

**Diplomarbeit**

**The effect of disease modifying therapies on CD62L  
expression in multiple sclerosis**

eingereicht von

**Paul Greiner**

zur Erlangung des akademischen Grades  
**Doktor der gesamten Heilkunde  
(Dr. med. univ.)**

an der

**Medizinischen Universität Graz**

ausgeführt an der

**Klinischen Abteilung für Neurologie**

unter der Anleitung von

Assoz. Prof. Priv.-Doz. Dr.med.univ. Michael Khalil, PhD und  
Ass.-Prof. Dr.med.univ. Martin Helmut Stradner

Graz, 29.08.2018

## *Eidesstattliche Erklärung*

*Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, andere als die angegebenen Quellen nicht verwendet habe und die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.*

*Graz, am 29.08.2018*

*Paul Greiner eh.*

## Danksagungen

Ich möchte diese Diplomarbeit meiner Familie, insbesondere meinen Eltern Günter und Michaela Greiner, widmen und mich für die Ermöglichung meines Studiums, ihre immerwährende Unterstützung und ihren Rückhalt bedanken.

Besonders bedanken möchte ich mich auch bei Assoz. Prof. Priv.-Doz. Dr.med.univ. Michael Khalil, für die stetige Unterstützung, die investierte Zeit und das große Engagement bei der Erstellung dieser Diplomarbeit.

Weiter möchte ich mich auch bei Frau Margarete Voortman MSc und allen anderen beteiligten Personen für ihre Hilfe bedanken, ohne die, dieses Projekt nicht durchführbar gewesen wäre.

# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis</b> .....	4
<b>Abkürzungen</b> .....	7
<b>Zusammenfassung</b> .....	9
<b>Abstract</b> .....	11
<b>1. Einleitung</b> .....	13
1.1 Epidemiologie.....	14
1.2 Ätiologie .....	15
1.3 Pathogenese.....	18
1.3.1 Immunpathogenese und akute schubhafte Multiple Sklerose.....	18
1.3.2 Neurodegeneration und Progression der Erkrankung.....	20
1.4 Klinik .....	22
1.4.1 Symptomatik .....	22
1.4.2 Verlaufsformen .....	23
1.5.1 Klinische neurologische Untersuchung.....	27
1.5.2 Magnetresonanztomographie (MRT) .....	27
1.5.3 Liquoruntersuchung .....	29
1.5.4 Evozierte Potenziale .....	29
1.7 Therapie.....	32
1.7.1 Schubtherapie.....	34
1.7.2 Basistherapie .....	34
1.7.3 Therapie aktiver Verlaufsformen.....	36
1.8 Progressive multifokale Leukenzephalopathie .....	37
1.8.1 PML und Multiple Sklerose .....	38
1.8.2 Biomarker und Multiple Sklerose .....	39
1.8.3 CD62L.....	42
1.9 Fragestellung .....	44
<b>2. Material und Methoden</b> .....	45
2.1 Patienten/innen .....	45
2.2 Methoden .....	46
2.2.1 Probengewinnung.....	46
2.2.2 CD62L-Messung.....	46
2.3 Statistik .....	47
<b>3. Ergebnisse</b> .....	49

3.1 Patientenkohorte .....	49
3.2 Vergleich der CD62L-Werte zwischen Gesunden und MS Patienten/innen, sowie der verschiedenen Therapien. ....	51
3.3 Longitudinale Veränderung der CD62L Expression .....	52
3.4 Assoziation der CD62L Expression mit demographischen und klinischen Daten .....	53
<b>4. Diskussion</b> .....	<b>54</b>

## Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1:</b> Verlaufsformen der Multiplen Sklerose nach der schweizerischen Multiple Sklerose Gesellschaft (64) .....	24
<b>Abbildung 2:</b> Therapieschema der Deutschen Gesellschaft für Neurologie (53) .....	33
<b>Abbildung 3:</b> Vergleich der CD62L Expression in den Therapiesubgruppen, Kontrollen und Patienten/innen ohne Therapie. DMF = Dimethylfumerat; FTY = Fingolimod; IFN/GA = Interferon beta/Glatirameracetat; NTZ = Natalizumab. ....	51
<b>Abbildung 4:</b> Zeitliche Dynamik der CD62L Expression in Patienten/innen ohne Therapiewechsel. ....	52
<b>Abbildung 5:</b> Effekte von Natalizumab und Fingolimod auf longitudinale Veränderung der CD62L Expression.....	53

## Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1:</b> McDonald Kriterien zur Diagnosestellung einer MS.(66) .....	26
<b>Tabelle 2:</b> Differentialdiagnosen der Multiplen Sklerose (55).....	31
<b>Tabelle 3:</b> Demographische und klinische Daten der Probanden/innen und CD62L Expression.....	50

## Abkürzungen

ADEM	akute disseminierte Enzephalomyelitis
CIS	klinisch isolierten Syndroms
CDMS	klinisch definitive Multiple Sklerose
DIS	Dissemination in Raum
DIT	Dissemination in Zeit
DMF	Dimethylfumerat
DMTs	disease modifying therapies
EAE	experimentellen autoimmunen Encephalomyelitis
EBV	Ebstein-Barr-Virus
EDSS	Expanded Disability Status Scale
FACS	fluorescence activated cell sorting
FS	Funktionssystem
FTY	Fingolimod
IFN/GA	Interferon beta/Glatirameracetat
IIDDs	nicht-MS idiopathische entzündliche demyelinisierende Erkrankungen
i.v.	intravenöse
IVIg	intravenöse Immunglobuline
JCV	John Cunningham Virus
MEP	motorisch evozierte Potenziale
MRT	Magnetresonanztomographie
MS	Multiple Sklerose
NAWM	normal appearing white matter
NMO	Neuromyelitis optica
NTZ	Natalizumab.
OSMS	optikospinale Multiple Sklerose in asiatischen Populationen
PBMCs	mononukleäre Zellen des peripheren Bluts
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PPMS	primär progrediente Multiple Sklerose

PML	progressive multifokale Leukenzephalopathie
RIS	radiologisch isoliertes Syndrom
RRMS	schubhaft remittierenden Multiple Sklerose
SPMS	sekundär progredienten Multiple Sklerose
SSEP	somatosensibel evozierte Potenziale
VCAM-1	vascular cell adhesion molecule-1
VEP	visuell evozierte Potenziale
ZNS	zentralen Nervensystems

## Zusammenfassung

**Hintergrund:** In den letzten Jahren nahm die Anzahl an hocheffektiven, immunmodulierenden Multiple Sklerose (MS) Therapeutika stetig zu. Mit ihr vergrößerte sich aber auch das Risiko und die Unvorhersehbarkeit potenziell schwerwiegender Nebenwirkungen. Strategien zur Maximierung der Therapiesicherheit und zur Evaluation des Patientenrisikos werden dringend benötigt. Das Zelladhäsionsmolekül CD62L oder L-Selektin wurde in einigen Arbeiten als möglicher Marker zur Risikoabschätzung einer progressiven multifokalen Leukenzephalopathie (PML) vorgeschlagen. Allerdings konnte auch gezeigt werden, dass präanalytische Schritte die Testergebnisse und deren klinische Anwendbarkeit beeinflussen. Das Verhalten der CD62L Expression von peripheren mononukleären Zellen und dessen klinische Bedeutung in frischen, unmittelbar analysierten Blutproben, ohne präanalytische limitierende Faktoren, wurde bisher noch nicht untersucht.

**Zielsetzung:** Das Ziel der Studie ist es, zu untersuchen, ob es unter verschiedenen MS Therapieformen zu einer Alteration der CD62L Expression in CD3+CD4+ mononukleären Zellen, in direkt analysierten Blutproben kommt. Zusätzlich soll eine einfache, leicht reproduzierbare Messung der CD62L Expression, ohne aufwendige präanalytische Arbeitsschritte, implementiert werden.

**Methoden:** Wir analysierten die CD62L Expression in CD3+CD4+ mononukleären Zellen aus peripheren Blutproben von Patienten/innen mit klinisch isoliertem Syndrom (CIS) und MS (baseline/follow-up n=234/n=98) sowie in gesunden Patienten/innen (n=51), innerhalb einer Stunde nach Probengewinnung, mittels FACS.

**Ergebnisse:** Die CD62L Expression in CD3+CD4+ mononukleären Zellen war signifikant herabgesetzt in mit Natalizumab (n=26) und Fingolimod (n=20) therapierten Patienten/innen. Eine signifikante Erhöhung der Werte konnte in Patienten/innen mit Dimethylfumarat Therapie (n=15) festgestellt werden, verglichen mit Patienten/innen unter Interferon/Glatirameracetat (n=90/30), keiner Therapie (n=53) und der gesunden Kontrollgruppe ( $p < 0.001$ ). Es zeigte sich eine zeitliche Stabilität der CD62L Expression in Patienten/innen mit kontinuierlicher Therapie.

Eine Unterbrechung einer Natalizumabtherapie führte zu einem Anstieg der Werte, wohingegen der Beginn einer Fingolimodtherapie zu einem Abfall der L-Selektin Expression führte.

**Interpretation:** Die Expression von CD62L in frischen Blutproben wird durch immunsuppressive MS Therapeutika beeinflusst und geht einher mit den bisher aufgezeigten Veränderungen, welche eine Erniedrigung der CD62L Expression in Patienten/innen mit Natalizumab- oder Fingolimodtherapie zeigen. Um die klinische Bedeutung dieser Veränderungen und den Bezug zu PML besser zu verstehen, bedarf es, auf Basis der in dieser Arbeit aufgezeigten Ergebnisse, weiterer Forschung.

## Abstract

**Background:** In the past few years the amount of highly effective disease modifying therapies in multiple sclerosis increased steadily. On the other hand, this increase is accompanied by a higher risk of potentially severe side effects. New and better strategies are needed to optimize the treatment of MS. CD62L or L-Selectin, a cell-adhesion molecule, has been proposed as a predictive marker in the risk estimation for developing progressive multifocal leukoencephalopathy. However, there seem to be preanalytical steps which are likely to impact the test results, thus limiting the clinical validity. Up to now, the changes of CD62L expression and their clinical impact in freshly collected blood samples, avoiding numerous preanalytical steps, have not been investigated yet.

**Objective:** The aim of this study is to investigate the effect of various disease modifying therapies (DMTs) on the expression of CD62L in CD3+CD4+ mononuclear cells in freshly collected and directly measured blood samples. Further we wanted to implement an easily reproducible test, without error-prone pre-analytical procedures.

**Methods:** We analysed the expression of CD62L in freshly collected blood samples of patients with clinically isolated syndrome (CIS) and MS (baseline/follow-up  $n=234/n=98$ ) and healthy controls ( $n=51$ ), within one hour after sampling by FACS.

**Results:** CD62L expression was significantly lower in patients receiving Natalizumab ( $n=26$ ) and Fingolimod ( $n=20$ ), otherwise in patients with dimethyl fumarate ( $n=15$ ) the expression was significantly higher, compared to patients treated with interferon/glatiramer acetate ( $n=90/30$ ), no DMT ( $n=53$ ) and healthy controls ( $p<0.001$ ). Further a temporal stability of the CD62L expression could be shown in patients with unchanged treatment. Contrariwise an increase of L-Selectin values was seen in patients who discontinued their Natalizumab therapy and a decrease among patients upon Fingolimod initiation.

**Conclusion:** The expression of CD62L in freshly collected and directly measured blood samples is altered in some DMTs and is alongside with the previous published data, that showed decreased levels of CD62L expression in patients treated with Natalizumab or Fingolimod. To better understand the clinical meaning of these

changes in the CD62L expression and the link to PML, further investigation, based on the results of this study, is needed.

This abstract has been accepted for poster presentation at the 34<sup>th</sup> Congress of ECTRIMS Berlin, Germany, 10 - 12 October 2018. (1)

# 1. Einleitung

Multiple Sklerose ist eine chronisch entzündliche Autoimmunerkrankung des zentralen Nervensystems (ZNS). Durch fokale Entzündungsherde kommt es zu einer Demyelinisierung und zu Schäden an Axonen der Nervenzellen. Sie ist die häufigste neurologische Erkrankung junger Erwachsener in der westlichen Welt.(2)

In den letzten Jahren nahm die Anzahl an hocheffektiven, immunmodulierenden MS Therapeutika stetig zu. Damit aber auch das Risiko und die Unvorhersehbarkeit von potentiell schwerwiegenden Nebenwirkungen. Die Notwendigkeit an Strategien zur Reduktion des Nebenwirkungsrisikos ist groß.(3)

Diese Diplomarbeit beschäftigt sich mit der Frage, wie sich die Expression des kürzlich vorgeschlagenen Biomarkers CD62L, in frisch gewonnenen und unmittelbar analysierten Blutproben verhält und diskutiert dessen Eignung als Parameter zur Risikostratifizierung einer progressiven multifokalen Leukenzephalopathie in MS Patienten/innen unter verschiedenen Therapieformen. Eine erniedrigte Expression des Zelladhäsionsmoleküls CD62L an CD3+CD4+ Lymphozyten wurde in einer Arbeit von Schwab et al. mit der Entstehung einer PML in Verbindung gebracht.(4)

Zur besseren Verständlichkeit wird in der weiteren Einleitung genauer auf die Erkrankung Multiple Sklerose eingegangen und das Krankheitsbild erläutert. Der Hauptteil dieser Diplomarbeit befasst sich anschließend mit der oben angeschnittenen Fragestellung.

## 1.1 Epidemiologie

Die Prävalenz der Multiplen Sklerose in Österreich beträgt etwa 98.5 pro 100.000 Einwohner und ist ähnlich der Prävalenzen anderer mitteleuropäischer Länder.(5)

Die Häufigkeit des Auftretens von MS zeigt unter geografischen Gesichtspunkten starke Schwankungen. Laut Kurtzke werden drei Zonen unterschieden: jene Länder mit Prävalenzen von >30 Fälle pro 100.000 Einwohnern, wie unter anderem der größte Teil Europas, Kanada und die nördliche USA, Neuseeland und Südost Australien, Länder mit mittlerer Häufigkeit und Länder mit einer geringen Prävalenz von unter 5 Fällen pro 100.000 Einwohnern, wie zum Beispiel alle afrikanischen Länder, der Norden Südamerikas und Teile Asiens.(6)

Die Gründe für diese geografische Verteilung liegen wahrscheinlich in genetischen Unterschieden sowie Umwelteinflüssen, sind aber noch nicht ausreichend geklärt.(7) Ein Erklärungsversuch befasst sich mit der Hypothese, dass Wikinger in den von ihnen bereisten Gebieten Suszeptibilitätsgene verbreiteten und sich MS so ausbreitete.(8)

MS tritt doppelt so oft bei Frauen gegenüber Männern auf, wobei Männer zu einem späteren Krankheitsbeginn und einer schlechteren Prognose tendieren.(9) Häufigster Zeitpunkt der Erstmanifestation liegt zwischen dem 20. und 40. Lebensjahr.(9)

## 1.2 Ätiologie

Die Ätiologie der Multiplen Sklerose ist bisher unbekannt. Es konnte bis heute, trotz großem Aufwand und vielen publizierten Hypothesen kein kausaler Grund gefunden werden. Einiges deutet darauf hin, dass eine Kombination aus genetischer Prädisposition und Umwelteinflüssen für die Entstehung von MS verantwortlich ist. Zu den mit MS am häufigsten in Verbindung gebrachten Umweltfaktoren zählen die Herkunft und Migration, Vitamin D Status, Epstein-Barr-Virus (EBV) Infektion, Adipositas in der Kindheit und Nikotinkonsum.(10)

### *Genetik*

Die ersten Überlegungen einer genetischen Komponente in der Ätiologie der Multiplen Sklerose folgten aus Beobachtungen über familiär gehäufte MS Fälle und der stark unterschiedlichen Prävalenzzahlen in verschiedenen Ethnien.(11) Robertson et al. zeigten in ihrer Studie ein abnehmendes Risiko von 2.77% (relatives Risiko (RR) 9.2) in erstgradig Verwandten zu 1,02% (RR 3.4) in zweitgradig Verwandten und 0.88% (RR 2.9) in drittgradig Verwandten, verglichen zum allgemeinen Lebenszeitrisiko in der Normalbevölkerung von 0.30%.(12)

Es wurden bis heute zahlreiche Gene gefunden die negative als auch positive Assoziationen für die Entstehung einer MS aufweisen, was darauf schließen lässt, dass es keinen Hauptlokus für MS im Genom gibt.(13) Eine Mutation des HLA-DRB1 Gens ist der stärkste identifizierte genetische Faktor in der Ätiologie der Multiplen Sklerose. Assoziationen mit HLA Genen, speziell dem DRB1\*1501 Allel, sind konstante Beobachtungen in fast allen MS Populationen.(14)

### *Herkunft & Migration*

Wie bereits vorhin erwähnt, variieren die Prävalenzzahlen der Multiplen Sklerose geographisch sehr stark. Je größer die Entfernung vom Äquator desto höher wird die Prävalenz der MS.(15) Mehrere Studien, aus Süd Afrika (16), Israel (17), Hawaii (18) und Großbritannien (19) zeigen eine Korrelation bezüglich des Risikos an MS zu erkranken und dem Gebiet in dem man aufgewachsen ist. Migration im Kindesalter

von Regionen mit hohen Prävalenzahlen in Gebiete mit niedrigeren Prävalenzen, senkt das Erkrankungsrisiko. Andererseits erhöht sich das Risiko bei Migration von Niedrig- in Hochrisiko Regionen im Vergleich mit dem allgemeinen Risiko der Population am Herkunftsort.(20)

### *Vitamin D*

Das geographische Verteilungsmuster der MS Prävalenzen könnte durch die verminderte Sonneneinstrahlung in höheren Breitengraden, vor allem in den Wintermonaten und dem damit verbundenen Vitamin D (25(OH)D) Mangel erklärbar sein.(21) Eine prospektive Studie innerhalb des US Militärs zeigte, dass in der Subgruppe der „non-hispanic whites“ das Risiko an MS zu erkranken um 62% niedriger war innerhalb des höchsten Quantils (Vitamin D-Spiegel > 99.20 nmol/L) verglichen zum niedrigsten Quantil (Vitamin D-Spiegel < 63.20 nmol/L). Auch zeigte sich eine stärkere Reduktion des Risikos in Individuen mit hohen 25(OH)D Werten vor dem 20. Lebensjahr.(22)

Rhead et al. konnten einen kausalen Zusammenhang zwischen niedrigen Vitamin D Werten und MS feststellen.(23) Andere Studien konnten Assoziationen zwischen hohen Vitamin D Werten und einem erniedrigten Schubrisiko (24) und einem höheren Risiko einer Progression eines klinisch isolierten Syndroms (CIS), einer Vorstufe der MS, in eine definitive Multiple Sklerose bei niedrigen Vitamin D Werten feststellen.(25)

### *Hygienehypothese und Epstein Barr Virus (EBV)*

Die Hygienehypothese, wurde bereits 1966 von Leibowitz et al. postuliert und beschreibt, dass die Konfrontation mit vielen infektiösen Pathogenen in der Kindheit protektiv gegen die Entstehung einer MS wirkt.(26)

Eine Limitation dieser Hypothese ist das so genannte EBV-Paradoxon. Eine EBV-Infektion wird seit langem als einer der möglichen Auslöser der MS gehandelt. Entgegengesetzt der Hygienehypothese haben Individuen, die nicht mit EBV infiziert sind ein sehr geringes Risiko an Multipler Sklerose zu erkranken. Verglichen zu Individuen, die in der Kindheit eine EBV Infektion durchgemacht haben, haben EBV-

Negative ein 10fach niedrigeres Risiko an MS zu erkranken. Eine EBV Manifestation im jungen Erwachsenenalter, die sich als infektiöse Mononukleose manifestiert, geht mit einem 2 bis 3fach erhöhtem Risiko im Vergleich zu Infektionen in der Kindheit und einem 20fach erhöhtem Risiko zu EBV Negativen einher.(27) Mehrere Studien konnten einen Anstieg an Anti-EBV Antikörpern mehr als 5 Jahre vor der ersten MS Manifestation feststellen.(28) Die Mechanismen, mit denen EBV in die Entstehung der MS eingreift sind bis heute nicht ganz verstanden und Gegenstand intensiver Forschung.

Als andere mögliche Erreger wurden Chlamydia pneumoniae und das Humane Herpesvirus 6 diskutiert, allerdings bisher ohne nachweisbare kausale Zusammenhänge.(29)

In mehreren Arbeiten, unter anderem in 4 prospektiven Studien werden positive Assoziationen zwischen Zigarettenkonsum und MS Risiko aufgezeigt. Obwohl nur eine der 4 Studien signifikante Zusammenhänge aufzeigte, zeigt eine Metaanalyse der zusammengefassten relativen Risiken eine hohe Signifikanz.(29) Nach einer Studie von Hedström et al., könnte Nikotin durch anti-inflammatorische und immunmodulierende Effekte allerdings das Risiko an einer MS zu erkranken verringern.(30)

## 1.3 Pathogenese

Multiple Sklerose ist definiert als chronisch entzündlich demyelinisierende Erkrankung des ZNS.(2) Allerdings zeigte sich, dass eine Entzündung nicht der einzige Krankheitsmechanismus der MS ist. Vielmehr zeigt sich ein komplexes Zusammenspiel mehrerer Mechanismen wie, Aktivierung der Mikroglia, oxidative Schäden, mitochondriale Funktionsstörungen und altersbezogene Akkumulation von Eisen, die neben einer entzündlichen Reaktion für die Demyelinisierung und Neurodegeneration verantwortlich sind.(31)

Die Komplexität der Pathogenese der Multiplen Sklerose wird auch durch die Tatsache deutlich, dass sie innerhalb der Erkrankung verschiedene Wege geht und in schubhaften und progressiven Stadien unterschiedliche Mechanismen, wie aktive Entzündungsherde oder neurodegenerative Veränderungen, im Vordergrund stehen.(32)

Die genauen Ursachen für die oben angeführten Faktoren in der Entstehung der MS sind noch nicht restlos geklärt und werden intensiv beforscht, um in weiterer Folge neue Therapiemöglichkeiten erschließen zu können.

### 1.3.1 Immunpathogenese und akute schubhafte Multiple Sklerose

Die Pathologie der MS ist charakterisiert durch konfluierende demyelinisierte Areale in der weißen und grauen Substanz des ZNS, welche den Verlust der Myelinscheiden der Nervenfasern und der Oligodendrozyten zeigen. Entzündungsreaktionen treten in allen Stadien der MS auf und tragen stark zu einer Demyelinisierung der Axone und Neurodegeneration bei. Allerdings konnte beobachtet werden, dass die entzündlichen Reaktionen in schubhaften Stadien, wie der schubhaft remittierenden Multiplen Sklerose (RRMS), stärker ausgeprägt sind als in progressiven Phasen wie der primär progredienten (PPMS) oder der sekundär progredienten MS (SPMS).(33)

Die auftretende Immunreaktion umfasst beide Arme des Immunsystems, das adaptive und das angeborene Immunsystem.(34) Zwei Hypothesen versuchen zu erklären woher die Entzündungsreaktion im ZNS stammt. Die „outside-in“ Hypothese

postuliert eine autoimmune Genese, bei der autoreaktive T-Zellen aus der Peripherie in das ZNS einwandern (35), während die „inside-out“ Hypothese von einer sekundären Entzündungsreaktion mit vorhergehender Infektion, durch zum Beispiel den Multiple Sklerose assoziierten Retrovirus MSRV, oder einer neuronalen Störung ausgeht.(31) Die Idee der autoimmunen Genese stützt sich auf beobachtete Ähnlichkeiten zwischen MS und dem Tiermodell dieser Erkrankung, der experimentellen autoimmunen Encephalomyelitis (EAE). Die in diesen Tieren gefundenen myelinspezifischen CD4+ T-Zellen, können auch in MS Patienten/innen in aktivierter Form im Liquor und peripheren Blut gefunden werden.(36) Laut der „inside-out“ Hypothese führen primäre Defekte an Oligodendrozyten (zB. genetische Mutationen) zu einem Absterben dieser und einer konsekutiven Aktivierung der Mikroglia.(31) Diese präaktiven oder präphagozytischen Läsionen in „normal appearing white matter“ (NAWM), der weißen Substanz des ZNS mit vorwiegend Nervenfasern, mit intakter Blut-Hirn-Schranke und ohne lymphozytärem Infiltrat und Demyelinisierung werden als erste pathologische Veränderung in der Entstehung von MS-Läsionen gewertet. Diese Hypothese stellt die primäre Rolle des Immunsystems in Frage und postuliert eine sekundäre Entzündungsreaktion.(37) Wie die T-Zellen im Menschen aktiviert werden ist noch nicht geklärt. Möglich sind Kreuzreaktionen mit körpereigenen Myelinepitopen, sogenannte molecular mimicry (38), mit anschließender Invasion des ZNS (outside-in) oder Präsentation, von aus dem ZNS kommenden Antigenen, mit sekundärer Immunantwort (inside-out), in zervikalen Lymphknoten (36) und lymphoiden Gewebe im Intestinaltrakt oder Bronchialsystem.(39)

Die Entzündungsreaktionen verursachen fokale Läsionen in der weißen und grauen Substanz des ZNS, sogenannte MS Plaques, die gehäuft an spezifischen Orten auftreten. In einer Studie konnten Haider et al. zeigen, dass Läsionen in der weißen Substanz gehäuft in Regionen mit hoher venösen Dichte und den „letzten Wiesen“ der arteriellen Blutversorgung auftreten.(40) Das zelluläre Infiltrat in diesen Plaques weist eine Häufung von mononukleären Phagozyten, T-Lymphozyten, vor allem CD4+, TH-1 und TH-17 Zellen und CD8+ T-Zellen, B-Lymphozyten, Plasmazellen und dendritischen Zellen auf.(39) TH-17 positive Zellen besitzen ein hohes pathogenes Potenzial und sind während Schüben, im peripheren Blut und Liquor, signifikant erhöht, verglichen zu Patienten/innen in Remissionsphasen.(41) In Tiermodellen konnte gezeigt werden, dass die Ausschaltung von Interleukin 23 (IL-

23), welches native CD4+ T-Zellen zu TH-17 Zellen differenzieren lässt, oder Interleukin 17 (IL-17), welches von TH-17 Zellen sezerniert wird, die pathophysiologischen Prozesse der EAE stoppen können.(42) Für eine starke Beteiligung von CD8+ Zellen spricht, dass axonale Schäden mit der Menge an CD8+ Zellen in Läsionen (43) und Schüben mit dem Verlust von terminal differenzierten autoregulatorischen CD8+ Zellen (44) korrelieren.

B-Gedächtnis Zellen können sich im Liquor in sogenannte Plasmablasts umwandeln und sind für die oligoklonalen Banden verantwortlich, die in der Diagnostik der MS eine große Rolle spielen.(34) Ein Mitwirken der B-Lymphozyten in der Pathogenese der MS wird auch durch Therapieerfolge mit Rituximab oder Cladribin, welche zu einer Depletion von B-Lymphozyten führen, verdeutlicht.(36) Makrophagen und aktivierte Mikroglia sind die häufigsten Immunzellen in MS Plaques und können neben der Interaktion mit dem adaptiven Immunsystem auch direkt entzündliche Schäden verursachen und sind daher hauptverantwortlich für Myelinschäden.(39) Außerdem zählen Makrophagen und aktivierte Mikroglia zu den Hauptquellen von oxidativem Stress in aktiven Läsionen.(45)

### **1.3.2 Neurodegeneration und Progression der Erkrankung**

Die Tatsache, dass alle bisherigen Therapieverfahren keine, beziehungsweise wenig, Wirkung in den progredienten Stadien der Multiplen Sklerose zeigen, weist auf andere pathophysiologische Mechanismen in der Entstehung der PPMS und SPMS hin. Im Gegensatz zur schubhaften MS, bei der akute entzündliche Plaques im Vordergrund stehen, dominieren in progressiven Formen kortikale Demyelinisierung und diffuse Veränderungen in der normal aussehenden weißen und grauen Substanz. Schlüsselemente der Neurodegeneration sind Aktivierung der Mikroglia, chronisch oxidative Schäden, Anhäufung von mitochondrialen Schäden in Axonen und altersabhängige Eisenablagerungen in Gehirn.(31) Lucchinetti et al. konnten allerdings zeigen, dass es auch in frühen Phasen der MS zu kortikaler Demyelinisierung mit einer entzündlichen Komponente und meningealen Entzündungsreaktionen kommt.(46)

Aufgrund der Entzündungsreaktionen kommt es zu oxidativen Schäden und mitochondrialen Dysfunktionen durch die Bildung von Sauerstoffradikalen in

Makrophagen und Mikroglia.(34) Mitochondrien und mitochondriale DNA sind stark anfällig für Schäden durch oxidativen Stress.(31) Mitochondriale Dysfunktion führt zu einem Energiedefizit, wird dieses zu groß führt es zu axonalen Schäden, Zelltod und Gewebedestruktion.(47) Weiter resultiert daraus eine Störung der Atmungskette, die wiederum zu einem Freiwerden von Elektronen und zur Bildung von Sauerstoffradikalen und oxidativen Schäden führt.(48)

Axonale Demyelinisierung beginnt in frühen Stadien der MS, führt aber durch eine sehr gute Kompensationsfähigkeit des ZNS, nicht sofort zu neurologischen Ausfällen.(49) Die meisten Axone überleben eine akute Demyelinisierung, nicht aber chronische Stadien der Demyelinisierung. Die Degeneration von chronisch demyelinisierten Axonen ist eine Charakteristik der progressiven MS und führt zu irreversiblen neurologischen Defiziten.(31)

Weitere Kennzeichen progressiver Stadien der Multiplen Sklerose sind diffuse Pathologien, axonale Schäden und Atrophie verursacht durch aktivierte Mikroglia, in „normal appearing white und grey matter“.(50) Unzureichende und fehlerhafte Remyelinisierung (31) spielt ebenso eine Rolle in der Progression der Erkrankung wie die Freisetzung von Eisen aus geschädigtem Myelin und Oligodendrozyten in den extrazellulären Raum, wo es die Toxizität von freien Sauerstoffradikalen erhöht.(51)

## 1.4 Klinik

Das bestimmende klinische Erscheinungsbild der Multiplen Sklerose ist, in den meisten Fällen, das schubhafte Fortschreiten der Erkrankung. Schübe sind die dominierende Eigenschaft der MS und dienen als Basis zur Einteilung in die verschiedenen Verlaufsformen der Erkrankung und als Maß für die Wirksamkeit von Therapien.(52)

Die erste Definition für MS Schübe geht auf Schumacher et al. im Jahr 1965 zurück und wird heute laut der deutschen Gesellschaft für Neurologie definiert als:

Neue oder reaktivierte bereits zuvor aufgetretene neurologische Ausfälle und Symptome, die der/die Patient/in berichtet oder die durch neurologische Untersuchungen objektiviert werden und länger als 24 Stunden andauern. Die Ausfälle dürfen nicht innerhalb eines Zeitintervalls von mindestens 30 Tagen zu vorausgegangen Schüben auftreten oder durch Änderungen der Körpertemperatur oder im Rahmen von Infektionen erklärbar sein.(53)

Durch Erhöhung der Körpertemperatur, zum Beispiel bei Fieber, körperlicher Anstrengung oder nach einem heißen Bad, kann es zu einem Pseudoschub (Uhthoff Phänomen) und einer vorübergehenden Verschlechterung der Symptome kommen, die sich aber mit Beendigung des physiologischen Stresses wieder zurückbilden und nicht als Krankheitsschub gewertet werden.(20)

### 1.4.1 Symptomatik

Die Symptome der Multiplen Sklerose sind sehr variabel und hängen vom Ort der Läsion im zentralen Nervensystem und der Verlaufsform der Erkrankung ab.(54)

Typische klinische Erscheinungsbilder der schubförmigen MS sind unilaterale Optikusneuritis, Doppelbilder, Sensibilitätsstörungen, Ataxie, Nystagmus, partielle Myelopathie, asymmetrische Extremitätenschwäche sowie Blasen- und Darmfunktionsstörungen.(55)

Patienten/innen mit progressiven Verlaufsformen, wie der primär progressiven MS, zeigen zu Beginn gehäuft Symptome einer chronisch progressiven Myelopathie. Typischerweise verschlechtert sich dieser Typ kontinuierlich und Tetraparesen,

kognitive Defizite, Erblindung, Hirnstamm-Syndrom und Kleinhirn-, Blasen-, Darm- und Sexualfunktionsstörungen können sich entwickeln.(56) Im Gegenzug zu diesen eher unspezifischen Symptomen gibt es mit dem bereits erwähnten Uhthoff Phänomen und dem Lhermitte- Zeichen (elektrisiertes Gefühl in den Extremitäten und entlang der Wirbelsäule bei passiver Kopfbeugung) zwei MS typische Zeichen.(20)

### **1.4.2 Verlaufsformen**

Die Multiple Sklerose kann in verschiedene Formen eingeteilt werden, die sich klinisch unterschiedlich präsentieren und verschieden therapiert werden.

Die Krankheit beginnt in ca. 85% aller Fälle mit einem akuten Auftreten von neurologischen Ausfällen und wird in diesem Stadium klinisch isoliertes Syndrom (CIS) genannt.(57) Das CIS als „Vorform“ der MS ist immer isoliert in Zeit und unterscheidet sich so von einer klinisch definitiven MS (CDMS).(58) In einer multizentrischen Studie von Kuhle et al., in der in einer 4 jährigen Follow-up Phase ca. 60% der CIS Patienten/innen zu einer CDMS konvertierten, konnten die Anzahl der T2 Läsionen im MRT, oligoklonale Banden im Liquor und das Alter bei CIS als stärkste voneinander unabhängige Risikofaktoren für eine Konversion in eine klinisch definitive MS ausgemacht werden.(59)

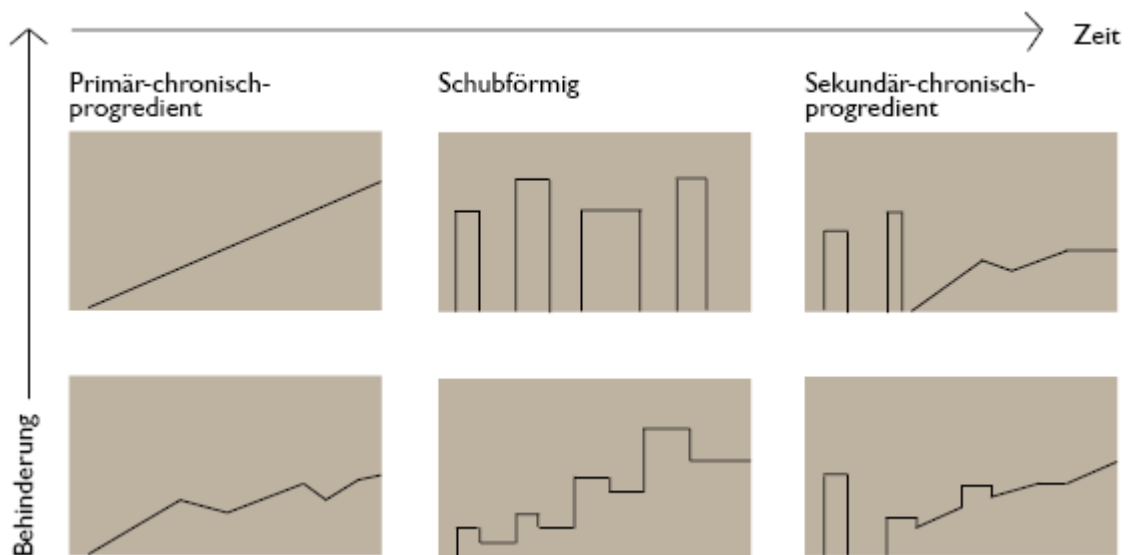
Die schubhaft remittierende Multiple Sklerose betrifft 85-90% der Patienten/innen und ist charakterisiert durch Episoden akuter neuer oder Verschlechterung alter neurologischer Defizite, gefolgt von Remissionsphasen. Die Remission der Schübe ist sehr variabel und reicht von vollständigem Rückgang bis zum Bestehenbleiben der Symptome.(55, 60) Die jährliche Schubrate lag in einer Studie von Kalincik et al. im ersten Jahr bei 1.1 Schüben, bedingt durch das Miteinbeziehen der ersten klinischen Geschehen, und nahm mit Dauer der Erkrankung und dem Alter der Patienten/innen ab. Frauen zeigten zudem eine höhere Schubrate als Männer.(61)

Kommt es nach einer initialen RRMS unabhängig von Schüben zu einer schleichenden irreversiblen Krankheitsprogression spricht man von einer sekundär progredienten MS. Zusätzlich kann es bei Patienten/innen mit SPMS zu schubhaften

Episoden kommen. Der Übergang zwischen RRMS und SPMS ist fließend und deswegen oft nur retrospektiv diagnostizierbar.(60)

Bei der primär progressiven Multiplen Sklerose kommt es ohne Schübe zu einer langsamen Zunahme an neurologischen Defiziten, mit vereinzelt Plateauphasen und kurzzeitigen Verbesserungen.(62) Die PPMS betrifft 10-15% aller MS Patienten/innen und manifestiert sich typischerweise später als die nichtprogressiven Formen (durchschnittliches Alter bei Manifestation ist 40 Jahre, verglichen mit 30 Jahren bei RRMS).(63)

Das radiologisch isolierte Syndrom (RIS) ist eine Sonderform der MS, mit zufällig gefundenen, klinisch stummen, MS typischen Läsionen im ZNS. Patienten/innen haben mit RIS haben ein erhöhtes Risiko später an MS zu erkranken und müssen engmaschig kontrolliert werden.(60)



**Abbildung 1:** Verlaufsformen der Multiplen Sklerose.(64)

## 1.5 Diagnostik

Um die Diagnose Multiple Sklerose stellen zu können müssen zwei Kriterien nachgewiesen werden, die zeitliche und die räumliche Dissemination der demyelinisierenden Prozesse im ZNS. Neben diesen beiden Kriterien darf keine bessere Erklärung für die Symptomatik vorhanden und alle möglichen Differenzialdiagnosen müssen ausgeschlossen sein.(65, 66)

Zur Diagnose der MS stehen die Anamnese, die vor allem wichtig für Hinweise auf vorangegangene Episoden neurologischer Symptome mit Schubcharakter ist, die klinisch neurologische Untersuchung, sowie paraklinische Untersuchungen wie MRT, Liquoranalyse, evozierte Potenziale und Blutuntersuchungen, zum Ausschluss möglicher Differenzialdiagnosen, zur Verfügung.(53)

Die aktuell gültigen Richtlinien zur Diagnostik der Multiplen Sklerose sind in der Revision der McDonald Kriterien von 2017 durch Thompson et al. festgelegt.(66) Eine Studie von Brownlee et al. in der die Poser Kriterien von 1982 mit den originalen McDonald Kriterien von 2001 und ihren Revisionen von 2005 und 2010 verglichen wurden, zeigte, dass mit jeder Erneuerung der Richtlinien Multiple Sklerose signifikant früher und häufiger erkannt werden konnte.(67)

In der folgenden Tabelle 1 sind die aktuell gültigen Diagnosekriterien der MS abgebildet.(66)

<b>Schübe</b>	<b>Klinisch objektivierbare Läsionen</b>	<b>Für eine Diagnose zusätzlich benötigte Untersuchung</b>
<b>≥ 2 klinische Schübe</b>	≥ 2	Keine
<b>≥ 2 klinische Schübe</b>	1 (plus einem klaren Beweis für einen vorherigen Schub durch eine Läsion in einer typischen Stelle im MRI)	Keine
<b>≥ 2 klinische Schübe</b>	1	Örtliche Dissemination durch einen erneuten klinischen Schub der eine andere Lokalisation impliziert oder durch MRT
<b>1 klinischer Schub</b>	≥ 2	Zeitliche Dissemination durch erneuten klinischen Schub, MRT oder oligoklonale Banden im Liquor
<b>1 klinischer Schub</b>	1	Örtliche Dissemination durch einen erneuten klinischen Schub der eine andere Lokalisation impliziert oder durch MRT UND Zeitliche Dissemination durch erneuten klinischen Schub, MRT oder oligoklonale Banden im Liquor

**Tabelle 1:** McDonald Kriterien zur Diagnosestellung einer MS.(66)

### **1.5.1 Klinische neurologische Untersuchung**

Die klinische Untersuchung und Anamnese sind wichtige Bestandteile der MS Diagnostik, vor allem um neue und vorangegangene Schübe zu erkennen und um neurologische Defizite zu quantifizieren. Hierbei ist die genaue Beachtung der vorhin genannten Definition eines Schubes wichtig, um die bestmögliche Therapie gewährleisten zu können. Die Quantifizierung des Schweregrads der neurologischen Beeinträchtigung durch MS erfolgt mit der sogenannten „Expanded Disability Status Scale“, kurz EDSS.(68) Die Symptome eines/er Patienten/in werden den jeweilig betroffenen Funktionssystemen (FS): Pyramidenbahnen, Kleinhirn, Hirnstamm, Sensorium, Vegetativum, Visus, zerebrale Funktionen oder andere Funktionen, zugeordnet und von 0 bis 6 bewertet. 0 entspricht einer normalen Funktion ohne Beeinträchtigung und 6 einer maximalen Beeinträchtigung bis Funktionsverlust. Im EDSS werden die Werte der Funktionssysteme und die maximale Gehstrecke ohne Hilfe und Pause bewertet und in eine Skala zusammengefügt. Wobei 0 für einen normalen neurologischen Befund steht und 10 für den Tod durch MS.(68)

Mögliche Schwächen des EDSS sind die starke Abhängigkeit, ab einem Wert von 4-6, von der maximalen Gehstrecke und unterschiedliche Beeinträchtigungssprünge zwischen den Werten.(69)

Eine weitere Skala zur Beurteilung anderer Funktionsbereiche ist der „Multiple Sclerosis Functional Composite Scale“, kurz MSFC, zu dem eine Gehstrecke auf Zeit („timed 25 foot walk“), ein Steckbrett-Test auf Zeit („9 hole-peg test“) und ein Aufmerksamkeits- und Konzentrationstest („paced auditory serial addition test“, PASAT) zählt.(53)

### **1.5.2 Magnetresonanztomographie (MRT)**

MRT-Kriterien wurden erstmals in den McDonald-Kriterien von 2001 in die MS Diagnostik aufgenommen und seither mehrmals revidiert um den Nachweis, der Dissemination der Läsionen in Zeit (DIT) und Raum (DIS) zu vereinfachen und dadurch eine frühere und genauere Diagnose der MS zu ermöglichen.

Die Kriterien basieren auf fokalen Läsionen der weißen Substanz des ZNS, die gehäuft in sogenannten MS typischen Arealen (periventrikulär, juxtacortical,

infratentorial und spinal) auftreten. In konventionellen MR-Sequenzen wie T2 gewichteten Aufnahmen und FLAIR zeigen sich Läsionen als hyperintense Areale. In T1 gewichteten Aufnahmen mit Gadolinium haltigen Kontrastmitteln können aktive, durch eine Mehraufnahme von Kontrastmittel, von inaktiven Läsionen unterschieden werden. Die Erhöhung der Kontrastmittelaufnahme resultiert aus einer erhöhten Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke durch andauernde entzündliche Prozesse. Hypointense Läsionen in T1 gewichteten postkontrastmittel Sequenzen sind mit schweren axonalen Verlusten und Demyelinisierung assoziiert.(70)

Die Anwendung der MR Diagnosekriterien sollte allerdings nur bei klinischen Verdacht auf Multiple Sklerose verwendet werden und dient nicht zur Differenzierung von MS und anderen Pathologien der weißen Substanz. Ebenso zu falsch positiven Diagnosen kann es bei der Anwendung der Kriterien bei Symptomen, die unwahrscheinlich durch eine MS ausgelöst sind, kommen.(67) Liu et al., zeigte zum Beispiel, dass in einer Kohorte von Kopfschmerzpatienten/innen ohne demyelinisierende Erkrankung, 24% durch zufällig gefundene Läsionen der weißen Substanz die McDonald-Kriterien von 2010 für eine Dissemination im Raum erfüllen.(71)

Die MAGNIMS Gruppe empfahl 2016 mehrere Modifikationen der geltenden McDonald-Kriterien für die MR Diagnostik. Unter anderem:

- 3 oder mehr Läsionen in der periventrikulären Region für eine Beteiligung und eine Dissemination im Raum,
- Läsionen des Nervus opticus sollten zu den Kriterien für DIS hinzugefügt werden als zusätzliche ZNS Region,
- Keine Unterscheidung zwischen symptomatischen und asymptomatischen Läsionen im MRT für DIS und DIT.(72)

In die aktuelle Revision der McDonald Kriterien aufgenommen wurde der Vorschlag symptomatische und asymptomatische Läsionen für die Bestimmung einer DIS und DIT zuzulassen. Die Anhebung der, für eine DIS nötige Läsionsanzahl von einer Läsion auf drei, zeigte eine zu kleine Verbesserung der Spezifität gegenüber den gültigen Kriterien. Ebenso unzureichend sind die Daten bezüglich der Aufnahme des visuellen Systems als fünftes MS typisches anatomisches Areal, weshalb auch dieser

Vorschlag nicht in der Revision der McDonald Kriterien 2017 berücksichtigt wurde.(66)

### **1.5.3 Liquoruntersuchung**

Die Liquordiagnostik bei Multipler Sklerose beinhaltet Zytologie, Albumin-, IgG-, IgA- und IgM Bestimmungen nach dem Quotienten-Schema und den Nachweis oligoklonaler IgG-Banden im Liquor. Bei gegebenem Verdacht werden auch die Antikörper-Synthese-Indizes (ASI) für die neurotrophen Viren Masern, Röteln, Zoster bestimmt.(53)

Häufig gefundene Veränderungen im Liquor sind eine normale bis leicht erhöhte Anzahl an weißen Blutkörperchen und Proteinen, ein erhöhter IgG Index und IgG oligoklonale Banden, die im Serum nicht nachweisbar sind.(73)

Die Bedeutung der Liquoranalyse und ihr Einbinden in das diagnostische Work-up bei Verdacht auf MS wird unter Experten kontrovers diskutiert, wie Statements von Sandberg-Wollheim und Olsson (74), Hutchinson (75) und Tur und Montalban (76) zeigen.

In der Revision der McDonald Kriterien 2017 wurde die Rolle der Liquoranalyse im Vergleich zu den bisher geltenden Kriterien stark aufgewertet. In Patienten/innen mit typischem klinisch isoliertem Syndrom und der Erfüllung einer DIS durch klinische oder MRT Kriterien und keiner besseren Erklärung der Symptome, erlauben liquorspezifische IgG oligoklonale Banden eine Diagnosestellung einer Multiplen Sklerose.(66)

### **1.5.4 Evozierte Potenziale**

Neben dem MRT kann mit Hilfe der evozierten Potentiale eine subklinische Krankheitsdissemination nachgewiesen werden. Zu Verfügung stehen visuell evozierte Potenziale (VEP), motorisch evozierte Potenziale (MEP) und somatosensibel evozierte Potenziale (SSEP).(53) Die Demyelinisierung der Axone führt zu einer verzögerten Latenz der evozierten Potentiale.(54)

## 1.6 Differentialdiagnosen

Die Diagnose der Multiplen Sklerose erfordert den Ausschluss von Krankheiten, die die klinischen und paraklinischen Zeichen besser erklären könnten. Initial tritt eine MS klinisch oft monofokal (ohne DIS), multifokal (mit DIS), monophasisch (ohne DIT), multiphasisch (mit DIT) oder progressiv auf. Viele andere Krankheiten, infektiöser, neoplastischer, kongenitaler, metabolischer oder vaskulärer Genese können sich ähnlich präsentieren und die Diagnosestellung erschweren und verzögern.

Sogenannte „nicht-MS idiopathische entzündliche demyelinisierende Erkrankungen (IIDDs)“, wie zum Beispiel Neuromyelitis optica (NMO), optikospinale MS in asiatischen Populationen (OSMS) oder akute disseminierte Enzephalomyelitis (ADEM), treten oft mit einer ähnlichen Symptomatik auf, unterscheiden sich aber in Verlauf, Pathogenese, Therapie und Prognose.(77)

Tabelle 2 zeigt einige Differentialdiagnosen nach Brownlee et al.(55)

KRANKHEITEN MIT SCHUBHAFTEM CHARAKTER	KRANKHEITEN MIT PROGRESSIVEM CHARAKTER
Neuromyelitis optika	HTLV1-assoziierte Myelopathie
Neurosarkoidose	Durale arteriovenöse Fistel
Zns vaskulitiden	Ernährungsbedingte Myelopathien (Vitamin B12 oder Kupfermangel)
Susac syndrom	Primäre Lateralsklerose
Cadasil (cerebrale autosomal-dominante arteriopathie mit subcorticalen infarkten und leukencephalopathie)	Leukodystrophien: Adrenomyeloneuropathie; Krabbe's disease; Alexander's disease; hereditäre diffuse Leukoenzephalopathie mit axonalen Sphäroiden
Bindegewebserkrankungen wie SLE, Sjörgen Syndrom	Hereditäre spastische Paraplegie
Mb. Behcet	Spinozerebelläre Ataxie
Clippers (chronic lymphocytic inflammation with pontine perivascular enhancement responsive to steroids)	
Leber`sche Optikusneuropathie	

**Tabelle 2:** Differentialdiagnosen der Multiplen Sklerose (55)

## 1.7 Therapie

Das primäre Ziel der MS-Therapie ist es das Auftreten von neuerlichen Schüben und die Zunahme der Behinderungsprogression zu verhindern.(78)

Eine weitere wichtige Therapiesäule neben der immunsuppressiven und immunmodulierenden Therapie, ist die symptomatische Therapie zur Steigerung der Lebensqualität von MS Patienten/innen. Sie verbindet idealerweise medikamentöse mit nicht medikamentöser Therapie wie, Physio-, Ergotherapie, Logopädie und psychologischer Betreuung. Häufig auftretende Begleitsymptome sind: Spastiken, Muskelschwäche, Schmerzen, Blasen-, Darm- und Sexualfunktionsstörungen, kognitive Defizite, Fatigue und Depression.(53)

In Anlehnung an die deutsche Gesellschaft für Neurologie wird die Therapie der Multiplen Sklerose in zwei Stufen eingeteilt, nämlich die Schubtherapie und eine verlaufsmodifizierte Intervalltherapie, die sich je nach Krankheitsaktivität unterscheidet und in einer früheren Nomenklatur als Basis- und Eskalationstherapie geführt wurde.(53) Folgend werden die einzelnen Therapiestufen genauer erläutert und in Abbildung 2 des Stufentherapieplans dargestellt.

Indikation	CIS <sup>1</sup>		RRMS <sup>1</sup>			SPMS <sup>1</sup>	
Verlaufsmodifizierende Therapie	(Hoch-) aktive Verlaufsform		<b>1. Wahl</b> - Alemtuzumab - Fingolimod - Natalizumab	<b>2. Wahl</b> - Mitoxantron (- Cyclophosphamid) <sup>4</sup>	<b>3. Wahl</b> - Experimentelle Verfahren	mit aufgesetzten Schüben	ohne aufgesetzte Schübe
	Milde/moderate Verlaufsform	- Glatirameracetat - Interferon-β 1a im - Interferon-β 1a sc - Interferon-β 1b sc	- Dimethylfumarat - Glatirameracetat - Interferon-β 1a im - Interferon-β 1a sc - Interferon-β 1b sc - PEG-IFN-β 1a sc - Teriflunomid (- Azathioprin) <sup>2</sup> (- IVIg) <sup>3</sup>				- Interferon-β 1a sc - Interferon-β 1b sc - Mitoxantron (- Cyclophosphamid) <sup>4</sup>
Schubtherapie	<b>2. Wahl</b>						
	- Plasmaseparation						
<hr/>							
<b>1. Wahl</b>							
- Methylprednisolonpuls							

Bei Versagen einer verlaufsmodifizierenden Therapie bei milder/moderater Verlaufsform einer MS werden diese Patienten wie eine aktive MS behandelt.

<sup>1</sup> Substanzen in alphabetischer Reihenfolge; die hier gewählte Darstellung impliziert KEINE Überlegenheit einer Substanz gegenüber einer anderen innerhalb einer Indikationsgruppe (dargestellt innerhalb eines Kastens)

<sup>2</sup> zugelassen wenn Interferon-β nicht möglich oder unter Azathioprin-Therapie stabiler Verlauf erreicht

<sup>3</sup> Einsatz nur postpartal im Einzelfall gerechtfertigt, insbesondere vor dem Hintergrund fehlender Behandlungsalternativen

<sup>4</sup> zugelassen für bedrohlich verlaufende Autoimmunkrankheiten, somit lediglich nur für fulminante Fälle als Ausweichtherapie vorzusehen, idealerweise nur an ausgewiesenen MS-Zentren

**Abbildung 2:** Therapieschema der Deutschen Gesellschaft für Neurologie (53)

### **1.7.1 Schubtherapie**

Als Standardtherapie eines MS Schubes gilt die intravenöse (i.v.) Hochdosis Therapie mit Glukokortikosteroiden. Im deutschsprachigen Raum wird in erster Linie hochdosiertes Methylprednisolon (500-1000mg) für 3-5 Tage verwendet, optional gefolgt von einer oralen Ausschleichphase.(53)

Ziel der Kortisonpulstherapie ist die rasche und möglichst vollständige Rückbildung der Schubsymptomatik, durch die Unterdrückung der Entzündungsreaktion und die Wiederherstellung der Blut-Hirn Schrankenfunktion.(53)

Bei unzureichender Symptomrückbildung kann die i.v. Kortisontherapie verlängert, der Zyklus wiederholt und auch in der Dosis bis zu einer Ultrahochdosistherapie (2000mg) gesteigert werden. Ist auch diese Therapie unzureichend oder nicht durchführbar muss eine Plasmapherese angedacht werden.(79)

Zu beachten ist der Ausschluss florider Infektionen vor der ersten Infusion mit Kortison und Nebenwirkungen wie anaphylaktische Reaktionen, Hyperglykämien Elektrolytstörungen sowie psychotische Reaktionen und emotionale Dekompensation.(53)

### **1.7.2 Basistherapie**

Die Basistherapie oder Therapie milder Verlaufsformen beinhaltet die medikamentöse Behandlung aller CIS und RRMS Patienten/innen mit geringer Krankheitsaktivität. Medikamente der ersten Wahl sind die Interferonpräparate Interferon beta-1a intramuskulär (Avonex®) 1x wöchentlich, -1a subkutan (Rebif®) 3x pro Woche und – 1b subkutan (Betaferon®) jeden zweiten Tag sowie Glatirameracetat subkutan (Copaxone®) täglich. Zusätzlich in der Basistherapie der RRMS verwendet werden Teriflunomide (Aubagio®) und Dimethylfumerat (Tecfidera®), welche oral verabreicht werden und täglich eingenommen werden müssen.(53)

In fünf Studien, CHAMPS (80), ETOMS (81), BENEFIT (82), PreCISe (83) und REFLEX (84), konnte gezeigt werden, dass ein möglichst rascher Therapiebeginn nach dem ersten Auftreten von klinischen Symptomen, CIS, sowohl die Zeit zum

zweiten klinischen Schub (CDMS) als auch die Zeit bis Erreichen der McDonalds Kriterien verlängert, wodurch eine möglichst schnelle Diagnose und Therapie anzustreben ist.(85)

Ein weiteres Medikament, Peginterferon beta-1a (Plegridy®), wird in den Leitlinien der deutschen Gesellschaft für Neurologie noch nicht berücksichtigt, ist für die Therapie aber mittlerweile zugelassen und muss im Gegensatz zu den anderen Interferonpräparaten nur einmal alle 2 Wochen verabreicht werden.(86) Ein anderes, zur Behandlung von Patienten/innen mit hoher Krankheitsaktivität, seit 2017 zugelassenes Therapeutikum ist das synthetische deoxyadenosin Analogon Cladribin. Cladribin kann die Blut-Hirn-Schranke überwinden und wird im ZNS von Lymphozyten aufgenommen und phosphoryliert diese. Dadurch kommt es zu einer Reduktion der in der Pathogenese der MS beteiligten T- und B-Lymphozyten.(87) Zwei Placebo kontrollierte Studien konnten zeigen, dass Cladribin nicht nur die Konversion eines CIS in eine CDMS verzögert (88), sondern auch in Kombination mit Interferon  $\beta$  die Schubrate und die Läsionsaktivität im MRT verringert.(89)

Weitere Medikamente die selten bei fehlender Wirksamkeit oder nicht Durchführbarkeit der first-line Therapien, teilweise Off-Label, angewandt werden sind: Azathioprin, intravenöse Immunglobuline (IVIg), Methotrexat oder Rituximab.(53)

Für die Therapie der progredienten Verlaufsformen der MS existieren bis heute keine guten Therapiemöglichkeiten. Die Entwicklung dieser gilt als größte Herausforderung in der MS Therapie für die Zukunft.(90) Zurzeit zur Behandlung der sekundär progredienten MS mit aufgesetzten Schüben zugelassen sind Interferon beta-1a subkutan, -1b subkutan sowie Mitoxantron, welches auch für die SPMS ohne Schübe verwendet werden kann.(53)

Studien mit dem, seit Beginn 2018 zugelassenem, monoklonalen Antikörper Ocrelizumab (Ocrevus®), zeigen möglicherweise vielversprechende Ergebnisse. Die ORATORIO-Studie, die die Wirkung von Ocrelizumab, einem monoklonalem Antikörper, der selektiv CD20 positive B Zellen depletiert, bei primär progressiver MS untersuchte, zeigt zum ersten Mal eine Verlangsamung der klinischen und Läsionsprogression im MRT im Vergleich zur Placebogruppe.(91) Die Studien OPERA 1 und OPERA 2 zeigten eine Überlegenheit von Ocrelizumab gegenüber Interferon-Beta 1a in schubhaft remittierender MS durch eine Senkung der jährlichen

Schubrate, langsamerer Krankheitsprogression und einer geringeren Anzahl an MR-Läsionen in einem Zeitraum von 96 Wochen.(92) In beiden Studien wurde allerdings eine erhöhte Rate an Infusionsreaktionen und Neoplasien unter der Therapie mit Ocrelizumab festgestellt, weswegen größere und längere Studien zur Sicherheit von Ocrelizumab nötig sind.(92)

### **1.7.3 Therapie aktiver Verlaufsformen**

In der sogenannten Eskalationstherapie sind vor allem Fingolimod und Natalizumab Mittel der ersten Wahl. Die Indikation zur Eskalationstherapie kann bei Patienten/innen gestellt werden, welche unter einem Basistherapeutikum mindestens einen Schub und  $\geq 9$  T2- hyperintense Läsionen oder eine neu aufgetretene Gadolinium aufnehmende Läsion im MR im vorhergehenden Jahr aufweisen. Bei rasch fortschreitenden, schweren Verläufen kann auch primär mit Fingolimod oder Natalizumab behandelt werden, wenn innerhalb eines Jahres 2 oder mehr Schübe und im MR eine starke Erhöhung an Läsionen zu einer kürzlich durchgeführten (6 bis 12 Monate) Untersuchung auftreten.(53)

Andere zugelassene, aber aufgrund ihrer Nebenwirkungsprofile, seltener eingesetzte Therapiemöglichkeiten sind der CD52 Antikörper Alemtuzumab, der CD25 Antikörper Daclizumab oder Mitoxantron und Cyclophosphamid, welche auch in der Therapie der SPMS verwendet werden.(53)

Durch die immunmodulatorische und immunsuppressive Wirkung der disease modifying therapy steht die Therapie der MS vor neuen Herausforderungen. Mit diesen neuen Therapiemöglichkeiten kamen auch höhere Risiken für Nebenwirkungen, wie unter anderem die progressive multifokale Leukenzephalopathie oder sekundär auftretende Autoimmunerkrankungen. Die Entwicklung neuer Tests und das Finden von prädiktiven Biomarkern ist von immenser Wichtigkeit, um eine sichere und effektive Therapie zu ermöglichen.(93)

Folgend wird auf die progressive multifokale Leukenzephalopathie und ihr Zusammenhang mit Natalizumabtherapie, sowie die Möglichkeit und Notwendigkeit der Vermeidung und des Risikomanagements dieser, genauer eingegangen.

## 1.8 Progressive multifokale Leukenzephalopathie

Die progressive multifokale Leukenzephalopathie ist eine seltene virale Erkrankung des zentralen Nervensystems. Ätiologisch verantwortlich für die PML ist eine Infektion mit dem JC (John Cunningham) Papillomavirus, benannt nach dem Patienten, in dem der Virus das erste Mal isoliert werden konnte. Die Infektion, die meist schon in der Kindheit erworben wird und mit der ein Großteil der Erwachsenen infiziert ist, verläuft in immunkompetenten Menschen asymptomatisch.(94) PML Erkrankungen können am häufigsten bei HIV Patienten/innen beobachtet werden, bis zu 5% der Patienten/innen mit AIDS erkranken an PML.(95) Vor der HIV Epidemie, mit der die Prävalenz der PML deutlich anstieg, war sie assoziiert mit malignen hämatologischen Erkrankungen, Organtransplantationen und chronisch entzündlichen Erkrankungen.(95) Ein weiterer, in den letzten Jahren zunehmender Faktor, sind monoklonale Antikörper, die in der Behandlung von Autoimmunerkrankungen wie Multipler Sklerose (96), Morbus Crohn (97), Psoriasis (98) und Lupus (99) eingesetzt werden.

Der zentrale Pathomechanismus der PML ist die Infektion von Oligodendrozyten mit dem JC-Virus und die damit einhergehende Entmarkung von Nervenfasern. Seltener, aber auch betroffen sind Astrozyten. Die Demyelinisierung führt zu fokalen Symptomen, je nach betroffenem Areal. Prädilektionsstellen sind posteriore Regionen des Gehirns einschließlich Hirnstamm, Kleinhirn und der Frontallappen.(100, 101) Die beiden am häufigsten auftretenden Symptome in einer Studie von Maas et al. waren motorische Schwäche und kognitive Veränderungen. Unter anderem häufig auftretenden Symptome sind Dysarthrie, Ataxie, Aphasie und Verhaltensveränderungen.(102)

Nach den Diagnosekriterien von Berger et al. ist die histopathologische Trias (Demyelinisierung, vergrößerte bizarre Astrozyten mit gelappten, hyperchromen Zellkernen, vergrößerte Nuclei der Oligodendrozyten) in einer Biopsie, zusammen mit einem Virusnachweis mittels Elektronenmikroskop, Immunhistochemie oder eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR) nötig um die Diagnose stellen zu können. Alternativ kann die Diagnose auch über typische radiologische und klinische Befunde

im Zusammenspiel mit einem positiven PCR Befund für JCV im Liquor gestellt werden.(101)

Bis heute gibt es keine antiviralen Therapien gegen den JC-Virus. Es wurden eine Vielzahl an Medikamenten getestet, allerdings ohne Erfolge.(103) Das vorrangige Therapieziel ist die Stärkung des körpereigenen Immunsystems um die Infektion unter Kontrolle bringen zu können. Bei HIV positiven Patienten/innen durch antiretrovirale Therapie und bei HIV negativen durch eine vorsichtige Reduzierung der immunsuppressiven Medikamente, soweit es die Grunderkrankung zulässt.(95)

### **1.8.1 PML und Multiple Sklerose**

Die progressive multifokale Leukenzephalopathie wird bei MS Patienten/innen durch die Einnahme von immunmodulatorischen Medikamenten ausgelöst. Das am häufigsten mit PML assoziierte MS Therapeutikum ist Natalizumab (Tysabri®), ein monoklonaler Antikörper gegen das  $\alpha$ 4-Integrin von T-Lymphozyten.(104) Seit den ersten bekannten PML Fällen unter Natalizumabtherapie 2005 und Anfang Juni 2017 kam es zu 731 bestätigten PML Erkrankungen mit einer Inzidenz von 4.21/1000 Patienten/innen.(105)

Andere MS Therapien unter denen das Auftreten von PML beobachtet werden konnte, sind Fingolimod (Gilenya®)(106) und Dimethyl Fumarat (Tecfidera®) (107), bei denen die Zahlen an Erkrankungen aber weit geringer sind.

Ein Problem, vor dem die MS Therapie in Zukunft stehen wird, ist die Langzeitkomplikationsrate der neuen immunmodulatorischen Medikamente. Viele davon wurden erst in den letzten 10 Jahren zugelassen und man weiß noch wenig über ihr Langzeitrisiko.(108) Für die Natalizumabtherapie konnten Faktoren ausgemacht werden die das Auftreten einer PML begünstigen, wie das Vorhandensein von Anti JC-Virus Antikörpern, vorherige immunsuppressive Therapie und die Therapiedauer, beziehungsweise die Anzahl an Infusionen mit Natalizumab.(109) Bei einer Therapie mit Tecfidera gilt die Reduktion der absoluten Lymphozytenzahl unter  $0.5 \times 10^9/L$  über einen Zeitraum von mehr als 6 Monaten als

Risikofaktor für die Entstehung einer PML.(107) McGuigan et al. empfehlen die Einführung eines Anti-JC Virus Antikörper Indexes, um Patienten/innen, in Zusammenschau mit den anderen bereits erwähnten Risikofaktoren, in zwei Risikogruppen zu unterteilen und dadurch ein individuelles Risikoprofil zu erstellen und danach die Therapierisiken besser einschätzen zu können.(110)

Im Weiteren beschäftigt sich diese Arbeit mit Biomarkern, die dazu dienen sollen das PML Risiko zu minimieren und die MS Therapie besser steuern zu können. Es wird dabei genauer auf die Rolle des Biomarkers L-Selectin eingegangen und die prognostische Wertigkeit evaluiert.

### **1.8.2 Biomarker und Multiple Sklerose**

Ein Biomarker ist definiert als Charakteristikum, welches objektiv messbar und evaluierbar ist, und als Indikator für normale biologische Prozesse, pathologische Prozesse oder pharmakologische Reaktionen auf therapeutische Interventionen dient.(111)

Das Feld der Biomarkerforschung in MS ist sehr aktiv und soll dabei helfen die Ätiopathogenese, Diagnose und Prognose der MS besser zu verstehen, sowie Behandlungsverläufe, Therapieeffizienz und gefährliche Nebenwirkungen besser beurteilen zu können und neue Therapiemöglichkeiten zu entwickeln. Obwohl eine große Zahl an potentiellen molekularen Biomarkern untersucht werden, gibt es bis jetzt wenige die validiert sind und im klinischen Alltag verwendet werden. Einige Beispiele für klinisch anwendbare Biomarker sind IgG oligoklonale Banden im Liquor, welche bei der Diagnosestellung verwendet werden, Anti-Aquaporin-4 Antikörper, die zum Ausschluss der Differentialdiagnose NMO herangezogen werden oder der bereits erwähnte Anti-JC-Virus Antikörper Status bei Natalizumabtherapie.(112)

Die größte Herausforderung und Schwierigkeit in der Entwicklung neuer Biomarker ist die Heterogenität der Erkrankung. MS wird in verschiedene Stadien eingeteilt und hat unterschiedliche Verlaufsformen. Die verschiedenen pathophysiologischen Mechanismen der einzelnen Formen können zu unterschiedlichen Modulationen von

Biomarkern führen und sie somit nur für eine bestimmte Verlaufsform aussagekräftig machen. Die Erreichung hoher Sensitivität und Spezifität von Biomarkern bildet eine weitere schwierige Aufgabe in der Biomarkerforschung, auf Grund von Ähnlichkeiten in den Krankheitsmechanismen zu anderen neurodegenerativen und neuroinflammatorischen Krankheiten.(113)

Biomarker in der Multiplen Sklerose werden ihrer Verwendung nach grob in verschiedene Gruppen eingeteilt, wobei es allerdings zu Überschneidungen kommt und es daher keine strenge Trennung gibt. Dazu zählen Biomarker mit prädiktivem oder diagnostischem Wert und Marker die Rückschlüsse auf den Krankheitsverlauf/-aktivität oder den Therapieverlauf inklusive Nebenwirkungen zulassen.(112)

Folgend werde ich mich auf Biomarker fokussieren, die in der Literatur in Zusammenhang mit der progressiven multifokalen Leukenzephalopathie bei MS Patienten/innen, unter verschiedenen Therapieformen und im speziellen unter Natalizumabtherapie, gebracht werden.

Um das Prinzip und den Mechanismus von Biomarkern zu verstehen und neue zu finden, lohnt sich ein genauere Blick auf die Ätiopathogenese der PML, die Pathophysiologie der JCV Infektion und die Wirkmechanismen von Natalizumab.

Wie bereits erwähnt tritt eine Infektion mit dem JC-Virus meist im Kindesalter auf, verläuft aber unbemerkt.(94) Virione verbleiben anschließend als latente Infektion in Nieren, Knochenmark und lymphatischen Organen.(114) Durch Mutationen in nicht codierenden transkriptionskontrollierenden Regionen und der VP1 Region entwickelt sich ein pathogener neurotroper Virus mit einer Spezifität für Gliazellen. Um schließlich im weiteren Verlauf eine PML zu entwickeln ist ein Versagen der ZNS Immunüberwachung nötig.(115)

Zu den bereits etablierten Markern im PML Risikomanagement bei MS Patienten/innen unter Natalizumabtherapie zählt der JCV Antikörperstatus. Patienten/innen mit positivem Antikörperstatus haben ein höheres Risiko an einer PML zu erkranken, während für Negative nur ein sehr geringes Risiko besteht.(109)

Ein Problem in der Aussagekraft dieses Tests besteht darin, dass etwa 50-60% aller MS Patienten/innen einen positiven AK-Status auf JCV haben, aber nur ein sehr geringer Anteil an PML erkrankt, was verdeutlicht, dass eine genaue individuelle Risikoabschätzung mit diesem Test nicht möglich ist.(116) Plavina et al. konnten eine Korrelation des Risikos mit steigendem quantitativem JCV-AK-Index beobachten, allerdings mit der Limitation, dass diese Korrelation nur bei Patienten/innen ohne vorangegangene Immunsuppression existiert. Bei Patienten/innen mit vorangegangener immunsuppressiver Therapie konnte kein Zusammenhang festgestellt werden. Basierend auf dem JCV Antikörper-Index und der Therapiedauer mit Natalizumab können Patienten/innen ohne vorangegangene Immunsuppression in zwei Risikogruppen eingeteilt werden. Patienten/innen mit einem Indexwert von  $\leq 1.50$  haben ein maximales Risiko von 1.13/1000 in den ersten 48 Therapiemonaten. Steigt der Index auf  $\geq 1.50$ , steigt auch das maximale Risiko auf 8.83/1000 in den ersten 48 Therapiemonaten.(117) McGuigan et al. empfehlen daher die Aufnahme des JCV Antikörper-Index in die standardmäßige Abklärung bei immunsuppressiv naiven Patienten/innen bei Natalizumabtherapie.(110)

Natalizumab ist ein rekombinanter, humanisierter, monoklonaler IgG4 Antikörper, der selektiv an die alpha Kette von  $\alpha 4\beta 1$  und  $\alpha 4\beta 7$  Integrinen bindet. Diese Integrine werden an der Oberfläche einiger hämatopoetischer Zellen, wie Lymphozyten, Monozyten und auch eosinophilen Granulozyten, exprimiert. Natalizumab verhindert die Bindung der Zellen, inklusive aktivierter T-Lymphozyten, an endotheliale Zellen die das vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) exprimieren. Die Migration der Zellen durch die Blut-Hirn-Schranke wird so blockiert, wodurch es zu dem therapeutischen Effekt, eine Verringerung der Entzündungsreaktion im ZNS, kommt. Durch diesen Eingriff in die Immunüberwachung des ZNS, steigt allerdings auch die Anfälligkeit für eine PML.(118)

Die genauen Mechanismen wie Natalizumab das Risiko für die Entstehung einer progressiven multifokalen Leukenzephalopathie beeinflusst sind mannigfaltig und nicht restlos geklärt.

Zu erwähnen sind, Änderungen in der Anzahl an CD4+ und CD8+ Zellen im peripherem Blut, wobei in mehreren Studien nicht geklärt werden konnte wie sich diese Lymphozytensubsets verhalten, denn man konnte steigende, fallende wie auch stabile Zellzahlen beobachten.(119-121)

Neben T-Lymphozyten scheint Natalizumab auch einen Einfluss auf die Funktion von antigenpräsentierenden Zellen, wie B-Lymphozyten und dendritischen Zellen zu haben. Natalizumab verringert die Fähigkeit von dendritischen Zellen, CD4+ Zellen zu stimulieren und eine adäquate Immunantwort gegen den JC Virus auszulösen.(122)

Ebenso konnte festgestellt werden, dass eine genetische Untersuchung des HLA-Komplexes helfen könnte ein individuelleres Risikoprofil für PML zu erstellen. Der Haplotyp HLA-DR1\*15, welcher ein Risikofaktor für die Entstehung einer MS ist, hat einen protektiven Effekt bei JCV Infektionen, wohingegen der Haplotyp HLA-DQB1\*06:03 eine negative Assoziation zu PML hat.(123)

B-Zellen und CD34+ Progenitorzellen könnten einigen Studien nach als Reservoir für den JC Virus dienen.(124) Natalizumab forciert eine Freisetzung von prä-B-Zellen sowie CD34+ Stammzellen aus dem Knochenmark in die Peripherie, was ein möglicher Mechanismus hinter der ansteigenden JC Virämie vor Ausbruch einer PML sein könnte.(125)

Ein neuer Ansatz in der Biomarkerforschung sind immunologische Biomarker basierend auf Leukozytenzellmembranmolekülen. Sie gehören meist den Familien der Integrine oder Selektine an und spielen eine Rolle in der Zellmigration durch die Blut-Hirn-Schranke. Einige dieser Marker, bei welchen allerdings noch kein prädiktiver Wert in Bezug auf PML nachgewiesen werden konnte, sind CD49d, CD29 und CD11a.(118)

Im Weiteren und auch in meiner wissenschaftlichen Arbeit beschäftige ich mich genauer mit einem Marker dieser Gruppe, genannt CD62L oder L-Selektin.

### **1.8.3 CD62L**

CD62L ist ein Adhäsionsmolekül welches an Lymphozytenmembranen exprimiert wird und eine entscheidende Rolle in der Bindung der Lymphozyten an das Endothel der Blutgefäße spielt. Auch spielt es eine wichtige Rolle in Rezirkulation und dem „homing“ (heimkehren) in Lymphknoten.(126)

Mehrere Arbeiten zeigten eine signifikante Reduktion der CD62L Expression an CD3+CD4+ mononukleären Zellen im peripheren Blut, in MS-Patienten/innen die mit Natalizumab und anderen DMTs behandelt werden. Folglich wurde CD62L als Parameter zur Risikoabschätzung einer PML vorgeschlagen.(4, 127-129)

Eine andere Studie von Liebermann et al. weist diesen Vorschlag allerdings zurück, mit der Begründung, dass sie keinen Unterschied in den CD62L Werten von Patienten/innen, die eine PML entwickelten und nicht-PML-Patienten/innen nachweisen konnten und die Werte durch technische Unterschiede in der Verarbeitung und Messung der Proben variieren.(130)

## 1.9 Fragestellung

Multiple Sklerose ist die häufigste entzündliche Erkrankung des zentralen Nervensystems in jungen Erwachsenen und bedarf in den meisten Fällen einer lebenslangen Therapie. Die Therapiemöglichkeiten der MS sind vielfältig und zeigen gute Wirksamkeit. Vor allem Therapien mit Natalizumab und Fingolimod führen zu einer deutlichen Reduktion der Schubraten und Progression der Erkrankung.

Die Kehrseiten dieser DMTs sind zum Teil schwerwiegende Nebenwirkungen wie die in der Einleitung beschriebene PML. Daher besteht ein starker Bedarf an Biomarkern, welche in der Beurteilung des Nebenwirkungsrisikos der MS Behandlung helfen können.(3)

Ein möglicher Weg dies zu erreichen, könnte der beschriebene Biomarker L-Selektin bzw. CD62L sein. In einigen Studien wird diesem Biomarker eine prädiktive Bedeutung in der Entstehung der PML bei Patienten/innen mit Natalizumabtherapie beigemessen.(4, 127-129)

Nicht vollständig geklärt ist das Verhalten der CD62L Expression in frischem Blut und die Vergleichbarkeit zu Messwerten bisheriger Studien aus kryokonservierten Proben. Ebenfalls unklar ist, wie andere DMTs, abgesehen von Natalizumab, die Expression von L-Selektin beeinflussen.

Ziel dieser Studie ist es, die CD62L Expression an CD3+CD4+ mononukleären Zellen aus peripher gewonnenem Blut innerhalb kurzer Zeit nach Probengewinnung, bei Patienten/innen mit verschiedenen DMTs zu bestimmen um das Verhalten der L-Selektin Expression unter den unterschiedlichen Therapieformen zu analysieren und eine mögliche einfache, klinisch anwendbare Messung zu implementieren.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Patienten/innen

Es wurden insgesamt 234 Patienten/innen mit klinisch isoliertem Syndrom oder Multipler Sklerose in die Studienkohorte eingeschlossen. Alle Teilnehmer/innen sind Patienten/innen der Spezialambulanz für Multiple Sklerose des Universitätsklinikums Graz und wurden während routinemäßigen Kontrollen zwischen März und Dezember 2015 akquiriert. Alle Studienteilnehmer/innen erfüllten folgende Einschlusskriterien: 1) Diagnose eines CIS oder einer MS, nach den zur Zeit des Einschlusses gültigen Diagnosekriterien (65); 2) Verfügbarkeit von einer oder mehrerer Vollblutproben; 3) Verfügbarkeit von detaillierten klinischen Daten.

Die Kontrollgruppe bestand aus 51 gesunden Freiwilligen, die sich im Rahmen einer Gesunden Untersuchung im Zeitraum von April bis Oktober 2015, zur Teilnahme an dieser Studie bereit erklärten. Eingeschlossen wurden alle volljährigen und mündigen Patienten/innen, die keine Ausschlusskriterien wie neoplastische Erkrankungen, akute oder chronische Infektionserkrankungen, Autoimmunerkrankungen, akute oder chronische Erkrankungen mit Organschäden, bestehende Schwangerschaft und schwere Anämie (Hb<9 mg/dl) aufwiesen.

Die Patienten/innen wurden bei regelmäßigen Follow-up Kontrollen untersucht und folgende demographische und klinische Daten wurden erhoben.

- Alter
- Geschlecht
- Alter bei Krankheitsbeginn
- Jährliche Schubrate
- Grad der Beeinträchtigung mittels EDSS-Score
- Therapie

Alle klinischen und demographischen Daten wurden aus dem Informationssystem MEDOCS und der wissenschaftlichen Datenbank RDA bezogen.

Die Studie wurde von der Ethikkommission der Medizinischen Universität Graz genehmigt. Alle Patienten/innen willigten schriftlich, in Form einer Einverständniserklärung, zur Teilnahme an dieser Studie ein.

## **2.2 Methoden**

### **2.2.1 Probengewinnung**

Von jedem/er Patienten/in wurde bei Routinekontrollen in der MS Ambulanz aus einer peripheren Vene Blut abgenommen und die mononukleären Zellen des peripheren Bluts (PBMC) in EDTA Röhrchen gesammelt.

Die Blutabnahme und Messung des CD62L-Wertes wurde in regelmäßigen Abständen bis zu maximal sieben Mal durchgeführt um longitudinale Veränderungen der L-Selektin Werte feststellen zu können.

### **2.2.2 CD62L-Messung**

Die Messung der Expression von L-Selektin an Leukozytenoberflächen wurde mittels Durchflusszytometrie (FACS – fluorescence activated cell sorting) innerhalb einer Stunde nach der Probengewinnung durchgeführt.

#### *FACS-Analyse:*

Die Durchflusszytometrie ist eine der meist genutzten Methoden in der medizinischen, insbesondere in der immunologischen Forschung. Sie ermöglicht neben dem Zählen von Zellen auch eine genauere Charakterisierung der Zellen durch Bestimmung von Größe, Granulierung oder Oberflächenmolekülen.

Zur Detektion der Zellen werden diese vor der Messung mit fluoreszenzgekoppelten Antikörpern inkubiert. In der FACS-Maschine werden die Zellen mit hoher Geschwindigkeit durch eine Verengung geschleust und so gänsemarschartig

aufgereiht. Jede Zelle wird einzeln von einem Laserstrahl erfasst und anhand der Streuung des Lichts und der unterschiedlichen Wellenlängen der Fluoreszenzfarbstoffe analysiert.

So ist es möglich zum Beispiel Subgruppen von Leukozyten zu identifizieren und wie in dieser Studie die Expression eines Oberflächenmoleküls zu quantifizieren.(131)

#### *Durchführung der Messung:*

Von den Proben wurden jeweils 100µl Vollblut aus den EDTA-Röhrchen in FACS-Röhrchen übertragen und mit den Antikörpern gegen CD3 (APC H7, BD 341110), CD4 (CD4 V500, BD 560768) und CD62L (CD62L PE, BioLegend 304806), im Verhältnis 20:1, für 30 Minuten, lichtgeschützt und bei Raumtemperatur inkubiert.

Danach wurden die roten Blutkörperchen mittels 2ml BD FACS Lysing Solution (BD Biosciences) lysiert. Nach Lyse der Erythrozyten wurden die Röhrchen zentrifugiert und der Überstand abgekippt, sodass ein Zellpallet aus PBMC übrigblieb. Die Pellets wurden anschließend in 2ml Cellwash resuspendiert und abermals abzentrifugiert. Die gewaschenen Paletts wurden in 150µl Cellwash resuspendiert und die Messung von CD3, CD4 und CD62L mittels des BD FACS Canto II Systems (BD Biosciences) durchgeführt.

## **2.3 Statistik**

Die statistische Analyse der Daten wurde mit dem Programm SPSS Statistics (Version 23.0, IBM Corp. Armonk, New York, USA) durchgeführt und die graphischen Darstellungen mit GraphPad Prism (Version 5.00, GraphPad Software, San Diego, USA) erstellt.

Die erhobenen Daten wurden mittels Kolmogorov-Smirnov Test auf eine Normalverteilung überprüft. Gruppenvergleiche wurden entweder mit dem Chi-Quadrat Test oder dem Mann-Whitney U-Test durchgeführt. Als Multivergleichsmodell wurde der Kruskal-Wallis Test verwendet und mittels post-hoc Dunn's Multiple Comparison test korrigiert. Longitudinale gepaarte Daten wurden

mittels Wilcoxon signed rank test analysiert. Korrelationen wurden mittels Spearman's Rank-Order Correlation errechnet.

Die Signifikanzgrenze wurde auf 5% ( $p < 0.05$ ) festgelegt.

## 3. Ergebnisse

### 3.1 Patientenkohorte

Zum Zeitpunkt der ersten CD62L Messung setzte sich die Kohorte aus 48 Patienten/innen mit CIS und 186 Patienten/innen mit diagnostizierter MS zusammen. 181 Patienten/innen standen unter Langzeit DMT: Natalizumab (n=26), Fingolimod (n=20), Dimethylfumarat (n=15), Interferon beta (n=90), Glatirameracetat (n=30). Für die gesamte Kohorte (n=234) war die totale Follow-up Zeit im Median 9.50, mit einer interquartilen Breite (IQR) von 6.20 – 13.40 Monaten. Die Geschlechterverteilung lag bei 146 weiblichen zu 88 männlichen Patienten, was der typischen 2:1 Verteilung der Multiplen Sklerose nahekommt.

Die Demographischen und klinischen Daten aller Probanden/innen sind in Tabelle 3 dargestellt.

	<b>CIS</b>	<b>MS</b>	<b>Kontrollen</b>	<b>p-Wert</b>
<i>n</i> Patienten/innen (% weiblich)	48 (72.9)	186 (59.7)	51 (39.2)	0.002 <sup>a</sup>
Alter [Jahre]	33.3 (26.70-44.1)	36.1 (30.5-45.3)	49.1 (34.1-60.9)	< 0.001 <sup>b</sup>
Alter bei Erkrankungsbeginn [Jahre]	30.9 (25.1-40.2)	26.1 (21.0-31.4)	N/A	0.001 <sup>c</sup>
Erkrankungsdauer [Jahre]	2.3 (1.2-4.8)	9.2 (5.0-15.3)	N/A	< 0.001 <sup>c</sup>
EDSS	1.0 (0.0-2.0)	1.8 (0.0-3.0)	N/A	0.005 <sup>c</sup>
<i>n</i> DMT	40 (83.3)	141 (75.8)	N/A	n.s. <sup>c</sup>
DMT Dauer [Jahre]	1.8 (0.4-4.1)	2.9 (1.0-6.7)	N/A	0.008 <sup>c</sup>
Zeit seit letztem Schub [Jahre]	2.5 (1.3-4.9)	1.9 (0.5-5.8)	N/A	n.s. <sup>c</sup>
Zeit seit letzter Kortisongabe [Jahre]	2.4 (1.2-5.0)	2.0 (0.5-4.9)	N/A	n.s. <sup>c</sup>
Dauer des Follow-up [Monate]	8.0 (5.2-10.8)	10.2 (6.3-14.4)	N/A	0.022 <sup>c</sup>
Zeit bis zur letzten Probe ( <i>n</i> = 12/85) [Tage]	117 (56-150)	113 (83-165)	N/A	n.s. <sup>c</sup>
CD62L <sup>+</sup> [% CD4 <sup>+</sup> ]	84.6 (79.5-87.2)	84.5 (79.1-89.5)	84.1 (78.3-88.2)	n.s. <sup>b</sup>

**CIS** = klinisch isoliertes Syndrom; **DMT** = disease modifying therapy; **EDSS** = Expanded Disability Status Scale; **MS** = Multiple Sklerose; **n** = Anzahl an Probanden; **N/A** = nicht anwendbar; **n.s.** = nicht signifikant.

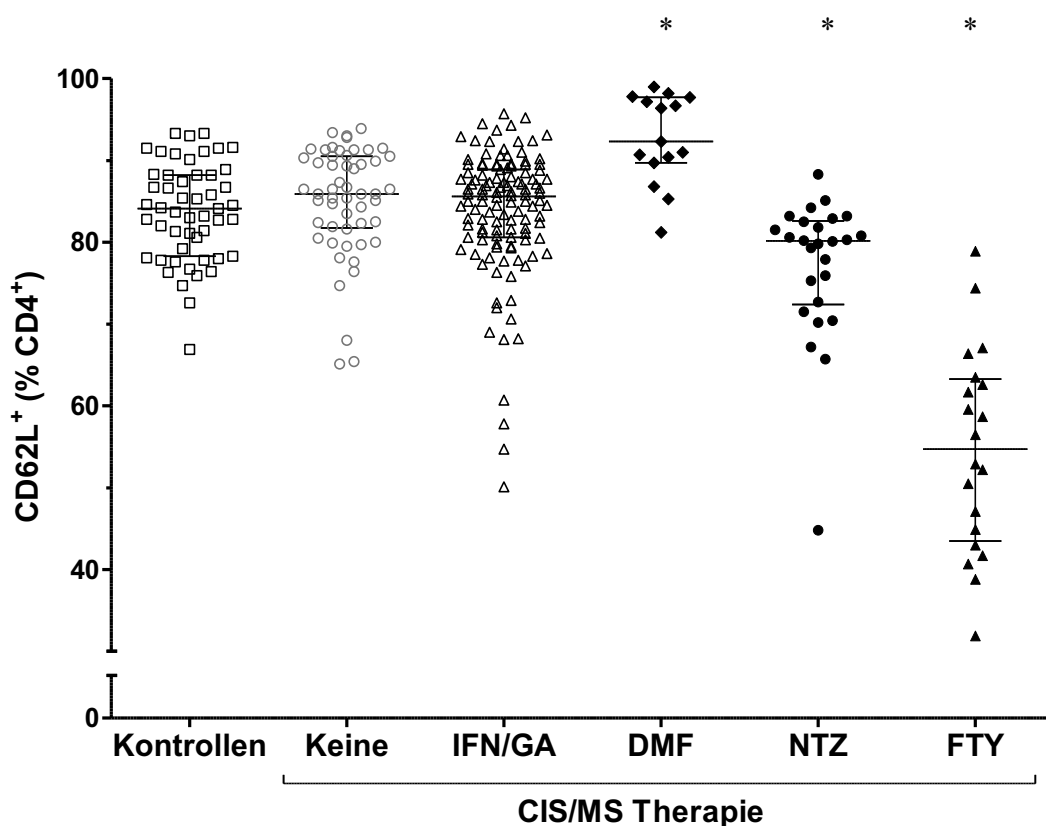
Wenn nicht anders beschrieben, gelten die Daten für den Zeitpunkt der ersten Messung. Werte sind als Nummern (%) oder Median (Interquartil Bereich). Signifikanz ( $p < 0.05$ ) wurde mit dem chi-square Test<sup>a</sup>, Kruskal-Wallis Test<sup>b</sup>, oder Mann-Whitney *U* Test<sup>c</sup> bewertet.

**Tabelle 3:** Demographische und klinische Daten der Probanden/innen und CD62L Expression.

### 3.2 Vergleich der CD62L-Werte zwischen Gesunden und MS Patienten/innen, sowie der verschiedenen Therapien.

Die Expression von CD62L in der gesunden Kontrollgruppe, CIS Patienten/innen und Patienten/innen mit MS waren vergleichbar und ergaben keinen signifikanten Unterschied (**Tabelle 3**). Vergleich man die einzelnen Therapeutika untereinander, konnte eine signifikante Reduktion der CD62L Expression in Patienten/innen, die mit Natalizumab (Median 80.2, IQR 72.7-82.5% CD4<sup>+</sup>) und Fingolimod (Median 54.7, IQR 44.0-63.1 % CD4<sup>+</sup>) behandelt wurden, im Vergleich zu allen anderen Therapieformen und Kontrollen festgestellt werden.

Die CD62L Expression in Patienten/innen welche mit Dimethylfumerat behandelt wurden war signifikant höher (Median 92.3, IQR 89.7-97.7 % CD4<sup>+</sup>), verglichen mit anderen DMTs (Interferon beta/Glatirameracetat,  $n = 120$ ; Median 85.6, IQR 80.6-88.9 % CD4<sup>+</sup>), Patienten/innen ohne Therapie ( $n = 53$ ; Median 85.9, IQR 81.9-90.5 % CD4<sup>+</sup>) und Kontrollen (Multivergleichsmodell  $p < 0.001$ ) (**Abbildung 3**)

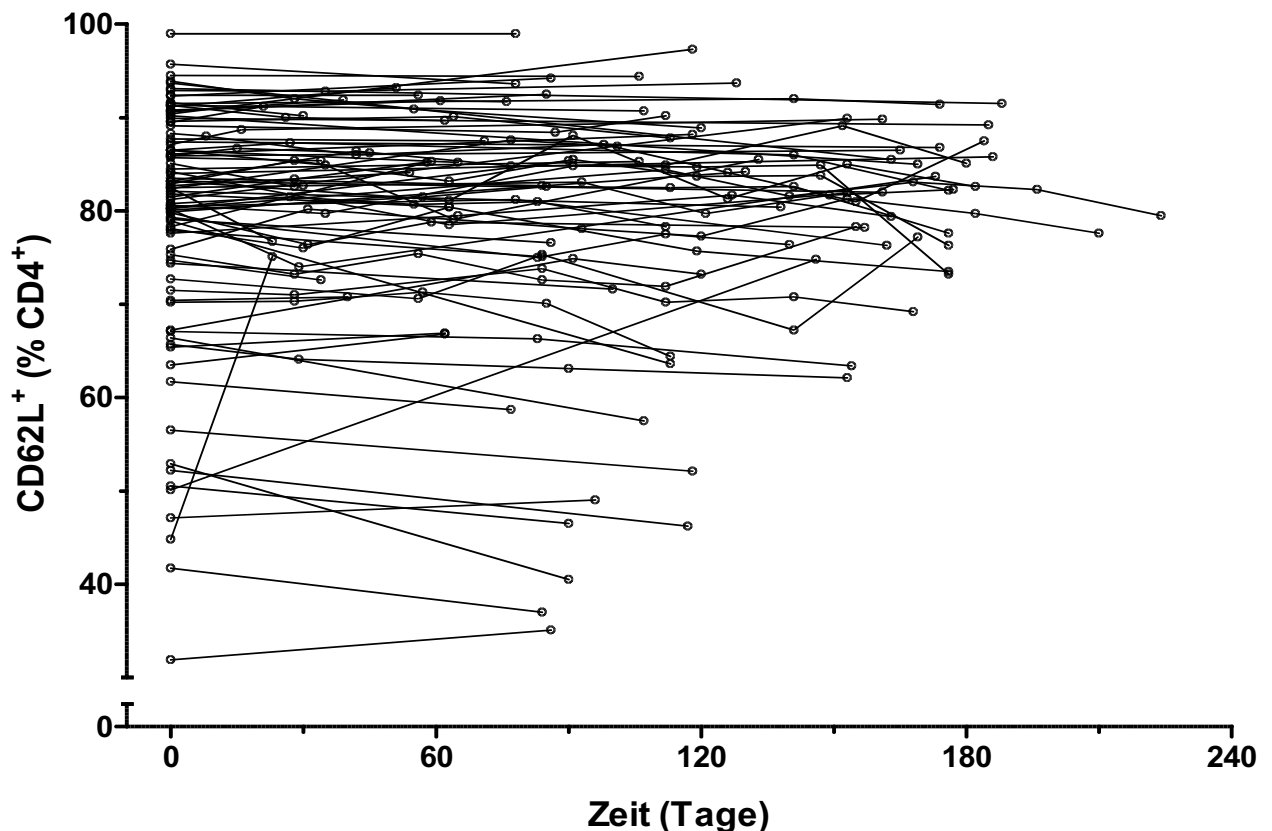


**Abbildung 3:** Vergleich der CD62L Expression in den Therapiegruppen, Kontrollen und Patienten/innen ohne Therapie. DMF = Dimethylfumerat; FTY = Fingolimod; IFN/GA = Interferon beta/Glatirameracetat; NTZ = Natalizumab.

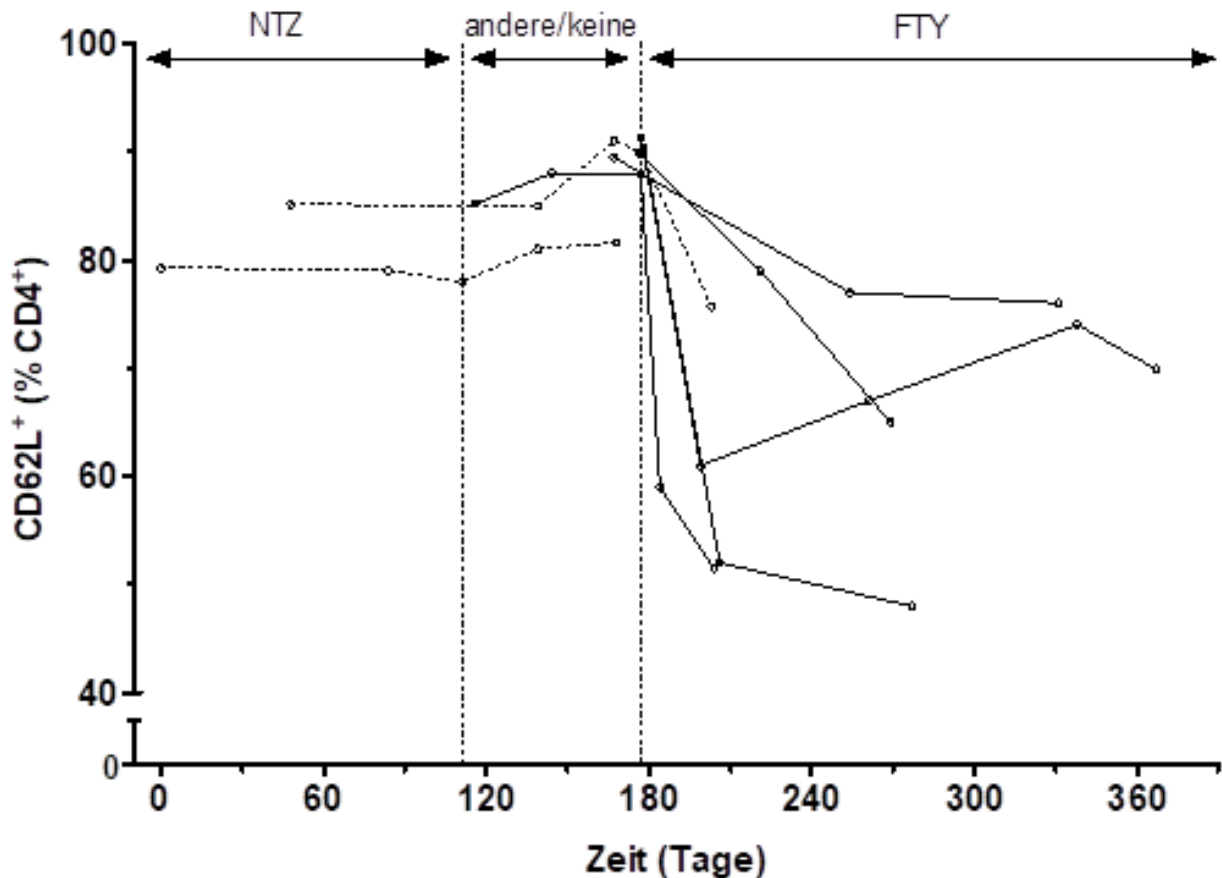
### 3.3 Longitudinale Veränderung der CD62L Expression

In 97 Patienten/innen konnte die Entwicklung der CD62L Expression durch wiederholte Blutentnahmen über einen Zeitraum von Median 113, IQR 78-163 Tagen, mit bis zu 7 Proben, beobachtet werden. Die CD62L Werte zeigt keine signifikante zeitliche Dynamik in allen Patienten/innen und in Patienten/innen die keine Änderung der DMT vornahmen (**Abbildung 4**).

Effekte der Therapieform auf die zeitliche Stabilität der CD62L Expression konnte in Patienten/innen festgestellt werden, die von einer Therapieform auf eine andere wechselten (**Abbildung 5**). In zwei Patienten stieg der CD62L Wert nach Beendigung einer Langzeittherapie mit Natalizumab (5.9 und 6.8 Jahre) wieder an. Ein rascher und wesentlicher Abfall der CD62L Werte konnte bei 6 Patienten/innen nach Therapiestart mit Fingolimod beobachtet werden.



**Abbildung 4:** Zeitliche Dynamik der CD62L Expression in Patienten/innen ohne Therapiewechsel.



**Abbildung 5:** Effekte von Natalizumab und Fingolimod auf longitudinale Veränderung der CD62L Expression. Effekte konnten nach Therapieende mit Natalizumab (n=2, gepunktete Linien) und bei Therapiestart mit Fingolimod (n=6, nach keiner oder anderer Therapie), nachgewiesen werden. In einem Patienten konnte die CD62L Expression nach Therapiewechsel und zweimonatiger Übergangsphase von Natalizumab auf Fingolimod gemessen werden.

### 3.4 Assoziation der CD62L Expression mit demographischen und klinischen Daten

Es konnten keine demographischen Zusammenhänge zwischen Geschlecht oder Alter und der CD62L Expression gefunden werden. Ebenso ergaben sich keine signifikanten Unterschiede in der CD62L Expression unter Berücksichtigung klinischer Daten wie Alter bei Erkrankungsbeginn, Erkrankungsdauer, Therapiedauer, EDSS und der jährlichen Schubrate.

## 4. Diskussion

Wie bereits erwähnt konnte in einigen Forschungsarbeiten ein Zusammenhang zwischen der Entstehung einer PML und einer niedrigen CD62L Expression festgestellt werden. Diese Studien konnten einen verringerten CD62L Wert in prä-PML verglichen mit non-PML Patienten/innen zeigen.(4, 127, 129) Schwab et al., konnten zeigen, dass das Absinken von CD62L unter einen bestimmten Schwellenwert das relative Risiko für die Entstehung einer PML 55-fach erhöht.(127) Die genauen pathophysiologischen Mechanismen wie niedrige L-Selektin Werte zu einer PML beitragen sind jedoch noch nicht geklärt.

Liebermann et al., konnten diesen Zusammenhang in ihrer Arbeit nicht reproduzieren. Zusätzlich konnte eine hohe Variabilität der CD62L Werte in longitudinalen Messungen und ein Absinken der CD62L Werte unter anderen Einflüssen wie Impfungen, Operationen und bakterielle Infektionen beobachtet werden.(130) In einer Subkohorte einer Studie von Schwab et al., in der frische Blutzellen untersucht wurden kein Unterschied in prä-PML Messungen zu Kontrollen festgestellt werden.(127)

Alle bisher erwähnten Studien nutzten für die Messung der CD62L Werte kryokonservierte und anschließend wieder aufgetaute PBMCs. Bereits in der ersten Arbeit zu diesem Thema durch Schwab et al., konnte gezeigt werden, dass dieser Einfrier- und Auftauzyklus einen Einfluss auf die Expression von CD62L, im Vergleich zu frischen Blutzellen hat.(4)

Zwei Studien postulieren daher, dass ein erniedrigter L-Selektin Wert nur ein Indikator für Immunzellstress und reduzierte zelluläre Integrität auf Grund des Einfrier- und Auftauzyklus ist.(127, 130)

Ebenso scheint die Methodik der Verarbeitung und die Zeitpunkte der Messungen entscheidenden Einfluss auf die CD62L Werte und ihren prädiktiven Wert zu haben (127-129)

Das Ziel dieser Arbeit war es, das Verhalten der CD62L Werte in frisch gewonnenem Blut, ohne vorhergehende Kryokonservation, von MS Patienten/innen unter

verschiedenen Therapeutika, mittels einfach reproduzierbaren Messungen, zu untersuchen.

Um eventuelle präanalytische Fehler zu vermeiden, wurden alle Proben innerhalb einer Stunde mittels FACS-Analyse ausgewertet und das benutzte Protokoll könnte leicht in die klinische Praxis implementiert werden.

Wir konnten in unserer Arbeit zeigen, dass das Verhalten der CD62L Werte in frisch isolierten PBMCs, der der Kryokonservierten aus anderen Arbeiten (4, 127-129) ähnlich ist. Wir beobachteten eine signifikante Erniedrigung der L-Selektin Expression in frischen CD3+CD4+ PMBCs bei Patienten/innen, die mit Natalizumab oder Fingolimod behandelt wurden, verglichen mit anderen Therapieformen, keiner Therapie und der gesunden Kontrollgruppe. Diese Ergebnisse sind vergleichbar mit jenen aus den vorher beschriebenen Studien an kryokonservierten PBMCs.(4, 127, 128) Weiters konnten wir eine, bisher in der Literatur nicht beschriebene, Erhöhung der CD62L Expression unter Therapie mit Dimethylfumerat feststellen.

Die Mechanismen wie DMTs zu Änderungen der L-Selektin Expression führen sind noch nicht verstanden. Die niedrigen Werte bei Patienten/innen unter Fingolimod Therapie könnten sich durch den Wirkmechanismus der Therapie erklären. Fingolimod führt zu einer Segregation von Lymphozyten in Lymphknoten und hemmt den Übertritt ins Blut, was eine Erklärung für das Fehlen von CD62LCD4+ T Lymphozyten im Blut sein könnte.(128) Gegen diesen Erklärungsversuch spricht aber, dass in dieser Arbeit der prozentuelle Anteil und nicht der absolute der CD62L Expression gemessen wurde.

Vergleicht man die CD62L Werte dieser Arbeit mit den Werten anderer Studien, fällt eine große Diskrepanz auf. Die L-Selektin Werte aus kryokonservierten Proben liegen je nach Studie bei der Kontrollgruppe bei 61% (4), 46.75%±9.80% (128) und 45.85%±13.59% (127) verglichen mit 84.10% in dieser Studie. Die Expression in Patienten/innen, welche mit Natalizumab oder Fingolimod therapiert wurden verhält sich ähnlich. In kryokonservierten Proben zeigt sich eine weitaus geringere Expression von CD62L als in frischen PBMCs. Natalizumab: 40.20% (4), 33.68%±

12.70% (128), 27.50% und 20.90% (130) zu 80.20%. Fingolimod: 28.76% $\pm$ 11.42% (128) zu 54.70%.

Spadaro et al. konnten in einer Subkohorte von Patienten mit Natalizumab, eine ähnlich hohe Expression von CD62L, in frischen Blutproben, zeigen.(128)

Der Grund für die Differenz in der Expression von L-Selektin liegt in der Verarbeitung der Proben. Die Kryokonservierung beeinflusst einerseits die CD62L Expression an sich negativ (132), andererseits kommt es dadurch zu einer geringeren Lebensfähigkeit der Lymphozyten, was die Expression der geschädigten Lymphozyten, aber auch der nicht geschädigten Lymphozyten herabsetzt.(130) Weitere Gründe für die differierenden Werte, auch zwischen den Studien mit kryokonservierten Proben, ist die unterschiedliche präanalytische Verarbeitung der Proben (127) sowie der Zeitpunkt der Messung und Probengewinnung.(129)

Pignolet et al. konnten im direkten Vergleich zeigen, dass die Lagerdauer nach dem Auftauen einen Einfluss auf die CD62L Expression hat. Eine direkte Analyse nach dem Auftauen zeigte einen L-Selektin Wert von 38.7% verglichen mit einem Wert von 21.8% nach einer 18 stündigen Lagerung. Ebenso wurde beobachtet, dass in dieser Kohorte kein Zusammenhang zwischen der zellulären Integrität und der CD62L Expression besteht.(129)

Die longitudinale Beobachtung der Werte zeigte keine signifikante zeitliche Dynamik der CD62L Expression in Patienten/innen ohne Therapie und jenen die ihre Therapieform nicht änderten. Longitudinale Daten standen von 97 Patienten/innen mit bis zu 7 Messwerten pro Patient/in zu Verfügung, während einer mittleren Follow-up Zeit von 9.5 Monaten. Bisher wurde die zeitliche Stabilität der L-Selektin Expression in mit Natalizumab therapierten Patienten/innen nachgewiesen.(4)

Spadaro et al. konnten zeigen, dass die CD62L Werte, innerhalb von 3 Messungen mit je 4 Monaten Abstand, vom Ersten zum zweiten Messwert signifikant abnahmen und anschließend stabil blieben, wobei bei 3% der longitudinal getesteten Patienten/innen je ein Wert unterhalb eines empirisch festgelegten Grenzwertes zur PML Risikoabschätzung lag.(128) Pignolet et al. konnten einen allgemeinen zeitlichen Trend der CD62L Expression in Abhängigkeit der Anzahl an Natalizumabinfusionen feststellen. Einer Abnahme des L-Selektin Wertes in den

ersten beiden Jahren einer Therapie mit Natalizumab, folgte eine stetige Wiederzunahme der Expression.(129) Liebermann et al. schlussfolgerten in ihrer Arbeit, dass die CD62L Expression longitudinal gemessen kein stabiler Parameter ist.(130)

Zusätzlich konnten wir in einer kleinen Subkohorte den hemmenden Einfluss von Natalizumab und Fingolimod auf die CD62L Expression in CD3+CD4+ PBMCs zeigen. Die Patienten/innen dieser Subkohorte änderten während des Zeitraums der longitudinalen Datensammlung ihre Therapieform. Die Messungen nach Absetzen einer Natalizumabtherapie zeigten eine Erholung und Wiederanstieg der L-Selektin Expression, wohingegen man nach Therapieeinleitung mit Fingolimod einen Einbruch der CD62L Werte beobachten konnte. Ein ähnliches Verhalten konnte in Studien durch Spadaro et al. an kryokonservierten und durch Cobo-Calvo et al. an CD4+ und CD8+ PBMCs aus frischen Blutproben festgestellt werden.(128, 133)

Zusammengefasst konnten wir zeigen, dass auch in frisch gewonnenen Blutproben signifikante Veränderungen der CD62L Expression von CD3+CD4+ PBMC unter verschiedenen MS Therapeutika nachzuweisen sind. Weiter fanden wir eine stabile zeitliche Dynamik der Expression. Die Messungen wurden ohne fehleranfällige präanalytische Arbeitsschritte, mit einem leicht zugänglichem Verfahren und einem Protokoll welches leicht in den klinischen Alltag implementiert werden könnte, durchgeführt.

Die klinische Bedeutung der beobachteten Effekte von Natalizumab, Fingolimod und Dimethylfumerat auf die L-Selektin Expression, wird in dieser Arbeit offen gelassen. Auf Grund der geringen Inzidenzzahlen der PML konnte in dieser Single-center Studie kein klinischer Zusammenhang mit PML getestet werden. Allerdings stellen die Ergebnisse und die vereinfachte Durchführung der Messung eine gute Basis für weitere Forschung zur Beantwortung dieser Fragestellung dar.

Die Ähnlichkeit der Resultate mit den Ergebnissen aus Studien mit kryokonservierten Proben lässt jedoch trotzdem einen Zusammenhang zwischen dem Absinken und der Entstehung einer PML implizieren. Aus diesem Grund ist es nötig die Expression von CD62L, in frischen PBMCs und prospektiven longitudinalen Studien mit PML Patienten/innen weiter zu untersuchen, ob CD62L als Biomarker zu

Risikoeinschätzung von Therapienebenwirkungen der DMTs in Multipler Sklerose, aber auch als möglicher Marker für die Therapiewirksamkeit oder Krankheitsaktivität geeignet ist. Weiter wird zu testen sein, ob auch noch andere Assoziationen, neben der PML, mit klinischen Daten in Langzeitverlauf bestehen.

## Literaturverzeichnis

1. Voortman MM, Geiner P, Moser D, Stradner M.H, Graninger W, Moser A, Haditsch B, Enzinger C, Fuchs S, Fazekas F, Fessler J, Khalil M. The effect of disease modifying therapies on CD62L expression in multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis Journal*. 2018; 34<sup>th</sup>ECTRIMS (European Committee for Treatment and Research of Multiple Sclerosis) Meeting ; OCT 10-12, 2018; Berlin, GERMANY. [Poster] .
2. Lassmann H, Bruck W, Lucchinetti C. Heterogeneity of multiple sclerosis pathogenesis: implications for diagnosis and therapy. *Trends in molecular medicine*. 2001;7(3):115-21.
3. Hegen H, Auer M, Deisenhammer F. Predictors of Response to Multiple Sclerosis Therapeutics in Individual Patients. *Drugs*. 2016;76(15):1421-45.
4. Schwab N, Schneider-Hohendorf T, Posevitz V, Breuer J, Gobel K, Windhagen S, et al. L-selectin is a possible biomarker for individual PML risk in natalizumab-treated MS patients. *Neurology*. 2013;81(10):865-71.
5. Baumhackl U, Eibl G, Ganzinger U, Hartung HP, Mamoli B, Pfeiffer KP, et al. Prevalence of multiple sclerosis in Austria. Results of a nationwide survey. *Neuroepidemiology*. 2002;21(5):226-34.
6. Kurtzke JF. Multiple sclerosis in time and space--geographic clues to cause. *Journal of neurovirology*. 2000;6 Suppl 2:S134-40.
7. Koch-Henriksen N, Sorensen PS. The changing demographic pattern of multiple sclerosis epidemiology. *The Lancet Neurology*. 2010;9(5):520-32.
8. Poser CM. Viking voyages: the origin of multiple sclerosis? An essay in medical history. *Acta neurologica Scandinavica Supplementum*. 1995;161:11-22.
9. Kantarci O, Wingerchuk D. Epidemiology and natural history of multiple sclerosis: new insights. *Current opinion in neurology*. 2006;19(3):248-54.

10. Ascherio A, Munger KL. Epidemiology of Multiple Sclerosis: From Risk Factors to Prevention-An Update. *Seminars in neurology*. 2016;36(2):103-14.
11. Hauser SL, Oksenberg JR. The neurobiology of multiple sclerosis: genes, inflammation, and neurodegeneration. *Neuron*. 2006;52(1):61-76.
12. Robertson NP, Fraser M, Deans J, Clayton D, Walker N, Compston DA. Age-adjusted recurrence risks for relatives of patients with multiple sclerosis. *Brain : a journal of neurology*. 1996;119 ( Pt 2):449-55.
13. Dymnt DA, Ebers GC, Sadovnick AD. Genetics of multiple sclerosis. *The Lancet Neurology*. 2004;3(2):104-10.
14. Oksenberg JR, Barcellos LF. Multiple sclerosis genetics: leaving no stone unturned. *Genes and immunity*. 2005;6(5):375-87.
15. Kurtzke JF. A reassessment of the distribution of multiple sclerosis. Part one. *Acta neurologica Scandinavica*. 1975;51(2):110-36.
16. Dean G, Kurtzke JF. On the risk of multiple sclerosis according to age at immigration to South Africa. *British medical journal*. 1971;3(5777):725-9.
17. Alter M, Halpern L, Kurland LT, Bornstein B, Leibowitz U, Silberstein J. Multiple sclerosis in Israel. Prevalence among immigrants and native inhabitants. *Archives of neurology*. 1962;7:253-63.
18. Detels R, Visscher BR, Malmgren RM, Coulson AH, Lucia MV, Dudley JP. Evidence for lower susceptibility to multiple sclerosis in Japanese-Americans. *American journal of epidemiology*. 1977;105(4):303-10.
19. Elian M, Nightingale S, Dean G. Multiple sclerosis among United Kingdom-born children of immigrants from the Indian subcontinent, Africa and the West Indies. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*. 1990;53(10):906-11.

20. Compston A, Coles A. Multiple sclerosis. *Lancet* (London, England). 2008;372(9648):1502-17.
21. Goldberg P. Multiple sclerosis: vitamin D and calcium as environmental determinants of prevalence. *International Journal of Environmental Studies*. 1974;6(1):19-27.
22. Munger KL, Levin LI, Hollis BW, Howard NS, Ascherio A. Serum 25-hydroxyvitamin D levels and risk of multiple sclerosis. *Jama*. 2006;296(23):2832-8.
23. Rhead B, Baarnhielm M, Gianfrancesco M, Mok A, Shao X, Quach H, et al. Mendelian randomization shows a causal effect of low vitamin D on multiple sclerosis risk. *Neurology Genetics*. 2016;2(5):e97.
24. Simpson S, Jr., Taylor B, Blizzard L, Ponsonby AL, Pittas F, Tremlett H, et al. Higher 25-hydroxyvitamin D is associated with lower relapse risk in multiple sclerosis. *Annals of neurology*. 2010;68(2):193-203.
25. Martinelli V, Dalla Costa G, Colombo B, Dalla Libera D, Rubinacci A, Filippi M, et al. Vitamin D levels and risk of multiple sclerosis in patients with clinically isolated syndromes. *Multiple sclerosis* (Houndmills, Basingstoke, England). 2014;20(2):147-55.
26. Leibowitz U, Antonovsky A, Medalie JM, Smith HA, Halpern L, Alter M. Epidemiological study of multiple sclerosis in Israel. II. Multiple sclerosis and level of sanitation. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*. 1966;29(1):60-8.
27. Thacker EL, Mirzaei F, Ascherio A. Infectious mononucleosis and risk for multiple sclerosis: a meta-analysis. *Annals of neurology*. 2006;59(3):499-503.
28. Ascherio A, Munger KL. 99th Dahlem conference on infection, inflammation and chronic inflammatory disorders: Epstein-Barr virus and multiple sclerosis: epidemiological evidence. *Clinical and experimental immunology*. 2010;160(1):120-4.

29. Ascherio A, Munger KL. Environmental risk factors for multiple sclerosis. Part I: the role of infection. *Annals of neurology*. 2007;61(4):288-99.
30. Hedstrom AK, Hillert J, Olsson T, Alfredsson L. Nicotine might have a protective effect in the etiology of multiple sclerosis. *Multiple sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)*. 2013;19(8):1009-13.
31. Mahad DH, Trapp BD, Lassmann H. Pathological mechanisms in progressive multiple sclerosis. *The Lancet Neurology*. 2015;14(2):183-93.
32. Lassmann H. Pathology and disease mechanisms in different stages of multiple sclerosis. *Journal of the neurological sciences*. 2013;333(1-2):1-4.
33. Dendrou CA, Fugger L, Friese MA. Immunopathology of multiple sclerosis. *Nature reviews Immunology*. 2015;15(9):545-58.
34. Grigoriadis N, van Pesch V. A basic overview of multiple sclerosis immunopathology. *European journal of neurology*. 2015;22 Suppl 2:3-13.
35. Hohlfeld R, Wekerle H. Autoimmune concepts of multiple sclerosis as a basis for selective immunotherapy: from pipe dreams to (therapeutic) pipelines. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004;101 Suppl 2:14599-606.
36. Comabella M, Khoury SJ. Immunopathogenesis of multiple sclerosis. *Clinical immunology (Orlando, Fla)*. 2012;142(1):2-8.
37. van Horssen J, Singh S, van der Pol S, Kipp M, Lim JL, Peferoen L, et al. Clusters of activated microglia in normal-appearing white matter show signs of innate immune activation. *Journal of neuroinflammation*. 2012;9:156.
38. Munz C, Lunemann JD, Getts MT, Miller SD. Antiviral immune responses: triggers of or triggered by autoimmunity? *Nature reviews Immunology*. 2009;9(4):246-58.

39. Hemmer B, Kerschensteiner M, Korn T. Role of the innate and adaptive immune responses in the course of multiple sclerosis. *The Lancet Neurology*. 2015;14(4):406-19.
40. Haider L, Zrzavy T, Hametner S, Hoftberger R, Bagnato F, Grabner G, et al. The topography of demyelination and neurodegeneration in the multiple sclerosis brain. *Brain : a journal of neurology*. 2016;139(Pt 3):807-15.
41. Brucklacher-Waldert V, Stuermer K, Kolster M, Wolthausen J, Tolosa E. Phenotypical and functional characterization of T helper 17 cells in multiple sclerosis. *Brain : a journal of neurology*. 2009;132(Pt 12):3329-41.
42. Komiyama Y, Nakae S, Matsuki T, Nambu A, Ishigame H, Kakuta S, et al. IL-17 plays an important role in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of immunology*. 2006;177(1):566-73.
43. Bitsch A, Schuchardt J, Bunkowski S, Kuhlmann T, Bruck W. Acute axonal injury in multiple sclerosis. Correlation with demyelination and inflammation. *Brain : a journal of neurology*. 2000;123 ( Pt 6):1174-83.
44. Cunnusamy K, Baughman EJ, Franco J, Ortega SB, Sinha S, Chaudhary P, et al. Disease exacerbation of multiple sclerosis is characterized by loss of terminally differentiated autoregulatory CD8+ T cells. *Clinical immunology (Orlando, Fla)*. 2014;152(1-2):115-26.
45. Fischer MT, Sharma R, Lim JL, Haider L, Frischer JM, Drexhage J, et al. NADPH oxidase expression in active multiple sclerosis lesions in relation to oxidative tissue damage and mitochondrial injury. *Brain : a journal of neurology*. 2012;135(Pt 3):886-99.
46. Lucchinetti CF, Popescu BF, Bunyan RF, Moll NM, Roemer SF, Lassmann H, et al. Inflammatory cortical demyelination in early multiple sclerosis. *The New England journal of medicine*. 2011;365(23):2188-97.

47. Narayanan S, De Stefano N, Francis GS, Arnaoutelis R, Caramanos Z, Collins DL, et al. Axonal metabolic recovery in multiple sclerosis patients treated with interferon beta-1b. *Journal of neurology*. 2001;248(11):979-86.
48. Murphy MP. How mitochondria produce reactive oxygen species. *The Biochemical journal*. 2009;417(1):1-13.
49. Bjartmar C, Wujek JR, Trapp BD. Axonal loss in the pathology of MS: consequences for understanding the progressive phase of the disease. *Journal of the neurological sciences*. 2003;206(2):165-71.
50. Kutzelnigg A, Lucchinetti CF, Stadelmann C, Bruck W, Rauschka H, Bergmann M, et al. Cortical demyelination and diffuse white matter injury in multiple sclerosis. *Brain : a journal of neurology*. 2005;128(Pt 11):2705-12.
51. Hametner S, Wimmer I, Haider L, Pfeifenbring S, Bruck W, Lassmann H. Iron and neurodegeneration in the multiple sclerosis brain. *Annals of neurology*. 2013;74(6):848-61.
52. Vollmer T. The natural history of relapses in multiple sclerosis. *Journal of the neurological sciences*. 2007;256 Suppl 1:S5-13.
53. Deutsche Gesellschaft für Neurologie. Diagnose und Therapie der Multiplen Sklerose. 2014:1-52.
54. Compston A, Coles A. Multiple sclerosis. *Lancet (London, England)*. 2002;359(9313):1221-31.
55. Brownlee WJ, Hardy TA, Fazekas F, Miller DH. Diagnosis of multiple sclerosis: progress and challenges. *Lancet (London, England)*. 2017;389(10076):1336-46.
56. Noseworthy JH, Lucchinetti C, Rodriguez M, Weinshenker BG. Multiple sclerosis. *The New England journal of medicine*. 2000;343(13):938-52.

57. Miller D, Barkhof F, Montalban X, Thompson A, Filippi M. Clinically isolated syndromes suggestive of multiple sclerosis, part I: natural history, pathogenesis, diagnosis, and prognosis. *The Lancet Neurology*. 2005;4(5):281-8.
58. Miller DH, Chard DT, Ciccarelli O. Clinically isolated syndromes. *The Lancet Neurology*. 2012;11(2):157-69.
59. Kuhle J, Disanto G, Dobson R, Adiatori R, Bianchi L, Topping J, et al. Conversion from clinically isolated syndrome to multiple sclerosis: A large multicentre study. *Multiple sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)*. 2015;21(8):1013-24.
60. Lublin FD, Reingold SC, Cohen JA, Cutter GR, Sorensen PS, Thompson AJ, et al. Defining the clinical course of multiple sclerosis: the 2013 revisions. *Neurology*. 2014;83(3):278-86.
61. Kalincik T, Vivek V, Jokubaitis V, Lechner-Scott J, Trojano M, Izquierdo G, et al. Sex as a determinant of relapse incidence and progressive course of multiple sclerosis. *Brain : a journal of neurology*. 2013;136(Pt 12):3609-17.
62. Lublin FD, Reingold SC. Defining the clinical course of multiple sclerosis: results of an international survey. National Multiple Sclerosis Society (USA) Advisory Committee on Clinical Trials of New Agents in Multiple Sclerosis. *Neurology*. 1996;46(4):907-11.
63. Miller DH, Leary SM. Primary-progressive multiple sclerosis. *The Lancet Neurology*. 2007;6(10):903-12.
64. Schweizerische Multiple Sklerose Gesellschaft.  
<https://www.multiplesklerose.ch/de/ueber-ms/multiple-sklerose/verlauf/>
65. Polman CH, Reingold SC, Banwell B, Clanet M, Cohen JA, Filippi M, et al. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the McDonald criteria. *Annals of neurology*. 2011;69(2):292-302.

66. Thompson AJ, Banwell BL, Barkhof F, Carroll WM, Coetzee T, Comi G, et al. Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria. *The Lancet Neurology*. 2018;17(2):162-73.
67. Brownlee WJ, Swanton JK, Altmann DR, Ciccarelli O, Miller DH. Earlier and more frequent diagnosis of multiple sclerosis using the McDonald criteria. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*. 2015;86(5):584-5.
68. Kurtzke JF. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). *Neurology*. 1983;33(11):1444-52.
69. Meyer-Moock S, Feng YS, Maeurer M, Dippel FW, Kohlmann T. Systematic literature review and validity evaluation of the Expanded Disability Status Scale (EDSS) and the Multiple Sclerosis Functional Composite (MSFC) in patients with multiple sclerosis. *BMC neurology*. 2014;14:58.
70. Filippi M, Rocca MA, Bastianello S, Comi G, Gallo P, Gallucci M, et al. Guidelines from The Italian Neurological and Neuroradiological Societies for the use of magnetic resonance imaging in daily life clinical practice of multiple sclerosis patients. *Neurological sciences : official journal of the Italian Neurological Society and of the Italian Society of Clinical Neurophysiology*. 2013;34(12):2085-93.
71. Liu S, Kullnat J, Bourdette D, Simon J, Kraemer DF, Murchison C, et al. Prevalence of brain magnetic resonance imaging meeting Barkhof and McDonald criteria for dissemination in space among headache patients. *Multiple sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)*. 2013;19(8):1101-5.
72. Filippi M, Rocca MA, Ciccarelli O, De Stefano N, Evangelou N, Kappos L, et al. MRI criteria for the diagnosis of multiple sclerosis: MAGNIMS consensus guidelines. *The Lancet Neurology*. 2016;15(3):292-303.
73. Freedman MS, Thompson EJ, Deisenhammer F, Giovannoni G, Grimsley G, Keir G, et al. Recommended standard of cerebrospinal fluid analysis in the diagnosis of multiple sclerosis: a consensus statement. *Archives of neurology*. 2005;62(6):865-70.

74. Sandberg-Wollheim M, Olsson T. Cerebrospinal fluid oligoclonal bands are important in the diagnosis of multiple sclerosis, unreasonably downplayed by the McDonald criteria 2010: Yes. *Multiple sclerosis* (Houndmills, Basingstoke, England). 2013;19(6):714-6.
75. Hutchinson M. CSF oligoclonal bands are important in the diagnosis of multiple sclerosis, unreasonably downplayed by the McDonald criteria 2010: Commentary. *Multiple sclerosis* (Houndmills, Basingstoke, England). 2013;19(6):719-20.
76. Tur C, Montalban X. CSF oligoclonal bands are important in the diagnosis of multiple sclerosis, unreasonably downplayed by the McDonald criteria 2010: No. *Multiple sclerosis* (Houndmills, Basingstoke, England). 2013;19(6):717-8.
77. Miller DH, Weinshenker BG, Filippi M, Banwell BL, Cohen JA, Freedman MS, et al. Differential diagnosis of suspected multiple sclerosis: a consensus approach. *Multiple sclerosis* (Houndmills, Basingstoke, England). 2008;14(9):1157-74.
78. Rudick RA, Cohen JA, Weinstock-Guttman B, Kinkel RP, Ransohoff RM. Management of multiple sclerosis. *The New England journal of medicine*. 1997;337(22):1604-11.
79. Keegan M, Konig F, McClelland R, Bruck W, Morales Y, Bitsch A, et al. Relation between humoral pathological changes in multiple sclerosis and response to therapeutic plasma exchange. *Lancet* (London, England). 2005;366(9485):579-82.
80. Jacobs LD, Beck RW, Simon JH, Kinkel RP, Brownschidle CM, Murray TJ, et al. Intramuscular interferon beta-1a therapy initiated during a first demyelinating event in multiple sclerosis. CHAMPS Study Group. *The New England journal of medicine*. 2000;343(13):898-904.
81. Comi G, Filippi M, Barkhof F, Durelli L, Edan G, Fernandez O, et al. Effect of early interferon treatment on conversion to definite multiple sclerosis: a randomised study. *Lancet* (London, England). 2001;357(9268):1576-82.

82. Kappos L, Polman CH, Freedman MS, Edan G, Hartung HP, Miller DH, et al. Treatment with interferon beta-1b delays conversion to clinically definite and McDonald MS in patients with clinically isolated syndromes. *Neurology*. 2006;67(7):1242-9.
83. Comi G, Martinelli V, Rodegher M, Moiola L, Bajenaru O, Carra A, et al. Effect of glatiramer acetate on conversion to clinically definite multiple sclerosis in patients with clinically isolated syndrome (PreCISe study): a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet (London, England)*. 2009;374(9700):1503-11.
84. Comi G, De Stefano N, Freedman MS, Barkhof F, Polman CH, Uitdehaag BM, et al. Comparison of two dosing frequencies of subcutaneous interferon beta-1a in patients with a first clinical demyelinating event suggestive of multiple sclerosis (REFLEX): a phase 3 randomised controlled trial. *The Lancet Neurology*. 2012;11(1):33-41.
85. Freedman MS, Comi G, De Stefano N, Barkhof F, Polman CH, Uitdehaag BM, et al. Moving toward earlier treatment of multiple sclerosis: Findings from a decade of clinical trials and implications for clinical practice. *Multiple sclerosis and related disorders*. 2014;3(2):147-55.
86. Calabresi PA, Kieseier BC, Arnold DL, Balcer LJ, Boyko A, Pelletier J, et al. Pegylated interferon beta-1a for relapsing-remitting multiple sclerosis (ADVANCE): a randomised, phase 3, double-blind study. *The Lancet Neurology*. 2014;13(7):657-65.
87. Leist TP, Weissert R. Cladribine: mode of action and implications for treatment of multiple sclerosis. *Clinical neuropharmacology*. 2011;34(1):28-35.
88. Leist TP, Comi G, Cree BA, Coyle PK, Freedman MS, Hartung HP, et al. Effect of oral cladribine on time to conversion to clinically definite multiple sclerosis in patients with a first demyelinating event (ORACLE MS): a phase 3 randomised trial. *The Lancet Neurology*. 2014;13(3):257-67.

89. Montalban X, Leist TP, Cohen BA, Moses H, Campbell J, Hicking C, et al. Cladribine tablets added to IFN-beta in active relapsing MS: The ONWARD study. *Neurology® neuroimmunology & neuroinflammation*. 2018;5(5):e477.
90. Correale J, Gaitan MI, Ysraelit MC, Fiol MP. Progressive multiple sclerosis: from pathogenic mechanisms to treatment. *Brain : a journal of neurology*. 2017;140(3):527-46.
91. Montalban X, Hauser SL, Kappos L, Arnold DL, Bar-Or A, Comi G, et al. Ocrelizumab versus Placebo in Primary Progressive Multiple Sclerosis. *The New England journal of medicine*. 2017;376(3):209-20.
92. Hauser SL, Bar-Or A, Comi G, Giovannoni G, Hartung HP, Hemmer B, et al. Ocrelizumab versus Interferon Beta-1a in Relapsing Multiple Sclerosis. *The New England journal of medicine*. 2017;376(3):221-34.
93. Wingerchuk DM, Weinshenker BG. Disease modifying therapies for relapsing multiple sclerosis. *BMJ (Clinical research ed)*. 2016;354:i3518.
94. Clifford DB. Progressive multifocal leukoencephalopathy therapy. *Journal of neurovirology*. 2015;21(6):632-6.
95. Tan CS. Beyond progressive multifocal leukoencephalopathy: expanded pathogenesis of JC virus infection in the central nervous system. 2010;9(4):425-37.
96. Langer-Gould A, Atlas SW, Green AJ, Bollen AW, Pelletier D. Progressive multifocal leukoencephalopathy in a patient treated with natalizumab. *The New England journal of medicine*. 2005;353(4):375-81.
97. Van Assche G, Van Ranst M, Sciot R, Dubois B, Vermeire S, Noman M, et al. Progressive multifocal leukoencephalopathy after natalizumab therapy for Crohn's disease. *The New England journal of medicine*. 2005;353(4):362-8.

98. Korman BD, Tyler KL, Korman NJ. Progressive multifocal leukoencephalopathy, efalizumab, and immunosuppression: a cautionary tale for dermatologists. *Archives of dermatology*. 2009;145(8):937-42.
99. Carson KR, Evens AM, Richey EA, Habermann TM, Focosi D, Seymour JF, et al. Progressive multifocal leukoencephalopathy after rituximab therapy in HIV-negative patients: a report of 57 cases from the Research on Adverse Drug Events and Reports project. *Blood*. 2009;113(20):4834-40.
100. Ferenczy MW, Marshall LJ, Nelson CD, Atwood WJ, Nath A, Khalili K, et al. Molecular biology, epidemiology, and pathogenesis of progressive multifocal leukoencephalopathy, the JC virus-induced demyelinating disease of the human brain. *Clinical microbiology reviews*. 2012;25(3):471-506.
101. Berger JR, Aksamit AJ, Clifford DB, Davis L, Koralnik IJ, Sejvar JJ, et al. PML diagnostic criteria: consensus statement from the AAN Neuroinfectious Disease Section. *Neurology*. 2013;80(15):1430-8.
102. Maas RP, Muller-Hansma AH, Esselink RA, Murk JL, Warnke C, Killestein J, et al. Drug-associated progressive multifocal leukoencephalopathy: a clinical, radiological, and cerebrospinal fluid analysis of 326 cases. *Journal of neurology*. 2016;263(10):2004-21.
103. Marshall LJ, Major EO. Molecular regulation of JC virus tropism: insights into potential therapeutic targets for progressive multifocal leukoencephalopathy. *Journal of neuroimmune pharmacology : the official journal of the Society on NeuroImmune Pharmacology*. 2010;5(3):404-17.
104. Polman CH, O'Connor PW, Havrdova E, Hutchinson M, Kappos L, Miller DH, et al. A randomized, placebo-controlled trial of natalizumab for relapsing multiple sclerosis. *The New England journal of medicine*. 2006;354(9):899-910.
105. Biogen. TYSABRI® (natalizumab): PML in patients receiving TYSABRI (USA TYSABRI PML Update). 2017.

106. Berger JR, Cree BA, Greenberg B, Hemmer B, Ward BJ, Dong VM, et al. Progressive multifocal leukoencephalopathy after fingolimod treatment. *Neurology*. 2018;90(20):e1815-e21.
107. Rosenkranz T, Novas M, Terborg C. PML in a patient with lymphocytopenia treated with dimethyl fumarate. *The New England journal of medicine*. 2015;372(15):1476-8.
108. Levin SN, Kaplan TB. Infectious Complications of Novel Multiple Sclerosis Therapies. *Current infectious disease reports*. 2017;19(2):7.
109. Bloomgren G, Richman S, Hotermans C, Subramanyam M, Goelz S, Natarajan A, et al. Risk of natalizumab-associated progressive multifocal leukoencephalopathy. *The New England journal of medicine*. 2012;366(20):1870-80.
110. McGuigan C, Craner M, Guadagno J, Kapoor R, Mazibrada G, Molyneux P, et al. Stratification and monitoring of natalizumab-associated progressive multifocal leukoencephalopathy risk: recommendations from an expert group. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*. 2016;87(2):117-25.
111. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clinical pharmacology and therapeutics*. 2001;69(3):89-95.
112. Comabella M, Montalban X. Body fluid biomarkers in multiple sclerosis. *The Lancet Neurology*. 2014;13(1):113-26.
113. Raphael I, Webb J, Stuve O, Haskins W, Forsthuber T. Body fluid biomarkers in multiple sclerosis: how far we have come and how they could affect the clinic now and in the future. *Expert review of clinical immunology*. 2015;11(1):69-91.
114. Major EO. Progressive multifocal leukoencephalopathy in patients on immunomodulatory therapies. *Annual review of medicine*. 2010;61:35-47.

115. Hunt D, Giovannoni G. Natalizumab-associated progressive multifocal leucoencephalopathy: a practical approach to risk profiling and monitoring. *Practical neurology*. 2012;12(1):25-35.
116. Lee P, Plavina T, Castro A, Berman M, Jaiswal D, Rivas S, et al. A second-generation ELISA (STRATIFY JCV DxSelect) for detection of JC virus antibodies in human serum and plasma to support progressive multifocal leucoencephalopathy risk stratification. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*. 2013;57(2):141-6.
117. Plavina T, Subramanyam M, Bloomgren G, Richman S, Pace A, Lee S, et al. Anti-JC virus antibody levels in serum or plasma further define risk of natalizumab-associated progressive multifocal leucoencephalopathy. *Annals of neurology*. 2014;76(6):802-12.
118. Antonioli C, Stankoff B. Immunological Markers for PML Prediction in MS Patients Treated with Natalizumab. *Frontiers in immunology*. 2014;5:668.
119. Skarica M, Eckstein C, Whartenby KA, Calabresi PA. Novel mechanisms of immune modulation of natalizumab in multiple sclerosis patients. *Journal of neuroimmunology*. 2011;235(1-2):70-6.
120. Stuve O, Cravens PD, Frohman EM, Phillips JT, Remington GM, von Geldern G, et al. Immunologic, clinical, and radiologic status 14 months after cessation of natalizumab therapy. *Neurology*. 2009;72(5):396-401.
121. Planas R, Jelcic I, Schippling S, Martin R, Sospedra M. Natalizumab treatment perturbs memory- and marginal zone-like B-cell homing in secondary lymphoid organs in multiple sclerosis. *European journal of immunology*. 2012;42(3):790-8.
122. de Andres C, Teijeiro R, Alonso B, Sanchez-Madrid F, Martinez ML, Guzman de Villoria J, et al. Long-term decrease in VLA-4 expression and functional impairment of dendritic cells during natalizumab therapy in patients with multiple sclerosis. *PloS one*. 2012;7(4):e34103.

123. Link J, Kockum I, Lorentzen AR, Lie BA, Celius EG, Westerlind H, et al. Importance of human leukocyte antigen (HLA) class I and II alleles on the risk of multiple sclerosis. *PloS one*. 2012;7(5):e36779.
124. Frohman EM, Monaco MC, Remington G, Ryschkewitsch C, Jensen PN, Johnson K, et al. JC virus in CD34+ and CD19+ cells in patients with multiple sclerosis treated with natalizumab. *JAMA neurology*. 2014;71(5):596-602.
125. Putzki N, Baranwal MK, Tettenborn B, Limmroth V, Kreuzfelder E. Effects of natalizumab on circulating B cells, T regulatory cells and natural killer cells. *European neurology*. 2010;63(5):311-7.
126. Wedepohl S, Beceren-Braun F, Riese S, Buscher K, Enders S, Bernhard G, et al. L-selectin--a dynamic regulator of leukocyte migration. *European journal of cell biology*. 2012;91(4):257-64.
127. Schwab N, Schneider-Hohendorf T, Pignolet B, Spadaro M, Gorlich D, Meinl I, et al. PML risk stratification using anti-JCV antibody index and L-selectin. *Multiple sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)*. 2016;22(8):1048-60.
128. Spadaro M, Caldano M, Marnetto F, Lugaresi A, Bertolotto A. Natalizumab treatment reduces L-selectin (CD62L) in CD4+ T cells. *Journal of neuroinflammation*. 2015;12:146.
129. Pignolet B, Schwab N, Schneider-Hohendorf T, Bucciarelli F, Biotti D, Averseng-Peaureaux D, et al. CD62L test at 2 years of natalizumab predicts progressive multifocal leukoencephalopathy. *Neurology*. 2016;87(23):2491-4.
130. Lieberman LA, Zeng W, Singh C, Wang W, Otipoby KL, Loh C, et al. CD62L is not a reliable biomarker for predicting PML risk in natalizumab-treated R-MS patients. *Neurology*. 2016;86(4):375-81.
131. F. H. *Biochemie des Menschen. Das Lehrbuch für das Medizinstudium*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG. 2012;5. Auflage:621.

132. Feuerecker M, Kaufmann I, Salam AP, Chouker A. Effects of cryopreservation with polyethylene glycol on the expression of CD11b and CD62L on the surface of polymorphonuclear leukocytes. *Cryo letters*. 2012;33(2):151-60.

133. Cobo-Calvo A, Figueras A, Bau L, Matas E, Mane Martinez MA, Leon I, et al. Leukocyte adhesion molecule dynamics after Natalizumab withdrawal in Multiple Sclerosis. *Clinical immunology (Orlando, Fla)*. 2016;171:18-24.