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

DISSERTATION

Einfluss der *Toxoplasma gondii* Infektion auf die Pathogenese und den Verlauf der Multiplen Sklerose

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Frauke Geisendörfer

aus Rüdersdorf

Datum der Promotion: 09.09.2016

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS **2**

ABSTRACT (Deutsch) **5**

ABSTRACT (English) **7**

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS **9**

1 EINLEITUNG UND EINFÜHRUNG IN DIE FRAGESTELLUNG **11**

1.1 Multiple Sklerose **11**

1.1.1 Epidemiologie und nichtinfektiöse Erklärungsansätze zur Ätiologie 11

1.1.2 Pathogenese 14

1.1.3 Klinische Symptomatik, Verlaufsformen und Prognose 17

1.1.4 Diagnostik 19

1.1.5 Therapie 21

1.2 Infektionshypothese- Bedeutung von viralen und bakteriellen Infektionen auf die Entwicklung und den Verlauf der Multiplen Sklerose **24**

1.2.1 Epstein- Barr- Virus 25

1.2.2 Humanes Herpesvirus- 6 26

1.2.3 Chlamydia pneumoniae 26

1.3 Hygienehypothese-Bedeutung von parasitären Infektionen auf die Entwicklung und den Verlauf der Multiplen Sklerose **27**

1.4 Toxoplasmose **29**

1.4.1 Epidemiologie von *T. gondii* 29

1.4.2 Biologie und Lebenszyklus von *T. gondii* 29

1.4.3 Klinische Präsentation 33

1.4.4 Diagnose 33

1.5 Einleitung in die Fragestellung **35**

2 METHODIK **37**

2.1 Auswahl der Patienten **37**

2.2 Ethikantrag **40**

2.3 Gewinnung der Proben **40**

2.4 Antikörperbestimmung **41**
2.4.1 Bestimmung der *T. gondii* Antikörper vom IgG- Typ 41
2.4.2 Bestimmung des *T. gondii* IgM- Antikörpers 42
2.5 Statistik **43**
3 ERGEBNISSE **45**
3.1 Klinische Charakteristika der Studienpopulation **45**
3.1.1 Nicht- gematchte Studienpopulation 46
3.1.2 Gematchte Studienpopulation 51
3.2 Seroprävalenz der *T. gondii* IgG- Antikörper **55**
3.2.1 Analyse der nicht- gematchten Studienpopulation 55
3.2.2 Subgruppenanalyse der nicht- gematchten Studienpopulation 56
3.2.3 Analyse der gematchten Studienpopulation 56
3.3 Vergleich des Toxo- IgG- Titers zwischen den MS- Subgruppen **58**
3.4 Vergleich des Toxo-IgG- Titers mit der Gesamt- IgG- Serumkonzentration von MS-Patienten **60**
3.5 Korrelation der Toxo-IgG- Titers mit dem Lebensalter der Studienpopulation **61**
3.6 Korrelation der Toxo- IgG- Titers mit der Erkrankungsdauer und EDSS- Score **62**
3.6.1 Korrelation des Toxo-IgG- Titers mit der Erkrankungsdauer 62
3.6.2 Korrelation des Toxo-IgG- Titers mit dem EDSS- Score 63
3.7 Zusammenhang des Toxo-IgG- Titers mit der Läsionslast im MRT **65**
3.7.1 Zusammenhang des Toxo-IgG- Titers mit der T2- und Gd- Läsionslast im cMRT 65
3.7.2 Zusammenhang des Toxo-IgG- Titers mit der T2- und Gd-Läsionslast im sMRT 72
3.8 Zusammenhang des Toxo- IgG- Titers mit dem Nikotinabusus der Studienpopulation. **70**
3.9 Einfluß des Nikotinabusus von MS- Patienten auf die Präsenz von antinukleären Antikörpern **72**
3.10 Zusammenhang der MS- Therapie mit dem *T. gondii*- Serostatus **73**
3.11 Seroprävalenz der *T. gondii* IgM- Antikörper **76**
3.11.1 Analyse der nicht- gematchten Studienpopulation 76
3.11.2 Analyse der gematchten Studienpopulation 76
4 DISKUSSION **78**
5 ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK **88**
6 LITERATURVERZEICHNIS **90**

ANHANG **104**

Erklärung an Eides statt **105**

Curriculum Vitae **106**

Publikationsliste **109**

Danksagung **111**

ABSTRACT (Deutsch)

HINTERGRUND: Parasitäre Infektionen können eine Reihe von immunmodulatorischen Prozessen im Immunsystem des Menschen bewirken und somit einen protektiven Effekt auf den Verlauf von Autoimmunerkrankungen wie Multiple Sklerose (MS) ausüben. *Toxoplasma (T.) gondii* ist ein ubiquitär vorkommendes, intrazellulär und parasitär lebendes Protozoon, das erst kürzlich mit einer Reihe von Autoimmunerkrankungen in Verbindung gebracht wurde.

METHODIK: Bestimmung der Prävalenz und Titerhöhe von *T. gondii* IgG- und IgM-Antikörper im Serum von 163 MS- und 91 Patienten mit einem klinisch-isolierten Syndrom (CIS) sowie 178 alters- und geschlechtsgematchten Kontrollen mittels Chemiluminiszenz-Mikropartikelimmunoessay (ARCHITECT). Die Ergebnisse wurden mit klinischen (Alter, Erkrankungsdauer, EDSS, Nikotinabusus) und paraklinischen (MRT, Liquor, Gesamt-IgG Serum, ANA-Status) Parametern korreliert. Dafür wurde der McNemar-, Chi-Square- und Fisher-exakt Test sowie der Mann-Whitney-, Kruskal-Wallis- und Wilcoxon- Test verwendet, um Unterschiede zwischen den Gruppen zu berechnen. Zur Analyse der Assoziation der Serumantikörper mit klinischen und paraklinischen Parametern wurde ein lineares Regressionsmodel angewandt (Spearman- Korrelationskoeffizient).

ERGEBNISSE: MS- Patienten wiesen eine signifikant geringere Seroprävalenzrate von *T. gondii* IgG- Antikörpern als Kontrollen (33,3 % vs. 47,9 %, p = 0,011) auf. Es lag jedoch kein signifikanter Unterschied in der Prävalenzrate für IgM-Antikörper zwischen den beiden Gruppen vor (2,9% vs. 2,2%, p = 0,716). Es bestand eine lineare Korrelation zwischen der Höhe des IgG- Antikörpertiters gegen *T. gondii* und dem Alter der Studienpopulation (r = 0,3312; p = < 0,0001). MS- Patienten, die einen positiven *T. gondii* IgG Status aufwiesen, tendierten außerdem zu einer kürzeren Erkrankungsdauer (p = 0,097), niedrigerem EDSS- Score (p = 0,709) sowie geringerer Läsionslast (T2 und Gadolineum) im cMRT (p = 0,099; p = 0,692) und sMRT (p = 0,844; p = 0,433), jedoch waren die Resultate statistisch nicht signifikant.
Die Rate an Rauchern war höher unter den MS- Patienten (73,6 % vs. 26,4 % gesunden Kontrollen) und diese wiesen einen signifikant höheren, medianen IgG- Titer

gegen *T. gondii* (6 IU/ml (0-17,9)) im Vergleich zu Nichtrauchern auf (0 IU/ml (0-7,9)) (p = 0,018).

INTERPRETATION: Die Ergebnisse demonstrieren eine negative Assoziation zwischen dem Vorliegen einer durchgemachten *T. gondii* Infektion und dem Auftreten der MS und könnten somit im Sinne der Hygienehypothese als protektiver Faktor für die Entwicklung und den Verlauf der Multiplen Sklerose angesehen werden.

ABSTRACT (English)

BACKGROUND: Parasitic infections can induce variable immunomodulatory effects and may, according to the 'hygiene hypothesis' protect against the development of autoimmune diseases like Multiple Sclerosis (MS). *Toxoplasma (T.) gondii* is an ubiquitous intracellular protozoan that was recently associated with various autoimmune diseases.

METHODS: Evaluation of sera from 163 MS and 91 clinically isolated syndrome cases (CIS) as well as 178 age and gender matched healthy controls for the prevalence of *T. gondii* IgG and IgM- antibodies utilizing chemiluminescent immunoassay (ARCHITECT). Furthermore associations with clinical (age, disease duration, EDSS, smoking) and paraclinical (MRI, CSF, total serum IgG, ANA-status) characteristics were tested. McNemar, Chi-Square, Fisher-exact test, as well as Mann-Whitney, Kruskal-Wallis and Wilcoxon test were performed to calculate differences between the groups as well as a linear regression model for analyzing associations of serum antibodies with clinical and paraclinical parameters

RESULTS: MS- patients showed a significantly lower prevalence for *T. gondii* IgG antibodies compared to controls (33.3 % vs. 47.9 %, p = 0.011). There was no significant difference in the prevalence rate for IgM antibodies between the groups (2.9 % vs. 2.2 %, p = 0.716). We found a linear correlation between the level of IgG antibodies against *T. gondii* and the age of the study population (r = 0.3312; p = <0.0001). MS- patients with a positive IgG antibody titer tended to show shorter disease duration (p = 0.097), lower EDSS- score (p = 0.709), and less lesions (T2 and gadolinium) on cMRI (p= 0.099; p = 0.692) and sMRI (p = 0.844; p = 0.433), although the results did not reach statistical significance. The rate of smokers was higher among MS- patients (73.6 % vs. 26.4 %) and they showed a significantly higher median anti-*T. gondii* IgG titre (6 IU/ml (0-17.9)) in comparison to non- smokers (0 IU/ml (0-7.9)) (p = 0.018).

CONCLUSIONS: The results demonstrate a negative association between an infection with the parasite *T. gondii* and the presence of MS and thus toxoplasmosis infection could be considered a protective factor for the development and disease progression of MS.

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
ANA	Antinukleäre Antikörper
APC	(engl.) Antigen presenting cell
BCG	Bacillus- Calmette- Guerin
bzw.	beziehungsweise
CD	(engl.) Cluster of Differentiation
CIS	(engl.) Clinically Isolated Syndrome
CMIA	Chemilimineszenz-Mikropartikelimmunoassay
DC	(engl.) Dendritic Cell
EAE	(engl.) Experimental Autoimmune Encephalitis
EBNA-1	Epstein- Barr nuclear antigen
ED	Alter bei Erstdiagnose
EDSS	Expanded Disability Status Scale
ELISA	(engl.) Enzyme- linked Immunosorbend Assay
EM	Erstmanifestationsalter
Et al.	(lat.) “Et alii’’, “und andere”
ggf.	gegebenenfalls
HIV	Humanes Immundefizienz Virus
HLA	Humane Leukozytenantigene
IFN-γ	Interferon gamma
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
IL	Interleukin
MBP	Myelinbasisches Protein
MHC	(engl.) Major Histocompatibility Complex
MS	Multiple Sklerose
Mtb	Mycobakterium tuberculosis
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
PCR	Polymerase Kettenreaktion

PPMS	Primär progredient verlaufende Multiple Sklerose
RA	Rheumatoide Arthritis
RLE	relative Lichteinheiten
RRMS	schubförmig- remittierend verlaufende Multiple Sklerose
SLE	Systemischer Lupus Erythematosus
s.o.	siehe oben
SPMS	Sekundär progredient verlaufende Multiple Sklerpse
Tab.	Tabelle
TCR	T-Zell Rezeptor
T. gondii	*Toxoplasma gondii*
T. trichiura	*Trichuis trichiura*
Th-Zelle	T-Helfer Zelle
TLR	(engl.) Toll-like Receptor
TNF	Tumornekrosefaktor
u.a.	unter anderem
z. B.	zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem

1 EINLEITUNG UND EINFÜHRUNG IN DIE FRAGESTELLUNG

1.1 Multiple Sklerose

1.1.1 Epidemiologie und nichtinfektiöse Erklärungsansätze zur Ätiologie

Die Multiple Sklerose (MS) ist die häufigste autoimmun- vermittelte, chronisch-entzündliche Erkrankung des zentralen Nervensystems und wurde bereits vor 150 Jahren von Jean-Martin Charcot zum ersten Mal beschrieben (1).
Betroffen sind vor allem junge Menschen mit einem durchschnittlichen Erkrankungsalter von 30 Jahren, wobei Frauen 2- 3 mal häufiger erkanken als Männer. Fast die Hälfte der Betroffenen sind nach ca. 15 Jahren Erkrankungsdauer auf Hilfsmittel zum Gehen angewiesen. Somit stellt die MS eine der Hauptursachen für erworbene Behinderung im jungen Erwachsenalter dar, womit der Erforschung der Ätiologie allein schon wegen der großen sozioökonomischen Auswirkung eine herausragende Bedeutung zukommt (2).

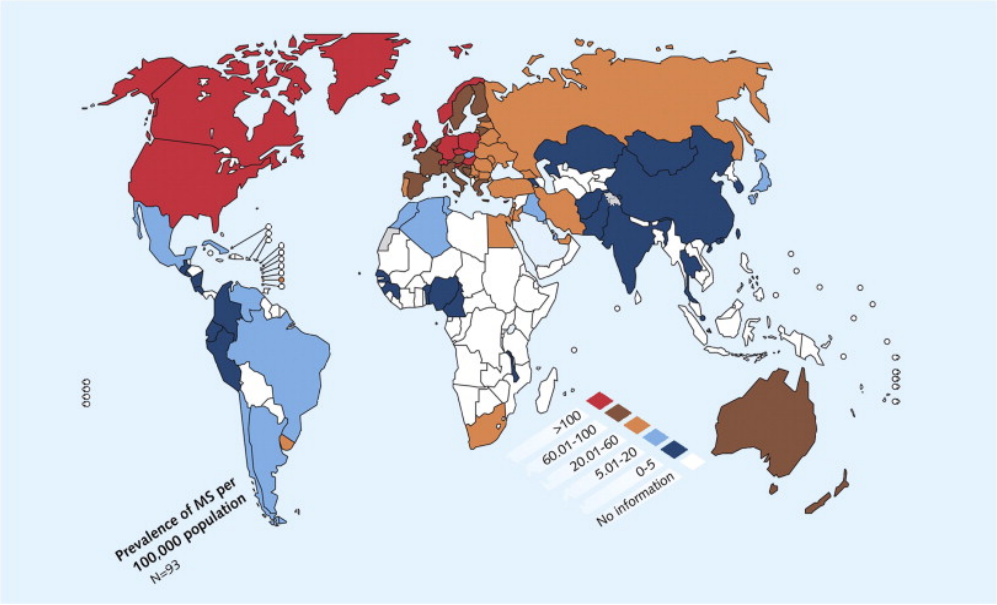

Abb. 1: Die geografische Verteilung der MS: Prävalenzraten pro 100 000 Einwohner (rot= >100, braun= 61-100, orange= 20-60, hellblau = 5-20, dunkelblau= 0-5, weiß= keine Information vorliegend (3)

Weltweit sind schätzungsweise 2,2 Mio. Menschen an MS erkrankt, wobei die Prävalenz stark von der geografischen Breite abhängig ist.

So variiert diese zwischen < 5 Fälle/ 100 000 Einwohner in tropischen Gebieten oder Asien und > 100 Fälle/ 100 000 Bewohnern in gemäßigten Klimazonen wie Nordeuropa, USA, Kanada, Neuseeland sowie den südlichen Anteilen von Australien (3).
Die Ethnie scheint eine herausragende Rolle zu spielen, da die Inuit im nördlichen Kanada, die Maoris in Neuseeland oder die Asiaten und Schwarzafrikaner ein wesentlich niedrigeres Erkrankungsrisiko im Vergleich zu Kaukasiern aufweisen (4).
Somit könnten genetische Faktoren für die geografische Verteilung, vor allem für die Unterschiede in den verschiedenen Ethnien, eine wichtige Rolle spielen.

Genetische Studien zeigen, dass Verwandte ersten Grades ein 20- 40 fach erhöhtes Risiko für die Entwicklung einer MS im Vergleich zur Allgemeinbevölkerung aufweisen (5). Ein noch stärkerer Zusammenhang besteht bei monozygoten Zwillingen, die eine Konkordanzrate von bis zu 25% aufweisen, im Vergleich zu 5% bei dizygoten Zwillingen (6). All diese Studien deuten jedoch eher auf eine genetische Prädisposition als auf ein spezifisches Gen mit einem einfachen Mendelschen Vererbungsmuster hin. Die intensive Suche nach spezifischen Genen führte bereits in den 1970er Jahren zur Assoziation mit HLA- Allelen (7). Besondere Risikoallele scheinen das HLA- DR15 (Phänotyp DRB1*1501 und DRB5*0101) und HLA- DQ6 (Phänotyp DQA1*0102 und DQB2*0602) zu sein, wobei schätzungsweise 28- 33% der kaukasischen MS- Patienten in Nordeuropa den HLA- DRB1*1501 Haplotyp tragen. Somit zeigt dieses Allel die stärkste Assoziation zur MS (8). Neue genetische Herangehensweisen wie genomweite Assoziationsstudien und die technische Möglichkeit zur Analyse von größeren Datensätzen, haben erst kürzlich weitere MS-anfällige Loki innerhalb und ausserhalb der HLA- Region gefunden, wie der single nucleotide polymorphe Marker für die Interleukin-2- und Interleukin-7- Rezeptor α- Kette, so dass um die 150 Kandidatengene vermutet werden, die vor allem eine wichtige Rolle für das Immunsystem spielen. Außerdem wurden auch protektive Assoziationen mit HLA- A*02-, HLA- C5- und HLA-DRB1*11- Allel festgestellt (8, 9).
Trotz dieser Erkenntnisse zeigt vor allem die niedrige Konkordanzrate bei monozygoten Zwillingen, dass genetische Faktoren allein als Erklärungsansatz für die Ätiologie der MS nur hinlänglich verwendet werden können.

Die Ergebnisse der Migrationsstudien deuten darauf hin, dass bestimmte Umwelteinflüße das Risiko an MS zu erkranken erheblich beeinflussen. Die MS-Inzidenz bei Migranten scheint dabei sowohl von der geografischen Lage als auch vom Alter zum Zeitpunkt der Migration abhängig zu sein. So weisen Migranten, die in ihrer Kindheit von einem Gebiet, mit einer hohen MS- Prävalenzrate in ein MS-Niedrigrisikogebiet einwandern, eine abnehmende Inzidenzrate auf, wohingegen die Migranten, die in die entgegengesetzte Richtung umziehen, ihr niedriges MS- Risiko ihres Heimatlandes beibehalten (10). Die zweite Generation der Migranten nimmt bei Aufwachsen im Immigrationsland das gleiche Risiko an, wie die einheimische Bevölkerung (11).
Diese Ergebnisse deuten auf einen Umweltfaktor hin, der vor allem in den ersten zwei Lebensdekaden einen entscheidenen Einfluß auf das Risiko für die Entwicklung der MS nimmt (12, 13).

Ein weiterer Risikofaktor für die Entwicklung der MS scheint die Vitamin-D3-Konzentration im Serum zu sein, da ein Mangel vor allem in den höheren Breitengraden aufgrund der geringeren Sonnenlichtexposition endemisch ist (14). Diese Hypothese wird gestützt durch zwei groß angelegte, prospektive Studien: von insgesamt 95 310 Frauen in der Nurses Health I und II- Studien entwickelten 173 eine MS. Hierbei stellte man fest, dass die tägliche Einnahme von ≥ 400 IU Vitamin D3 einen protektiven Effekt auf die Entwicklung der MS hatte (15). Eine weitere Korrelationsstudie des US Militärs zeigte, dass hohe Serumspiegel von 25- Hxdroxyvitamin D3, das aufgrund der langen Halbwertszeit von 20-60 Tagen im Serum als der beste Indikator gilt (16), das Risiko für MS signifikant absenkt: so bedeutet eine Erhöhung des Spiegels um 20 ng/ml eine 41% Risikoreduktion bei kaukasischen MS- Patienten (17). Der immunsuppressive Effekt von Vitamin D3 wurde bisher nur in Tiermodellen oder in-vitro- Studien nachgewiesen: so scheint 1,25- Dihydroxyvitamin- D3 nicht nur die Proliferation von B- Gedächtnis- und Plasmazellen sowie die Immunglobulinbildung zu hemmen, sondern auch einen inhibierenden Effekt auf CD4+-T- Zellen und proinflammatorische Th1- und Th17-Zellen auszuüben, so dass die Bildung von regulatorischen T- Zellen gefördert wird.
Somit kann ein Vitamin- D3- Mangel als wichtiger Risikofaktor für die Entwicklung der MS angesehen werden (18).

Ein weiterer Risikofaktor, der eine starke Assoziation mit MS aufweist, ist das Rauchen. So zeigen Raucher im Vergleich zu Nicht- Rauchern ein 40- 80% erhöhtes Risiko an einer MS zu erkranken, was erst kürzlich in einer Metaanalyse zusammengefasst wurde (RR 1,48; 95% KI 1,35- 1,63; p <10 -15) (19). Des Weiteren legen Studien nah, dass die Progression von der RRMS in die SPMS durch das Rauchen beschleunigt wird (20, 21). Hierbei besteht ein altersunabhängiger, kausaler Zusammenhang zwischen dem erhöhten MS- Risiko und der Dauer und Intensität des Rauchens. Die schädlichen Effekte nach Einstellung des Rauchens sinken nur langsam ab und haben bis zu 10 Jahren danach, unabhängig von der Gesamtdosis, noch negative Auswirkungen auf den Krankheitsverlauf (22). Die potentiellen Mechanismen, die durch das Rauchen bei MS- Patienten ausgelöst werden bzw. die Krankheitsprogression begünstigen, wurden bisher nur wenig erforscht.
Jedoch scheint nicht allein das Nikotin für die negativen Effekte verantwortlich zu sein, da bei Menschen, die Schnupftabak benutzen, dass Risiko für MS nicht erhöht ist (23). Auch zeigen Passivraucher ein ähnlich hohes Risiko für MS, was für verursachende Komponenten im Zigarettenrauch spricht (24). So wird vor allem dem Stickstoffmonoxid (NO) eine wichtige Rolle zugeschrieben, da Oligodendrozyten *in vitro* vulnerabler auf NO als Astrozyten und Mikrogliazellen reagieren, so dass sie *in vito* bei oxidativen Streß eher sterben. Somit könnte NO eine mögliche Ursache für die Demyelinisierung und den Axonenverlust sein, der im progressive Stadium der MS dominiert (25). Durch das Rauchen wird außerdem die Rate und die Dauer für obere Atemwegsinfektionen erhöht (26), was schon seit langem als etablierter Risikofaktor der MS gilt und auch mit dem Auftreten von Schüben assoziiert ist (20).

Zusammenfassend muss festgestellt werden, dass die Ätiologie der MS, trotz weltweiter Forschungsanstrengungen, immer noch weitestgehend unbekannt ist, am ehesten jedoch eine multifaktoriell bedingte Erkrankung darstellt.

1.1.2 Pathogenese

Die MS galt lange als klassische T-Zell- vermittelte Autoimmunerkrankung. Jedoch zeigen die Erkenntnisse der letzten Jahre, dass die Pathogenese sehr viel komplexer

ist und neurodegenerative Prozesse nicht nur in der chronisch-progredienten Phase der Erkrankung, sondern auch schon in der akuten eine wichtige Rolle spielen und das Ausmaß der neurologischen Behinderung maßgeblich bestimmen.

Dabei gilt der in der akuten Phase auftretende demyelinisierende Plaque als das pathophysiologische Korrelat der MS und besteht vorwiegend aus T- Helferzellen und B-Lymphozyten, Plasmazellen, Makrophagen und Mikrogliazellen (27). Dieser auch als Läsion bezeichnete Plaque stellt das Endresultat eines Prozesses dar, der durch Inflammation, De- und Remyelinisierung, Oligodendrozytenverlust und Astrozytose gekennzeichnet ist (10). Das neuropathologische Läsionsmuster unterscheidet sich dabei von Patient zu Patient. Die Läsionen innerhalb eines Patienten scheinen jedoch die gleichen pathologischen Muster aufzuweisen, weshalb Lucchinetti und Pittock diese in vier Demyelinisierungsmechanismen eingeteilt haben (28). Da das Läsionsmuster jedoch nicht mit der klinischen Verlaufsform der MS korreliert (RRMS vs. SPMS, PPMS), werden die vier Stadien von einigen Autoren (Prineas und Barnett) auch als stadiumabhängige Heterogenität gedeutet, in der sich die Läsionen kontinuierlich verändern und je nach Erkrankungsphase in einem Individuum feststellbar sind (29). Die meisten Läsionen bleiben klinisch stumm und zeigen sich in der Regel nur bildmorphologisch im MRT. Dabei finden sich die Plaques nicht nur in der weißen Substanz (bevorzugt am Nervus opticus, laterale Ventrikel, Hirnstamm, Kleinhirn und Rückenmark), sondern auch in der leukokortikalen und subpialen grauen Substanz (30), die durch frühere MRT-Untersuchungen kaum detektiert werden konnten (31). Die kortikalen Läsionen sind vor allem bei chronisch- progredienten Patienten vorhanden und erklären gut, weshalb 40- 70% der Patienten im Laufe ihrer Erkankung unter kognitiven Defziten wie beeinträchtigte Lern- und Gedächtnisfunktionen sowie verlangsamte Informationsverarbeitung leiden (32).

Lange ging man davon aus, dass die autoimmune Antwort primär durch CD4+-T-Helferzellen vermittelt wird (29), die die Oligodendrozyten (Myelin- produzierenden Zellen des ZNS) sowie das Myelin selbst angreifen. Die CD4+- Zellen befinden sich vorwiegend im perivaskulären Raum und an den Meningen und werden durch die dendritischen Zellen nach Antigenpräsentation aktiviert, was zur Freisetzung proinflammatorischer Zytokine und Chemotaxis von Makrophagen führt (27). Jedoch scheinen auch CD8+-T- Helferzellen beteiligt zu sein, die sich vorwiegend in den

parenchymalen und perivaskulären Läsionen aufhalten, oligoklonal expandieren und schließlich die MHC I- tragenden Neurone und Oligodendrozyten attackieren. Es ist aber noch unklar, gegen welches Antigen sich die Spezifität der CD8+-T- Helferzellen richtet (33).

Kürzlich wurden außerdem IL-17 produzierende CD4+- und CD8+-T- Zellen in aktiven und chronisch aktiven Läsionen nachgewiesen, nicht jedoch in inaktiven Plaques, was auf eine wichtige Rolle für IL-17 in der MS-Pathogenese schließen lässt (34).

Für die Pathophysiologie der MS scheint die humorale Immunantwort neben der zellulären von herausragender Bedeutung zu sein. Man weiß schon seit Langem, dass die Präsenz von oligoklonalen Banden im Liquor ein typisches diagnostisches Kennzeichen der MS ist, die selbst nach immunsuppressiver und immunmodulatorischer Therapie nachweisbar bleiben (35). Des Weiteren lässt sich bei 80- 100% der Patienten eine polyspezifische intrathekale humorale Antwort gegen ein weites Spektrum von viralen Antigenen detektieren, hier v.a. Masern, Röteln und Varizella Zoster Virus, was auch als “MRZ-Reaktion” beschrieben wird und noch spezifischer für die MS ist als oligoklonale Banden (36). Die klonalen B- Zellen befinden sich vorwiegend im perivaskulären Raum, den Meningen sowie im Liquor und synthetisieren Immunglobulin G, dass sich gegen die eigentlichen Autoantigene richten. Des Weiteren wurden B- Zellfollikel an den Leptomeningen von SPMS- Patienten gefunden, die hier die humorale Antwort aufrechterhalten (37). Zudem lassen sich B-Zell- Zytokine in den Plaques und Plasmazellen im Liquor von MS- Patienten nachweisen, wobei deren Anzahl mit der lokalen IgG- Synthese und dem Ausmaß der Inflammation korreliert (38). Ein weiterer Hinweis auf die pathogenetische Rolle von B-Zellen liefert die gute klinische Wirksamkeit der Plasmapheresetherapie (35) sowie das Ansprechen der Patienten auf Rituximab (39) und Ocrelizumab (40).

Unklar ist im Moment jedoch, ob die Invasion des ZNS durch T- und B- Zellen das initiierende Ereigniss der MS ist oder ob es sekundär aufgrund einer Aktivierung von Mikrogliazellen und Makrophagen und der lokalen Freisetzung von körpereigenen oder fremden Antigenen zur Einwanderung kommt.

Obwohl die immunvermittelte Zerstörung der Oligodendrozyten und des Myelins im ZNS als die primäre Pathologie der MS angesehen wird, stellt die Hauptursache für die permanenten neurologischen Schäden die neuronale und axonale Degeneration dar,

die bereits zu Beginn der Erkankung stattfindet und durch die bisherigen immunsuppressiven und immunmodulatorischen Therapien kaum beeinflusst wird (31, 41). Die Axondegeneration wird wahrscheinlich durch unspezifische Schädigungen aufgrund der Entzündungszellen sowie der Aktivierung der Mikrogliazellen hervorgerufen, die neben proinflammatorischen Zytokinen auch proteolytischer Enzyme, reaktiver Sauerstoff- und Stickstoffspezies freisetzen, die eine neurotoxische Stoffwechsellage begünstigt und aufgrund des nicht-vorhandenen schützenden Myelins schnell zur Schädigung führt. Außerdem wird durch die Entzündungszellen viel Glutamat freigesetzt, was in höheren Dosen schnell zum Zelltod führt (Exzitotoxidität) (42, 43).

Die progressive Neurodegeneration bleibt durch die funktionelle Reorganisation des Cortex zunächst klinisch stumm (44), wird jedoch durch zunehmende therapierefraktäre neurologische Behinderung klinisch apparent und stellt die Transformation in die sekundär-progrediente Phase dar. Die zunehmende Neurodegeneration bei SPMS und PPMS- Patienten kann indirekt durch die zunehmende Atrophie des Gehirns und Rückenmarks quantifiziert werden (42).

1.1.3 Klinische Symptomatik, Verlaufsformen und Prognose

An MS erkranken vorwiegend junge Menschen zwischen ihrer 2. - 3. Lebensdekade (45), wobei Frauen etwa zweimal so häufig betroffen sind wie Männer. Bei ca. 80% der Patienten beginnt die MS mit einer akuten Episode uni- oder multifokaler neurologischer Störungen (46). Diese Episode wird auch als klinisch isoliertes Syndrom (CIS) bezeichnet und stellt die Erstmanifestation der MS dar (47). Typische Symptome sind ein unilateraler Visusverlust, Doppelbilder und Schwindel, motorische Schwäche, Taubheit und Kribbelparästhesien, Koordinationsstörungen oder autonome Störungen (10). Die Beschwerden entwickeln sich typischerweise über mehrere Tage, halten ca. 24 Stunden an und bilden sich entweder spontan oder aufgrund einer Kortikosteroidtherapie vollständig oder unvollständig zurück (2). Durch Erhöhung der Körperkerntemperatur, wie z. B. bei Fieber oder nach einem heißen Bad, kann es zu einer transienten Verschlechterung der Symptome kommen, was auch als Uthoff-Phänomen bezeichnet wird und pathognomonisch für die MS ist. Ein weiteres MS-spezifisches Symptom ist das Lhermitte-Phänomen, was die Auslösung elektrischer

Sensationen aufgrund spinaler Herde entlang des Rückens und der Extremitäten bei Kopfbeugung beschreibt (48). Viele MS- Patienten leiden außerdem an Fatigue, die sich medikamentös nur schlecht beeinflussen lässt und oftmals zu einer erheblichen Beeinträchtigung der Lebensqualität führt (2).

Der häufigste Verlauf der MS ist der schubförmig remittierende, der bei 80- 85% der Betroffenen vorherrschend ist. Die Schubrate ist anfänglich höher als im Verlauf der Erkrankung (ca. 0,2- 1,2/ Jahr) und nimmt in den Folgejahren auch unbehandelt kontinuerlich ab (10). Nach ca. 10- 15 Jahren Krankheitsdauer bilden sich bei ca. 2/3 der Betroffenen die Symptome zunehmend unvollständig zurück, was die Transformation in die sekundär-progrediente Phase der MS darstellt (SPMS).

Bei 10- 15% der Betroffenen kommt es nach Erstmanifestation jedoch zu keiner Remission, sondern zur progredienten Verschlechterung (47). Dieser Verlauf wird deshalb als primär- progredient (PPMS) bezeichnet und tritt, ähnlich wie die SPMS, um das 40. Lebensjahr auf (30). Der Anteil der betroffenen Männer ist bei der PPMS höher als bei der RRMS mit einem Geschlechterverhältnis von 1:1. Meist erleben die Betroffenen eine schnelle Einschränkung ihrer Gehfähigkeit, da sich die PPMS häufig spinal manifestiert (48).

Da sich die MS klinisch sehr variabel präsentiert und mit unterschiedlicher Geschwindigkeit zur Beeinträchtigung der Lebensqualität führt, sind Aussagen zur Prognose des einzelnen Patienten trotz weltweiter Forschungsbemühungen schwierig. Dem zu Folge beobachtet man bei vielen MS- Patienten eine erhöhte Komorbidität für Depressionen (10), wobei ungeklärt bleibt, ob dies reaktiv geschieht oder Ausdruck neuropsychiatrischer Symptome ist (49).

Einige prognostische Faktoren sind jedoch durch Beobachtungsstudien bekannt: so scheint die Prognose relativ günstig zu sein, wenn sensorische oder visuelle Symptome dominieren, die Schübe monosymptomatisch sind und es zu einer vollständigen und langanhaltenden Remission kommt. Des Weiteren scheinen das weibliche Geschlecht und ein junges Alter bei Erstmanifestation (< 40 Jahre) sich günstig auszuwirken.

Im Gegensatz dazu deutet eine polysymptomatische, vor allem motorische Beteiligung auf eine schlechtere Prognose hin, ebenso eine hohe Schubrate zu Beginn der Erkrankung und eine unvollständige Remission der Symptome (50). Des Weiteren korreliert die Anzahl der demyelinisierenden Herde mit der Prognose (47).

1.1.4 Diagnostik

Um die Diagnose einer MS zu stellen, muss mit Hilfe klinischer und paraklinischer Parameter der Nachweis einer räumlichen und zeitlichen Dissemination von Entzündungsherden erfolgen und kein Hinweis auf eine andere (wahrscheinlichere) Ätiologie vorliegen (51). Dabei ist mit räumlicher Dissemination das Vorliegen von demyelinisierender Läsionen an mehr als einem Ort im ZNS bezeichnet. Zeitliche Dissemination beschreibt, dass neue Plaques im Verlauf der Erkrankung hinzukommen, die ggf. zu klinischen Symptomen führen (52).
Seit dem Jahr 2001 werden die McDonald- Kriterien verwendet, um zum einen eine schnelle und vor allem sichere Diagnosefindung mit einem hohen Grad an Sensitivität und Spezifität zu ermöglichen und zum anderen international anerkannte, einheitliche Diagnosekriterien zu verwenden, die eine bessere Vergleichbarkeit von Studienergebnissen ermöglichen (46). Nach den McDonald- Kriterien erfolgt die Diagnose rein klinisch, wenn sich MS- typische, neurologische Symptome eruieren lassen, die zweifelsfrei auf 2 voneinander abgrenzbare Läsionen hinweisen. Die MS-typischen Symptome werden als Schub bezeichnet, der durch das Auftreten von subjektiven oder objektiven neurologischen Symptomen charakterisiert ist, die über mindestens 24 Stunden anhalten und einen zeitlicher Abstand von mindestens 30 Tagen zu einem vorherliegenden Schub aufweisen (51). Um einen Schub zu objektivieren und Differentialdiagnosen auszuschließen, werden radiologische (MRT), laborchemische (Liquoranalyse) und neurophysiologische Verfahren (evozierte Potentiale) angewandt (52).

Dank der technischen Entwicklung der letzten 20 Jahre ist das MRT ein sehr sensibles Verfahren, um die Dissemination von Läsionen in Raum und Zeit nachzuweisen sowie um klinisch- inapparente Krankheitsaktivität zu messen. So lassen sich bei 95% der MS- Patienten fokale oder konfluierende Abnormalitäten in der weißen Substanz des ZNS detektieren, wobei diese vor allem periventrikulär, juxtacortikal, infratentoriell oder im Rückenmark lokalisiert sind (10). Nach den revidierten McDonald- Kriterien von 2010 kann bereits nach einem CIS die Diagnose einer sicheren MS erfolgen, wenn zu diesem Zeitpunkt asymptomatische, gadoliniumaufnehmende Läsionen neben alten Läsionen detektiert werden. Diese sogenannten Swanton-Kriterien erlauben eine

höhere Sensitivität mit weniger MRT- Scans als die zuvor verwendeten Barkhof-Kriterien und werden daher empfohlen (53).

Unterstützend erfolgt bereits seit 1983 die routinemässige Untersuchung des Liquors zum Nachweis oligoklonaler Banden mittels Proteinelektrophorese und isoelektrische Fokussierung (54). Dabei können die oligoklonalen Banden im Liquor bei 60- 70% der CIS- und 90% der MS- Patienten gefunden werden (positiv= ≥ 2 oligoklonalen Banden) (55).
Zusätzlich ist der IgG- Index ((IgG Liquor/ Serum)/(Albumin Liquor/ Serum) bei 70- 90% der MS- Patienten erhöht (> 0.7), wobei der Nachweis oligoklonalen Banden sensitiver und spezifischer ist (55). Zellzahl, Glukose- und Gesamtproteingehalt im Liquor sind nur von untergeordneter Rolle für den Diagnoseprozess, da diese bei 2/3 der MS- Patienten normal sind bzw. diese eine leichte Pleozytose (< 50 Zellen/µl) haben (55). Somit kommt der Liquoranalyse nach wie vor eine wichtige Bedeutung zu, vor allem bei atypischen, klinischen Präsentationen und zum Ausschluß anderer infektiöser und inflammatorischer Erkankungen (51).

Demyelinisierungen verzögern charakteristischerweise die Latenz von visuellen-, akustischen- und somatosensorisch-evozierten Potentialen sowie die zentralmotorische Leitungszeit und sind bei > 50% der MS- Patienten pathologisch (52). Die evozierten Potentiale helfen, klinisch-inapperente Läsionen nachzuweisen, die durch das MRT nicht gefunden werden (48).

Alternative Diagnosen wie systemisch verlaufende Autoimmunerkrankungen, infektiöse, strukturelle, tumoröse oder hereditäre Erkrankungen müssen ausgeschlossen werden (48). Des Weiteren sollte auch die Diagnose einer Neuromyelitis optica (NMO) in Betracht gezogen werden, falls eine optikospinale Symptomausprägung vorliegt. Die Bestimmung der Aquaporin-4- Antikörper stellt einen sensitiven und hoch- spezifischen Serummarker für die NMO dar und erleichtert damit die differentialdiagnostische Abgrenzung zur klassischen MS (56).

1.1.5 Therapie

Seit den 1990er Jahren existieren krankheitsmodifizierende Medikamente für die MS, wobei Interferon- β die erste zugelassene Therapie zur Behandlung der RRMS war (57). Seitdem ist die Zahl der zugelassenen Präparate stetig gestiegen, wobei gerade in den letzten zehn Jahren große Fortschritte durch die Entwicklung oraler Medikamente und monoklonaler Antikörper erzielt wurden (58).
Bisher profitieren allerdings nur RRMS- Patienten von den Therapien, da diese primär immunsuppressiv bzw. -modulatorisch wirken und neurodegenerative Prozesse nicht wirksam unterbinden können (42). Eine abschließende Nutzen- Risiko-Bewertung ist erst nach jahrelangem Einsatz im klinischen Alltag möglich. So bleibt die größte Herausforderung für die Therapie der MS, eine gute Balance zwischen effektiver Krankheitskontrolle und der Vermeidung potentiell schwerwiegender Nebenwirkungen zu finden, um die Betroffenen effektiver vor dem Erwerb irreversibler neurologischer Behinderung zu schützen.

Basistherapeutika

Die Primärbehandlung der schubförmig- remittierenden MS erfolgt mit den sogenannten Basistherapeutika, wozu neben Interferon- β1a (Rebif, Avonex) und Interferon- β1b (Betaseron) auch das Glatirameracetat (Copaxone) sowie das oral eingenommene Teriflunomid (Aubagio) und Dimethylfumarat (Tecfidera) und der monoklonale Antikörper Alemtuzumab (Lemtrada) gehören.

Betainterferone und Glatirameracetat

Interferone wurden bereits in den 1970er Jahren aufgrund ihrer antiviralen Aktivität benutzt und weisen in klinischen Studien eine Schubratenreduktion von 30- 35% im Vergleich zu Placebo im Beobachtungszeitraum von 24 Monaten auf (59), wobei laut einer kürzlich erschienenden Metaanalyse Interferon- β1a (Rebif) die größte Effektivität aufweist (60). Eine vergleichbare Wirksamkeit besitzt auch das seit 1997 zugelassene Glatirameracetat (Copaxone), welches ein Polymer aus vier synthetisch hergestellten Aminosäuren ist und in der Regel ein besseres Nebenwirkungsprofil aufweist als die Betainterferone (57, 61). Beide Medikamente wirken immunmodulatorisch, wobei der genaue Wirkmechanismus unbekannt ist. Neben der Therapie der RRMS erweisen sich die Interferone auch als wirksam in der Verzögerung der Konversion von CIS zur

klinisch definitiven MS. So konvertierten 28- 35% der CIS- Patienten unter Interferon-β1a und -1b im Vergleich zu 45- 50% der Patienten mit Placebo über eine Beobachtungszeitraum von 2 Jahren (62, 63).

Teriflunomid (Aubagio)

Teriflunomid stellt das erste orale Medikament zur Behandlung der RRMS dar und ist seit Ende 2013 in Deutschland zugelassen. Teriflunomid ist der aktive Metabolit von Leflunomid, welches bereits für die Behandlung der rheumatoiden Arthritis zugelassen ist (57). Es blockiert die Dihydro-Orotat- Dehydrogenase und die de- novo Pyrimidinsynthese in T- und B- Zellen sowie anderen schnell teilenden Zellpopulationen, was zur Absenkung der Lymphozytenproliferation, nicht jedoch zur Tötung ruhender Lymphozyten führt (64, 65). In zwei Phase- III- Studien zeigte Teriflunomid eine Schubratenreduktion von 31- 36% im Vergleich zu Placeo und eine Behinderungsreduktion von 30% (66).

Dimethylfumarat (Tecfidera)

Dimethylfumarat ist seit Frühjahr 2014 in Deutschland als Basistherapie zur Behandlung der RRMS zugelassen. Es wird bereits seit 20 Jahren erfolgreich in der Dermatologie als Psoriasismedikament eingesetzt und besitzt ein günstiges Nebenwirkungsprofil (gastrointestinale Nebenwirkungen, Flush, Ausschlag), die 4- 6 Wochen nach Therapieinitiierung wieder verschwinden (67). Der genaue Wirkmechnanismus ist bisher unbekannt, aber man nimmt an, dass Dimethylfumarat nukleäre Transkriptionsfaktoren beeinflusst und somit die Reaktion auf oxidativen Stress sowie die Immunfunktion moduliert (68). Eine kürzlich publizierte Metaanalyse von randomisiert- kontrollierten Studien zeigt eine durchschnittliche Schubratenreduktion von 44- 53% und Behinderungsreduktion von 28% im Vergleich zu Placebo (69).

Alemtuzumab (Lemtrada)

Alemtuzumab ist ein humanisierter monoklonaler Antikörper gegen das CD 52-Glykoprotein, welches auf der Oberfläche von Lymphozyten und Monozyten exprimiert wird (70). Die Funktion von CD 52 ist bisher unbekannt. Die Therapie führt zu einer rapiden und zum Teil langanhaltenden Abnahme der Lymphozyten, vor allem der CD4+-T- Zellen, weshalb Alemtuzumab eher bei hochaktiven RRMS-Verläufen

angewendet werden soll. Die Schubratenreduktion liegt bei 75% und Verminderung der Krankheitsprogression bei 60% im Vergleich zu Patienten, die mit Interferon- β1a behandelt wurden (71).

Eskalationstherapie

Natalizumab (Tysabri)

Eine Eskalationstherapie wird bei sogenanten "Therapieversagern'' angewendet, die trotz Basismedikation weiterhin eine hohe Schubfrequenz bzw. deutliche Progredienz im Behinderungsgrad aufweisen. In diesen Fällen kann Natalizumab eingesetzt werden, welches in einer kürzlich publizierten Metaanalyse von randomisiert- kontrollierten Studien zu einer Schubratenreduktion von 40- 68% führte und das Risikos der Krankheitsprogression um 25% im Vergleich zu Placebo in einem Beobachtungszeitraum von 24 Monaten absenkt hat (72). Natalizumab ist ein seit 2006 zugelassener monoklonaler Antikörper, der durch die Hemmung des α4β1- Integrins die Leukozytenmigration über die Blut- Hirnschranke vermindert und folglich zu einer Absenkung der Inflammation im ZNS führt (58). Im Liquor von behandelten Patienten lässt sich eine reduzierte Lymphozytenzahl nachweisen, wobei insbesondere die CD4+- T- Zellen erniedrigt sind (73). Die breite Anwendung von Natalizumab ist aufgrund des Auftretens einer progressiven multifokalen Leukenzephalopathie limitiert (durch humane Papovavirus (JC- Virus) ausgelöst), die zwar selten, aber dann meist letal endet und somit nur behandlungsresistenten und besonders aggressiv verlaufenden RRMS- Formen vorbehalten ist (58).

Fingolimod (Gilenya)

Fingolimod entstammt einem immunmodulatorisch wirksamen Derivat (Myriozin) des in der traditionell chinesischen Medizin verwendeten Pilzes *Isaria sinclairii* (74) und wirkt nach oraler Aufnahme als Modulator des Sphingosin-1-Phosphatrezeptors (S1P). Dieser spielt u.a. eine wichtige Rolle für die Lymphozytenmigration aus sekundär-lymphatischen Organen (74), so dass die B- und T- Zellen nach Bindung von Fingolimod an der Migration gehindert werden und im Lymphknoten verbleiben. Somit kommt es zu einer Abnahme reifer, potenziell autoreaktiver B- und T- Zellen, die peripher zirkulieren, was als Ursache für die klinische Wirkung von Fingolimod

angenommen wird (Schubratenreduktion von 53%, Behinderungsreduktion von 30% im Vergleich zu Placebo) (75).

Therapie der chronisch- progredienten Multiplen Sklerose

Für primär- progrediente Verläufe gibt es bisher keine zugelassenen Therapien, so dass diesen Patienten, neben der symptomatischen Behandlung, nur regelmäßige Kortison-Pulstherapien und die Teilnahme an klinischen Studien angeboten werden kann (76).

Bei sekundär- progredienten Verläufen kann eine Therapie mit Mitoxantron erwogen werden, dass nachgewiesener Maßen eine gute Effektivität in der Reduktion der Krankheitsprogression zeigt (77). Mitoxantron wurde bereits in den 1970er Jahren als Chemotherapeutikum entwickelt und weist sowohl immunmodulatorische (erniedrigte IL-2 und Interferon-γ- Sekretion) als auch immunsuppressive Wirkungen auf (Hemmung der B- und T- Zell- sowie Makrophagenproliferation) (57). Nach einer kumulativen Dosis von 100mg/ m^2 kann es jedoch zu kardiotoxischen Nebenwirkungen (78) sowie zur Induktion akuter myeloischer Leukämien kommen (79), weshalb der Einsatz von Mitoxantron zeitlich begrenzt erfolgen soll.

1.2 Infektionshypothese- Bedeutung von viralen und bakteriellen Infektionen auf die Entwicklung und den Verlauf der Multiplen Sklerose

Schon vor 120 Jahren, als die MS erstmals beschrieben worden ist, wurden Infektionen als zugrunde liegende Ursache der Krankheitsinitiation angenommen (80). Die Erkenntnisse der epidemiologischen Studien werden außerdem häufig dahingehend interpretiert, dass man nach Einflußfaktoren für die Entwicklung der MS in der frühen Kindheit suchen sollte, wie z. B. den Einfluß von viralen und bakteriellen Infektionen (81, 82).

Die Infektionshypothese basiert auf der Annahme, dass virale und bakterielle Erreger in genetisch anfälligen Individuen, mit einer bereits bestehenden Immundysregulation, Autoimmunität über eine Reihe von Mechanismen induzieren können und somit einen

wichtigen Faktor in der Ätiologie der MS darstellen. Zu den vermuteten Mechanismen gehören molekulares Mimikry, Bystander- Aktivierung und persistente Infektion (81, 82). Das molekulare Mimikry beschreibt das Auftreten von Kreuzreaktionen zwischen Epitopen (z. B. Proteine, DNA), die von dem Pathogen und dem Wirten geteilt werden bzw. sich in ihrem molekularen Aufbau ähneln. Ein bekanntes Beispiel für postinfektiös ausgelöste Autoimmunität ist das rheumatische Fieber nach *Streptococcus pyogenes* Infektion (Kreuzreaktion zwischen M- Protein und kardialen Myosin, wordurch eine Myokarditis induziert wird (83)) sowie das Guillan- Barré Syndrom nach *Campylobacter jejuni* Infektion (Kreuzreaktion zwischen Lipo- Oligosacharide und Gangliosid GM- 1 in peripheren Nerven, die zur akuten Polyradikulitis führt (84)).
Die Bystander- Aktivierung tritt auf, wenn durch die Freisetzung proninflammatorischer Zytokine ein Mikromilieu geschaffen wird, das zur unspezifischen Schädigung benachbarter, gesunder Zellen und zur Freisetzung körpereigener Antigene führt. Autoreaktive Lymphozyten, die zuvor nicht in der initialen Immunantwort gegen das Pathogen beteiligt waren, können hierdurch aktiviert werden.
Auch eine andauernde Infektion mit Viren und Bakterien kann zu Autoimmunität führen, in dem das Immunsystem konstant vor allem durch eine polyklonale Proliferation von B-Zellen aktiviert bleibt. Manchmal kann hierdurch eine monospezifische Proliferation auftreten, die einher geht mit zirkulierenden Immunkomplexen und nachfolgender Schädigung körpereigenen Gewebes.
Einige der bisher untersuchten Erreger werden nachfolgend erläutert. Es existiert jedoch eine verwirrende Vielzahl an Studien, die durch den indirekten Nachweis einer stattgehabten Infektion eine Assoziation des Erregers zur MS nahelegen. Da die seroepidemiologischen Studien oftmals nicht prospektiv erfolgten, können diese nur Hinweise auf einen ätiologische Zusammenhang liefern, da eine Assoziation keine kausale Ursache beweist (85). Zudem konnte in vielen Fällen eine festgestellte Assoziationen in Nachuntersuchungen nicht reproduziert werden (81).

1.2.1 Epstein- Barr-Virus

Epstein- Barr- Virus (EBV) ist ein ubiquitär vorkommendes Herpesvirus, welches primär über Speichelkontakt übertragen wird und anschließend eine latente Infektion in B-Zellen etabliert. EBV ist der am häufigsten untersuchte Erreger, da er die stärkste

Assoziation zur MS ausweist. So sind fast 100% der MS- Patienten seropositiv im Vergleich zu 90- 95% der gesunden Bevölkerung (86). Das Alter bei Erstinfektion scheint eine wichtige Rolle für das spätere Risiko der MS- Entwicklung zu spielen. In den Entwicklungsländern findet die Primärinfektion in der Regel bis zum 5. Lebensjahr statt und verläuft asymptomatisch, wohingegen ein Drittel der Bevölkerung in den Industrienationen bis zur Pubertät seronegativ bleibt und durch Speichelkontakte eine symptomatisch verlaufende Primärinfektion erleidet (infektiöse Mononukleose, IM) (86). Forscher entdeckten vor ca. 25 Jahren Ähnlichkeiten in der Epidemiologie der MS und der IM und führten eine Reihe von Seroprävalenzstudien durch. Eine kürzlich publizierte Metaanalyse kam zu einem kombinierten, relativen Risiko für die Entwicklung einer MS nach durchgemachter IM von 2.3 (95% Intervall, 1,7- 3,0; $p < 10(-8)$) (87). Des Weiteren zeigten zwei große, prospektive Studien, dass es 10- 15 Jahre vor Erstmanifestation der MS zu einem Anstieg der EBV-Antikörper-Titer (EBNA-1) im Vergleich zu Kontrollen kommt (88, 89).

1.2.2 Humane Herpesvirus- 6

Auch das humane Herpesvirus- 6 (HHV- 6) kommt ubiquitär vor und etabliert, wie alle Herpesviren, eine latente Infektion, speziell in T- Zellen und ZNS- Gewebe (81). Da man virale DNA in MS-Autopsiegewebe gefunden hat (90), wurde dem HHV- 6 eine potentielle Rolle in der Entwicklung der MS zugeschrieben. Des Weiteren zeigten Studien eine höhere Viruslast im Serum während eines Schubes (91) sowie höhere Antikörpertiter und freie DNA im Serum und Liquor von MS- Patienten. Die erhöhte virale DNA- Last und Antikörper gegen HHV- 6 im Liquor und Serum von MS- Patienten lassen sich jedoch auch bei Patienten mit anderen inflammatrischen ZNS-Erkrankungen und HIV detektieren und könnten somit durch Reaktivierung des Virus in den latent infizierten T- Zellen bedingt sein, die durch das ZNS wandern (92).

1.2.3 Chlamydia pneumoniae

Auch Chlamydia pneumoniae (Cpn), ein obligat intrazelluläres, gramnegatives Bakterium, dass häufiger Auslöser von Atemwegsinfektionen ist, hat in den letzten Jahren viel Aufmerksamkeit erzeugt. Eine initiale Studie kam zu dem Ergebniss, dass 97% der MS- Patienten Cpn- DNA im Liquor im Vergleich zu 18% der gesunden

Kontrollen aufweisen, was durch nachfolgende Studien jedoch nicht reproduziert werden konnte (85). Bei Patienten mit anderen neurologischen Erkrankungen kann Cpn jedoch auch gefunden werden, wobei eine kürzlich publizierte Metaanalyse zu dem Ergebniss kam, dass MS- Patienten höhere Cpn DNA- im Liquor und intrathekal synthetisierte Cpn-spezifische Immunglobuline aufweisen, als Kontrollen mit anderen neurologischen Erkrankungen (93). All diese Studien wurden jedoch nach Diagnosestellung durchgeführt, so dass keine Aussage darüber gemacht werden kann, ob Cpn ein Risikofaktor für die Entwicklung der MS darstellt (85).

1.3 Hygienehypothese-Bedeutung von parasitären Infektionen auf die Entwicklung und den Verlauf der Multiplen Sklerose

Die Hygienehypothese besagt, dass der Grad der frühkindlichen Exposition gegenüber weit verbreiteten und relativ harmlosen Erregern mit dem Auftreten von Autoimmunerkrankungen und Atopien korreliert und ein hoher hygienischer und sozioökonomischer Standard als Risikofaktor für diese Erkrankungen gilt (94, 95).
Dass die MS- Prävalenz von der Höhe des hygienischen Standards in der Kindheit abhängig sein könnte, stellte bereits Leibowitz im Jahre 1966 fest (96).
Die Hygienehypothese stützt sich zum einen auf epidemiologische Daten, zum anderen auf tierexperimentelle und klinische Studien: die Zunahme von Autoimmunerkrankungen wie MS, Typ- 1 Diabetes und Morbus Crohn ist invers korreliert mit dem Auftreten infektiöser Erkrankungen wie Masern, Mumps, Hepatits A oder Tuberkulose in den letzten drei Jahrzehnten in Nordamerika und Europa. Dies scheint vor allem durch die mikrobielle Deprivation bedingt zu sein, die mit dem breiten Einsatz von Antibiotika und Impfungen bzw. durch den hohen hygienischen Standard hergestellt wird (94).
Die beste Evidenz für einen kausalen Zusammenhang zwischen Infektionen und dem Auftreten von Autoimmunerkrankungen wird aus tierexperimentellen Studien gewonnen, die konsistent beobachtet haben, dass Autoimmunerkrankungen in anfälligen Maus- und Rattenstämmen in einer höheren Rate auftraten, wenn sie in einer spezifischen, pathogenfreien Umwelt großgezogen worden sind, als die Tiere, die unter konventionellen Bedingungen aufwuchsen (97). So lag beispielsweise die Rate für

Diabetes von nichtübergewichtigen Mäusen bei 80% statt 40%, wenn sie unter isolierten Lebensbedingungen aufwuchsen (98).
Des Weiteren konnte durch die gezielte Gabe von Erregern, wie z. B. Mykobakterien, der Krankheitsausbruch von Diabetes in Mäusen verhindert (99) bzw. der Verlauf der EAE gemildert werden (100). Die Annahme, dass Parasiten für die Balance unseres Immunsystems unverzichtbar sind, stammt auch aus der Überlegung heraus, dass über Millionen von Jahren eine koevolutionäre Entwicklung zwischen Parasiten und menschlichen Immunsystem stattgefunden hat (101), wobei diese tendenziell einen immunsuppressiven Status im Wirten induzieren, um toleriert zu werden (95).
Unterstützt werden die epidemiologischen Beobachtungen und tierexperimentellen Erkenntnisse auch durch Erfolge in ersten klinischen Studien mit *Trichuis (T.) trichiura* und BCG- Impfungen. Helminthen sind wurmartige Parasiten, die eine dichotome Beziehung bezüglich der globalen Verteilung der MS und deren Auftreten aufweisen. So nimmt die MS- Prävalenz stark ab, wenn eine kritische Belastung mit *T. trichiura* von 10% überschritten ist (102). Aus tierexperimentellen Studien weiß man, dass der Verlauf der EAE durch die vorherige Gabe von Helminthen abgeschwächt wird, bedingt durch die Zunahme regulatorischer T- Zellen und Abnahme proinflammatorischer Zytokine (103). Erste klinische Studien mit Helminthen bei MS- Patienten zeigen eine Verminderung der klinischen und bildgebenen Krankheitsprogression sowie eine Zunahme an regulatorischen T- Zellen (104).
Neben den positiven Ergebnissen der Helmithentherapie scheint auch die BCG-Impfung protektive Effekte auf die Krankheitsaktivität bei MS- Patienten (signifikant geringere Anzahl kontrastmittelaufnehmender Läsionen nach BCG- Impfung (105)) sowie CIS- Patienten zu haben (signifikant weniger kontrastmittelaufnehmende Läsionen als nicht- geimpfte CIS- Patienten (106)), ohne nennenswerte Nebenwirkungen zu verursachen. BCG ist ein Lebendimpfstoff aus attenuierten *Mycobacterium bovis* Stämmen, der nach Injektion, neben anderen potentiel immunstimulatorischen Effekten, eine Immunreaktion gegen das intrazellulär lebende Mykobakterium induziert.
Diese Immunantworten können eine langanhaltend, protektive Immunität bei MS-Patienten aktivieren, wobei der genaue Wirkmechanismus bisher nicht geklärt ist. Man vermutet, dass es durch die Verabreichung des Impfstoffs zu Antigenkompetitionen

kommt, die zum einen die Entwicklung regulatorischer Zellen fördert und zum anderen autoreaktive T-Zellantworten ablenkt und vermindert (Bystander- Suppression) (97).
Obwohl die oben beschriebenen Erkenntnisse der Hygienehypothese die ätiologische Rolle der Umweltfaktoren für die Entwicklung der MS sowie deren steigende Inzidenz gut erklären, bedarf es weiterer Studien, um die Evidenz für diese Hypothese zu erhärten.

1.4 Toxoplasmose

1.4.1 Epidemiologie von *Toxoplasma (T.) gondii*

Toxoplasmen gehören weltweit gesehen zu den häufigsten Parasiten: schätzungsweise 1/3 der Weltbevölkerung sind latent mit *T. gondii* infiziert, so dass die Toxoplasmose in Gebieten mit hohen Prävalenzraten ein bedeutendes Problem für das öffentliche Gesundheitswesen darstellt (107). In Brasilien sind beispielsweise 50- 80% der Bevölkerung latent mit *T. gondii* infiziert (107), wohingegen in den USA (108) oder Schweden (109) nur ca. 14- 25% der Bevölkerung seropositiv sind.
Die Prävalenzunterschiede können durch verschiedene Faktoren erklärt werden. Neben dem Alter bei Erstinfektion spielen vor allem sozioepidemiologische Faktoren wie Ernährungssgewohnheiten, hygienische Standards und der sozioökonomische Status eine wichtige Rolle. Kontakt zu Katzen scheint keinen Einfluß auf das Infektionsrisiko zu nehmen (110). In Deutschland nimmt die Seroprävalenzrate laut dem Robert Koch Institut mit steigendem Alter zu, wobei schätzungsweise 50% der Bevölkerung infiziert sind. Die Toxoplasmose ist, mit Ausnahme der konatalen Infektionen (10- 20 Fälle/ Jahr), keine meldepflichtige Erkrankung.

1.4.2 Biologie und Lebenszyklus von *T. gondii*

T. gondii ist ein obligat intrazellulär lebendes Protozoon und gehört zum Stamm der Apicomplexa und der Ordnung der Kokzidien an, wozu auch weitere humanpathogene Spezies wie Plasmodien (Malaria), Cryptosporidien und Eimerien gehören.
Dabei existieren drei Stadien von *T. gondii*, die durch einen komplexen Lebenszyklus miteinander verbunden sind (*Abb.1*): Oozysten, Tachyzoiten und Gewebezysten, die in ihrem Inneren mehrere tausend Bradyzoiten enthalten (111).

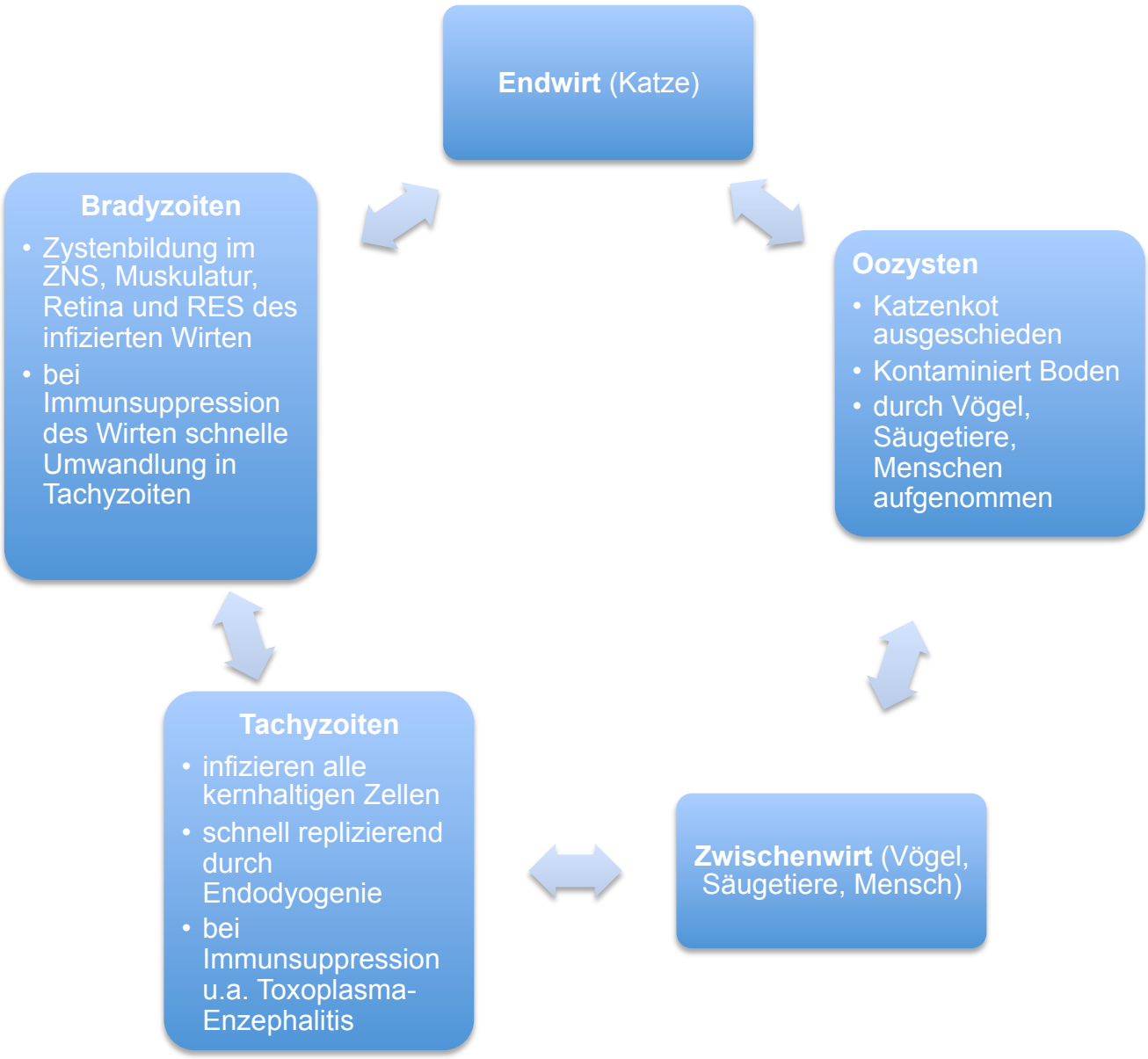

Abb. 2: Lebenszyklus von *T. gondii*

Der parasitäre Lebenszyklus der Toxoplasmen lässt sich in eine sexuelle und eine asexuelle Replikationsphase unterteilen: Katzen und Katzenartige (Felidae) stellen dabei den eigentlichen Endwirt dar, denn nur in ihrem Darmepithel kann *T. gondii* die geschlechtliche Vermehrung (Gamogonie) über mehrere Entwicklungsstadien durchführen. Hieraus resultieren Oozysten, die zwischen dem 3.- 24. Tag nach Erstinfektion mit dem Katzenkot ausgeschieden werden. Im Anschluß erfolgt deren

Sporulation, woduch die Oozysten in warmen, feuchten Gebieten bis zu 18 Monaten lebensfähig bleiben. Sehr heiße oder kalte Außentemperaturen sowie kochendes Wasser führen zum Absterben der Oozysten. Dies erklärt zum Teil die geografische Verteilung der Toxoplasmose.

Die sporulierten Oozysten aus der Umwelt sind sowohl für die Katze selbst, als auch für andere Zwischenwirte infektiös, wobei eine weitere Infektion des Endwirts nur noch selten zur erneuten Ausscheidung von infektiösen Oozysten führt. Die sporulierten Oozysten werden dann entweder über kontaminierte Nahrung wie unzureichend erhitzes, zystenhaltiges Fleisch oder durch oozystenhaltige, fäkale Verunreinigungen im Trinkwasser oder Boden von Menschen und Tieren aufgenommen. Beim Menschen spielt neben der horizontalen Übertragung vor allem die vertikale über die Plazenta in der Pränatalperiode eine herausragende Rolle aufgrund der weitreichenden Konsequenzen für Mutter und Ungeborenes. Auch Übertragungen im Zusammenhang mit Organtransplantationen und Bluttransfusionen von seropositiven Spendern auf seronegative Empfänger können stattfinden (111).

Nach Aufnahme der Oozysten durch den Zwischenwirten kommt es nach Passage des Gastrointestinaltrakts und Umwandlung in schnell replizierende Tachyzoiten, die das asexuelle Stadium darstellen, welches in der akuten Phase der Infektion dominiert, zur hämatogenen Dissemination des Erregers (111, 112). Dabei können sich die Tachyzoiten prinzipiell in jeder kernhaltigen Zelle replizieren, vor allem jedoch in Neuronen und Astrozyten, Zellen der Retina sowie Muskelzellen, da diese sich durch eine lange Vitalität und wenig Antigenoberfläche auszeichnen und somit die idealen Vorraussetzungen für eine latente Infektion bieten.

Unter dem Einfluss der körpereigenen Immunantwort wird die Vermehrung der Tachyzoiten rasch limitiert und in den meisten Organen eliminiert. Dabei führt die akute Infektion sowohl zur Induktion der humoralen Immunantwort, als auch zur Aktivierung des zellulären Arms (113). Als Haupteffektoren fungieren dabei CD8+- T- Zellen, während CD4+- T- Zellen vor allem regulatorische Funktionen ausüben. Es kommt zu einer starken und langanhaltenden Th1- Immunantwort, die durch die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen wie INF-γ, IL-12 und TNFα gekennzeichnet ist und kombiniert zur Aktivierung antiparasitäre Effektormechanismen führt (Abb. 2). Dabei kommt dem IL-12 eine Schlüsselrolle bei der Aktivierung IFN- γ produzierender T- und

NK- Zellen zu, welches aufgrund der Stimulation von TLR- Signalwege durch Oberflächenbestandteile von *T. gondii* (Profillin aktiviert TLR-11 und TLR-12) von dendritische Zellen gebildet wird (114). IFN-γ scheint sowohl in der akuten, als auch in der chronischen Phase der Infektion die zentrale Rolle bei der Immunabwehr gegen die Toxoplasmen zu spielen: es aktiviert vor allem die Makrophagen, die daraufhin wichtige antiparasitäre Effektormoleküle (u.a. NO) produzieren, die die weitere intrazelluläre Replikation der Tachyzoiten hemmt und somit zur Konversion zu Bradyzoiten beiträgt (114).

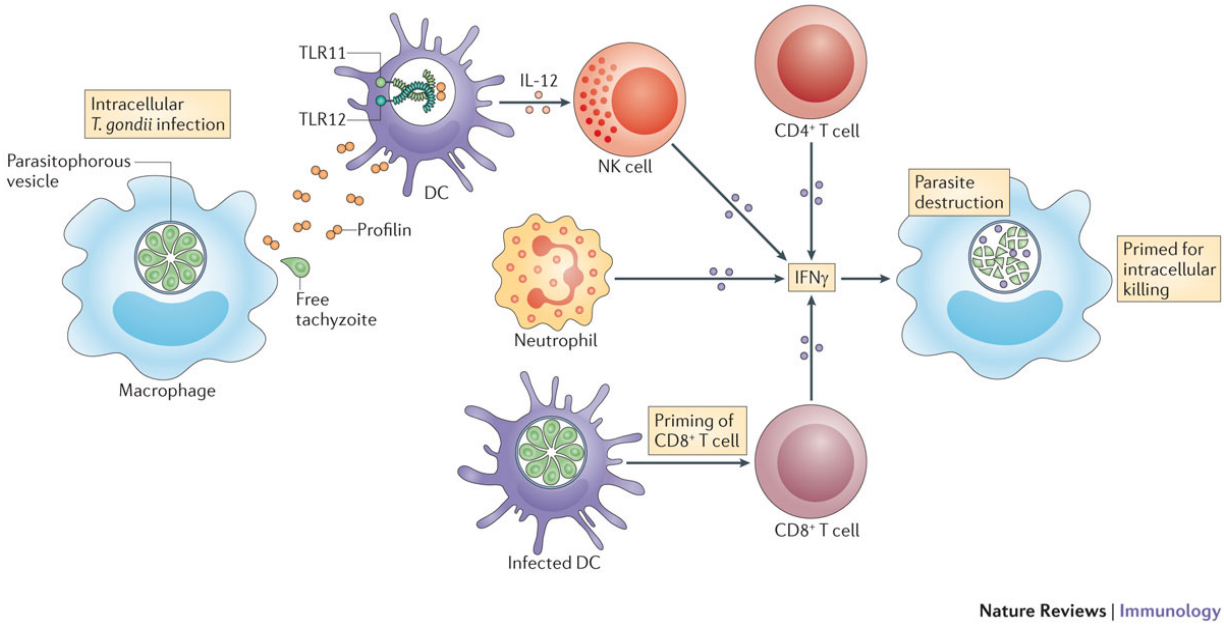

Abb. 3: Schematische Darstellung der Immunantwort gegen *T. gondii* (Quelle: (114)

Das Immunsystem schafft es jedoch nicht die Toxoplasmen komplett zu eliminieren. Zum einen verbleiben diese intrazellulär in der so genannten parasitophoren Vakuole, die keine Bindungsstellen für wirtseigene Moleküle aufweist, so dass die Toxoplasmen innerhalb der Wirtszelle unerkannt bleiben. Zum anderen setzen die Toxoplasmen die Hochregulation der MHC-II- abhängigen Antigenpräsentation herab (113) und inhibieren die Apoptose der Wirtszelle (115). Somit können die Toxoplasmen dauerhaft intrazellulär persistieren und sich erfolgreich der Immunantwort entziehen (Immunevasion).

1.4.3 Klinische Präsentation

Bei immunkompetenten Patienten

Eine Infektion mit *T. gondii* verläuft bei gesunden Personen in der Regel subklinisch. Nur bei 10- 20% der Patienten kann es zu milden Allgemeinsymptomen kommen wie Lymphadenopathie, leichtes Fieber oder Krankheitsgefühl (111).

Bei immunsupprimierten Patienten

Eine Toxoplasmoseinfektion bei iatrogen Immunsupprimierten und Patienten mit AIDS kann ohne adequate Therapie oft tödlich verlaufen (116). Bei diesen Patienten ist die Toxoplasmose fast immer das Resultat einer Reaktivierung. Die Toxoplasmose-Enzephalitis ist dabei die häufigste Erscheinungsform, da sich die Gewebezysten vor allem im ZNS befinden. Deshalb ist die klinische Symptomatik unspezifisch und variiert von fokalen Symptomen bis zu komplexen zentralnervösen Störungen, wobei sich die Symptomatik sowohl schleichend, als auch akut und fulminant entwickeln kann und schließlich zur Abszessbildung und Nekrose des betroffenden Hirnareals führt (114, 116).

Die diaplazentare Übertragung des Parasiten bei Primärinfektion in der Schwangerschaft bleibt in der Regel symptomlos. In Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Erstinfektion steigt das Risiko der diaplazentaren Übertragung, wohingegen die klinischen Symptome im ersten Trimenon am schlimmsten sind (Abort nicht selten) (117). Die typische Trias aus Chorioretinitis, Hydrocephalus und Kalzifizierungsherde ist dabei eher untypisch (118). Im dritten Trimenon sind nur in 10% der Fälle klinische Symptome vorhanden. Meist enwickeln sich die Spätfolgen erst im Laufe der Entwicklung des Kindes (u.a. wie Chorioretinitis, psychomotorische Retardierung, Epilepsien) (111).

1.4.4 Diagnose

Der Nachweis einer Infektion mit *T. gondii* kann entweder indirekt mit serologischen Methoden oder direkt mittels PCR, Kultivierung oder Histologie erfolgen. Die Wahl des geeigneten diagnostischen Mittels und deren richtige Interpretation hängt vom Immunstatus des Patienten ab, wobei in der klinischen Praxis die Diagnostik v.a. bei

immunsupprimierten Patienten mit reaktivierter Toxoplasmose sowie bei Primärinfektion in der Schwangerschaft von Bedeutung ist (119).

Indirekter Erregernachweis

Der serologische Nachweis der *T. gondii*- Antikörper ist in der Regel der erste diagnostische Schritt, sowohl bei infizierten immunkompetenten Patienten, als auch zum Nachweis der Erstinfektion während der Schwangerschaft.

Der Nachweis von Toxo-IgG- Antikörpern erfolgte früher häufig durch den Sabin-Feldman Dye Test, wohingegen heutzutage meist der ELISA sowie der IgG-Aviditätstest angewendet werden (119). Spezifische Toxo-IgG- Antikörper sind in der Regel 2 Wochen nach Erstinfektion positiv und bleiben ein Leben lang nachweisbar. Um jedoch eine Unterscheidung zwischen einer erst kürzlich stattgefundenen oder schon länger zurückliegenden Erstinfektion bei positiven IgG- Antikörperstatus treffen zu können, wurde der funktionelle IgG- Aviditätstest entwickelt. Hierbei nutzt man die Beobachtung, dass die Affinität der spezifischen IgG- Antikörper gegenüber *T. gondii* zu Beginn der Infektion noch niedrig ist und in den nachfolgenden Wochen steigt. So bedeutet ein hoher Affinitätsindex, dass die Primärinfektion vor mehr als 3 Monaten stattgefunden hat und erlaubt somit eine sichere Einschätzung des Risikos für eine diaplazentare Übertragung des Parasiten (120). Ein signifikanter Anstieg von niedrig-aviden IgG- Antikörpern ist im Gegensatz dazu beweisend für eine akute Infektion. Dies ist ein wichtiger Punkt, da die spezifischen IgM-Antikörper zum Teil bis zu 18 Monate nach Primärinfektion nachweisbar sein können (130) und man somit konfirmatorische Testungen benötigt. Der Nachweis von IgM-Antikörpern erfolgt entweder über ein double-sandwich ELISA oder über ein Agglutinationsassay (IgM-ISAGA) (119). Bereits eine Woche nach Erstinfektion ist der Test reaktiv. Ein negativer IgM- Antikörper Status schließt hingegen eine akute Infektion aus, worin auch der primäre diagnostische Wert liegt (111).

Direkter Erregernachweis

Der direkte Nachweis *T. gondii* dient der definitiven Diagnosesicherung bei der zerebralen, okulären, disseminierten und kongenitalen Toxoplasmoseinfektion und erfolgt entweder mittels PCR aus Körperflüssigkeiten oder Gewebe (119) oder histologisch durch den Nachweis von Tachyzoiten aus Gewebeproben. Des Weiteren

kann auch eine Erregeranzucht in einer Zellkultur unternommen werden, wobei dieses Verfahren viel Zeit kostet und daher selten angewand wird.

1.5 Einleitung in die Fragestellung

Nach wie vor bleibt die Ätiologie der MS ungeklärt, obwohl es sich viele Studien zum Ziel gemacht haben, die Mechanismen dieser so häufig vorkommenden Autoimmunerkrankung zu verstehen.

Es besteht jedoch der allgemeiner Konsens, dass die Multiple Sklerose eine multifaktoriell bedingte Erkankung ist, bei der neben einer gewissen genetischen Prädisposition vor allem Umweltfaktoren eine weitreichende, ätiologische Rolle spielen.

Neben klimatischen Faktoren wie UV-Exposition und Vitamin- D3 oder Lebensstilfaktoren wie Rauchen oder Übergewicht in der Kindheit, wird auch immer wieder Erregern eine verursachende Rolle zugeschrieben. Ursache hierfür sind die zum Teil signifikanten Unterschiede im Serostatus zwischen MS- Patienten und Kontrollen bezüglich der Antikörper gegen Viren und Bakterien, wobei der Zusammenhang am deutlichsten für EBV gezeigt wurde.

Auf der anderen Seite geht die Hygienehypothese davon aus, dass aufgrund der hohen hygienischen Standards in den Industriestaaten und der breiten Nutzung von Antibiotika das Risiko für die Entwicklung von Atopien und Autoimmunerkrankungen in der westlichen Bevölkerung zugenommen hat, was mit einer Verminderung von parasitären Infektionen in Zusammenhang gesehen wird. Auch legen Studien nahe, dass sich unser Immunsystem, evolutionsbiologisch gesehen, in Abhängigkeit von parasitären Infektionen entwickelt hat und somit Infektionen für die Balance des Immunsystems wichtig sind.

T. gondii gehört weltweit gesehen zu den häufigsten Parasiten, wobei der Seroprävalenzstatus stark mit den hygienischen Verhältnissen der Bevökerung korreliert und somit eine umgekehrt proportionale Verteilung zur Prävalenz der MS aufweist.

Des Weiteren ist *T. gondii,* ähnlich wie *Mycobacterium tuberculosis,* ein intrazellulärer Erreger, der die Fähigkeit besitzt eine dauerhafte Persistenz im Menschen zu etablieren und somit das Immunsystem kontinuerlich zu stimulieren.

Da erst kürzlich über die protektiven Effekte der BCG- Impfung auf die Krankheitsaktivität der MS berichtet wurde (100, 105, 121) und auch Parasiten im Darm von MS- Patienten einen immunmodulierenden Effekt ausüben, stellt sich für mich die Frage, ob auch *T. gondii* einen ätiologischen Einfluß auf das Risiko und den Verlauf der MS hat.

Dabei soll insbesondere untersucht werden, ob ein positiver Serostatus, ähnlich wie die BCG- Impfung, ein protektiven Faktor für die Entwicklung und den Verlauf der MS darstellt.

Bisher existieren in der Literatur noch keine klinischen Studien mit einer alters- und geschlechtsgematchten, großen Studienpopulation, so dass die vorliegende Arbeit sich zum Ziel gesetzt hat, den ätiologischen Zusammenhang der *T. gondii* Infektion auf das Risiko und den Verlauf der MS zu untersuchen.

Dafür werden die Seroprävalenzraten der MS- Patienten mit denen von alters- und geschlechtsgematchten Kontrollen verglichen und mit relevanten klinischen und paraklinischen Parametern korreliert.

2 METHODIK

2.1 Auswahl der Patienten

In die Studie wurden 163 MS- Patienten und 91 Patienten mit einem klinisch- isolierten Syndrom (CIS) sowie 178 alters- und geschlechtsgematchte Kontrollen eingeschlossen. Einschlusskriterien für die MS- Patienten waren: klinisch-, bildgebend und liquorologisch gesicherte Multiple Sklerose nach den McDonald- Kriterien von 2005 sowie Alter 16- 75 Jahre. Die 163 MS- Patienten setzten sich zusammen aus 114 Patienten mit schubförmig- remittierenden MS (RRMS), 10 Patienten mit sekundär-progredienten MS (SPMS) und 39 Patienten mit primär- progredienter MS (PPMS), waren kaukasischer Abstammung und lebten in Berlin und Umkreis. Daher war die Exposition gegenüber geographischen Faktoren, die eine Infektion mit *T. gondii* beeinflussen könnten, vergleichbar.

Alle Patienten wurden im Zeitraum von 2002- 2013 in der Klinik und Poliklinik für Neurologie der Charité diagnostiziert oder behandelt und erhielten im Zuge dessen eine Liquorpunktion und Blutentnahme, zerebrale und meist auch spinale MRT-Untersuchungen mit oder ohne gadoliniumhaltigen Kontrastmittel, neurophysiologische Untersuchungen sowie einen ausführlichen neurologischen Status. Mit Hilfe dieser Angaben wurden alle relevanten klinischen und paraklinischen Parameter retrospektiv aus Arztbriefen und Untersuchungsbefunden der Klinik für Neurologie der Charité ermittelt sowie im Anschluß die Antikörper- Prävalenz- und Titerhöhe im Serum von MS- Patienten und Kontrollen gegen *T. gondii* aus Rückstellproben im Zentrallabor der Charité bestimmt.

Dabei wurden Informationen zum Zeitpunkt der Probenentnahme über die unten genannten Parameter ermittelt und in einer Excelltabelle zusammengefasst (siehe Tab. 1 & 2):

- Name, Alter und Geschlecht
- Alter bei Erstmanifestation und Erkrankungsdauer
- Verlaufsform
- Erstmanifestationssymptome
- Anzahl der Schübe

- Datum der Liquorpunktion sowie Befund (Vorhandensein von oligoklonalen Banden, Konzentration von IgG-, IgA- und IgM im Liquor und Serum sowie Bestimmung des Quotienten aus der Konzentration von IgG-, IgA und IgM im Liquor und Serum)
- Datum der zerebralen und spinalen MRT- Untersuchung sowie deren Befund (Anzahl an T1- und T2- gewichteten Läsionen und Anzahl der Gadolinium-aufnehmenden Läsionen nach Barkhof- Kriterien)
- Basismedikation (Glatirameracetat, Interferon β1-a und β1-b) oder Eskalationstherapie (Natalizumab, Mitoxantron)
- Nikotinabusus zum Zeitpunkt der Probenentnahme (Exraucher und Raucher wurden mit ja klassifiziert, Nichtraucher mit nein)
- ANA-Status (positiv ≥ 1:80)

Des Weiteren wurde anhand des neurologischen Untersuchungsbefundes zum Zeitpunkt der Probenentnahme der Behinderungsgrad der MS- Patienten mit Hilfe der Expanded Disability Status Scale (EDSS) von Kurtzke bestimmt. Dabei wurde die Schwere der Beeinträchtigung anhand von 8 neurologischen Systemen ermittelt, welche die Funktionen der Pyramidenbahn, des Kleinhirns, Sensoriums und Hirnstammes, des Blasen- und Mastdarms- sowie der visuellen und zerebralen Funktion umfassen. Die einzelnen Systeme können dabei von 0 (normale Funktion) bis VI (schwere Beeinträchtigung) bewertet werden.
Außerdem wird auch das Ausmaß der Gehfähigkeit in der Bewertung berücksichtigt.
Im Anschluss werden die Punkte addiert und zum Gesamtscore zusammengefasst. Die Skala reicht dabei von 0 (neurologischer Normalbefund) bis 10 (Tod durch MS).
Ein EDSS bis 3,5, zeigt an, dass vorwiegend Störungen in den einzelnen Funktionssystemen vorliegen, während der EDSS ab 4,0 maßgeblich durch das Ausmaß der Einschränkung des Gehvermögens bedingt ist (122).
Es gab keine Informationen über den sozioökonomischen Status und Bildungsgrad der Patienten, weshalb diese Punkte in weiteren Analysen nicht berücksichtigt werden konnten. Des Weiteren konnten nicht alle relevanten klinischen und paraklinischen Daten von allen Patienten erhoben werden, da diese in einem klinischen, retrospektiven Setting rekrutiert wurden.

Die 178 alters- und geschlechtsgematchten Kontrollen wurden aus der Poliklinik für Neurologie der Charité oder der Charité Notaufnahme im Zeitraum von 2002- 2012 rekrutiert und waren entweder freiwillige gesunde Probanden (n= 75) oder Patienten mit nicht-inflammatorischen neurologischen Erkrankungen (n= 103) laut der Konsensusdefinition für Kontrollgruppen in Biomarkerstudien in MS von 2013 (123). Die symptomatischen Kontrollen erhielten die oben genannten diagnostischen Maßnahmen mit Ausnahme der ANA- Titerbestimmung, um infektiöse, chronisch-entzündliche Erkrankungen wie HIV, Tuberkulose, Syphillis oder Hepatitis B/ C, Autoimmun- oder maligne Grunderkrankungen des ZNS auzuschließen und waren bezüglich des Wohnortes und geographischen Einflussfaktoren vergleichbar mit den MS- Patienten.

Die symptomatischen Kontrollen (n= 103) stellten sich aufgrund von Kopfschmerzen oder polytopen, unspezifischen Beschwerdebildern vor. Von diesen litten 53 an einer primären Kopfschmerzform (7 Probanden mit Migräne mit Aura, 10 Probanden mit Migräne ohne Aura, 1 Patient mit *migraine sans migraine*, 24 Probanden mit episodischem Spannungskopfschmerz, 5 Probanden mit chronischem Spannungskopfschmerz, 1 Proband mit analgetikainduziertem Kopfschmerz, 3 Probanden mit Clusterkopfschmerzen, 2 Probanden mit Hemicrania continua sowie 2 Probanden mit Kopfschmerzen bei chronischer Sinusitis maxillaris). Bei den restlichen symptomatischen Kontrollen konnte entweder eine chronisch- entzündliche ZNS-Erkankung ausgeschlossen (n= 33) oder eine somatoforme Störung diagnostiziert werden (n= 17).

Anschließend erfolgte ein paarweises Matching bezüglich des Alters und Geschlechts zu den jeweiligen MS- Patienten.

Die Serumprobenentnahme der Patienten und Kontrollen erfolgte zur Zeit der primären Diagnostik. Die nachfolgende Analyse auf *T. gondii* IgG- und IgM Antikörper erfolgte im Zeitraum von Oktober- Dezember 2013 durch die mikrobiologische Abteilung des Zentrallabors der Charité nach den gleichen Vorgaben wie für Routinebestimmungen. Die Laborassistenten waren bezüglich der klinischen Daten und Studiengruppe verblindet.

Dabei wurden die Namen der Patienten und Kontrollen zeitnah anonymisiert, so dass das Zeitfenster für die Vorhaltung personenbezogener Daten minimiert worden ist. Der

Name ist durch eine fortlaufende Nummer ersetzt und die initiale Zuordnungsliste im Anschluß vernichtet worden, so wie es bei der datenschutzrechtlichen Prüfung vereinbart wurde.

2.2 Ethikantrag

Die vorliegende Studie wurde von der Ethikkommission der Charité-Universitätsmedizin Berlin nach datenschutzrechtlicher Prüfung genehmigt und nach den ethischen Standards der Deklaration von Helsinki durchgeführt. Von einer verpflichtenden Einwillingungserklärung der Patienten und Probanden wurde abgesehen, da sich die Studie vorwiegend auf die Nutzung bereits vorhandener Daten bzw. Proben sowie Routineparameter fokussierte. Die Nummer des Ethikantrags lautet wie folgt: EA1/317/12.

2.3 Gewinnung der Proben

Die Serumproben zur Analyse der *T. gondii* IgG- und IgM- Antikörper entstammten aus Rückstellproben der Klinik für Neurologie der Charité Mitte. Diese wurden nach der Probenentnahme zunächst zentrifugiert und im Anschluß bei durchschnittlich - 70 Grad Celsius in einem handelsüblichen Gefrierschrank der Arbeitsgruppe für klinische Neuroimmunologie eingefroren. Um die Antikörperbestimmung vornehmen zu können, wurden die Serumproben einmalig aufgetaut, vor der Aliquotierung auf dem Vortex gemischt und mittels variabel einstellbarer Eppendorfpipetten in 1 ml große Reagenzgläser pipetiert. Anschließend wurden diese mit der entsprechenden Labornummer beschriftet und bis zum zeitnahen Transport zum kooperierenden mikrobiologischen Zentrallabor der Charité im Kühlschrank der Arbeitsgruppe bei 4 Grad Celsius aufbewahrt.

Das Restmaterial ging an die Klinik und Poliklinik für Neurologie der Charité Mitte zurück und wurde erneut bei - 70 Grad Celsius im Gefrierschrank der Arbeitsgruppe eingefroren.

2.4 Antikörperbestimmung

Die Prävalenz und Titerhöhe der *T. gondii* - Antikörper vom IgG- und IgM- Typ wurde aus 300 µl Serum von MS- Patienten und Kontrollen mittels dem ARCHITECT Toxo IgG und IgM Assay Kit der Firma ''Abbott Laboratories'' analysiert.
Das Verfahren wird im Folgenden für den jeweiligen Antikörper beschrieben.

2.4.1 Bestimmung der *T. gondii* Antikörper vom IgG- Typ

Der ARCHITECT Toxo IgG- Assay ist ein automatisiertes Zwei-Schritt- Immunoassay zur quantitativen Bestimmung von IgG- Antikörpern gegen *T. gondii* im Humanserum und beruht auf der Technik des Chemilumineszenz-Mikropartikelimmunoassays (CMIA).
Im ersten Schritt werden die verdünnte Probe, das Assayverdünnungsmittel und die mit *T. gondii* Antigen beschichteten paramagnetischen Mikropartikel gemischt. Die Mikropartikel enthalten das P30 (SAG1) und P35 (GRA8) - Antigen von *T. gondii* welches rekombinant hergestellt wurde und mit den *T. gondii* spezifischen Antikörpern im Probenserum ein Antigen-Antikörper- Komplex bildet (124).
Nachdem diese gewaschen sind, wird in einem zweiten Schritt akridiuniummarkiertes anti-human IgG (Maus) hinzugegeben, wodurch ein Reaktionsgemisch mit dem *T. gondii* spezifischen IgG- Antikörpern entsteht, die bereits an die Mikropartikel gebunden haben.
Nach einem weiteren Waschzyklus werden dem Reaktionsgemisch Pretrigger- und Triggerlösungen zugegeben (enthalten Wasserstoffperoxid und Natriumhydroxid).
Die daraus resultierende Chemilumineszenz-Reaktion wird in relativen Lichteinheiten (RLE) gemessen. Dabei besteht eine direkte Abhängigkeit zwischen der Menge an *T. gondii* - IgG Antikörpern in der Probe und der RLE, die vom optischen System des ARCHITECT gemessen wurde. Das System berechnet dabei den Mittelwert des Chemilumineszenzsignals der Kalibratoren und generiert eine Kalibrierungskurve.
Die Standardeinstellung der Ergebniseinheit für den ARCHITECT Toxo IgG Assay ist IU/ml.
Proben, mit einer Konzentration von ≥ 3,0 IU/ml gelten als reaktiv für IgG- Antikörper gegen *T. gondii* und deuten auf eine zurückliegende oder akute Infektion hin, falls auch die IgM-Antikörper gegen *T. gondii* reaktiv sein sollten. Dabei wird eine relative

Sensitivität von 97,5% vom Hersteller angegeben. Als nicht- reaktiv werden Konzentrationen von ≤ 1,6 IE/ml angesehen, die damit eine stattgehabte Infektion mit *T. gondii* mit hoher relativer Spezifität von 99,1% ausschließen (117). Proben mit Konzentrationen von 1,6- ≤ 3,0 IE/ml gelten als grenzwertig. Diese sollten entweder mit einem Toxo-IgM- Test analysiert werden oder es wird eine Nachbestimmung einer zweiten Proben innerhalb weniger Wochen vorgenommen, was in dieser Studie jedoch aufgrund des Studiendesigns nicht möglich war, so dass entsprechend eine IgM-Bestimmung vorgenommen wurde.

2.4.2 Bestimmung des *T. gondii* IgM- Antikörpers

Der ARCHITECT Toxo IgM-Assay ist ein automatisiertes Zwei-Schritt Immunoassay zum qualitativen Nachweis von IgM- Antikörpern gegen *T. gondii* im Humanserum und basiert, ebenso wie Toxo- IgG, auf der CMIA-Technik.

Im ersten Schritt wird die vorverdünnte Probe mit paramagnetischen Mikropartikeln vermischt, die mit monoklonal hergestellten anti- human IgM der Maus beschichtet ist. Dadurch verbinden sich die spezifisch gegen *T. gondii* gerichteten IgM- Antikörper in der Probe mit den anti- human- IgM beschichteten Mirkopartikeln und bilden so ein Antikörper-Antikörper Komplex.

Nachdem die Probe gewaschen wurde, erfolgte in einem zweiten Arbeitsschritt die Zugabe eines Konjugatkomplexes, welches aus einem monoklonal hergestellten, akridiniummarkierten anti-Toxo-p30- Antigen F(ab)2- Fragment und einem nativen *T. gondii* Lysat (p30 Antigen) besteht. Dieser Konjugatkomplex wird im Anschluß von den spezifischen IgM- Antikörpern gegen *T. gondii* in der Probe des Patienten gebunden und bildet somit einen Antikörper-Antikörper-Konjugat- Komplex aus.

In einem weiteren Waschzyklus werden dem Reaktionsgemisch Pretrigger- und Triggerlösungen hinzugegeben, wodurch die Chemilumineszenzreaktion aktiviert wird. Diese wird, wie auch schon bei der ARCHITECT Toxo IgG- Bestimmung, in RLE gemessen. Durch den Vergleich des aus der Reaktion enstehenden Chemielumineszenzsignals der Patientenprobe mit dem Grenzwertsignal der bereits vorhandenen Kalibirierungskurve erfolgt der endgültige Nachweis der IgM- Antikörper, wobei die Menge direkt proportional zu den gemessenen RLE ist.

Die Probe wird als positiv bewertet, wenn das resultierende Chemilumineszenzsignal größer ist als das Grenzwertsignal, dass heißt wenn der Index-Wert bei ≥ 0,60 liegt. Nicht- reaktive Ergebnisse werden definiert als Indexwerte ≤ 0,50 und grenzwertige Resultate befinden sich im Bereich von 0,39- 0,50.
Die relative Sensitivität des Tests beträgt 97,5%, die relative Spezifität 99,8% (125).
Somit kann eine akut vorliegende Toxoplasmose sicher ausgeschlossen werden, wenn der Test nicht reaktiv ist.

2.5 Statistik

Die Haupthypothese dieser Studie besteht in der Untersuchung eines ätiologischen Zusammenhangs zwischen der Seropositivität für *T. gondii* IgG und IgM- Antikörper und dem Einfluss auf die Entwicklung und den Verlauf der MS.
Dafür wurden die klinischen und paraklinischen Parameter der MS- Patienten mit den Ergebnissen der Serologie in Bezug zu den alters- und geschlechtsgematchten Kontrollen gesetzt und auf statistische Zusammenhänge hin untersucht.

Die statistische Auswertung erfolgte mit der Software Graph Pad Prism, Version 6.0e für Mac OS X, GraphPad Software, La Jolla California USA, www.graphpad.com" sowie mit der Software Wizard, Version 1.4.6 von Evan Miller, "www.wizardmac.com".

Da in Europa das Level der endemischen Infektion mit Toxoplasmose in einer Population mit steigendem Alter zunimmt (126) und somit als Risikofaktor für eine gilt, wurde ein paarweises Matching der MS- Patienten mit den Kontrollen bezüglich des Alters (max. 3 Jahre Differenz) und Geschlechts durchgeführt, um strukturgleiche Gruppen zur statitstischen Analyse zu erhalten und somit eine systematische Verzerrung (Selektionsbias) zu vermeiden.
Des Weiteren wurde ein separates Matching für MS- Patienten in Abhängigkeit ihres *T. gondii* IgG- Status nach Geschlecht, Alter (max. 3 Jahre Differenz) sowie Erkrankungsdauer (max. 1 Jahr Differenz) durchgeführt, um zu analysieren, ob ein positiver *T. gondii* IgG- Status mit einem milderen klinischen und bildmorphologischen Krankheitsverlauf einhergeht.

Für den Vergleich der Seroprävalenzraten zwischen den alters- und geschlechtsgematchten MS- Patienten und Kontrollen wurde der McNemar- Tests verwendet. Der McNemar- Test ist ein Häufigkeitstest für zwei verbundene Stichproben, die hinsichtlich eines Alternativmerkmals verglichen werden sollen.
Es wurde untersucht, ob die MS- Patienten eine andere Exposition gegenüber dem Risikofaktor aufwiesen, als die gematchte Kontrolle. Dabei wurde ein negativer *T. gondii* IgG- Status als Risikofaktor angesehen, da eine durchgemachte parasitäre Infektion, anlehnend an die Hygienehypothese, als protektiver Faktor für die Entwicklung einer MS gelten würde.
Die Analyse der Seroprävalenzraten von *T. gondii* IgM- Antikörpern zwischen MS-Patienten und Kontrollen erfolgte mit den gleichen statistischen Testverfahren.

Zur Analyse von Häufigkeiten wurde entweder der Chi-Quadrat- Vierfeldertest oder der Fisher-‘s- exakter Test durchgeführt, wenn die erwarteten Häufigkeiten zu klein waren.

Um die Art des Zusammenhangs zwischen zwei quantitativen Merkmalen zu bestimmen, wurde die lineare Regressionssanalyse durchgeführt.
Dabei wurde der Korrelationskoeffizient nach Spearman (Rangkorrelation) verwendet, da eine jeweilige Normalverteilung für beide Merkmale nicht vorlag.

Für den Vergleich von Mittelwerten bei quantitativen, nicht normalverteilten Merkmalen wurde der Mann- Whitney- sowie der Kruskal- Wallis- Test zum Vergleich mehrerer für unverbundene Stichproben verwendet.

Der Wilcoxon- Test wurde für den Vergleich von Merkmalen bei verbundenen Stichproben angewandt.

Das Testergebnis wurde als statistisch signifikant angesehen, wenn der *p*- Wert kleiner war als 0,05.

3 ERGEBNISSE

3.1 Klinische Charakteristika der Studienpopulation

In die Studie wurden insgesamt 254 Patienten mit MS eingeschlossen, wovon 35,8% mit CIS (91/ 254), 44,9% mit RRMS (114/ 254), 3,9% mit SPMS (10/ 254) und 15,4% mit PPMS (39/ 254) nach den revidierten McDonald- Kriterien von 2005 diagnostiziert worden sind.

Die Kontrollgruppe umfasste 178 gesunde und symptomatische Probanden.

Im Anschluß erfolgte die Bestimmung der *T. gondii* Antikörper vom IgG- und IgM- Typ sowie die Erhebung der IgG- Titerhöhe in den Serumproben.

Danach wurde der *T. gondii* IgG- und IgM- Serostatus sowie die Titerhöhe auf Zusammenhänge mit klinischen und paraklinischen Parametern untersucht.

Dafür erfolgte ein paarweises Matching für das Alter und Geschlecht.

Die gematchte Studienpopulation umfasste 165 Patienten mit MS, davon 37,0% mit CIS (61/ 165), 44,2% mit RRMS (73/ 165), 2,4% mit SPMS (4/ 165) sowie 16,4% mit PPMS (27/ 165).

Die klinischen Charakteristika der Hauptvergleichskategorien zwischen MS- Patienten und gesunden Kontrollen sind nachfolgend zusammengefasst in der Tabelle zu finden, jeweils für die nicht- gematchte und gematchte Studienpopulation. Die demografischen Eigenschaften der RRMS- und CIS- Kohorte waren ähnlich im Bezug zum Alter bei Erstmanifestation und Probenentnahme, Geschlecht sowie Behinderungsgrad (EDSS). PPMS- und SPMS- Patienten wiesen ein höheres Alter bei Erstmanifestation und Probenentnahme auf, besaßen eine längere Erkrankungsdauer und einen höheren EDSS- Score und hatten einen höheren Anteil an männlichen Betroffenen.

3.1.1 Nicht- gematchte Studienpopulation

	Gesamt MS	CIS	RRMS	SPMS	PPMS	GK
Demographie	254	91	114	10	39	178
Geschlecht (Anteil Frauen)	154 (60,6%)	51 (56,0%)	83 (72,8%)	4 (40,0%)	16 (41,0%)	114 (64,0%)
Alter (MW[1] ± SD[2])	39,2 ± 11,7	36,1 ± 12,1	37,1 ± 8,8	51,3 ± 13,1	49,1 ± 11,1	38,1 ±12,7
Alter bei Erstmanifestation (MW ± SD)	34,9 ± 10,5	34,7 ± 11,3	34,0 ± 9,3	41,8 ± 11,8	39,1 ± 11,9	NA[3]
Erkrankungsdauer in Jahren (Median {25. -75. Perzentil})	1,0 (0,1- 3,8)	0,1 (0,1- 0,8)	1,7 (0,3- 4,8)	3,2 (2,1- 8,4)	3,9 (1,7- 16,7)	NA
Klinische Krankheitsaktivität						
Anzahl der Schübe (Median {25. -75. Perzentil})	2 (1-2)	1 (1-1)	2 (2-3)	5 (3-5)	NA	NA
EDSS[4] (Median	2,0	2,0	2,0	4,5	4,5	NA

[1] MW = Mittelwert

[2] SD = Standardabweichung

[3] NA = nicht zutreffend

[4] EDSS = (engl.) Expanded disability status scale, Behinderungsgrad

	Gesamt MS	CIS	RRMS	SPMS	PPMS	GK
{25. -75. Perzentil})	(1,5- 3,0)	(1,0- 2,0)	(1,5- 2,5)	(2,5- 6,5)	(3,0-7,0)	
Paraklinische Krankheitsaktivität						
Liquor						
Oligoklonale Banden (n in %)	100	100	100	100	100	0
IgG- Quotient (Liquor/Serum)[5] (MW± SD)	5,4 ± 3,6	5,1 ± 4,0	5,5 ± 3,2	5,0 ± 2,3	6,6 ± 3,4	2,6 ± 1,0
Gesamt IgG- Serum in mg/dl (MW± SD)	1103,5 ± 249,1	1146,7 ± 242,6	1088,0 ± 241,1	941,1 ± 299,3	1011,1 ± 249,8	NA
ANA- Status n (%)						
positiv	50 (19,7%)	18 (19,8%)	25 (21,9%)	2 (20,0%)	5 (12,8%)	NA
negativ	41 (16,1%)	25 (27,5%)	15 (13,2%)	1 (10,0%)	0 (0%)	0
keine Angabe	163 (64,2%)	48 (52,7%)	74 (65,0%)	7 (70,0%)	34 (87,2%)	178
Anzahl T2- Läsionen cMRT[6] n (%)						

[5] (x 10^{-3})

[6] cMRT = zerebrale Magnetresonanztomographie

	Gesamt MS	CIS	RRMS	SPMS	PPMS	GK
0	6 (2,4%)	3 (3,3%)	2 (1,8%)	0 (0%)	0 (2,4%)	NA
< 6	72 (28,3%)	37 (40,7%)	31 (27,2%)	0 (0%)	4 (10,3%)	NA
≥ 6	120 (47,2%)	33 (36,3%)	71 (62,3%)	6 (60,0%)	10 (25,6%)	NA
keine Angabe	56 (22,0%)	18 (19,8%)	10 (8,8%)	4 (40,0%)	24 (61,5%)	NA
Gd- Läsionen [7] im cMRT n (%)						
positiv	80 (31,5%)	28 (30,7%)	47 (41,2%)	3 (30,0%)	2 (5,1%)	NA
negativ	90 (35,4%)	35 (38,5%)	43 (37,7%)	3 (30,0%)	9 (23,1%)	NA
keine Angabe	84 (33,1%)	28 (30,8%)	24 (21,1%)	4 (40,0%)	28 (71,8%)	NA
Anzahl T2- Läsionen sMRT[8] n (%)						
0	25 (9,8%)	11 (12,1%)	11 (9,6%)	0 (0%)	3 (7,7%)	NA
< 3	65	19	40	3	3	NA

[7] Gd-Läsionen= Gadolineum (Kontrastmittel)- aufnehmende Läsionen im MRT

[8] sMRT= spinale Magnetresonanztomographie

	Gesamt MS	**CIS**	**RRMS**	**SPMS**	**PPMS**	**GK**
	(25,6%)	(20,9%)	(35,1%)	(30,0%)	(7,7%)	
≥ 3	34 (13,4%)	7 (7,7%)	18 (15,8%)	1 (10,0%)	8 (20,5%)	NA
keine Angabe	130 (51,2%)	54 (59,3%)	45 (39,5%)	6 (60,0%)	25 (64,1%)	NA
Gd- Läsionen im sMRT n (%)						
positiv	34 (13,4%)	8 (8,8%)	24 (21,1%)	0 (0%)	2 (5,1%)	NA
negativ	85 (33,5%)	27 (29,7%)	43 (37,7%)	4 (40,0%)	11 (28,2%)	NA
keine Angabe	135 (53,1%)	56 (61,5%)	47 (41,2%)	6 (60,0%)	26 (66,6%)	NA

	Gesamt MS	CIS	RRMS	SPMS	PPMS	GK
Therapie n (%)						
Basistherapie	26 (10,2%)	3 (3,3%)	22 (19,3%)	1 (10,0%)	0 (0%)	NA
Eskalationstherapie	9 (3,5%)	0 (0%)	1 (0,9%)	4 (40,0%)	10 (25,6%)	NA
unbehandelt	184 (72,4%)	84 (92,3%)	87 (76,3%)	5 (50%)	8 (20,5%)	NA
keine Angabe	29 (11,4%)	4 (4,4%)	4 (3,5%)	0 (0%)	21 (53,8%)	NA
Nikotinabusus n (%)						
ja	64 (25,2%)	24 (26,4%)	33 (28,9%)	2 (20,0%)	5 (12,8%)	23 (12,9%)
nein	125 (49,2%)	44 (48,4%)	64 (56,1%)	7 (70,0%)	10 (25,6%)	30 (16,9%)
keine Angabe	65 (25,6%)	23 (25,3%)	17 (14,9%)	1 (10,0%)	24 (61,5%)	125 (70,2%)

Tab. 1: Charakteristika der nicht- gematchten Studienpopulation

3.1.2 Gematchte Studienpopulation

	Gesamt MS	CIS	RRMS	SPMS	PPMS	GK
Demographie	165	61	73	4	27	165
Geschlecht (Anteil Frauen)	108 (65,5%)	39 (63,9%)	53 (72,6%)	2 (50%)	14 (51,9%)	108 (65,5%)
Alter (MW ± SD)	37,9 ± 11,9	34,7 ± 11,3	35,5 ± 9,4	47,3 ± 12,5	50,0 ± 11,2	37,9,0 ± 12,0
Alter bei Erstmanifestation (MW ± SD)	34,0 ± 10,1	32,8 ± 9,6	33,2 ± 9,9	38,2 ± 6,3	41,0 ± 11,4	NA
Erkrankungsdauer in Jahren (Median {25. -75. Perzentil})	1,0 (0,1- 3,4)	0,1 (0,1- 0,4)	1,6 (0,2- 3,8)	3,2 (3,1- 3,9)	3,8 (1,5- 13,2)	NA
Klinische Krankheitsaktivität						
Anzahl der Schübe (Median {25. -75. Perzentil})	2 (1- 2)	1 (1- 1)	2 (2- 3)	5 (5- 5)	NA	NA
EDSS (Median {25. -75. Perzentil})	2,0 (1,5- 3,0)	2,0 (1,0- 2,0)	2,0 (1,5- 2,5)	3,5 (2,5- 6,5)	5,0 (2,5- 7,0)	NA
Paraklinische Krankheitsaktivität						
Liquor						
Oligoklonale Banden (n in %)	100	100	100	100	100	0
Quotient IgG	5,3 ± 3,6	4,9 ± 4,1	5,3 ± 3,2	5,0 ± 0,8	6,7 ± 3,5	2,6 ± 1,0

	Gesamt MS	CIS	RRMS	SPMS	PPMS	GK
(Liquor/Serum) (MW± SD)						
Gesamt-IgG-Serum in mg/dl (MW ± SD)	1105,0 ± 257,5	1151,2 ± 243,2	1077,2 ± 270,7	1030,0 ± 285,0	1033,9 ± 250,9	NA
ANA-Status n (%)						
positiv	29 (17,6%)	10 (16,4%)	16 (21,9%)	0 (0%)	3 (11,1%)	0
negativ	29 (17,6%)	18 (29,5%)	10 (13,7%)	1 (25,0%)	0 (0%)	0
keine Angabe	107 (64,8%)	33 (54,1%)	47 (64,4%)	3 (75,0%)	25 (88,8%)	165
Anzahl T2- Läsionen cMRT n (%)						
0	3 (1,8%)	2 (3,3%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (3,7%)	NA
< 6	50 (30,3 %)	27 (44,3%)	19 (26,0%)	0 (0%)	4 (14,8%)	NA
≥ 6	74 (44,8%)	16 (26,2%)	47 (64,4%)	3 (75,0%)	8 (29,6%)	NA
keine Angabe	38 (23,0%)	16 (26,2%)	7 (9,6%)	1 (25,0%)	14 (51,9%)	NA
Gd- Läsionen im cMRT n (%)						
positiv	53 (32,1%)	20 (32,8%)	32 (43,8%)	0 (0%)	1 (3,7%)	NA
negativ	57 (34,5%)	18 (29,5%)	27 (37,0%)	3 (75%)	9 (33,3%)	NA

	Gesamt MS	CIS	RRMS	SPMS	PPMS	GK
keine Angabe	55 (33,3%)	23 (37,7%)	14 (19,2%)	1 (25%)	17 (63,0%)	NA
Anzahl T2- Läsionen sMRT n (%)						
0	19 (11,5%)	9 (5,5%)	7 (9,6%)	0 (0%)	3 (11,1%)	NA
< 3	44 (26,7%)	11 (18,0%)	29 (39,7%)	2 (50%)	2 (7,4%)	NA
≥ 3	23 (13,9%)	4 (6,6%)	10 (13,7%)	1 (25%)	8 (29,6%)	NA
keine Angabe	79 (47,9%)	37 (60,7%)	27 (37,0%)	1 (25%)	14 (51,9%)	NA
Gd- Läsionen im sMRT n (%)						
positiv	23 (13,9%)	6 (9,8%)	15 (20,5%)	0 (0%)	2 (7,4%)	NA
negativ	58 (35,2%)	16 (26,2%)	29 (39,7%)	3 (75%)	10 (37,0%)	NA
keine Angabe	84 (50,9%)	39 (63,9%)	29 (39,7%)	1 (25%)	15 (55,5%)	NA

	Gesamt MS	CIS	RRMS	SPMS	PPMS	GK
Therapie n (%)						
Basistherapie	17 (10,3%)	3 (4,9%)	15 (20,5%)	0 (0%)	0 (0%)	NA
Eskalationstherapie	13 (7,9%)	0 (0%)	1 (1,4%)	3 (75%)	8 (29,6%)	NA
unbehandelt	117 (70,9%)	54 (88,5%)	54 (74,0%)	1 (25%)	8 (29,6%)	NA
keine Angabe	18 (10,9%)	4 (6,6%)	3 (4,1%)	0 (0%)	11 (40,7%)	NA
Nikotinabusus n (%)						
ja	40 (24,2%)	13 (21,3%)	21 (28,8%)	1 (25%)	5 (18,5%)	23 (13,9%)
nein	82 (49,7%)	30 (49,2%)	42 (57,5%)	2 (50%)	8 (29,6%)	29 (17,6%)
keine Angabe	43 (26,0%)	18 (29,5%)	10 (13,7%)	1 (25%)	14 (51,9%)	113 (68,5%)

Tab. 2: Charakteristika der gematchten Studienpopulation

3.2 Seroprävalenz der *T. gondii* IgG- Antikörper

Mit Hilfe des zweiseitigen Fisher- und McNemar- Tests wurde analysiert, ob ein Unterschied in der Seroprävalenz von IgG- Antikörper gegen *T. gondii* von Patienten mit MS und gesunden Kontrollen vorliegt.

3.2.1 Analyse der nicht- gematchten Studienpopulation

Zunächst erfolgte die Analyse der nicht-gematchte Studienpopulation mit Hilfe des exakten Tests nach Fisher.

	MS	GK
Toxo-IgG positiv	95	83
%	37,4	46,6
Gesamt	254	178

Tab. 3: Seroprävalenzrate der *T. gondii* Antikörper vom IgG- Typ bei MS- Patienten und Kontrollen in der nicht-gematchten Studienpopulation

Dieser ergab keinen signifikanten Unterschied in der Seroprävalenzrate der *T. gondii* Antikörper vom IgG- Typ (p = 0,06).
Die Odds Ratio betrug 0,68 bei einem 95%- Konfidenzintervall von 0,463- 1,009.

3.2.2 Subgruppenanalyse der nicht- gematchten Studienpopulation

Die Subgruppenanalyse der nicht- gematchten Studienpopulation ergab, dass vor allem SPMS- Patienten die Tendenz zu einer höheren Seropositivität für *T. gondii* IgG-Antikörper aufwiesen als CIS-, RR- und PPMS- Patienten.
Es konnten jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen bezogen auf den Toxo-IgG- Serostatus nachgewiesen werden (p = 0,395; Chi-Square Test).

	Toxo-IgG- positiv (n/ Gesamt)	%
CIS	36/91	39,6
RRMS	43/114	38,6
SPMS	4/10	40,0
PPMS	15/39	38,5
GK	83/178	46,6

Tab. 4: Seroprävalenzrate für *T. gondii* Antikörper vom IgG- Typ in der Subgruppenanalyse der nicht- gematchten Studienpopulation

3.2.3 Analyse der gematchten Studienpopulation

Da das Alter als bekannter Risikofaktor für eine *T. gondii* Infektion gilt, wurde im Anschluß ein paarweises Matching für Alter (max. 3 Jahre Altersdifferenz) und Geschlecht durchgeführt. Hierdurch wurden strukturgleiche Gruppen zur Analyse

geschaffen, so dass die Validität der Ergebnisse angehoben und systematische Fehler (Selektionsbias) vermieden werden konnten.
In der gematchten Studienpopulation wiesen 33,3% der MS- Patienten im Gegensatz zu 47,9% der gesunden Kontrollen einen positiven Serostatus für *T. gondii* IgG-Antikörper auf.

	MS	GK
Toxo-IgG positiv	55	79
%	33,3	47,9
Gesamt	165	165

Tab. 5: Seroprävalenzrate der *T. gondii* Antikörper vom IgG- Typ bei MS- Patienten und Kontrollen in der gematchten Studienpopulation

Der Unterschied in der Seroprävalenz der IgG- Antikörper ist damit hochsignifikant (p = 0,009, Fishers- exakter Test) mit einer Odds Ratio von 0,54 bei einem 95% Konfidenzintervall von 0,349- 0,85.
Die weitere Analyse auf Unterschiede in der *T. gondii* Seroprävalenzrate der alters- und geschlechtsgematchten Studienpopulation erfolgte mit Hilfe des McNemar- Test. Der McNemar- Test wird bei gematchten bzw. verbundenen Stichproben als Häufigkeitstest angewandt und dient zum Vergleich eines Alternativmerkmals.
Die Fall-Kontroll-Paare (n= 165) wurden dabei auf Anwesenheit des Risikofaktors (anlehnend an die Hygienehypothese wurde ein negativer *T. gondii* IgG- Status als Risikofaktor gewertet) verglichen.
Dabei ergab sich, dass es 49 Paare gab, bei denen nur der MS- Patient, nicht aber der gematchte Kontrollproband, dem Risikofaktor ausgesetzt war (65,333%) im Gegensatz

zu 26 Paaren, in denen nur die Kontrollen und nicht der MS- Patient exponiert waren (34,667%).

Das heißt, dass fast doppelt so viele MS- Patienten (n= 49) einen negativen *T. gondii* IgG- Status im Vergleich zu alters- und geschlechtsgemachten Kontrollen (n= 26) aufwiesen.

Dies entspricht einem *p*- Wert von 0,011 und stellt somit ein signifikantes Ergebniss dar. Die Odds Ratio betrug 1,8 bei einem 95%- Konfidenzintervall von 1,15- 3,16.

	MS	**Kontrolle**
Toxo-IgG positiv	26/ 165	49/ 165
%	15,8	29,7
		p* = 0,011

Tab. 6: Ergebnisse des McNemar- Tests (Vergleich der Fall-Kontrollpaare auf Anwesenheit eines negativen *T. gondii* IgG- Status)

Somit kann die Nullhypothese aufgrund der Ergebnissen des Fisher- und des McNemar- Tests abgelehnt und die Alternativhypothese angenommen werden, die besagt, dass eine durchgemachte Toxoplasmoseinfektion, im Sinne der Hygienehypothese, ein protektiver Faktor für die Entwicklung der MS sein könnte.

3.3 Vergleich des Toxo- IgG- Titers zwischen den MS- Subgruppen

Die Analyse auf Unterschiede in der *T. gondii* IgG- Titerhöhe zwischen den einzelnen MS- Patienten im Vergleich zu den Kontrollen erfolgte mit Hilfe des Kruskal- Wallis-Test (Varianzanalyse für unabhängige Stichproben zum Vergleich mehrerer Gruppen), da die einzelnen IgG- Titer schief verteilt waren. Hierfür wurden die serologischen Ergebisse aller MS- Patienten berücksichtigt.

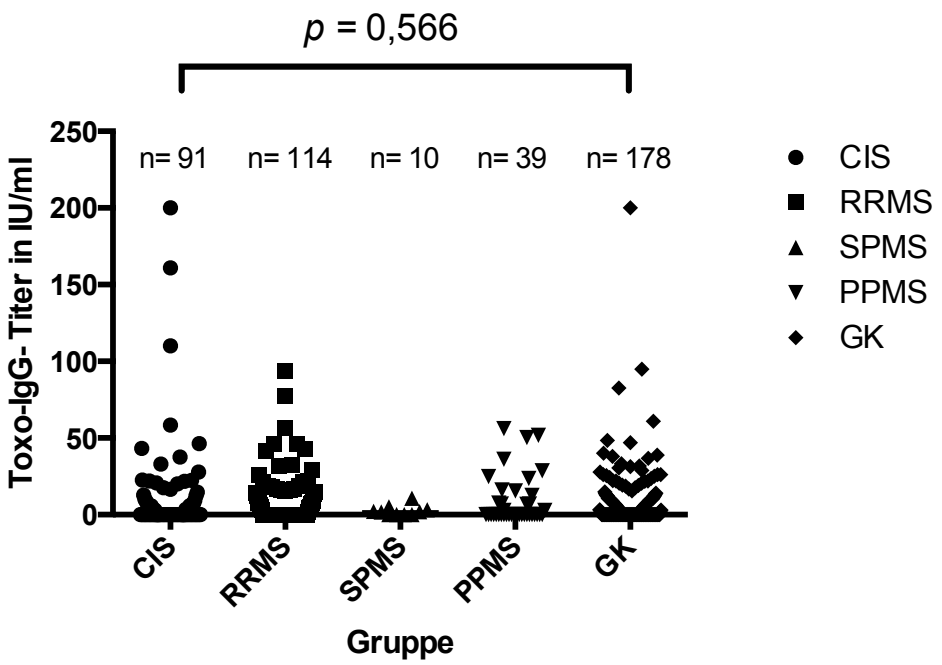

Abb. 4: Daten sind dargestellt mittels Scatterplot mit Angaben zum Median. Folgende Werte haben sich für die Mediane sowie das 25.- 75. Perzentil ergeben: CIS= 0 (0- 6,1); RRMS= 0 IU/ml (0- 6,1); SPMS: 1,9 IU/ml (0- 3,2); PPMS= 0 IU/ml (0- 12,7), GK= 0 (0- 11,3). Der *p*-Wert beträgt 0,566 und ist damit nicht statistisch signifikant.

Wie schon in der grafischen Darstellung mittels Scatterplot vermutet werden konnte, zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Höhe des Toxo-IgG- Titers zwischen den MS-Subgruppen und gesunden Kontrollen (Kruskal-Wallis Test, $p = 0{,}566$).
Anmerkend muss jedoch dazu gesagt werden, dass die Anzahl der SPMS- Patienten im Vergleich zu den anderen MS-Verlaufsformen, sehr klein war (n= 10).

3.4 Vergleich des Toxo- IgG- Titers mit der Gesamt IgG- Serumkonzentration von MS- Patienten

Um zu analysieren, ob ein erhöhter *T. gondii* IgG- Titer mit einer erhöhten Konzentration an Gesamt- Immunglobulin G im Serum korreliert sein könnte, wurden die jeweiligen Daten für die MS- Patienten in einem Streudiagramm zusammengefasst. Die Analyse der Daten mit Hilfe der linearen Regressionsanalyse und Berechnung des Korrelationskoeffizienten nach Spearman ergab einen negativen Zusammenhang zwischen der Höhe der Gesamt-IgG- Konzentration und der Höhe der *T. gondii* IgG-Antikörper mit r = -0,1647. Dies entspricht einem *p*- Wert von 0,027 und ist damit ein signifikantes Ergebniss.

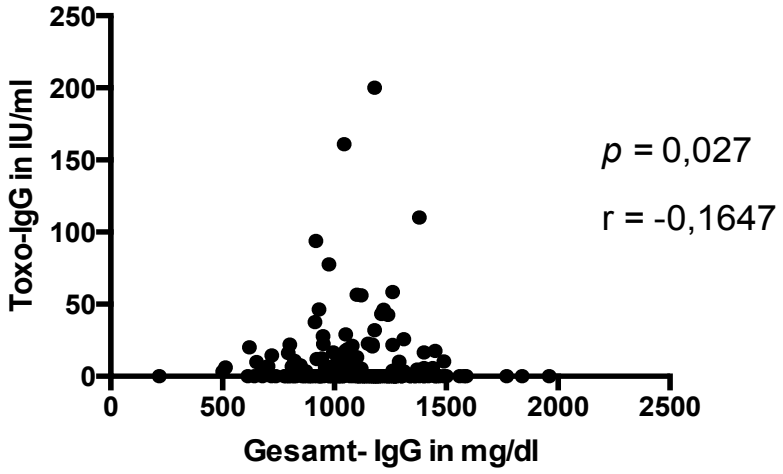

Abb. 5: Korrelation der Gesamt-IgG- Konzentration im Serum mit der Konzentration der *T. gondii* IgG- Antikörper; r = Korrelationskoeffizient nach Spearman

3.5 Korrelation der Toxo- IgG- Titers mit dem Lebensalter der Studienpopulation

Als gesicherter Risikofaktor für eine *T. gondii* Infektion zählt das Alter, wobei mit steigendem Lebensalter eine höhere Seroprävalenz vorliegt.

Das Alter scheint jedoch auch einen Einfluß auf die Höhe des IgG- Titers gegen *T. gondii* zu haben. Die Analyse der Daten mit Hilfe der linearen Regressionsanalyse deutet darauf hin, dass der IgG- Titer mit dem Alter der Studienpopulation ansteigt.

Der Korrelationskoeffizient nach Spearman beträgt r = 0,3312 bei einem 95% Konfidenzintervall von 0,2- 0,4. Dies entspricht einem *p*- Wert von < 0,0001 und ist damit ein hochsignifikantes Ergebniss.

Somit deutet die Korrelationsanalyse auf einen linearen Zusammenhang zwischen der Höhe des *T. gondii* IgG- Titers und dem Alter der Studienpopulation hin.

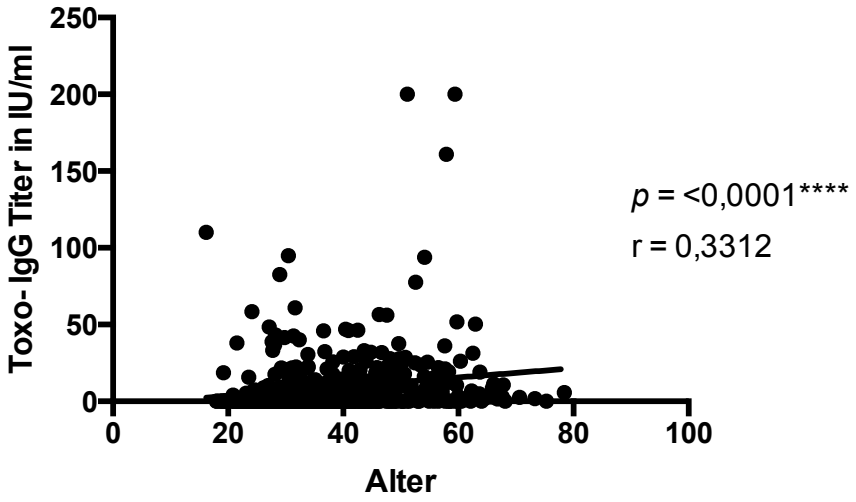

Abb. 6: Korrelation des *T. gondii* IgG- Antikörpertiters mit dem Alter der nicht-gematchten Studienpopulation; r = Korrelationskoeffizient nach Spearman

3.6 Korrelation der Toxo- IgG- Titers mit der Erkrankungsdauer und dem EDSS- Score

Um herauszufinden, ob ein Zusammenhang zwischen dem *T. gondii* IgG- Status sowie der Höhe des *T. gondii* IgG- Titers mit der Länge und Schwere der MS- Erkrankung besteht, wurde zum einen ein Matching zwischen Toxo-IgG positiven mit Toxo-IgG negativen MS- Patienten nach Alter (max. 3 Jahre Differenz), Erkrankungsdauer (max. 1 Jahr Differenz) und Geschlecht durchgeführt und zum anderen eine Korrelationsanalyse nach Spearman getätigt. Die Vermutung war, dass ein chronisch-entzündlicher und autoreaktiver Prozess die Immunantwort gegenüber *T. gondii* beeinflussen könnte.

3.6.1 Korrelation des Toxo- IgG- Titers mit der Erkrankungsdauer

Die Erkrankungsdauer der gesamten, nicht- gematchten MS- Patienten lag bei 1,0 Jahren (0,1- 3,8)[9], wobei naturgemäß CIS- Patienten die kürzeste (0,1 {0,1- 0,8}) und PPMS und SPMS- Patienten die längste Erkrankungsdauer aufwiesen (PPMS= 3,9 {1,7- 16,7}; SPMS= 3,2 {2,1- 8,4}).
Die grafische Darstellung der Daten erbrachte dabei die Tendenz einer inversen Korrelation, da die Patienten zu Beginn der Erkrankung höhere *T. gondii* IgG-Antikörpertiter aufwiesen als mit längerer Erkrankungsdauer. Nach Berechnung des Korrelationskoeffizienten nach Spearman bestätigte sich diese Tendenz jedoch nicht, so dass zwischen der Höhe des *T. gondii* IgG- Titers und der Erkrankungsdauer der MS- Patienten kein Zusammenhang besteht ($r = 0,12$, $p = 0,097$).

[9] Angabe zum Alter entspricht dem Median, 25.-75. Perzentil (siehe auch Tab. Charakterisierung Studienpopulation)

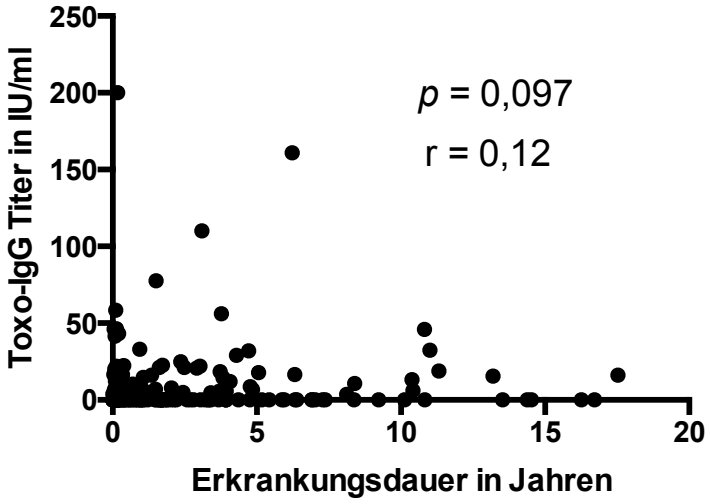

Abb. 7: Korrelation des *T. gondii* IgG- Antikörpertiters mit der Dauer der Erkrankung der nicht-gematchten MS- Patienten, r = Korrelationskoeffizient nach Spearman.

3.6.2 Korrelation des Toxo- IgG- Titers mit dem EDSS- Score

Der EDSS der nicht-gemachten MS-Population lag bei 2,0 (1,5- 3,0)[10], wobei in der Regel CIS- und RRMS- Patienten einen niedrigeren Behinderungsgrad aufwiesen als PPMS- und SPMS- Patienten (CIS= 2,0 {1,0- 2,0}; RRMS= 2,0 {1,5- 2,5}; SPMS= 4,5 {2,5- 6,5}; PPMS= 4,0 {3,0- 7,0}).
Die grafische Darstellung mittels Streudiagramm mit anschließender Korrelationsanalyse mit dem Spearman Korrelationskoeffizienten erbrachte keinen Zusammenhang zwischen der Höhe des Behinderungsgrads (EDSS) und dem IgG-Titer gegen *T. gondii* (r = - 0,0419, *p* = 0,709).

[10] Angabe zum EDSS entspricht dem Median, 25.- 75. Perzentil (siehe auch Tab. Charakterisierung Studienpopulation)

Die Analyse der gematchten MS- Patienten auf Unterschiede im EDSS- Score in Abhängigkeit von ihrem *T. gondii* IgG- Status erbrachte auch keinen signifikanten Unterschied (p = 0,71; Wilcoxon- Test).

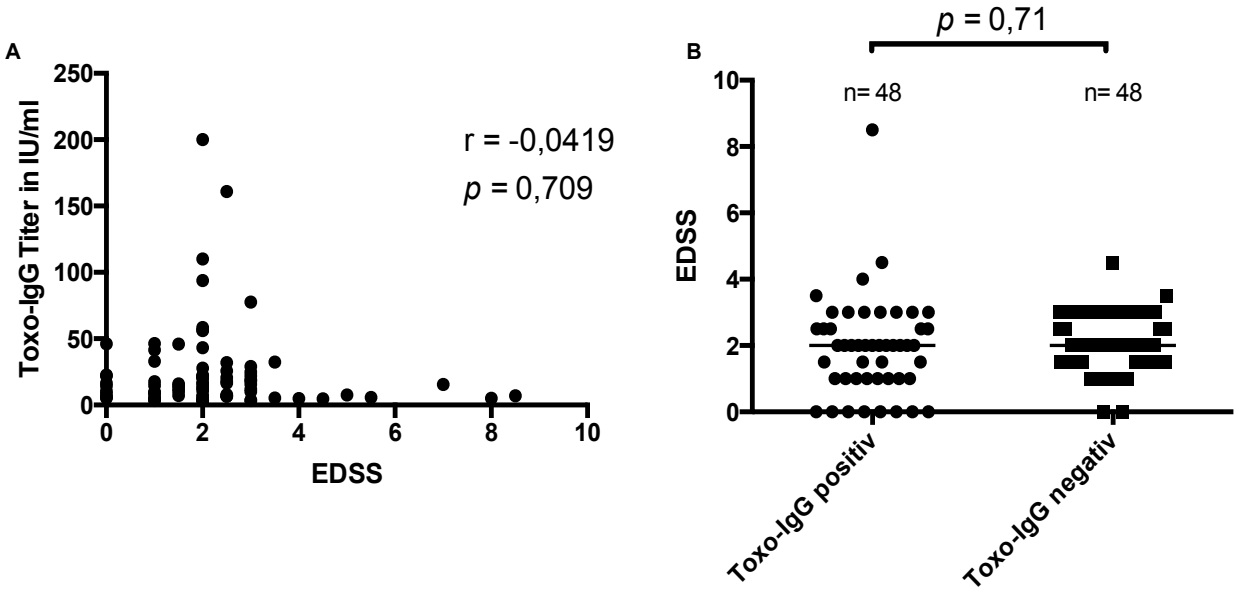

Abb. 8: (A) Korrelation des *T. gondii* IgG- Antikörpertiters mit dem EDSS der nicht-gematchten MS- Patienten, r = Korrelationskoeffizient nach Spearman. (B) Vergleich des EDSS- Scores der gematchten MS- Patienten in Abhängigkeit ihres *T. gondii* IgG- Status dargestellt als Scatter plot mit Angaben zum Median. Die Anzahl der Patienten in jeder Gruppe steht über dem Scatter plot.

3.7 Zusammenhang des Toxo- IgG- Titers mit der Läsionslast im MRT

In der klinischen Praxis wird oftmals die Anzahl der T2- sowie der kontrastmittelaufnehmenden Läsionen im zerebralen und spinalen MRT verwendet, um die Krankheitsaktivität der MS- Patienten evaluieren zu können.
Als Kontrastmittel wird dabei standardmäßig Gadolineum (Gd) verwendet. Eine hohe Läsionslast geht dabei meist mit einem aktiveren Krankheitsverlauf einher und kann daher u.a. als Indikation zur Therapieinitiierung bei CIS- Patienten dienen, wenn diese ≥ als 6 T2-Läsionen im cMRT aufweisen (Deutsche Multiple Sklerose Therapie Konsensusgruppe) (127). Diese klinische Relevanz berücksichtigend, wurde die Einteilung der Läsionslast folgendermaßen vorgenommen: zerebrale T2- Läsionen wurden eingeteilt in < 6 oder ≥ 6 Läsionen, spinale T2- Läsionen in 0, < 3 oder ≥ 3 und kontrastmittelanreichernde Läsionen in vorhanden (Gd+) oder nicht vorhanden (Gd-) (siehe Charakteristika der Studienpopulation).
Im Anschluss wurde zum einen untersucht, ob ein Zusammenhang zwischen der Höhe des *T. gondii* IgG- Titers mit der Anzahl der T2- und Gd- aufnehmenden Läsionen im cMRT und sMRT besteht und zum anderen, ob sich nach Alter, Geschlecht und Erkrankungsdauer gematchte MS- Patienten in Abhängigkeit ihres *T. gondii* IgG-Serostatus bezüglich ihrer Anzahl der T2- und Gd- aufnehmenden Läsionen im cMRT und sMRT unterscheiden.

3.7.1 Zusammenhang des Toxo-IgG- Titers mit der T2- und Gd-Läsionslast im cMRT

Mit Hilfe des Kruskal- Wallis-Tests wurde untersucht, ob ein Zusammenhang zwischen der Höhe des *T. gondii* IgG- Titers mit der Anzahl der T2- und kontrastmittelanreichernden (Gd+)- Läsionen im cMRT bei *T. gondii* positiven MS-Patienten besteht.
Die Analyse erfolgte mit der nicht- gematchten Studienpopulation, da diese mehr Patienten inkludiert. Patienten mit < 6 T2- Läsionen im cMRT (n= 36) wiesen tendenziell einen höheren, medianen *T. gondii* IgG- Titer von 18 IU/ml auf im Vergleich zu Patienten mit ≥ 6 T2- Läsionen im cMRT (n= 44) mit 12 IU/ml.

Dieser Unterschied erreichte jedoch keine statistische Signifikanz (*p* = 0,099) und bleibt somit nur eine tendenzielle Beobachtung (Abb. 9A).
Die Analyse der gematchten MS- Patienten erbrachte auch keine statistisch signifikanten Unterschiede in der Anzahl der T2- Läsionen, obwohl sich die Tendenz einer niedrigeren Läsionszahl bei positiven Toxo- IgG- Status auch hier beobachten ließ (Abb. 9B) (*p* = 0,395, Chi-Quadrat Test).

Als nächstes erfolgte der Vergleich von *T. gondii* positiven MS- Patienten mit (n = 28) und ohne (n = 42) Gd- anreichernden Läsionen im cMRT (Abb. 9C). Hier zeigte sich ein tendenziell erniedrigter *T. gondii* IgG- Titer bei Patienten mit Gd+- Läsionen (*p* = 0,692). Jedoch ergab die Analyse mit den gematchten MS- Patienten keinen statistisch signifikanten Unterschied (*p* = 0,341) (Abb. 9D).

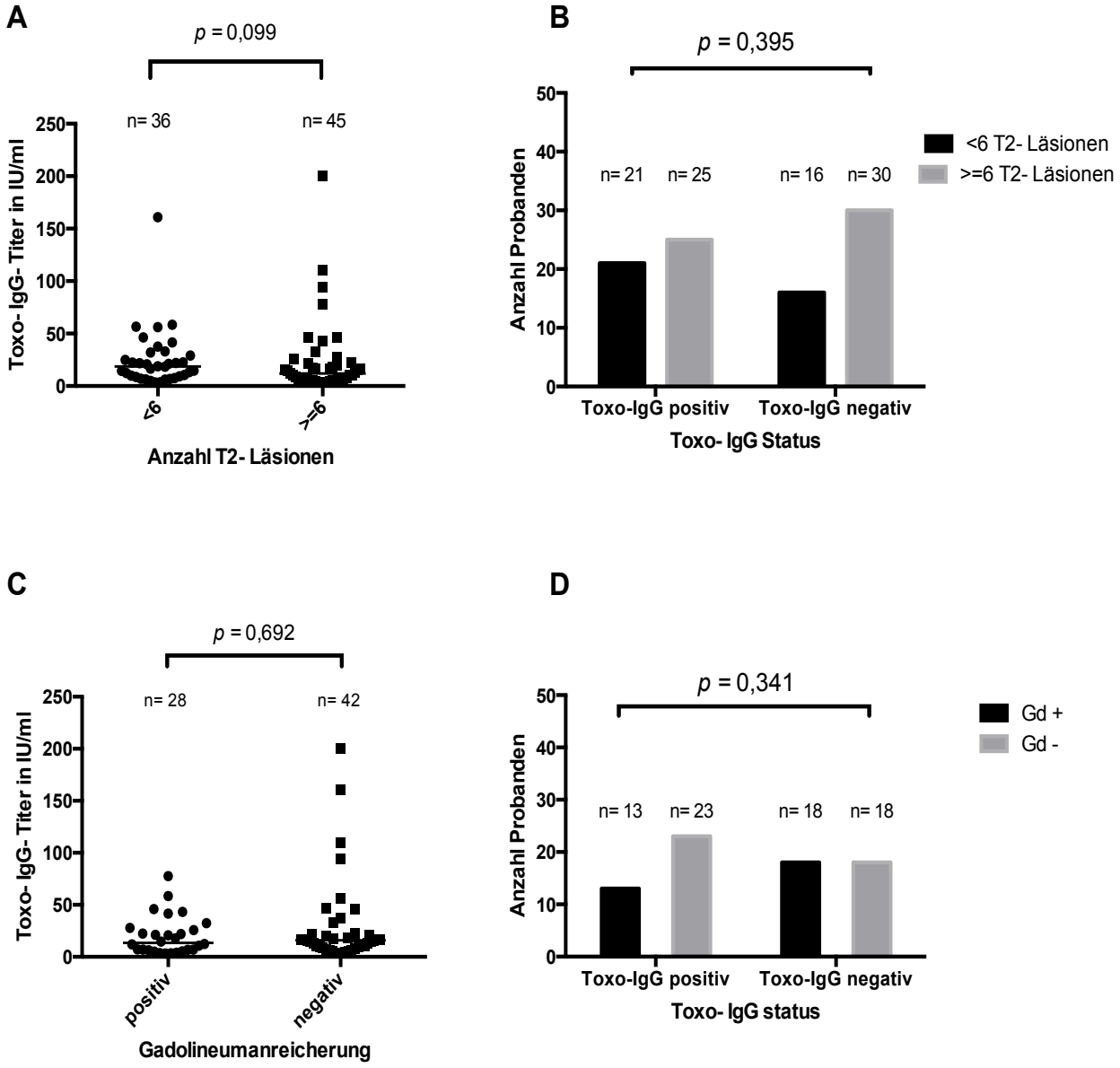

Abb. 9: *T. gondii* IgG- Titer und T2- (A) und Gd+- Läsionen (C) im cMRT sind dargestellt als Scatter plot, der Vergleich zwischen gematchten MS- Patienten mit positiven und negativen *T. gondii* IgG- Status (B, D) sind dargestellt als Balkendiagramm. Die Linie innerhalb des Scatter plots ist der Median. Die Anzahl der Patienten in der jeweiligen Gruppe befindet sich oberhalb des Scatter plots und Balkens.

3.7.2 Zusammenhang des Toxo-IgG- Titers mit der T2- und Gd-Läsionslast im sMRT

Mit Hilfe des Kruskal- Wallis- Test wurde untersucht, ob ein Zusammenhang zwischen der Höhe des *T. gondii* IgG- Titers und der Anzahl der T2- Läsionen im sMRT besteht. Daten bezüglich des sMRT lagen für 124 MS- Patienten vor, jedoch wiesen von diesen nur 53 Patienten einen positiven *T. gondii* IgG- Titer auf. Patienten mit keinen T2-Läsionen im sMRT (n= 9) besaßen den niedrigsten medianen IgG- Titer mit 13,2 IU/ml im Vergleich zu Patienten mit < 3 (n= 27) (18,5 IU/ml) oder ≥ 3 (n=17) (18,9 IU/ml) T2-Läsionen im sMRT. Jedoch erreichte der Unterschied weder in der nicht-gematchten (p = 0,844, Abb. 10A) noch in der gematchten MS-Gruppe (p = 0,433, Abb. 10B, Chi-Quadrat Test) einen signifikanten Unterschied und bleibt damit eine tendenzielle Beobachtung.

Als nächstes erfolgte der Vergleich von *T. gondii* positiven MS- Patienten mit (n= 16) und ohne (n= 34) Gd- anreichernden Läsionen im sMRT (Abb. 10C).
Der Vergleich der *T. gondii* IgG positiven Patienten mit (n= 16) und ohne (n= 34) Gd+-Läsionen zeigte auch keinen signifikanten Unterschied bezüglich dem *T. gondii* -Titer und Status zwischen den Gruppen (nicht-gematcht: p = 0,433, Abb. 10C) (gematcht p = 0,264, Abb. 10D, Chi- Quadrat Test).

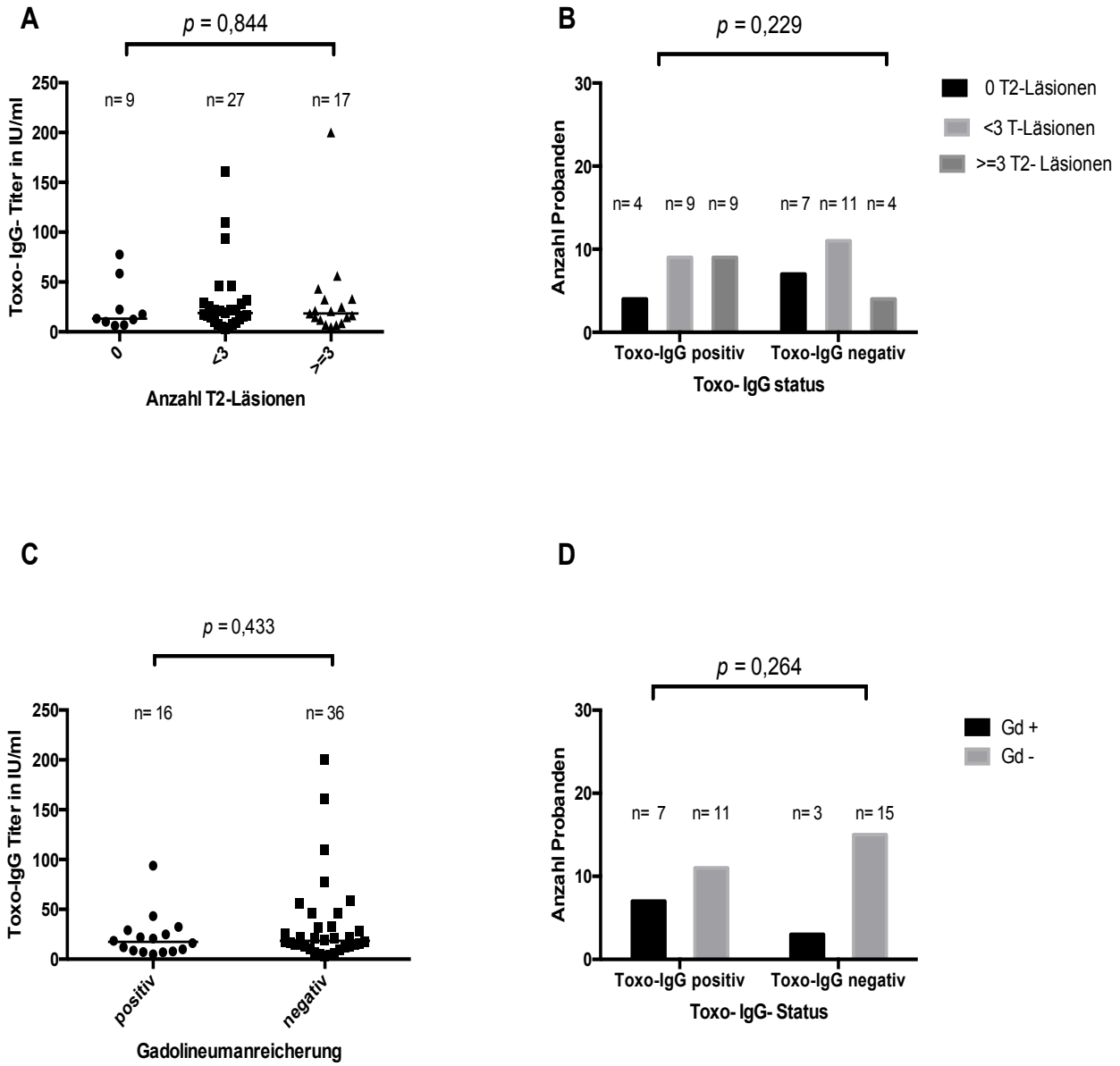

Abb. 10: *T. gondii*- IgG- Titer und T2 (A) und Gd+ Läsionen (C) im sMRT sind dargestellt als Scatter plot, der Vergleich zwischen gematchten MS- Patienten mit positiven und negativen *T. gondii*- IgG- Status (B, D) sind dargestellt als Balkendiagramm. Die Linie innerhalb des Scatter plots ist der Median. Die Anzahl der Patienten in der jeweiligen Gruppe befindet sich oberhalb des Scatter plots und Balkens.

3.8 Zusammenhang des Toxo- IgG- Titers mit dem Nikotinabusus der Studienpopulation

Da der Nikotinabusus als ein etablierter Risikofaktor für die Entwicklung der MS gilt, wurde dieser als klinischer Parameter erhoben, um zu analysieren, ob der Nikotinabusus einen Einfluß auf den *T. gondii* IgG- Serostatus von MS- Patienten spielen könnte bzw. die Immunantwort auf die Toxoplasmeninfektion beeinflusst.
Dies kann zum einen bedingt sein durch eine erhöhte Anfälligkeit für Infektionen, zum anderen aber auch durch Modulation der Immunantwort bei Kontakt mit Erregern.
Diese veränderte Immunantwort könnte durch die Bestimmung der *T. gondii*- IgG- Titerhöhe und dem Vergleich zu Nichtrauchern objektivierbar gemacht werden.

Zur Analyse des Einflusses des Nikotinabusus auf die Höhe des *T. gondii* IgG- Titers wurde der Mann-Whitney- Test für unverbundene Stichproben verwendet.

Dabei zeigte sich, dass Raucher (n= 87) einen signifikant höheren, medianen *T. gondii* IgG- Titer (6 IU/ml (0 -17,9) im Vergleich zu Nichtrauchern (n= 155) (0 IU/ml (0- 7,9) aufwiesen.
Der Unterschied in der Höhe des *T. gondii* IgG- Titers zwischen Rauchern und Nichtrauchern entspricht einem *p*- Wert von 0,018.
Raucher tendieren somit zu einer stärkeren humoralen Immunantwort gegen Parasiten wie *T. gondii* als Nichtraucher.

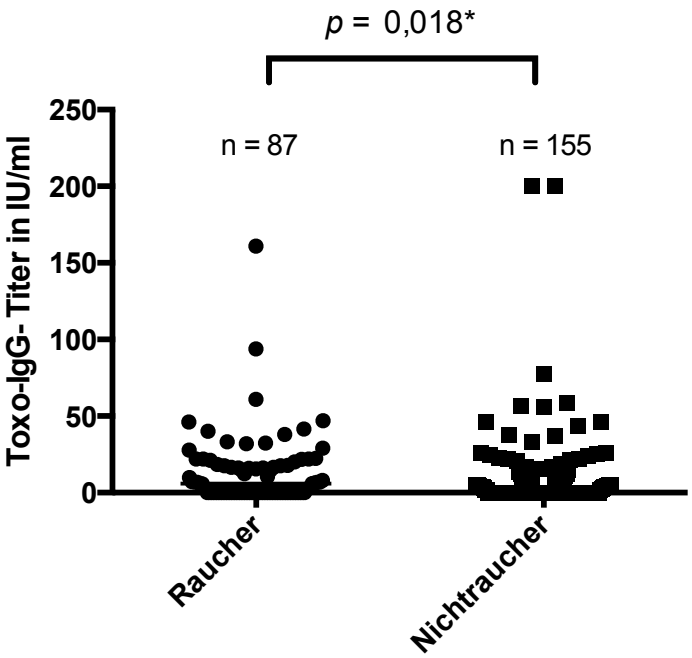

Abb. 11: *T. gondii*- IgG- Titer und Nikotinabusus dargstellt als Scatter plot. Die Linie innerhalb des Scatter plots entspricht dem Median. Die Anzahl der Patienten in der jeweiligen Gruppe befindet sich oberhalb des Scatter plots.

Die weitere Analyse der Raucher erbrachte, dass 73,6% der MS- Patienten Nikotinabusus betrieben (64/ 87). Bei den gesunden Kontrollen war im Gegensatz dazu der Anteil der Raucher wesentlich niedriger mit 26,4% (23/ 87).
Mit Hilfe des Fisher- exakt Tests wurde untersucht, ob sich die Prävalenz im Raucherstatus zwischen MS- Patienten und Kontrollen signifikant unterschied.
Dieser ergab mit einem *p*- Wert von 0,257 und damit ein nicht signifikantes Ergebniss. Jedoch muss einschränkend gesagt werden, dass aufgrund des retrospektiven Studiendesigns verhältnissmässig wenig Angaben zum Nikotinabusus bei den Kontrollen vorlagen (keine Angaben bei n= 125) im Gegensatz zu den MS- Patienten (n = 65). Dies könnte bedingt sein durch die unterschiedliche Anamneseführung, da Nikotinabusus als etablierter Risikofaktor für die Entwicklung der MS gilt.

3.9 Einfluß des Nikotinabusus von MS- Patienten auf die Prävalenz von antinukleären Antikörpern

Schon seit Längerem ist bekannt, dass antinukleäre Antikörper (ANA) nicht nur bei Patienten mit systemischen Lupus erythematosus detektiert werden können, sondern auch bei Patienten mit anderen Autoimmunerkrankungen wie MS (128), was als unspezifische Reaktion bzw. Ausdruck der fehlgesteuerten Immunantwort bei Autoimmunerkrankungen gewertet wird.

Um zu analysieren, ob die tendenziell verstärkte Immunantwort gegen Toxoplasmen bei rauchenden MS- Patienten als eine unspezifische Reaktion des autoreaktiven Immunsystems zu werten ist, wurde zusätzlich der ANA- Status der MS- Patienten erhoben und mit ihrem Nikotinabusus korreliert.

Dabei wiesen 32,6% der Raucher (15/ 46) im Vergleich zu 67,4% der Nichtraucher (31/ 46) einen positiven ANA-Status auf.

	ANA- positiv	%
Raucher	15	32,6
Nichtraucher	31	67,4
		p = 0,265

Tab. 7: Prävalenz von ANA-Antikörpern bei Nikotinabusus

Die Analyse mit dem Fisher-exakt-Test ergab einen *p*- Wert von 0,265 und damit ein nicht signifikantes Ergebniss. MS- Patienten, die rauchen, weisen somit nicht signifikant häufiger ANA auf als Nichtraucher.

Jedoch stellte sich die Frage, ob MS- Patienten, die einen positiven ANA- Status besaßen (n= 50), auch einen positiven *T. gondii* IgG- Status hatten.

Der Zusammenhang wurde mit Hilfe des Fisher- exakt Tests überprüft. Lediglich 44,4% der MS- Patienten (16/ 36) wiesen bei einem positiven *T. gondii*- IgG- Status auch

ANAs auf (p = 0,133). Es zeigte sich daher kein statistisch signifikanter Zusammenhang.

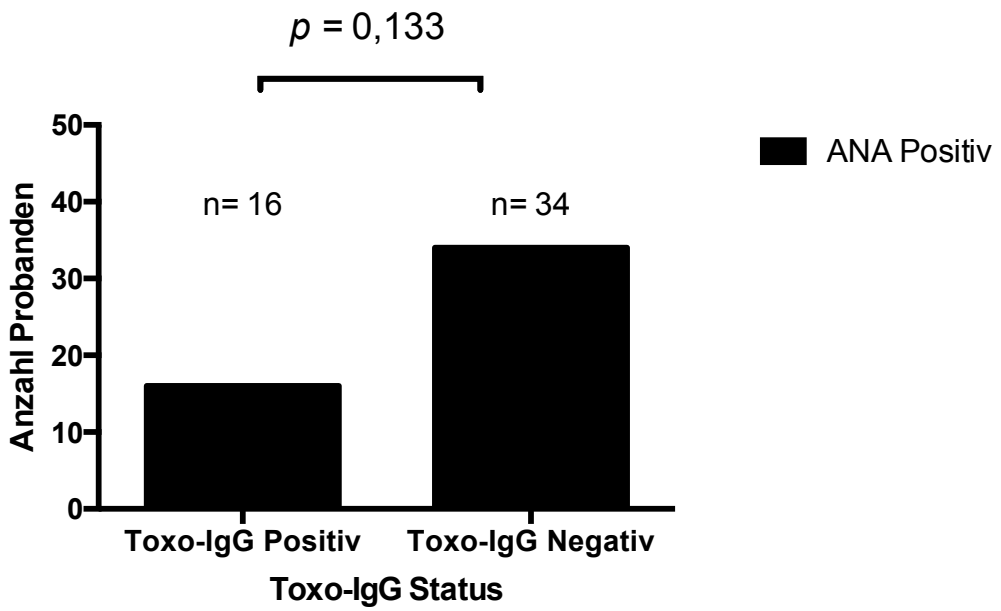

Abb. 12: Zusammenhang zwischen ANA- Status und Seropositivität für *T. gondii* bei MS-Patienten dargstellt als Balkendiagramm. Die Anzahl der Patienten in der jeweiligen Gruppe befindet sich oberhalb des Balkens.

Es kann daher vermutet werden, dass die verstärkte IgG-Antwort gegen Toxoplasmen bei rauchenden MS- Patienten nicht als unspezifische Aktivierung des Immunsystems gewertet werden muss.
Toxoplasmen, aber auch ein vorliegender Nikotinabusus, könnten im Gegenteil die Immunantwort stärker modulieren als bisher angenommen.

3.10 Zusammenhang der MS- Therapie mit dem *T. gondii*- Serostatus

Die Basis- und Eskalationstherapie für MS- Patienten führt zu einer Immunmodulation und -suppression und könnte somit die Art und Weise der Immunantwort auf intrazellulär lebende Parasiten wie *T. gondii* beeinflussen.

Deshalb wurde mit Hilfe des Chi- Quadrat- Test untersucht, ob die MS- Therapie einen Einfluß auf den Antikörperstatus und die IgG- Titerhöhe gegen *T. gondii* spielt und therapierte MS- Patienten beispielsweise häufiger an Toxoplasmose erkranken. Unbehandelte MS- Patienten (n= 184) waren im Durchschnitt 37,9 [11] ± 11,4 [12] Jahre alt und wiesen zu 37,0% einen positiven *T. gondii*- IgG- Antikörperstatus auf. MS- Patienten mit Basistherapeutika (n= 25) waren durchschnittlich 37,2 ± 8,1 Jahre alt und in 48,0% der Fälle *T. gondii* IgG positiv.

Patienten mit Eskalationstherapie (n= 16) waren im Vergleich zu den unbehandelten bzw. mit Basismedikation therapierten Patienten älter 41,6 ± 14,2 und wiesen in 31,3% der Fälle IgG- Antikörper gegen *T. gondii* auf. Jedoch sind die Fallzahlen der Patienten, die Basis- oder Eskalationstherapie erhielten, relativ klein, so dass die Validität der statistischen Angaben limitiert ist.

[11] MW= Mittelwert

[12] SD= Standardabweichung

Therapie	*T. gondii*- IgG positiv	%	*T. gondii*- IgG negativ	%
unbehandelt	68	37,0	116	63,0
Basistherapie	12	48,0	13	52,0
Eskalations-therapie	5	31,3	11	68,7

Tab. 8: Zusammenhang zwischen der MS- Therapieform und der Seroprävalenz für *T. gondii*- IgG Antikörper

Die Unterschiede in der Seropositivität für *T. gondii* in den einzelnen Therapiegruppen erreichte keine statistische Signifikanz (p = 0,483, Chi- Quadrat Test), so dass die MS-Therapie keinen Zusammenhang mit dem *T. gondii* Serostatus der Patienten aufweist und als Confounder ausgeschlossen werden kann.

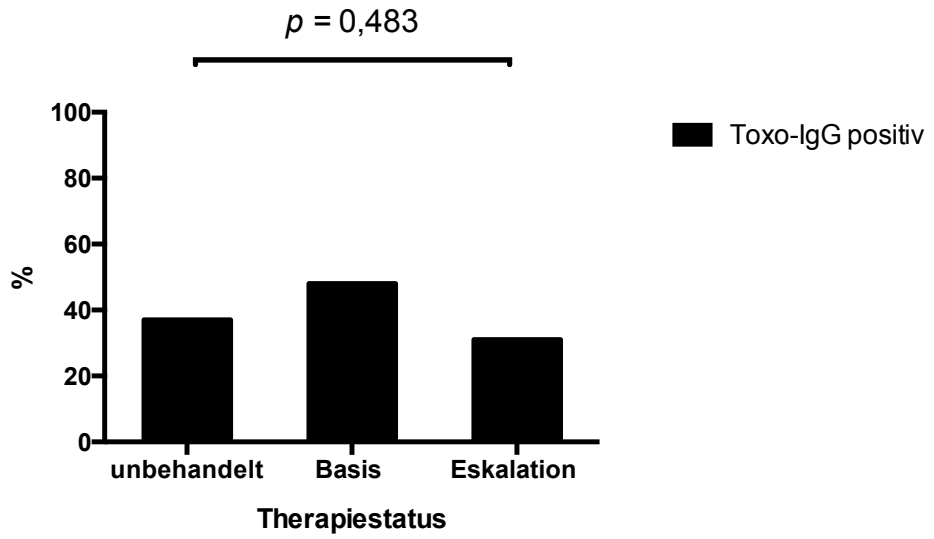

Abb. 13: Zusammenhang zwischen der MS- Therapieform und der Seroprävalenz für *T. gondii* IgG- Antikörper dargstellt als Balkendiagramm.

3.11 Seroprävalenz der *T. gondii* IgM-Antikörper

Mit Hilfe des zweiseitigen Chi-Square Tests wurde analysiert, ob ein Unterschied in der Seroprävalenz von IgM- Antikörpern gegen *T. gondii* von Patienten mit MS und gesunden Kontrollen vorliegt.

3.11.1 Analyse der nicht- gematchten Studienpopulation

Zunächst erfolgte die Analyse der nicht- gematchte Studienpopulation. *T. gondii* Antikörper vom IgM-Typ konnten dabei in 2,4% der MS- Patienten und 2,2 % der gesunden Kontrollen gefunden werden. Damit besteht kein signifikanter Unterschied zwischen der IgM-Seropositivität von MS- Patienten und gesunden Kontrollen für *T. gondii* (p = 0,923).

3.11.2 Analyse der gematchten Studienpopulation

In der gematchten Studienpopulation wiesen 2,9% (5/ 175) der MS- Patienten und 2,2% (4/ 178) der gesunden Kontrollen einen positiven IgM- Serostatus für *T. gondii* auf. Auch nach Durchführung des Matchings besteht kein signifikanter Unterschied in der IgM-Seropositivität für *T. gondii* von MS- Patienten und gesunden Kontrollen (p = 0,716).

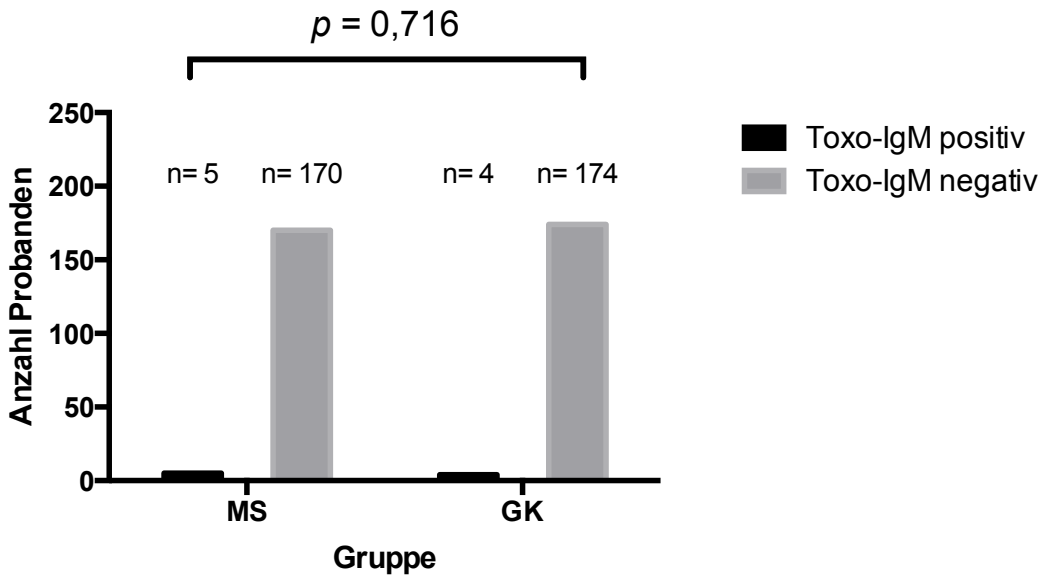

Abb. 14: Seroprävalenzrate der *T. gondii* Antikörper vom IgM-Typ bei MS- Patienten und Kontrollen in der gematchten Studienpopulation, dargstellt als Balkendiagramm. Die Anzahl der Patienten in der jeweiligen Gruppe befindet sich oberhalb des Balkens.

4 DISKUSSION

Die Assoziation zwischen parasitären Infektionen und MS bleibt, trotz einer wachsenden Evidenz für deren protektive Rolle wie u.a. für Helminthen beschrieben wurde, schwer nachzuvollziehen. In der aktuellen Literatur liegen nur spärlich Daten über die ätiologische Rolle des ubiquitär vorkommenden, intrazellulären Parasiten *T. gondii* für die Pathogenese und den Verlauf der MS vor. Die vorliegende Arbeit ist die Erste, die die Seroprävalenz von *T. gondii* IgG- Antikörper in einer großen, alters- und geschlechtsgematchten Fall- Kontroll- Studie bei MS- Patienten untersucht hat.

Aus einer großen Anzahl von MS- Patienten und alters- und geschlechtsgematchten, gesunden Kontrollen wurde die Prävalenz von *T. gondii* Antikörpern vom IgG- und IgM-Typ im Serum sowie die IgG- Titerhöhe ermittelt und des Weiteren die Ergebnisse im Anschluß mit klinischen und paraklinischen Parametern der MS- Patienten korreliert, um so ggf. neue Erkenntnisse für zukuntige Biomarker zu gewinnen.
Dabei wurde ein hochsignifikanter Unterschied in der Seroprävalenz der *T. gondii* IgG-Antikörper zwischen MS- Patienten (33,3%) und gesunden Kontrollen (47,9%) gefunden (p = 0,009), so dass sich vermuten lässt, dass aufgrund der negativen Assoziation eine durchgemachte Toxoplasmoseinfektion als ein protektiver Faktor für die Entwicklung der MS angesehen werden kann.
Die Seroprävalenzrate für die IgM- Antikörper zwischen MS- Patienten und gesunden Kontrollen wies keinen signifikanten Unterschied auf (2,9% vs. 2,2%; p = 0,716).
Es bestand außerdem kein Zusammenhang zwischen der MS-Therapie und der *T. gondii* Seropositivitätsrate, so dass der Therapiestatus als Confounder ausgeschlossen werden konnte (p = 0,483).

Dieses Ergebniss steht im Einklang mit den Resultaten von Pestehchian et. al, welcher auch die Seroprävalenzrate von *T. gondii* IgG- Antikörper bei MS- Patienten und Kontrollen untersucht hat. Jedoch fungierten in seiner Studie Familienangehörige als Kontrollgruppe, welche nicht nach Alter oder Geschlecht gematcht wurden, so dass seine Ergebnisse nicht mit denen der vorliegenden Studie verglichen werden können (129). Jedoch zeigte sich auch hier, dass MS- Patienten tendenziell eine niedrigere

Seroprävalenz im Vergleich zu den Kontrollen aufweisen (18 positive Patienten vs. 24 Familienangehörige; $p = 0{,}09$).
Auch die Resultate von Seroprävalenz- und Tierstudien, die die ätiologische Rolle von *T. gondii* bei Autoimmunerkrankungen wie systemischer Lupus Erythematodes (SLE) oder Diabetes mellitus Typ I untersucht haben, stehen im Einklang mit einer negativen Assoziation von Toxoplasmose zur jeweiligen Erkrankung.
So scheinen Patienten mit SLE zum einen eine ähnlich niedrige Seropositivität für IgG-Antikörper gegen *T. gondii* aufzuweisen, wie die MS- Patienten in dieser Studie (36% vs. 32,9%) (130).
Zum anderen konnte im experimentellen Tiermodell des SLE (F1 Maus- New Zealand Black /New Zealand White) eine mildere Nierenbeteiligung (weniger Proteinurie und Immunkomplexablagerungen) und längere Überlebenszeit nach Infektion mit *T. gondii* im Vergleich zu nichtinfizierten Artgenossen beobachtet werden (131). Diese Resultate deuten darauf hin, dass die Entwicklung von autoimmunologischen Lupussyndromen im Sinne einer Lupusnephritis durch die Infektion mit *T. gondii* in den F1-Mäusen verhindert werden kann.
Auch Patienten mit Diabetes mellitus Typ 1 weisen eine niedrigere Seroprävalenzrate für *T. gondii* IgG- Antikörper im Vergleich zu Verwandten ersten Grades und gesunden Kontrollen auf (5% vs. 24% und 40%) (126). Die niedrige Positivitätsrate der Patienten könnte durch ihr jüngeres Alter begründet sein, da der Typ-I Diabetes hauptsächlich eine Erkrankung des Kindes- und Jugendalter ist und junge Patienten in der Regel noch wenig Kontakt zu *T. gondii* und anderen Erregern hatten. Jedoch sprechen die Ergebniss auch dafür, dass Toxoplasmen kein auslösendes Agens für die Entwicklung des Diabetes mellitus Typ I darstellen.

Die protektive Rolle von *T. gondii* für die Ätiologie der MS könnte durch die Etablierung einer latenten Infektion in allen kernhaltigen, daher auch antigenpräsentierenden Zellen (APC), bedingt sein, die das Immunsystem nicht nur zur Produktion antiparasitärer Effektormoleküle zwingt, um die weitere intrazelluläre Replikation der Toxoplasmen zu unterbinden.
Die Infektion mit *T. gondii* führt auch zur Th1- Immunantwort (durch Ausschüttung von IL-12 von APC nach Erkennung von *T. gondii* durch TLR- 11 sowie Produktion von IFN-

γ durch CD8+- T- Zellen) und Herabregulation der MHC-II- Genexpression und Antigenpräsentation für CD4+-T- Lymphozyten in extrazerebralen APC im Mausmodell (114).
Lüders et al. berichteten außerdem, dass *T. gondii* in der Lage ist, die IFN-γ induzierte MHC-II- Expression in Astrozyten und Mikrogliazellen von Raten bereits auf Gentranskriptionsebene zu inhibieren (132). Dieser Mechanismus wäre besonders interessant, da angenommen wird, dass eine inadequate Antigenpräsentation im ZNS ein wichtiger pathophysiologischer Schritt in der Initiation der MS darstellt.
Des Weiteren sollte auch die evolutionäre Bedeutung von protozoischen Parasiten wie *T. gondii* und anderen, über die Nahrung übertragenen Infektionen wie Helminthen, auf die Entwicklung des menschlichen Immunsystems betrachtet werden, da diese Erreger fester Bestandteil der menschlichen Biota waren (101). Ihr Verschwinden in der entwickelten Welt und die breite Anwendung von Antibiotika könnte dazu beigetragen haben, dass Autoimmunerkrankungen in den Industrienationen zugenommen haben (94, 133).
So weist die weltweite Verbreitung der Toxoplasmose, bis auf wenige Ausnahmen, eine dichotome Beziehung zur Epidemiologie der MS auf, mit hohen Prävalenzraten in Entwicklungs- bzw. Schwellenländern (80% Brasilien (107), 100% Saudi-Arabien (134)) und niedrigen in Industrienationen (USA 22,5% (108), Island 9,8%, Schweden 23% (133)).
Die Seroprävalenz ist dabei neben dem Alter vor allem vom sozioökonomischen Status und hygienischen Verhältnissen vor Ort abhängig. So spielt der Verzehr von ungenügend gebratenem bzw. rohem Fleisch vorwiegend nur in den Industrienationen eine wichtige Rolle, da Menschen in den Entwicklungsländern seltener Fleisch bzw. eher Durchgebratenes verzehren. Die Klimabedingungen sowie die Trinkwasserversorgung der Bevölkerung spielen für die Entwicklungsländer eine größere Rolle, da hier die Hauptübertragung durch mit Oozysten kontaminiertes Wasser und Boden erfolgt (107, 111, 133).

Es existieren jedoch auch Seroprävalenzstudien für *T. gondii*, die eine höhere Seropositivität für IgG- Antikörper bei Autoimmunerkrankungen herausgefunden haben, wie beispielsweise bei der RA (63% vs. 36% bei Patienten mit SLE) (130), Hashimoto-

Thyreoditis/ Morbus Basedow (56,5% vs. 38,0% bei gesunden Kontrollen) (135) oder Wegener Granulomatose (65% vs. 40% bei gesunden Kontrollen) (136).
In der RA- Studie wurden jedoch Patienten mit SLE als Vergleichsgruppe verwendet und keine gesunden Kontrollen, so dass deren Aussagekraft limitiert ist. In der Studie zur Hashimoto-Thyreoditis/ Morbus Basedow erfolgte kein Matching der Kontrollen nach Alter und Geschlecht, so dass das Alter als möglicher Confounder für die Positivitätsrate von *T. gondii* IgG- Antikörpern bestehen bleibt und bei der Seroprävalenzstudie zum Morbus Wegener stammte das Patientenkollektiv aus Israel und nicht Europa, so dass deren Ergebnisse nicht vergleichbar bzw. vorsichtig interpretiert werden müssen, da sich die weltweite Verbreitung von *T. gondii* doch sehr unterscheidet.

Neben der Erhebung der *T. gondii* IgG und IgM-Antikörper erfolgte auch die Bestimmung des IgG- Titers sowie dessen Korrelation mit demografischen, klinischen und paraklinischen Parametern. Dabei ergaben sich drei wichtige Erkenntnisse: zum einen hängt die Seroprävalenzrate für *T. gondii* nicht nur vom Alter ab. Es fand sich ein linearer Zusammenhang in der linearen Regressionsanalyse zwischen der Höhe des *T. gondii* IgG- Titers und dem Lebensalter der Studienpopulation, so dass mit höherem Lebensalter sich nicht nur die Wahrscheinlichkeit erhöht, Kontakt mit *T. gondii* zu haben, sondern auch die humorale Immunantwort stärker zu sein scheint ($r = 0{,}3312$; $p = <0{,}0001$).
Die Titerhöhe gegen die Toxoplasmen steht jedoch nicht im linearen Zusammenhang mit der Gesamt-IgG- Konzentration im Serum, sondern weist eine negative Korrelation auf. Das heißt, dass die Höhe des Toxo-IgG- Titers bei einer sehr niedrigen bzw. sehr hohen Gesamt-IgG-Konzentration eher niedrig ausfällt, während sie bei einer normalen Gesamt-IgG-Konzentration (700- 1600 mg/dl) eher hoch ist.

Interessanterweise zeigte sich in der weiteren Analyse der MS- Subgruppen, dass SPMS- Patienten eine eher niedrige Gesamt-IgG- Konzentration im Serum aufweisen im Vergleich zu CIS-, RRMS- und PPMS- Patienten (941,1 ± 299,3 vs. 1146,7 ± 242,6, 1088,0 ± 241,1 bzw. 1011,1 ± 249,8)[13].
Leider existiert bis dato keine Literatur zu dieser Beobachtung. Man könnte aber annehmen, dass eine normale Gesamt-IgG- Konzentration wichtig für die Produktion eines ausreichend hohen bzw. schützenden Antikörpertiters ist.
Da vor allem SPMS- und PPMS- Patienten eine längere Erkrankungsdauer im Vergleich zu CIS- und RRMS- Patienten aufwiesen (3,2 bzw. 3,9 Jahre vs. 0,1 bzw. 1,7 Jahre)[14], lässt sich vermuten, dass eine längere Erkrankungsdauer einher geht mit einer schwächeren humoralen Immunantwort gegenüber *T. gondii*.

Ein besonderes Augenmerk wurde auf die Analyse des Zusammenhangs zwischen der Höhe des IgG- Titers gegen *T. gondii* und dessen Korrelation mit Parametern zur Krankheitsaktivität der MS- Patienten gelegt, da bis dato keine Biomarker im Serum von MS- Patienten bekannt sind, die eine Einschätzung des Krankheitsverlaufs und -schwere und somit der Prognose des einzelnen Patienten tätigen würden.
So haben es sich bereits zuvor viele klinische Studien zum Ziel gesetzt, Antikörpertiter mit Parametern der Krankheitsaktivität- und progression zu korrelieren. Dies wurde vor allem bei EBV, der als wichtigster infektiöser Risikofaktor für die Entwicklung der MS gilt, aber auch bei HHV- 6 und CMV durchgeführt (137-140).
In dieser Studie fand sich die Tendenz, dass ein hoher IgG- Titer gegen *T. gondii* einher geht mit einer kürzeren Erkrankungsdauer, niedrigerem EDSS- Score, weniger T2- und kontrastmittelaufnehmenden Läsionen im cMRT und kontrastmittelaufnehmenden Läsionen im sMRT. Die Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen sowie den nach

[13] Berechnung zur Gesamt-IgG-Konzentration im Serum entspricht dem Mittelwert ± Standardabweichung

[14] Berechnung der Erkrankungsdauer entspricht dem Median

Alter, Geschlecht und Erkrankungsdauer gematchten MS- Patienten waren jedoch nicht statistisch signifikant.
Dies könnte zum einem an der relativ kleinen Studienpopulation liegen (vor allem sehr wenige SPMS- Patienten mit n= 10), zum anderem aber auch an dem relativ inhomogenen Patientenkollektiv und Studiendesign, da die Datenerhebung der klinischen und paraklinischen Parametern retrospektiv erfolgte und somit keine standardisierten Labor- bzw. MRT- Verfahren angewendet werden konnten.
Dies spricht jedoch auch für die Ergebnisse, denn wenn die Tendenz des Zusammenhangs zwischen der *T. gondii* IgG- Titerhöhe und Krankheitsschwere bereits im klinischen Setting besteht, könnte dieser Effekt in einer prospektiv angelegten und randomisiert- kontrollierten Studie wesentlich größer bzw. signifikanter ausfallen.
Somit könnte die Bestimmung des *T. gondii*- Serostatus von MS- Patienten, falls die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit in weiteren Studien repliziert werden können, einen Biomarker zur Einschätzung der bisherigen parasitären Belastung des Immunsystems darstellen und somit zum anderen zur Risikostratifizierung dienen, falls sich die Tendenz bestätigen lassen sollte, dass ein hoher *T. gondii* IgG- Antikörpertiter mit einem milderen Krankheitsverlauf einher geht.
Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit unterstreichen jedoch, dass parasitäre Infektionen möglicherweise einen größeren Einfluß auf die Pathogenese und den Verlauf von Autoimmunerkrankungen haben, als bisher angenommen wurde und sprechen für deren weitere Erforschung.

Neben der Analyse auf einen Zusammenhang zwischen den Parametern zur Einschätzung der Krankheitsaktivität wurde auch der Nikotinabusus der MS- Patienten und Kontrollen erhoben, da Rauchen als etablierter Risikofaktor für die Entwicklung der MS gilt (19) und die Anfälligkeit und Immunantwort gegenüber einer Infektion mit *T. gondii* beeinflussen könnte.
So war ein weiteres und unerwartetes Ergebnis dieser Studie, dass offensichtlich ein Zusammenhang zwischen dem Nikotinabusus der Studienpopulation und der Höhe des IgG- Titers gegen *T. gondii* besteht, wobei Raucher einen höheren Titer als Nichtraucher aufwiesen (p = 0,018).

Die Weitere Analyse der Raucher erbrachte, dass diese zu 73,6% MS- Patienten waren, so dass sich die Frage stellte, ob die höhere Titerentwicklung gegen *T. gondii* bei rauchenden MS- Patienten als unspezifische Reaktion des fehlgesteuerten, autoreaktiven Immunsystems gewertet werden muss oder ob der erhöhte IgG- Titer Ausdruck einer erhöhten Anfälligkeit und Reagibilität des Immunsystems gegenüber (parasitären) Infektionen sein könnte.

Um diese Vermutung zu überprüfen, wurde zusätzlich der ANA- Status der MS- Patienten erhoben und auf den Zusammenhang mit ihrem Nikotinabusus untersucht.

ANA scheinen dabei in der frühen Phase der MS- Erkrankung durch das humorale Immunsystem synthetisiert zu werden, da ein positiver ANA- Status einhergeht mit einem kürzeren Krankheitsverlauf und niedrigerem EDSS- Score (128). Es wird vermutet, dass die Anwesenheit von ANA Ausdruck der Exposition gegenüber körpereigenen Antigenen während der Oligodendrozytenapoptose in den MS- Läsionen ist, die bereits in der Frühphase der Erkrankung stattfindet (29).

Die Analyse des ANA- Status der MS- Patienten ergab, dass rauchende MS- Patienten eher einen negativen als positiven ANA- Status aufwiesen, was jedoch keine statistische Signifikanz erreichte (54,5 % vs. 45,5 %; p = 0,265). Dieses Ergebnis könnte somit gegen die Vermutung sprechen, dass die höhere Titerentwicklung bei Rauchern gegen *T. gondii* eine unspezifische Reaktion durch das fehlgesteuerte Immunsystem darstellt.

Des Weiteren wurde untersucht, ob MS- Patienten, die einen positiven IgG- Status gegen *T. gondii* besitzen, gleichzeitig auch einen positiven ANA- Status aufweisen.

Auch hier zeigte sich kein statistisch signifikanter Zusammenhang (44,4% ANA positiv vs. 55,5% ANA negativ; p = 0,133).

Somit könnte geschlussfolgert werden, dass rauchende MS- Patienten mit einer stärkeren humoralen Antwort gegenüber einer *T. gondii* und ggf. auch anderen parasitären Infektionen reagieren, als MS- Patienten, die keinen Nikotinabusus betreiben.

Experimentelle oder empirische Daten, die sich mit den potentiellen biologischen Mechanismen der Interaktion zwischen Infektion und Rauchen konzentrieren, sind spärlich.

Es existieren jedoch Studien bezüglich des Zusammenhangs zwischen der Höhe der anti- EBNA-1-Antikörper, die bei Kontakt mit EBV gebildet werden, und dem Raucherstatus der MS- Patienten. Diese kamen jedoch zu widersprüchlichen Ergebnissen: Simon et.al. fand eine Interaktion zwischen EBNA-1-IgG- Antikörpern und dem Raucherstatus, wobei diese höhere Titer aufwiesen als Nichtraucher (141), wohingegen Sundqvist et.al. diese Ergebnisse nicht replizieren konnte (142). Die Diskrepanz könnte jedoch durch die unterschiedlichen Studiendesigns begründet sein.
Die Plausibilität einer Interaktion zwischen Rauchen und *T. gondii* könnte durch die Gemeinsamkeiten bezüglich der Folgen der Exposition begründet werden.
Zum einen weisen Raucher eine erhöhte Anfälligkeit für Infektionen auf, die durch strukturelle und immunologische Veränderungen begründet sind (143). So beeinflusst das Rauchen sowohl die zelluläre- als auch die humorale Immunantwort: neben einer unspezifischen Erhöhung aller Leukozyten weisen Raucher, die leichten Nikotinabusus betreiben (weniger als 50 pack year's) eine erhöhte Anzahl an CD4+-T- Lymphozyten auf, die die B- Zellproliferation, Differenzierung und Immunglobulinsynthese fördern (144). Starke Raucher (≥ 50 pack year's) weisen hingegen eine erhöhte CD8+- und erniedrigte CD4+-T- Lymphozytenzahl auf, die zu einer erhöhten Infektanfälligkeit führen könnte (145).
Zwar wurden die pack year's nicht im Raucherstatus der Studienpopulation erhoben.
Man könnte jedoch vermuten, dass leichte Raucher auf die *T. gondii* Infektion mit einer verstärkten humoralen Antwort reagiert haben. Zukünftige Studien sollten diese Beobachtung näher analysieren.

Die Ergebnisse dieser Studie sind limitiert durch die relativ kleine Anzahl der Studienpopulation (MS = 163, CIS = 91, gesunde Kontrollen= 178) sowie dem retrospektiven, monozentrischen Studiendesign, das keine standardisierte Datenerhebung erlaubte, sondern eher die Analyse klinischer Daten aus einer inhomogenen Studienpopulation darstellt.
Zudem war die SPMS- Patientenkohorte unterrepräsentiert (n= 10).
Des Weiteren wurde die Kontrollgruppe aus einem krankenhausbasierten Ansatz rekrutiert (Poliklinik für Neurologie sowie Rettungsstelle der Charité Mitte und Virchow-Klinikum) und ist damit nicht unbedingt repräsentativ für die Allgemeinbevölkerung.

Neben gesunden Probanden (n = 75) wurden auch Kontrollen mit nicht-inflammatorischen neurologischen Erkrankungen (n= 103) eingeschlossen, die jedoch keine organischen Auffälligkeiten aufwiesen.
Es wurde außerdem nicht der sozioökonomische Status und Bildungsgrad, Ernährungsgewohnheiten oder der Vitamin-D3- Status der Studienpopulation erhoben, die möglicherweise einen Einfluß auf die Seroprävalenzrate für *T. gondii* spielen könnten.
Durch das retrospektive Studiendesign erhält man zudem nur eine Momentaufnahme, in dem Sinne, dass bereits alle Patienten mit MS (nach den McDonald- Kriterien) diagnostiziert worden sind und nicht gesagt werden kann, zu welchen Zeitpunkt die Infektion mit *T. gondii* stattgefunden hat bzw. auch keine Aussage über die Veränderung des IgG- Titers über einen gewissen Zeitraum getätigt werden kann.
Die Ergebnisse aus den Seroprävalenzstudien bei SLE und Diabetes mellitus Typ I sprechen jedoch auch dafür, dass die Infektion mit *T. gondii* einen protektiven Faktor für die Entwicklung der MS darstellt.
Des Weiteren bleiben die IgG- Antikörper gegen die Toxoplasmen meist ein Leben lang im Serum nachweisbar (119).

Zukünftige Studien könnten die oben aufgeführten Punkte berücksichtigen und die Antikörper zum einen prospektiv bestimmen, so dass Daten zur IgG- Titerhöhe zu unterschiedlichen Zeitpunkten (z. B. im Schub und Remission) vorliegen, um sie im Zusammenhang mit der Krankheitsaktivität stelllen zu können (Korrelation mit klinischen und paraklinischen Parametern); und zum anderen sollte der sozioökonomische Status sowie Ernährungsgewohnheiten und Bildungsgrad in weiteren Analysen mitberücksichtigt werden.
Des Weiteren sollte der Einfluß des Nikotinabusus auf die humorale Antwort bei Patienten mit Autoimmunerkrankungen und ggf. parasitären Infektionen in zukünftigen Studien eingehender erforscht werden. In der vorliegenden Arbeit konnte aufgrund des Studiendesigns lediglich eine Gruppeneinteilung zwischen Nichtrauchern und Rauchern vorgenommen werden, die sowohl aktive als auch ehemalige Nikotinabusus-betreibende MS- Patienten inkludierte. Diese Einordnung erfolgte primär, da sowohl ein vergangener als auch ein aktueller Nikotinkonsum einen Risikofaktor für die

Entwicklung einer MS darstellt. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass Ex-Raucher eine andersartige Immunantwort gegenüber parasitären Erregern wie *T. gondii* aufweisen wie aktive Raucher.

Zukünftigen Studien sollten daher sowohl den genauen Zeitraum als auch die Menge (in pack years) des Nikotinabusus erheben und näher auf Zusammenhänge analysieren.

5 ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

Die Multiple Sklerose bleibt eine Erkrankung mit ungeklärter Ätiologie.
Jedoch bleibt der allgemeine Konsens, dass sowohl genetische, als auch Umwelt- und Lebensstilfaktoren eine wichtige Rolle in der Pathogenese der MS spielen und daher das beste Modell zur Erklärung der Ätiologie sind.
Die vorliegende Arbeit hat es sich zum Ziel gesetzt, einen wichtigen Beitrag in der Erforschung infektiöser Umweltfaktoren zu leisten, indem sie untersucht hat, welche Rolle *T. gondii*, ein ubiquitär vorkommendes, intrazellulär und parasitär lebendes Protozoon, für die Pathogenese und den Verlauf der MS spielt.

Der Erforschung parasitärer Infektionen kommt eine besondere Rolle zu, da sie ein Erklärungsansatz für die weltweite Verbreitung der MS und anderer Autoimmunerkrankungen darstellt und auch die steigende Inzidenz und Prävalenz der MS erklären könnte.
Parasiten bewirken dabei eine Reihe von immunmodulatorischen Prozessen im Immunsystem des Menschen und gehören seit Jahrtausenden zur humanen Biota. Da in Zeiten hohen hygienischer Standards in den Industrienationen die Besiedelung mit parasitären Erregern stark abgenommen hat bzw. auch in den Schwellenländern durch immer besser werdende Lebensstandards abnehmen wird, kommt deren Erforschung eine herausragende Rolle zu, da die MS nach wie vor eine der Hauptursachen für erworbene Behinderung im jungen Erwachsenenalter darstellt und somit eine große sozioökonomische Auswirkung hat.

Diese Studie bestätigt die Hypothese, dass MS- Patienten eine niedrigere Seroprävalenz gegenüber *T. gondii* aufweisen als gesunde Kontrollen, so dass eine durchgemachte Infektion einen protektiven Faktor für die Entwicklung der MS darstellt.
Des Weiteren zeigt sich die Tendenz, dass ein hoher IgG- Titer auch protektiv für den Verlauf sein könnte, im Sinne einer milderen Krankheitsaktivität und kürzeren Erkrankungsdauer.

Auch kommt der Erhebung des Nikotinabusus der Patienten eine unerwartet wichtige Rolle zu, da Raucher eine höhere IgG-Antwort gegen *T. gondii* ausbilden als Nichtraucher und diese auch mehrheitlich MS- Patienten waren.

Es bedarf daher zukünftig weiterer Studien, vor allem mit prospektiven Design, die zum einen die vorliegenden Ergebnisse in einem größeren und homogeneren Patientenkollektiv bestätigen und zum anderen neue Impulse für die Etablierung von Biomarkern im Serum von MS- Patienten geben könnten, wenn sich bestätigt, dass hohe *T. gondii* IgG- Titer mit einem milderen Krankheitsverlauf (im Sinne eines niedrigeren EDSS- Scores und Läsionslast im MRT) einhergehen und somit ein Marker für die Prognose von Patienten darstellen könnte.

6. LITERATURVERZEICHNIS

1. Landtblom A-M, Fazio P, Fredrikson S, Granieri E. The first case history of multiple sclerosis: Augustus d'Esté (1794–1848). Neurol Sci. 2010;31(1):29-33.

2. Noseworthy JH, Lucchinetti C, Rodriguez M, Weinshenker BG. Multiple Sclerosis. N Engl J Med. 2000;343(13):938-52.

3. Milo R, Kahana E. Multiple sclerosis: Geoepidemiology, genetics and the environment. Autoimmunity reviews. 2010;9(5):A387-A94.

4. Pugliatti M, Sotgiu S, Rosati G. The worldwide prevalence of multiple sclerosis. Clin Neurol Neurosurg. 2002;104(3):182-91.

5. Sadovnick AD, Baird PA, Ward RH. Multiple sclerosis: updated risks for relatives. Am J Med Genet. 1988;29(3):533-41.

6. Willer CJ, Dyment DA, Risch NJ, Sadovnick AD, Ebers GC, Group TCCS. Twin concordance and sibling recurrence rates in multiple sclerosis. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2003;100(22):12877-82.

7. Terasaki PI, Park MS, Opelz G, Ting A. Multiple sclerosis and high incidence of a B lymphocyte antigen. Science. 1976;193(4259):1245-7.

8. Sawcer S, Hellenthal G, Pirinen M, Spencer CC, Patsopoulos NA, Moutsianas L, et al. Genetic risk and a primary role for cell-mediated immune mechanisms in multiple sclerosis. Nature. 2011;476(7359):214-9.

9. Hafler DA, Compston A, Sawcer S, Lander ES, Daly MJ, De Jager PL, et al. Risk alleles for multiple sclerosis identified by a genomewide study. N Engl J Med. 2007;357(9):851-62.

10. Compston A, Coles A. Multiple sclerosis. Lancet. 2008;372:1502 - 17.

11. Elian M, Nightingale S, Dean G. Multiple sclerosis among United Kingdom-born children of immigrants from the Indian subcontinent, Africa and the West Indies. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 1990;53(10):906-11.

12. Alter M, Leibowitz U, Speer J. Risk of multiple sclerosis related to age at immigration to Israel. Arch Neurol. 1966;15(3):234-7.

13. Gale CR, Martyn CN. Migrant studies in multiple sclerosis. Prog Neurobiol. 1995;47(4–5):425-48.

14. Holick M. Vitamin D deficiency. N Engl J Med. 2007;357:266 - 81.

15. Munger K, Zhang S, O'Reilly E, Hernan M, Olek M, Willett W, et al. Vitamin D intake and incidence of multiple sclerosis. Neurology. 2004;62:60 - 5.

16. Ascherio A, Munger KL, Simon KC. Vitamin D and multiple sclerosis. The Lancet Neurology. 2010;9(6):599-612.

17. Munger K, Levin L, Hollis B, Howard N, Ascherio A. Serum 25-hydroxyvitamin D levels and risk of multiple sclerosis. JAMA. 2006;296:2832 - 8.

18. Ascherio A, Munger KL, Lunemann JD. The initiation and prevention of multiple sclerosis. Nat Rev Neurol. 2012;8(11):602-12.

19. Handel AE, Williamson AJ, Disanto G, Dobson R, Giovannoni G, Ramagopalan SV. Smoking and Multiple Sclerosis: An Updated Meta-Analysis. PLoS One. 2011;6(1):e16149.

20. Hernán MA, Jick SS, Logroscino G, Olek MJ, Ascherio A, Jick H. Cigarette smoking and the progression of multiple sclerosis. Brain. 2005;128(6):1461-5.

21. Healy BC, Ali EN, Guttmann CG, et al. SMoking and disease progression in multiple sclerosis. Arch Neurol. 2009;66(7):858-64.

22. Hedstrom AK, Hillert J, Olsson T, Alfredsson L. Smoking and multiple sclerosis susceptibility. Eur J Epidemiol. 2013;28(11):867-74.

23. Hedstrom AK, Baarnhielm M, Olsson T, Alfredsson L. Tobacco smoking, but not Swedish snuff use, increases the risk of multiple sclerosis. Neurology. 2009;73(9):696-701.

24. Sundstrom P, Nystrom L, Hallmans G. Smoke exposure increases the risk for multiple sclerosis. Eur J Neurol. 2008;15(6):579-83.

25. Smith KJ, Kapoor R, Felts PA. Demyelination: the role of reactive oxygen and nitrogen species. Brain Pathol. 1999;9(1):69-92.

26. Graham NM. The epidemiology of acute respiratory infections in children and adults: a global perspective. Epidemiol Rev. 1990;12:149-78.

27. Hemmer B, Nessler S, Zhou D, Kieseier B, Hartung HP. Immunopathogenesis and immunotherapy of multiple sclerosis. Nat Clin Pract Neurol. 2006;2(4):201-11.

28. Pittock SJ, Lucchinetti CF. The pathology of MS: new insights and potential clinical applications. Neurologist. 2007;13(2):45-56.

29. Barnett MH, Prineas JW. Relapsing and remitting multiple sclerosis: pathology of the newly forming lesion. Ann Neurol. 2004;55(4):458-68.

30. Dutta R, Trapp BD. Relapsing and progressive forms of multiple sclerosis: insights from pathology. Curr Opin Neurol. 2014;27(3):271-8.

31. McFarland H, Martin R. Multiple sclerosis: a complicated picture of autoimmunity. Nat Immunol. 2007;8:913 - 9.

32. Honce JM. Gray Matter Pathology in MS: Neuroimaging and Clinical Correlations. Multiple sclerosis international. 2013;2013:627870.

33. Saxena A, Martin-Blondel G, Mars LT, Liblau RS. Role of CD8 T cell subsets in the pathogenesis of multiple sclerosis. FEBS Lett. 2011;585(23):3758-63.

34. Tzartos JS, Friese MA, Craner MJ, Palace J, Newcombe J, Esiri MM, et al. Interleukin-17 production in central nervous system-infiltrating T cells and glial cells is associated with active disease in multiple sclerosis. Am J Pathol. 2008;172(1):146-55.

35. Hoffmann F, Meinl E. B cells in multiple sclerosis: good or bad guys?: An article for 28 May 2014 - World MS Day 2014. Eur J Immunol. 2014;44(5):1247-50.

36. Jarius S, Eichhorn P, Jacobi C, Wildemann B, Wick M, Voltz R. The intrathecal, polyspecific antiviral immune response: Specific for MS or a general marker of CNS autoimmunity? J Neurol Sci. 2009;280(1–2):98-100.

37. Haugen M, Frederiksen JL, Degn M. B cell follicle-like structures in multiple sclerosis-With focus on the role of B cell activating factor. J Neuroimmunol. 2014.

38. Cepok S, Rosche B, Grummel V, Vogel F, Zhou D, Sayn J, et al. Short-lived plasma blasts are the main B cell effector subset during the course of multiple sclerosis. Brain. 2005;128(Pt 7):1667-76.

39. He D, Guo R, Zhang F, Zhang C, Dong S, Zhou H. Rituximab for relapsing-remitting multiple sclerosis. The Cochrane database of systematic reviews. 2013;12:Cd009130.

40. Kappos L, Li D, Calabresi PA, O'Connor P, Bar-Or A, Barkhof F, et al. Ocrelizumab in relapsing-remitting multiple sclerosis: a phase 2, randomised, placebo-controlled, multicentre trial. Lancet. 2011;378(9805):1779-87.

41. Stadelmann C, Wegner C, Brück W. Inflammation, demyelination, and degeneration — Recent insights from MS pathology. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease. 2011;1812(2):275-82.

42. Dutta R, Trapp BD. Pathogenesis of axonal and neuronal damage in multiple sclerosis. Neurology. 2007;68(22 suppl 3):S22-S31.

43. Correale J. The role of microglial activation in disease progression. Mult Scler. 2014.

44. Rocca MA, Mezzapesa DM, Falini A, Ghezzi A, Martinelli V, Scotti G, et al. Evidence for axonal pathology and adaptive cortical reorganization in patients at presentation with clinically isolated syndromes suggestive of multiple sclerosis. Neuroimage. 2003;18(4):847-55.

45. Ebers GC. Environmental factors and multiple sclerosis. The Lancet Neurology. 2008;7(3):268-77.

46. Polman C, Reingold S, Banwell B, Clanet M, Cohen J, Filippi M, et al. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the McDonald criteria. Ann Neurol. 2011;69:292 - 302.

47. Lublin FD, Reingold SC, Cohen JA, Cutter GR, Sorensen PS, Thompson AJ, et al. Defining the clinical course of multiple sclerosis: The 2013 revisions. Neurology. 2014.

48. Compston A, Coles A. Multiple sclerosis. The Lancet. 2002;359(9313):1221-31.

49. Paparrigopoulos T, Ferentinos P, Kouzoupis A, Koutsis G, Papadimitriou GN. The neuropsychiatry of multiple sclerosis: focus on disorders of mood, affect and behaviour. International review of psychiatry (Abingdon, England). 2010;22(1):14-21.

50. Weinshenker BG. The natural history of multiple sclerosis. Neurol Clin. 1995;13(1):119-46.

51. 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.

52. Karussis D. The diagnosis of multiple sclerosis and the various related demyelinating syndromes: A critical review. J Autoimmun. 2014;48–49(0):134-42.

53. Swanton JK, Rovira A, Tintore M, Altmann DR, Barkhof F, Filippi M, et al. MRI criteria for multiple sclerosis in patients presenting with clinically isolated syndromes: a multicentre retrospective study. Lancet Neurol. 2007;6(8):677-86.

54. Poser CM, Paty DW, Scheinberg L, McDonald WI, Davis FA, Ebers GC, et al. New diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines for research protocols. Ann Neurol. 1983;13(3):227-31.

55. Awad A, Hemmer B, Hartung HP, Kieseier B, Bennett JL, Stuve O. Analyses of cerebrospinal fluid in the diagnosis and monitoring of multiple sclerosis. J Neuroimmunol. 2010;219(1-2):1-7.

56. Jarius S, Wildemann B. Aquaporin-4 Antibodies (NMO-IgG) as a Serological Marker of Neuromyelitis Optica: A Critical Review of the Literature. Brain Pathol. 2013;23(6):661-83.

57. Vosoughi R, Freedman MS. Therapy of MS. Clin Neurol Neurosurg. 2010;112(5):365-85.

58. Jones JL, Coles AJ. New treatment strategies in multiple sclerosis. Exp Neurol. 2010;225(1):34-9.

59. Paty DW, Li DK. Interferon beta-Ib is effective in relapsing-remitting multiple sclerosis. II. MRI analysis results of a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. 1993 [classical article]. Neurology. 2001;57(12 Suppl 5):S10-5.

60. Filippini G, Del Giovane C, Vacchi L, D'Amico R, Di Pietrantonj C, Beecher D, et al. Immunomodulators and immunosuppressants for multiple sclerosis: a network meta-analysis. The Cochrane database of systematic reviews. 2013;6:Cd008933.

61. La Mantia L, Munari LM, Lovati R. Glatiramer acetate for multiple sclerosis. The Cochrane database of systematic reviews. 2010(5):Cd004678.

62. Kappos L, Freedman MS, Polman CH, Edan G, Hartung HP, Miller DH, et al. Effect of early versus delayed interferon beta-1b treatment on disability after a first clinical event suggestive of multiple sclerosis: a 3-year follow-up analysis of the BENEFIT study. Lancet. 2007;370(9585):389-97.

63. Jacobs LD, Beck RW, Simon JH, Kinkel RP, Brownscheidle CM, Murray TJ, et al. Intramuscular interferon beta-1a therapy initiated during a first demyelinating event in multiple sclerosis. CHAMPS Study Group. N Engl J Med. 2000;343(13):898-904.

64. Cross AH, Naismith RT. Established and novel disease-modifying treatments in multiple sclerosis. J Intern Med. 2014;275(4):350-63.

65. He D, Xu Z, Dong S, Zhang H, Zhou H, Wang L, et al. Teriflunomide for multiple sclerosis. The Cochrane database of systematic reviews. 2012;12:Cd009882.

66. Confavreux C, O'Connor P, Comi G, Freedman MS, Miller AE, Olsson TP, et al. Oral teriflunomide for patients with relapsing multiple sclerosis (TOWER): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. Lancet Neurol. 2014;13(3):247-56.

67. Roll A, Reich K, Boer A. Use of fumaric acid esters in psoriasis. Indian J Dermatol Venereol Leprol. 2007;73(2):133-7.

68. Linker RA, Lee DH, Ryan S, van Dam AM, Conrad R, Bista P, et al. Fumaric acid esters exert neuroprotective effects in neuroinflammation via activation of the Nrf2 antioxidant pathway. Brain. 2011;134(Pt 3):678-92.

69. Kawalec P, Mikrut A, Wisniewska N, Pilc A. The effectiveness of dimethyl fumarate monotherapy in the treatment of relapsing-remitting multiple sclerosis: a systematic review and meta-analysis. Curr Neuropharmacol. 2014;12(3):256-68.

70. Hu Y, Turner MJ, Shields J, Gale MS, Hutto E, Roberts BL, et al. Investigation of the mechanism of action of alemtuzumab in a human CD52 transgenic mouse model. Immunology. 2009;128(2):260-70.

71. Coles AJ, Compston DA, Selmaj KW, Lake SL, Moran S, Margolin DH, et al. Alemtuzumab vs. interferon beta-1a in early multiple sclerosis. N Engl J Med. 2008;359(17):1786-801.

72. Pucci E, Giuliani G, Solari A, Simi S, Minozzi S, Di Pietrantonj C, et al. Natalizumab for relapsing remitting multiple sclerosis. The Cochrane database of systematic reviews. 2011(10):Cd007621.

73. Stuve O, Marra CM, Bar-Or A, Niino M, Cravens PD, Cepok S, et al. Altered CD4+/CD8+ T-cell ratios in cerebrospinal fluid of natalizumab-treated patients with multiple sclerosis. Arch Neurol. 2006;63(10):1383-7.

74. Massberg S, von Andrian UH. Fingolimod and Sphingosine-1-Phosphate — Modifiers of Lymphocyte Migration. N Engl J Med. 2006;355(11):1088-91.

75. Kappos L, Radue E-W, O'Connor P, Polman C, Hohlfeld R, Calabresi P, et al. A Placebo-Controlled Trial of Oral Fingolimod in Relapsing Multiple Sclerosis. N Engl J Med. 2010;362(5):387-401.

76. Wolinsky JS, Narayana PA, O'Connor P, Coyle PK, Ford C, Johnson K, et al. Glatiramer acetate in primary progressive multiple sclerosis: results of a multinational, multicenter, double-blind, placebo-controlled trial. Ann Neurol. 2007;61(1):14-24.

77. Martinelli Boneschi F, Vacchi L, Rovaris M, Capra R, Comi G. Mitoxantrone for multiple sclerosis. The Cochrane database of systematic reviews. 2013;5:Cd002127.

78. Ghalie RG, Edan G, Laurent M, Mauch E, Eisenman S, Hartung HP, et al. Cardiac adverse effects associated with mitoxantrone (Novantrone) therapy in patients with MS. Neurology. 2002;59(6):909-13.

79. Ghalie RG, Mauch E, Edan G, Hartung HP, Gonsette RE, Eisenmann S, et al. A study of therapy-related acute leukaemia after mitoxantrone therapy for multiple sclerosis. Mult Scler. 2002;8(5):441-5.

80. Larner AJ. Aetiological role of viruses in multiple sclerosis: a review. J R Soc Med. 1986;79(7):412-7.

81. Kakalacheva K, Münz C, Lünemann JD. Viral triggers of multiple sclerosis. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease. 2011;1812(2):132-40.

82. Kivity S, Agmon-Levin N, Blank M, Shoenfeld Y. Infections and autoimmunity – friends or foes? Trends Immunol. 2009;30(8):409-14.

83. Cunningham MW. Streptococcus-induced myocarditis in mice. Autoimmunity. 2001;34(3):193-7.

84. Yuki N. [Pathogenesis of axonal Guillain-Barre syndrome]. Rinsho Shinkeigaku. 2007;47(1):1-7.

85. Marrie RA. Environmental risk factors in multiple sclerosis aetiology. The Lancet Neurology. 2004;3(12):709-18.

86. Crawford DH, Macsween KF, Higgins CD, Thomas R, McAulay K, Williams H, et al. A Cohort Study among University Students: Identification of Risk Factors for Epstein-Barr Virus Seroconversion and Infectious Mononucleosis. Clin Infect Dis. 2006;43(3):276-82.

87. Thacker EL, Mirzaei F, Ascherio A. Infectious mononucleosis and risk for multiple sclerosis: A meta-analysis. Ann Neurol. 2006;59(3):499-503.

88. Ascherio A, Munger KL, Lennette ET, et al. Epstein-barr virus antibodies and risk of multiple sclerosis: A prospective study. JAMA. 2001;286(24):3083-8.

89. Ascherio A, Munger K. Environmental risk factors for multiple sclerosis. Part I: the role of infection. Ann Neurol. 2007;61:288 - 99.

90. Sanders VJ, Felisan S, Waddell A, Tourtellotte WW. Detection of herpesviridae in postmortem multiple sclerosis brain tissue and controls by polymerase chain reaction. J Neurovirol. 1996;2(4):249-58.

91. Nora-Krukle Z, Chapenko S, Logina I, Millers A, Platkajis A, Murovska M. Human herpesvirus 6 and 7 reactivation and disease activity in multiple sclerosis. Medicina (Kaunas). 2011;47(10):527-31.

92. Liedtke W, Malessa R, Faustmann PM, Eis-Hubinger AM. Human herpesvirus 6 polymerase chain reaction findings in human immunodeficiency virus associated neurological disease and multiple sclerosis. J Neurovirol. 1995;1(3-4):253-8.

93. Bagos PG, Nikolopoulos G, Ioannidis A. Chlamydia pneumoniae infection and the risk of multiple sclerosis: a meta-analysis. Mult Scler. 2006;12(4):397-411.

94. Bach J-F. The Effect of Infections on Susceptibility to Autoimmune and Allergic Diseases. N Engl J Med. 2002;347(12):911-20.

95. Correale J, Farez MF. The impact of environmental infections (parasites) on MS activity. Multiple Sclerosis Journal. 2011;17(10):1162-9.

96. Leibowitz U, Antonovsky A, Medalie JM, Smith HA, Halpern L, Alter M. Epidemiological study of multiple sclerosis in Israel. II. Multiple sclerosis and level of sanitation. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 1966;29(1):60-8.

97. Bach J-F. Infections and autoimmune diseases. J Autoimmun. 2005;25, Supplement(0):74-80.

98. Like AA, Guberski DL, Butler L. Influence of environmental viral agents on frequency and tempo of diabetes mellitus in BB/Wor rats. Diabetes. 1991;40(2):259-62.

99. Martins TC, Aguas AP. Mechanisms of Mycobacterium avium-induced resistance against insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM) in non-obese diabetic (NOD) mice: role of Fas and Th1 cells. Clin Exp Immunol. 1999;115(2):248-54.

100. Lee J, Reinke EK, Zozulya AL, Sandor M, Fabry Z. Mycobacterium bovis Bacille Calmette-Guérin Infection in the CNS Suppresses Experimental Autoimmune Encephalomyelitis and Th17 Responses in an IFN-γ-Independent Manner. The Journal of Immunology. 2008;181(9):6201-12.

101. Rook GA. Hygiene hypothesis and autoimmune diseases. Clin Rev Allergy Immunol. 2012;42(1):5-15.

102. Fleming JO, Cook TD. Multiple sclerosis and the hygiene hypothesis. Neurology. 2006;67(11):2085-6.

103. Sewell D, Qing Z, Reinke E, Elliot D, Weinstock J, Sandor M, et al. Immunomodulation of experimental autoimmune encephalomyelitis by helminth ova immunization. Int Immunol. 2003;15(1):59-69.

104. Correale J, Farez M. Association between parasite infection and immune responses in multiple sclerosis. Ann Neurol. 2007;61(2):97-108.

105. Ristori G, Buzzi MG, Sabatini U, Giugni E, Bastianello S, Viselli F, et al. Use of Bacille Calmette-Guerin (BCG) in multiple sclerosis. Neurology. 1999;53(7):1588-9.

106. Ristori G, Romano S, Cannoni S, Visconti A, Tinelli E, Mendozzi L, et al. Effects of Bacille Calmette-Guérin after the first demyelinating event in the CNS. Neurology. 2014;82(1):41-8.

107. Bahia-Oliveira LM, Jones JL, Azevedo-Silva J, Alves CC, Orefice F, Addiss DG. Highly endemic, waterborne toxoplasmosis in north Rio de Janeiro state, Brazil. Emerg Infect Dis. 2003;9(1):55-62.

108. Jones JL, Kruszon-Moran D, Wilson M, McQuillan G, Navin T, McAuley JB. Toxoplasma gondii Infection in the United States: Seroprevalence and Risk Factors. Am J Epidemiol. 2001;154(4):357-65.

109. Evengard B, Petersson K, Engman ML, Wiklund S, Ivarsson SA, Tear-Fahnehjelm K, et al. Low incidence of toxoplasma infection during pregnancy and in newborns in Sweden. Epidemiol Infect. 2001;127(1):121-7.

110. Petersen E. Toxoplasmosis. Seminars in Fetal and Neonatal Medicine. 2007;12(3):214-23.

111. Montoya JG, Liesenfeld O. Toxoplasmosis. Lancet. 2004;363(9425):1965-76.

112. Blader IJ, Saeij JP. Communication between Toxoplasma gondii and its host: impact on parasite growth, development, immune evasion, and virulence. APMIS. 2009;117(5-6):458-76.

113. Lang C, Algner M, Beinert N, Groß U, Lüder CGK. Diverse mechanisms employed by Toxoplasma gondii to inhibit IFN-γ-induced major histocompatibility complex class II gene expression. Microbes and Infection. 2006;8(8):1994-2005.

114. Yarovinsky F. Innate immunity to Toxoplasma gondii infection. Nat Rev Immunol. 2014;14(2):109-21.

115. Nash PB, Purner MB, Leon RP, Clarke P, Duke RC, Curiel TJ. Toxoplasma gondii-Infected Cells Are Resistant to Multiple Inducers of Apoptosis. The Journal of Immunology. 1998;160(4):1824-30.

116. Luft BJ, Hafner R, Korzun AH, Leport C, Antoniskis D, Bosler EM, et al. Toxoplasmic Encephalitis in Patients with the Acquired Immunodeficiency Syndrome. N Engl J Med. 1993;329(14):995-1000.

117. Gay-Andrieu F, Fricker-Hidalgo H, Sickinger E, Espern A, Brenier-Pinchart M-P, Braun H-B, et al. Comparative evaluation of the ARCHITECT Toxo IgG, IgM, and IgG Avidity assays for anti-Toxoplasma antibodies detection in pregnant women sera. Diagn Microbiol Infect Dis. 2009;65(3):279-87.

118. Gay-Andrieu F, Marty P, Pialat J, Sournies G, de Laforte TD, Peyron F. Fetal toxoplasmosis and negative amniocentesis: necessity of an ultrasound follow-up. Prenat Diagn. 2003;23(7):558-60.

119. Montoya JG. Laboratory Diagnosis of Toxoplasma gondii Infection and Toxoplasmosis. J Infect Dis. 2002;185(Supplement 1):S73-S82.

120. Liesenfeld O, Montoya JG, Kinney S, Press C, Remington JS. Effect of Testing for IgG Avidity in the Diagnosis of Toxoplasma gondii Infection in Pregnant Women: Experience in a US Reference Laboratory. J Infect Dis. 2001;183(8):1248-53.

121. Bourdette D, Naismith RT. BCG vaccine for clinically isolated syndrome and MS: Infections and protective immunity. Neurology. 2014;82(1):15-6.

122. Kurtzke JF. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). Neurology. 1983;33(11):1444-52.

123. Teunissen C, Menge T, Altintas A, Álvarez-Cermeño JC, Bertolotto A, Berven FS, et al. Consensus definitions and application guidelines for control groups in cerebrospinal fluid biomarker studies in multiple sclerosis. Multiple Sclerosis Journal. 2013;19(13):1802-9.

124. Sickinger E, Gay-Andrieu F, Jonas G, Schultess J, Stieler M, Smith D, et al. Performance characteristics of the new ARCHITECT Toxo IgG and Toxo IgG Avidity assays. Diagn Microbiol Infect Dis. 2008;62(3):235-44.

125. Sickinger E, Braun H-B, Praast G, Stieler M, Gundlach C, Birkenbach C, et al. Evaluation of the Abbott ARCHITECT Toxo IgM assay. Diagn Microbiol Infect Dis. 2009;64(3):275-82.

126. Krause I, Anaya JM, Fraser A, Barzilai O, Ram M, Abad V, et al. Anti-infectious Antibodies and Autoimmune-associated Autoantibodies in Patients with Type I Diabetes Mellitus and their Close Family Members. Ann N Y Acad Sci. 2009;1173(1):633-9.

127. Rieckmann P, Toyka KV. [Immunomodulatory staged therapy of multiple sclerosis. New aspects and practical applications, March 2002]. Nervenarzt. 2002;73(6):556-63.

128. Szmyrka-Kaczmarek M, Pokryszko-Dragan A, Pawlik B, Gruszka E, Korman L, Podemski R, et al. Antinuclear and antiphospholipid antibodies in patients with multiple sclerosis. Lupus. 2012;21(4):412-20.

129. Pestehchian N, Etemadifarr M, Yousefi HA, Chiani M, Aslani N, Nasr Z. Frequency of Blood-tissue Parasitic Infections in Patients with Multiple Sclerosis, as Compared to their Family Members. Int J Prev Med. 2014;5(12):1578-81.

130. Fischer S, Agmon-Levin N, Shapira Y, Porat Katz BS, Graell E, Cervera R, et al. Toxoplasma gondii: bystander or cofactor in rheumatoid arthritis. Immunol Res. 2013;56(2-3):287-92.

131. Chen M, Aosai F, Norose K, Mun HS, Ishikura H, Hirose S, et al. Toxoplasma gondii infection inhibits the development of lupus‐like syndrome in autoimmune (New Zealand Black × New Zealand White) F1 mice. Int Immunol. 2004;16(7):937-46.

132. Luder CG, Lang C, Giraldo-Velasquez M, Algner M, Gerdes J, Gross U. Toxoplasma gondii inhibits MHC class II expression in neural antigen-presenting cells by down-regulating the class II transactivator CIITA. J Neuroimmunol. 2003;134(1-2):12-24.

133. Birgisdóttir A, Asbjörnsdottir H, Cook E, Gislason D, Jansson C, Olafsson I, et al. Seroprevalence of Toxoplasma gondii in Sweden, Estonia and Iceland. Scand J Infect Dis. 2006;38(8):625-31.

134. el-Sebai MM. Study on toxoplasmosis in Quasseem, Saudi Arabia. J Egypt Soc Parasitol. 1991;21(1):273-5.

135. Tozzoli R, Barzilai O, Ram M, Villalta D, Bizzaro N, Sherer Y, et al. Infections and autoimmune thyroid diseases: Parallel detection of antibodies against pathogens with proteomic technology. Autoimmunity reviews. 2008;8(2):112-5.

136. Lidar M, Langevitz P, Barzilai O, Ram M, Porat-Katz B-S, Bizzaro N, et al. Infectious Serologies and Autoantibodies in Inflammatory Bowel Disease. Ann N Y Acad Sci. 2009;1173(1):640-8.

137. 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.

138. Lünemann JD, Tintoré M, Messmer B, Strowig T, Rovira Á, 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.

139. Berti R, Brennan M, Soldan S, Ohayon J, Casareto L, McFarland H, et al. Increased detection of serum HHV-6 DNA sequences during multiple sclerosis (MS) exacerbations and correlation with parameters of MS disease progression. J Neurovirol. 2002;8(3):250-6.

140. Zivadinov R, Nasuelli D, Tommasi MA, Serafin M, Bratina A, Ukmar M, et al. Positivity of cytomegalovirus antibodies predicts a better clinical and radiological outcome in multiple sclerosis patients. Neurol Res. 2006;28(3):262-9.

141. Simon KC, van der Mei IA, Munger KL, Ponsonby A, Dickinson J, Dwyer T, et al. Combined effects of smoking, anti-EBNA antibodies, and HLA-DRB1*1501 on multiple sclerosis risk. Neurology. 2010;74(17):1365-71.

142. Sundqvist E, Sundström P, Lindén M, Hedström AK, Aloisi F, Hillert J, et al. Lack of replication of interaction between EBNA1 IgG and smoking in risk for multiple sclerosis. Neurology. 2012;79(13):1363-8.

143. Arcavi L, Benowitz NL. CIgarette smoking and infection. Arch Intern Med. 2004;164(20):2206-16.

144. Tollerud DJ, Clark JW, Brown LM, Neuland CY, Mann DL, Pankiw-Trost LK, et al. The effects of cigarette smoking on T cell subsets. A population-based survey of healthy caucasians. Am Rev Respir Dis. 1989;139(6):1446-51.

145. Ginns LC, Goldenheim PD, Miller LG, Burton RC, Gillick L, Colvin RB, et al. T-lymphocyte subsets in smoking and lung cancer: Analysis of monoclonal antibodies and flow cytometry. Am Rev Respir Dis. 1982;126(2):265-9.

Abbildungen

Abb. 1: Die geografische Verteilung der MS: Prävalenzraten pro 100 000 Einwohner (rot= >100, braun= 61-100, orange= 20-60, hellblau = 5-20, dunkelblau= 0-5, weiß= keine Information vorliegend

Abb. 2: Lebenszyklus von *T. gondii*

Abb. 3: Schematische Darstellung der Immunantwort gegen *T. gondii*

Abb. 4: Daten sind dargestellt mittels Scatterplot mit Angaben zum Median. Folgende Werte haben sich für die Mediane sowie das 25.- 75. Perzentil ergeben: CIS= 0 (0- 6,1); RRMS= 0 IU/ml (0- 6,1); SPMS: 1,9 IU/ml (0- 3,2); PPMS= 0 IU/ml (0- 12,7), GK= 0 (0- 11,3). Der *p*- Wert beträgt 0,566 und ist damit nicht statistisch signifikant.

Abb. 5: Korrelation der Gesamt-IgG- Konzentration im Serum mit der Konzentration der *T. gondii* IgG- Antikörper; r = Korrelationskoeffizient nach Spearman

Abb. 6: Korrelation des *T. gondii* IgG- Antikörpertiters mit dem Alter der nicht-gematchten Studienpopulation; r = Korrelationskoeffizient nach Spearman

Abb.7: Korrelation des *T. gondii* IgG- Antikörpertiters mit der Dauer der Erkrankung der nicht- gematchten MS- Patienten, r = Korrelationskoeffizient nach Spearman.

Abb.8: (A) Korrelation des *T. gondii* IgG- Antikörpertiters mit dem EDSS der nicht-gematchten MS- Patienten, r = Korrelationskoeffizient nach Spearman. (B) Vergleich des EDSS- Scores der gematchten MS- Patienten in Abhängigkeit ihres *T. gondii* IgG-Status dargestellt als Scatter plot mit Angaben zum Median. Die Anzahl der Patienten in jeder Gruppe steht über dem Scatter plot.

Abb. 9: *T. gondii* IgG- Titer und T2 (A) und Gd+ Läsionen (C) im cMRT sind dargestellt als Scatter plot, der Vergleich zwischen gematchten MS- Patienten mit positiven und negativen *T. gondii* IgG- Status (B, D) sind dargestellt als Balkendiagramm. Die Linie innerhalb des Scatter plots ist der Median. Die Anzahl der Patienten in der jeweiligen Gruppe befindet sich oberhalb des Scatter plots und Balkens.

Abb. 10: *T. gondii* IgG- Titer und T2 (A) und Gd+ Läsionen (C) im sMRT sind dargestellt als Scatter plot, der Vergleich zwischen gematchten MS- Patienten mit positiven und negativen *T. gondii* IgG- Status (B, D) sind dargestellt als Balkendiagramm. Die Linie innerhalb des Scatter plots ist der Median. Die Anzahl der Patienten in der jeweiligen Gruppe befindet sich oberhalb des Scatter plots und Balkens.

Abb. 11: *T. gondii* IgG- Titer und Nikotinabusus dargstellt als Scatter plot. Die Linie innerhalb des Scatter plots entspricht dem Median. Die Anzahl der Patienten in der jeweiligen Gruppe befindet sich oberhalb des Scatter plots.

Abb. 12: Zusammenhang zwischen ANA- Status und Seropositivität für *T. gondii* bei MS- Patienten dargstellt als Balkendiagramm. Die Anzahl der Patienten in der jeweiligen Gruppe befindet sich oberhalb des Balkens.

Abb. 13: Zusammenhang zwischen der MS- Therapieform und der Seroprävalenz für *T. gondii* IgG- Antikörper dargstellt als Balkendiagramm.

Abb. 14: Seroprävalenzrate der *T. gondii* Antikörper vom IgM- Typ bei MS- Patienten und Kontrollen in der gematchten Studienpopulation, dargstellt als Balkendiagramm. Die Anzahl der Patienten in der jeweiligen Gruppe befindet sich oberhalb des Balkens.

Tabellen

Tab. 1: Charakteristika der nicht- gematchten Studienpopulation

Tab. 2: Charakteristika der gematchten Studienpopulation

Tab. 3: Seroprävalenzrate der *T. gondii* Antikörper vom IgG- Typ bei MS- Patienten und Kontrollen in der nicht- gematchten Studienpopulation

Tab. 4: Seroprävalenzrate für *T. gondii* Antikörper vom IgG- Typ in der Subgruppenanalyse der nicht-gematchten Studienpopulation

Tab. 5: Seroprävalenzrate der *T. gondii* Antikörper vom IgG- Typ bei MS- Patienten und Kontrollen in der gematchten Studienpopulation

Tab. 6: Ergebnisse des McNemar- Tests (Vergleich der Fall-Kontrollpaare auf Anwesenheit eines negativen *T. gondii* IgG- Status

Tab. 7: Prävalenz von ANA bei Nikotinabusus

Tab. 8: Zusammenhang zwischen der MS- Therapieform und der Seroprävalenz für *T. gondii* IgG- Antikörper

ANHANG

Erklärung an Eides statt

„Ich, Frauke Geisendörfer (geb. Stascheit), versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Einfluß der *Toxoplasma gondii* Infektion auf die Pathogenese und den Verlauf der Multiplen Sklerose“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.
Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -*www.**icmje**.org*) kenntlich gemacht.
Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.
Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

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

_____
Frauke Geisendörfer
Promovendin

Curriculum Vitae

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

Publikation und Präsentation

Anteilserklärung an etwaigen erfolgten Publikationen

Frauke Stascheit, Friedemann Paul, Lutz Harms, Berit Rosche;
***Toxoplasma gondii* is negatively associated with Multiple Sclerosis-**
A case- control study;
Journal of Neuroimmunology (JNI-D-15-00069), angenommen: 13.05.2015;
Online publiziert: 14.05.2015; gedruckt: 15.08.2015, 285:119-24.

Beitrag im Einzelnen:
Die von mir durchgeführten Tätigkeiten umfasste zunächst die Erstellung der Fall-Kontroll- Paare sowie die Erfassung der jeweils zu analysierenden Daten. Hierzu wählte ich aus der Datenbank der Klinik für Neurologie nach Übereinstimmung aller Einschlußkriterien MS- und CIS-Patienten sowie alters- und geschlechtsgematchte Kontrollen aus. Die relevanten klinischen und paraklinischen Parameter der Studienpopulation wurden von mir tabellarisch zusammengefasst sowie die dazugehörigen Serumproben aus dem Liquorlabor der Charité Campus Mitte herausgesucht. Die Serumproben wurden zur Bestimmung der *T. gondii* IgG- und IgM-Antikörper von mir vorbereitet und zum mikrobiologischen Zentrallabor der Charité transportiert.
Im Anschluss erfolgte die statistische Analyse und Auswertung der Daten, die Erstellung der Ergebnisse und sowie die Anfertigung der vorliegenden Monographie und Publikation. Weiterhin führte ich Überarbeitungen am Manuskript durch, reichte die Arbeit ein und bearbeitete die Fragen und Anmerkungen der Reviewer.

Prof. Dr. med. Lutz Harms	Frauke Geisendörfer
Betreuender Hochschullehrer	Promovendin

Anteilserklärung an etwaigen erfolgten Präsentationen

Stascheit F, Paul F, Harms L, Rosche B

''*Toxoplasma gondii* is negatively associated with multiple sclerosis''

Poster: 67 th AAN Annual Meeting; Washington D.C., USA, April 2015

Frauke Geisendörfer hatte folgenden Anteil an der Präsentation:

Rekrutierung der Patienten, Datenerhebung sowie statistische Analyse und Auswertung der Ergebnisse wie oben aufgeführt.
Im Anschluss erfolgte die Anfertigung des Posters sowie die Präsentation der Arbeit auf der Poster- Session des 67. Kongresses der „American Academy of Neurology“ in Washington D.C., USA.

Prof. Dr. med. Lutz Harms	Frauke Geisendörfer
Betreuender Hochschullehrer	Promovendin

Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle ganz herzlich bei allen Personen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.
Zu aller erst möchte ich ein großer Dankeschön gegenüber den Patienten aussprechen, die zur Erforschung der vorliegenden Fragestellung ihre Serumproben zur Verfügung gestellt haben und ohne die die Bearbeitung des Themas nicht möglich gewesen wäre.

Ein besonderer Dank gilt meinem Betreuer Prof. Dr. med. Lutz Harms, der mir zum einen die theoretische Grundlage dieser Arbeit gelegt und es mir zur Bearbeitung überlassen hat und mich zum anderen weitreichend unterstützt und gefördert hat. Für sein Vertrauen bedanke ich mich sehr herzlich.
Darüber hinaus möchte ich mich bei Frau Dr. med. Berit Rosche für die sehr gute fachliche Anleitung und den zahlreichen fruchtbaren Diskussionen bedanken, aber auch für die Unterstützung in vielerlei anderer Hinsicht.

Für die statistische Beratung und kritischer Auseinandersetzung der Ergebnisse möchte ich mich bei Dr. phil. Ulrike Grittner bedanken. Für die großzügige Überlassung von gesammelten Patientenserumproben sowie der Revision der Arbeit bedanke ich mich bei Prof. Dr. med. Friedemann Paul.
Bei Frau Eberspächer und Frau Cox, den Mitarbeiterinnen der Mikrobiologie des Labor Berlins unter der Leitung von Prof. Dr. Dr. Göbel, möchte ich mich sehr für die freundliche und unkomplizierte Zusammenarbeit bedanken.

Inniger Dank gilt meinem Mann Felix Geisendörfer, der mich in jeder Hinsicht geduldig begleitete und mich vor allem durch seine kritischen Anmerkungen bei statistischen Fragestellung sehr unterstützt hat; und meinen Eltern für ihr Vertrauen, Optimismus und Unterstützung in vielerlei Hinsicht.