

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN  
Klinik und Poliklinik für Neurologie, Klinikum rechts der Isar  
(Direktor: Prof. Dr. B. Hemmer)

**Genomweite Assoziationsstudie**  
**zu Liquorveränderungen**  
**bei Multipler Sklerose**

Natalie Beate Cathrin Giehl

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Medizin genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Prof. Dr. E. J. Rummeny

Prüfer der Dissertation:

1. Prof. Dr. B. Hemmer
2. Prof. Dr. M. Mühlau

Die Dissertation wurde am 15.07.2016 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 18.10.2017 angenommen.

# INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	4	
1	EINLEITUNG	6
1.1	Multiple Sklerose – eine Einführung	6
1.2	Einfluss der Genetik auf Multiple Sklerose	8
1.3	Liquordiagnostik bei Multipler Sklerose	9
1.3.1	Allgemeines zur Liquordiagnostik	9
1.3.2	Zellzahl im Liquor	10
1.3.3	Schrankenfunktion	10
1.3.4	Intrathekale Immunglobulin-Synthese	11
1.4	Ziel der Arbeit	15
2	PATIENTENKOLLEKTIVE, MATERIAL UND METHODIK	16
2.1	Verwendete Materialien	16
2.2	Patientenkollektive	20
2.3	Molekularbiologische Methoden	22
2.3.1	DNA-Extraktion	22
2.3.2	Genotypisierung des Initialkollektivs und des zweiten Validierungskollektivs mittels Bead-Chip-Verfahren von Illumina	23
2.3.3	Genotypisierung des ersten Validierungskollektivs mittels MALDI- TOF-Verfahren von Sequenom	25
2.4	Statistische Methoden	30
3	ERGEBNISSE	33
3.1	Patientenkollektive	33
3.2	Vergleich der intraindividuellen Variation der intrathekalen IgG- Synthese	35
3.3	Genetische Assoziation mit der Zellzahl im Liquor	36
3.4	Genetische Assoziation mit der berechneten intrathekalen IgA- Synthese (IgA <sub>IF</sub> )	39

3.5	Genetische Assoziation mit der berechneten intrathekalen IgM-Synthese (IgM <sub>IF</sub> )	40
3.6	Genetische Assoziation mit der intrathekalen IgG-Synthese	41
3.6.1	Berechnete IgG-Synthese (IgG <sub>IF</sub> )	41
3.6.2	IgG-Index	43
3.7	Assoziation der intrathekalen IgG-Synthese mit dem IGHC-Locus	49
3.8	Assoziation der beschriebenen SNPs mit der Prädisposition zu Multipler Sklerose	50
3.9	Zusammenfassung der Ergebnisse	51
4	DISKUSSION	53
5	ZUSAMMENFASSUNG	59
	LITERATURVERZEICHNIS	61
	TABELLEN- UND ABBILDUNGSVERZEICHNIS	72
	DANKSAGUNG	74

# ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Alb	Albumin
bp	Basenpaar
CIS	Clinically isolated syndrome (Klinisch isoliertes Syndrom)
CSF	Cerebrospinal fluid (Liquor cerebrospinalis)
EBV	Epstein-Barr-Virus
ELISA	enzyme linked immosorbent assay
Gm	Genetic marker (der schweren Ketten des IgG)
GWAS	Genomweite Assoziationsstudie
IEF	Isoelektrische Fokussierung
Ig	Immunglobulin
IGHC	Immunoglobulin heavy chain (Immunglobulinschwerkette)
MHC	Major Histocompatibility Complex
MRT	Magnetresonanztomographie
MS	Multiple Sklerose
OKB	Oligoklonale Banden
PCR	Polymerase chain reaction
pHWE	p-Wert des Hardy-Weinberg-Gleichgewichts
PPMS	Primary progressive multiple sclerosis (primär chronisch-progrediente Multiple Sklerose)
Q	Quotient
rpm	Umdrehungen pro Minute
RRMS	Relapsing-remitting multiple sclerosis (schubförmig-remittierende Multiple Sklerose)

SNP	Single Nucleotide Polymorphism (Einzelnukleotidpolymorphismus)
SPMS	Secondary progressive multiple sclerosis (sekundär chronisch-progrediente Multiple Sklerose)
ZNS	Zentrales Nervensystem

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 Multiple Sklerose – eine Einführung

Die Multiple Sklerose (MS) ist nach derzeitigem Stand der Wissenschaft eine chronisch-entzündliche Erkrankung des zentralen Nervensystems (ZNS). Die MS zählt zu den häufigen neurologischen Krankheiten und ist in Nordamerika und Europa die häufigste Ursache für eine nicht-traumatisch bedingte Behinderung im jungen Erwachsenenalter (Hirtz et al., 2007; Weinshenker, 1996). Die MS wird typischerweise in der dritten oder vierten Lebensdekade erstdiagnostiziert (Compston and Coles, 2002; Trapp and Nave, 2008). Weltweit sind 2,5 Millionen Menschen betroffen (Freedman, 2006), wobei die Prävalenz in Nord- und Zentraleuropa mit 1:1000 am höchsten ist (Ebers, 2008; Noseworthy et al., 2000).

Durch eine Entzündung im ZNS kommt es zu einer zunehmenden Demyelinisierung von Nervenfasern und auch zu axonaler Schädigung (Trapp et al., 1998; Trapp and Nave, 2008). Schon zu Beginn der Erkrankung und im weiteren Krankheitsverlauf zunehmend werden außerdem neurodegenerative Prozesse beobachtet. Alle diese Veränderungen können zu einer entsprechenden klinischen Symptomatik führen.

Patienten mit MS entwickeln zumeist eines oder mehrere folgender Symptome: Sehstörungen, Doppelbilder, Sensibilitätsstörungen, Lähmungen, eine Gleichgewichtstörung oder eine Blasen- / Mastdarmschwäche (Frohman et al., 2003). Der klinische Verlauf der MS ist sehr unterschiedlich (Trapp and Nave, 2008). Etwa 85% aller MS-Patienten haben zu Beginn einen schubförmig-remittierenden Krankheitsverlauf (RRMS). Dies bedeutet, dass sich Episoden mit neurologischen Symptomen, d.h. Schübe entwickeln, die sich zumindest initial zurückbilden und von Phasen ohne Krankheitssymptome abgelöst werden. Ein klinisch isoliertes Syndrom (CIS) wird nach einem ersten Schub diagnostiziert, wenn alle Diagnosekriterien einer MS vorliegen, jedoch der chronische Verlauf der Erkrankung (noch) nicht nachgewiesen ist. Bei der Mehrzahl der Patienten mit initial schubförmigem Verlauf kommt es später zu dem sogenannten sekundär chronisch-progredienten Verlauf (SPMS) (Hauser and Oksenberg, 2006; Trapp and Nave, 2008). Der sekundär chronisch-progrediente Verlauf ist durch eine von Schüben unabhängige, schleichende Verschlechterung der neurologischen Symptome, v.a. der Gehfähigkeit, gekennzeichnet.

Bis zu 15% aller MS-Patienten haben bereits von Beginn an eine schleichende Zunahme der neurologischen Symptome, was dann als primär chronisch-progredienter Verlauf (PPMS) bezeichnet wird. Von dem schubförmig-remittierenden Krankheitsverlauf sind zunehmend häufiger Frauen als Männer betroffen. Aktuell wird von einem Geschlechter-Verhältnis von 3:1 ausgegangen (Celius and

Vandvik, 2001; Debouverie et al., 2007; Orton et al., 2006; Sellner et al., 2011). Die primär chronische Form der MS tritt zumeist später im Leben und bei Männern und Frauen gleich häufig auf (Trapp and Nave, 2008).

Die Diagnose einer MS wird anhand der sogenannten McDonald Kriterien gestellt. Hierbei handelt es sich um ein Konsensuspapier eines internationalen Expertengremiums, das 2001 erstmals erschienen ist und zuletzt 2010 überarbeitet wurde (McDonald et al., 2001; Polman et al., 2005; Polman et al., 2011). Hauptdiagnosekriterien sind bei Vorliegen einer typischen klinischen Symptomatik der klinische und/oder paraklinische Nachweis von Krankheitsaktivität mit örtlicher und zeitlicher Dissemination sowie der Ausschluss anderer Ursachen für die Symptomatik. Als paraklinischer Parameter dient vor allem die Bildgebung mittels Magnetresonanztomografie (MRT). Eine Liquordiagnostik kann nach den McDonald Kriterien zudem zur Diagnose einer PPMS herangezogen werden (McDonald et al., 2001; Polman et al., 2005; Polman et al., 2011; Tumani et al., 2011). Vor allem in Europa wird weiterhin bei jedem Patienten im Rahmen der Erstdiagnose eine Liquoruntersuchung empfohlen, um mögliche Differentialdiagnosen einer Multiplen Sklerose auszuschließen und bei typischem Liquorbefund schon in der Frühphase der Erkrankung die Diagnose zu erhärten (Tumani et al., 2011).

Nach derzeitigem Wissensstand handelt es sich bei der MS um eine Autoimmunerkrankung (Compston and Coles, 2002), bei der T-Zellen aber auch B-Zellen mit dem humoralen Immunsystem eine wesentliche Rolle spielen (Compston and Coles, 2008; Disanto et al., 2012). Die Beteiligung von B-Zellen und dem humoralen Immunsystem an der Krankheitsentstehung und Krankheitsaktivität wird durch folgende Beobachtungen gestützt: in Liquor, Meningen und den MS-charakteristischen ZNS-Läsionen wurde eine Akkumulation von klonalen B-Zellen, Antikörperproduzierenden Plasmazellen sowie Komplementablagerungen nachgewiesen (Baranzini et al., 1999; Cepok et al., 2005; Owens et al., 1998; Storch et al., 1998). Komplementablagerungen werden dabei vor allem bei Patienten gefunden, die besonders gut auf eine Plasmapherese zur eskalierten Schubtherapie ansprechen (Keegan et al., 2005; Weinshenker et al., 1999). Außerdem wurde in mehreren klinischen Studien belegt, dass B-Zell depletierende Therapien mit Anti-CD20-Antikörpern den Verlauf der Erkrankung positiv beeinflussen (Hauser et al., 2008; Kappos et al., 2011; Piccio et al., 2010).

Viele Aspekte der Pathogenese der MS sind allerdings noch immer weitgehend unklar und beim einzelnen Patienten kann nach wie vor nicht benannt werden, was letztlich die Erkrankung ausgelöst hat. In den letzten Jahren konnten verschiedene Faktoren identifiziert werden, die die Entwicklung einer Multiplen Sklerose möglicherweise beeinflussen. Dazu zählen eine Infektion mit dem Epstein-Barr-Virus (EBV) im Kindesalter, ein niedriger Vitamin-D-Spiegel, ein Nikotinabusus und eine genetische Prädisposition (Ascherio and Munger, 2007a; Ascherio and Munger, 2007b; Di Pauli et al.,

2008; Simon et al., 2010). Letztlich geht man derzeit von einer multifaktoriellen Genese der MS aus, bestehend aus Umwelteinflüssen bei Menschen mit entsprechender genetischer Prädisposition (Ascherio and Munger, 2007a; Ascherio and Munger, 2007b; Hafler et al., 2007; Noseworthy et al., 2000; Oksenberg et al., 2008; Sospedra and Martin, 2005).

## 1.2 Einfluss der Genetik auf Multiple Sklerose

Epidemiologische Daten haben erste Hinweise dafür gegeben, dass genetische Faktoren bei der Entstehung einer MS eine Rolle spielen. So haben 15% der MS-Patienten eine positive Familienanamnese für MS (Compston and Coles, 2002). In Europa und Nordamerika beträgt die Prävalenz von MS etwa 0,1%. Geschwister von MS-Patienten haben dagegen mit 3% ein höheres, eineiige Zwillinge mit 15 - 35% eine deutlich höheres Risiko, eine Multiple Sklerose zu entwickeln (Compston and Coles, 2002). Eine Vererbung nach den Mendel'schen Regeln liegt bei der MS nicht vor (De Jager et al., 2009). Frühe Kopplungsanalysen konnten deshalb die genetischen Grundlagen der Multiplen Sklerose nicht entschlüsseln. Erst durch den technologischen Fortschritt der Genotypisierungsverfahren und durch genomweite Assoziationsanalysen mit großen Fallzahlen ist es gelungen, zahlreiche Varianten von Genen zu identifizieren, die die Prädisposition zur Krankheitsentstehung einer MS beeinflussen (De Jager et al., 2009; Hafler et al., 2007; Patsopoulos et al., 2011; Sawcer, 2008; Sawcer et al., 2011b).

Mit genomweiten Assoziationsstudien (GWAS) kann der Zusammenhang von Einzelnukleotidpolymorphismen, sogenannten SNPs (single nucleotide polymorphism), mit einem Phänotyp untersucht werden. Typischerweise werden dabei genetische Varianten untersucht, die in der Gesamtbevölkerung zu mindestens fünf Prozent auftreten. Dieser Zusammenhang wird in unabhängigen Kontrollkollektiven überprüft. Für genomweite Assoziationsstudien gilt gewöhnlich ein Signifikanzniveau von  $5 \times 10^{-8}$ , da für multiples Testen von bis zu einer Million unabhängiger Genorte korrigiert wird (Hardy and Singleton, 2009).

Als erstes genetisches Merkmal der MS wurde vor über 40 Jahren die HLA-(humane Leukozytenantigen) Region entdeckt (Jersild et al., 1972). Die HLA-Region ist auf Chromosom 6 lokalisiert und kodiert für zellmembranständige Oberflächen-Proteine, die die individuelle Immunregulation wesentlich mitbestimmen. Die HLA-Region weist eine besonders hohe Dichte an Polymorphismen auf und ein starkes Kopplungsungleichgewicht, so dass zwei nebeneinander liegende Gene häufiger gemeinsam vererbt werden, als statistisch zu erwarten ist (Horton et al., 2004). Auch in aktuellen

Studien zeigt der HLA-Locus mit dem Klasse II Allel HLA-DRB1\*15:01 die stärkste Assoziation mit MS (Sawcer et al., 2011a) und wurde in allen bisher untersuchten Populationen bestätigt (Compston, 2006). Weitere Assoziationen innerhalb des HLA-Locus wurden für DRB1\*03:01-DQB1\*02:01 und DRB1\*13:01 sowie dem klassischen HLA-A\*02:01 Allel gefunden, wobei Letzteres einen protektiven Effekt aufweist (1976a; Moutsianas et al., 2015; Sawcer et al., 2011a; Yeo et al., 2007).

Neben der HLA-Region wurden bislang 110 weitere Polymorphismen beschrieben, die mit einer Prädisposition für MS assoziiert sind (Beecham et al., 2013). Die meisten dieser Polymorphismen liegen in Genen, die eine immunologisch relevante Funktion codieren, was die Hypothese, dass die Multiple Sklerose eine Autoimmunerkrankung ist, wesentlich unterstützt (Hafler et al., 2007; Sawcer et al., 2011b). Bei den Varianten, die bislang identifiziert werden konnten, handelt es sich um sogenannte häufige Polymorphismen, die auch in der gesunden Bevölkerung vorkommen und von denen jeder einzelne nur eine kleine Effektstärke hinsichtlich des Krankheitsrisikos aufweist (Sawcer et al., 2011a).

## **1.3 Liquordiagnostik bei Multipler Sklerose**

### **1.3.1 Allgemeines zur Liquordiagnostik**

Die Entnahme von Liquor cerebrospinalis aus dem Subarachnoidalraum ist ein wichtiger Bestandteil der neurologischen Diagnostik zur Sicherung einer klinischen Verdachtsdiagnose. Quantitativer Nachweis oder Ausschluss von Erregern, Zellen, Proteinen oder Entzündungsfaktoren liefern wichtige Ergebnisse für Diagnose und Therapie verschiedener neurologischer Erkrankungen. Einen MS-spezifischen Liquorbefund gibt es nicht, doch findet sich bei Patienten mit einer MS typischerweise eine lymphomonozytäre Pleozytose, eine intrathekale IgG-Synthese mit Nachweis oligoklonaler Banden im Liquor sowie eine Antikörperreaktion gegen Masern, Röteln und Zoster (MRZ-Reaktion) (Tumani et al., 2009). In den europäischen Leitlinien der Liquordiagnostik bei Multipler Sklerose von 1994 wurde der Nachweis von oligoklonalen Banden als einzig obligatorischer Test festgesetzt. Eine Bestimmung der Blut-Liquor-Schrankenfunktion, des IgG-Quotienten und der Zellzahl werden als hilfreiche Zusatzparameter empfohlen (Andersson et al., 1994).

### 1.3.2 Zellzahl im Liquor

Die Bestimmung der Zellzahl zur Quantifizierung von Leukozyten im Liquor ist bei Erkrankungen des ZNS wesentlicher Bestandteil der Liquordiagnostik. Zellzahl und Zelldifferenzierung müssen innerhalb der ersten zwei Stunden (idealerweise in den ersten 30 Minuten) nach Lumbalpunktion bestimmt werden, da es dann bereits zu einer Lyse von Erythrozyten und Leukozyten kommen kann (Wick, Liquordiagnostik, Buch Nr. 1). Die Zellzahl wird mit Hilfe der Fuchs-Rosenthal-Kammer bestimmt, bei Normozytose kann eine Zellzahlbestimmung durch Membranfilter zu besseren Ergebnissen führen (Burechailo and Cunningham, 1974). Beim Gesunden findet man 0-4 Leukozyten/ $\mu\text{l}$ , darunter etwa 2/3 Lymphozyten und 1/3 Monozyten. Bei zwei Drittel der MS-Patienten zeigt sich kein Anstieg der Zellzahl, bei einem Drittel eine leichte Pleozytose bis 50 Leukozyten/ $\mu\text{l}$  (Drulovic et al., 1995; Freedman et al., 2005). Eine Pleozytose  $>50$  Leukozyten/ $\mu\text{l}$  ist für eine MS ungewöhnlich und sollte dazu führen, dass die Diagnose einer MS kritisch überprüft wird (Awad et al., 2010).

### 1.3.3 Schrankenfunktion

Die sogenannte Blut-Liquor-Schranke wird von Kapillaren sowie der Basalmembran der perivaskulären Zellschicht gebildet und reguliert den Austausch von Zellen und Molekülen zwischen Blut und Zerebrospinalflüssigkeit. Um den Zusammenhang zwischen Proteinen im Blut und im Liquor zu beschreiben, spricht man von einer funktionellen Blut-Liquor-Schrankenfunktion, die bei Erkrankungen des ZNS eine besondere Rolle spielt. Die absolute Konzentration eines Proteins im Liquor hängt nicht nur von der Blut-Liquor-Schrankenfunktion, sondern auch von der Serumkonzentration, dem Liquorfluss, der Molekülgröße, dem Patientenalter und dem Liquorvolumen ab (Andersson et al., 1994).

Albumin ist der ideale Parameter um die Blut-Liquor-Schrankenfunktion zu bestimmen, da es ausschließlich in Hepatozyten synthetisiert wird. Für den Gesamtproteingehalt des Liquors besteht kein derart spezifischer Zusammenhang. Daher stellt der Albumin-Liquor-Serum-Konzentrationsquotient ( $Q_{\text{Alb}} = \text{Alb (CSF)}/\text{Alb (Serum)}$ ) das beste quantitative Maß für die Blut-Liquor-Schrankenfunktion dar (Andersson et al., 1994; Reiber et al., 2003). Der Albumin-Quotient ist altersabhängig (Tabelle 1), mit starken Schwankungen innerhalb der ersten vier Lebensmonate, auf die hier jedoch nicht näher eingegangen wird. Einen Näherungswert gibt auch die Formel  $Q_{\text{Alb}} < (4 + \text{Alter}/15) \times 10^{-3}$ . Der Hauptmodulator der Dynamik der Liquorproteine und somit der Blut-Liquor-Schrankenfunktion ist die Liquorflussgeschwindigkeit (Reiber, 2001; Reiber, 2003). Die Albuminkonzentration bzw. der Albuminquotient steigen daher mit zunehmendem Alter des Menschen, weil die Liquorflussgeschwindigkeit, aber auch die Liquorproduktionsgeschwindigkeit sinken.

**Tabelle 1: Altersabhängigkeit des Albuminquotienten****(Andersson et al., 1994)**

Alter des Patienten (in Jahren)	$Q_{\text{Alb}}$ (oberer Referenzwert für die ersten 10 ml lumbal gewonnenen Liquors)
Unter 15	$5,0 \times 10^{-3}$
16-40	$6,5 \times 10^{-3}$
40-60	$8,0 \times 10^{-3}$
Über 60	$8-9 \times 10^{-3}$

Bei MS-Patienten ist der Albuminquotient selten und dann meist nur leicht erhöht (Wildemann, Neurologische Labordiagnostik, Buch Nr. 2), was bedeutet, dass bei ca. 10% der MS-Patienten eine Schrankenstörung vorliegt. In der vorliegenden Arbeit wird der Albuminquotient nicht genauer untersucht, spielt jedoch zur Quantifizierung der intrathekalen Immunglobulin-Synthese (IgG, IgA, IgM) eine große Rolle.

### **1.3.4 Intrathekale Immunglobulin-Synthese**

#### *1.3.4.1 Allgemeines*

Eine intrathekale Immunglobulin-Synthese, d.h. eine Produktion von Immunglobulinen im Liquorkompartiment, dient als Nachweis für eine entzündliche Erkrankung des ZNS. Die intrathekale Synthese von IgG gilt als der wichtigste Liquorparameter für die Diagnose einer MS (Ohman et al., 1992). Insbesondere die Isotypen IgG1 und IgG3 (Greve et al., 2001) sind bei der MS erhöht. IgG ist entweder mit qualitativen Methoden (Nachweis von oligoklonalen Banden) oder mit quantitativen Tests messbar. Quantitative Tests sind weniger sensitiv für MS als qualitative Methoden: OKBs sind bei ca. 90-95% aller MS-Patienten nachweisbar, eine quantitativ nachweisbare intrathekale IgG-Synthese dagegen nur bei ca. 70% (Link and Huang, 2006). Studien haben gezeigt, dass das Ausmaß der intrathekalen IgG-Synthese bei verschiedenen MS-Patienten variiert, jedoch beim individuellen Patienten relativ stabil bleibt (Schipper, 1989; Walsh and Tourtellotte, 1986; Warren and Catz, 1985). Therapeutische Ansätze wie Glukokortikoide, Interferon-Beta, B-Zell-Depletion oder autologe

Stammzelltransplantation verändern die individuelle intrathekale IgG-Synthese kaum (Archelos et al., 2000; Piccio et al., 2010; Saiz et al., 2001), selbst wenn es darunter zu einer Reduktion der B-Zellen im Liquor kommt (Piccio et al., 2010).

#### 1.3.4.2 Qualitätsmessungen: Oligoklonale Banden

Der Nachweis von oligoklonalen Banden (OKB) ist - verglichen mit allen anderen qualitativen und quantitativen Tests - die sensitivste Methode, eine intrathekale Immunglobulin-Synthese nachzuweisen (Andersson et al., 1994; Freedman et al., 2005). OKB werden mittels Elektrophorese in zeitgleich abgenommenen Serum- und Liquorproben nachgewiesen. Die fünf klassischen Befundmuster von OKB sind in Tabelle 2 dargestellt.

**Tabelle 2: Befundmuster von oligoklonalen Banden**  
(Andersson et al., 1994; Freedman et al., 2005)

Typ	Oligoklonale Banden	Interpretation
1	Keine OKB in Liquor und Serum	Normalbefund
2	OKB ausschließlich im Liquor	<b>Intrathekale Ig-Synthese</b>
3	OKB im Liquor und zusätzlich identische Banden in Liquor und Serum	<b>Intrathekale Ig-Synthese</b>
4	Identische OKB in Liquor und Serum	Keine intrathekale Ig-Synthese; systemische Immunreaktion ohne intrathekale Beteiligung
5	Monoklonale Banden in Liquor und Serum	Keine intrathekale Ig-Synthese; Banden durch Paraproteine

Die sensitivste Methode (>95%) zum Nachweis von OKB ist die isoelektrische Fokussierung (IEF) auf Agarose-Gel mit anschließendem Western Blot (Awad et al., 2010; Fortini et al., 2003; Keir et al., 1990; Keren, 2003). OKB werden als positiv definiert, wenn mindestens zwei liquorspezifische Banden detektiert werden (Awad et al., 2010; Link and Huang, 2006). Eine weitere, jedoch weniger sensitive Methode, um OKB nachzuweisen, ist die Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) mit anschließender Silberfärbung (Awad et al., 2010; Luque and Jaffe, 2007).

Mehr als 95% aller Patienten mit klinisch definitiver MS haben positive oligoklonale IgG-Banden (Tumani et al., 2011). IgG-OKB sind jedoch nicht spezifisch für eine MS (Andersson et al., 1994). Sie haben einen hohen negativen, jedoch einen niedrigen positiven prädiktiven Wert, so dass sie lediglich ein guter Screening-Marker sind (Awad et al., 2010). Verschiedene Untersuchungen, ob OKB möglicherweise auch einen prognostischen Wert haben, deuten darauf hin, dass Patienten mit klinisch isoliertem Syndrom und nachweisbaren OKB ein erhöhtes Risiko für die Entstehung einer manifesten MS haben (Dobson et al., 2013; Joseph et al., 2009; Lourenco et al., 2012; Siritho and Freedman, 2009). Eine Reduktion der OKB bei klinischer Besserung oder durch medikamentöse Therapie tritt in der Regel nicht ein (Cross et al., 2006; Rudick et al., 1999; Stuve et al., 2009).

Oligoklonale Banden vom IgA- und IgM-Typ spielen bei der Diagnostik einer MS eine untergeordnete Rolle (Awad et al., 2010). IgA-Banden sind bei MS-Patienten eher ungewöhnlich und sollten an Differentialdiagnosen denken lassen (Andersson et al., 1994; Martino et al., 1993; Mehta et al., 1984). IgM-Banden werden bei etwa 30-60% aller MS-Patienten gefunden, meistens in der Frühphase der Erkrankung (Lolli et al., 1991; Sharief and Thompson, 1991; Villar et al., 2005).

#### 1.3.4.3 Quantitätsmessung: IgG-Index und Quotientendiagramme

Zur quantitativen Differenzierung von Immunglobulinen im Liquorkompartiment müssen eine Lumbalpunktion und eine venöse Blutentnahme zum gleichen Zeitpunkt erfolgen, um die Werte in Relation zueinander setzen zu können. Dazu bildet man Liquor-Serum-Quotienten der verschiedenen Immunglobulin-Konzentrationen und von Albumin.

Der IgG-Index wird nach Delpech und Lichtblau mit folgender Formel berechnet (Delpech and Lichtblau, 1972):

$$\text{IgG-Index} = \left[ \frac{Q_{\text{IgG}}}{Q_{\text{Alb}}} \right] = \left[ \frac{\text{IgG (CSF)}}{\text{IgG (Serum)}} \right] / \left[ \frac{\text{Alb (CSF)}}{\text{Alb (Serum)}} \right]$$

Er stellt einen linearen Ansatz zur Quantifizierung der intrathekalen IgG-Synthese dar (Link and Huang, 2006). Ist er auf über 0,66 erhöht, geht man von einer IgG-Produktion im ZNS aus (Awad et al., 2010). Einen erhöhten IgG Index findet man nur bei ca. 70% der Patienten mit MS (Link and Huang, 2006), so dass dieser Parameter in der klinischen Anwendung nicht so sensitiv wie der Nachweis von OKB ist. Reiber und Felgenhauer haben bei der grafischen Darstellung der Quotienten gezeigt, dass die Grenzlinie zwischen intrathekalen Ig-Synthese und Ig-Diffusion aus dem Blut nicht linear verläuft, sondern durch eine hyperbolische Funktion beschrieben wird (Reiber and Felgenhauer, 1987). Im Beispiel hier die Hyperbelfunktion für IgG:

$$Q_{\text{Lim}} (\text{IgG}) = 0,93 \sqrt{(Q_{\text{Alb}})^2 + 6 \cdot 10^{-6}} - 1,7 \cdot 10^{-3}$$

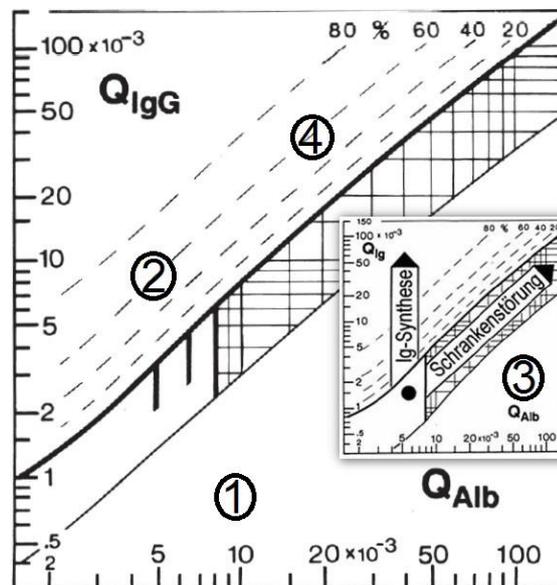
Wenn eine intrathekale IgG-Synthese vorliegt, kann sie nach folgender Formel berechnet werden:

$$Ig_{Loc} = [ Q_{IgG} - Q_{Lim}(IgG) ] * Ig_{Serum}$$

Im Quotientendiagramm (Abb.1) kann man erkennen, ob eine Schrankenfunktionsstörung und/oder eine lokale Ig-Synthese vorliegen. Typische Befundkonstellationen können somit auf einen Blick einer bestimmten Erkrankung zugeordnet werden. Auf x- und y-Achse werden jeweils Albuminquotient und Ig-Quotient aufgetragen, so dass sich folgende vier Befundkonstellationen ergeben (Andersson et al., 1994):

1. Normalbefund
2. Isolierte lokale Ig-Synthese
3. Isolierte Schrankenfunktionsstörung
4. Kombinierte lokale Ig-Synthese und Schrankenfunktionsstörung

Eine isolierte lokale Ig-Synthese ist typisch für Multiple Sklerose und kommt so als Diagnostikmarker in Deutschland zum Einsatz.



**Abb. 1: Quotientendiagramm nach Reiber**

((Reiber, 1994); Homepage 1, siehe Literaturverzeichnis)

## 1.4 Ziel der Arbeit

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Frage, ob bei Multipler Sklerose das Ausmaß der Pleozytose sowie der intrathekalen Antikörper-Synthese genetisch determiniert ist. Studien konnten zeigen, dass das Ausmaß der intrathekalen Synthese von IgG bei MS-Patienten relativ stabil bleibt und nicht durch Medikamente beeinflusst wird. Somit ergibt sich die Hypothese, dass genetische Varianten das Ausmaß der intrathekalen IgG-Synthese beeinflussen. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde eine genomweite Assoziationsstudie mit der Liquorzellzahl und Parametern der intrathekalen Immunglobulinsynthese bei Patienten mit Multipler Sklerose durchgeführt.

## 2 PATIENTENKOLLEKTIVE, MATERIAL UND METHODIK

### 2.1 Verwendete Materialien

Tabelle 3: Zur DNA-Extraktion verwendete Materialien

Material	Hersteller
<i>Verbrauchsmaterialien</i>	
Röhrchen 50 ml	Sarstedt
Safe-Seal Röhrchen 1,5 ml	Sarstedt
Filterspitzen für Pipetten	Eppendorf
<i>Reagenzien</i>	
Cell Lysis Solution 1000 ml	Qiagen
Protein Precipitation Solution 350 ml	Qiagen
Isopropanol 2,5 l	Merck
Ethanol (70%) 2,5 l	Merck
50 x TE Buffer pH 7,5	USB
<i>Geräte</i>	
Pipetten	Eppendorf
Überkopfmischer Reax 2	Heidolph
Zentrifuge Multifuge 3S	Heraeus
Wasserbad	Memmert
Vortex	Heidolph
Gefrierschrank	Sanyo

**Tabelle 4: Zur DNA-Konzentrationsbestimmung verwendete Materialien**

Material	Hersteller
<i>Verbrauchsmaterialien</i>	
Filterspitzen für Pipetten	Eppendorf
0,8 ml 96-well storage plate	Thermo
Verschlussfolie: Adhesive PCR Foil Seals	Thermo
<i>Reagenzien</i>	
50 x TE Buffer pH 7,5	USB
<i>Geräte</i>	
Spectrophotometer NanoDrop 2000	Thermo
Pipetten	Eppendorf

**Tabelle 5: Für die MALDI-TOF-Genotypisierung verwendete Materialien**

Material	Hersteller
<i>Verbrauchsmaterialien</i>	
Deep-well-96er-Platten	Qiagen
Thermo-Fast 384 Platten	Thermo Scientific
Pipettenspitzen	Rainin
Röhrchen 14 ml	BD Falcon
Röhrchen 50 ml	BD Falcon
Flüssigkeitsreservoir PVC „Rotilabo“	Roth
Verschlussfolien „Adhesive PCR Film“	Thermo Scientific
96-well-V-Bodenmikrotiterplatte	Greiner

Clean-Resin-Platten	Sequenom
Dünne Verschlussfolien	Qiagen
SpectroCHIP Array	Sequenom
<b>Reagenzien</b>	
0,1x und 1x TE-Puffer	selbst hergestellt
Nanopure LiChrosolv H <sub>2</sub> O	Merck
PCR-Puffer mit MgCl <sub>2</sub> (10x)	Qiagen
DNTP-Set (25mM)	Fermentas
Primer (50µM)	Ella-Biotech
DNA-Polymerase HotStarTaq (5U/µl)	Qiagen
Agarose in Pulverform	Biozym
Ethidiumbromid	Merck
Blue Juice	selbst hergestellt
100 bp Plus DNA „Gene Ruler“	Fermentas
SAP Puffer 10x	Sequenom
SAP-Enzym (1U/µl)	Sequenom
iPLEX Buffer plus (10x)	Sequenom
iPLEX termination mix	Sequenom
Primer	Ella-Biotech
iPLEX Enzyme	Sequenom
Clean Resin	Sequenom
<b>Geräte</b>	
Pipettierroboter TEMO	Tecan
1-/12-Kanal-Pipetten	Rainin

Vortex	
Tischzentrifuge	
Pipettierroboter Genesis RSP 150	Tecan
Rotanta 46 RS Zentrifuge	Hettich
C 1000 Thermal Cycler	Bio-Rad
200 ml Kolben	Schott
Mikrowelle	Severin
Gelschlitten, Gelkämme, Gelkammer	Biozym
UV-Lichtkammer	Peqlab
Multimek 96 Pipettier-Roboter	Beckman
High speed microplate shaker	Illumina
Zentrifuge	Sigma
DNA Engine Tetrad	Biozym
Roto-Shake Genie	Scientific Industries
Mass Array™ Nanodispenser	Sequenom / Samsung
Massenspektromieter Maldi-TOF „Bruker“	Sequenom

## 2.2 Patientenkollektive

Eingeschlossen wurden Patienten mit Diagnose einer Multiplen Sklerose (MS) oder Klinisch isoliertem Syndrom (CIS). Dabei wurden ein initiales Kollektiv und zwei unabhängige Validierungskollektive untersucht. Patienten des Initialkollektivs und des ersten Validierungskollektivs wurden in Deutschland rekrutiert; das zweite Validierungskollektiv stammt aus Belgien. Alle Patienten hatten vor Einschluss in die Studie ihr schriftliches Einverständnis zur Teilnahme gegeben. Die Genehmigungen durch die Ethikkommissionen der rekrutierenden Zentren (Universitäten Marburg, Düsseldorf, TU München und KU Leuven) lagen vor. Alle Patienten sind europäischer Abstammung.

Nach Überprüfung der Diagnose anhand von Arztbriefen wurden die klinischen Parameter bei Lumbalpunktion (Alter, Geschlecht) sowie der Liquorbefund aller Patienten erfasst. Die Daten der Liquoruntersuchungen stammen von Lumbalpunktionen bei Erstdiagnose der Multiplen Sklerose (MS). Nach den deutschen Leitlinien wird eine Liquoruntersuchung bei Erstdiagnose empfohlen, so dass die Patienten, die in die vorliegende Arbeit eingeschlossen wurden, einen unverfälschten Querschnitt von MS-Patienten bei Erstdiagnose darstellen. Alle Laboratorien, in denen Liquor für unsere Studie untersucht wurde, haben an Ringversuchen teilgenommen und sind zertifiziert.

Folgende Liquorparameter wurden erhoben:

- Oligoklonale Banden
- Leukozyten
- IgG,  $Q_{IgG}$ ,  $IgG_{IF}$  (nach der Reiberformel berechnet), lokale IgG-Synthese (vom Labor angegeben), IgG-Index
- IgA,  $Q_{IgA}$ ,  $IgA_{IF}$  (nach der Reiberformel berechnet), lokale IgA-Synthese (vom Labor angegeben)
- IgM,  $Q_{IgM}$ ,  $IgM_{IF}$  (nach der Reiberformel berechnet), lokale IgM-Synthese (vom Labor angegeben)

Bei der Betrachtung der intrathekalen IgG-Synthese erwiesen sich quantitative Parameter als geeigneter für die genetische Assoziationsstudie als oligoklonale Banden, die bei 90-95% aller MS-Patienten positiv sind. Daher wurden nur der IgG-Index sowie die nach Reiber berechnete IgG-Synthese ( $IgG_{IF}$ ) als Liquorparameter in die Studie aufgenommen.

Für die Analyse der genetischen Assoziation wurden folgende Liquorparameter ausgewählt: Leukozyten, IgG-Index,  $IgG_{IF}$ ,  $IgA_{IF}$ ,  $IgM_{IF}$ .

In Tabelle 6 sind die Anzahl der Befunde dieser Liquorparameter für alle drei Kollektive sowie die Normwerte dargestellt.

**Tabelle 6: n-Zahl der Liquorparameter in allen drei Kollektiven**

Darstellung aller in die Studie eingeschlossenen Liquorparameter mit Angabe der Anzahl der primär erhobenen sowie der schließlich in die Studie eingeschlossenen Befunde (nach Qualitätskontrolle), die im Verlauf untersucht wurden.

1. Zahl: primär erhobene Anzahl an Befunden

2. Zahl: nach Qualitätskontrolle eingeschlossene Befunde

Parameter	Normwerte	Anzahl der Befunde nach Qualitätskontrolle		
		Initialkollektiv	1.Validierungs-kollektiv	2.Validierungs-kollektiv
Leukozyten/ $\mu$ l	<4/ $\mu$ l	444/ 434	353/ 330	
$\text{IgG-Index} = \left[ \frac{Q_{\text{IgG}}}{Q_{\text{Alb}}} \right]$	0,34 – 0,66	229	279/ 256	153
Lokale IgG-Synthese nach Reiber Formel [%] ( $\text{IgG}_{\text{IF}}$ )		196	276/252	
Lokale IgA-Synthese nach Reiber Formel [%] ( $\text{IgA}_{\text{IF}}$ )		121		
Lokale IgM-Synthese nach Reiber Formel [%] ( $\text{IgM}_{\text{IF}}$ )		101		

Um die Hypothese zu stützen, dass die intrathekale IgG-Synthese im Laufe des Lebens jedes Patienten mit Multipler Sklerose stabil bleibt und somit eine genetische Disposition vermutet werden kann, wurden bei einem kleinen Kollektiv die Werte untersucht. Insgesamt waren aus dem vorhandenen Kollektiv bei elf Patienten Daten von zwei Lumbalpunktionen vorhanden. Der IgG-Index wurde für diese 11 Patienten im Zeitverlauf dargestellt.

## 2.3 Molekularbiologische Methoden

### 2.3.1 DNA-Extraktion

Die Extraktion der DNA für die genetischen Untersuchungen erfolgte aus Vollblut. Nach venöser Blutentnahme einer EDTA-Monovette wurde die DNA mit Hilfe des *Genra Puregene Blood Kit* (Qiagen, Deutschland) bzw. dem *Illustra Nucleon BACC Genomic DNA Extraction Kit* (GE Healthcare, Buckinghamshire, Großbritannien) extrahiert. Nacheinander erfolgten Trennung der Blutbestandteile, Zellyse und Phasentrennung, Präzipitation, Waschen und das Auflösen der DNA. Die verwendeten Materialien finden sich in Tabelle 3.

Zunächst wurde ein Wasserbad auf 37°C vorgeheizt, worin die Blutproben unter leichtem Schütteln aufgetaut wurden. Um die Blutbestandteile voneinander zu trennen, wurden 30 ml *Cell Lysis Solution* in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen vorgelegt und 10 ml Vollblut zugegeben. Dieses wurde durch mehrmaliges Wenden gemischt und bei Raumtemperatur (15-25°C) inkubiert. Danach wurde das Gemisch zwei Minuten lang bei 2000 g zentrifugiert, so dass sich die Leukozyten in einem Pellet absetzten. Der Überstand wurde vorsichtig verworfen, so dass nur das Pellet und max. 200 µl der Restflüssigkeit im Röhrchen blieben. Dann mischte man die Flüssigkeit 10 Sekunden lang zur Resuspension des Pellets auf dem Vortexer.

Im Anschluss erfolgte die Lyse der Leukozyten und die Phasentrennung: Dazu wurden 3,33 ml der *Protein Precipitation Solution* zu der Probe hinzugegeben und auf dem Vortexer für ca. 20 Sekunden gemischt, so dass die Zellen lysierten und die Proteine ausfielen. Es folgte ein 6-minütiges Zentrifugieren bei 2000 g. Die präzipitierten Proteine sollten sich als dunkelbraune Ablagerung am Gefäßrand zeigen. Falls das nicht der Fall war, wurde das Gemisch für ca. 5 Minuten auf Eis inkubiert und dann nochmals zentrifugiert.

Zur Präzipitation der DNA wurden 10 ml Isopropanol in ein sauberes 50 ml Zentrifugenröhrchen vorgelegt und dann dem Überstand hinzugefügt. Dabei sollte darauf geachtet werden, dass sich die Proteinablagerung nicht löst. Anschließend sollte die Probe etwa 2 Minuten auf dem Überkopfmi-scher bei langsamer Umdrehung ausfällen und danach für 3 Minuten bei 2000 g zentrifugiert werden. Die DNA wird so als kleines, weißes Pellet sichtbar.

Im Anschluss wurde die DNA gewaschen. Der Überstand konnte verworfen werden und die Restflüssigkeit vorsichtig mit Hilfe eines saugfähigen Papiers aufgefangen werden. Dabei war darauf zu achten, dass das DNA-Pellet im Röhrchen blieb. Dann wurden 10 ml Ethanol (70%) hinzugefügt, alles kurz gemischt und für 2 Minuten bei 2000 g zentrifugiert. Der Überstand konnte wiederum verworfen und die Restflüssigkeit mit saugfähigem Papier entfernt werden. Nach 10-minütigem Trocknen wurden 100-1000 µl TE-Puffer (je nach Pellet-Größe) hinzugefügt und für 5 Sekunden bei mittlerer Geschwindigkeit auf dem Vortexer gemischt.

Zum Auflösen der DNA wurde die Probe zunächst 60 Minuten lang im Wasserbad bei 65°C inkubiert und dann nochmals bei Raumtemperatur über Nacht auf dem Überkopfmischer bei langsamer Umdrehung.

Um die DNA länger lagern zu können, erfolgte nach kurzem Zentrifugieren eine Umfüllung in ein 1,5 ml Röhrchen zur Lagerung bei -80°C.

Für die DNA-Typisierung wurde eine Konzentration von 50 ng/µl eingesetzt. Die DNA-Konzentrationsbestimmung erfolgte mit Hilfe des Spectrophotometers *NanoDrop 2000*. Zu Beginn wurde der Leerwert eingestellt, indem 1,5 µl TE-Puffer an die dafür vorhergesehene Stelle des Geräts pipettiert wurden. Im Anschluss gab man jeweils 1,5 µl der bei Raumtemperatur aufgetauten DNA in das Gerät und maß die Konzentration. Jede Konzentrationsmessung erfolgte zweimal. Wenn beide Messungen mehr als 10% voneinander abwichen, wurde die Konzentration weiter geprüft. Zwischen zwei Messungen wurde die Vorrichtung mit einem weichen Tuch gereinigt. Im Gerät erfolgte gleichzeitig eine erste Qualitätskontrolle der Reinheit der DNA. Dazu wurde der Quotient von OD<sub>250</sub> zu OD<sub>280</sub> bestimmt, der bei einer reinen DNA-Isolierung etwa bei 1,8 liegen sollte. Bei Verunreinigung der Probe durch Phenol oder Proteinreste war der Wert signifikant kleiner.

Der vorgegebene Zielwert von 50 ng/µl wurde durch entsprechende Verdünnung mit dem TE-Puffer eingestellt. Für die anschließende Genotypisierung beider Kollektive wurden jeweils 50 µl in 96-well-Platten gefüllt, mit Folie verschlossen und auf Trockeneis transportiert.

## **2.3.2 Genotypisierung des Initialkollektivs und des zweiten Validierungskollektivs mittels Bead-Chip-Verfahren von Illumina**

### **2.3.2.1 Allgemeines**

Die DNA-Proben des Initialkollektivs wurden mit dem *Human660-Quad BeadChip* (Illumina, San Diego DA, USA) mit Hilfe der *Illumina Infinium Plattform* im *Wellcome Trust Sanger Institute (WTSI)* im Rahmen des WTCCC2-Projekts (Sawcer et al., 2011b) in Hinxton, Großbritannien genotypisiert.

Das zweite Validierungskollektiv mit 153 Probanden wurde wie das Initialkollektiv mit dem *Human660-Quad chip* (Illumina, San Diego, CA, USA) am *Sanger Institut* in Cambridge genotypisiert.

### 2.3.2.2 Qualitätskontrolle der Genotypisierung

Die Qualitätskontrolle der Genotypisierung wurde für jede Patientenprobe und für jeden SNP durchgeführt. In die vorliegende Studie wurden nur Proben eingeschlossen, deren prozentualer Anteil erfolgreich genotypisierter Einzelnukleotidpolymorphismen (SNPs) zu der SNP-Gesamtzahl über 95% lag (Call rate > 95%). Beim Initialkollektiv mussten nach Qualitätskontrolle insgesamt zehn Proben aus der Studie ausgeschlossen werden: Zwei Proben wiesen keine ausreichende Genotypisierungsqualität auf. Nach Geschlechtskontrolle mit Sequenom-Markern (*gender check*) wurden fünf weitere Proben wegen inkorrekt oder fehlender Geschlechtsangabe ausgeschlossen. Drei weitere Proben wurden durch multidimensionale Skalierung als nicht-europäischer Herkunft erkannt und entsprachen somit nicht mehr den Einschlusskriterien der Studie.

SNPs des Initialkollektivs wurden nur dann analysiert, wenn die Häufigkeit des Minorallels (*minor allele frequency* = MAF) über 5% lag und die Call rate > 95% betrug. Nach Qualitätskontrolle standen 526 014 SNPs für die Analyse des Initialkollektivs zur Verfügung.

Im ersten Validierungskollektiv lag die call rate von 23 Proben < 90%, so dass diese Proben ausgeschlossen wurden. Die call rate der SNPs in der Analyse des ersten Validierungskollektivs betrug > 97% und in der Analyse des zweiten Validierungskollektivs 94%. Die Qualität der Genotypisierung von SNPs wurde außerdem in einer visuellen Auswertung der Cluster plots durch einen erfahrenen Wissenschaftler des Helmholtz-Instituts geprüft.

### 2.3.2.3 Sequenzierung

Bei dem Bead-Chip-Verfahren von *Illumina* handelt es sich um eine Hochdurchsatz-Genotypisierung, so dass es die Durchführung von genomweiten Genotypisierungen erlaubt. Dabei konnten vier Proben gleichzeitig auf viele verschiedene Einzelnukleotidpolymorphismen (SNPs) mittels 657 366 Bead-Marker untersucht werden. Auf dem Chip waren Streifen, in denen verschiedene Bead-Typen enthalten sind. Jeder Bead-Marker bestand aus einem in seiner Identität bekannten Biomolekül, das zu einem entsprechenden SNP komplementär ist. Die zu untersuchende Probe und eine Kontrollprobe wurden – nach Vervielfältigung durch gewöhnliche PCR - mit jeweils unterschiedlich fluoreszierenden Didesoxynukleosidtriphosphaten (ddNTP) markiert. Wenn die untersuchte DNA und das ddNTP komplementär zueinander waren, wurde das ddNTP durch eine Polymerase eingebaut, wodurch die DNA durch Fluoreszenz markiert wurde. Bei der anschließenden Hybridisierung banden die DNA-Fragmente der zu untersuchenden Patientenproben an Bead-Marker auf dem Chip, so dass eine Identifikation der SNPs erfolgte. Nach mehrmaligem Waschen konnte ein hochauflösender Zwei-Farben-Laserscanner Farbintensität, Wellenlänge und Farbposition messen und SNPs identifizieren (Homepage 2, siehe Literaturverzeichnis).

### 2.3.3 Genotypisierung des ersten Validierungskollektivs mittels MALDI-TOF-Verfahren von Sequenom

Alle SNPs, die im initialen Kollektiv ein Signifikanzniveau von  $p < 10^{-5}$  erreichten, wurden in einem ersten Validierungskollektiv weiter untersucht. Hierzu wurde das MALDI-TOF-Verfahren des *Sequenom iPlex Gold System* (Sequenom, San Diego, CA, USA) im Helmholtz-Institut München, Deutschland verwendet. Das Genotyp-Calling wurde mit der Software *SpectroTYPER 3.4* durchgeführt. Das Versuchsdesign wurde durch AssayDesign 3.1.2.2 mit *iPLEX Gold chemistry default parameter* entworfen.

Für die Zellzahl fanden sich im Initialkollektiv sechs SNPs, die im ersten Validierungskollektiv untersucht werden sollten. Einer der sechs SNPs (rs7430165) konnte nicht mit dem iPLEX bestimmt werden und ein weiterer SNP (rs6770719) fiel aus technischen Gründen aus. Im ersten Validierungskollektiv lagen nach Qualitätskontrolle somit Ergebnisse von vier SNPs vor.

Für IgG<sub>IF</sub> fanden sich im Initialkollektiv sechs SNPs, die alle im Validierungskollektiv erfolgreich untersucht werden konnten.

Für den IgG-Index wurden im Initialkollektiv 17 SNPs gefunden, deren Assoziation im ersten Validierungskollektiv überprüft werden sollte. Der SNP rs1134590 fiel bei der Typisierung aus. Drei SNPs (rs34398108, rs12897751 und rs34295723) wurden nicht typisiert, da bereits geeignete SNPs in derselben Genregion mit der Platte typisiert wurden und eine Kombination technisch nicht möglich war. Bei SNP rs12884389 konnte keine ausreichende *Call rate* erreicht werden, so dass der SNP von der weiteren Analyse ausgeschlossen wurde. 23 Proben mussten wegen individuell niedriger *Call rates* (< 90%) aus dem ersten Validierungskollektiv genommen werden.

MALDI-TOF ist ein Analyseverfahren, das das Molekulargewicht von chemischen Verbindungen bestimmen kann. Die matrixunterstützte Laser-Desorptions-Ionisation (MALDI) ist dabei mit einer Flugzeit-Massenspektrometrie (TOF) kombiniert. In der vorliegenden Arbeit wurde dieses Verfahren genutzt, um das Molekulargewicht von kleinen DNA-Fragmenten zu bestimmen, so dass eine spezifische Analyse von einzelnen Basen möglich war und SNPs identifiziert werden konnten. Um einen SNP mit dem MALDI-TOF-Verfahren zu genotypisieren, musste die DNA-Sequenz, die den SNP umgibt, zunächst amplifiziert werden. Nur bei ausreichender DNA-Konzentration konnte die spezifische iPLEX-Reaktion ablaufen. Das Ergebnis bekam man durch Übertragung der DNA auf einen Mikrochip, der dann mit Hilfe des MALDI-TOF-Massenspektrometers den SNP entschlüsseln konnte. Die einzelnen Moleküle wurden in dem Gerät durch ein elektrisches Feld beschleunigt. Die Zeit, die ein Molekül benötigt, um auf den Detektor aufzuschlagen, ließ auf das Molekulargewicht des Moleküls schließen. Je leichter das DNA-Fragment war, desto früher erreichte es den Detektor.

Dadurch kann der Austausch einer einzelnen Base in einem DNA-Fragment identifiziert werden. Das gesamte Verfahren wurde in mehrere Abschnitte aufgeteilt, die im Folgenden genauer beschrieben sind: allgemeine Vorbereitungen, Vervielfältigung der DNA-Abschnitte durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR), Gelelektrophorese zur Überprüfung der PCR-Produkte, SAP-Reaktion zur Aufreinigung, Extensionsreaktion, Aufreinigung der Extensionsprodukte durch Entzug der Salze, Dispensieren der Extensionsprodukte auf den SpectroCHIP und Massenspektrometrie mit dem MALDI-TOF-Verfahren.

Für das iPLEX-Verfahren wurden 384-well-Microtiterplatten benötigt. Aus vier 96er deep-well-Platten mit einer DNA-Konzentration von 1 ng/μl wurden mittels dem Pipettier-Roboter TEMO je eine 384er Mikrotiterplatte mit je 5 μl der Verdünnung pro well hergestellt. Diese wurden bei Raumtemperatur über Nacht getrocknet, so dass in den 384-well-Microtiterplatten eine DNA-Menge von 5 ng/well vorlag.

Um ein SNP mit Hilfe eines Massenspektrometers identifizieren zu können, mussten die umliegenden Abschnitte der DNA vervielfältigt werden. Dabei sollten DNA-Amplifikate mit einer Länge von etwa 100 Basenpaaren (bp) entstehen. Dazu wurde eine Polymeraseketten-Reaktion (PCR) mit dem Qiagen HotStarTaq-Kit nach Protokoll durchgeführt. Dabei wurden zu der DNA mehrere spezifische Primer gemischt („Multiplex-PCR“), die an den SNP-flankierenden Stellen der DNA andocken. Dadurch bildeten dNTPs neue komplementäre Stränge. Das für die Reaktion notwendige Enzym war die hitzestabile DNA-Polymerase. In einem ThermoCycler liefen hintereinander folgende Schritte ab: Denaturierung der DNA bei 94°C, Anlagerung der Primer (Annealing) bei 56°C und Amplifikation der DNA (Elongation) bei 72°C. Durch die Wiederholung dieser Schritte kam es zu einer exponentiellen Zunahme der DNA-Konzentration, so dass nun einzelne SNPs untersucht werden konnten.

Zur Entstehung des Mastermix wurden 15312 μl Reinstwasser in ein 50 ml Röhrchen vorgelegt. PCR-Puffer, MgCl<sub>2</sub> und der dNTP-Mix wurden kurz gevortext und auf der Tischzentrifuge abzentrifugiert. Dann wurden davon 3000 μl PCR-Puffer, 1,625 mM MgCl<sub>2</sub> und 500 μM dNTP-Mix in das 50 ml Röhrchen hinzugegeben. Nach mehrmaligem Wenden der Primer-Platten (F und R für den 5'3'-Strang und den 3'5'-Strang) wurden aus jeder Vertiefung 100nM in das 50 ml Röhrchen pipettiert. Unter Zuhilfenahme einer 12-Kanal-Pipette und eines Reservoirs konnte dieser Schritt vereinfacht werden. Zuletzt wurde die DNA-Polymerase HotStarTaq (0,5 U/rxn) hinzugegeben, für einige Sekunden abzentrifugiert und dann 960 μl in das Röhrchen hinzugegeben.

Die Zugabe des Mastermix zur DNA erfolgte mit dem Pipettier-Roboter Genesis RSP 150. Es wurden 5 μl des Mastermix zu jeder DNA-Probe pipettiert und im Anschluss die Platten mit thermostabiler Folie verschlossen.

Die nachfolgende PCR im Thermo Cycler erfolgte nach unten stehendem Programm (Tabelle 7).

**Tabelle 7: Cycler-Programm der PCR**

Schritt	Temperatur	Dauer	Zyklen
	94°C	15 Minuten	1x
<b>Denaturierung</b>	94°C	20 Sekunden	45 x
<b>Annealing</b>	56°C	30 Sekunden	
<b>Elongation</b>	72°C	60 Sekunden	
	72°C	3 Minuten	1x
	20°C		1x

### 2.3.3.1 Gelelektrophorese

Zur Sicherstellung, dass die PCR tatsächlich erfolgreich abgelaufen ist, erfolgte stichprobenartig eine Gelelektrophorese. Das Prinzip beruht darauf, dass Nukleinsäuren eine negative Ladung haben und somit unter elektrischer Spannung wandern. Die Geschwindigkeit ist dabei proportional zu ihrem Molekulargewicht, so dass anhand der entstehenden Bandenmuster die Größe der einzelnen DNA-Abschnitte abgeschätzt werden kann. Mit Hilfe eines 100bp-Kontroll-Ladder konnte anhand der Banden verifiziert werden, ob in der vorangegangenen PCR DNA-Amplifikate von 100 bp entstanden waren.

### 2.3.3.2 SAP-Reaktion

Im anschließenden Schritt wurden die PCR-Produkte mit dem Enzym SAP (shrimp alkaline phosphatase) des IPLEX Gold Kit aufgereinigt.

Zur Entstehung des Mastermix wurden 7956 µl Reinstwasser in ein 50 ml Röhrchen vorgelegt. Der SAP-Puffer und das SAP-Enzym wurden gevortext und dann 884 µl des SAP-Puffers und 1560 µl des SAP-Enzyms in das Röhrchen gegeben. Anschließend wurde das Röhrchen wieder verschlossen, gevortext und in ein Flüssigkeitsreservoir gegeben, so dass man nun mit einer 12-Kanal-Pipette 10,5 µl in jede Vertiefung einer 96-well-V-Bodenmikrotiterplatte geben konnte.

Im Anschluss wurden 2 µl des Mastermix mit dem Pipettier-Roboter Multimek 96 zur DNA gegeben. Die anschließende SAP-Reaktion im ThermoCycler erfolgte nach feststehendem Programm (Tabelle 8).

**Tabelle 8: Programm für die SAP-Reaktion**

Schritt	Temperatur	Dauer	Zyklen
<b>Aktivierung</b>	37 °C	40 Minuten	1x
<b>Inaktivierung</b>	85°C	5 Minuten	1x
	20 °C		1x

### 2.3.3.3 iPLEX-Reaktion

Bei der iPLEX-Reaktion lagern sich spezifische Extensions-Primer so an die DNA-Fragmente an, dass der Primer genau eine Base vor dem zu detektierenden SNP aufhört. Mit Hilfe einer DNA-Polymerase lagern sich dem entsprechenden SNP Didesoxynukleotide an, die dann im nächsten Schritt identifiziert werden können.

Zur Entstehung des Mastermix wurden wiederum 4017,3 µl Reinstwasser in ein 50 ml Röhrchen vorgelegt. Der iPLEX-Puffer und der iPLEX termination mix (= massemodifizierte Nukleotide) wurden im Vortexer gemischt und jeweils 1040 µl in das Röhrchen gegeben. Im Anschluss wurden die Primer dazu pipettiert, wobei das Volumen von der Masse des spezifischen Primers abhing. Je schwerer der Primer war, desto mehr Volumen musste zum Mastermix gegeben werden. Das Volumen war in 4 Bereiche gestaffelt (9,5 – 19,5 µl pro Platte). Zum Schluss wurden 213 µl des iPLEX-Enzyms (= DNA-Polymerase) dazugegeben und das verschlossene Röhrchen auf dem Vortexer gemischt. Der

Inhalt wurde in ein Flüssigkeitsreservoir gegeben, so dass man nun mit einer 12-Kanal-Pipette 10,5 µl in jede 96-well-V-Bodenmikrotiterplatte verteilen konnte. Nach sorgfältigem Verschluss mit einer Folie wurden die 96-well-Platten kurz bei 1500 rpm zentrifugiert.

Wie zuvor erfolgte die Zugabe von 2 µl des Mastermix in die Tochterplatten der SAP-Reaktion mit dem Pipettier-Roboter Multimek 96. Die anschließende iPLEX-Reaktion erfolgte im ThermoCycler nach feststehendem Programm (Tabelle 9).

**Tabelle 9: Cycler-Programm der iPLEX-Reaktion**

Schritt	Temperatur	Dauer	Zyklen	
	94°C	30 Sekunden	1x	
<b>Denaturierung</b>	94°C	5 Sekunden	1x	40x
<b>Annealing</b>	52°C	5 Sekunden	5x	
<b>Elongation</b>	80°C	5 Sekunden		
	72°C	3 Minuten	1x	
	20°C		1x	

#### 2.3.3.4 Aufreinigung der Extensionsprodukte

Damit die Ergebnisse bei der anschließenden Massenspektrometrie nicht durch verschiedene Salze beeinflusst und verfälscht wurden, wurde zum Extensionsprodukt Resin-Pulver gegeben. Durch Entsalzen der iPLEX-Reaktionsprodukte konnte die Spectro-Analyse optimiert werden.

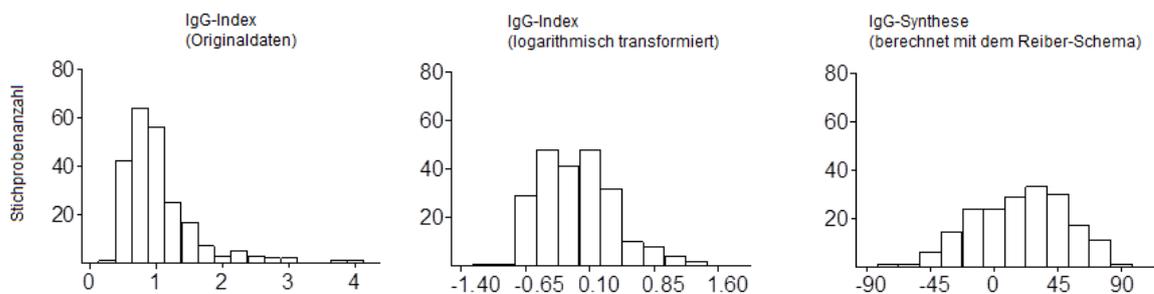
Das Extensionsprodukt wurde dabei mit Hilfe des Multimeck-Pipettier-Roboters mit 24µl Reinstwasser verdünnt und ihm danach 6mg Resin zugegeben. Nach Verschluss der Platten mit einer Folie wurden sie 30 Minuten auf dem Roto-Shaker gemischt und anschließend bei 3000 x g für 10 Minuten zentrifugiert.

### 2.3.3.5 Spotting

Unter Spotting versteht man die Übertragung der verarbeiteten Proben auf den Sequenom-Silizium-Chip. Mit Hilfe eines Nanodispensers wurde der Analyt mit einem Volumen von 15 bis 25 nl auf den SpectroCHIP Array übertragen. Der fertige Chip konnte dann mit dem Massenspektrometer MALDI-TOF unter Vakuum-Bedingungen gelesen und die Ergebnisse generiert werden. Anhand des Molekulargewichts wurden jeweils beide Allele einer Probe identifiziert.

## 2.4 Statistische Methoden

Die statistischen Analysen der genomweiten Assoziation wurden durch die Statistikerin Frau Dr. Eva Albrecht des Instituts für Genetische Epidemiologie am Helmholtz Zentrum München durchgeführt. Im Initialkollektiv folgte die Verteilung des IgG-Index nicht einer Gauß'schen Normalverteilung, sondern war rechtsschief. Daher wurden die Werte des IgG-Index für alle Kollektive logarithmisch transformiert. Die nach dem Reiber-Schema berechnete IgG-Synthese war normalverteilt, so dass keine Transformation erforderlich war (Abbildung 2).



**Abb. 2: Häufigkeitsverteilung der intrathekalen IgG-Synthese**

Abbildung der Häufigkeitsverteilung der intrathekalen IgG-Synthese im Initialkollektiv – Originaldaten des IgG-Index, IgG-Index nach logarithmischer Transformation und Originaldaten der nach der Reiber-Formel berechneten IgG-Synthese (IgG<sub>IF</sub>)

Um eine Assoziation zwischen jedem einzelnen SNP und dem jeweiligen Phänotyp zu prüfen, wurden lineare Regressionsmodelle des Programms PLINK (Purcell et al., 2007) verwendet. Es wurde ein additiver Effekt der SNPs angenommen. Für das Geschlecht wurde adjustiert. SNPs, die im Initialkollektiv ein Signifikanzniveau von  $p < 1 \times 10^{-5}$  erreichten und damit potentiell eine Assoziation aufwiesen, wurden im ersten Validierungskollektiv überprüft.

Für das erste Validierungskollektiv wurden für die Phänotypen der intrathekalen IgG-Synthese p-Werte  $< 7,1 \times 10^{-3}$  als signifikant angenommen und in einem zweiten Validierungskollektiv überprüft. Dieser p-Wert entspricht einer Bonferroni-Korrektur für sieben voneinander unabhängige Tests, korrespondierend zu 16 SNPs in sieben untersuchten Regionen im Genom.

Zusätzlich wurden SNPs im zweiten Validierungskollektiv analysiert, die in einer Metaanalyse des Initialkollektivs und des ersten Validierungskollektivs das genomweite Signifikanzniveau erreichten. Dabei wurden p-Werte  $< 9,5 \times 10^{-8}$  als genomweit signifikant angenommen, was einer Bonferroni-Korrektur für 526 014 Tests (SNPs) entspricht. Die Metaanalysen wurden mit einem Fixed-Effects-Modell der Software METAL durchgeführt, wobei eine Gewichtung mit der inversen Varianz vorgenommen wurde (Homepage 3, siehe Literaturverzeichnis).

Die grafischen Darstellungen wurden mit der Software R (Homepage 4, siehe Literaturverzeichnis), GraphPad Prism und Locus Zoom (Pruim et al., 2010) angefertigt. Zur Berechnung, ob verschiedene SNPs im Kopplungsungleichgewicht (linkage desequilibrium) stehen, wurde die `-ld`-Option von PLINK genutzt.

Zur Berechnung der erklärten Varianz wurde in beiden Validierungskollektiven der multiple Determinationskoeffizient  $R^2$  des Kovariatenmodells von demjenigen des Gesamtmodells, in welchem sowohl Kovariaten als auch SNPs enthalten sind, separat abgezogen und der mit der Stichprobengröße gewichtete Durchschnitt ermittelt.

Die statistische Teststärke wurde mit Hilfe von Quanto (Homepage 5, siehe Literaturverzeichnis) jeweils für Initial- und Validierungskollektive getrennt berechnet (Tabelle 10).

Am Beispiel des IgG-Index:

Im Initialkollektiv mit 229 Probanden wurden mit einer Teststärke von  $>80\%$  SNPs entdeckt, die bei einem Signifikanzniveau von  $p = 1 \times 10^{-5}$  mindestens 11,4% der phänotypischen Varianz erklären. Im ersten Validierungskollektiv mit 256 Probanden konnten mit einer Teststärke  $>80\%$  SNPs gefunden werden, die bei einem Signifikanzniveau von  $p = 7,1 \times 10^{-3}$  die phänotypische Varianz zu mindestens 4,8% erklären. Im zweiten Validierungskollektiv mit 153 Probanden wurden mit einer Teststärke  $>80\%$  SNPs gefunden, die bei einem Signifikanzniveau von 0,025 mindestens 6% der phänotypischen Varianz erklären (entspricht einer Bonferroni-Korrektur für zwei genomische Regionen).

**Tabelle 10: Statistische Auswertung am Beispiel des IgG-Index**

	Probandenzahl	p-Wert	Erklärte Varianz (Teststärke > 80%)
<b>Initialkollektiv</b>	229	$1 \times 10^{-5}$	> 11,4%
<b>1. Validierungskollektiv</b>	256	$7,1 \times 10^{-3}$	> 4,8%
<b>2. Validierungskollektiv</b>	153	0,025	> 6%

# 3 ERGEBNISSE

## 3.1 Patientenkollektive

Im Initialkollektiv wurden nach Qualitätskontrolle 434 (Leukozyten) bzw. 229 (IgG) Patienten mit einem Klinisch isolierten Syndrom (CIS) oder einer definitiven Multiplen Sklerose (MS) analysiert. Im ersten unabhängigen Validierungskollektiv wurden weitere 330 (Leukozyten) bzw. 256 (IgG) Patienten aus Deutschland untersucht und in einem zweiten unabhängigen Kollektiv aus Belgien 153 Patienten. In beide Validierungskollektive wurden Patienten mit Multipler Sklerose sowie Klinisch isoliertem Syndrom eingeschlossen. In Tabelle 11 sind Geschlechtsverteilung, Patientenalter und Anteil der Patienten mit primär chronisch-progredienter Multipler Sklerose aller drei Kollektive dargestellt. Es konnte nicht von allen Patienten, von denen genetische Analysen vorlagen, alle Liquorparameter erhoben werden. Dies wird ebenfalls in Tabelle 11 aufgeführt.

**Tabelle 11: Darstellung der klinischen Charakteristika der drei Patientenkollektive**

Darstellung der klinischen Charakteristika des Initialkollektivs und der beiden Validierungskollektive. Das Alter der Patienten entspricht dem Alter bei Lumbalpunktion. Es wird die Anzahl der Patienten nach Qualitätskontrolle und somit der in der genetischen Analyse berücksichtigten Patienten für die jeweiligen Liquorparameter angegeben. PPMS = primär progressiv verlaufende Multiple Sklerose.

	Liquorparameter	Initialkollektiv	Validierungs-kollektiv 1	Validierungs-kollektiv 2
<b>Anzahl</b>	Zellzahl	434	330	
	IgG-Index	229	256	153
	IgG <sub>IF</sub>	196	252	
	IgA <sub>IF</sub>	121		
	IgM <sub>IF</sub>	101		
<b>Geschlecht (w: m)</b>	Zellzahl	319 : 115	211 : 119	
	IgG-Index	173 : 56	164 : 92	106 : 47
	IgG <sub>IF</sub>	151 : 45	161 : 91	
	IgA <sub>IF</sub>	88 : 33		
	IgM <sub>IF</sub>	71 : 30		
<b>Alter in Jahren (Mittel (Altersspanne))</b>	Zellzahl	35 (16-67)	35 (15-72)	
	IgG-Index	35 (16-67)	35 (15-72)	41 (14-71)
	IgG <sub>IF</sub>	35 (16-67)	35 (15-72)	
	IgA <sub>IF</sub>	36 (16-67)		
	IgM <sub>IF</sub>	35 (16-59)		
<b>PPMS (n (%))</b>	Zellzahl	10 (4,6)		
	IgG-Index	11 (4,8)	5 (2,0)	27 (17,6)
	IgG <sub>IF</sub>	9 (4,5)		
	IgA <sub>IF</sub>	6 (5,0)		
	IgM <sub>IF</sub>	4 (4,0)		

## 3.2 Vergleich der intraindividuellen Variation der intrathekalen IgG-Synthese

In der Literatur wird beschrieben, dass die Quantität der intrathekalen IgG-Synthese bei Patienten mit Multipler Sklerose zwar sehr unterschiedlich ist, jedoch beim einzelnen Patienten lebenslang relativ konstant bleibt. Um dies in unserem Kollektiv zu evaluieren, wurde bei elf Patienten mit MS, bei denen mindestens zwei Liquorproben vorlagen, der IgG-Index im Verlauf geprüft. Das zeitliche Intervall zwischen den zwei Lumbalpunktionen der elf Patienten betrug zwischen 2 und 28 Monaten und lag im Mittel bei 12 Monaten. Wie in der unten stehenden Abbildung 3 dargestellt, zeigt sich der IgG-Index über die Zeit intraindividuell recht stabil bei hoher interindividueller Variabilität.

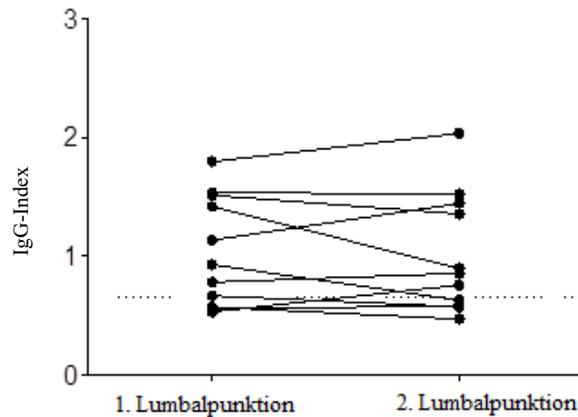


Abb. 3: Intrathekale IgG-Synthese im Verlauf der Zeit (n=11)

### 3.3 Genetische Assoziation mit der Zellzahl im Liquor

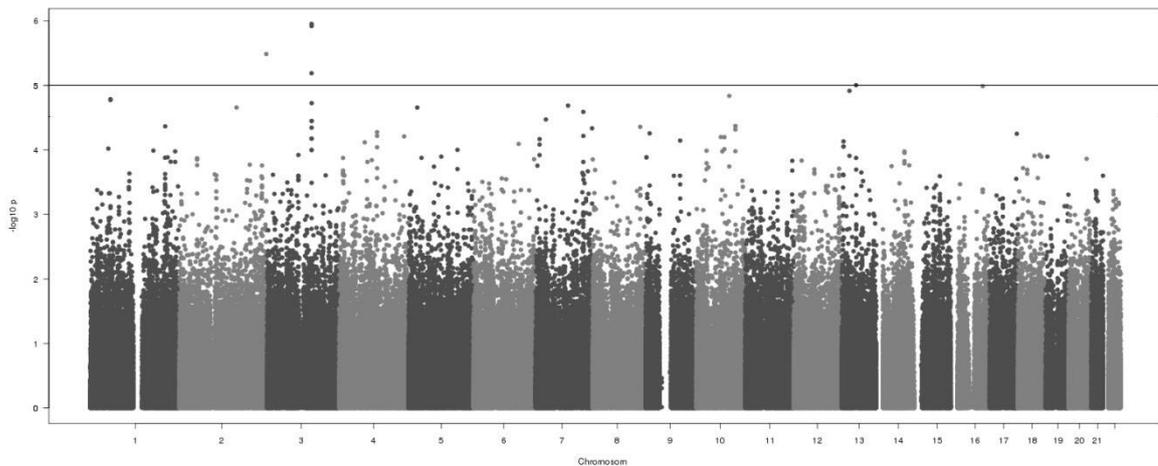
In der vorliegenden Arbeit wurde in einem Initialkollektiv von Patienten mit Multipler Sklerose und CIS eine genomweite Assoziationsstudie der Zellzahl im Liquor und 526 014 SNPs durchgeführt.

Die Verteilung der Zellzahl, d.h. die Anzahl der Leukozyten pro Mikroliter im Liquor, ist im Initialkollektiv und im ersten Validierungskollektiv vergleichbar (Tabelle 12).

**Tabelle 12: Vergleich der Zellzahl in den zwei Kollektiven**

	<b>Initialkollektiv</b>	<b>1.Validierungskollektiv</b>
<b>Zellzahl/<math>\mu</math>l [Mittelwert]</b>	9,83	11
<b>Zellzahl [Minimum und Maximum]</b>	(0-73)	(0-125)

Bei der genomweiten Assoziationsanalyse der Zellzahl im Liquor fanden sich im Initialkollektiv sechs SNPs, die einen p – Wert  $<1 \times 10^{-5}$  aufwiesen. Der Manhattan plot der Zellzahl ist in Abbildung 4 dargestellt.



**Abb. 4: GWAS-Manhattan plot der Zellzahl**

Darstellung der im Initialkollektiv ( $n = 434$ ) analysierten 526 014 SNPs und deren Assoziation zur Zellzahl. Auf der y-Achse sind die negativen Logarithmen der p-Werte der jeweiligen SNPs aufgetragen, auf der x-Achse sind die SNPs nach Chromosomenposition aufgereiht. Die horizontale Linie zeigt den willkürlich gewählten Cutt-off-Wert von  $p = 1 \times 10^{-5}$ .

Sechs SNPs zeigten im Initialkollektiv einen p-Wert  $< 10^{-5}$ : rs7566783 auf Chromosom 2, rs2070179, rs4482697, rs7430165 und rs6770719 auf Chromosom 3 sowie rs17055484 auf Chromosom 13. Fünf der sechs SNPs konnten mithilfe der iPLEX-Methode im ersten Validierungskollektiv untersucht werden (alle außer SNP rs7430165). Der SNPs rs6770719 fiel dabei aus technischen Gründen aus, so dass im ersten Validierungskollektiv noch vier SNPs analysiert werden konnten. Die Genotyp-Verteilung entsprach dabei dem Hardy-Weinberg-Equilibrium. Im Validierungskollektiv konnte jedoch keine Assoziation bestätigt werden. Es konnte somit keine genetische Assoziation zur Zellzahl im Liquor nachgewiesen werden (Tabelle 13). Eine Untersuchung im zweiten Validierungskollektiv erfolgte daher nicht.

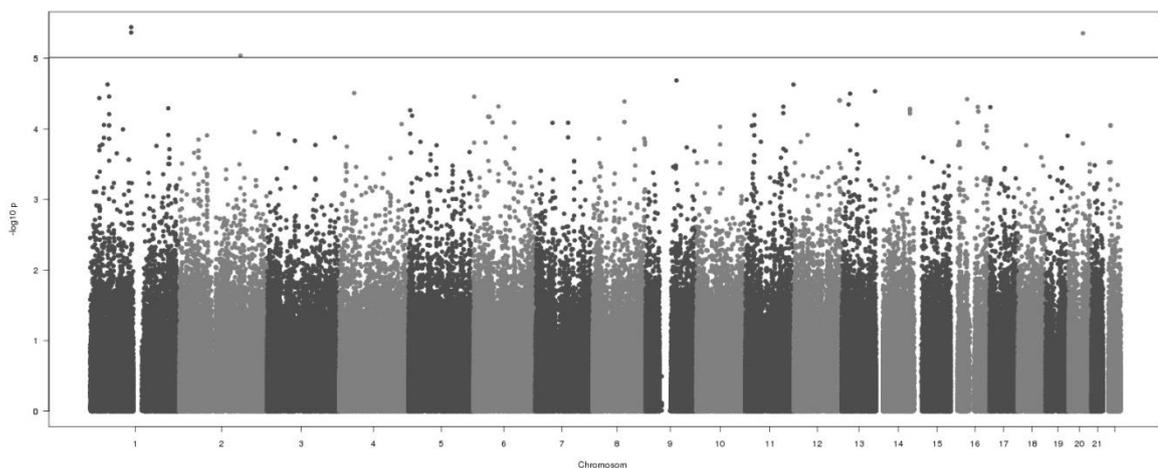
**Tabelle 13: Ergebnisse der genetischen Assoziation von der Zellzahl im Liquor**

(\*hg19 = Humaner Genombrowser 19, \*\* pHWE = p-Wert für Hardy-Weinberg-Gleichgewicht)

		rs7566783	rs2070179	rs4482697	rs17055484
<b>Chromosom</b>		2	3	3	13
<b>Position (hg19*)</b>		240626750	121353254	121536497	59376143
<b>Initialkollektiv</b>	<b>Probandenzahl n</b>	433	434	434	433
	<b>Call rate</b>	0,999	0,999	1,000	0,998
	<b>pHWE**</b>	$5,48 \times 10^{-1}$	$5,13 \times 10^{-1}$	$1,12 \times 10^{-1}$	$6,72 \times 10^{-1}$
	<b>p-Wert</b>	$3,26 \times 10^{-6}$	$3,37 \times 10^{-6}$	$1,11 \times 10^{-6}$	$9,92 \times 10^{-6}$
<b>1. Validierungs-kollektiv</b>	<b>Probandenzahl</b>	330	328	330	330
	<b>Call rate</b>	0,997	0,991	0,997	0,997
	<b>pHWE**</b>	$1,66 \times 10^{-1}$	$6,52 \times 10^{-1}$	$5,57 \times 10^{-1}$	$4,92 \times 10^{-1}$
	<b>p-Wert</b>	$6,01 \times 10^{-1}$	$3,23 \times 10^{-1}$	$3,17 \times 10^{-1}$	$6,11 \times 10^{-1}$

### 3.4 Genetische Assoziation mit der berechneten intrathekalen IgA-Synthese ( $IgA_{IF}$ )

Im Weiteren wurden genetische Assoziationen zur berechneten intrathekalen IgA-Synthese ( $IgA_{IF}$ ) analysiert. Auf den Chromosomen 1, 2 und 20 konnten vier SNPs gefunden werden, die einen  $p$ -Wert  $< 1 \times 10^{-5}$  aufweisen. Der dazugehörige Manhattan plot ist in Abbildung 5 dargestellt. Auf Grund besserer  $p$ -Werte bei der intrathekalen IgG-Synthese hat man im Rahmen dieser Arbeit darauf verzichtet, die Ergebnisse bezüglich der intrathekalen IgA-Synthese weiter zu verfolgen. Diese werden unabhängig von dieser Arbeit weiterbearbeitet.

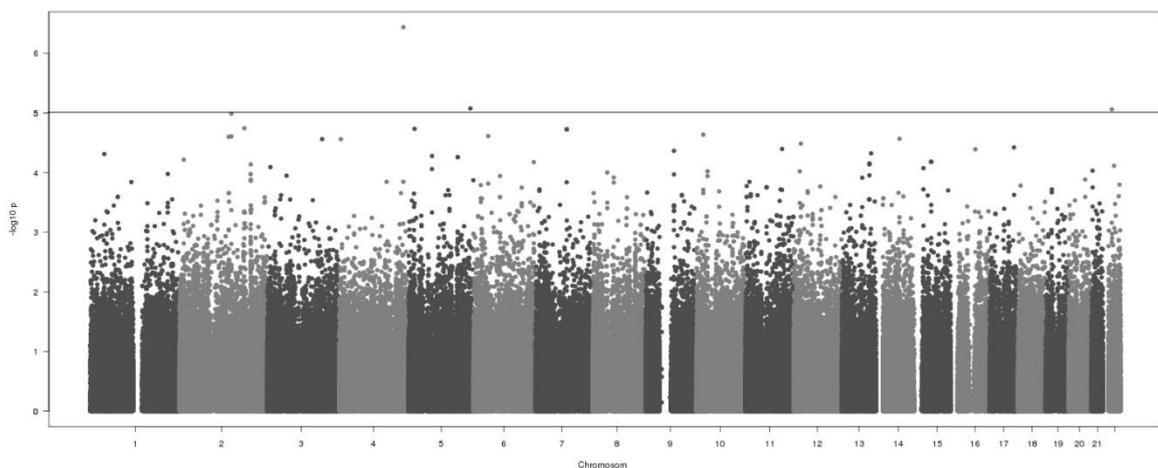


**Abb. 5: GWAS-Manhattan plot zur berechneten intrathekalen IgA-Synthese ( $IgA_{IF}$ )**

Darstellung der im Initialkollektiv ( $n = 121$ ) analysierten 526 014 SNPs und deren Assoziation zur berechneten intrathekalen IgA-Synthese ( $IgA_{IF}$ ). Auf der y-Achse sind die negativen Logarithmen der  $p$ -Werte der jeweiligen SNPs aufgetragen, auf der x-Achse sind die SNPs nach Chromosomenposition aufgereiht. Die horizontale Linie zeigt den willkürlich gewählten Cutt-off-Wert von  $p = 1 \times 10^{-5}$ .

### 3.5 Genetische Assoziation mit der berechneten intrathekalen IgM-Synthese (IgM<sub>IF</sub>)

In der genomweiten Assoziationsstudie mit der berechneten intrathekalen IgM-Synthese (IgM<sub>IF</sub>) zeigten sich auf den Chromosomen 4,5 und 22 drei SNPs, die einen p-Wert von  $< 1 \times 10^{-5}$  aufweisen. In der Abbildung 6 ist der Manhattan plot dargestellt. Auf Grund besserer p-Werte bei der intrathekalen IgG-Synthese hat man im Rahmen dieser Arbeit auch darauf verzichtet, die Ergebnisse bezüglich der intrathekalen IgM-Synthese weiter zu verfolgen. Die Frage der genomweiten Signifikanz der IgM-Synthese wird unabhängig von dieser Arbeit weiterbearbeitet.



**Abb. 6: GWAS-Manhattan plot zur berechneten intrathekalen IgM-Synthese (IgM<sub>IF</sub>)**

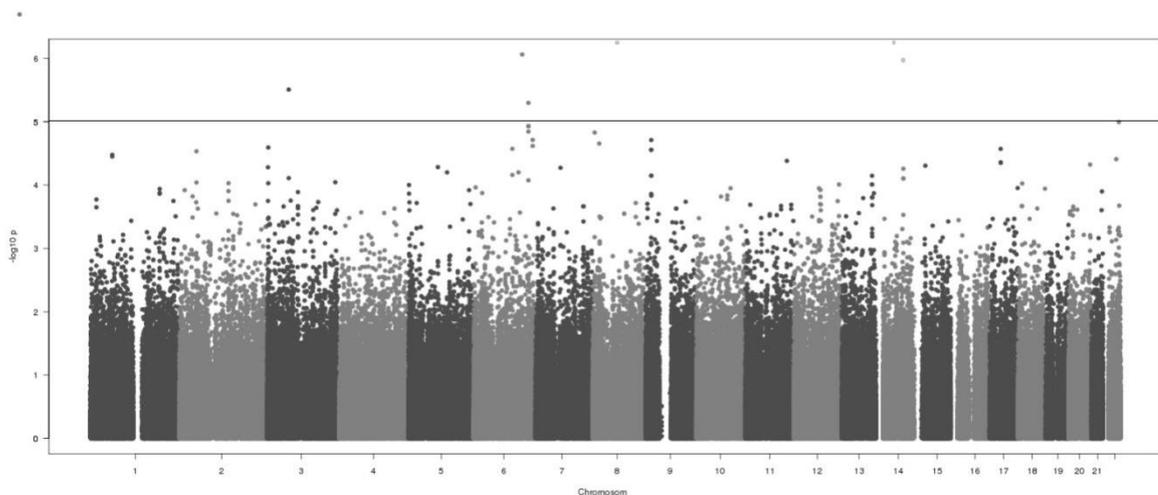
Darstellung der im Initialkollektiv ( $n = 101$ ) analysierten 526 014 SNPs und deren Assoziation zur berechneten intrathekalen IgM-Synthese (IgM<sub>IF</sub>). Auf der y-Achse sind die negativen Logarithmen der p-Werte der jeweiligen SNPs aufgetragen, auf der x-Achse sind die SNPs nach Chromosomenposition aufgereiht. Die horizontale Linie zeigt den willkürlich gewählten Cutt-off-Wert von  $p = 1 \times 10^{-5}$ .

## 3.6 Genetische Assoziation mit der intrathekalen IgG-Synthese

### 3.6.1 Berechnete IgG-Synthese (IgG<sub>IF</sub>)

Bei Analyse einer genetischen Assoziation mit der intrathekalen IgG-Synthese bei Patienten mit Multipler Sklerose wurden zwei Parameter im Liquor untersucht: die berechnete IgG-Synthese (IgG<sub>IF</sub>) sowie der IgG-Index.

In Abbildung 7 ist der Manhattan plot der berechneten IgG-Synthese (IgG<sub>IF</sub>) dargestellt.



**Abb. 7: GWAS-Manhattan plot zur berechneten intrathekalen IgG-Synthese (IgG<sub>IF</sub>)**

Darstellung der im Initialkollektiv ( $n = 212$ ) analysierten 526 014 SNPs und deren Assoziation zur berechneten intrathekalen IgG-Synthese (IgG<sub>IF</sub>). Auf der y-Achse sind die negativen Logarithmen der p-Werte der jeweiligen SNPs aufgetragen, auf der x-Achse sind die SNPs nach Chromosomenposition aufgereiht. Die horizontale Linie zeigt den willkürlich gewählten Cutt-off-Wert von  $p = 1 \times 10^{-5}$ .

Bei IgG<sub>IF</sub> fanden sich im Initialkollektiv bei einem Signifikanzniveau von  $p < 1 \times 10^{-5}$  sechs assoziierte SNPs: rs17361780 auf Chromosom 3, rs6908581 und rs7771156 auf Chromosom 6, rs13277723 auf Chromosom 8 und zwei weitere SNPs auf Chromosom 14: rs10136766 und rs11160868. Bei den vier erstgenannten SNPs, die sich auf den Chromosomen 3, 6 und 8 befinden, konnte im ersten Validierungskollektiv keine Assoziation zu IgG<sub>IF</sub> nachgewiesen werden. Die übrigen beiden SNPs auf Chromosom 14 konnten im ersten Validierungskollektiv repliziert werden: rs10136766 und rs11160868 mit p-Werten von  $6,07 \times 10^{-6}$  und  $3,29 \times 10^{-5}$ . Eine Verteilung der Genotypen nach dem Hardy-Weinberg-Gleichgewicht konnte bewiesen werden (Tabelle 14).

Da der IgG-Index im Verlauf mehr signifikante Ergebnisse erzielte, wurde bezüglich der berechneten IgG-Synthese zunächst kein zweites Validierungskollektiv untersucht.

**Tabelle 14: Ergebnisse der genetischen Assoziation von IgG<sub>IF</sub>**

(\*hg19 = Humaner Genombrowser 19, \*\* pHWE = p-Wert für Hardy-Weinberg-Gleichgewicht)

		rs17361780	rs6908581	rs7771156	rs13277723	rs11160868	rs10136766
<b>Chromosom</b>		3	6	6	8	14	14
<b>Position (hg19*)</b>		59772328	134417322	151721749	18241486	106212273	106232585
<b>Initialkollektiv</b>	<b>Probandenzahl n</b>	196	196	196	196	196	191
	<b>Call rate</b>	0,999	1,000	1,000	0,998	0,987	0,976
	<b>pHWE**</b>	7,04 x 10 <sup>-1</sup>	8,9 x 10 <sup>-1</sup>	1,00	6,66 x 10 <sup>-4</sup>	5,36 x 10 <sup>-2</sup>	2,54 x 10 <sup>-1</sup>
	<b>p-Wert</b>	3,12 x 10 <sup>-6</sup>	8,69 x 10 <sup>-7</sup>	5,05 x 10 <sup>-6</sup>	3,49 x 10 <sup>-6</sup>	8,69 x 10 <sup>-6</sup>	3,64 x 10 <sup>-6</sup>
<b>1. Validierungs-kollektiv</b>	<b>Probandenzahl</b>	251	251	250	252	248	252
	<b>Call rate</b>	0,997	0,997	0,994	0,997	0,976	0,997
	<b>pHWE**</b>	6,84 x 10 <sup>-1</sup>	8,03 x 10 <sup>-1</sup>	8,01 x 10 <sup>-1</sup>	7,44 x 10 <sup>-1</sup>	3,92 x 10 <sup>-1</sup>	7,82 x 10 <sup>-1</sup>
	<b>p-Wert</b>	2,54 x 10 <sup>-1</sup>	3,02 x 10 <sup>-1</sup>	6,05 x 10 <sup>-1</sup>	9,17 x 10 <sup>-1</sup>	3,29 x 10 <sup>-5</sup>	6,07 x 10 <sup>-6</sup>

### 3.6.2 IgG-Index

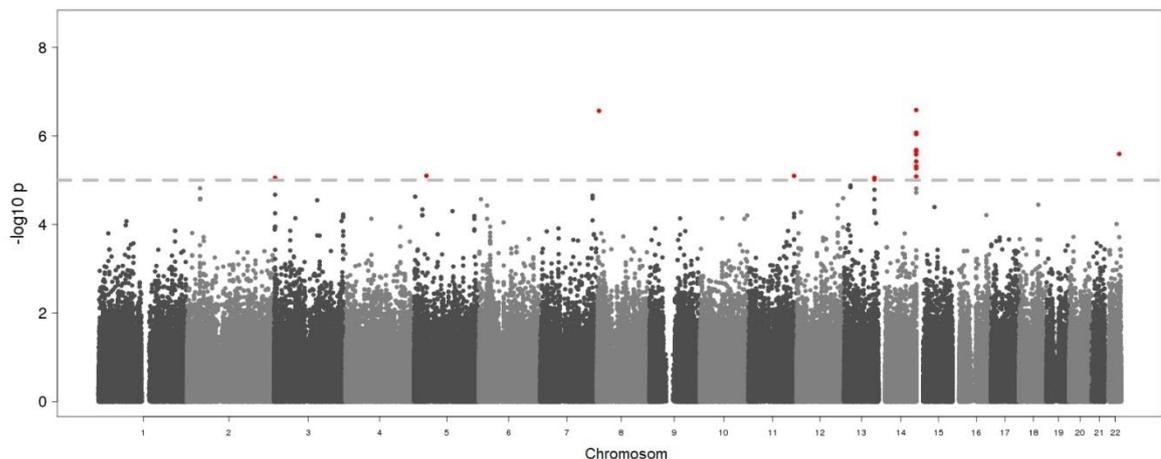
In der vorliegenden Arbeit wurde in einem Initialkollektiv eine genomweite Assoziationsstudie bei 229 Patienten mit Multipler Sklerose zwischen IgG-Index und 526 014 SNPs durchgeführt.

Die Verteilung der IgG-Index-Werte ist in den verschiedenen Kollektiven vergleichbar (Tabelle 15).

**Tabelle 15: Vergleich des IgG-Index in den drei Kollektiven**

	Initialkollektiv	1.Validierungskollektiv	2.Validierungskollektiv
<b>IgG-Index</b>	0,95	0,85	0,99
<b>[geometrisches Mittel (Minimum - Maximum)]</b>	(0,29 – 3,94)	(0,37 – 5,20)	(0,43 – 5,36)

Der Manhattan plot des IgG-Index ist in Abbildung 8 abgebildet. Im Initialkollektiv konnten in der genomweiten Analyse 17 SNPs mit einer potentiellen Assoziation ( $p$ -Wert  $< 1 \times 10^{-5}$ ) identifiziert werden. Diese 17 SNPs liegen in 7 verschiedenen Regionen des Genoms.



**Abb. 8: GWAS-Manhattan plot des IgG-Index**

Darstellung der im Initialkollektiv ( $n = 229$ ) analysierten 526 014 SNPs und deren Assoziation zum IgG-Index. Auf der y-Achse sind die negativen Logarithmen der  $p$ -Werte der jeweiligen SNPs aufgetragen, auf der x-Achse sind die SNPs nach Chromosomenposition aufgereiht. Die horizontale Linie zeigt den willkürlich gewählten Cutt-off-Wert von  $p = 1 \times 10^{-5}$ . SNPs mit kleineren  $p$ -Werten sind rot markiert.

Zur Replikation dieser SNPs wurde ein unabhängiges Kollektiv mit 256 Patienten herangezogen. Es wurden 14 der 17 SNPs für die Replikation ausgewählt, die alle 7 Regionen abdecken. In einer Region auf Chromosom 14 fanden sich eng beieinanderliegend mehrere potentiell assoziierte SNPs, so dass drei dieser SNPs (rs34398108, rs12897751 und rs34295723) aus technischen Gründen nicht weiter verfolgt wurden. Bei der Qualitätskontrolle der Genotypisierung des ersten Validierungskollektivs mussten zwei SNPs ausgeschlossen werden: rs12884389 zeigte bei der visuellen Cluster plot Analyse keine hinreichende Trennschärfe der Genotypen und rs1134590 ergab kein hinreichendes Genotypisierungssignal. Sechs der 14 SNPs, konnten im ersten Validierungskollektiv nicht verifiziert werden. Weder in der Einzelanalyse noch in der Metaanalyse der ersten beiden Kollektive konnte eine Signifikanz nachgewiesen werden. Bei fünf SNPs auf Chromosom 14 wurde im Initialkollektiv sowie im ersten Validierungskollektiv eine statistisch signifikante Assoziation nachgewiesen: rs11621145, rs11160868, rs10136766, rs2725142 und rs2753571 mit p-Werten zwischen  $1,4 \times 10^{-6}$  und  $3,4 \times 10^{-8}$ .

In einer ersten Metaanalyse des Initialkollektivs und des ersten Validierungskollektivs bestätigten sich die Ergebnisse der fünf SNPs auf Chromosom 14. Zusätzlich zeigte ein SNP auf Chromosom 8 (rs2408007) einen p-Wert von  $p = 5,0 \times 10^{-8}$  und somit eine genomweite Signifikanz.

Zur weiteren Prüfung der Assoziation der genannten sechs SNPs, die sowohl im Initialkollektiv als auch im ersten Validierungskollektiv bzw. in der Metaanalyse dieser beiden Kollektive eine statistische Signifikanz zum IgG-Index aufgewiesen hatten, wurde ein zweites Validierungskollektiv untersucht (n= 153). Dabei ergab der SNP auf Chromosom 8 (rs2408007) einen p-Wert von  $7,8 \times 10^{-2}$ ; bei den fünf SNPs auf Chromosom 14 (rs11621145, rs11160868, rs10136766, rs2725142 und rs2753571) lagen die p-Werte zwischen  $3,5 \times 10^{-1}$  und  $7,9 \times 10^{-3}$ .

Ergänzend wurde eine Metaanalyse aller drei Kollektive durchgeführt: Bei SNP rs2408007 auf Chromosom 8 konnte bei einem p-Wert von  $p = 4,7 \times 10^{-5}$  keine genomweite Assoziation zum IgG-Index bei Patienten mit Multipler Sklerose dargestellt werden. Bei den fünf SNPs auf Chromosom 14 (rs11621145, rs11160868, rs10136766, rs2725142 und rs2753571) ergaben sich p-Werte von  $6,5 \times 10^{-11}$  bis  $7,5 \times 10^{-16}$ , so dass man von einer genomweit signifikanten Assoziation dieser SNPs mit dem IgG-Index bei Patienten mit Multipler Sklerose sprechen kann. Das genomweite Signifikanzniveau wird bei  $p = 5 \times 10^{-8}$  angenommen. Die stärkste Assoziation zeigte sich für den SNP rs10136766 mit einem p-Wert von  $p = 7,5 \times 10^{-16}$ . In den Validierungskollektiven ist dieser SNP für 8,9% der Varianz der intrathekalen IgG-Synthese verantwortlich.

In Tabelle 16 sind die Ergebnisse der 17 SNPs für das Initialkollektiv, die Validierungskollektive und die Metaanalysen dargestellt.

**Tabelle 16: Mit dem IgG-Index assoziierte SNPs**

Tabelle mit allen SNPs, die im Initialkollektiv und im 1. Validierungskollektiv eine Assoziation mit dem IgG-Index aufwiesen. Grau hinterlegt sind SNPs, die sowohl im 1. sowie 2. Validierungskollektiv sowie in der Metaanalyse aller drei Kollektive eine genomweite Assoziation zum IgG-Index aufwiesen. n = Anzahl der Probanden, EAF = Effect allele frequency

SNP	Chromosom	Position	Effektallel	Zweites Allel	Initialkollektiv				1.Validierungskollektiv				1.Metaanalyse		2.Validierungskollektiv				2.Metaanalyse	
					n	EAF	Beta	p-Wert	n	EAF	Beta	p-Wert	Beta	p-Wert	n	EAF	Beta	p-Wert	Beta	p-Wert
rs9848578	3	3094310	G	A	229	0.87	0.273	8.8E-06	256	0.85	0.006	9.2E-01	0.142	9.0E-04	---	---	---	---	---	---
rs3816325	5	34682767	G	A	229	0.19	0.230	8.0E-06	255	0.23	-0.046	3.8E-01	0.097	7.2E-03	---	---	---	---	---	---
rs2408007	8	5460838	C	A	229	0.72	0.228	2.7E-07	255	0.77	0.112	3.3E-02	0.181	5.0E-08	153	0.74	-0.117	7.8E-2	0.121	4.7E-5
rs7948482	11	128044966	G	A	229	0.18	0.252	8.0E-06	255	0.19	-0.079	1.6E-01	0.090	2.2E-02	---	---	---	---	---	---
rs9582694	13	104026274	C	A	229	0.14	0.262	8.9E-06	256	0.17	-0.082	1.0E-01	0.068	7.5E-02	---	---	---	---	---	---
rs9582695	13	104036436	G	A	229	0.15	0.259	9.7E-06	256	0.17	-0.085	9.4E-02	0.066	8.2E-02	---	---	---	---	---	---
rs34398108	14	106169056	A	G	227	0.27	0.216	2.1E-06	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
rs11621145	14	106172880	G	A	218	0.25	0.223	2.2E-06	254	0.29	0.241	2.5E-07	0.232	6.5E-13	144	0.28	0.157	7.9E-03	0.215	3.1E-14
rs1134590	14	106188230	G	A	226	0.21	0.252	2.6E-06	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
rs11160868	14	106212273	A	G	229	0.24	0.224	9.1E-07	252	0.26	0.247	2.4E-07	0.235	2.5E-13	150	0.26	0.114	5.0E-02	0.206	1.9E-13
rs10136766	14	106232585	A	G	224	0.24	0.250	2.6E-07	256	0.27	0.254	3.4E-08	0.252	6.7E-15	149	0.26	0.152	1.2E-02	0.229	7.5E-16
rs34295723	14	106233106	G	A	198	0.27	0.222	8.2E-06	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
rs12897751	14	106233748	C	G	211	0.25	0.215	3.8E-06	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
rs12884389	14	106244123	C	A	229	0.24	0.257	5.4E-06	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
rs2725142	14	106249173	G	C	227	0.29	0.217	8.5E-07	254	0.31	0.222	1.4E-06	0.220	1.5E-12	151	0.29	0.062	3.0E-01	0.185	1.5E-11
rs2753571	14	106252699	A	C	229	0.29	0.202	4.9E-06	254	0.31	0.227	8.0E-07	0.214	5.8E-12	152	0.29	0.055	3.5E-01	0.180	6.5E-11
rs743931	22	45959540	G	A	229	0.29	0.207	2.6E-06	252	0.28	0.085	1.0E-01	0.157	1.9E-06	---	---	---	---	---	---

Alle diese fünf SNPs auf Chromosom 14 sind in den vorliegenden Kollektiven in hohem Kopplungsungleichgewicht, d.h. sie werden miteinander vererbt. Das Kopplungsungleichgewicht LD (linkage disequilibrium) ist perfekt, wenn  $r^2=1$ . Im Initialkollektiv ergeben sich  $r^2$ -Werte zwischen 0,93 (rs11160868) und 0,75 (rs11621145), im ersten Validierungskollektiv  $r^2$ -Werte zwischen 0,95 (rs11160868) und 0,79 (rs2725142) und im zweiten Validierungskollektiv solche zwischen 0,95 (rs11160868) und 0,71 (rs2725142).

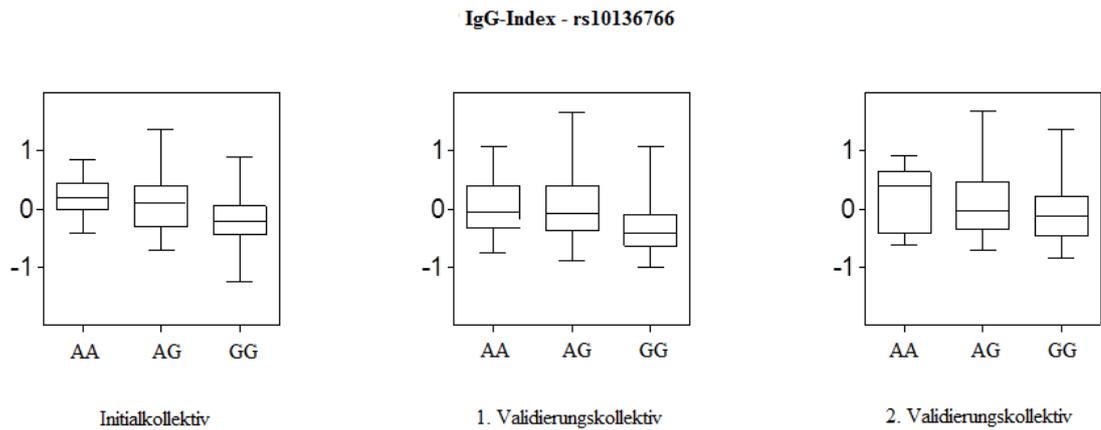
In einem weiteren Schritt wurden diese fünf SNPs, die beim IgG-Index eine signifikante Assoziation zeigten, auch auf eine Assoziation bei der nach der Reiber-Formel berechneten IgG-Synthese ( $\text{IgG}_{\text{IF}}$ ) überprüft. Es zeigte sich bei allen fünf SNPs ebenfalls eine genomweit signifikante Assoziation, jedoch mit etwas größeren p-Werten als beim IgG-Index. In der folgenden Tabelle 17 sind diese Werte für alle drei Kohorten sowie die Metaanalyse dargestellt.

**Tabelle 17: Mit der intrathekalen IgG-Synthese assoziierte SNPs**

EAF = effect allele frequency, n = Anzahl der Probanden

		IgG-Index					IgG <sub>I</sub> F				
SNP		rs 10136766	rs 11160868	rs 11621145	rs 2725142	rs 2753571	rs 10136766	rs 11160868	rs 11621145	rs 2725142	rs 2753571
Chromosom		14					14				
Position		106232585	106212273	106172880	106249173	106252699	106232585	106212273	106172880	106249173	106252699
Effekt allel		A	A	G	G	A	A	A	G	G	A
Zweites Allel		G	G	A	C	C	G	G	A	C	C
Initialkollektiv	EAF	0.24	0.24	0.25	0.29	0.29	0.24	0.24	0.25	0.29	0.29
	n	224	229	218	227	229	191	196	185	194	196
	Beta	0.250	0.224	0.223	0.217	0.202	18.440	16.400	15.730	15.690	14.780
	P-Wert	2.6E-07	9.1E-07	2.2E-06	8.5E-07	4.9E-06	3.6E-06	8.7E-06	6.6E-05	1.0E-05	3.2E-05
1. Validierungskollektiv	EAF	0.27	0.26	0.29	0.31	0.31	0.27	0.26	0.29	0.31	0.31
	n	256	252	254	254	254	252	248	250	250	250
	Beta	0.254	0.247	0.241	0.222	0.227	18.010	17.290	17.210	14.230	14.740
	P-Wert	3.4E-08	2.4E-07	2.5E-07	1.4E-06	8.0E-07	6.1E-06	3.3E-05	2.0E-05	3.6E-04	2.1E-04
2. Validierungskollektiv	EAF	0.26	0.26	0.28	0.29	0.29	0.26	0.26	0.28	0.29	0.29
	n	149	150	144	151	152	97	97	93	97	98
	Beta	0.152	0.114	0.157	0.062	0.055	12.620	10.590	12.440	7.370	6.785
	P-Wert	1.2E-02	5.0E-02	7.9E-03	3.0E-01	3.5E-01	1.6E-02	3.9E-02	9.9E-03	1.4E-01	1.8E-01
Metaanalyse	Beta	0.229	0.206	0.215	0.185	0.180	16.992	15.421	15.430	13.403	13.059
	P-Wert	7.5E-16	1.9E-13	3.1E-14	1.5E-11	6.5E-11	2.3E-12	9.3E-11	9.4E-11	5.7E-09	1.4E-08

In einem zusätzlichen Schritt wurden bei SNP rs10136766, der die stärkste Assoziation zur intrathekalen IgG-Synthese zeigt, die Werte des IgG-Index bei homozygoten und heterozygoten Trägern dargestellt (Abbildung 9). Es ergab sich eine höhere intrathekale IgG-Produktion bei homozygoten Trägern des Allel A.

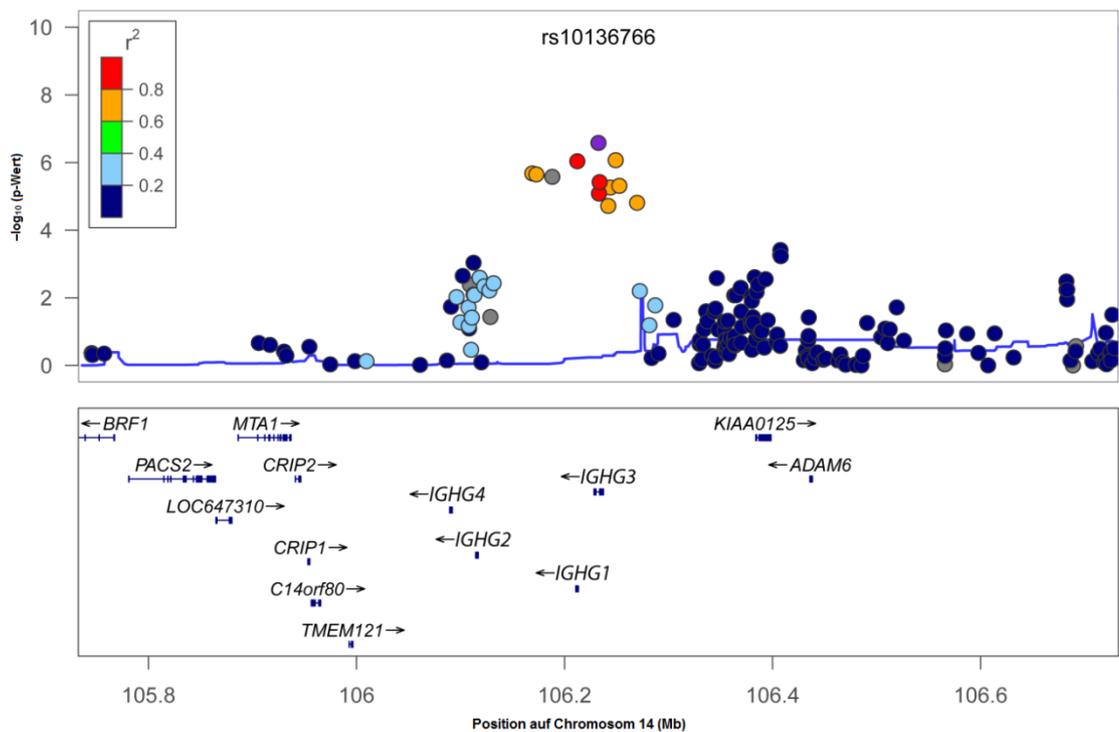


**Abb. 9: Höhe des IgG-Index bei dem SNP rs10136766**

Bildliche Darstellung der Höhe des IgG-Index bei Patienten im Initialkollektiv sowie den beiden unabhängigen Validierungskollektiven, die im SNP rs10136766 homozygot für das Allel A (AA) oder G (GG) oder heterozygot (AG) sind. In jeder Gruppe sind Minimum und Maximum der Werte als vertikale, der Median der Werte als horizontale Linie dargestellt.

### 3.7 Assoziation der intrathekalen IgG-Synthese mit dem IGHC-Locus

Die fünf mit dem IgG-Index signifikant assoziierten SNPs liegen in einer Region auf dem langen Arm von Chromosom 14 (14q32.33). In dieser Region findet sich der sogenannte Immunglobulin-Schwerketten-Locus (Immunglobulin heavy chain locus = IGHC). Hier liegen die Gene, die die schweren Ketten der Immunglobulin-Isotypen IgG1-4 kodieren. Der SNP rs10136766, bei dem die stärkste Assoziation zum IgG-Index nachgewiesen werden konnte, liegt in einem Intron zwischen Exon 8 und 9 des Gens IGHG3 (HGNC: 5527). In Abbildung 10 ist die regionale Assoziation des IgG-Index um SNP rs10136766 dargestellt.



**Abb. 10: Plot der regionalen Assoziation des IgG-Index um rs10136766**

Darstellung aller SNPs, die +/- 500kb von dem SNP rs10136766 entfernt sind, und deren Assoziation zum IgG-Index. Auf der y-Achse sind die negativen Logarithmen der p-Werte der jeweiligen SNPs aufgetragen, auf der x-Achse sind die SNPs nach Chromosomenposition aufgereiht. Der SNP rs10136766 ist violett markiert, die Farbe der anderen SNPs hängt von ihrer Korrelation mit dem SNP-Index wie im Farbschema ab. Graue Farbe bedeutet, dass die Korrelation unbekannt ist. Die Korrelationen entsprechen den hg19/1000g EUR Nov2010-Daten. Die Gene IGHG1-4 im unteren Kasten wurden entsprechend der SNP-Datenbank bei LocusZoom manuell hinzugefügt.

### **3.8 Assoziation der beschriebenen SNPs mit der Prädisposition zu Multipler Sklerose**

Um herauszufinden, ob die im IGHC-Locus identifizierten SNPs nicht nur mit der intrathekalen IgG-Synthese, sondern auch mit Multipler Sklerose assoziiert sind, wurden weitere Untersuchungen durchgeführt. Drei der fünf identifizierten SNPs (rs11621145, rs2725142, rs2753571) wurden bei 1854 MS-Patienten sowie 5175 Kontrollprobanden aus England untersucht. Rs11160868 und rs10136766 fielen bei den Kontrollprobanden durch die Qualitätskontrolle, so dass keine Analyse möglich war. Bei den anderen drei SNPs konnte in dem vorliegenden Datensatz keine Assoziation mit der Erkrankung an Multipler Sklerose nachgewiesen werden (Tabelle 18).

**Tabelle 18: Assoziation der SNPs mit Multipler Sklerose**

<b>SNP</b>	<b>p-Wert</b>	<b>Odds ratio</b>
<b>rs11621145</b>	0,132	0,94 (0,87 - 1,02)
<b>rs2725142</b>	0,140	0,94 (0,87 - 1,02)
<b>rs2753571</b>	0,170	1,06 (0,98 - 1,14)

### 3.9 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die Studie beruht auf der Annahme, dass das Ausmaß der intrathekalen Entzündungsreaktion bei Patienten mit Multipler Sklerose genetisch determiniert ist. Zunächst wurde die Variabilität der intrathekalen IgG-Synthese über die Zeit bei elf Patienten mit Multipler Sklerose untersucht. Über ein Zeitintervall von 2-28 Monaten (im Mittel 12 Monate) zeigte sich bei allen Patienten eine große intraindividuelle Stabilität bei hoher interindividueller Variabilität.

In einer genomweiten Assoziationsstudie wurden bei Patienten mit gesicherter Multipler Sklerose und Klinisch isoliertem Syndrom (CIS) 526 014 Einzelnukleotidpolymorphismen (SNPs) auf eine Assoziation mit den Liquorparametern Leukozytenzahl ( $n=434$ ), IgG-Index ( $n=229$ ), berechnete intrathekale IgG-Synthese ( $IgG_{IF}$ ) ( $n=196$ ), berechnete intrathekale IgA-Synthese ( $IgA_{IF}$ ) ( $n=121$ ) und berechnete intrathekale IgM-Synthese ( $IgM_{IF}$ ) ( $n=101$ ) untersucht. Bei der intrathekalen IgA- und IgM-Synthese wurden im Initialkollektiv potentiell signifikante SNPs gefunden, jedoch wegen der geringen  $n$ -Zahl vorerst nicht weiter verfolgt. Bei einem Signifikanzniveau von  $p=1 \times 10^{-5}$  zeigten sechs SNPs eine signifikante Assoziation zur Zellzahl im Liquor und 21 SNPs zur intrathekalen IgG-Synthese. Von diesen 21 SNPs waren sechs SNPs bei der berechneten IgG-Synthese nach Reiber ( $IgG_{IF}$ ) und 17 SNPs beim IgG-Index im entsprechenden Signifikanzniveau. Zwei SNPs waren für beide Phänotypen signifikant. Von diesen insgesamt 27 SNPs konnten 12 mit Hilfe des iPLEX-Verfahrens in einem zweiten unabhängigen Kollektiv mit 256 Patienten mit Multipler Sklerose und CIS untersucht werden. Eine genetische Assoziation zur Zellzahl im Liquor konnte nicht bestätigt werden. Bei insgesamt fünf SNPs konnte eine statistisch signifikante Assoziation zur intrathekalen IgG-Synthese gezeigt werden: Für die erste Validierung wurde ein Signifikanzniveau von  $p < 7,1 \times 10^{-3}$  angenommen; entsprechend der Bonferroni-Korrektur für sieben unabhängige Tests (= 7 Regionen von 16 SNPs). Eine Assoziationsanalyse von fünf SNPs, die alle auf Chromosom 14 liegen, mit der berechneten intrathekalen IgG-Synthese erbrachte ein statistisch signifikantes Ergebnis. In der Metaanalyse der ersten beiden Kohorten erwies sich ein weiterer SNP auf Chromosom 8 als assoziiert. Zur Überprüfung der bisherigen Ergebnisse wurde eine dritte Kohorte von 153 Patienten mit Multipler Sklerose untersucht. Dabei erreichte der SNP auf Chromosom 8 (rs2408007) einen  $p$ -Wert von  $7,8 \times 10^{-2}$ , was eine genomweite Assoziation nicht bestätigt. Die fünf SNPs auf Chromosom 14 zeigten auch im zweiten Validierungskollektiv eine Assoziation mit intrathekalem IgG. In einer Metaanalyse aller drei Kohorten ergaben sich für die fünf SNPs auf Chromosom 14 (rs11621145, rs11160868, rs10136766, rs2725142 und rs2753571)  $p$ -Werte zwischen  $6,5 \times 10^{-11}$  und  $7,5 \times 10^{-16}$ . Das genomweite Signifikanzniveau wird bei  $p = 5 \times 10^{-8}$  angenommen. Diese fünf SNPs liegen alle im Genlocus IGHC des Chromosoms 14, der die Schwerketten der IgG-Isotypen kodiert. Für SNP rs10136766, der in der Metaanalyse aller drei Kohorten mit einem  $p$ -Wert von  $p = 7,5 \times 10^{-16}$  die stärkste Assoziation zeigt, wurden die Werte des IgG-Index bei

homozygoten und heterozygoten Trägern dargestellt. Es bestätigte sich eine erhöhte intrathekale IgG-Produktion bei homozygoten Trägern des Allels A. Eine Assoziation der genannten fünf SNPs mit der Suszeptibilität einer Multiplen Sklerose konnte nicht gezeigt werden.

## 4 DISKUSSION

Multiple Sklerose (MS) ist nach derzeitigem Kenntnisstand eine Autoimmunerkrankung, die durch ein Zusammenspiel von genetischen Faktoren und Umweltfaktoren entsteht. Eine erhöhte Produktion von Antikörpern im Liquor, insbesondere von Immunglobulinen der Subklasse IgG1 und IgG3, gilt als charakteristisches Merkmal der Erkrankung. Da die intrathekale IgG-Synthese bei verschiedenen MS-Patienten unterschiedlich hoch, jedoch bei jedem Individuum ein Leben lang relativ konstant bleibt, also eine hohe interindividuelle Variabilität bei geringer intraindividuelle Variabilität aufweist, wurde eine genetische Grundlage für das Ausmaß der intrathekalen IgG-Synthese vermutet (Schipper, 1989; Walsh and Tourtellotte, 1986; Warren and Catz, 1985). Dies konnte von uns in einem Kollektiv von elf Patienten für den IgG-Index bestätigt werden.

Ein weiteres Argument, dass die intrathekale IgG-Synthese bei MS-Patienten genetisch determiniert sein könnte, ergeben Studien aus Japan, Spanien, Westaustralien, Schweden und der Türkei. Dort konnte eine Assoziation zwischen HLA-DRB1-Allelen und dem Nachweis von oligoklonalen Banden (OKB) im Liquor gezeigt werden (Idiman et al., 2009; Imrell et al., 2006; Kikuchi et al., 2003; Leone et al., 2013; Mero et al., 2013; Romero-Pinel et al., 2011; Wu et al., 2010).

Es ist bekannt, dass der IgG-Index nicht nur bei MS, sondern auch bei anderen neurologischen Erkrankungen erhöht ist. Insbesondere bei infektiösen Krankheiten des zentralen Nervensystems zeigt sich vorübergehend ein erhöhter IgG-Index, der jedoch im Laufe der Erkrankung stark variiert (Cepok et al., 2003). Bei Patienten mit Multipler Sklerose dagegen bleibt ein bestehender IgG-Index weitgehend stabil (Schipper, 1989; Walsh and Tourtellotte, 1986; Warren and Catz, 1985). Auch therapeutische Ansätze wie Glukokortikoide, Interferon-Beta, B-Zell-Depletion oder autologe Stammzelltransplantation verändern die individuelle intrathekale IgG-Synthese bei MS-Patienten kaum (Archelos et al., 2000; Piccio et al., 2010; Saiz et al., 2001). Die Anzahl der B-Zellen, die im Liquor nachgewiesen werden kann, reduziert sich allerdings unter Therapie zum Teil signifikant.

Um die Hypothese eines Zusammenhangs zwischen entzündlicher Liquorreaktion und Genetik zu prüfen, wurde eine genomweite Assoziationsstudie zu häufigen genetischen Varianten durchgeführt. In einer ersten Kohorte wurden bei Patienten mit gesicherter Multipler Sklerose 526 014 Einzelnukleotidpolymorphismen (SNPs) auf eine Assoziation mit den Liquorparametern Leukozyten (n=434), intrathekale Synthese von IgG, IgA und IgM (n=196/ 121/ 101) sowie IgG-Index (n=229) untersucht. SNPs, die im initialen Kollektiv eine Assoziation mit einem p-Wert  $< 1 \times 10^{-5}$  aufwiesen, wurden in zwei Validierungskollektiven weiter untersucht.

In der vorliegenden Arbeit wurden nur Patienten europäischer Herkunft eingeschlossen. Da für das Initialkollektiv maximal 434 Proben zur Verfügung standen und für das erste Validierungskollektiv max. 330 Proben, wurde zur Sicherung der Ergebnisse ein zweites Validierungskollektiv mit 153 Proben aus Belgien hinzugezogen. Eine Kontrollgruppe mit gesunden Probanden war nicht möglich, da kaum Liquorbefunde mit DNA-Proben verfügbar sind. Die im Initialkollektiv gefundenen möglichen Assoziationen wurden zunächst im ersten Validierungskollektiv überprüft. Die signifikanten SNPs wurden im zweiten Validierungskollektiv untersucht. Zum Ende der Arbeit wurde eine Metaanalyse der drei Kollektive durchgeführt. Für die intrathekale Synthese von IgA und IgM konnten im Initialkollektiv wenige potentiell signifikante SNPs gefunden werden. Auf Grund der niedrigen Probenzahl ( $n = 121$  bzw.  $n = 101$ ) wurden diese SNPs jedoch in den weiteren Kollektiven nicht untersucht. Es kann somit keine Aussage über eine mögliche Assoziation zu genetischen Varianten getroffen werden.

Für die Zellzahl wurden im Initialkollektiv drei möglich assoziierte Regionen im Genom identifiziert. Im ersten Validierungskollektiv konnte keine der Regionen verifiziert werden. Möglicherweise ist die Probandenzahl dieser Arbeit nicht ausreichend gewesen, so dass keine statistisch signifikanten Assoziationen erreicht werden konnten. Vielleicht ist die Pleozytose im Liquor bei MS-Patienten jedoch nicht genetisch determiniert. Etwa 2/3 aller MS-Patienten haben eine normale Zellzahl im Liquor; bei etwa 1/3 der Patienten besteht eine leicht erhöhte Zellzahl mit 5-50 Zellen/ $\mu\text{l}$ . Werte  $> 100$  Zellen/ $\mu\text{l}$  sprechen gegen die Diagnose MS. Da die Zellzahl im Zeitverlauf eines Patienten mit Multipler Sklerose üblicherweise eher nicht konstant ist, überrascht das Ergebnis der vorliegenden Arbeit nicht. Möglicherweise ist die Zellzahl daher eher von der Akuität der entzündlichen Krankheitsaktivität abhängig.

Bei der Betrachtung der intrathekalen IgG-Synthese erwiesen sich quantitative Parameter als geeigneter für die Studie als oligoklonale Banden, die bei 90-95% aller MS-Patienten positiv sind. Daher wurden der IgG-Index sowie die nach der Reiber-Formel berechnete IgG-Synthese ( $\text{IgG}_{\text{IF}}$ ) in die Studie aufgenommen.

Trotzdem bleibt der Nachweis von oligoklonalen Banden - verglichen mit allen anderen qualitativen und quantitativen Tests - die sensitivste Methode, eine intrathekale Immunglobulin-Synthese nachzuweisen (Andersson et al., 1994; Freedman et al., 2005). Einige Studien haben bereits eine Assoziation zwischen dem Nachweis von oligoklonalen Banden im Liquor und dem HLA-DRB1-Gen des Haupthistokompatibilitätskomplex zeigen können (Idiman et al., 2009; Imrell et al., 2006; Kikuchi et al., 2003; Romero-Pinel et al., 2011; Wu et al., 2010). Zwei neuere Studien aus Skandinavien und Italien haben inzwischen mit einer sehr viel höheren Fallzahl als in unserer Studie eine Assoziation zu zwei SNPs des HLA-Komplexes sowie zu einem SNP des Calsyntenin-2-Gens und einem SNP auf Chromosom 6q nachgewiesen (Leone et al., 2013; Mero et al., 2013). Patienten mit OKBs und

Patienten ohne OKBs scheinen immunogenetisch unterschiedlich zu sein, sodass man von einer genetischen Determinierung von OKBs sprechen kann (Imrell et al., 2006). Ob eine Assoziation der oligoklonalen Banden im Liquor zum IGHC-Locus besteht, kann in dieser Studie nicht beantwortet werden.

Für die Assoziation der intrathekalen IgG-Synthese wurden in der vorliegenden Arbeit der IgG-Index sowie die nach der Reiber-Formel berechnete IgG-Synthese ( $IgG_{IF}$ ) herangezogen. Dabei wurden im Initialkollektiv acht Regionen im Genom gefunden, die mit dem IgG-Index bzw. der  $IgG_{IF}$ -Synthese potentiell assoziiert sind. Sieben dieser Regionen (Chromosom 3, 5, 6, 8, 11, 13 und 22) konnten in den Validierungskollektiven nicht repliziert werden. Möglicherweise ist für diese Regionen die Fallzahl der Studie zu niedrig, so dass keine signifikanten Ergebnisse erzielt werden konnten. Um die Assoziation dieser SNPs zu prüfen, sollte daher eine Studie mit mehr Probanden durchgeführt werden. Zu Beginn der Studie wurden die  $IgG_{IF}$ -Synthese und der IgG-Index getrennt untersucht. Da sich beim IgG-Index eine höhere Signifikanz zeigte als bei der  $IgG_{IF}$ -Synthese, wurden die weiteren Untersuchungen zunächst nur für den IgG-Index gemacht. In einem späteren Schritt konnte jedoch gezeigt werden, dass die für den IgG-Index genomweit signifikanten SNPs ebenfalls eine Assoziation mit der  $IgG_{IF}$ -Synthese zeigen. Erwähnenswert scheint, dass der SNP rs10136766 bei beiden Tests der intrathekalen IgG-Synthese die größte Assoziation zeigte.

In allen drei Patientenkollektiven konnte eine genetische Region identifiziert werden, die signifikant mit dem IgG-Index und der  $IgG_{IF}$ -Synthese assoziiert ist. Es wurden 5 SNPs gefunden, die alle auf dem Schwerekettenimmunglobulin-Locus (IGHC) des Chromosoms 14 liegen. Der SNP rs10136766 im IGHG3-Gen zeigt mit einem p-Wert von  $7,5 \times 10^{-16}$  die stärkste Assoziation zur intrathekalen IgG-Synthese und liegt in einem Intron zwischen Exon 8 und Exon 9. Alle fünf assoziierten SNPs stehen zudem in einem hohen Kopplungsungleichgewicht, was dafür spricht, dass es sich um ein tatsächlich positives Ergebnis handelt und die Region von biologischer Relevanz ist. Ähnlich wie die HLA-Region weist der IGHC-Locus eine sehr hohe Anzahl an Polymorphismen auf.

Um die Rolle des IGHC-Locus genauer zu verstehen, ist die Kenntnis über den Aufbau der Antikörper wichtig, insbesondere des Immunglobulins G.

Immunglobuline bestehen aus je zwei identischen leichten Ketten und zwei schweren Ketten, die durch Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Es konnten neun Subklassen der Immunglobuline nachgewiesen werden, die durch die Aminosäuresequenz der konstanten Region der schweren Ketten definiert sind (Jefferis, 2007; Nezlin and Ghetie, 2004; Woof and Burton, 2004). Neben den Subklassen IgA, IgM, IgD und IgE existiert das IgG, das im Folgenden genauer betrachtet wird.

Die leichten Ketten des IgG ( $Ig_L$ :  $Ig\kappa$  und  $Ig\lambda$ ) bestehen aus einer variablen und einer konstanten Domäne ( $V_L$  und  $C_L$ ). Die schweren Ketten des IgG ( $Ig_H$ ) haben eine variable ( $V_C$ ) sowie drei konstante Domänen ( $C_{H1-3}$ ). Der IGHC-Locus beschreibt den Genort, an dem die konstanten Domänen

der schweren Ketten genetisch determiniert sind (Giudicelli et al., 2005). Je nach Kombination der konstanten Domänen von schweren Ketten und leichter Kette entstehen unterschiedliche Allotypen des IgG.

Allotypen der schweren Ketten werden Gm (Genetic marker) abgekürzt. Eine erste Ziffer gibt die Subklasse des IgG an (z.B. G1m für einen IgG1-Allotyp), eine zweite Ziffer nummeriert die verschiedenen Allotypen durch (G1m1, G1m2, ...) (1976b; Jefferis and Lefranc, 2009). Die Gene des IGHC-Locus stehen in einem hohen Kopplungsungleichgewicht, so dass diese in den meisten Fällen gemeinsam vererbt werden. Dabei spricht man von einem haploiden Genotyp, bzw. in diesem Fall von den Gm-Haplotypen (Jefferis and Lefranc, 2009). Die schweren Ketten der verschiedenen Gm-Haplotypen unterscheiden sich letztlich durch den Austausch weniger Aminosäuren (Compston et al., 1976; Link et al., 2012; Terasaki et al., 1976).

In der vorliegenden Arbeit konnte eine starke Assoziation der intrathekalen IgG-Synthese zum Genlocus IGHC nachgewiesen werden. Unklar bleibt, ob diese Assoziation nur bei Patienten mit Multipler Sklerose vorliegt oder generell eine Assoziation zu einer höheren intrathekalen IgG-Synthese besteht.

In der Literatur wird die Korrelation des Gm-Allotyps mit Multipler Sklerose kontrovers diskutiert. Studien zu Prädisposition, Verlauf und Schwere der Erkrankung sowie zur absoluten Höhe des IgG im Liquor ergeben unterschiedliche Ergebnisse. Sesboue, Haile und Raknes konnten bei ihren Kollektiven keinen Zusammenhang zwischen Gm-Allotypen und Patienten mit Multipler Sklerose finden (Haile et al., 1985; Raknes et al., 2000; Sesboue et al., 1985). Pandey vermutet ein vierfach erhöhtes Risiko an Multipler Sklerose zu erkranken, wenn man den G1m17,21-Allotyp hat (Pandey et al., 1981). Blanc zeigte eine Assoziation zu MS für den G3m23,5-Allotyp (Blanc et al., 1986). Salier konnte IgG aus ZNS-Läsionen isolieren und zeigen, dass speziell der G3m-Allotyp keine Assoziation zu MS aufweist (Salier et al., 1983).

Bereits 1993 hat man eine Assoziation zwischen Gm-Allotypen und MS untersucht, ohne signifikante Ergebnisse (Hillert, 1993). In der 2011 durchgeführten genomweiten Assoziationsstudie von Sawcer (Sawcer et al., 2011b) konnten die in der vorliegenden Studie signifikanten SNPs nicht genauer untersucht werden, da dieser Locus bei den Kontrollprobanden nicht adäquat genotypisiert werden konnte. Daher wurde im Rahmen der vorliegenden Studie bei einem Kollektiv von 1854 Patienten mit Multipler Sklerose und 5175 Kontrollen das Genom auf die fünf signifikanten SNPs untersucht. Nach Qualitätskontrolle konnten drei SNPs auf ihre Assoziation überprüft werden. Diese zeigten bei dem vorliegenden Kollektiv keine Assoziation zu Multipler Sklerose. Anhand unserer Daten muss daher davon ausgegangen werden, dass der IGHC-Locus für die Entstehung der Multiplen Sklerose keine Rolle spielt.

Ob Polymorphismen des IGHC-Locus den Krankheitsverlauf der Multiplen Sklerose beeinflussen, bleibt ebenfalls herauszufinden. Verschiedene unkontrollierte Versuchsreihen und neuropathologische Studien ergeben indirekte Hinweise darauf, dass das Ausmaß der humoralen Immunantwort im ZNS für die Langzeitprognose der MS-Patienten relevant sein könnte. Stendahl-Brodin zeigte bereits 1980, dass Patienten mit positiven oligoklonalen Banden eine deutlich höhere intrathekale Entzündungsaktivität haben und dies wiederum mit einem schnelleren Fortschreiten der Multiplen Sklerose einhergeht (Stendahl-Brodin and Link, 1980). Howell wies nach, dass das Auftreten von B-Zell-Follikeln im ZNS mit einer erhöhten diffusen Entzündungsaktivität sowie schwerem Verlauf der Erkrankung korreliert (Howell et al., 2011). Auch Calabrese konnte zeigen, dass viele kortikale Läsionen und eine erhöhte intrathekale Ig-Synthese zu einer höheren Konversionsrate von Klinisch isoliertem Syndrom (CIS) zu MS führen bzw. zu einem aggressiveren Krankheitsverlauf bei manifester MS (Calabrese et al., 2012). Auch Dobson und Kuhle konnten eine enge Assoziation zwischen kortikalen Läsionen, Patientenalter und dem Nachweis von oligoklonalen Banden im Liquor mit einem Übergang vom Klinisch isolierten Syndrom zu manifester Multiplen Sklerose zeigen (Dobson et al., 2013; Kuhle et al., 2015).

Möglicherweise beeinflussen die SNPs im IGHC-Locus die Interaktion zwischen IgG und diversen Fc- $\gamma$ -Rezeptoren, insbesondere dem neonatalen Fc- $\gamma$ -Rezeptor, der an der Blut-Liquor-Schranke gebildet wird und bei der Homöostase des IgG und dessen Verteilung im Gehirn eine Rolle spielt (Garg and Balthasar, 2009; Roopenian and Akilesh, 2007; Schlachetzki et al., 2002).

Bisher ist für die G1m- und G2m-Allotypen eine Assoziation mit einer anderen Immunerkrankungen beschrieben: Asthma bronchiale bei Kindern (Oxelius et al., 1998). Der Vergleich der genetischen Assoziationen von verschiedenen Autoimmunerkrankungen wird in Zukunft wichtig sein, um die Pathogenese der MS besser zu verstehen (Nylander and Hafler, 2012).

Somit zeigt die vorliegende Studie, dass die Anzahl der intrathekalen IgG-Antikörper zumindest teilweise genetisch determiniert ist. Die Höhe des intrathekalen IgGs bei MS-Patienten ist mit dem IGHC-Locus assoziiert. Der IGHC-Locus hat antigenunabhängig Einfluss auf die Menge des intrathekalen IgGs. Wenn erhöhtes IgG pathogen ist, dann sollte eine höhere Ausschüttung zur Schädigung von liquornahem Gewebe führen, was bei Multipler Sklerose der Fall ist. Somit kann die Hypothese aufgestellt werden, dass die Menge des intrathekalen IgGs kein Marker für die Krankheitsaktivität ist. Vielmehr scheint die Antikörper-Homöostase im Liquor genetisch determiniert zu sein. Somit wäre die quantitative Messung der intrathekal produzierten Antikörper nur ein Epiphänomen der Genetik eines Patienten mit Multipler Sklerose. Ein hoher IgG-Index oder ein starker Nachweis von oligoklonalen Banden (OKB) wären dann kein Zeichen für eine primär hohe Krankheitsaktivität.

Es werden weitere Studien bei Menschen mit verschiedenen neurologischen Erkrankungen und erhöhter intrathekalen IgG-Synthese nötig sein, um die Rolle des IGHC-Locus vollständig zu verstehen. Vielleicht ist er für die Entstehung und Regulierung der Immunantwort durch IgG verantwortlich - unabhängig von der zugrunde liegenden Erkrankung. Zukünftige Studien werden untersuchen müssen, wodurch dieser Locus ein höheres intrathekales IgG induziert und inwieweit diese genetische Variation im IGHC-Locus mit Multipler Sklerose assoziiert ist. Es bleibt herauszufinden, ob diese genetische Variation eine Veränderung des Krankheitsverlaufs und schlussendlich der Therapiemöglichkeiten haben wird – sei es nun bei Multipler Sklerose oder anderen entzündlichen Erkrankungen des zentralen Nervensystems. Möglicherweise wird man durch Kenntnisse der genetischen Disposition gerade in frühen Stadien von Erkrankungen Möglichkeiten haben, die Therapie individuell abzustimmen.

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

Die Multiple Sklerose ist eine chronisch-entzündliche Erkrankung des zentralen Nervensystems. Man geht heute davon aus, dass es sich um eine Autoimmunerkrankung handelt, deren Manifestation durch Umwelt und Genetik beeinflusst wird. In der Diagnostik der Multiplen Sklerose wird in Deutschland routinemäßig eine Lumbalpunktion durchgeführt und der Liquor untersucht. Dabei zeigen sich Veränderungen verschiedener Parameter, wovon jedoch keiner spezifisch für eine Multiple Sklerose ist. Charakteristisch für Multiple Sklerose sind insbesondere eine erhöhte Zellzahl im Liquor sowie eine erhöhte intrathekale IgG-Synthese. Daher besteht Grund zur Annahme, dass diese Parameter relevant für die Entstehung der Erkrankung sein könnten. Bisher sind die genaue Pathogenese der Erkrankung sowie die Relevanz der Pleozytose und der intrathekalen Immunglobulinsynthese nicht bekannt. Insbesondere bei der IgG-Synthese kann ein genetischer Zusammenhang vermutet werden, da die intrathekale IgG-Synthese bei verschiedenen Patienten mit Multipler Sklerose unterschiedlich hoch, jedoch bei jedem Individuum lebenslanglich konstant zu sein scheint.

In einer genomweiten Assoziationsstudie wurden in einem Initialkollektiv bei einem p-Wert  $< 10^{-5}$  526 014 Einzelnukleotidpolymorphismen (SNPs) auf Assoziationen mit den Liquorbefunden von Patienten mit Multipler Sklerose untersucht. Die gefundenen SNPs wurden in zwei Validierungskollektiven von Patienten mit Multipler Sklerose überprüft. Bei der Zellzahl konnten die drei im Initialkollektiv gefundenen Regionen im Genom in einem ersten Validierungskollektiv nicht bestätigt werden. Es konnte somit keine genomweite Assoziation der Zellzahl im Liquor von MS-Patienten zu einer bestimmten Genregion nachgewiesen werden. Eine zu Beginn verfolgte mögliche Assoziation zur intrathekalen IgA- bzw. IgM-Synthese wurde auf Grund von niedrigen n-Zahlen nicht weiter verfolgt.

Bei der intrathekalen IgG-Synthese wurden im Initialkollektiv acht genetische Regionen identifiziert, die möglicherweise eine Assoziation aufweisen. Für eine Region auf Chromosom 14 mit fünf SNPs (rs11621145, rs11160868, rs10136766, rs2725142 und rs2753571) konnte in einem ersten sowie in einem zweiten Validierungskollektiv eine genomweite Assoziation bestätigt werden: Der SNP rs10136766 zeigte in der Metaanalyse der drei Kollektive mit einem p-Wert von  $p = 7,5 \times 10^{-16}$  die stärkste Assoziation zum IgG-Index. Alle fünf SNPs sind in den vorliegenden Kollektiven in einem hohen Kopplungsungleichgewicht. Die fünf SNPs liegen auf dem Genlocus, der die konstante Domäne der Schwerekettenimmunglobuline kodiert (IGHC-Locus).

Genetische Varianten des IGHG-Locus sind folglich mit der Menge des intrathekalen IgGs bei Patienten mit Multipler Sklerose assoziiert. Da jedoch für den IGHG-Locus in dieser und anderen Studien keine signifikante Assoziation zu Multipler Sklerose nachgewiesen werden konnte, muss aktuell davon ausgegangen werden, dass der IGHG-Locus die intrathekale IgG-Synthese unabhängig von der

zugrundeliegenden Erkrankung und daher antigenunabhängig beeinflusst. Es konnte somit eine genetische Determinierung der intrathekalen IgG-Synthese nachgewiesen werden, ohne dass diese Synthese sicher von der zugrunde liegenden Erkrankung abhängt. Somit scheint die Menge des intrathekalen IgGs auch kein primärer Marker für die Krankheitsaktivität zu sein. Die Ergebnisse ermöglichen ein besseres Verständnis der erhöhten IgG-Liquorwerte bei MS-Patienten und möglicherweise auch bei anderen Erkrankungen. Weitere Studien müssen in Zukunft untersuchen, durch welche Mechanismen der IGHC-Locus die IgG-Liquorwerte beeinflusst und wie diese Erkenntnisse in Zukunft bei der Therapie der Multiplen Sklerose oder anderer neurologischer Erkrankungen mit erhöhtem intrathekalen IgG verwendet werden können.

# LITERATURVERZEICHNIS

- 1976a. Review of the notation for the allotypic and related markers of human immunoglobulins. WHO meeting on human immunoglobulin allotypic markers, held 16-19 July 1974, Rouen, France. Report amended June 1976. *Journal of immunogenetics*. 3, 357-62.
- 1976b. Review of the notation for the allotypic and related markers of human immunoglobulins. *Journal of immunology*. 117, 1056-8.
- Andersson, M., Alvarez-Cermeno, J., Bernardi, G., Cogato, I., Fredman, P., Frederiksen, J., Fredrikson, S., Gallo, P., Grimaldi, L.M., Gronning, M., et al., 1994. Cerebrospinal fluid in the diagnosis of multiple sclerosis: a consensus report. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*. 57, 897-902.
- Archelos, J.J., Storch, M.K., Hartung, H.P., 2000. The role of B cells and autoantibodies in multiple sclerosis. *Annals of neurology*. 47, 694-706.
- Ascherio, A., Munger, K.L., 2007a. Environmental risk factors for multiple sclerosis. Part I: the role of infection. *Annals of neurology*. 61, 288-99.
- Ascherio, A., Munger, K.L., 2007b. Environmental risk factors for multiple sclerosis. Part II: Noninfectious factors. *Annals of neurology*. 61, 504-13.
- Awad, A., Hemmer, B., Hartung, H.P., Kieseier, B., Bennett, J.L., Stuve, O., 2010. Analyses of cerebrospinal fluid in the diagnosis and monitoring of multiple sclerosis. *Journal of neuroimmunology*. 219, 1-7.
- Baranzini, S.E., Jeong, M.C., Butunoi, C., Murray, R.S., Bernard, C.C., Oksenberg, J.R., 1999. B cell repertoire diversity and clonal expansion in multiple sclerosis brain lesions. *Journal of immunology*. 163, 5133-44.
- Beecham, A.H., Patsopoulos, N.A., Xifara, D.K., Davis, M.F., Kempainen, A., Cotsapas, C., Shah, T.S., Spencer, C., Booth, D., Goris, A., Oturai, A., Saarela, J., Fontaine, B., Hemmer, B., Martin, C., Zipp, F., D'Alfonso, S., Martinelli-Boneschi, F., Taylor, B., Harbo, H.F., Kockum, I., Hillert, J., Olsson, T., Ban, M., Oksenberg, J.R., Hintzen, R., Barcellos, L.F., Agliardi, C., Alfredsson, L., Alizadeh, M., Anderson, C., Andrews, R., Sondergaard, H.B., Baker, A., Band, G., Baranzini, S.E., Barizzone, N., Barrett, J., Bellenguez, C., Bergamaschi, L., Bernardinelli, L., Berthele, A., Biberacher, V., Binder, T.M., Blackburn, H., Bomfim, I.L., Brambilla, P., Broadley, S., Brochet, B., Brundin, L., Buck, D., Butzkueven, H., Caillier, S.J., Camu, W., Carpentier, W., Cavalla, P., Celius, E.G., Coman, I., Comi, G., Corrado, L., Cosemans, L., Cournu-Rebeix, I., Cree, B.A., Cusi, D., Damotte, V., Defer, G., Delgado, S.R., Deloukas, P., di Sapio, A., Diltthey, A.T., Donnelly, P., Dubois, B., Duddy, M., Edkins, S., Elovaara, I., Esposito, F., Evangelou, N., Fiddes, B., Field, J., Franke, A., Freeman, C., Frohlich, I.Y., Galimberti, D., Gieger, C., Gourraud, P.A., Graetz, C., Graham, A., Grummel, V., Guaschino, C., Hadjixenofontos, A., Hakonarson, H., Halfpenny, C., Hall, G., Hall, P., Hamsten, A., Harley, J., Harrower, T., Hawkins, C., Hellenthal, G., Hillier, C., Hobart, J., Hoshi, M., Hunt, S.E., Jagodic, M., Jelcic, I., Jochim, A., Kendall, B., Kermodé, A., Kilpatrick, T., Koivisto, K., Konidari, I., Korn, T., Kronsbein, H., Langford, C., Larsson, M., Lathrop, M., Lebrun-Frenay, C., Lechner-Scott, J., Lee, M.H., Leone, M.A., Leppä, V., Liberatore, G., Lie, B.A., Lill, C.M., Linden, M., Link, J., Luessi, F., Lycke, J., Macchiardi, F., Mannisto, S., Manrique, C.P., Martin, R., Martinelli, V., Mason, D., Mazibrada, G., McCabe, C., Mero, I.L., Mescheriakova, J., Moutsianas, L., Myhr, K.M., Nagels, G., Nicholas, R., Nilsson, P., Piehl, F., Pirinen, M., Price, S.E., Quach, H., Reunanen, M., Robberecht, W., Robertson, N.P., Rodegher, M., Rog, D., Salvetti, M., Schnetz-Boutaud, N.C., Sellebjerg, F., Selter, R.C., Schaefer, C., Shaunak, S., Shen, L., Shields, S., Siffrin, V., Slee, M., Sorensen, P.S., Sorosina, M., Sospedra, M., Spurkland, A., Strange, A., Sundqvist, E., Thijs, V., Thorpe, J., Ticca, A., Tienari, P., van Duijn, C., Visser, E.M., Vucic, S., Westerlind, H., Wiley, J.S., Wilkins, A., Wilson, J.F., Winkelmann, J., Zajicek, J., Zindler,

- E., Haines, J.L., Pericak-Vance, M.A., Ivinson, A.J., Stewart, G., Hafler, D., Hauser, S.L., Compston, A., McVean, G., De Jager, P., Sawcer, S.J., McCauley, J.L., 2013. Analysis of immune-related loci identifies 48 new susceptibility variants for multiple sclerosis. *Nature genetics*. 45, 1353-60.
- Blanc, M., Clanet, M., Berr, C., Dugoujon, J.M., Ruydavet, B., Ducos, S.J., Rascol, A., Alperovitch, A., 1986. Immunoglobulin allotypes and susceptibility to multiple sclerosis. An epidemiological and genetic study in the Hautes-Pyrenees county of France. *Journal of the neurological sciences*. 75, 1-5.
- Burechailo, F., Cunningham, T.A., 1974. Counting cells in cerebrospinal fluid collected directly on membrane filters. *Journal of clinical pathology*. 27, 101-5.
- Calabrese, M., Federle, L., Bernardi, V., Rinaldi, F., Favaretto, A., Varagnolo, M.C., Perini, P., Plebani, M., Gallo, P., 2012. The association of intrathecal immunoglobulin synthesis and cortical lesions predicts disease activity in clinically isolated syndrome and early relapsing-remitting multiple sclerosis. *Multiple sclerosis*. 18, 174-80.
- Celius, E.G., Vandvik, B., 2001. Multiple sclerosis in Oslo, Norway: prevalence on 1 January 1995 and incidence over a 25-year period. *European journal of neurology : the official journal of the European Federation of Neurological Societies*. 8, 463-9.
- Cepok, S., Zhou, D., Vogel, F., Rosche, B., Grummel, V., Sommer, N., Hemmer, B., 2003. The immune response at onset and during recovery from *Borrelia burgdorferi* meningoradiculitis. *Archives of neurology*. 60, 849-55.
- Cepok, S., Rosche, B., Grummel, V., Vogel, F., Zhou, D., Sayn, J., Sommer, N., Hartung, H.P., Hemmer, B., 2005. Short-lived plasma blasts are the main B cell effector subset during the course of multiple sclerosis. *Brain : a journal of neurology*. 128, 1667-76.
- Compston, A., Coles, A., 2002. Multiple sclerosis. *Lancet*. 359, 1221-31.
- Compston, A., 2006. Making progress on the natural history of multiple sclerosis. *Brain : a journal of neurology*. 129, 561-3.
- Compston, A., Coles, A., 2008. Multiple sclerosis. *Lancet*. 372, 1502-17.
- Compston, D.A., Batchelor, J.R., McDonald, W.I., 1976. B-lymphocyte alloantigens associated with multiple sclerosis. *Lancet*. 2, 1261-5.
- Cross, A.H., Stark, J.L., Lauber, J., Ramsbottom, M.J., Lyons, J.A., 2006. Rituximab reduces B cells and T cells in cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients. *Journal of neuroimmunology*. 180, 63-70.
- De Jager, P.L., Jia, X., Wang, J., de Bakker, P.I., Ottoboni, L., Aggarwal, N.T., Piccio, L., Raychaudhuri, S., Tran, D., Aubin, C., Briskin, R., Romano, S., Baranzini, S.E., McCauley, J.L., Pericak-Vance, M.A., Haines, J.L., Gibson, R.A., Naeglin, Y., Uitdehaag, B., Matthews, P.M., Kappos, L., Polman, C., McArdle, W.L., Strachan, D.P., Evans, D., Cross, A.H., Daly, M.J., Compston, A., Sawcer, S.J., Weiner, H.L., Hauser, S.L., Hafler, D.A., Oksenberg, J.R., 2009. Meta-analysis of genome scans and replication identify CD6, IRF8 and TNFRSF1A as new multiple sclerosis susceptibility loci. *Nature genetics*. 41, 776-82.
- Debouverie, M., Pittion-Vouyovitch, S., Louis, S., Roederer, T., Guillemin, F., 2007. Increasing incidence of multiple sclerosis among women in Lorraine, Eastern France. *Multiple sclerosis*. 13, 962-7.
- Delpech, B., Lichtblau, E., 1972. [Immunochemical estimation of IgG and albumin in cerebrospinal fluid]. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 37, 15-23.
- Di Pauli, F., Reindl, M., Ehling, R., Schautzer, F., Gneiss, C., Lutterotti, A., O'Reilly, E., Munger, K., Deisenhammer, F., Ascherio, A., Berger, T., 2008. Smoking is a risk factor for early conversion to clinically definite multiple sclerosis. *Multiple sclerosis*. 14, 1026-30.
- Disanto, G., Morahan, J.M., Barnett, M.H., Giovannoni, G., Ramagopalan, S.V., 2012. The evidence for a role of B cells in multiple sclerosis. *Neurology*. 78, 823-32.

- Dobson, R., Ramagopalan, S., Davis, A., Giovannoni, G., 2013. Cerebrospinal fluid oligoclonal bands in multiple sclerosis and clinically isolated syndromes: a meta-analysis of prevalence, prognosis and effect of latitude. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*. 84, 909-14.
- Drulovic, J., Stojisavljevic, N., Dujmovic, I., Sokic, D., Mavra, M., Levic, Z., 1995. [Findings of cerebrospinal fluid in the diagnosis of multiple sclerosis]. *Srpski arhiv za celokupno lekarstvo*. 123, 191-3.
- Ebers, G.C., 2008. Environmental factors and multiple sclerosis. *Lancet neurology*. 7, 268-77.
- Fortini, A.S., Sanders, E.L., Weinshenker, B.G., Katzmann, J.A., 2003. Cerebrospinal fluid oligoclonal bands in the diagnosis of multiple sclerosis. Isoelectric focusing with IgG immunoblotting compared with high-resolution agarose gel electrophoresis and cerebrospinal fluid IgG index. *American journal of clinical pathology*. 120, 672-5.
- Freedman, M.S., Thompson, E.J., Deisenhammer, F., Giovannoni, G., Grimsley, G., Keir, G., Ohman, S., Racke, M.K., Sharief, M., Sindic, C.J., Sellebjerg, F., Tourtellotte, W.W., 2005. Recommended standard of cerebrospinal fluid analysis in the diagnosis of multiple sclerosis: a consensus statement. *Archives of neurology*. 62, 865-70.
- Freedman, M.S., 2006. Disease-modifying drugs for multiple sclerosis: current and future aspects. *Expert opinion on pharmacotherapy*. 7 Suppl 1, S1-9.
- Frohman, E.M., Goodin, D.S., Calabresi, P.A., Corboy, J.R., Coyle, P.K., Filippi, M., Frank, J.A., Galetta, S.L., Grossman, R.I., Hawker, K., Kachuck, N.J., Levin, M.C., Phillips, J.T., Racke, M.K., Rivera, V.M., Stuart, W.H., 2003. The utility of MRI in suspected MS: report of the Therapeutics and Technology Assessment Subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology*. 61, 602-11.
- Garg, A., Balthasar, J.P., 2009. Investigation of the influence of FcRn on the distribution of IgG to the brain. *The AAPS journal*. 11, 553-7.
- Giudicelli, V., Chaume, D., Lefranc, M.P., 2005. IMGT/GENE-DB: a comprehensive database for human and mouse immunoglobulin and T cell receptor genes. *Nucleic acids research*. 33, D256-61.
- Greve, B., Magnusson, C.G., Melms, A., Weissert, R., 2001. Immunoglobulin isotypes reveal a predominant role of type 1 immunity in multiple sclerosis. *Journal of neuroimmunology*. 121, 120-5.
- Hafler, D.A., Compston, A., Sawcer, S., Lander, E.S., Daly, M.J., De Jager, P.L., de Bakker, P.I., Gabriel, S.B., Mirel, D.B., Ivinson, A.J., Pericak-Vance, M.A., Gregory, S.G., Rioux, J.D., McCauley, J.L., Haines, J.L., Barcellos, L.F., Cree, B., Oksenberg, J.R., Hauser, S.L., 2007. Risk alleles for multiple sclerosis identified by a genomewide study. *The New England journal of medicine*. 357, 851-62.
- Haile, R.W., Goldstein, A., Field, L., Marazita, M.L., 1985. A linkage analysis of the Gm locus and multiple sclerosis. *Genetic epidemiology*. 2, 29-34.
- Hardy, J., Singleton, A., 2009. Genomewide association studies and human disease. *The New England journal of medicine*. 360, 1759-68.
- Hauser, S.L., Oksenberg, J.R., 2006. The neurobiology of multiple sclerosis: genes, inflammation, and neurodegeneration. *Neuron*. 52, 61-76.
- Hauser, S.L., Waubant, E., Arnold, D.L., Vollmer, T., Antel, J., Fox, R.J., Bar-Or, A., Panzara, M., Sarkar, N., Agarwal, S., Langer-Gould, A., Smith, C.H., 2008. B-cell depletion with rituximab in relapsing-remitting multiple sclerosis. *The New England journal of medicine*. 358, 676-88.
- Hillert, J., 1993. Immunoglobulin gamma constant gene region polymorphisms in multiple sclerosis. *Journal of neuroimmunology*. 43, 9-14.
- Hirtz, D., Thurman, D.J., Gwinn-Hardy, K., Mohamed, M., Chaudhuri, A.R., Zalutsky, R., 2007. How common are the "common" neurologic disorders? *Neurology*. 68, 326-37.

- Horton, R., Wilming, L., Rand, V., Lovering, R.C., Bruford, E.A., Khodiyar, V.K., Lush, M.J., Povey, S., Talbot, C.C., Jr., Wright, M.W., Wain, H.M., Trowsdale, J., Ziegler, A., Beck, S., 2004. Gene map of the extended human MHC. *Nature reviews. Genetics.* 5, 889-99.
- Howell, O.W., Reeves, C.A., Nicholas, R., Carassiti, D., Radotra, B., Gentleman, S.M., Serafini, B., Aloisi, F., Roncaroli, F., Magliozzi, R., Reynolds, R., 2011. Meningeal inflammation is widespread and linked to cortical pathology in multiple sclerosis. *Brain : a journal of neurology.* 134, 2755-71.
- Idiman, E., Ozakbas, S., Dogan, Y., Kosehasanogullari, G., 2009. The significance of oligoclonal bands in multiple sclerosis: relevance of demographic and clinical features, and immunogenetic backgrounds. *Journal of neuroimmunology.* 212, 121-4.
- Imrell, K., Landtblom, A.M., Hillert, J., Masterman, T., 2006. Multiple sclerosis with and without CSF bands: clinically indistinguishable but immunogenetically distinct. *Neurology.* 67, 1062-4.
- Jefferis, R., 2007. Antibody therapeutics: isotype and glycoform selection. *Expert opinion on biological therapy.* 7, 1401-13.
- Jefferis, R., Lefranc, M.P., 2009. Human immunoglobulin allotypes: possible implications for immunogenicity. *MAbs.* 1, 332-8.
- Jersild, C., Svejgaard, A., Fog, T., 1972. HL-A antigens and multiple sclerosis. *Lancet.* 1, 1240-1.
- Joseph, F.G., Hirst, C.L., Pickersgill, T.P., Ben-Shlomo, Y., Robertson, N.P., Scolding, N.J., 2009. CSF oligoclonal band status informs prognosis in multiple sclerosis: a case control study of 100 patients. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry.* 80, 292-6.
- Kappos, L., Li, D., Calabresi, P.A., O'Connor, P., Bar-Or, A., Barkhof, F., Yin, M., Leppert, D., Glanzman, R., Tinbergen, J., Hauser, S.L., 2011. Ocrelizumab in relapsing-remitting multiple sclerosis: a phase 2, randomised, placebo-controlled, multicentre trial. *Lancet.* 378, 1779-87.
- Keegan, M., Konig, F., McClelland, R., Bruck, W., Morales, Y., Bitsch, A., Panitch, H., Lassmann, H., Weinshenker, B., Rodriguez, M., Parisi, J., Lucchinetti, C.F., 2005. Relation between humoral pathological changes in multiple sclerosis and response to therapeutic plasma exchange. *Lancet.* 366, 579-82.
- Keir, G., Luxton, R.W., Thompson, E.J., 1990. Isoelectric focusing of cerebrospinal fluid immunoglobulin G: an annotated update. *Annals of clinical biochemistry.* 27 ( Pt 5), 436-43.
- Keren, D.F., 2003. Optimizing detection of oligoclonal bands in cerebrospinal fluid by use of isoelectric focusing with IgG immunoblotting. *American journal of clinical pathology.* 120, 649-51.
- Kikuchi, S., Fukazawa, T., Niino, M., Yabe, I., Miyagishi, R., Hamada, T., Hashimoto, S.A., Tashiro, K., 2003. HLA-related subpopulations of MS in Japanese with and without oligoclonal IgG bands. *Human leukocyte antigen. Neurology.* 60, 647-51.
- Kuhle, J., Disanto, G., Dobson, R., Adiatori, R., Bianchi, L., Topping, J., Bestwick, J., Meier, U.C., Marta, M., Costa, G.D., Runia, T., Evdoshenko, E., Lazareva, N., Thouvenot, E., Iaffaldano, P., Drenzo, V., Khademi, M., Piehl, F., Comabella, M., Sombekke, M., Killestein, J., Hegen, H., Rauch, S., D'Alfonso, S., Alvarez-Cermenon, J., Kleinova, P., Horakova, D., Roesler, R., Lauda, F., Llufrui, 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., Malmstrom, C., Scarpini, E., Fenoglio, C., Wergeland, S., Laroni, A., Annibaldi, V., Romano, S., Martinez, A., Carra, A., Salvetti, M., Uccelli, A., Torkildsen, O., Myhr, K., Galimberti, D., Rejdak, K., Lycke, J., Frederiksen, J., Drulovic, J., Confavreux, C., Brassat, D., Enzinger, C., Fuchs, S., Bosca, I., Pelletier, J., Picard, C., Colombo, E., Franciotta, D., Derfuss, T., Lindberg, R., Yaldizli, O., Vecsei, L., Kieseier, B., Hartung, H., Villoslada, P., Siva, A., Saiz, A., Tumani, H., Havrdova, E., Villar, L., Leone, M., Barizzone, N., Deisenhammer, F., Teunissen, C., Montalban, X., Tintore, M., Olsson, T., Trojano, M., Lehmann, S., Castelnovo, G., Lapin, S., Hintzen, R., Kappos, L., Furlan, R., Martinelli, V., Comi, G., Ramagopalan,

- S., Giovannoni, G., 2015. Conversion from clinically isolated syndrome to multiple sclerosis: A large multicentre study. *Multiple sclerosis*.
- Leone, M.A., Barizzzone, N., Esposito, F., Lucenti, A., Harbo, H.F., Goris, A., Kockum, I., Oturai, A.B., Celius, E.G., Mero, I.L., Dubois, B., Olsson, T., Sondergaard, H.B., Cusi, D., Lupoli, S., Andreassen, B.K., Myhr, K.M., Guerini, F.R., Comi, G., Martinelli-Boneschi, F., D'Alfonso, S., 2013. Association of genetic markers with CSF oligoclonal bands in multiple sclerosis patients. *PloS one*. 8, e64408.
- Link, H., Huang, Y.M., 2006. Oligoclonal bands in multiple sclerosis cerebrospinal fluid: an update on methodology and clinical usefulness. *Journal of neuroimmunology*. 180, 17-28.
- Link, J., Kockum, I., Lorentzen, A.R., Lie, B.A., Celius, E.G., Westerlind, H., Schaffer, M., Alfredsson, L., Olsson, T., Brynedal, B., Harbo, H.F., Hillert, J., 2012. Importance of human leukocyte antigen (HLA) class I and II alleles on the risk of multiple sclerosis. *PloS one*. 7, e36779.
- Lolli, F., Siracusa, G., Amato, M.P., Fratiglioni, L., Dal Pozzo, G., Galli, E., Amaducci, L., 1991. Intrathecal synthesis of free immunoglobulin light chains and IgM in initial multiple sclerosis. *Acta neurologica Scandinavica*. 83, 239-43.
- Lourenco, P., Shirani, A., Saeedi, J., Oger, J., Schreiber, W.E., Tremlett, H., 2012. Oligoclonal bands and cerebrospinal fluid markers in multiple sclerosis: associations with disease course and progression. *Multiple sclerosis*.
- Luque, F.A., Jaffe, S.L., 2007. Cerebrospinal fluid analysis in multiple sclerosis. *International review of neurobiology*. 79, 341-56.
- Martino, G., Servalli, C., Filippi, M., Buscemi, M., Martinelli, V., Furlan, R., Comi, G., Grimaldi, L.M., 1993. Absence of oligoclonally restricted immunoglobulins in tears from multiple sclerosis patients. *Journal of neuroimmunology*. 44, 149-55.
- McDonald, W.I., Compston, A., Edan, G., Goodkin, D., Hartung, H.P., Lublin, F.D., McFarland, H.F., Paty, D.W., Polman, C.H., Reingold, S.C., Sandberg-Wollheim, M., Sibley, W., Thompson, A., van den Noort, S., Weinshenker, B.Y., Wolinsky, J.S., 2001. Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the diagnosis of multiple sclerosis. *Annals of neurology*. 50, 121-7.
- Mehta, P.D., Patrick, B.A., Miller, J.A., 1984. Absence of oligoclonal IgA in CSF and serum of multiple sclerosis patients. *Journal of neuroimmunology*. 6, 67-9.
- Mero, I.L., Gustavsen, M.W., Saether, H.S., Flam, S.T., Berg-Hansen, P., Sondergaard, H.B., Jensen, P.E., Berge, T., Bjolgerud, A., Muggerud, A., Aarseth, J.H., Myhr, K.M., Celius, E.G., Sellebjerg, F., Hillert, J., Alfredsson, L., Olsson, T., Oturai, A.B., Kockum, I., Lie, B.A., Andreassen, B.K., Harbo, H.F., 2013. Oligoclonal band status in Scandinavian multiple sclerosis patients is associated with specific genetic risk alleles. *PloS one*. 8, e58352.
- Moutsianas, L., Jostins, L., Beecham, A.H., Dilthey, A.T., Xifara, D.K., Ban, M., Shah, T.S., Patsopoulos, N.A., Alfredsson, L., Anderson, C.A., Attfield, K.E., Baranzini, S.E., Barrett, J., Binder, T.M., Booth, D., Buck, D., Celius, E.G., Cotsapas, C., D'Alfonso, S., Dendrou, C.A., Donnelly, P., Dubois, B., Fontaine, B., Lar Fugger, L., Goris, A., Gourraud, P.A., Graetz, C., Hemmer, B., Hillert, J., Kockum, I., Leslie, S., Lill, C.M., Martinelli-Boneschi, F., Oksenberg, J.R., Olsson, T., Oturai, A., Saarela, J., Sondergaard, H.B., Spurkland, A., Taylor, B., Winkelmann, J., Zipp, F., Haines, J.L., Pericak-Vance, M.A., Spencer, C.C., Stewart, G., Hafler, D.A., Ivinson, A.J., Harbo, H.F., Hauser, S.L., De Jager, P.L., Compston, A., McCauley, J.L., Sawcer, S., McVean, G., 2015. Class II HLA interactions modulate genetic risk for multiple sclerosis. *Nature genetics*. 47, 1107-13.
- Nezlin, R., Ghetie, V., 2004. Interactions of immunoglobulins outside the antigen-combining site. *Advances in immunology*. 82, 155-215.
- Noseworthy, J.H., Lucchinetti, C., Rodriguez, M., Weinshenker, B.G., 2000. Multiple sclerosis. *The New England journal of medicine*. 343, 938-52.

- Nylander, A., Hafler, D.A., 2012. Multiple sclerosis. *The Journal of clinical investigation*. 122, 1180-8.
- Ohman, S., Ernerudh, J., Forsberg, P., Henriksson, A., von Schenck, H., Vrethem, M., 1992. Comparison of seven formulae and isoelectrofocusing for determination of intrathecally produced IgG in neurological diseases. *Annals of clinical biochemistry*. 29 ( Pt 4), 405-10.
- Oksenberg, J.R., Baranzini, S.E., Sawcer, S., Hauser, S.L., 2008. The genetics of multiple sclerosis: SNPs to pathways to pathogenesis. *Nature reviews. Genetics*. 9, 516-26.
- Orton, S.M., Herrera, B.M., Yee, I.M., Valdar, W., Ramagopalan, S.V., Sadovnick, A.D., Ebers, G.C., 2006. Sex ratio of multiple sclerosis in Canada: a longitudinal study. *Lancet neurology*. 5, 932-6.
- Owens, G.P., Kraus, H., Burgoon, M.P., Smith-Jensen, T., Devlin, M.E., Gilden, D.H., 1998. Restricted use of VH4 germline segments in an acute multiple sclerosis brain. *Annals of neurology*. 43, 236-43.
- Oxelius, V.A., Carlsson, A.M., Aurivillius, M., 1998. Alternative G1m, G2m and G3m allotypes of IGHG genes correlate with atopic and nonatopic pathways of immune regulation in children with bronchial asthma. *International archives of allergy and immunology*. 115, 215-9.
- Pandey, J.P., Goust, J.M., Salier, J.P., Fudenberg, H.H., 1981. Immunoglobulin G heavy chain (Gm) allotypes in multiple sclerosis. *The Journal of clinical investigation*. 67, 1797-1800.
- Patsopoulos, N.A., Esposito, F., Reischl, J., Lehr, S., Bauer, D., Heubach, J., Sandbrink, R., Pohl, C., Edan, G., Kappos, L., Miller, D., Montalban, J., Polman, C.H., Freedman, M.S., Hartung, H.P., Arnason, B.G., Comi, G., Cook, S., Filippi, M., Goodin, D.S., Jeffery, D., O'Connor, P., Ebers, G.C., Langdon, D., Reder, A.T., Traboulsee, A., Zipp, F., Schimrigk, S., Hillert, J., Bahlo, M., Booth, D.R., Broadley, S., Brown, M.A., Browning, B.L., Browning, S.R., Butzkueven, H., Carroll, W.M., Chapman, C., Foote, S.J., Griffiths, L., Kermodé, A.G., Kilpatrick, T.J., Lechner-Scott, J., Marriott, M., Mason, D., Moscato, P., Heard, R.N., Pender, M.P., Perreau, V.M., Perera, D., Rubio, J.P., Scott, R.J., Slee, M., Stankovich, J., Stewart, G.J., Taylor, B.V., Tubridy, N., Willoughby, E., Wiley, J., Matthews, P., Boneschi, F.M., Compston, A., Haines, J., Hauser, S.L., McCauley, J., Ivinson, A., Oksenberg, J.R., Pericak-Vance, M., Sawcer, S.J., De Jager, P.L., Hafler, D.A., de Bakker, P.I., 2011. Genome-wide meta-analysis identifies novel multiple sclerosis susceptibility loci. *Annals of neurology*. 70, 897-912.
- Piccio, L., Naismith, R.T., Trinkaus, K., Klein, R.S., Parks, B.J., Lyons, J.A., Cross, A.H., 2010. Changes in B- and T-lymphocyte and chemokine levels with rituximab treatment in multiple sclerosis. *Archives of neurology*. 67, 707-14.
- Polman, C.H., Reingold, S.C., Edan, G., Filippi, M., Hartung, H.P., Kappos, L., Lublin, F.D., Metz, L.M., McFarland, H.F., O'Connor, P.W., Sandberg-Wollheim, M., Thompson, A.J., Weinshenker, B.G., Wolinsky, J.S., 2005. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2005 revisions to the "McDonald Criteria". *Annals of neurology*. 58, 840-6.
- 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, 292-302.
- Pruim, R.J., Welch, R.P., Sanna, S., Teslovich, T.M., Chines, P.S., Gliedt, T.P., Boehnke, M., Abecasis, G.R., Willer, C.J., 2010. LocusZoom: regional visualization of genome-wide association scan results. *Bioinformatics*. 26, 2336-7.
- Purcell, S., Neale, B., Todd-Brown, K., Thomas, L., Ferreira, M.A., Bender, D., Maller, J., Sklar, P., de Bakker, P.I., Daly, M.J., Sham, P.C., 2007. PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *American journal of human genetics*. 81, 559-75.

- Raknes, G., Fernandes Filho, J.A., Pandey, J.P., Myhr, K.M., Ulvestad, E., Nyland, H., Vedeler, C.A., 2000. IgG allotypes and subclasses in Norwegian patients with multiple sclerosis. *Journal of the neurological sciences*. 175, 111-5.
- Reiber, H., Felgenhauer, K., 1987. Protein transfer at the blood cerebrospinal fluid barrier and the quantitation of the humoral immune response within the central nervous system. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 163, 319-28.
- Reiber, H., 1994. Flow rate of cerebrospinal fluid (CSF)--a concept common to normal blood-CSF barrier function and to dysfunction in neurological diseases. *Journal of the neurological sciences*. 122, 189-203.
- Reiber, H., 2001. Dynamics of brain-derived proteins in cerebrospinal fluid. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 310, 173-86.
- Reiber, H., 2003. Proteins in cerebrospinal fluid and blood: barriers, CSF flow rate and source-related dynamics. *Restorative neurology and neuroscience*. 21, 79-96.
- Reiber, H., Thompson, E.J., Grimsley, G., Bernardi, G., Adam, P., Monteiro de Almeida, S., Fredman, P., Keir, G., Lammers, M., Liblau, R., Menna-Barreto, M., Sa, M.J., Seres, E., Sindic, C.J., Teelken, A., Trendelenburg, C., Trojano, M., van Antwerpen, M.P., Verbeek, M.M., 2003. Quality assurance for cerebrospinal fluid protein analysis: international consensus by an Internet-based group discussion. *Clinical chemistry and laboratory medicine : CCLM / FESCC*. 41, 331-7.
- Romero-Pinel, L., Martinez-Yelamos, S., Bau, L., Matas, E., Gubieras, L., Maria Pujal, J., Morandeira, F., Bas, J., Arbizu, T., 2011. Association of HLA-DRB1\*15 allele and CSF oligoclonal bands in a Spanish multiple sclerosis cohort. *European journal of neurology : the official journal of the European Federation of Neurological Societies*. 18, 1258-62.
- Roopenian, D.C., Akilesh, S., 2007. FcRn: the neonatal Fc receptor comes of age. *Nature reviews. Immunology*. 7, 715-25.
- Rudick, R.A., Cookfair, D.L., Simonian, N.A., Ransohoff, R.M., Richert, J.R., Jacobs, L.D., Herndon, R.M., Salazar, A.M., Fischer, J.S., Granger, C.V., Goodkin, D.E., Simon, J.H., Bartoszak, D.M., Bourdette, D.N., Braiman, J., Brownschidle, C.M., Coats, M.E., Cohan, S.L., Dougherty, D.S., Kinkel, R.P., Mass, M.K., Munchsauer, F.E., O'Reilly, K., Priore, R.L., Whitham, R.H., et al., 1999. Cerebrospinal fluid abnormalities in a phase III trial of Avonex (IFNbeta-1a) for relapsing multiple sclerosis. The Multiple Sclerosis Collaborative Research Group. *Journal of neuroimmunology*. 93, 8-14.
- Saiz, A., Carreras, E., Berenguer, J., Yague, J., Martinez, C., Marin, P., Rovira, M., Pujol, T., Arbizu, T., Graus, F., 2001. MRI and CSF oligoclonal bands after autologous hematopoietic stem cell transplantation in MS. *Neurology*. 56, 1084-9.
- Salier, J.P., Glynn, P., Goust, J.M., Cuzner, M.L., 1983. Distribution of nominal and latent IgG (Gm) allotypes in plaques of multiple sclerosis brain. *Clinical and experimental immunology*. 54, 634-40.
- Sawcer, S., 2008. The complex genetics of multiple sclerosis: pitfalls and prospects. *Brain : a journal of neurology*. 131, 3118-31.
- Sawcer, S., Hellenthal, G., Pirinen, M., Spencer, C.C., Patsopoulos, N.A., Moutsianas, L., Dilthey, A., Su, Z., Freeman, C., Hunt, S.E., Edkins, S., Gray, E., Booth, D.R., Potter, S.C., Goris, A., Band, G., Oturai, A.B., Strange, A., Saarela, J., Bellenguez, C., Fontaine, B., Gillman, M., Hemmer, B., Gwilliam, R., Zipp, F., Jayakumar, A., Martin, R., Leslie, S., Hawkins, S., Giannoulatou, E., D'Alfonso, S., Blackburn, H., Boneschi, F.M., Liddle, J., Harbo, H.F., Perez, M.L., Spurkland, A., Waller, M.J., Mycko, M.P., Ricketts, M., Comabella, M., Hammond, N., Kockum, I., McCann, O.T., Ban, M., Whittaker, P., Kempainen, A., Weston, P., Hawkins, C., Widaa, S., Zajicek, J., Dronov, S., Robertson, N., Bumpstead, S.J., Barcellos, L.F., Ravindrarajah, R., Abraham, R., Alfredsson, L., Ardlie, K., Aubin, C., Baker, A., Baker, K., Baranzini, S.E., Bergamaschi, L., Bergamaschi, R., Bernstein, A., Berthele, A., Boggild, M., Bradfield, J.P., Brassat, D., Broadley, S.A., Buck, D., Butzkueven, H.,

- Capra, R., Carroll, W.M., Cavalla, P., Celius, E.G., Cepok, S., Chiavacci, R., Clerget-Darpoux, F., Clysters, K., Comi, G., Cossburn, M., Cournu-Rebeix, I., Cox, M.B., Cozen, W., Cree, B.A., Cross, A.H., Cusi, D., Daly, M.J., Davis, E., de Bakker, P.I., Debouverie, M., D'Hooghe M, B., Dixon, K., Dobosi, R., Dubois, B., Ellinghaus, D., Elovaara, I., Esposito, F., Fontenille, C., Foote, S., Franke, A., Galimberti, D., Ghezzi, A., Glessner, J., Gomez, R., Gout, O., Graham, C., Grant, S.F., Guerini, F.R., Hakonarson, H., Hall, P., Hamsten, A., Hartung, H.P., Heard, R.N., Heath, S., Hobart, J., Hoshi, M., Infante-Duarte, C., Ingram, G., Ingram, W., Islam, T., Jagodic, M., Kabesch, M., Kermode, A.G., Kilpatrick, T.J., Kim, C., Klopp, N., Koivisto, K., Larsson, M., Lathrop, M., Lechner-Scott, J.S., Leone, M.A., Leppa, V., Liljedahl, U., Bomfim, I.L., Lincoln, R.R., Link, J., Liu, J., Lorentzen, A.R., Lupoli, S., Macciardi, F., Mack, T., Marriott, M., Martinelli, V., Mason, D., McCauley, J.L., Mentch, F., Mero, I.L., Mihalova, T., Montalban, X., Mottershead, J., Myhr, K.M., Naldi, P., Ollier, W., Page, A., Palotie, A., Pelletier, J., Piccio, L., Pickersgill, T., Piehl, F., Pobywajlo, S., Quach, H.L., Ramsay, P.P., Reunanen, M., Reynolds, R., Rioux, J.D., Rodegher, M., Roesner, S., Rubio, J.P., Ruckert, I.M., Salvetti, M., Salvi, E., Santaniello, A., Schaefer, C.A., Schreiber, S., Schulze, C., Scott, R.J., Sellebjerg, F., Selmaj, K.W., Sexton, D., Shen, L., Simms-Acuna, B., Skidmore, S., Sleiman, P.M., Smestad, C., Sorensen, P.S., Sondergaard, H.B., Stankovich, J., Strange, R.C., Sulonen, A.M., Sundqvist, E., Syvanen, A.C., Taddeo, F., Taylor, B., Blackwell, J.M., Tienari, P., Bramon, E., Tourbah, A., Brown, M.A., Tronczynska, E., Casas, J.P., Tubridy, N., Corvin, A., Vickery, J., Jankowski, J., Villoslada, P., Markus, H.S., Wang, K., Mathew, C.G., Wason, J., Palmer, C.N., Wichmann, H.E., Plomin, R., Willoughby, E., Rautanen, A., Winkelmann, J., Wittig, M., Trembath, R.C., Yaouanq, J., Viswanathan, A.C., Zhang, H., Wood, N.W., Zuvich, R., Deloukas, P., Langford, C., Duncanson, A., Oksenberg, J.R., Pericak-Vance, M.A., Haines, J.L., Olsson, T., Hillert, J., Ivinson, A.J., De Jager, P.L., Peltonen, L., Stewart, G.J., Hafler, D.A., Hauser, S.L., McVean, G., Donnelly, P., Compston, A., 2011a. Genetic risk and a primary role for cell-mediated immune mechanisms in multiple sclerosis. *Nature*. 476, 214-9.
- Sawcer, S., Hellenthal, G., Pirinen, M., Spencer, C.C., Patsopoulos, N.A., Moutsianas, L., Dilthey, A., Su, Z., Freeman, C., Hunt, S.E., Edkins, S., Gray, E., Booth, D.R., Potter, S.C., Goris, A., Band, G., Oturai, A.B., Strange, A., Saarela, J., Bellenguez, C., Fontaine, B., Gillman, M., Hemmer, B., Gwilliam, R., Zipp, F., Jayakumar, A., Martin, R., Leslie, S., Hawkins, S., Giannoulatou, E., D'Alfonso, S., Blackburn, H., Martinelli Boneschi, F., Liddle, J., Harbo, H.F., Perez, M.L., Spurkland, A., Waller, M.J., Mycko, M.P., Ricketts, M., Comabella, M., Hammond, N., Kockum, I., McCann, O.T., Ban, M., Whittaker, P., Kemppinen, A., Weston, P., Hawkins, C., Widaa, S., Zajicek, J., Dronov, S., Robertson, N., Bumpstead, S.J., Barcellos, L.F., Ravindrarajah, R., Abraham, R., Alfredsson, L., Ardlie, K., Aubin, C., Baker, A., Baker, K., Baranzini, S.E., Bergamaschi, L., Bergamaschi, R., Bernstein, A., Berthele, A., Boggild, M., Bradfield, J.P., Brassat, D., Broadley, S.A., Buck, D., Butzkueven, H., Capra, R., Carroll, W.M., Cavalla, P., Celius, E.G., Cepok, S., Chiavacci, R., Clerget-Darpoux, F., Clysters, K., Comi, G., Cossburn, M., Cournu-Rebeix, I., Cox, M.B., Cozen, W., Cree, B.A., Cross, A.H., Cusi, D., Daly, M.J., Davis, E., de Bakker, P.I., Debouverie, M., D'Hooghe M, B., Dixon, K., Dobosi, R., Dubois, B., Ellinghaus, D., Elovaara, I., Esposito, F., Fontenille, C., Foote, S., Franke, A., Galimberti, D., Ghezzi, A., Glessner, J., Gomez, R., Gout, O., Graham, C., Grant, S.F., Guerini, F.R., Hakonarson, H., Hall, P., Hamsten, A., Hartung, H.P., Heard, R.N., Heath, S., Hobart, J., Hoshi, M., Infante-Duarte, C., Ingram, G., Ingram, W., Islam, T., Jagodic, M., Kabesch, M., Kermode, A.G., Kilpatrick, T.J., Kim, C., Klopp, N., Koivisto, K., Larsson, M., Lathrop, M., Lechner-Scott, J.S., Leone, M.A., Leppa, V., Liljedahl, U., Bomfim, I.L., Lincoln, R.R., Link, J., Liu, J., Lorentzen, A.R., Lupoli, S., Macciardi, F., Mack, T., Marriott, M., Martinelli, V., Mason, D., McCauley, J.L., Mentch, F., Mero, I.L., Mihalova, T., Montalban, X., Mottershead, J., Myhr, K.M., Naldi, P., Ollier, W., Page, A., Palotie, A., Pelletier, J., Piccio, L., Pickersgill, T., Piehl, F., Pobywajlo, S., Quach, H.L., Ramsay, P.P., Reunanen, M., Reynolds, R., Rioux, J.D., Rodegher, M., Roesner, S., Rubio, J.P., Ruckert, I.M., Salvetti, M., Salvi, E., Santaniello, A., Schaefer, C.A., Schreiber, S., Schulze, C., Scott, R.J., Sellebjerg, F., Selmaj, K.W., Sexton, D., Shen, L., Simms-Acuna,

- B., Skidmore, S., Sleiman, P.M., Smestad, C., Sorensen, P.S., Sondergaard, H.B., Stankovich, J., Strange, R.C., Sulonen, A.M., Sundqvist, E., Syvanen, A.C., Taddeo, F., Taylor, B., Blackwell, J.M., Tienari, P., Bramon, E., Tourbah, A., Brown, M.A., Tronczynska, E., Casas, J.P., Tubridy, N., Corvin, A., Vickery, J., Jankowski, J., Villoslada, P., Markus, H.S., Wang, K., Mathew, C.G., Wason, J., Palmer, C.N., Wichmann, H.E., Plomin, R., Willoughby, E., Rautanen, A., Winkelmann, J., Wittig, M., Trembath, R.C., Yaouanq, J., Viswanathan, A.C., Zhang, H., Wood, N.W., Zuvich, R., Deloukas, P., Langford, C., Duncanson, A., Oksenberg, J.R., Pericak-Vance, M.A., Haines, J.L., Olsson, T., Hillert, J., Iverson, A.J., De Jager, P.L., Peltonen, L., Stewart, G.J., Hafler, D.A., Hauser, S.L., McVean, G., Donnelly, P., Compston, A., 2011b. Genetic risk and a primary role for cell-mediated immune mechanisms in multiple sclerosis. *Nature*. 476, 214-9.
- Schipper, H., 1989. [Local cerebrospinal fluid IgG production in multiple sclerosis]. *Schriftenreihe Neurologie*. 30, 1-91.
- Schlachetzki, F., Zhu, C., Pardridge, W.M., 2002. Expression of the neonatal Fc receptor (FcRn) at the blood-brain barrier. *Journal of neurochemistry*. 81, 203-6.
- Sellner, J., Kraus, J., Awad, A., Milo, R., Hemmer, B., Stuve, O., 2011. The increasing incidence and prevalence of female multiple sclerosis--a critical analysis of potential environmental factors. *Autoimmunity reviews*. 10, 495-502.
- Sesboue, R., Daveau, M., Degos, J.D., Martin-Mondiere, C., Goust, J.M., Schuller, E., Rivat-Peran, L., Coquerel, A., Dujardin, M., Salier, J.P., 1985. IgG (Gm) allotypes and multiple sclerosis in a French population: phenotype distribution and quantitative abnormalities in CSF with respect to sex, disease severity, and presence of intrathecal antibodies. *Clinical immunology and immunopathology*. 37, 143-53.
- Sharief, M.K., Thompson, E.J., 1991. The predictive value of intrathecal immunoglobulin synthesis and magnetic resonance imaging in acute isolated syndromes for subsequent development of multiple sclerosis. *Annals of neurology*. 29, 147-51.
- Simon, K.C., van der Mei, I.A., Munger, K.L., Ponsonby, A., Dickinson, J., Dwyer, T., Sundstrom, P., Ascherio, A., 2010. Combined effects of smoking, anti-EBNA antibodies, and HLA-DRB1\*1501 on multiple sclerosis risk. *Neurology*. 74, 1365-71.
- Siritho, S., Freedman, M.S., 2009. The prognostic significance of cerebrospinal fluid in multiple sclerosis. *Journal of the neurological sciences*. 279, 21-5.
- Sospedra, M., Martin, R., 2005. Immunology of multiple sclerosis. *Annual review of immunology*. 23, 683-747.
- Stendahl-Brodin, L., Link, H., 1980. Relation between benign course of multiple sclerosis and low-grade humoral immune response in cerebrospinal fluid. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*. 43, 102-5.
- Storch, M.K., Piddlesden, S., Haltia, M., Iivanainen, M., Morgan, P., Lassmann, H., 1998. Multiple sclerosis: in situ evidence for antibody- and complement-mediated demyelination. *Annals of neurology*. 43, 465-71.
- Stuve, O., Cravens, P.D., Frohman, E.M., Phillips, J.T., Remington, G.M., von Geldern, G., Cepok, S., Singh, M.P., Tervaert, J.W., De Baets, M., MacManus, D., Miller, D.H., Radu, E.W., Cameron, E.M., Monson, N.L., Zhang, S., Kim, R., Hemmer, B., Racke, M.K., 2009. Immunologic, clinical, and radiologic status 14 months after cessation of natalizumab therapy. *Neurology*. 72, 396-401.
- Terasaki, P.I., Park, M.S., Opelz, G., Ting, A., 1976. Multiple sclerosis and high incidence of a B lymphocyte antigen. *Science*. 193, 1245-7.
- Trapp, B.D., Peterson, J., Ransohoff, R.M., Rudick, R., Mork, S., Bo, L., 1998. Axonal transection in the lesions of multiple sclerosis. *The New England journal of medicine*. 338, 278-85.
- Trapp, B.D., Nave, K.A., 2008. Multiple sclerosis: an immune or neurodegenerative disorder? *Annual review of neuroscience*. 31, 247-69.

- Tumani, H., Hartung, H.P., Hemmer, B., Teunissen, C., Deisenhammer, F., Giovannoni, G., Zettl, U.K., 2009. Cerebrospinal fluid biomarkers in multiple sclerosis. *Neurobiology of disease*. 35, 117-27.
- Tumani, H., Deisenhammer, F., Giovannoni, G., Gold, R., Hartung, H.P., Hemmer, B., Hohlfeld, R., Otto, M., Stangel, M., Wildemann, B., Zettl, U.K., 2011. Revised McDonald criteria: The persisting importance of cerebrospinal fluid analysis. *Annals of neurology*.
- Villar, L.M., Masjuan, J., Sadaba, M.C., Gonzalez-Porque, P., Plaza, J., Bootello, A., Alvarez-Cermeno, J.C., 2005. Early differential diagnosis of multiple sclerosis using a new oligoclonal band test. *Archives of neurology*. 62, 574-7.
- Walsh, M.J., Tourtellotte, W.W., 1986. Temporal invariance and clonal uniformity of brain and cerebrospinal IgG, IgA, and IgM in multiple sclerosis. *The Journal of experimental medicine*. 163, 41-53.
- Warren, K.G., Catz, I., 1985. The relationship between levels of cerebrospinal fluid myelin basic protein and IgG measurements in patients with multiple sclerosis. *Annals of neurology*. 17, 475-80.
- Weinshenker, B.G., 1996. Epidemiology of multiple sclerosis. *Neurologic clinics*. 14, 291-308.
- Weinshenker, B.G., O'Brien, P.C., Petterson, T.M., Noseworthy, J.H., Lucchinetti, C.F., Dodick, D.W., Pineda, A.A., Stevens, L.N., Rodriguez, M., 1999. A randomized trial of plasma exchange in acute central nervous system inflammatory demyelinating disease. *Annals of neurology*. 46, 878-86.
- Woof, J.M., Burton, D.R., 2004. Human antibody-Fc receptor interactions illuminated by crystal structures. *Nature reviews. Immunology*. 4, 89-99.
- Wu, J.S., Qiu, W., Castley, A., James, I., Joseph, J., Christiansen, F.T., Carroll, W.M., Mastaglia, F.L., Kermode, A.G., 2010. Presence of CSF oligoclonal bands (OCB) is associated with the HLA-DRB1 genotype in a West Australian multiple sclerosis cohort. *Journal of the neurological sciences*. 288, 63-7.
- Yeo, T.W., De Jager, P.L., Gregory, S.G., Barcellos, L.F., Walton, A., Goris, A., Fenoglio, C., Ban, M., Taylor, C.J., Goodman, R.S., Walsh, E., Wolfish, C.S., Horton, R., Traherne, J., Beck, S., Trowsdale, J., Caillier, S.J., Ivinson, A.J., Green, T., Pobywajlo, S., Lander, E.S., Pericak-Vance, M.A., Haines, J.L., Daly, M.J., Oksenberg, J.R., Hauser, S.L., Compston, A., Hafler, D.A., Rioux, J.D., Sawcer, S., 2007. A second major histocompatibility complex susceptibility locus for multiple sclerosis. *Annals of neurology*. 61, 228-36.

## Bücher:

1. Petereit HF, Sindern E, Wick M: Liquordiagnostik. Leitlinien und Methodenkatalog der Deutschen Gesellschaft für Liquordiagnostik und Klinische Neurochemie; Springer Verlag, Heidelberg; 1-68; ISBN 978-3-540-39017-6
2. Brigitte Wildemann, Patrick Oschmann: Neurologische Labordiagnostik; Auflage 1, 2006; Thieme Verlag; ISBN-13: 978-3131365910

## Homepages:

1. <http://de.wikipedia.org/w/index.php?title=Datei:Reiber-Diagramm.jpg&filetimestamp=20061117205819> (17.01.2013)
2. [http://www.illumina.com/products/human660w\\_quad\\_v1\\_dna\\_analysis\\_beadchip\\_kits.ilmn](http://www.illumina.com/products/human660w_quad_v1_dna_analysis_beadchip_kits.ilmn) (01.09.2011)
3. [www.sph.umich.edu/csg/abecasis/metal](http://www.sph.umich.edu/csg/abecasis/metal) (25.03.2012)
4. [www.r-project.org](http://www.r-project.org) (02.04.2013)
5. <http://hydra.usc.edu/gxe> (05.04.2013)

# TABELLEN- UND ABBILDUNGSVERZEICHNIS

## TABELLEN

<b>Tabelle 1: Altersabhängigkeit des Albuminquotienten</b> .....	11
<b>Tabelle 2: Befundmuster von oligoklonalen Banden</b> .....	12
<b>Tabelle 3: Zur DNA-Extraktion verwendete Materialien</b> .....	16
<b>Tabelle 4: Zur DNA-Konzentrationsbestimmung verwendete Materialien</b> .....	17
<b>Tabelle 5: Für die MALDI-TOF-Genotypisierung verwendete Materialien</b> .....	17
<b>Tabelle 6: n-Zahl der Liquorparameter in allen drei Kollektiven</b> .....	21
<b>Tabelle 7: Cycler-Programm der PCR</b> .....	27
<b>Tabelle 8: Programm für die SAP-Reaktion</b> .....	28
<b>Tabelle 9: Cycler-Programm der iPLEX-Reaktion</b> .....	29
<b>Tabelle 10: Statistische Auswertung am Beispiel des IgG-Index</b> .....	32
<b>Tabelle 11: Darstellung der klinischen Charakteristika der drei Patientenkollektive</b> .....	34
<b>Tabelle 12: Vergleich der Zellzahl in den zwei Kollektiven</b> .....	36
<b>Tabelle 13: Ergebnisse der genetischen Assoziation von der Zellzahl im Liquor</b> .....	38
<b>Tabelle 14: Ergebnisse der genetischen Assoziation von IgG<sub>IF</sub></b> .....	42
<b>Tabelle 15: Vergleich des IgG-Index in den drei Kollektiven</b> .....	43
<b>Tabelle 16: Mit dem IgG-Index assoziierte SNPs</b> .....	45
<b>Tabelle 17: Mit der intrathekalen IgG-Synthese assoziierte SNPs</b> .....	47
<b>Tabelle 18: Assoziation der SNPs mit Multipler Sklerose</b> .....	50

**ABBILDUNGEN**

<b>Abb. 1: Quotientendiagramm nach Reiber .....</b>	<b>14</b>
<b>Abb. 2: Häufigkeitsverteilung der intrathekalen IgG-Synthese .....</b>	<b>30</b>
<b>Abb. 3: Intrathekale IgG-Synthese im Verlauf der Zeit (n=11) .....</b>	<b>35</b>
<b>Abb. 4: GWAS-Manhattan plot der Zellzahl .....</b>	<b>37</b>
<b>Abb. 5: GWAS-Manhattan plot zur berechneten intrathekalen IgA-Synthese (<math>IgA_{IF}</math>).....</b>	<b>39</b>
<b>Abb. 6: GWAS-Manhattan plot zur berechneten intrathekalen IgM-Synthese (<math>IgM_{IF}</math>).....</b>	<b>40</b>
<b>Abb. 7: GWAS-Manhattan plot zur berechneten intrathekalen IgG-Synthese (<math>IgG_{IF}</math>).....</b>	<b>41</b>
<b>Abb. 8: GWAS-Manhattan plot des IgG-Index .....</b>	<b>43</b>
<b>Abb. 9: Höhe des IgG-Index bei dem SNP rs10136766.....</b>	<b>48</b>
<b>Abb. 10: Plot der regionalen Assoziation des IgG-Index um rs10136766 .....</b>	<b>49</b>

# DANKSAGUNG

Zuallererst möchte ich meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Bernhard Hemmer, für die Überlassung des interessanten Themas danken. Die Möglichkeit, in seiner Arbeitsgruppe mitzuarbeiten, hat mir einen wertvollen Einblick in die Grundlagenforschung gegeben und mein Verständnis der klinischen Medizin bereichert.

Mein besonderer Dank gilt meiner Betreuerin, Frau PD Dr. Dorothea Buck. Ihr großes Engagement über Jahre hinweg hat diese Arbeit ermöglicht. Sie ist mir immer mit Rat und Tat zur Seite gestanden und wusste mich immer wieder mit ihrer Zuversicht zu motivieren. Sowohl bei Durchführung, Auswertung und Verfassen der Arbeit war sie eine wertvolle Unterstützung, die ich nicht hätte missen wollen. Ganz lieben Dank!

Auch Frau Verena Grummel möchte ich herzlich für ihr offenes Ohr und ihre Hilfsbereitschaft danken, mich in die Geheimnisse der Labormethodik eingeweiht zu haben.

Die wertvollen und konstruktiven Ideen von Frau Dr. Sabine Cepok und Frau Prof. Dr. Juliane Winkelmann haben die Ergebnisse der Arbeit maßgeblich beeinflusst. Danke dafür.

Frau Regina Feldmann und Frau Susanne Lindhof waren maßgeblich an der Genotypisierung unserer DNA-Proben beteiligt. Danke für die tatkräftige Unterstützung sowie die Beantwortung meiner unzähligen Fragen zu ihrer Arbeit.

Die statistische Auswertung einer genomweiten Assoziationsstudie geht über die Möglichkeiten eines Mediziners weit hinaus. Daher herzlichen Dank an Frau Dr. Eva Albrecht für die Auswertung der Daten sowie an Herrn Peter Lichtner für seine Unterstützung.

Herr Jonas Ernst hat mir schließlich geholfen, die komplizierte Statistik der Arbeit weitgehend zu verstehen. Herzlichen Dank für die unkomplizierte, spontane Hilfsbereitschaft.

Ein besonderer Dank geht an alle Ärztinnen und Ärzte, Arzthelferinnen und Sekretärinnen für die Bereitschaft, mir noch ausstehende Befunde zukommen zu lassen.

Zu guter Letzt geht der wichtigste Dank an alle Patientinnen und Patienten, die bereit waren, an unserer Studie teilzunehmen und uns ihre medizinischen Daten zu überlassen. Ihre Bereitschaft, zur Forschung beizutragen und so vielleicht in Zukunft bessere Therapien zu ermöglichen, war die Grundlage für diese Arbeit. Danke!