

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

DISSERTATION

Intrathekal synthetisiertes Immunglobulin M als
Krankheitsaktivitäts- und prognostischer Biomarker bei
Patientinnen und Patienten mit klinisch isoliertem Syndrom
und früher Multipler Sklerose

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von
Catherina Manon Pfuhl
aus Herrenberg

Datum der Promotion: 3.12.2021

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	3
1. Abstracts	4
1.1 Abstract auf Deutsch	4
1.2 Abstract auf Englisch	5
2. Einleitung	7
2.1 Multiple Sklerose	7
3. Material und Methoden	8
3.1 Diagnostik	8
3.2 Die Berliner CIS-Kohorte	10
3.3 Liquoranalysen	11
3.4 Intrathekal synthetisiertes Immunglobulin M	14
3.5 Statistik	15
4. Ergebnisse	16
5. Diskussion	19
5.1 Resonanz auf Publikation	20
6. Literaturverzeichnis	23
7. Eidesstattliche Versicherung	26
8. Ausführliche Anteilserklärung	28
9. Auszug aus der Journal Summary List	30
10. Druckexemplar der Publikation	31
11. Lebenslauf	45
12. Publikationsliste	47
13. Danksagung	50

Abkürzungsverzeichnis

CDMS	clinically definitive multiple sclerosis (klinisch definitive Multiple Sklerose)
CI	confidence interval (Konfidenzintervall)
CIS	clinically isolated syndrome (klinisch isoliertes Syndrom)
EBV	Epstein Barr Virus
EDSS	Expanded Disability Status Scale
HR	hazard ratio (hazard Rate)
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
MRT	Magnetresonanztomographie
MS	Multiple Sklerose
OKB	oligoklonale Banden
OCT	optical coherence tomography (optische Kohärenztomographie)
OR	Odds Ratio
VEP	visuell evozierte Potentiale
RRMS	relapsing remitting multiple sclerosis (schubförmig remittierende Multiple Sklerose)

1. Abstracts

1.1 Abstract auf Deutsch

Hintergrund: Ein klinisch isoliertes Syndrom (clinically isolated syndrome, CIS) stellt die klinische Erstmanifestation einer entzündlich-demyelinisierenden Erkrankung dar, welche bei manchen Patientinnen und Patienten in das Vollbild einer schubförmigen Multiplen Sklerose (MS) übergehen kann. Bei einem CIS und einer MS findet sich sehr häufig eine intrathekale Synthese von Immunglobulin (Ig)G, welche einerseits qualitativ in Form oligoklonaler IgG-Banden (OKB), andererseits quantitativ mithilfe der sogenannten Reiberdiagramme nachgewiesen werden kann. Während intrathekal synthetisiertes IgG neben einem jungen Alter bei Symptombeginn und einer hohen Anzahl an Läsionen in der Magnetresonanztomographie (MRT) ein gut untersuchter Risikofaktor für die Konversion von CIS zu MS darstellt, ist die Studienlage zu intrathekal synthetisiertem IgM uneindeutig. Vorgehende Studien zeigten jedoch Hinweise auf einen aggressiveren Krankheitsverlauf und ein höheres Konversionsrisiko.

Ziel: Ziel dieser Untersuchung war es, eine intrathekale IgM-Synthese als unabhängigen Risikofaktor für die Konversion von CIS zu MS zu evaluieren. Außerdem sollte eine mögliche Assoziation einer intrathekalen IgM-Synthese mit demographischen, radiologischen und Liquorbefunden untersucht werden.

Methoden: Liquorparameter, inklusive OKB und einer intrathekalen IgG- und IgM-Synthese im Reiberdiagramm von 150 Patientinnen und Patienten mit CIS oder mit früher MS aus der Berliner CIS-Kohortenstudie wurden erfasst und mit demographischen und MR-tomographischen Parametern korreliert. Des Weiteren wurde mittels Cox-Regressionsanalysen eine intrathekale IgM-Synthese als Risikofaktor für die Konversion von einem CIS in eine MS im Vergleich zu bereits bekannten Risikofaktoren für eine Konversion untersucht.

Ergebnisse: OKB konnten bei 86.6% der Studienteilnehmerinnen und -teilnehmer nachgewiesen werden. Eine intrathekale IgG-Synthese bestand bei 46.5%, eine IgM-Synthese bei 23.2%. Patientinnen und Patienten mit einem CIS und Nachweis einer intrathekalen IgM-Synthese waren im Median fünf Jahre jünger als CIS-Patientinnen und -Patienten ohne intrathekale IgM-Synthese (27 bzw. 32 Jahre, $p=0.009$). Des Weiteren hatten Patientinnen und Patienten mit einer intrathekalen IgM-Synthese signifikant häufiger infratentorielle Läsionen in der MRT (56.3% bzw. 33.3%; OR

[95% CI] 2.58 [1.13–5.93]). Sowohl in der univariaten als auch in der multivariablen Cox-Regressionsanalyse war eine intrathekale IgM-Synthese stark assoziiert mit der Konversion von CIS zu MS (multivariable Regression: HR [95% CI] 3.05 [1.45-6.44], $p=0.003$). In die multivariable Analyse eingeschlossen wurden unter anderem Alter (0.96 [0.93-1.00], $p=0.059$), OKB (0.92 [0.33-2.61], $p=0.879$), intrathekale IgG-Synthese (0.98 [0.48-1.99], $p=0.947$), sowie der radiologische Nachweis einer räumlichen Dissemination (2.63 [1.11-6.22], $p=0.028$).

Schlussfolgerung: Eine intrathekale IgM-Synthese ist ein bedeutsamer unabhängiger Risikofaktor für die Konversion eines CIS in eine MS, welcher zukünftig in die individuelle Beratung sowie therapeutische Entscheidungen bei Patientinnen und Patienten mit einem CIS mit einbezogen werden könnte.

1.2 Abstract auf Englisch

Background: A clinically isolated syndrome (CIS) is the first manifestation of an inflammatory demyelinating disease, which in some patients can progress to multiple sclerosis (MS). An intrathecal synthesis of immunoglobulin (Ig)G is a characteristic finding in patients with a CIS or MS. It can be detected either qualitatively by oligoclonal bands (OCB) or quantitatively by calculating the fraction of intrathecally synthesised IgG with formulas described by Reiber. In addition to a younger age and a high number of intracerebral lesions, intrathecal IgG synthesis is a well-known risk factor for conversion from CIS to MS. In contrast, the predictive role of intrathecally synthesised IgM has been less clear. However, recent studies suggested intrathecal IgM production to be associated with a more aggressive course of disease and a higher risk of conversion.

Objective: To evaluate intrathecal IgM synthesis as an independent risk factor for conversion from CIS to MS and to investigate a possible association between intrathecal IgM production and demographic, radiologic, and cerebrospinal fluid findings.

Methods: We recorded OCB, an intrathecal IgG and IgM production, and other CSF parameters of 150 patients with CIS or early MS who participate in the Berlin CIS-cohort and correlated the data with demographic and radiologic parameters. Using Cox-regression models we evaluated intrathecal IgM production as a risk factor for

conversion from CIS to MS according to McDonald criteria 2010 compared to other risk factors.

Results: OCB were detected in 86.6%, an intrathecal IgG production was observed in 46.5% and an intrathecal IgM synthesis in 23.2% of all patients. Patients with a CIS and an intrathecal IgM synthesis were on average five years younger at symptom onset than patients without an intrathecal IgM production (27 vs. 32 years, $p=0.009$). Furthermore, patients with an intrathecal IgM production had more frequently infratentorial lesions on MRI (56.3% vs. 33.3%; OR [95% CI] 2.58 [1.13–5.93]). In univariate and in multivariable Cox regression analyses intrathecal IgM production was strongly associated with conversion to MS (multivariable analysis: HR [95% CI] 3.05 [1.45-6.44], $p=0.003$). Among the variables included in the multivariable model were age (0.96 [0.93-1.00], $p=0.059$), OCB (0.92 [0.33-2.61], $p=0.879$), calculated IgG production (0.98 [0.48-1.99], $p=0.947$) and radiologic evidence of dissemination in space (2.63 [1.11-6.22], $p=0.028$).

Conclusion: Intrathecal IgM production is a meaningful, independent risk factor for conversion from CIS to MS. Thus, it could be taken into account for individualised counselling and therapeutic decision in patients with a CIS.

(vgl. Abstract Publikation: S. 31)

2. Einleitung

2.1 Multiple Sklerose

Die Multiple Sklerose (MS) ist eine chronisch-entzündliche, neurodegenerative Erkrankung, die im jüngeren Erwachsenenalter auftritt. In einer Analyse der Abrechnungsdaten der gesetzlichen Krankenversicherungen in Deutschland betrug im Jahr 2010 die Prävalenz der MS 289/100.000 Versicherte,¹ wobei in den letzten Jahrzehnten eine Zunahme der Häufigkeit beobachtet werden konnte.² Die exakte Pathogenese der MS ist bis heute nicht vollständig verstanden. Etablierte Risikofaktoren für die Entwicklung einer MS sind unter anderem eine genetische Prädisposition, weibliches Geschlecht, eine durchgemachte Epstein-Barr Virus-Infektion, niedrige Vitamin D-Spiegel und Rauchen.³ Die MS geht mit zerebralen und spinalen entzündlichen Läsionen einher, die sich mittels der Magnetresonanztomographie (MRT) bildgebend darstellen lassen. Der wichtigste Laborbefund bei der MS ist eine intrathekale, also eine im Liquorraum stattfindende, Synthese von Immunglobulin (Ig)G, welche sich bei >95% der Patientinnen und Patienten mit MS findet.⁴

Typischerweise verläuft die MS initial schubförmig. Das erstmalige Auftreten von Symptomen, die auf eine mögliche MS hinweisen (z.B. einer Optikusneuritis, einer Hemiparese oder Hemihypästhesie), bezeichnet man als klinisch isoliertes Syndrom (engl. clinically isolated syndrome, CIS). Ein CIS ist somit ein erstes Schubereignis, das die mögliche spätere Entwicklung einer MS ankündigen kann. Die Diagnose einer klinisch definitiven MS (engl. clinically definitive MS, CDMS) lässt sich jedoch erst stellen, wenn im Anschluss an ein CIS zu einem späteren Zeitpunkt ein zweites Schubereignis auftritt. Bei Patientinnen und Patienten mit einem CIS stellt sich also die wichtige Frage, ob, und wenn ja, wann es nach einem CIS zukünftig zu einem zweiten Schubereignis kommt. Die Beantwortung dieser Frage ist auch insofern hochrelevant, als die Empfehlung zu einer Immuntherapie auf dieser individuellen prognostischen Einschätzung des weiteren Krankheitsverlaufes beruht. Vor diesem Hintergrund haben verschiedene Studien Risikofaktoren identifiziert, welche die Wahrscheinlichkeit einer sogenannten Konversion von einem CIS in eine MS vorhersagen können. Etablierte Risikofaktoren für eine Konversion von einem CIS in eine MS sind die Anzahl und unterschiedliche Lokalisation von Läsionen in der

kranialen MRT, eine intrathekale IgG-Synthese, sowie ein jüngeres Patientenalter.^{5,6,7}

Interessanterweise weist ein Teil der Patientinnen und Patienten mit MS neben einer intrathekalen IgG- auch eine intrathekale IgM-Synthese auf. Die mögliche Rolle einer intrathekalen IgM-Synthese als prognostischer Marker für eine Konversion in eine MS bei Patientinnen und Patienten mit einem CIS war bislang in prospektiven Studien jedoch nicht ausreichend untersucht. Vor diesem Hintergrund stellen sich folgende Fragen: Stellt eine intrathekale IgM-Synthese einen Risikofaktor für eine Konversion dar? Falls dies der Fall sein sollte, wie stark ist der Einfluss einer intrathekalen IgM-Synthese als Risikofaktor für eine Konversion im Vergleich zu bereits bekannten Risikofaktoren? Unterscheiden sich Patientinnen und Patienten mit einer intrathekalen IgM-Synthese hinsichtlich klinischer und kernspintomographischer Charakteristika von Patientinnen und Patienten, die diesen Liquorbefund nicht aufweisen?

In der vorliegenden Studie untersuchten wir in einer prospektiven Kohorte von Patientinnen und Patienten mit einem CIS eine intrathekale IgM-Synthese im Vergleich zu bereits etablierten Risikofaktoren als potentiellen prognostischen Parameter für die Konversion von einem CIS in eine MS. Hiermit wollten wir einen für die klinische Praxis relevanten Beitrag zur Verbesserung der Einschätzung des Konversionsrisikos von CIS in eine MS leisten.

3. Material und Methoden

3.1 Diagnostik

Ein klinisch isoliertes Syndrom stellt ein erstmaliges Schubereignis mit akutem oder subakutem Beginn und einer Dauer von mindestens 24 Stunden dar, das typisch für eine entzündlich-demyelinisierende Erkrankung ist (z.B. eine Optikusneuritis oder eine transverse Myelitis). In der Labordiagnostik sowie in der MRT durften sich hierbei keine Hinweise auf anderweitige Differentialdiagnosen finden.

Die Diagnose einer MS wird anhand klinischer Parameter und mit Hilfe der MRT nach den sogenannten McDonald-Kriterien gestellt. Erstmals 2001 etabliert, haben die Diagnosekriterien mehrfache Revisionen erfahren, zuletzt 2017. Wir wandten in unsere Studie die Kriterien von 2010 an, da die Erfassung der Diagnosen vor 2017 erfolgte. Die McDonald-Kriterien von 2010 sind der Abbildung zu entnehmen.

Clinical Presentation	Additional Data Needed for MS Diagnosis
≥2 attacks ^a ; objective clinical evidence of ≥2 lesions or objective clinical evidence of 1 lesion with reasonable historical evidence of a prior attack ^b	None ^c
≥2 attacks ^a ; objective clinical evidence of 1 lesion	Dissemination in space, demonstrated by: ≥1 T2 lesion in at least 2 of 4 MS-typical regions of the CNS (periventricular, juxtacortical, infratentorial, or spinal cord) ^d ; or Await a further clinical attack ^a implicating a different CNS site
1 attack ^a ; objective clinical evidence of ≥2 lesions	Dissemination in time, demonstrated by: Simultaneous presence of asymptomatic gadolinium-enhancing and nonenhancing lesions at any time; or A new T2 and/or gadolinium-enhancing lesion(s) on follow-up MRI, irrespective of its timing with reference to a baseline scan; or Await a second clinical attack ^a
1 attack ^a ; objective clinical evidence of 1 lesion (clinically isolated syndrome)	Dissemination in space and time, demonstrated by: For DIS: ≥1 T2 lesion in at least 2 of 4 MS-typical regions of the CNS (periventricular, juxtacortical, infratentorial, or spinal cord) ^d ; or Await a second clinical attack ^a implicating a different CNS site; and For DIT: Simultaneous presence of asymptomatic gadolinium-enhancing and nonenhancing lesions at any time; or A new T2 and/or gadolinium-enhancing lesion(s) on follow-up MRI, irrespective of its timing with reference to a baseline scan; or Await a second clinical attack ^a
Insidious neurological progression suggestive of MS (PPMS)	1 year of disease progression (retrospectively or prospectively determined) plus 2 of 3 of the following criteria ^d : 1. Evidence for DIS in the brain based on ≥1 T2 lesions in the MS-characteristic (periventricular, juxtacortical, or infratentorial) regions 2. Evidence for DIS in the spinal cord based on ≥2 T2 lesions in the cord 3. Positive CSF (isoelectric focusing evidence of oligoclonal bands and/or elevated IgG index)

If the Criteria are fulfilled and there is no better explanation for the clinical presentation, the diagnosis is "MS"; if suspicious, but the Criteria are not completely met, the diagnosis is "possible MS"; if another diagnosis arises during the evaluation that better explains the clinical presentation, then the diagnosis is "not MS."

^aAn attack (relapse; exacerbation) is defined as patient-reported or objectively observed events typical of an acute inflammatory demyelinating event in the CNS, current or historical, with duration of at least 24 hours, in the absence of fever or infection. It should be documented by contemporaneous neurological examination, but some historical events with symptoms and evolution characteristic for MS, but for which no objective neurological findings are documented, can provide reasonable evidence of a prior demyelinating event. Reports of paroxysmal symptoms (historical or current) should, however, consist of multiple episodes occurring over not less than 24 hours. Before a definite diagnosis of MS can be made, at least 1 attack must be corroborated by findings on neurological examination, visual evoked potential response in patients reporting prior visual disturbance, or MRI consistent with demyelination in the area of the CNS implicated in the historical report of neurological symptoms.

^bClinical diagnosis based on objective clinical findings for 2 attacks is most secure. Reasonable historical evidence for 1 past attack, in the absence of documented objective neurological findings, can include historical events with symptoms and evolution characteristics for a prior inflammatory demyelinating event; at least 1 attack, however, must be supported by objective findings.

^cNo additional tests are required. However, it is desirable that any diagnosis of MS be made with access to imaging based on these Criteria. If imaging or other tests (for instance, CSF) are undertaken and are negative, extreme caution needs to be taken before making a diagnosis of MS, and alternative diagnoses must be considered. There must be no better explanation for the clinical presentation, and objective evidence must be present to support a diagnosis of MS.

^dGadolinium-enhancing lesions are not required; symptomatic lesions are excluded from consideration in subjects with brainstem or spinal cord syndromes.

MS = multiple sclerosis; CNS = central nervous system; MRI = magnetic resonance imaging; DIS = dissemination in space; DIT = dissemination in time; PPMS = primary progressive multiple sclerosis; CSF = cerebrospinal fluid; IgG = immunoglobulin G.

McDonald-Kriterien von 2010.⁸

Vereinfacht formuliert kann eine CDMS nach zwei aufgetretenen Schüben diagnostiziert werden. Ist erst ein Schub aufgetreten, müssen weitere Kriterien erfüllt

sein um die Diagnose MS zu stellen. Dies ist einerseits der Nachweis der Dissemination im Raum (das heißt es sind Läsionen in verschiedenen Regionen des zentralen Nervensystems vorhanden), als auch der Nachweis für die zeitliche Dissemination (Vorhandensein von unterschiedlich alten Läsionen. Diese lassen sich durch Kontrastmittelgabe unterscheiden. Erst kürzlich aufgetretene Läsionen weisen, eine Kontrastmittelaufnahme auf im Gegensatz zu älteren Läsionen).

Neu in den Kriterien von 2017 ist die Wiederaufnahme von oligoklonalen Banden (OKB) als Nachweis einer intrathekalen Immunglobulinsynthese, was die wieder zunehmende Bedeutung der Liquordiagnostik unterstreicht. So lässt sich neuerdings bereits nach einem klinisch nachgewiesenen Schub sowie ≥ 2 Läsionen in der MRT in für eine MS typischen Regionen und bei Vorhandensein von OKB eine MS diagnostizieren. Ein Nachweis für die zeitliche Dissemination ist in diesem Falle nicht mehr erforderlich.⁹

3.2 Die Berliner CIS-Kohorte

Sämtliche Patientinnen und Patienten, die in dieser Arbeit analysiert wurden, entstammen der „Berliner CIS-Kohorte“ (NCT01371071), einer prospektiven, longitudinalen Beobachtungsstudie mit Beginn im Jahr 2011. Die Berliner CIS-Kohorte ist ein Kooperationsprojekt des NeuroCure Clinical Research Center Berlin und der Klinik für Neurologie der Charité Universitätsmedizin Berlin. Ziel dieser Beobachtungsstudie ist unter anderem die Identifizierung und Evaluation von möglichen Faktoren, die das Konversionsrisiko bzw. den frühen Verlauf einer MS beeinflussen. Für die Studie liegt ein positives Votum der Ethikkommission Charité Campus Mitte vor. Im Rahmen mehrerer Projekte wurden (unter Beteiligung der Verfasserin dieser Arbeit) bereits einzelne Datensätze analysiert und veröffentlicht, z.B. zur Rolle von Antikörpern gegen Epstein-Barr-Virus (EBV) als mögliche Krankheitsaktivitäts- und prognostische Parameter bei früher MS,¹⁰ zum Zusammenhang einer intrathekalen IgG-Synthese mit der Höhe von Antikörperspiegeln gegen EBV,¹¹ zur Rolle von Vitamin D bei früher MS,¹² zu Veränderungen der retinalen Ganglienschicht bei Patientinnen und Patienten mit

früher MS,¹³ sowie zur Rolle von microRNAs¹⁴ und Gamma-H2AX¹⁵ als mögliche Biomarker bei Patientinnen und Patienten mit CIS und MS.

Einschlusskriterien für die aktuelle Studie waren Volljährigkeit, die Diagnose eines CIS (Diagnosezeitpunkt maximal 6 Monate zurückliegend) oder die Diagnose einer schubförmig remittierenden MS (engl. relapsing remitting MS, RRMS) nach den McDonald-Kriterien von 2010 (Diagnosezeitpunkt maximal 24 Monate zurückliegend). Ausschlusskriterien umfassten die Verweigerung des schriftlichen Einverständnisses in die Studie, einen Substanzabusus in der Vergangenheit und Umstände, die die Durchführung einer MRT oder eine Untersuchung mittels optischer Kohärenztomographie (OCT) nicht zulassen.

Mindestens einmal jährlich stattfindende Studienvisiten bestanden unter anderem aus einer cerebralen und spinalen Bildgebung mittels 3-Tesla-MRT (ausführliche technische Informationen zur Bildgenerierung siehe Publikation, S. 33) einer ausführlichen neurologischen Untersuchung inklusive Erhebung des Grades der Behinderung mittels der Expanded Disability Status Scale (EDSS), visuellen Prüfungen (mittels Visustestung, visuell evozierten Potentialen (VEP) und der OCT) sowie der Gewinnung von Blut- und Speichelproben.

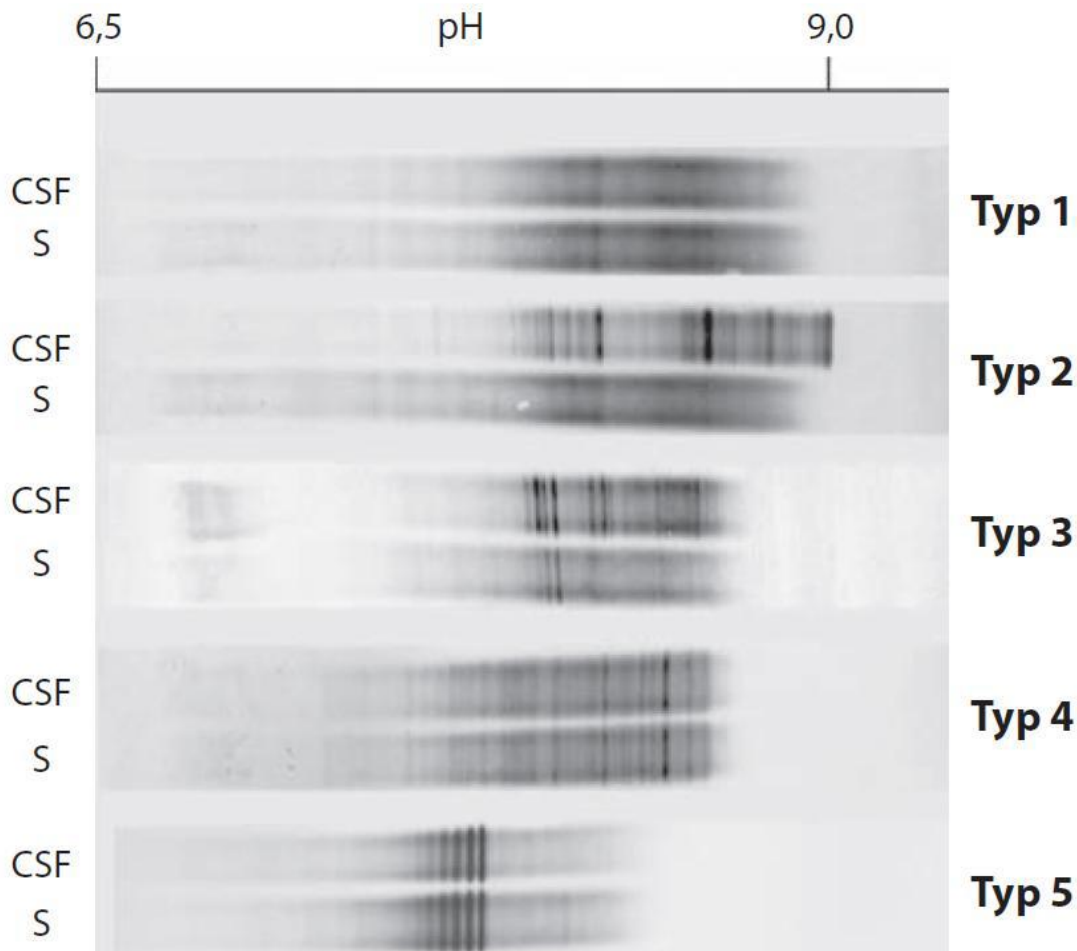
3.3 Liquoranalysen

Die in dieser Arbeit analysierten Liquordaten entstammen in der Regel von dem ersten stationären Aufenthalt bei Symptombeginn (vor Einschluss der Patientinnen und Patienten in die Berliner CIS-Kohorte). Die Lumbalpunktionen wurden somit nicht zu Studienzwecken, sondern ausschließlich im Rahmen der Routinediagnostik durchgeführt. Alle Liquoranalysen wurden von akkreditierten Laboren durchgeführt.

Eine intrathekale Ig-Synthese kann mit unterschiedlichen Verfahren qualitativ oder quantitativ ermittelt werden.

Der qualitative Nachweis erfolgt durch den Nachweis sogenannter oligoklonaler Banden (OKB), welche im Liquor, jedoch nicht im Serum nachweisbar sind. Die Auftrennung der Proteine erfolgt mittels isoelektrischer Fokussierung durch Auftragen von Serum und Liquor des Patienten auf ein Gel, in dem zuvor ein pH-Gradient

etabliert wurde. Nachdem eine elektrische Spannung angelegt wurde, bewegen sich die Proteine je nach Eigenladung im Gel unterschiedlich weit und können somit voneinander diskriminiert werden. Hierbei können fünf Banden-Typen unterschieden werden.

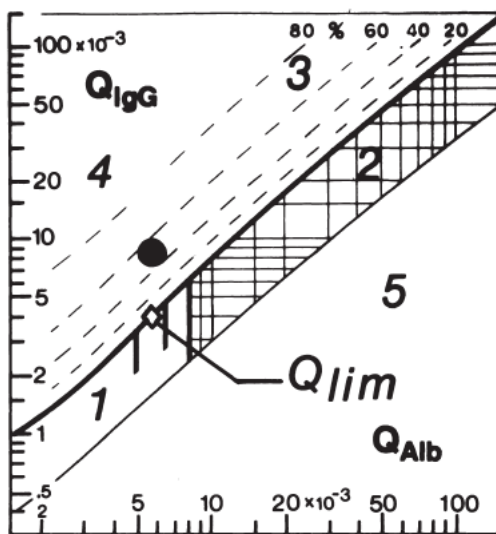


Typ 1: Keine Banden in Liquor und Serum. Typ 2: Oligoklonale IgG-Banden im Liquor, nicht im Serum. Interpretation: Intrathekale IgG-Synthese. Typ 3: Oligoklonale Banden im Liquor (wie Typ 2) und zusätzlich identische oligoklonale Banden im Liquor und Serum (wie Typ 4). Interpretation: Intrathekale IgG-Synthese. Typ 4: Übereinstimmende oligoklonale Bandenmuster in Liquor und Serum. Interpretation: Keine intrathekale IgG-Synthese aber Immunreaktion im Blut. Typ 5: Monoklonales Bandenmuster in Liquor und Serum. Interpretation: Systemische Paraproteinämie.¹⁶

Der quantitative Nachweis einer intrathekalen Ig-Synthese erfolgt mittels der sogenannten Reiber-Diagramme und deren Formeln.¹⁶ Hierbei wird der prozentuale Anteil an intrathekal synthetisiertem Immunglobulin am Gesamt-Immunglobulin im Liquor errechnet aus Liquor/Serum-Quotienten von Albumin und dem entsprechenden Immunglobulin sowie Q_{lim}. Eine hyperbolische Funktion beschreibt den Referenzbereich für Immunglobulin im Liquor, das aus dem Blut stammt. Werte

oberhalb des Referenzbereichs signalisieren damit eine intrathekale Ig-Synthese. QLim stellt die obere Grenze des Referenzbereichs für den jeweiligen Ig-Quotienten in Bezug zum Albuminquotienten dar.¹⁷

Diese Liquor-Serum-Quotienten können auch graphisch miteinander in Beziehung gesetzt werden. In einem Diagramm aufgezeichnet (siehe Abb.), gelingt schnell die Beurteilung ob ein Normalbefund, eine intrathekale Ig-Synthese, eine gestörte Blut-Hirn-Schrankenfunktion oder Mischformen bestehen.



Liquor/Serum-Quotienten-Diagramm für IgG. QLim, markiert den oberen Referenzbereich. Anhand der diagonalen gestrichelten Linien oberhalb QLim, kann der Anteil einer intrathekal synthetisierten Ig-Synthese abgelesen werden. Es können verschiedene Bereiche voneinander diskriminiert werden. Bereich 1: Normalbefund. Bereich 2: Gestörte Blut-Hirn-Schranken-Funktion. Bereich 3: Intrathekale IgG-Synthese und gestörte Blut-Hirn-Schranken-Funktion. Bereich 4: Intrathekale IgG-Synthese. Bereich 5: analytische Fehler (da Werte unterhalb des Referenzbereichs).¹⁷

Zur exakten rechnerischen Herangehensweise von QLim für die jeweiligen Immunglobuline sowie die Errechnung der intrathekal synthetisierten Ig-Fraktion verweise ich auf die Publikation (S. 32-33).

Eine dritte, jedoch veraltete, Messmethode ist die Erhebung des Ig-Index. Hierbei werden ebenfalls die Liquor-Serum-Quotienten von Albumin und des jeweiligen Ig zueinander in Beziehung gesetzt. Da jedoch physiologisch keine lineare Beziehung zwischen den beiden Quotienten herrscht, führt dies bei hohen Albuminquotienten zu falsch positiven Befunden.¹⁷

Sowohl die qualitative Erfassung einer intrathekalen IgG-Synthese in Form von OKB als auch die quantitative Methode zum Nachweis einer intrathekalen Ig-Synthese ist im Rahmen der Routine-Liquordiagnostik in Deutschland etabliert. Hierbei ist die Sensitivität des Nachweises von OKB höher als die des Nachweises einer intrathekalen IgG-Synthese im Reiber-Diagramm.

3.4 Intrathekal synthetisiertes Immunglobulin M

Wie bereits erwähnt wurde eine intrathekale IgG-Synthese bei Patientinnen und Patienten mit früher MS bereits häufig untersucht und stellt einen etablierten Risikofaktor für die Konversion eines CIS in eine MS dar. Dahingegen besteht für intrathekal synthetisiertes IgM eine widersprüchliche Datenlage.

Zum einen gibt es bisher keinen Goldstandard zur Messung von intrathekal synthetisiertem IgM. Aufgrund der pentameren Struktur und des höheren Molekulargewichts, ist die Methode für oligoklonale IgM-Banden deutlich anspruchsvoller und störanfälliger als die Bestimmung von oligoklonalen IgG-Banden. Kritiker bemängeln daher eine höhere Anzahl falsch positiver Bandeninterpretationen.¹⁸

Die quantitative Berechnung einer intrathekalen IgM-Synthese erfolgt analog zur Berechnung von IgG mithilfe der Reiber Formeln und scheint keine methodischen Einschränkungen aufzuweisen. Es ist jedoch vorstellbar, dass - in Analogie zur Messung von intrathekal synthetisiertem IgG - die quantitative Messung möglicherweise weniger sensitiv ist als eine qualitative Messung.¹⁹

Aufgrund der unsicheren Messmethoden für IgM-Banden sowie die bereits in Deutschland als Routineparameter gut verfügbaren Daten zur kalkulierten Synthese, analysierten wir in dieser Arbeit die mittels der Reiber-Formeln berechnete quantitative intrathekale IgM-Synthese.

Zum anderen ist die bisherige Studienlage zu intrathekal synthetisiertem IgM als prognostischer Parameter widersprüchlich. Eine Studie mit 500 sardinischen Patientinnen und Patienten konnte keine Assoziation von intrathekal synthetisiertem IgM (gemessen als oligoklonale IgM Banden) mit erhöhter Behinderungsprogression

bei MS feststellen.²⁰ Zu ähnlichen Ergebnissen, allerdings durch quantitativ gemessenes IgM, kam eine Studie mit 70 pädiatrischen MS-Patientinnen und Patienten.¹⁸ Konträr hierzu zeigten Huss et al. in einer retrospektiven Studie mit 126 CIS-Patientinnen und Patienten, dass das Vorhandensein von intrathekal synthetisiertem IgM das Risiko für die Konversion in eine MS erhöht.²¹ Die Arbeitsgruppe um Villar et al. konnte ebenfalls ein erhöhtes Konversionsrisiko sowie einen aggressiveren Krankheitsverlauf bei Patientinnen und Patienten mit oligoklonalen IgM-Banden darstellen.²²

Die zitierten Studien unterscheiden sich in der angewandten Methodik der IgM Messung und der Studienendpunkte. Dies erschwert die Vergleichbarkeit.

Die insgesamt begrenzte und kontroverse Datenlage zu intrathekal synthetisiertem IgM war ein Grund Daten zur intrathekalen IgM-Synthese in einer großen Patientenkohorte systematisch zu erheben und auszuwerten.

3.5 Statistik

Die statistische Auswertung der Daten wurde mittels der Programme GraphPad Prism sowie SPSS durchgeführt. Zur Beschreibung der verschiedenen statistischen Tests verweise ich auf die Publikation (S. 33). Im Hinblick auf die teils komplexe statistische Auswertung, insbesondere sind hier die im Folgenden erläuterten Regressionsanalysen zu nennen, arbeiteten wir eng mit der Biostatistikerin Frau PD Dr. Ulrike Grittner vom Institut für Biometrie und Klinische Epidemiologie der Charité Universitätsmedizin Berlin zusammen.

Zunächst nutzten wir lineare und binäre logistische Regressionsanalysen um die Beziehung von einer intrathekalen Ig-Synthese (differenziert in Vorhandensein von OKB, im Anschluss zusätzlich Vorhandensein einer kalkulierten intrathekalen IgG- oder IgM-Synthese) mit definierten abhängigen Variablen (Alter bei Symptombeginn, Anzahl und Lokalisation von MRT-Läsionen, Zellzahl im Liquor) einzeln zu modellieren. Als Maß der Effektstärke dienten das partielle Eta-Quadrat (partial η^2). Außerdem berechneten wir Odd Ratios (OR) um die Stärke des Zusammenhangs der Variablen zu quantifizieren sowie Konfidenzintervalle (CI) von 95%. Um eine

mögliche gegenseitige Abhängigkeit der intrathekalen IgG- und IgM-Synthese sichtbar zu machen, wurde ein zusätzlicher Interaktionseffekt berechnet, welcher sich als nicht signifikant erwies.

Mittelpunkt unserer Untersuchung bildeten im Anschluss die Cox-Regressionsanalysen. Univariate Analysen berechnen zunächst den Einfluss einzelner Variablen (in unserem Fall Alter, Geschlecht, Immuntherapie, Anzahl an MRT-Läsionen, Nachweis einer räumlichen Dissemination im MRT, OKB und intrathekal synthetisiertes IgG oder IgM) auf das Eintreten eines Ereignisses (Konversion CIS in eine MS). Im Anschluss erfolgt eine multivariable Analyse. Um mögliche Einflüsse von Variablen weitestgehend auszuschließen, wurden zunächst die oben genannten Variablen dem Modell hinzugefügt und bei statistisch ausbleibendem Einfluss mit einer schrittweisen Rückwärtsselektion wieder aus dem Modell entfernt. Das radiologisch definierte Kriterium der Dissemination im Raum, OKB, intrathekal synthetisiertes IgG und IgM wurden von dieser Rückwärtsselektion, auch „stepwise backward selection“ genannt, ausgenommen.

4. Ergebnisse

Ausgewählte Ergebnisse werden im Folgenden dargestellt. Für eine detaillierte Darstellung der Ergebnisse verweise ich auf unsere Publikation (S. 34-37).

Mithilfe der oben genannten Reiber-Formeln berechneten wir den prozentualen Anteil von intrathekal synthetisiertem Immunglobulin G, M und A am Gesamt-Immunglobulin im Liquor bei 150 Patientinnen und Patienten mit CIS oder RRMS. Insgesamt wiesen 46.5% (n=144) der Studienteilnehmerinnen und -teilnehmer eine intrathekale IgG-Synthese >0% auf, während der Nachweis von oligoklonalen Banden als sensitivere Methode bei 86.6% (n=149) deutlich häufiger gelang. Bei 23.2% (n=142) der Studienpatientinnen und -patienten konnte eine intrathekale IgM-Synthese detektiert werden und nur bei 3.7% (n=136) der Patientinnen und Patienten bestand eine IgA-Synthese.

Des Weiteren analysierten wir Variablen wie Alter, Geschlecht, weitere Liquorparameter sowie Läsionsanzahl und -lokalisierung in Gruppenvergleichen unter anderem mithilfe von logistischen Regressionsanalysen. Wir definierten fünf Gruppen, die sich anhand der intrathekalen Ig-Synthese unterschieden, je nach dem ob OKB, eine kalkulierte IgG- oder IgM-Synthese bestanden (siehe Tabelle). Eine weitere Subgruppenanalyse erfolgte nur unter allen OKB-positiven Patienten. Hier erfolgte die Einteilung in zwei Gruppen in Patientinnen und Patienten mit oder ohne eine intrathekale IgM-Synthese.

	OKB	IgG	IgM
Gruppe 1	-	-	-
Gruppe 2	+	-	-
Gruppe 3	+	-	+
Gruppe 4	+	+	-
Gruppe 5	+	+	+

Einteilung der Gruppen.

Patienten und Patientinnen mit einer intrathekalen IgM-Synthese waren im Median bei erstem klinischen Schubereignis fünf Jahre jünger als Patienten und Patientinnen ohne IgM-Synthese (27 vs. 32 Jahre, $p=0.013$). Selbiges Ergebnis konnte auch erzielt werden, wenn nur OCB-positive Patienten und Patientinnen in die Berechnung mit einbezogen wurden (27 vs. 32 Jahre, partielles η^2 für IgM-Synthese: 0.056, $p=0.009$). Im Gegensatz dazu waren OKB oder eine kalkulierte intrathekale IgG-Synthese nicht assoziiert mit dem Alter bei Symptombeginn (η^2 für OKB+ vs. OKB-: 0.001, $p=0.663$; partielles η^2 für kalkulierte IgG-Synthese: 0.015, $p=0.180$).

Während eine intrathekale IgM-Synthese keine Korrelation mit der Läsionsanzahl in der MRT aufwies, zeigten sich Unterschiede der Gruppen hinsichtlich der Läsionslokalisierung. 56.3% (18/32) der IgM-positiven Patientinnen und Patienten wiesen infratentorielle Läsionen auf, während in der Gruppe mit negativem IgM-Status nur 31.7% der Patienten und Patientinnen Läsionen in dieser ZNS-Region zeigten ($p=0.021$). Dieses Ergebnis bestätigte sich auch, wenn nur OKB-positive Patienten und Patientinnen analysiert wurden (56.3% vs. 33.3%, OR [95% CI] 2.58 [1.13-5.93]). Der IgM-Status war jedoch nicht mit anderen Läsionslokalisationen (periventrikulär oder juxtacortical) assoziiert.

Mittels der Cox-Regressionsanalyse berechneten wir den Einfluss von einer intrathekalen Ig-Synthese und anderer Variablen (Alter, Geschlecht, Immuntherapie, räumliche Dissemination und Läsionszahl) auf das Konversionsrisiko. Der Beobachtungszeitraum betrug im Median 619 Tage von erster bis letzter MRT-Untersuchung, bzw. 727 Tage vom ersten Schubereignis bis zur letzten Studienvisite. In diesem Zeitraum trat bei 42 von 96 Patienten mit einem CIS eine Konversion in eine MS auf. Dies geschah entweder klinisch in Form eines zweiten Schubereignisses oder radiologisch durch den Nachweis einer neu aufgetretenen Läsion und damit einer kernspintomographisch nachweisbaren zeitlichen Dissemination (siehe Abb. McDonald-Kriterien 2010 S. 9). Bei 31/42 Patienten lag eine radiologische und bei 11/42 Patienten eine klinische Konversion vor.

Patientinnen und Patienten, die eine intrathekale IgM-Synthese aufwiesen, hatten sowohl in der univariaten (hazard ratio [95% CI] 3.42 [1.75-6.67], $p < 0.001$) als auch in der multivariablen Analyse (HR [95% CI] 3.05 [1.45-6.44], $p = 0.003$) ein mehr als dreifach erhöhtes Konversionsrisiko im Vergleich zu Patientinnen und Patienten ohne eine intrathekale IgM-Synthese. Im Gegensatz dazu waren OKB oder eine kalkulierte intrathekale IgG-Synthese nicht assoziiert mit der Konversion in eine MS. In einer Subgruppenanalyse von ausschließlich OKB-positiven Patientinnen und Patienten konnte der Einfluss einer intrathekalen IgM-Synthese auf das Konversionsrisiko ebenfalls gezeigt werden (prozentualer Anteil an konvertierten Patientinnen und Patienten innerhalb eines Jahres [95% CI]: OKB+/IgM- 17.6% [7.0-27.0] vs. OKB+/IgM+ 57.1% [23.3-76.1]). Dieser Effekt wurde nicht maßgeblich beeinflusst durch eine zusätzlich vorhandene kalkulierte IgG-Synthese (OKB+/IgG-/IgM+ 55.0% [0-80.2] vs. OKB+/IgG+/IgM+ 58.3% [6.0-81.5]).

Unter den anderen untersuchten Variablen wies die räumliche Dissemination sowie die absolute Anzahl an Läsionen einen signifikanten Einfluss auf das Konversionsrisiko auf. Diese Ergebnisse konnten jedoch in der Analyse von ausschließlich OKB-positiven Patienten und Patientinnen nicht bestätigt werden. Die übrigen Variablen beeinflussten das Risiko nicht. Damit ist intrathekal synthetisiertes IgM in unseren Analysen der stärkste Einflussfaktor für die Konversion in eine MS.

5. Diskussion

Im Folgenden werden exemplarisch verschiedene Aspekte unserer Arbeit diskutiert. Detailliertere Ausführungen sind der Publikation zu entnehmen (S. 37-42).

Die drei wichtigsten Ergebnisse dieser Arbeit sind, dass intrathekal synthetisiertes IgM a) ein starker Prädiktor für die Konversion von CIS in eine MS ist, b) mit dem Auftreten von infratentoriellen Läsionen und c) mit jüngerem Erstmanifestationsalter einer MS assoziiert ist.

Unsere Ergebnisse sind damit konsistent mit einigen anderen Studien, die ebenfalls gezeigt haben, dass eine intrathekale IgM-Synthese ein Marker für einen ungünstigeren Verlauf einer MS bzw. ein Risikofaktor für die Konversion von CIS zu MS ist.^{21,22,23,24} Die Studien unterschieden sich jedoch oft in der Messung der IgM-Synthese. Unserer Meinung nach ist die Berechnung der intrathekal synthetisierten Fraktion von IgM am Gesamt-IgM im Liquor nach Reiber die aktuell zu favorisierende Methode zur Erfassung einer intrathekalen IgM-Synthese. Zum einen ist die Berechnung weniger störanfällig und erfordert keine gleichermaßen aufwändigen laborexperimentellen Arbeitsschritte wie die Messung von oligoklonalen IgM-Banden. Des Weiteren ist sie der Messung des IgM-Indexes überlegen, da sie der nichtlinearen Beziehung zwischen Liquor-Serum-Quotienten von Immunglobulin und Albumin Rechnung trägt. Und nicht zuletzt wird die Berechnung der intrathekalen Ig-Synthese nach Reiber in Deutschland und in Europa im Rahmen der Standard-Liquordiagnostik bereits seit Jahren breitflächig erhoben und ist daher gut etabliert.

Sowohl aufgrund des signifikant jüngeren Alters bei Symptombeginn als auch aufgrund der höheren Konversionsrate können wir aus unseren Daten schlussfolgern, dass eine intrathekale IgM-Synthese ein Zeichen erhöhter Krankheitsaktivität bei Patientinnen und Patienten mit einem CIS darstellt. Eine kalkulierte intrathekale IgM-Synthese ist laut unseren Ergebnissen sogar ein stärkerer Risikofaktor für die Konversion als bereits bekannte Risikofaktoren wie zum Beispiel OKB, jüngeres Alter, die Zahl der Läsionen oder die Erfüllung der MRT-Kriterien für die Dissemination im Raum. Huss et al.²¹ konnten ebenfalls einen stärkeren Einfluss von intrathekal synthetisiertem IgM als OKB auf das Konversionsrisiko feststellen.

Einige bisher veröffentlichte Studien, die OKB als Risikofaktor für die Konversion eines CIS in eine MS untersuchten, berücksichtigten nicht intrathekal synthetisiertes IgM.^{6,7} In unserer Arbeit hatten alle Patientinnen und Patienten, die eine intrathekale IgM-Synthese aufwiesen, ebenfalls den Nachweis von OKB im Liquor. Aufgrund dessen ist es vorstellbar, dass das Konversionsrisiko, welches in den voran gegangenen Studien OKB zugeschrieben wurde, bei einem Teil der vormals untersuchten Patientinnen und Patienten auf eine mögliche IgM-Synthese zurückzuführen ist.

Stärken unserer Arbeit sind die Erhebung eines umfassenden Datensatzes an Liquorparametern von Patientinnen und Patienten mit CIS und früher MS. Diese Daten konnten gemeinsam mit standardisierten klinischen sowie MRT-Daten, welche bei Studieneinschluss sowie bei mehrfachen Folgevisiten erhoben wurden, analysiert werden.

Limitationen unserer Arbeit sind ein noch zu geringer Beobachtungszeitraum um den längerfristigen Einfluss von einer intrathekalen IgM-Synthese zu beurteilen. Des Weiteren wurden MR-tomographisch keine volumetrischen Daten erfasst wie zum Beispiel Daten zu Atrophie oder dem Verhältnis von weißer zu grauer Substanz. Eine Untersuchung dieser Parameter in Abhängigkeit von einer intrathekalen IgM-Synthese könnte Ziel zukünftiger Studien sein.

Insgesamt konnten wir in unserer Arbeit zeigen, dass eine intrathekale IgM-Synthese einen wichtigen Risikofaktor für eine frühe Konversion von CIS in eine MS darstellt und somit bei der individuellen Beratung von Patientinnen und Patienten mit einem CIS und bei Therapieentscheidungen mit einbezogen werden könnte.

5.1 Resonanz auf die Publikation

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden nach der Publikation in der Fachöffentlichkeit bereits weiter diskutiert. Unsere Arbeit wurde unter anderem in der Rubrik „research highlight“ im Journal Nature Reviews Neurology zusammengefasst.²⁵

Des Weiteren berichteten Alcalá et al. in Form eines Kommentars²⁶ zu unserer Veröffentlichung von ihren Ergebnissen mit oligoklonalen IgM-Banden, welche

ebenfalls einen Risikofaktor für die Konversion in eine MS darstellen.²⁷ Darüber hinaus konnte diese Arbeitsgruppe feststellen, dass Patientinnen und Patienten mit oligoklonalen IgM-Banden unterschiedlich auf Immuntherapien reagieren. So sprach die Patientengruppe mit IgM-Banden im Hinblick auf weitere Schübe schlechter auf Interferon- β an als auf Glatirameracetat.²⁸ Ihre Schlussfolgerung war, dass intrathekal synthetisiertes IgM einen Einfluss auf die Wirksamkeit von Immuntherapien hat (speziell auf die Wirksamkeit von Interferon- β) und der IgM-Status in Therapieentscheidungen mit einbezogen werden sollte.

Da in unserer Probandengruppe bei Studieneinschluss nur etwa ein Drittel der Patientinnen und Patienten überhaupt MS-Therapeutika erhielt (Kortikosteroide ausgenommen) und die CIS-Kohorten-Studie primär keine Therapiestudie darstellt, verzichteten wir aufgrund der kleinen Fallzahlen auf eine Subgruppenanalyse hinsichtlich der verschiedenen Immuntherapien. Die Immuntherapie fand als dichotome Variable Eingang in unsere Berechnungen ob die Patientinnen und Patienten eine Medikation erhielten oder nicht.

Eine kürzlich veröffentlichte Metaanalyse untersuchte unter anderem den Einfluss von IgM auf das Konversionsrisiko, in der auch unsere Arbeit als eine von 12 Studien mit einbezogen wurde.²⁹ Die Autorinnen Mailand und Frederiksen kamen in ihrer Bewertung zu den gleichen Schlüssen wie wir, was die Validität unserer Daten unterstreichen könnte. Gleichfalls sahen die Autorinnen weiteren Forschungsbedarf hinsichtlich einer intrathekalen IgM-Synthese. Sie bemängelten die Heterogenität der eingeschlossenen Studien, was eine mögliche Verallgemeinerung der Ergebnisse mindert.

In Zukunft sind weitere langfristig angelegte, prospektive multizentrische Studien mit einer standardisierten Erhebung einer intrathekalen IgM-Synthese nötig um unsere Ergebnisse und die anderer Studien zu bestätigen und diese spezielle Patientengruppe weiter zu charakterisieren.

Ein weiterer Aspekt mit Forschungsbedarf ist unter anderem die Wirksamkeit von verschiedenen immunmodulierenden Therapien in Abhängigkeit von einer intrathekalen IgM-Synthese. Dies erfolgt mit dem primären Ziel individualisierte Therapieentscheidungen treffen zu können. Vorstellbar wäre diesbezüglich außerdem, dass Patientinnen und Patienten mit einer intrathekalen IgM-Synthese

aufgrund der höheren Krankheitsaktivität mehr von einer frühen, hoch effizienten Therapie profitieren könnten.

Intrathekal synthetisiertes IgM ist somit ein vielversprechender Parameter, der bei Patientinnen und Patienten mit CIS bzw. früher MS in die individuelle Prognoseabschätzung und Therapieentscheidungen mit einbezogen werden könnte.

6. Literaturverzeichnis

- ¹ Kip, M., Zimmermann, A., Bleß, H. H. (2016) Epidemiologie der Multiplen Sklerose. In: M. Kip, T. Schönfelder, H. H. Bleß (eds.) Weißbuch Multiple Sklerose. (p. 16). Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-662-49204-8_2.
- ² Koch-Henriksen, N., & Sørensen, P. S. (2010). The changing demographic pattern of multiple sclerosis epidemiology. *The Lancet. Neurology*, 9(5), 520–532. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(10\)70064-8](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(10)70064-8).
- ³ Ascherio, A., & Munger, K. L. (2016). Epidemiology of Multiple Sclerosis: From Risk Factors to Prevention-An Update. *Seminars in neurology*, 36(2), 103–114. <https://doi.org/10.1055/s-0036-1579693>.
- ⁴ Andersson, M., Alvarez-Cermeño, J., Bernardi, G., Cogato, I., Fredman, P., Frederiksen, J., Fredrikson, S., Gallo, P., Grimaldi, L. M., & Grønning, M. (1994). Cerebrospinal fluid in the diagnosis of multiple sclerosis: a consensus report. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*, 57(8), 897–902. <https://doi.org/10.1136/jnnp.57.8.897>.
- ⁵ Tintoré, M., Rovira, A., Río, J., Nos, C., Grivé, E., Téllez, N., Pelayo, R., Comabella, M., Sastre-Garriga, J., & Montalban, X. (2006). Baseline MRI predicts future attacks and disability in clinically isolated syndromes. *Neurology*, 67(6), 968–972. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000237354.10144.ec>.
- ⁶ Kuhle, J., Disanto, G., Dobson, R., Adiutori, R., Bianchi, L., Topping, J., Bestwick, J. P., Meier, U. C., Marta, M., Dalla Costa, G., Runia, T., Evdoshenko, E., Lazareva, N., Thouvenot, E., Iaffaldano, P., Drenzo, V., Khademi, M., Piehl, F., Comabella, M., Sombekke, M., Killestein, J., Hegen, H., Rauch, S., D'Alfonso, S., Alvarez-Cermeño, J. C., Kleinová, P., Horáková, D., Roesler, R., Lauda, F., Llufríu, S., Avsar, T., Uygunoglu, U., Altintas, A., Saip, S., Menge, T., Rajda, C., Bergamaschi, R., Moll, N., Khalil, M., Marignier, R., Dujmovic, I., Larsson, H., Malmestrom, C., Scarpini, E., Fenoglio, C., Wergeland, S., Laroni, A., Annibaldi, V., Romano, S., Martínez, A. D., Carra, A., Salvetti, M., Uccelli, A., Torkildsen, Ø., Myhr, K. M., Galimberti, D., Rejdak, K., Lycke, J., Frederiksen, J. L., Drulovic, J., Confavreux, C., Brassat, D., Enzinger, C., Fuchs, S., Bosca, I., Pelletier, J., Picard, C., Colombo, E., Franciotta, D., Derfuss, T., Lindberg, R., Yaldizli, Ö., Vécsei, L., Kieseier, B. C., Hartung, H. P., Villoslada, P., Siva, A., Saiz, A., Tuman, H., Havrdová, E., Villar, L. M., Leone, M., Barizzone, N., Deisenhammer, F., Teunissen, C., Montalban, X., Tintoré, M., Olsson, T., Trojano, M., Lehmann, S., Castelnovo, G., Lapin, S., Hintzen, R., Kappos, L., Furlan, R., Martinelli, V., Comi, G., Ramagopalan, S. V., & Giovannoni, G. (2015). Conversion from clinically isolated syndrome to multiple sclerosis: A large multicentre study. *Multiple sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)*, 21(8), 1013–1024. <https://doi.org/10.1177/1352458514568827>.
- ⁷ Tintore, M., Rovira, À., Río, J., Otero-Romero, S., Arrambide, G., Tur, C., Comabella, M., Nos, C., Arévalo, M. J., Negrotto, L., Galán, I., Vidal-Jordana, A., Castilló, J., Palavra, F., Simon, E., Mitjana, R., Auger, C., Sastre-Garriga, J., & Montalban, X. (2015). Defining high, medium and low impact prognostic factors for developing multiple sclerosis. *Brain : a journal of neurology*, 138(Pt 7), 1863–1874. <https://doi.org/10.1093/brain/awv105>.
- ⁸ Polman, C. H., Reingold, S. C., Banwell, B., Clanet, M., Cohen, J. A., Filippi, M., Fujihara, K., Havrdova, E., Hutchinson, M., Kappos, L., Lublin, F. D., Montalban, X., O'Connor, P., Sandberg-Wollheim, M., Thompson, A. J., Waubant, E., Weinshenker, B., & Wolinsky, J. S. (2011). Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the McDonald criteria. *Annals of neurology*, 69(2), 292–302. <https://doi.org/10.1002/ana.22366>.
- ⁹ Thompson, A. J., Banwell, B. L., Barkhof, F., Carroll, W. M., Coetzee, T., Comi, G., Correale, J., Fazekas, F., Filippi, M., Freedman, M. S., Fujihara, K., Galetta, S. L., Hartung, H. P., Kappos, L., Lublin, F. D., Marrie, R. A., Miller, A. E., Miller, D. H., Montalban, X., Mowry, E. M., Sorensen, P. S., Tintoré, M., Traboulsee, A. L., Trojano, M., Uitdehaag, B. M. J., Vukusic, S., Waubant, E., Weinshenker, B. G., Reingold, S. C., & Cohen, J. A. (2018). Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria. *The Lancet. Neurology*, 17(2), 162–173. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(17\)30470-2](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(17)30470-2).

-
- ¹⁰ Gieß, R. M., Pfuhl, C., Behrens, J. R., Rasche, L., Freitag, E., Khalighy, N., Otto, C., Wuerfel, J., Brandt, A. U., Hofmann, J., Eberspächer, B., Bellmann-Strobl, J., Paul, F., & Ruprecht, K. (2017). Epstein-Barr virus antibodies in serum and DNA load in saliva are not associated with radiological or clinical disease activity in patients with early multiple sclerosis. *PLoS one*, *12*(4), e0175279. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175279>.
- ¹¹ Pfuhl, C., Oechtering, J., Rasche, L., Gieß, R. M., Behrens, J. R., Wakonig, K., Freitag, E., Pache, F. C., Otto, C., Hofmann, J., Eberspächer, B., Bellmann-Strobl, J., Paul, F., & Ruprecht, K. (2015). Association of serum Epstein-Barr nuclear antigen-1 antibodies and intrathecal immunoglobulin synthesis in early multiple sclerosis. *Journal of neuroimmunology*, *285*, 156–160. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2015.06.012>.
- ¹² Behrens, J. R., Rasche, L., Gieß, R. M., Pfuhl, C., Wakonig, K., Freitag, E., Deuschle, K., Bellmann-Strobl, J., Paul, F., Ruprecht, K., & Dörr, J. (2016). Low 25-hydroxyvitamin D, but not the bioavailable fraction of 25-hydroxyvitamin D, is a risk factor for multiple sclerosis. *European journal of neurology*, *23*(1), 62–67. <https://doi.org/10.1111/ene.12788>.
- ¹³ Zimmermann, H. G., Knier, B., Oberwahrenbrock, T., Behrens, J., Pfuhl, C., Aly, L., Kaminski, M., Hoshi, M. M., Specovius, S., Giess, R. M., Scheel, M., Mühlau, M., Bellmann-Strobl, J., Ruprecht, K., Hemmer, B., Korn, T., Paul, F., & Brandt, A. U. (2018). Association of Retinal Ganglion Cell Layer Thickness With Future Disease Activity in Patients With Clinically Isolated Syndrome. *JAMA neurology*, *75*(9), 1071–1079. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2018.1011>.
- ¹⁴ Keller, A., Leidinger, P., Meese, E., Haas, J., Backes, C., Rasche, L., Behrens, J. R., Pfuhl, C., Wakonig, K., Gieß, R. M., Jarius, S., Meder, B., Bellmann-Strobl, J., Paul, F., Pache, F. C., & Ruprecht, K. (2015). Next-generation sequencing identifies altered whole blood microRNAs in neuromyelitis optica spectrum disorder which may permit discrimination from multiple sclerosis. *Journal of neuroinflammation*, *12*, 196. <https://doi.org/10.1186/s12974-015-0418-1>.
- ¹⁵ Rasche, L., Heiserich, L., Behrens, J. R., Lenz, K., Pfuhl, C., Wakonig, K., Gieß, R. M., Freitag, E., Eberle, C., Wuerfel, J., Dörr, J., Bauer, P., Bellmann-Strobl, J., Paul, F., Roggenbuck, D., & Ruprecht, K. (2016). Analysis of Lymphocytic DNA Damage in Early Multiple Sclerosis by Automated Gamma-H2AX and 53BP1 Foci Detection: A Case Control Study. *PLoS one*, *11*(1), e0147968. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0147968>.
- ¹⁶ Reiber, H. (2006). Liquordiagnostik. In B. Wildemann, H. Reiber, P. Oschmann P (eds.) *Neurologische Labordiagnostik*. (p.149.) Thieme, Stuttgart.
- ¹⁷ Reiber, H. (2006). Liquordiagnostik. In B. Wildemann, H. Reiber, P. Oschmann P (eds.) *Neurologische Labordiagnostik*. (p.143-146) Thieme, Stuttgart.
- ¹⁸ Stauch, C., Reiber, H., Rauchenzauner, M., Strasak, A., Pohl, D., Hanefeld, F., Gärtner, J., & Rostásy, K. M. (2011). Intrathecal IgM synthesis in pediatric MS is not a negative prognostic marker of disease progression: quantitative versus qualitative IgM analysis. *Multiple sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)*, *17*(3), 327–334. <https://doi.org/10.1177/1352458510388543>.
- ¹⁹ Kleine, T.O. (2019). Liquor-IgM, oligoklonal. In: A.M. Gressner., T. Arndt (eds) *Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik*. (p. 1499). Springer Reference Medizin. Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-662-48986-4_1929.
- ²⁰ Frau, J., Villar, L. M., Sardu, C., Secci, M. A., Schirru, L., Ferraro, D., Coghe, G., Lorefice, L., Fenu, G., Bedin, R., Sola, P., Marrosu, M. G., & Cocco, E. (2018). Intrathecal oligoclonal bands synthesis in multiple sclerosis: is it always a prognostic factor?. *Journal of neurology*, *265*(2), 424–430. <https://doi.org/10.1007/s00415-017-8716-4>.
- ²¹ Huss, A., Abdelhak, A., Halbgebauer, S., Mayer, B., Senel, M., Otto, M., & Tumani, H. (2018). Intrathecal immunoglobulin M production: A promising high-risk marker in clinically isolated syndrome patients. *Annals of neurology*, *83*(5), 1032–1036. <https://doi.org/10.1002/ana.25237>.

-
- ²² Villar, L. M., Masjuan, J., González-Porqué, P., Plaza, J., Sádaba, M. C., Roldán, E., Bootello, A., & Alvarez-Cermeño, J. C. (2002). Intrathecal IgM synthesis predicts the onset of new relapses and a worse disease course in MS. *Neurology*, *59*(4), 555–559. <https://doi.org/10.1212/wnl.59.4.555>.
- ²³ Ferraro, D., Simone, A. M., Bedin, R., Galli, V., Vitetta, F., Federzoni, L., D'Amico, R., Merelli, E., Nichelli, P. F., & Sola, P. (2013). Cerebrospinal fluid oligoclonal IgM bands predict early conversion to clinically definite multiple sclerosis in patients with clinically isolated syndrome. *Journal of neuroimmunology*, *257*(1-2), 76–81. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2013.01.011>.
- ²⁴ Klein, A., Selter, R. C., Hapfelmeier, A., Berthele, A., Müller-Myhsok, B., Pongratz, V., Gasperi, C., Zimmer, C., Mühlau, M., & Hemmer, B. (2019). CSF parameters associated with early MRI activity in patients with MS. *Neurology(R) neuroimmunology & neuroinflammation*, *6*(4), e573. <https://doi.org/10.1212/NXI.0000000000000573>.
- ²⁵ Lemprière S. (2019). Intrathecal immunoglobulin M predicts conversion from CIS to MS. *Nature reviews. Neurology*, *15*(11), 620–621. <https://doi.org/10.1038/s41582-019-0272-3>.
- ²⁶ Alcalá, C., Pérez-Miralles, F. C., Gil-Perotín, S., Casanova, B. (2019). Reader Response: Intrathecal IgM is a strong risk factor for early conversion to multiple sclerosis. Retrieved 2020 June 7 from <https://n.neurology.org/content/reader-response-intrathecal-igm-production-strong-risk-factor-early-conversion-multiple>.
- ²⁷ Boscá, I., Magraner, M. J., Coret, F., Alvarez-Cermeño, J. C., Simó-Castelló, M., Villar, L. M., & Casanova, B. (2010). The risk of relapse after a clinically isolated syndrome is related to the pattern of oligoclonal bands. *Journal of neuroimmunology*, *226*(1-2), 143–146. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2010.05.032>.
- ²⁸ Casanova, B., Lacruz, L., Villar, M. L., Domínguez, J. A., Gadea, M. C., Gascón, F., Mallada, J., Hervás, D., Simó-Castelló, M., Álvarez-Cermeño, J. C., Calles, C., Olascoaga, J., Ramió-Torrentà, L., Alcalá, C., Cervelló, A., Boscá, I., Pérez-Mirallles, F. C., & Coret, F. (2018). Different clinical response to interferon beta and glatiramer acetate related to the presence of oligoclonal IgM bands in CSF in multiple sclerosis patients. *Neurological sciences : official journal of the Italian Neurological Society and of the Italian Society of Clinical Neurophysiology*, *39*(8), 1423–1430. <https://doi.org/10.1007/s10072-018-3442-y>.
- ²⁹ Mailand, M. T., & Frederiksen, J. L. (2020). Intrathecal IgM as a Prognostic Marker in Multiple Sclerosis. *Molecular diagnosis & therapy*, *24*(3), 263–277. <https://doi.org/10.1007/s40291-020-00455-w>.

7. Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Catherina Manon Pfuhl, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Intrathekal synthetisiertes Immunglobulin M als Krankheitsaktivitäts- und prognostischer Biomarker bei Patientinnen und Patienten mit klinisch isoliertem Syndrom und früher Multipler Sklerose“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilserklärung). Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Erstbetreuer, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; www.icmje.org) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

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

22.06.2020

Unterschrift

8. Ausführliche Anteilserklärung

Publikation 1: Pfuhl, C., Grittner, U., Gieß, R. M., Scheel, M., Behrens, J. R., Rasche, L., Pache, F. C., Wenzel, R., Brandt, A. U., Bellmann-Strobl, J., Paul, F., Ruprecht, K., & Oechtering, J.. Intrathecal IgM production is a strong risk factor for early conversion to multiple sclerosis. *Neurology*. 2019.

Im Rahmen meiner Doktorarbeit koordinierte ich und führte im Zeitraum von 2013-2015 regelmäßig zahlreiche Studienvisiten der Berliner CIS-Kohorte am NeuroCure Clinical Research Center (NCRC) Berlin durch. Während der jeweils etwa fünf bis sieben Stunden umfassenden Visiten wurden zahlreiche Daten erhoben, die in die vorliegende Arbeit eingeflossen sind. Die Berliner CIS-Kohorte ist eine seit 2011 laufende prospektive Beobachtungsstudie, die maßgeblich durch Prof. Dr. med. Friedemann Paul, Dr. med. Judith Bellmann-Strobl und PD Dr. med. Klemens Ruprecht geplant wurde und verantwortet wird.

Eigenständig führte ich bei den Visiten unter anderem die Entnahme von Blut- und Speichelproben sowie deren Aufbereitung zur Analyse, eine visuelle Testung sowie eine ausführliche neurokognitive und motorische Testung mittels validierter Tests durch. Unter Supervision von Dr. med. Janina Behrens, Dr. med. Florence Pache oder Dr. med. Judith Bellmann-Strobl führte ich ausführliche neurologische Untersuchungen mit gemeinsamer Festlegung des EDSS-Scores durch. Dr. med. René Gieß, Katharina Wakonig und Dr. med. Ludwig Rasche führten in dieser Zeit zusammen mit mir ebenfalls Studienvisiten im Rahmen ihrer Doktorarbeiten durch. Ich war an der Digitalisierung der analogen Studienprotokolle beteiligt. Außerdem erstellte ich eigenständig einen Fragebogen zum Rauchverhalten und erhob diese Daten bei unseren Studienteilnehmerinnen und -teilnehmern. Diese Auswertung fand zwar nicht in dieser Publikation Verwendung, jedoch in der Publikation zu lymphozytären DNA-Schäden in unserer Studienpopulation.¹⁵

Ich extrahierte selbstständig die kompletten in dieser Arbeit verwendeten Liquordaten aus den Arztbriefen der Patientinnen und Patienten bzw. dem Laborsystem der Charité – Universitätsmedizin Berlin sowie sämtliche andere Daten aus unseren zu dem Zeitpunkt noch analogen Protokollen der Studienvisiten und erfasste die Daten in Exceltabellen. Bei fehlenden Liquordaten gelang es mir bei einem Großteil diese

telefonisch bei externen Kliniken anzufordern. Ausgehend von dieser Datenmatrix wurden sämtliche Berechnungen der vorliegenden Arbeit durchgeführt.

Des Weiteren war ich an der Aufarbeitung der MR-tomographischen Daten und der Daten zur Konversion von CIS zu MS maßgeblich beteiligt.

Ich erstellte die deskriptive Statistik der vorliegenden Arbeit inklusive Tabellen 1 und 2 der Publikation selbstständig. Mittels GraphPad Prism führte ich unter Supervision von Dr. med. Johanna Oechtering und PD Dr. med. Klemens Ruprecht statistische Tests durch (u.a. „Mann-Whitney U Test“ und „Fisher exact test“). Gemeinsam mit PD Dr. phil. Ulrike Grittner und PD Dr. med. Klemens Ruprecht erfolgten die Regressionsanalysen mittels SPSS. Im Anschluss erstellte ich Entwürfe für das Publikationsmanuskript. Einen maßgeblichen Anteil an der endgültigen Überarbeitung der Entwürfe hatte mein Doktorvater PD Dr. med. Klemens Ruprecht. Im Zuge der Beantwortung der Reviewer-Kommentare zu unserem Manuskript beantwortete ich unter anderem einen Kommentarpunkt der Gutachter (möglicher Einfluss einer Durchführung der Liquordiagnostik in unterschiedlichen Liquorlaboren auf die Ergebnisse der Arbeit) selbstständig. Das letztlich angenommene Manuskript wurde maßgeblich durch PD Dr. med. Klemens Ruprecht, Dr. med. Johanna Oechtering und mich erstellt.

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers

Unterschrift der Doktorandin

9. Auszug aus der Journal Summary List

Journal Data Filtered By: **Selected JCR Year: 2017** Selected Editions: SCIE, SSCI

Selected Categories: **“CLINICAL NEUROLOGY”** Selected Category

Scheme: WoS **Gesamtanzahl: 197** Journale

Rank	Full Journal Title	Total Cites	Journal Impact Factor	Eigenfactor Score
1	LANCET NEUROLOGY	28,671	27.138	0.069040
2	Nature Reviews Neurology	8,095	19.819	0.028090
3	ACTA NEUROPATHOLOGICA	18,783	15.872	0.041490
4	Alzheimers & Dementia	10,423	12.740	0.030040
5	JAMA Neurology	6,885	11.460	0.035270
6	BRAIN	52,061	10.840	0.075170
7	SLEEP MEDICINE REVIEWS	6,080	10.602	0.010720
8	ANNALS OF NEUROLOGY	37,251	10.244	0.053390
9	NEURO-ONCOLOGY	10,930	9.384	0.030350
10	Epilepsy Currents	790	9.333	0.001600
11	MOVEMENT DISORDERS	26,511	8.324	0.037980
12	Translational Stroke Research	2,202	8.266	0.005260
13	NEUROLOGY	88,493	7.609	0.115530
14	NEUROSCIENTIST	4,738	7.461	0.008730
15	JOURNAL OF NEUROLOGY NEUROSURGERY AND PSYCHIATRY	29,695	7.144	0.032980
16	STROKE	65,854	6.239	0.088520
17	BRAIN PATHOLOGY	4,952	6.187	0.007750
18	Brain Stimulation	4,263	6.120	0.014510
19	NEUROPATHOLOGY AND APPLIED NEUROBIOLOGY	3,654	6.059	0.006350
20	Neurotherapeutics	3,973	5.719	0.008980
21	PAIN	36,132	5.559	0.038000
22	Multiple Sclerosis Journal	10,675	5.280	0.021890
23	SLEEP	20,547	5.135	0.025870
...

10. Druckexemplar der Publikation

Pfuhl, C., Grittner, U., Gieß, R. M., Scheel, M., Behrens, J. R., Rasche, L., Pache, F. C., Wenzel, R., Brandt, A. U., Bellmann-Strobl, J., Paul, F., Ruprecht, K., & Oechtering, J. (2019). Intrathecal IgM production is a strong risk factor for early conversion to multiple sclerosis. *Neurology*, *93*(15), e1439–e1451.

<https://doi.org/10.1212/WNL.00000000000008237>.

Aus lizenzrechtlichen Gründen wird die Publikation in der elektronischen Version der Dissertation nicht veröffentlicht (Seiten 31-44).

11. Lebenslauf

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

12. Publikationsliste

1. **Pfuhl, C.**, Grittner, U., Gieß, R. M., Scheel, M., Behrens, J. R., Rasche, L., Pache, F. C., Wenzel, R., Brandt, A. U., Bellmann-Strobl, J., Paul, F., Ruprecht, K., & Oechtering, J. (2019). Intrathecal IgM production is a strong risk factor for early conversion to multiple sclerosis. *Neurology*, 93(15), e1439–e1451. <https://doi.org/10.1212/WNL.00000000000008237>.
Impact Factor (2018): 8,689.
2. Zimmermann, H. G., Knier, B., Oberwahrenbrock, T., Behrens, J., **Pfuhl, C.**, Aly, L., Kaminski, M., Hoshi, M. M., Specovius, S., Giess, R. M., Scheel, M., Mühlau, M., Bellmann-Strobl, J., Ruprecht, K., Hemmer, B., Korn, T., Paul, F., & Brandt, A. U. (2018). Association of Retinal Ganglion Cell Layer Thickness With Future Disease Activity in Patients With Clinically Isolated Syndrome. *JAMA neurology*, 75(9), 1071–1079. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2018.1011>.
Impact Factor (2018): 12,321.
3. Gieß, R. M., **Pfuhl C.**, Behrens, J. R., Rasche, L., Freitag, E., Khalighy, N., Otto, C., Wuerfel, J., Brandt, A. U., Hofmann, J., Eberspächer, B., Bellmann-Strobl, J., Paul, F., & Ruprecht, K. (2017). Epstein-Barr virus antibodies in serum and DNA load in saliva are not associated with radiological or clinical disease activity in patients with early multiple sclerosis. *PloS one*, 12(4), e0175279. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175279>.
Impact Factor (2018): 2,776.
4. Schlemm, L., Giess, R. M., Rasche, L., **Pfuhl, C.**, Wakonig, K., Behrens, J. R., Scheibenbogen, C., Bellmann-Strobl, J., Paul, F., Reimer, U., & Ruprecht, K. (2016). Fine specificity of the antibody response to Epstein-Barr nuclear antigen-2 and other Epstein-Barr virus proteins in patients with clinically isolated syndrome: A peptide microarray-based case-control study. *Journal of neuroimmunology*, 297, 56–62. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2016.05.012>.
Impact Factor (2018): 2,832.
5. Rasche, L., Heiserich, L., Behrens, J. R., Lenz, K., **Pfuhl, C.**, Wakonig, K., Gieß, R. M., Freitag, E., Eberle, C., Wuerfel, J., Dörr, J., Bauer, P., Bellmann-Strobl, J.,

Paul, F., Roggenbuck, D., & Ruprecht, K. (2016). Analysis of Lymphocytic DNA Damage in Early Multiple Sclerosis by Automated Gamma-H2AX and 53BP1 Foci Detection: A Case Control Study. *PloS one*, 11(1), e0147968.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0147968>.

Impact Factor (2018): 2,776.

6. Behrens, J. R., Rasche, L., Gieß, R. M., **Pfuhl, C.**, Wakonig, K., Freitag, E., Deuschle, K., Bellmann-Strobl, J., Paul, F., Ruprecht, K., & Dörr, J. (2016). Low 25-hydroxyvitamin D, but not the bioavailable fraction of 25-hydroxyvitamin D, is a risk factor for multiple sclerosis. *European journal of neurology*, 23(1), 62–67.

<https://doi.org/10.1111/ene.12788>.

Impact Factor (2018): 4,387.

7. Keller, A., Leidinger, P., Meese, E., Haas, J., Backes, C., Rasche, L., Behrens, J. R., **Pfuhl, C.**, Wakonig, K., Gieß, R. M., Jarius, S., Meder, B., Bellmann-Strobl, J., Paul, F., Pache, F. C., & Ruprecht, K. (2015). Next-generation sequencing identifies altered whole blood microRNAs in neuromyelitis optica spectrum disorder which may permit discrimination from multiple sclerosis. *Journal of neuroinflammation*, 12, 196. <https://doi.org/10.1186/s12974-015-0418-1>.

Impact Factor (2018): 5,700.

8. **Pfuhl, C.**, Oechtering, J., Rasche, L., Gieß, R. M., Behrens, J. R., Wakonig, K., Freitag, E., Pache, F. C., Otto, C., Hofmann, J., Eberspächer, B., Bellmann-Strobl, J., Paul, F., & Ruprecht, K. (2015). Association of serum Epstein-Barr nuclear antigen-1 antibodies and intrathecal immunoglobulin synthesis in early multiple sclerosis. *Journal of neuroimmunology*, 285, 156–160.

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

Impact Factor (2018): 2,832.

Posterpräsentation auf dem Kongress des ECTRIMS (European Committee for Treatment and Research in Multiple Sclerosis) 2015 in Barcelona, Spanien:

Oechtering, J., **Pfuhl, C.**, Wenzel, R., Behrens, J. R., Rasche, R., Giess, R. M., Wuerfel, J., Brandt, A.U., Wakonig, K., Pache, F. C., Freitag, E., Bellmann-Strobl, J.,

Paul, F., & Ruporecht, K. (2015). Differential associations of intrathecally produced immunoglobulin (Ig)G and M with radiological findings in early multiple sclerosis. ECTRIMS Online Library. Retrieved 2020 June 10 from <https://onlinelibrary.ectrims-congress.eu/ectrims/2015/31st/116281/johanna.oechtering.differential.associations.of.intrathecally.produced.html?f=listing%3D0%2Abrowseby%3D8%2Asortby%3D1%2Asearch%3Doechtering> (Posterpräsentation durch Dr. med. J. Oechtering)

Vortrag auf der Fortbildung “Update Multiple Sklerose 2018“ am 17.11.2018, Charité Universitätsmedizin Berlin.

Veranstalter: Klinik und Poliklinik für Neurologie, NeuroCure Clinical Research Center, Klinisches und Experimentelles Forschungszentrum für MS.

Pfuhl, C. Intrathekale IgM-Synthese: Ein neuer relevanter Biomarker bei MS.

13. Danksagung

Zuerst möchte ich meinem Doktorvater PD Dr. med. Klemens Ruprecht danken nicht nur für die Überlassung des Themas, sondern besonders für seine außerordentliche Verbindlichkeit, ständige Erreichbarkeit bei Rückfragen und durchweg wunderbare Unterstützung. Durch seinen Einsatz wurde dieses Projekt maßgeblich vorangebracht. Seine Begeisterung für die Klinische Neurologie und die Wissenschaft sind eine Inspiration.

Des Weiteren möchte ich allen Kolleginnen und Kollegen aus der Arbeitsgruppe Klinische Neuroimmunologie „AG Paul“ des NeuroCure Clinical Research Centers danken für die stets kollegiale und konstruktive und oftmals heitere Zusammenarbeit. Insbesondere sind hier Dr. med. Janina Behrens, Dr. med. Ludwig Rasche und Dr. med. René Gieß zu nennen. Ich bin dankbar für die Möglichkeiten, die mir dieses Projekt und die Arbeitsgruppe boten

Ein ganz besonderer Dank gilt unseren 150 Patientinnen und Patienten, die sich ohne finanzielle Aufwandschädigung den ausführlichen Studienvisiten zu Verfügung stellten. Es war für mich eine sehr besondere Erfahrung einen Großteil der Studienteilnehmerinnen und -teilnehmer persönlich kennenzulernen und sie teilweise über eine längere Zeit zu begleiten. Außerdem lernte ich so die sehr variablen Krankheitsverläufe kennen und konnte den unterschiedlichen persönlichen Umgang der Patientinnen und Patienten mit der Erkrankung wahrnehmen. Ich wünsche ihnen von Herzen, dass sich der stete wissenschaftliche Fortschritt in der MS-Forschung günstig auf ihr Leben auswirkt.

Zuletzt danke ich meiner Familie und meinen Freundinnen und Freunden für die langanhaltende persönliche Unterstützung und Motivation, besonders meinem Partner Bo Kundy für seine ständige Präsenz in allen Lebenslagen.