, et al. Broad screening for human herpesviridae DNA in multiple sclerosis cerebrospinal fluid and serum. *Acta Neurol Belg*. 2009; 109(4):277–82. PMID: 20120207
41. Cocuzza CE, Piazza F, Musumeci R, Oggioni D, Andreoni S, Gardinetti M, et al. Quantitative detection of Epstein-Barr virus DNA in cerebrospinal fluid and blood samples of patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. *PLoS One*. 2014; 9(4):e94497. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0094497> PMID: 24722060
42. Ruprecht K. Multiple sclerosis and Epstein-Barr virus: new developments and perspectives. *Nervenarzt*. 2008; 79(4):399–407. <https://doi.org/10.1007/s00115-007-2335-8> PMID: 17713752

43. Otto C, Hofmann J, Ruprecht K. Antibody producing B lineage cells invade the central nervous system predominantly at the time of and triggered by acute Epstein-Barr virus infection: A hypothesis on the origin of intrathecal immunoglobulin synthesis in multiple sclerosis. *Med Hypotheses*. 2016; 91:109–13. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2016.04.025> PMID: 27142157
44. Latham LB, Lee MJ, Lincoln JA, Ji N, Forsthuber TG, Lindsey JW. Antivirus immune activity in multiple sclerosis correlates with MRI activity. *Acta Neurol Scand*. 2016; 133(1):17–24. <https://doi.org/10.1111/ane.12417> PMID: 25939660

6.2 Publikation 2

Autoren:

Pfuhl C, Oechtering J, Rasche L, Giess RM, Behrens JR, Wakonig K, Freitag E, Pache FC, Otto C, Hofmann J, Eberspächer B, Bellmann-Strobl J, Paul F, Ruprecht K.

Titel:

Association of serum Epstein-Barr nuclear antigen-1 antibodies and intrathecal immunoglobulin synthesis in early multiple sclerosis.

Journal:

Journal of Neuroimmunology 285 (2015).

<https://www.journals.elsevier.com/journal-of-neuroimmunology>

Online-Veröffentlichung:

15. August 2015. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2015.06.012>

Aus lizenzrechtlichen Gründen wird der genannte Artikel in seiner publizierten Version auf den folgenden Seiten dieser Arbeit nicht veröffentlicht (Seiten 66 – 69).

- Artikel aus lizenzrechtlichen Gründen an dieser Stelle nicht veröffentlicht -
Online-Publikation unter <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2015.06.012>

- Artikel aus lizenzrechtlichen Gründen an dieser Stelle nicht veröffentlicht -
Online-Publikation unter <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2015.06.012>

- Artikel aus lizenzrechtlichen Gründen an dieser Stelle nicht veröffentlicht -
Online-Publikation unter <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2015.06.012>

- Artikel aus lizenzrechtlichen Gründen an dieser Stelle nicht veröffentlicht -
Online-Publikation unter <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2015.06.012>

- Artikel aus lizenzrechtlichen Gründen an dieser Stelle nicht veröffentlicht -
Online-Publikation unter <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2015.06.012>

6.3 Publikation 3

Autoren:

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

Titel:

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:

Journal of Neuroimmunology 272 (2014).

<https://www.journals.elsevier.com/journal-of-neuroimmunology>

Online-Veröffentlichung:

15. Juli 2014. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2014.04.005>

Aus lizenzrechtlichen Gründen wird der genannte Artikel in seiner publizierten Version auf den folgenden Seiten dieser Arbeit nicht veröffentlicht (Seiten 72 – 76).

- Artikel aus lizenzrechtlichen Gründen an dieser Stelle nicht veröffentlicht -
Online-Publikation unter <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2014.04.005>

- Artikel aus lizenzrechtlichen Gründen an dieser Stelle nicht veröffentlicht -
Online-Publikation unter <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2014.04.005>

- Artikel aus lizenzrechtlichen Gründen an dieser Stelle nicht veröffentlicht -
Online-Publikation unter <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2014.04.005>

- Artikel aus lizenzrechtlichen Gründen an dieser Stelle nicht veröffentlicht -
Online-Publikation unter <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2014.04.005>

- Artikel aus lizenzrechtlichen Gründen an dieser Stelle nicht veröffentlicht -
Online-Publikation unter <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2014.04.005>

7. Lebenslauf

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

8. Vollständige Publikationsliste

Gieß, R.M., Pfuhl, C., Behrens, J.R., Rasche, L., Freitag, E., Khalighy, N., Otto, C., Wuerfel, J., Brandt, A.U., Hofmann, J., Eberspächer, B., Bellmann-Strobl, J., Paul, F., Ruprecht, K., 2017. Epstein-Barr virus antibodies in serum and DNA load in saliva are not associated with radiological or clinical disease activity in patients with early multiple sclerosis. *PLOS ONE* 12, e0175279. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175279>

Behrens, J.R., Rasche, L., **Gieß, R.M.**, Pfuhl, C., Wakonig, K., Freitag, E., Deuschle, K., Bellmann-Strobl, J., Paul, F., Ruprecht, K., Dörr, J., 2016. Low 25-hydroxyvitamin D, but not the bioavailable fraction of 25-hydroxyvitamin D, is a risk factor for multiple sclerosis. *Eur. J. Neurol.* 23, 62–67. <https://doi.org/10.1111/ene.12788>

Huhn, K., Lämmer, R., Zimmermann, H., Lämmer, A., Waschbisch, A., Utz, K., **Gieß, R.M.**, Paul, F., Linker, R.A., Lee, D.-H., 2016. Retinal imaging and axonal degeneration in later onset multiple sclerosis. *J. Neurol. Sci.* 370, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2016.09.009>

Keller, A., Leidinger, P., Meese, E., Haas, J., Backes, C., Rasche, L., Behrens, J.R., Pfuhl, C., Wakonig, K., **Gieß, R.M.**, Jarius, S., Meder, B., Bellmann-Strobl, J., Paul, F., Pache, F.C., Ruprecht, K., 2015. Next-generation sequencing identifies altered whole blood microRNAs in neuromyelitis optica spectrum disorder which may permit discrimination from multiple sclerosis. *J Neuroinflammation* 12. <https://doi.org/10.1186/s12974-015-0418-1>

Ruprecht, K., Wunderlich, B., **Gieß, R.**, Meyer, P., Loebel, M., Lenz, K., Hofmann, J., Rosche, B., Wengert, O., Paul, F., et al. (2014). 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* 272, 56–61.

Pfuhl, C., Oechtering, J., Rasche, L., **Gieß, R.M.**, Behrens, J.R., Wakonig, K., Freitag, E., Pache, F.C., Otto, C., Hofmann, J., Eberspächer, B., Bellmann-Strobl, J., Paul, F., Ruprecht, K., 2015. Association of serum Epstein-Barr nuclear antigen-1 antibodies and intrathecal immunoglobulin synthesis in early multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol.* 285, 156–160. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2015.06.012>

Rasche, L., Heiserich, L., Behrens, J.R., Lenz, K., Pfuhl, C., Wakonig, K., **Gieß, R.M.**, Freitag, E., Eberle, C., Wuerfel, J., Dörr, J., Bauer, P., Bellmann-Strobl, J., Paul, F., Roggenbuck, D., Ruprecht, K., 2016. Analysis of Lymphocytic DNA Damage in Early Multiple Sclerosis by Automated Gamma-H2AX and 53BP1 Foci Detection: A Case Control Study. *PLoS ONE* 11, e0147968. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0147968>

Schlemm, L., **Giess, R.M.**, Rasche, L., Pfuhl, C., Wakonig, K., Behrens, J.R., Scheibenbogen, C., Bellmann-Strobl, J., Paul, F., Reimer, U., Ruprecht, K., 2016. Fine specificity of the antibody response to Epstein-Barr nuclear antigen-2 and other Epstein-Barr virus proteins in patients with clinically isolated syndrome: A peptide microarray-based case-control study. *J. Neuroimmunol.* 297, 56–62. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2016.05.012>

9. Danksagung

Die Anzahl der Leute, auf deren Unterstützung und Mitarbeit ich während meiner Promotion zählen konnte, ist zu groß, als dass ich allen an dieser Stelle gerecht werden kann. Unmöglich wäre diese Forschungsarbeit ohne die zahlreichen Freiwilligen, darunter größtenteils an MS erkrankte Menschen, die sich selbst und ihre freie Zeit der Wissenschaft zur Verfügung stellen. Ich danke ihnen allen für die Unterstützung der Forschung und wünsche ihnen, dass der zukünftige wissenschaftliche Fortschritt sich direkt und positiv auf ihr Leben auswirkt.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn PD Dr. med. Klemens Ruprecht für die Überlassung des Arbeitsthemas und die große Unterstützung und Eröffnung von Möglichkeiten während der Bearbeitung. Seine klinische und wissenschaftliche Begeisterung für eine Vielzahl an Fachgebieten stellt eine Inspiration auch für meinen weiteren angestrebten Werdegang dar. Ich danke außerdem dem gesamten Team des NeuroCure Clinical Research Centers der Charité Berlin und der AG Klinische Neuroimmunologie unter Leitung von Prof. Dr. med. Friedemann Paul, den involvierten Mitarbeitern des ehemaligen Instituts für Virologie Charité Campus Mitte und der Labor Berlin Charité Vivantes GmbH – neben der sehr guten fachlichen Kompetenz war es gerade die herzliche und unkomplizierte Zusammenarbeit, die seit Beginn meiner Tätigkeit eine große Motivation für mich war. Besonders zu nennen ist in diesem Zusammenhang Janina Behrens, die in meiner Zeit als Doktorand und studentischer Mitarbeiter die Betreuung meiner Arbeit übernahm und auf deren freundschaftliche Unterstützung ich auch darüber hinaus immer zählen konnte.

Mein herzlichster Dank geht an meine Familie: An meine Eltern, die mir nicht nur ihre volle Unterstützung während meines gesamten Studiums gaben, sondern auch schon seit meiner Kindheit meine Neugierde und Wissbegierigkeit förderten, und an meine Brüder, die mir jederzeit und genauso das Gefühl geben, dass wir füreinander da sind.

Nicht zuletzt und ganz besonders danke ich der Frau, die weiß, dass sie gemeint ist. Von dem Moment, seit dem wir uns kennen, hast du mein Leben vollständig gemacht.