

**Genexpressionsuntersuchungen zur potentiellen Rolle des
Epstein-Barr-Virus und Humaner endogener Retroviren bei der
Pathogenese der Multiplen Sklerose**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt

der Medizinischen Fakultät

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Tommy Schwarz

Betreuer:

Prof. Dr. med. Markus Otto

Prof. Dr. med. Stephan Zierz

Gutachter:

Prof. Thomas Skripuletz, Hannover

apl. Prof. Malte Kornhuber, Sangerhausen

Datum der Verteidigung: 07.04.2026

Vorbemerkung

In der vorliegenden Arbeit wird im Sinne eines besseren Leseflusses das generische Maskulinum verwendet. Entsprechend sind mit dem grammatikalischen männlichen Plural, wenn nicht explizit anders angegeben, Personen aller Geschlechter eingeschlossen.

Referat

Bei der Multiplen Sklerose (MS) handelt es sich um eine inflammatorische und degenerative Erkrankung des zentralen Nervensystems; der genaue Mechanismus ihrer Entstehung ist noch nicht hinreichend entschlüsselt. Als Risikofaktoren stehen virale Infektionen, vor allem durch das Epstein-Barr-Virus, eine genetische Prädisposition sowie die pathologische Aktivierung humaner endogener Retroviren im Vordergrund.

Das Epstein-Barr-Virus aus der Familie der Herpesviren ist Auslöser der Infektiösen Mononukleose, persistiert jedoch auch nach akuter Infektion in den B-Lymphozyten des Wirts und kann durch Reaktivierung die Entstehung lymphoproliferativer Erkrankungen begünstigen. Nach symptomatischer EBV-Infektion ist das Risiko, eine MS zu entwickeln, signifikant erhöht. Ferner lassen sich bei MS-Erkrankten vermehrt Antikörper gegen EBV-spezifische Antigene nachweisen.

Eine vielversprechende Hypothese geht von einer EBV-getriggerten Transaktivierung endogener Retroviren aus, welche als Superantigene zu einer dysregulierten Immunantwort und damit zu den MS-typischen Veränderungen führen.

Für diese Arbeit wurde die Expression verschiedener EBV- und retroviraler Gene in EBV-immortalisierten lymphoblastoiden Zelllinien, gewonnen aus dem Blut von MS-Patienten und gesunden Probanden, mittels qRT-PCR quantifiziert. Ferner wurden mittels eines Fragebogens klinische Daten der Patienten erhoben, um einen möglichen Zusammenhang dieser mit der Genexpression untersuchen zu können.

Bei MS-Erkrankten konnte eine stärkere Expression der beiden EBV-Gene EBNA-2 und -1 und der retroviralen Sequenzen HERV-W1 *ENV*, -K *GAG* und -H *ENV59* gegenüber Gesunden sowie eine Bevorzugung des weiblichen Geschlechts für einige der Gene gezeigt werden. Der Nachweis von Korrelationen zwischen den EBNA und HERV-W1 sowie HERV-K unterstützt die Möglichkeit einer Transaktivierung; auch finden sich Hinweise auf ein mögliches Zusammenspiel zwischen verschiedenen Retroviren. Ferner konnten vereinzelt Assoziationen der Genexpression mit verschiedenen klinischen Patientencharakteristika gezeigt werden, die Potenzial für weiterführende Untersuchungen bergen.

Insgesamt unterstützen die Daten die Beteiligung von HERV im Rahmen der Pathogenese der MS und stellen vor allem die Vertreter HERV-W1 und HERV-K in den Vordergrund.

Schwarz, Tommy: Genexpressionsuntersuchungen zur potentiellen Rolle des Epstein-Barr-Virus und Humaner endogener Retroviren bei der Pathogenese der Multiplen Sklerose, Halle (Saale), Univ., Med. Fak., Diss., 67 Seiten, 2025

Inhaltsverzeichnis

Verzeichnis der Abkürzungen und Symbole

| | |
|---|-----------|
| 1 Einleitung | 1 |
| 1.1 Multiple Sklerose – ein Überblick | 1 |
| 1.1.1 Klinische Aspekte | 1 |
| 1.1.2 Risikofaktoren in der MS-Pathogenese | 4 |
| 1.2 EBV als Risikofaktor verschiedener Erkrankungen einschließlich MS | 5 |
| 1.2.1 EBV und B-Lymphozyten | 6 |
| 1.2.2 EBV und MS-Pathogenese | 6 |
| 1.3 Humane endogene Retroviren und MS-Pathogenese | 7 |
| 1.3.1 HERV-kodierte Proteine und MS-Pathogenese | 8 |
| 1.3.2 Wichtige Retrovirusfamilien | 8 |
| 1.4 MS-Virushypothese: Übersicht | 9 |
| 2 Zielstellung | 11 |
| 3 Material und Methoden | 12 |
| 3.1 Materialien | 12 |
| 3.1.1 Chemikalien, Kits und Mixe | 12 |
| 3.1.2 Nährmedium | 13 |
| 3.1.3 Zelllinie B95-8 | 13 |
| 3.1.4 Primer | 13 |
| 3.1.5 Geräte | 14 |
| 3.2 Probanden | 15 |
| 3.2.1 Patientenakquise | 15 |
| 3.2.2 Kontrollspender | 17 |
| 3.3 Methoden | 17 |
| 3.3.1 Gewinnung der Blutproben | 17 |
| 3.3.2 Separation peripherer mononukleärer Zellen | 18 |
| 3.3.3 Ansetzen der Zellkulturen | 18 |
| 3.3.4 Etablierung lymphoblastoider Zelllinien | 19 |
| 3.3.5 Isolation der Gesamt-RNA | 20 |
| 3.3.6 Synthese der komplementären DNA | 20 |
| 3.3.7 Quantitative Echtzeit-PCR | 21 |
| 3.3.8 Statistische Auswertung | 23 |

| | |
|--|-----------|
| 4 Ergebnisse | 25 |
| 4.1 Beschreibung des Patientenkollektives | 25 |
| 4.1.1 Erkrankungsverlauf | 25 |
| 4.1.2 Symptome beim ersten Krankheitsschub | 25 |
| 4.1.3 Vorliegen von Risikofaktoren | 26 |
| 4.2 Etablierung lymphoblastoider Zelllinien | 26 |
| 4.3 Quantitative Echtzeit-PCR | 27 |
| 4.4 Relative Genexpression von MS-Patienten und Kontrollen | 27 |
| 4.5 Geschlechtsabhängigkeit der Genexpression | 29 |
| 4.6 Korrelationen zwischen den untersuchten Genen | 31 |
| 4.7 Abhängigkeit der Genexpression von biographischen Patientendaten | 34 |
| 4.7.1 Zusammenhänge mit nicht krankheitsspezifischen Patientendaten | 34 |
| 4.7.2 Zusammenhänge mit krankheitsspezifischen Patientendaten | 36 |
| 4.7.3 Korrelationen zwischen Genexpression und ausgewählten biographischen Patientendaten | 40 |
| 5 Diskussion | 42 |
| 5.1 Methodisches Vorgehen und Fehlerbetrachtung | 42 |
| 5.1.1 HERV-Fc1 <i>ENV</i> | 43 |
| 5.2 Einordnung des Patientenkollektives | 43 |
| 5.3 Die nukleären EBV-Antigene als Krankheitsfaktoren | 44 |
| 5.4 Erhöhte Expression von HERV-K, -H und -W | 46 |
| 5.4.1 Korrelationen zwischen verschiedenen Retroviren | 47 |
| 5.5 Die Rolle verschiedener Risiko- & Krankheitsfaktoren auf die Genexpression | 48 |
| 5.5.1 Frauen als prädisponiertes Geschlecht der Multiplen Sklerose | 48 |
| 5.5.2 Rauchverhalten | 49 |
| 5.5.3 Vitamin-D-Status | 49 |
| 5.5.4 Andere Infektionskrankheiten | 50 |
| 5.5.5 Die Auswirkungen immunmodulierender Therapien | 50 |
| 6 Literaturverzeichnis | 52 |
| 7 Thesen | 67 |
| Erklärungen | |

Verzeichnis der Abkürzungen und Symbole

| | |
|-----------------|---|
| APC | antigenpräsentierende Zelle (<i>antigen-presenting cell</i>) |
| CD | <i>cluster of differentiation</i> |
| cDNA | komplementäre Desoxyribonukleinsäure (<i>complementary deoxyribonucleic acid</i>) |
| CIS | klinisch isoliertes Syndrom (<i>clinically isolated syndrome</i>) |
| CMV | Cytomegalievirus |
| CO ₂ | Kohlenstoffdioxid |
| coLCL | lymphoblastoide Zelllinien der Kontrollgruppe (<i>lymphoblastoid cell lines, control group</i>) |
| Ct | <i>cycle threshold</i> |
| DIS | räumliche Dissemination (<i>dissemination in space</i>) |
| DIT | zeitliche Dissemination (<i>dissemination in time</i>) |
| DMSG | Deutsche Multiple Sklerose Gesellschaft |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure (<i>deoxyribonucleic acid</i>) |
| dsDNA | doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure (<i>double-stranded deoxyribonucleic acid</i>) |
| EBNA | Epstein-Barr-Virus nukleäres Antigen (<i>nuclear antigen</i>) |
| EBV | Epstein-Barr-Virus |
| ENV | Hüllprotein (<i>envelope</i>) |
| ERVWE1 | Endogenes Retrovirus Gruppe W, Vertreter 1, Hüllprotein |
| ESR2 | Östrogenrezeptor 2 (<i>estrogen receptor 2</i>) |
| GAG | gruppenspezifisches Antigen (<i>group-specific antigen</i>) |
| HERV | Humanes endogenes Retrovirus |
| HHV | Humanes Herpesvirus |
| HIV | Humanes Immundefizienzvirus |
| HLA | Humanes Leukozytenantigen |
| HPRT-1 | Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase 1 |
| HSV | Herpes simplex-Virus |
| IgG | Immunglobulin G |
| IM | Infektiöse Mononukleose |
| LCL | lymphoblastoide Zelllinie (<i>lymphoblastoid cell line</i>) |
| LTR | <i>long terminal repeat</i> |
| LZ | Lebenszeit |

| | |
|---------|--|
| MHC | <i>Major histocompatibility complex</i> |
| mRNA | Boten-Ribonukleinsäure (<i>messenger ribonucleic acid</i>) |
| MRT | Magnetresonanztomographie |
| MS | Multiple Sklerose |
| MSLCL | lymphoblastoide Zelllinien der MS-Gruppe (<i>lymphoblastoid cell lines, multiple sclerosis group</i>) |
| MSRV | Multiple Sklerose-assoziiertes Retrovirus |
| NCBI | <i>National Center for Biotechnology Information</i> |
| NF-κB | <i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells</i> |
| NR | Nichtraucher |
| OKB | oligoklonale Banden |
| PBMC | mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (<i>peripheral blood mononuclear cells</i>) |
| PBS | phosphatgepufferte Salzlösung (<i>phosphate-buffered saline</i>) |
| PCR | Polymerasekettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>) |
| PIRA | schubunabhängige Progression (<i>progression independent of relapse activity</i>) |
| POL | Polymerase |
| PPMS | primär progressive Multiple Sklerose |
| qRT-PCR | quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (<i>quantitative real-time polymerase chain reaction</i>) |
| RAW | schubassoziierte Verschlechterung (<i>relapse-associated worsening</i>) |
| RNA | Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>) |
| RRMS | schubförmig remittierende (<i>relapse remitting</i>) Multiple Sklerose |
| RT | Reverse Transkriptase |
| RT-PCR | Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (<i>real-time polymerase chain reaction</i>) |
| SNP | <i>single nucleotide polymorphism</i> |
| SPMS | sekundär progressive Multiple Sklerose |
| Taq | <i>Thermus aquaticus</i> |
| TCEP | Tris-(2-carboxyethyl)-phosphin |
| tRNA | Transfer-Ribonukleinsäure (<i>transfer ribonucleic acid</i>) |
| TZ | T-Zelle/-Lymphozyt |
| VDR | Vitamin-D-Rezeptor |
| VZV | Varicella zoster-Virus |
| XIST | <i>X-inactive specific transcript</i> |
| ZNS | zentrales Nervensystem |

1 Einleitung

Bei der Multiplen Sklerose (MS) handelt es sich um die am häufigsten diagnostizierte auto-inflammatorische Erkrankung des zentralen Nervensystems (ZNS). Wenngleich viele ex- und intrinsische Risikofaktoren bekannt sind beziehungsweise als für die Entstehung relevant vermutet werden, ist die genaue Pathogenese bisher unklar. Auch fehlt es an verlässlichen, objektiv messbaren Parametern, mit deren Hilfe man Krankheitsaktivität und Therapieansprechen sicher quantifizieren könnte.

Das Epstein-Barr-Virus ist ein Herpesvirus mit einer Seroprävalenz von über 95 % in der Gesamtbevölkerung (Dunmire et al. 2018). Die Erstinfektion verläuft im Jugend- und frühen Erwachsenenalter meist asymptomatisch, kann sich jedoch auch als Infektiöse Mononukleose manifestieren. Nach einer solchen ist das Risiko einer MS-Erkrankung signifikant erhöht (Loosen et al. 2022). Weitere epidemiologische, serologische und molekulargenetische Beobachtungen unterstützen die Annahme einer grundlegenden Beteiligung des EBV an der Entstehung der Multiplen Sklerose (Houen und Ruprecht 2023).

Im Folgenden wird eine Übersicht über MS und ätiologische Konzepte gegeben, insbesondere mit Blick auf endogene und exogene Viren als mögliche Risikofaktoren.

1.1 Multiple Sklerose – ein Überblick

1.1.1 Klinische Aspekte

Epidemiologie und Klinik:

Mit einer Prävalenz von 0,34 % im Jahr 2019 (Holstiege et al. 2022), was, gerechnet auf die Bevölkerungszahl, mindestens 250.000 Erkrankte bedeutet, ist die Multiple Sklerose die häufigste entzündliche Erkrankung des ZNS in Deutschland und zeichnet sich weltweit betrachtet durch ein Nord-Süd-Gefälle mit einer deutlichen höheren Inzidenz in äquatorfernen Regionen aus (Wallin et al. 2019). Typisch ist auch eine deutliche Präferenz des weiblichen Geschlechtes (etwa 70 %). Charakteristischerweise tritt die Erstmanifestation im jungen Erwachsenenalter in Erscheinung, wobei Patienten am häufigsten über schmerzlose Visusstörungen – im Rahmen einer Optikusneuritis – und über Sensibilitätsstörungen klagen. Im längeren Krankheitsverlauf dominieren Erschöpfungserscheinungen (Fatigue) und funktionelle Einschränkungen, vor allem des Gehvermögens (Stahmann und Haas 2021).

Klassischerweise unterscheidet man vier verschiedene Verlaufsformen (Lublin et al. 2014):

1. Klinisch isoliertes Syndrom (CIS):
Erstmaliges Auftreten einer typischen Symptomatik bedingt durch eine entzündliche Demyelinisierung, wobei die McDonald-Kriterien (siehe unten) nicht erfüllt werden.
2. Schubförmig remittierende MS (RRMS):
Häufigste Verlaufsform bei Erstdiagnose. Rezidivierende, abgrenzbare Krankheitsschübe mit vollständiger oder partieller Regredienz der Symptome.
3. Sekundär progressive MS (SPMS):
Schubunabhängige klinische Verschlechterung nach initial schubförmig remittierendem Verlauf.
4. Primär progressive MS (PPMS):
Progrediente klinische Verschlechterung ohne initiales Auftreten typischer Schübe.

Seit einiger Zeit ändert sich zunehmend das Verständnis des Krankheitsverlaufes und es wird weniger zwischen den beschriebenen Formen als vielmehr zwischen einer schubassoziierten (RAW = *relapse-associated worsening*) und einer schubunabhängigen (PIRA = *progression independent of relapse activity*) klinischen Verschlechterung unterschieden (Lublin et al. 2022). Kappos et al. konnten zeigen, dass auch bei Patienten mit einer schubförmigen Verlaufsform 80 bis 90 % der bleibenden Einschränkungen unabhängig von den Krankheitsschüben entstehen (Kappos et al. 2020). Äquivalente Befunde lassen sich auch bildmorphologisch nachweisen, wobei insbesondere eine schubunabhängige Hirnvolumenminderung mehrfach beschrieben ist (Stefano et al. 2010; Cagol et al. 2022; Cree et al. 2019).

Diagnostik:

Die Diagnosestellung erfolgt anhand der McDonald-Kriterien, wobei in dieser Arbeit die Kriterien von 2017 verwendet wurden (Thompson et al. 2018): Diesen entsprechend ist neben dem Vorliegen einer typischen Symptomatik der Nachweis einer zeitlichen (DIT = *dissemination in time*) und einer räumlichen (DIS = *dissemination in space*) Dissemination zentralnervöser Läsionen notwendig, wobei dieser typischerweise mittels MRT (Magnetresonanztomographie) erbracht wird. Hier zeigen sich in der T2-Wichtung hyperintense Läsionen (siehe Abb. 1), Prädilektionsstellen sind periventrikulär, (juxta-)kortikal, infratentoriell und spinal. Außerdem ist der Nachweis oligoklonaler Banden (OKB) im Liquor, welche eine intrathekale Immunglobulin G-Produktion (IgG) anzeigen (Reiber et al. 1998), zusätzliches Diagnosekriterium für das Vorliegen einer zeitlichen Dissemination bei fehlendem bildmorphologischem Korrelat.

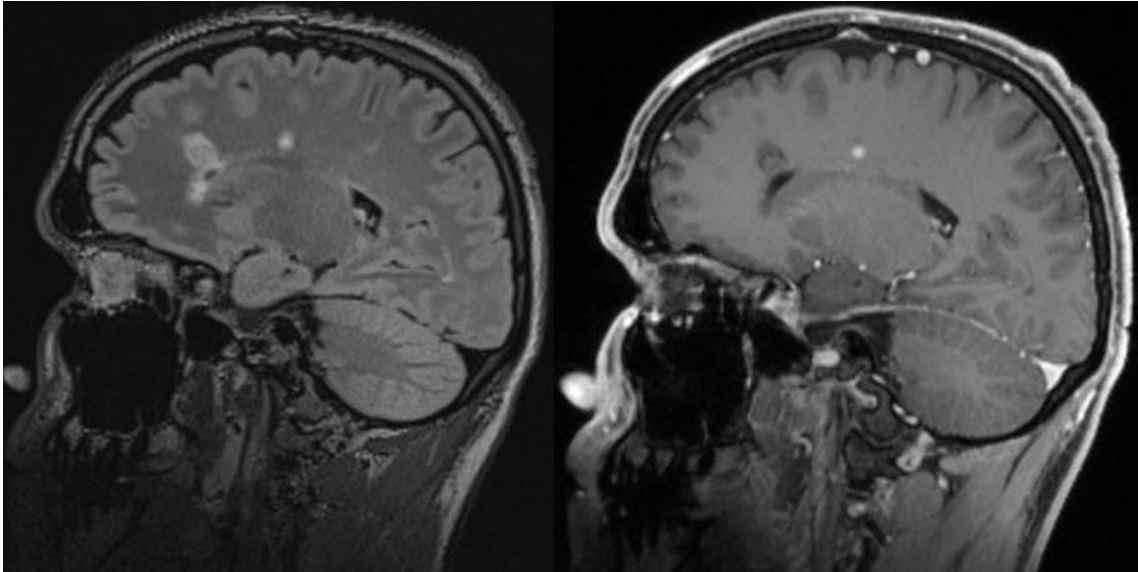


Abb. 1: MRT mit multiplen MS-typischen ZNS-Läsionen, Sagittalschnitt, links FLAIR-Sequenz, rechts T1w-Sequenz nach Kontrastmittelapplikation (mit freundlicher Genehmigung der Neuroradiologie des Inselspitals Bern)

Im September 2024 wurde eine aktualisierte Version der McDonald-Kriterien vorgestellt, wobei die offizielle Publikation und die Übernahme in den klinischen Alltag und die Leitlinien noch ausstehen. Folgende wesentlichen Änderungen wurden angekündigt (Montalban X. 2024):

- Möglichkeit der frühzeitigen Diagnosestellung auch bei asymptomatischen Patienten durch Identifikation eines radiologisch isolierten Syndroms
- *Nervus opticus* als fünfte Prädilektionsstelle
- DIT nicht mehr zwingend erforderlich zur Diagnosestellung
- Anpassung der DIS-Kriterien
- Nachweis von freien Leichtketten, Typ κ als gleichwertige Alternative zu OKB
- Erweiterung der bildmorphologischen Diagnosekriterien (*central vein sign, paramagnetic rim lesions*)

Therapieansätze:

Die Therapie erfolgt in Abhängigkeit von Verlaufsform und Schwere der Symptomatik, wobei zwischen einer Schub-, einer Immun- und einer symptomatischen Therapie unterschieden wird. Ein Schub wird definiert durch das Vorliegen typischer Klinik über mindestens 24 Stunden und mit einem Intervall von über 30 Tagen zum Beginn vorangegangener Schübe, wobei die Symptome nicht durch eine andere somatische Ursache erklärbar sein dürfen (Hemmer B., Gehring K. et al. 2024).

Grundlage der Schubtherapie ist die Applikation von hochdosierten Glukokortikosteroiden im Sinne einer Immunsuppression. Bei unzureichender Wirksamkeit können als Eskalation Aphereseverfahren (Plasmapherese und Immunadsorption) durchgeführt werden.

Für die verlaufsmulierende Therapie stehen verschiedene Substanzklassen zur Verfügung, die anhand ihrer Wirksamkeit eingeteilt werden können:

- Kategorie 1: β -Interferone, Fumarate, Glatirameramide, Teriflunomid
- Kategorie 2: Cladribin, Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptormodulatoren
- Kategorie 3: Alemtuzumab, CD20-Antikörper (Ocrelizumab, Rituximab, Ofatumumab, Ublituximab), Natalizumab

Diese Auswahl gilt vor allem für die RRMS. Für die Behandlung der SPMS können Siponimod und Ponesimod (Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptormodulatoren), Cladribin, β -Interferone sowie Anti-CD20-Therapeutika erwogen werden. Für die Therapie der PPMS wird aktuell die Gabe der CD20-Antikörper Ocrelizumab und Rituximab empfohlen (CD = *cluster of differentiation*).

Ergänzend zur immunmodulierenden spielt die symptomatische Therapie für die Patienten eine wichtige Rolle. Neben der medikamentösen Behandlung (zum Beispiel der Gabe von Baclofen bei Spastiken) stehen Physio- und Ergotherapie, Logopädie sowie Psychotherapie und psychosoziale Betreuung zur Symptomkontrolle und ganzheitlichen Begleitung zur Verfügung.

1.1.2 Risikofaktoren in der MS-Pathogenese

Es wird davon ausgegangen, dass die Pathogenese der MS multifaktoriell ist und sowohl genetische als auch Umweltfaktoren eine Rolle bei der Entstehung spielen.

So zeigen Verwandte von MS-Erkrankten ein deutlich erhöhtes Risiko, auch zu erkranken, wobei die höchste Konkordanz bei monozygoten Zwillinge besteht (O'Gorman et al. 2013; Westerlind et al. 2014). Es sind über 200 Risikogene bekannt (International Multiple Sclerosis Genetics Consortium 2019; Liu et al. 2022), wobei vor allem Variationen der Humanen Leukozytenantigene (HLA = MHC = *major histocompatibility complex*) – insbesondere HLA-DR15.5 – das Erkrankungsrisiko bis um den Faktor drei erhöhen können (Sawcer et al. 2011). Außerhalb der HLA gibt es mindestens 110 potentielle Risiko-SNPs (*single nucleotide polymorphisms*) (Didonna und Oksenberg 2015).

Die Epigenetik beschreibt vererbare Beeinflussungen von Genen und deren Aktivität, die nicht durch Änderung der DNA-Sequenz hervorgerufen werden und spielt in der Entstehung der Multiplen Sklerose eine Rolle. Bekannte Mechanismen sind DNA-Methylierung, Histonmodifikation und MicroRNA-Interferenz. Bei der MS sind unter anderem die Makrophagenaktivierung, die Differenzierung von T-Helferzellen und die Neurosteroidsynthese als epigenetisch kontrollierte Mechanismen bekannt (Koch et al. 2013).

Mittels Migrationsstudien konnte gezeigt werden, dass Personen, die in eine Region mit anderem MS-Risiko als dem ihrer Heimat migrieren, ein adaptiertes persönliches Risiko aufweisen, woraus zu schließen ist, dass auch Umweltfaktoren eine grundlegende Rolle bei der Entstehung spielen (Gale und Martyn 1995).

Als wichtigster Risikofaktor gilt das Epstein-Barr-Virus, welches das MS-Risiko um etwa den Faktor 32 erhöhen soll (Bjornevik et al. 2022), wofür verschiedenste Befunde sprechen (siehe Abschnitt 1.2). Auch weitere, vor allem virale, Erreger wurden lange als Risikofaktoren diskutiert: Neben weiteren Vertretern aus der Familie der Herpesviren (Herpes simplex-Viren 1 und 2 [HSV-1/-2], Varicella zoster-Virus [VZV], Cytomegalievirus [CMV], Humanes Herpesvirus 6 [HHV-6]) betraf dies vor allem auch die Erreger von Mumps, Masern und Röteln (Ascherio und Munger 2007). Nach aktuellem Wissensstand sind diese aber nicht mit einem erhöhten Erkrankungsrisiko assoziiert und es besteht nur für das Epstein-Barr-Virus der Nachweis für eine grundlegende Beteiligung an der Krankheitsentstehung (Lünemann et al. 2010; Bjornevik et al. 2022).

Neben den klassischen exogenen Viren werden zunehmend humane endogene Retroviren (HERV) als Krankheitsursachen, vor allem bei Autoimmun- und malignen Erkrankungen, in Betracht gezogen. Hierbei handelt es sich um Sequenzen des menschlichen Genoms retroviralen Ursprungs. Einige Sequenzen können potentiell weiterhin für (funktionelle) Proteine codieren und transkribiert werden und somit als Antigene fungieren (siehe Abschnitt 1.3).

Als weitere extrinsische Risikofaktoren werden vor allem Nikotinabusus (Rosso und Chitnis 2020; Arneth 2020) und Vitamin-D-Mangel (Gombash et al. 2022) diskutiert, wobei hier proinflammatorische beziehungsweise immunmodulierende Wirkmechanismen im menschlichen Körper relevant und möglicherweise am Pathomechanismus beteiligt sind. Auch ist eine Vermittlung über die oben beschriebenen epigenetische Mechanismen möglich (Koch et al. 2013). Außerdem wird zunehmend die Rolle des intestinalen Mikrobioms diskutiert. Eine dysbiotische Darmflora wird mit verschiedenen Erkrankungen in Verbindung gebracht (El-Sayed et al. 2021). Studien zeigen eine veränderte Darmflora zwischen MS-Erkrankten und Gesunden (Ordoñez-Rodríguez et al. 2023) sowie Assoziationen zwischen Mikrobiom und MS-Risiko (Xiaoyuan Zhou et al. 2022), -Verlauf (Cox et al. 2021) sowie -Therapie (Vacaras et al. 2023).

1.2 EBV als Risikofaktor verschiedener Erkrankungen einschließlich MS

Das Epstein-Barr-Virus (EBV, auch Humanes Herpesvirus 4 = HHV-4) ist ein Erreger aus der (Unter-) Familie der Gammaherpesviren. Die weltweite Seroprävalenz EBV-spezifischer Antikörper liegt bei über 95 %, was bedeutet, dass ein Großteil der Menschen sich im Laufe ihres Lebens mit dem Virus infizieren. Die Übertragung erfolgt meist in der Adoleszenz per oraler Schmierinfektion (Dunmire et al. 2018). Während bei Kindern die Erstinfektion meist latent oder mit unspezifischen Symptomen erfolgt, tritt bei Erwachsenen und vor allem Jugendlichen häufig das typische Pfeiffersche Drüsenfieber (auch Infektiöse Mononukleose = IM) auf. Klinisch präsentiert sich dieses mit der charakteristischen Trias aus Fieber, Tonsillopharyngitis und zervikaler Lymphadenopathie (Karrer und Nadal 2014). Darüber hinaus ist das EBV durch seine

Persistenz im Wirt und seine lymphoproliferativen Eigenschaften ein Risikofaktor für die Entwicklung verschiedener maligner Erkrankungen des Immunsystems, vor allem des Burkitt- und des Hodgkin-Lymphoms (Maeda et al. 2009), und stellt das erste Virus dar, für das onkogene Eigenschaften nachgewiesen werden konnten (Epstein 2015).

1.2.1 EBV und B-Lymphozyten

EBV infiziert vor allem B-Lymphozyten und in geringerem Maße auch (pharyngeale) Epithelzellen, T-Lymphozyten und natürliche Killerzellen. Über das Glykoprotein 350/220 bindet es an CD21, wodurch die Endozytose vermittelt wird. Das Glykoprotein 42 vermittelt dabei als Cofaktor und interagiert mit HLA-Klasse-II-Molekülen (Speck et al. 2000). Letztendlich wird die Virus-DNA im Kern der Wirtszelle freigesetzt und persistiert dort als zirkularisiertes Episom. EBV-infizierte B-Zellen differenzieren zu Gedächtniszellen und zirkulieren somit lebenslang und meist inaktiv im peripheren Blut (Knipe und Howley 2021).

Durch Aktivierung des Wp-Promoters wird die sog. Latenz III eingeleitet, welche *in vitro* zur Etablierung lymphoblastoider Zelllinien (LCL) führt. EBNA-2 (EBV *nuclear antigen 2*) ist das erste hierbei aktivierte Gen, dessen Translationsprodukt als Transaktivator für weitere Wirts- und EBV-Gene fungiert. Somit ist es das essentielle EBV-Gen der Latenzphase und wird hier als Marker ebenjener bestimmt (Knipe und Howley 2021; Allday et al. 1989).

Im lytischen Zyklus – im Rahmen einer Erstinfektion oder Reaktivierung – kommt es zu einer verstärkten Replikation und Virusfreisetzung. EBNA-1 ist das einzige EBNA, das auch im lytischen Zyklus exprimiert wird. Es bindet an oriP – eine Region des EBV-Genoms – und ist für die Persistenz des Episoms und für die Replikation des EBV verantwortlich. Im lytischen Zyklus wird hierbei ein anderer Promotor verwendet. Diese Transkripte wurden hier als Marker für den lytischen EBV-Zyklus quantifiziert (Knipe und Howley 2021; Allday et al. 1989).

1.2.2 EBV und MS-Pathogenese

Nach einer infektiösen Mononukleose – also einer symptomatischen Primärinfektion mit EBV – ist das Risiko, im Verlauf von bis zu 30 Jahren eine MS zu entwickeln, mehr als verdoppelt (Handel et al. 2010; Nielsen et al. 2007; Thacker et al. 2006). Bei MS-Patienten lassen sich – auch schon vor Erstdiagnose der Erkrankung – erhöhte Antikörper gegen EBV-spezifische Antigene nachweisen (Santiago et al. 2010; Munger et al. 2011; Levin et al. 2005). Ferner gibt es Hinweise für eine EBV-Aktivität im ZNS von MS-Patienten, zum Beispiel durch den Nachweis EBV-infizierter B-Lymphozyten (Serafini et al. 2007; Hassani et al. 2018) oder einer humoralen und zellulären Immunreaktion auf EBV im Liquor Betroffener (Holmøy und Vartdal 2004; Bray et al. 1992).

In einer aktuellen Längsschnittstudie konnte gezeigt werden, dass ein Anstieg von Neurofilament-Leichtketten im Serum – einem Biomarker für eine Axondegeneration – erst und nur nach EBV-Serokonversion auftritt (Bjornevik et al. 2022). Eine Erhöhung dieser Proteine konnte unter anderem auch in einer pädiatrischen MS-Patientengruppe nachgewiesen werden (Wendel et al. 2022) und wird als klinischer Biomarker für neurodegenerative Erkrankungen diskutiert (Khalil et al. 2018).

EBV führt zu einer Immortalisierung und Proliferation von B-Lymphozyten. Eine erhöhte beziehungsweise veränderte Aktivität von B-Zellen, vor allem Gedächtniszellen, scheint auch eine Rolle in der Pathogenese der MS zu spielen, was veränderte Zytokinmuster oder auch die Wirksamkeit einer gegen B-Lymphozyten gerichteten Therapie bei MS-Erkrankten vermuten lassen (Cencioni et al. 2021). Es gibt viele weitere mögliche immunologisch vermittelte Mechanismen, über die ein Zusammenhang zwischen EBV und MS plausibel erscheint, unter anderem mittels CD4- und CD8-positiver T-Lymphozyten (Angelini et al. 2013; Lünemann et al. 2008). Nichtsdestotrotz ist der genaue Mechanismus bisher unbekannt.

1.3 Humane endogene Retroviren und MS-Pathogenese

Humane endogene Retroviren (HERV) bilden etwa 8 % des menschlichen Genoms (Lander et al. 2001), es handelt sich um Genelemente retroviralen Ursprungs. Der gängigen Theorie entsprechend entstanden sie vor Millionen von Jahren durch Infektion von Keimzellen durch exogene Retroviren, die ihre RNA in das Wirtsgenom integriert haben und so von Generation zu Generation vererbt werden. Durch die lange Persistenz sammeln die viralen Sequenzen multiple Mutationen und Rekombinationen an, weshalb die meisten nicht mehr für funktionsfähige Proteine codieren (Morandi et al. 2017).

HERV werden anhand ihrer Strukturmerkmale, genauer anhand der tRNA-Spezifität der Primerbindungsstelle, in 31 Familien eingeteilt und liegen in unterschiedlicher Kopienzahl im gesamten Wirtsgenom verteilt vor (Morandi et al. 2017). Die grundlegende Struktur des HERV-Genoms ist schematisch in Abb. 2 dargestellt: Über zwei LTRs (*long terminal repeats*) ist es ins Wirtsgenom integriert. *GAG* bezeichnet das gruppenspezifische Antigen, codiert für (Nucleo-)Capsid- und Matrixproteine und ist konserviert innerhalb einer HERV-Familie. *POL* (Polymerase) codiert für Reverse Transkriptase und Integrase und *ENV* (*envelope*) für die viralen Hüllproteine (John M Coffin et al. 1997).

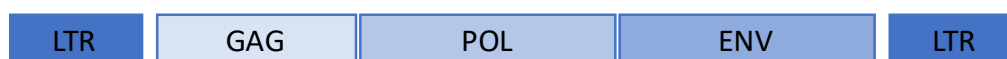


Abb. 2: Schematische Darstellung der Genomstruktur endogener Retroviren

1.3.1 HERV-kodierte Proteine und MS-Pathogenese

Einige HERV-Sequenzen können zur Synthese vollständiger Proteine führen (Mueller-Lantzsch et al. 1993). Syncytin-1 etwa ist das Hüllprotein eines Retrovirus aus der HERV-W-Familie und spielt eine physiologische Rolle im fetalen Synzytiotrophoblasten (Mi et al. 2000).

Zunehmend ergeben sich Hinweise, dass HERV-kodierte Proteine auch an der Pathogenese von verschiedenen malignen und Autoimmunerkrankungen beteiligt sind. Sie können als Antigene fungieren und damit eine Immunreaktion im Wirt auslösen (Balada et al. 2010; Mager und Stoye 2015). Naheliegender ist es, HERV auch als Faktoren in der Pathogenese der MS in Betracht zu ziehen. 1989 wurde das erste Retrovirus aus einer Liquorzelllinie eines MS-Patienten nachgewiesen (Perron et al. 1989). Das MSR (*multiple sclerosis-associated retrovirus*) gehört zur HERV-W-Familie, welche neben -K und -H/F die meiste Evidenz bezüglich einer Rolle bei MS bietet (Antony et al. 2011).

1.3.2 Wichtige Retrovirusfamilien

HERV-K:

In der HERV-K-Familie ist vor allem für den Vertreter -K18 ein Zusammenhang mit MS beschrieben: Bestimmte Genotypen sind mit einem höheren MS-Risiko assoziiert (Tai et al. 2008; La Hera et al. 2013). Im zerebralen Gewebe von MS-Patienten konnte eine erhöhte Expression von HERV-K-RNA nachgewiesen werden (Johnston et al. 2001; Bhetariya et al. 2017). In dieser Retrovirusfamilie haben wir das gruppenspezifische Antigen *GAG* zur Quantifizierung gewählt, um möglichst viele Vertreter der Gruppe zu erfassen.

HERV-H:

Bezüglich der möglichen Beteiligung von HERV-H bei MS gibt es keine eindeutige Studienlage. Bei dänischen Probanden konnten eine höhere Expression dieser Retrovirusfamilie und höhere Antikörperlevel in MS-Patienten gezeigt werden (Christensen et al. 2007; Christensen et al. 2003; Christensen et al. 2000; Brudek et al. 2009). HERV-H62 *ENV* liegt in der Nähe von MS-Risiko-Polymorphismen (Brütting et al. 2016), bestimmte HERV-H-Loci werden nur in MS-Läsionen exprimiert (Elkjaer et al. 2021). Demgegenüber zeigten sich in anderen Untersuchungen keine erhöhten Expressionslevel in Gehirn (Antony et al. 2004; Johnston et al. 2001), Liquor (Alvarez-Lafuente et al. 2008) und Immunzellen (Antony et al. 2006) von MS-Patienten. Wir haben uns entschieden, die Expression des Vertreters HERV-H *ENV59* zu quantifizieren, welches über einen großen offenen Leserahmen verfügt (Parseval et al. 2001).

Zur HERV-H-Familie (beziehungsweise erweitert HERV-H/F) gehört auch HERV-Fc1. Die wichtigste bekannte Kopie dieses Retrovirus befindet sich auf dem X-Chromosom, was

hinsichtlich der Geschlechtspräferenz der MS durchaus relevant erscheint (Nissen et al. 2012). Die Sequenz codiert für ein vollständiges Hüllprotein (Bénil et al. 2003). Mehrere Studien konnten eine Assoziation zwischen MS und dem Vorliegen eines Polymorphismus in der Nähe von HERV-Fc1 feststellen (La Hera et al. 2014). Ferner wurde eine deutlich höhere Last von HERV-Fc1-RNA im Plasma von MS-Patienten verglichen mit Gesunden beschrieben (Laska et al. 2012). Von allen beschriebenen Retroviren gibt es für -Fc1 die übersichtlichste Studienlage.

HERV-W:

Neben dem schon erwähnten MSRNV besteht für das Hüllprotein des Gens ERVWE1 – HERV-W1 *env* – Evidenz für eine Beteiligung in der Pathogenese der Multiplen Sklerose (Lezhnyova et al. 2020). Dieses wird auch als Syncytin-1 bezeichnet und entspricht somit dem oben erwähnten Retroelement, das eine physiologische Rolle in der Plazentafunktion spielt (Mi et al. 2000). Sowohl in peripherem Blut als auch in Liquor und Hirngewebe konnte in diversen Studien meist eine erhöhte Expression von HERV-W bei MS-Patienten nachgewiesen werden (Morandi et al. 2017).

Das Hüllprotein des MSRNV verfügt über eine ausgeprägte proinflammatorische Potenz und kann im Sinne eines Superantigens eine überschießende Immunreaktion auslösen (Perron et al. 2001; Firouzi et al. 2003). Die Sekretion proinflammatorischer Zytokine wird induziert (Perron et al. 2013; Rolland et al. 2005). Ferner kommt es zur axonalen Schädigung, Mikrogliaaktivierung und Hemmung der Oligodendrozytendifferenzierung und des Myelinscheidenrepairs (Kremer et al. 2019; Kremer et al. 2013). Für HERV-W1 *env* wurde eine Oligodendrozytenschädigung durch die Induktion von oxidativem Stress beschrieben (Antony et al. 2007; Antony et al. 2004).

1.4 MS-Virushypothese: Übersicht

Die Multiple Sklerose zeichnet sich durch das Vorliegen einer zentralnervösen Inflammation sowie einer Neurodegeneration auf dem Boden genetischer und Umweltfaktoren aus. Der klassischen Sichtweise nach handelt es sich um eine primär zellulär vermittelte Autoimmunerkrankung (Baecher-Allan et al. 2018). Diese Annahme kann aber die vielfältigen Verläufe und Befunde der Erkrankung nicht zufriedenstellend erklären. So kommt es auch ohne aktive Inflammation und das Vorliegen von Schüben zu einer progredienten Hirnatrophie und klinischen Einschränkungen (Cheriyian et al. 2012). Schon bevor ein klinischer Schub auftritt zeigen sich magnetresonanztomographisch Veränderungen im ZNS (Tortorella et al. 1999; Filippi et al. 1998). Noch vor einigen Jahren konnte bei Verwendung der geläufigen Immuntherapien zwar eine Reduktion der Schubhäufigkeit, jedoch keine signifikante Reduktion des schleichenden Krankheitsprogresses im Sinne bleibender Einschränkungen festgestellt werden (Khan et al. 2013; Lublin et al. 2016; Miller et al. 2014). Eine aktuelle und umfangreiche Metaanalyse

bestätigt dies für die meisten eingesetzten Substanzen und zeigt nur für Natalizumab eine Wirksamkeit in der Hemmung des Krankheitsprogresses (Gonzalez-Lorenzo et al. 2024). Ferner scheinen auch aktuelle Anti-CD20-Therapeutika, vor allem Ocrelizumab, den Krankheitsverlauf, sowohl bei der RRMS als auch bei er SPMS, positiv zu beeinflussen (Wolinsky et al. 2020; Montalban et al. 2023).

Eine mögliche Erklärung bietet die Beteiligung endogener Retroviren (Emmer et al. 2014). Wie oben beschrieben besitzen einige retrovirale Genprodukte superantigene Eigenschaften und sind in der Lage, T-Zellen in überschießender Menge zu rekrutieren (Sutkowski et al. 2001; Perron et al. 2001). Ferner existieren auch B-Zellsuperantigene – zum Beispiel das Glykoprotein 120 des HIV (Humanes Immundefizienzvirus), ebenfalls ein Retrovirus – welche den MS-typischen Befund der oligoklonalen Banden hervorrufen können (Emmer et al. 2011).

Da das Epstein-Barr-Virus mit zunehmender Evidenz nicht nur ein Risiko- sondern vermutlich ein zwingend ursächlicher Faktor ist, muss auch dieses mit dem beschriebenen Pathomechanismus in Einklang gebracht werden. Neben seiner Potenz, die Aktivität von B-Lymphozyten zu verändern und diese zu immortalisieren, gibt es Hinweise, dass das EBV endogene Retroviren transaktiviert und so deren mögliche pathogene Wirkung triggert (Sutkowski et al. 2004; Mameli et al. 2012). Da sowohl HERV im Genom aller Individuen präsent sind als auch das Epstein-Barr-Virus ubiquitär vorkommt und eine sehr hohe Durchseuchung aufweist, scheinen dennoch auch genetische und exogene Faktoren diesen Mechanismus zu beeinflussen.

Der mögliche Mechanismus dieser Hypothese ist in Abbildung 3 dargestellt: Exogene Faktoren, insbesondere EBV, induzieren die Transkription und Translation immunogener HERV-Sequenzen. Das entsprechende Protein wird über HLA-Moleküle auf antigenpräsentierenden Zellen (APC) von T-Zellen (TZ) erkannt und induziert als Superantigen eine dysregulierte Immunantwort.

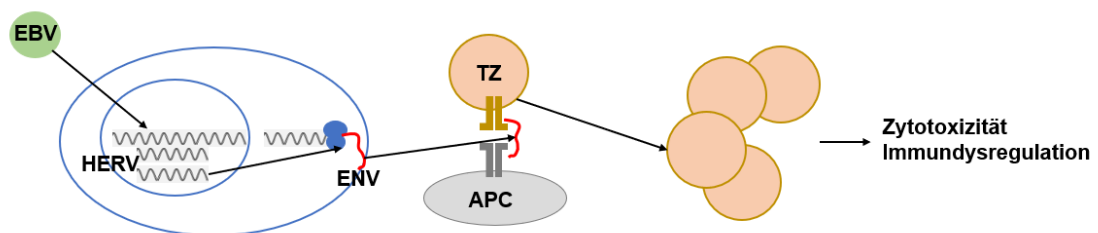


Abb. 3: Mechanismus der HERV-vermittelten Immunpathogenese, nach Emmer et al. 2014

2 Zielstellung

In der vorliegenden Studie soll die Expression verschiedener EBV- (EBNA-1 und -2) und HERV-Gene (HERV-K *GAG*, -W1 *ENV*, -H *ENV59* und -Fc1 *ENV*), welche als Faktoren in der Pathogenese der MS gelten, nach EBV-getriggelter Etablierung lymphoblastoider Zelllinien aus Spenderblut quantifiziert werden. Folgende Aspekte sollen dabei untersucht werden:

1. Gibt es Expressionsunterschiede für die EBV- und HERV-Gene zwischen MS-Patienten und Gesunden?
2. Gibt es mögliche Korrelationen zwischen den verschiedenen Genen?
3. Wie beeinflussen andere diskutierte MS-Risikofaktoren die Genexpression?
4. Gibt es Zusammenhänge mit patienten- und erkrankungsspezifischen Eigenschaften?

3 Material und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Chemikalien, Kits und Mixe

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden folgende Chemikalien, Kits und Mixe verwendet (siehe Tab. 1 und 2):

Tab. 1: verwendete Chemikalien

| Bezeichnung | Hersteller |
|--|--|
| Ampuwa steriles Wasser | Fresenius Kabi AG, Bad Homburg v. d. Höhe |
| Bacillol AF | Paul Hartmann AG, Heidenheim |
| BioWhittaker Phosphate Buffered Saline | Lonza Group AG, Basel, Schweiz |
| DMSO (Dimethylsulfoxid), $\geq 99.7\%$ | Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA |
| DANN AWAY | Molecular BioProducts by Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA |
| Erythrozytenlysepuffer | PAN-Biotech GmbH, Aidenbach |
| Ethanol 70 % | Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA |
| Gibco Penicillin-Streptomycin (10.000 U/ml) | Life Technologies, Carlsbad, CA, USA |
| Pancoll human 1.077 g/ml (Separationsmedium) | PAN-Biotech GmbH, Aidenbach |
| Panserin 401, serumfreies Komplettmedium (mit L-Glutamin) | PAN-Biotech GmbH, Aidenbach |
| Rnase AWAY | Molecular BioProducts by Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA |
| Rnase-freies Wasser | Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren |
| TCEP-hydrochlorid (Pulver) (Tris-[2-carboxyethyl]-phosphin) | Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA |
| Trypanblau-Lösung 0,4 % | Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA |

Tab. 2: verwendete Kits und vorgefertigte Mixe

| Bezeichnung | Hersteller |
|---------------------------------|---|
| NucleoSpin RNA Mini-Kit | Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren |
| PowerUp SYBR Green 2x Mastermix | Applied Biosystems by Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA |
| qScript cDNA 5x SuperMix | Quantabio, Beverly, MA, USA |

3.1.2 Nährmedium

Als Nährmedium für die Etablierung lymphoblastoider Zelllinien wurde eine unter sterilen Bedingungen selbst präparierte Lösung bestehend aus 99 % Panserin 401 und 1 % Penicillin/Streptomycin (zur Prävention bakterieller Kontaminationen der Zellkulturen) genutzt und bei 4-6 °C gelagert. Vor Verwendung erfolgte stets die Erwärmung auf 37 °C im Wasserbad. Panserin 401 enthält keine Wachstumsfaktoren, sodass ein Zellwachstum und eine Proliferation nur bei Vorliegen endogener Wachstumsreize oder dem exogenen Zusatz von Wachstumsfaktoren zu erwarten ist.

3.1.3 Zelllinie B95-8

Wie in der Einleitung beschrieben ist das Epstein-Barr-Virus in der Lage, B-Lymphozyten zu immortalisieren und eine Proliferation zu initiieren. Diese Eigenschaft kann sich experimentell zur Etablierung lymphoblastoider Zelllinien zunutze gemacht werden. In den 1970er Jahren ist es einer Forschergruppe der Yale University School of Medicine gelungen, Blutzellen eines Lisztaffen (*Sanguinis oedipus*) mithilfe des EBV eines Patienten mit IM zu einer stabilen LCL (B95-8) zu immortalisieren, die hohe Mengen an Viruspartikeln synthetisiert und freisetzt (Miller et al. 1972; Miller und Lipman 1973). Der virushaltige Überstand von Zellkulturen dieser Zelllinie kann somit zur Immortalisierung humaner B-Lymphozyten genutzt werden.

Für die Durchführung der vorliegenden Arbeit wurde der EBV-haltige Überstand freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. Martin Staeger aus dem Labor der Klinik für Pädiatrie I des Universitätsklinikums Halle (Saale) zur Verfügung gestellt.

3.1.4 Primer

Bei allen für die *Real-Time-PCR* (Polymerasekettenreaktion) verwendeten Primerpaaren (siehe Tab. 3) handelte es sich um etablierte, schon vom beteiligten Labor genutzte Sequenzen. Die

Primersequenzen zur Detektion von HERV-Fc1 *ENV* wurden ebenda *designt* und noch nicht veröffentlicht.

Die Primer wurden von Invitrogen/Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, MA, USA) bezogen. Für jedes Gen wurden jeweils ein *Forward*- und ein *Reverse*-Primer genutzt, die mit einer Stoffmengenkonzentration von je 10 µM in sterilem Wasser gelöst und anschließend bei -20 °C aufbewahrt wurden.

Tab. 3: verwendete Primer zur Durchführung der qPCR

f = Forward-Primer, *r* = Reverse-Primer, NCBI = National Center for Biotechnology Information

| Genbezeichnung | Sequenz (5'-3') | Exemplarische NCBI- Accession-Nr.: |
|---------------------|--|---|
| HPRT-1 | f: ACC AGT CAA CAG GGG ACA TAA r: CTT CGT GGG GTC CTT TTC ACC | NM_000194.3 (Referenzstandard gemäß <i>RefSeqGene</i> von NCBI) |
| EBNA-2 | f: TCT GCT ATG CGA ATG CTT TG r: GAG GGT GCA TTG ATT GGT CT | V01555.2: 48888-49287 (Hoennscheidt et al. 2009) |
| EBNA-1 | f: GCT TTG CGA AAA CGA AAG TG r: CCC CTC GTC AGA CAT GAT | V01555.2: 62339-107954 (Bernig et al. 2014) |
| HERV-K GAG | f: GGC CAT CAG AGT CTA AAC CAC G r: CTG ACT TTC TGG GGG TGG CCG | JN675025.1 (Giebler et al. 2018) |
| HERV-H ENV59 | f: TGG CCG CTC CTT TAT GTA TC r: TAG TTG GGC TTT GGA GAT GG | AJ289711.1 (Karimi et al. 2019) |
| HERV-W1 ENV | f: TGC TAA CCG CTG AAA GAG GG r: CGA AGC TCC TCT GCT CTA CG | NM_014590.3 (Karimi et al. 2019) |
| HERV-Fc1 ENV | f: CTC CCC ATC TCT CTG GTG C r: TGA GGA GGC TGG TTT CTA CTA AG | AL354685.17 (nicht publiziert) |

3.1.5 Geräte

Die im Weiteren beschriebenen Versuche wurden mit den in Tab. 4 genannten Geräten durchgeführt:

Tab. 4: verwendete Geräte

¹ Muskellabor der Neurologischen Universitätsklinik Halle (Saale)

² Zentrum für Medizinische Grundlagenforschung, Medizinische Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

| Gerät | Bezeichnung (Hersteller) |
|----------------------------|--|
| CO ₂ -Inkubator | Heraeus HeraCell (Kendro Laboratory Products GmbH, Hanau) ¹ |
| Lichtmikroskop | Axiovert 25 (Carl Zeiss AG, Oberkochen) ¹ |
| Pipetten | Pipetman (Gilson Inc., Middleton, WI, USA) ¹ Reference (Eppendorf SE, Hamburg) ¹ |
| Pipettierhilfe | pipetus (Hirschmann GmbH und Co. KG, Eberstadt) ¹ |
| Plattenleser | Infinite 200 PRO (Tecan Group AG, Männedorf, Schweiz) ² |
| Real-Time-PCR-System | Applied Biosystems QuantStudio 3 (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) ¹ |
| Sterilbank | Heraeus HeraSafe HS 12 (Kendro Laboratory Products GmbH, Hanau) ¹ |
| Thermocycler | peqSTAR 2x (Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen) ¹ |
| Vortexer | Vortex-Genie 2 (Scientific Industries, Inc., Bohemia, NY, USA) ¹ |
| Wasserbad | Medingen W6 (P-D Management Industries-Technologies GmbH, Wilsdruff) ¹ |
| Zentrifugen | Fast Gene Plate Centrifuge (Nippon Genetics Europe GmbH, Düren) ¹ Heraeus Biofuge fresco (Kendro Laboratory Products GmbH, Hanau) ¹ Heraeus Labofuge 400R (Kendro Laboratory Products GmbH, Hanau) ¹ MiniSpin (Eppendorf SE, Hamburg) ¹ |

3.2 Probanden

Um die Validität der durchgeführten Messungen zu erhöhen, wurden für jeden Probanden, sowohl in der MS- als auch in der Kontrollgruppe, jeweils biologische (mehrere LCL pro Proband) und technische (zweimalige Durchführung der qPCR pro LCL und Gen) Replikate angefertigt.

Das Projekt wurde durch die Ethik-Kommission der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg bewertet und eine Zustimmung erteilt (Bearbeitungsnummer 2015-89).

3.2.1 Patientenakquise

Die Probandenakquise wurde in Zusammenarbeit mit den neurologischen Ambulanzen des Krankenhauses Martha-Maria Halle-Dölau (zertifiziertes MS-Zentrum) sowie des

Universitätsklinikums Halle (Saale) und mit informiertem Einverständnis der Probanden nach mündlicher und schriftlicher Aufklärung über die Verwendung des Blutes sowie über die Datenschutzbestimmungen durchgeführt. Bei allen Studienteilnehmern der Patientengruppe lag die Diagnose einer Multiplen Sklerose entsprechend der McDonald-Kriterien von 2017 (Thompson et al. 2018) vor.

Ferner wurden die Patienten gebeten, einen Fragebogen zur Charakterisierung des individuellen Krankheitsverlaufes und des Vorliegens möglicher Risikofaktoren auszufüllen. Folgende Informationen wurden hierdurch erhoben:

Allgemeine und Risikofaktoren:

- Geschlecht
- Geburtsdatum
- Datum des Studieneintritts
- Nebenerkrankungen
- Begleitmedikation
- durchgemachte Infektionserkrankungen (Mumps, Masern, Röteln, Windpocken, IM)
- Rauchverhalten
- Vitamin-D-Status
- Essgewohnheiten
- Familienanamnese bezüglich MS
- Schulabschluss

MS-spezifische Faktoren:

- MS-Verlaufsform
- Alter bei erstem Krankheitsschub
- Symptomatik bei erstem Krankheitsschub
- zeitliches Intervall zwischen den ersten beiden Krankheitsschüben
- Auftreten einer Infektionserkrankung oder Impfung vor dem ersten Schub
- Zahl der Schübe in den vergangenen zwei Jahren
- aktuelle, MS-bezogene Gehstreckeneinschränkung
- aktuelle und vorhergehende MS-Medikation

Anhand der erhobenen Informationen wurden folgende Daten berechnet:

- Alter bei Studieneintritt (Datum des Studieneintritts – Geburtsdatum)
- Dauer der Erkrankung in Jahren (Alter bei Studieneintritt – Alter bei erstem Schub)

- Dauer der Erkrankung in % der Lebenszeit (Dauer der Erkrankung in Jahren / Alter bei Studieneintritt * 100)

Die Fragebögen, ebenso wie die Zellkulturen, wurden bei Studieneintritt anonymisiert.

3.2.2 Kontrollspender

Bei den zehn Probanden der Kontrollgruppe handelte es sich um gesunde, anonymisierte Spender, deren Blut aus der Einrichtung für Transfusionsmedizin des Universitätsklinikums Halle (Saale) bezogen wurde, wobei lediglich das Geschlecht der Probanden über Ermittlung der XIST-Expression (*X-inactive specific transcript*) bekannt war. Das Spenderblut wurde standardmäßig auf das Vorliegen typischer parenteral übertragbarer Krankheitserreger (z.B. HIV) untersucht, der Serostatus bezüglich EBV wurde nicht erfasst.

3.3 Methoden

Sämtliche Arbeiten im Zusammenhang mit vitalen Zellkulturen (Punkte 3.3.1 bis 3.3.3) wurden unter entsprechenden hygienischen Bedingungen unter der Sterilbank durchgeführt. Die Arbeit mit EBV-haltigen Lösungen sowie vitalen EBV-immortalisierten Zelllinien (Punkte 3.3.2 und 3.3.3) geschah, entsprechend der Einordnung in die Risikogruppe 2, unter Einhaltung der in Infektionsschutzgesetz und Biostoffverordnung vorgeschriebenen Maßnahmen.

Bei Arbeiten mit RNA und DNA wurden nukleasefreie Materialien verwendet bzw. Geräte sowie Arbeitsflächen vor der Benutzung mit RNase AWAY bzw. DNA AWAY behandelt. Ferner wurden Nukleinsäuren während der Verarbeitung auf Eis gelagert.

3.3.1 Gewinnung der Blutproben

Die anonymisierten Blutproben der MS-Patienten stammten aus den neurologischen Ambulanzen des Krankenhauses Martha-Maria Halle-Dörlau (zertifiziertes MS-Zentrum) sowie des Universitätsklinikums Halle (Saale). Die Gewinnung erfolgte durch periphere venöse Blutentnahme unter Einhaltung allgemeingültiger hygienischer und prozeduraler Standards in den Ambulanzen der beiden beteiligten Kliniken; es wurden jeweils etwa 20 ml Vollblut entnommen. Bei dem Blut der zehn Probanden der Kontrollgruppe handelte es sich um *Buffy Coats* – also leukozytenreiche Konzentrate, welche als Nebenprodukte der Verarbeitung von Vollblutspenden entstehen – gesunder, anonymer Spender aus der Einrichtung für Transfusionsmedizin des Universitätsklinikums Halle (Saale)). Das Spenderblut wurde standardmäßig auf das Vorliegen

typischer parenteral übertragbarer Krankheitserreger untersucht. Je Proband standen etwa 80-120 ml Blutkonzentrat zur Verfügung.

Alle Blutproben wurden binnen 12 Stunden am Tag der Gewinnung weiter aufgearbeitet, wie im Folgenden beschrieben.

3.3.2 Separation peripherer mononukleärer Zellen

Um periphere mononukleäre Zellen (PBMC) aus Vollblut zu separieren, stellt die Dichtegradientenzentrifugation unter Verwendung eines Separationsmediums eine etablierte Methode dar. Das im Rahmen dieser Arbeit verwendete Separationsmedium enthält ein Polysaccharid, welches zur Erythrozytenaggregation führt und die Sedimentation dieser unterstützt. Die Dichte des Mediums beträgt 1.077 g/ml; dichtere Blutbestandteile (Erythrozyten und ein Großteil der Granulozyten) durchtreten das Medium und setzen sich als Sediment am Boden des Zentrifugationsröhrchens ab, während Lympho-, Mono- und teils Thrombozyten sich aufgrund ihrer niedrigeren Dichte als dünne Zellschicht zwischen Separationsmedium und Blutplasma konzentrieren und anschließend abpipettiert werden können (Luttmann et al. 2014). Zunächst erfolgte das Einfüllen und Abzentrifugieren (30 s bei 1.000 g) von 15 ml Separationsmedium im 50 ml-Filterröhrchen und anschließend das Befüllen mit dem gewonnenen Spenderblut. Nach Zentrifugation (10 min bei 1.000 g) zeigten sich die mononukleären Zellen wie oben beschrieben als dünne Zellschicht zwischen Medium und Plasma. Diese wurde anschließend mittels Pasteurpipette entnommen, in einem separaten Falcon gesammelt und anschließend zwei- bis dreimal mit PBS (*Phosphate-buffered saline*) gewaschen (jeweils 10 min bei 300 g), um verbleibende nicht benötigte Blutbestandteile, wie z. B. Thrombozyten, zu entfernen. Für das Blut aus der Transfusionsmedizin wurden diese Schritte je nach Blutvolumen drei- bis viermal durchgeführt und die PBMC gemeinsam in einem Röhrchen gesammelt und weiterverarbeitet.

Bei deutlicher makroskopischer Verunreinigung der gewonnenen Zellfraktion mit Erythrozyten wurde eine Lyse dieser mittels Erythrozytenlysepuffer durchgeführt.

3.3.3 Ansetzen der Zellkulturen

Nach Resuspendieren der Zellen in PBS erfolgte das Auszählen in der Neubauer-Zählkammer und die Berechnung der Zellkonzentration (c) sowie der Gesamtzellzahl (Z_{ges}) (Schrödel 2010). Dafür wurden 40 μ l Zellsuspension mit 40 μ l Trypanblaulösung vermischt, hiervon 20 μ l in eine Zählkammer pipettiert und die Gesamtzellzahl in den vier großen Quadraten der Zählkammer (Z_{ZK}) ermittelt. Die Berechnung erfolgte nach folgender Formel:

$$c = (Z_{ZK} \div 4) \times 2 \times 10^4 \quad (2 = \text{Verdünnungsfaktor}, 10^4 = \text{Kammerkonstante})$$

$$Z_{ges} = c \times V \quad (V = \text{Volumen der Zellsuspension})$$

Ein Teil der Zellen wurde, abhängig von der Gesamtzellzahl, in 6-10 ml Nährmedium mit einer Konzentration von 3×10^5 /ml resuspendiert.

Anschließend wurde jeweils 1 ml Zellsuspension in 5-6 Wells einer 24-Wellplatte pipettiert. Um eine Immortalisierung der Lymphozyten zu erreichen und so lymphoblastoide Zelllinien zu generieren, wurden jeweils 4-5 dieser Wells mit je 1 ml EBV-haltigen Zellkulturüberstandes der B95-8-Zelllinie versetzt. In jeweils ein weiteres Well wurde 1 ml Nährmedium einpipettiert, um ein möglicherweise auftretendes Spontanwachstum beobachten zu können. Die Zellkulturen wurden nun im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert.

Die verbliebenen Zellen jeder Probe wurden abzentrifugiert (10 min bei 500 g), mit einer Lösung bestehend aus 90 % PBS + 10 % DMSO (je maximal 10×10^6 Zellen in 1 ml Lösung pro Kryoröhrchen) resuspendiert und bei -80 °C konserviert.

3.3.4 Etablierung lymphoblastoider Zelllinien

Die Zellkulturen wurden jeweils für insgesamt 8-15 Wochen bei o. g. Bedingungen inkubiert und zweimal pro Woche lichtmikroskopisch bezüglich des Zellwachstums sowie der Konditionierung des Mediums beurteilt; ein Farbumschlag nach gelb zeigte hierbei einen Nährstoffverbrauch sowie ein Anfallen von Stoffwechselprodukten und somit ein Wachstum der Zellkultur an. In der 24-Wellplatte erfolgte ein regelmäßiges Auffüllen mit Nährmedium. Nach etwa 2-3 Wochen zeigte sich meist ein stabiles Wachstum von Zellhaufen, sodass die Zellsuspensionen zweimalig im Abstand von 3-4 Tagen im Verhältnis 1:2 geteilt und mit Medium aufgefüllt werden konnten, sodass pro Zelllinie etwa 8 ml Suspension zur Verfügung standen. Anschließend wurden diese in eine 25-ml-Zellkulturflasche umgesetzt und mit Medium auf 10 ml aufgefüllt, wobei 1 ml Suspension, aufgefüllt mit 1 ml Medium, als Reserve in der Kulturplatte zurückbehalten wurde. In der Kulturflasche wurde die Zellsuspension bei gutem Wachstum zwei Mal wöchentlich, meist im Verhältnis 1:2, passagiert: Etwa die Hälfte des konditionierten Mediums wurde abpipettiert und verworfen und anschließend mit frischem Nährmedium ersetzt. Dies erfolgte in der Regel bis Passage 10. Beim vorletzten – meist dem neunten – Passagieren wurde die Suspension mit Nährmedium auf 20 ml ergänzt.

Beim letzten Passagieren wurden 10 ml Suspension zum Anlegen einer kryokonservierten Reserve entnommen. Dafür wurde, nach Bestimmung der Zellkonzentration (siehe 3.3.2), die Suspension zentrifugiert (10 min bei 500 g), der Überstand abpipettiert und das Zellpellet in einer Lösung bestehend aus 90 % Nährmedium + 10 % DMSO resuspendiert. Die Lagerung erfolgte

bei -80 °C (etwa 2-3 Mio. Zellen pro Kryoröhrchen). Die verbleibende Zellkultur wurde wieder auf 20 ml mit Nährmedium aufgefüllt.

Abschließend wurden die Zellen für die RNA-Isolation gesammelt und kryokonserviert. Hierzu wurde die homogenisierte Zellsuspension zu etwa gleichen Teilen in zwei 15 ml-Röhrchen überführt und zentrifugiert (10 min bei 500 g). Nach Absaugen des Flüssigkeitsüberstandes wurden die verbleibenden Zellpellets sofort in Flüssigstickstoff gefroren und anschließend bei -80 °C gelagert.

3.3.5 Isolation der Gesamt-RNA

Die Isolation der Gesamt-RNA erfolgte nach der *single-step*-Methode (Mülhardt 2013) mit Hilfe eines RNA-Kits entsprechend der Gebrauchsanweisung des Herstellers unter Verwendung von TCEP als Reduktionsmittel, welches zuvor mit einer Stoffmengenkonzentration von 15 mM in sterilem Wasser gelöst wurde. Die Zellpellets wurden kurzzeitig bei Raumtemperatur inkubiert und nach dem Auftauen sofort mit dem vorbereiteten Lysepuffer resuspendiert, um eine Degradation der RNA zu Vermeiden.

Nach dem Vorgehen entsprechend der Gebrauchsanweisung und Elution der RNA in 40 µl nukleasefreiem Wasser erfolgte die photometrische Konzentrations- und Reinheitsbestimmung mit Hilfe des TECAN Infinite 200 PRO. Bei dieser Methode wird die Absorption des Eluats bei 260 nm und somit die optische Dichte gemessen, woraus die RNA-Konzentration errechnet werden kann (Hauk 2013; Mülhardt 2013), wobei die Berechnung durch die zugehörige Software durchgeführt wurde. Das Verhältnis $A_{260\text{ nm}} : A_{280\text{ nm}}$ gibt einen Hinweis auf die Reinheit des Eluats, insbesondere auf Proteinverunreinigungen, und wird bei RNA im Bereich von etwa 2,0 als normwertig angesehen (Wilfinger et al. 1997).

3.3.6 Synthese der komplementären DNA

Die Synthese der cDNA (*complementary DNA*) erfolgte mittels reverser Transkription. Durch das Enzym Reverse Transkriptase (RT), welches erstmalig in Retroviren nachgewiesen wurde (Baltimore 1970), ist es möglich, RNA in DNA zu transkribieren, welche dann als komplementäre, kurz cDNA, bezeichnet wird (Mülhardt 2013).

Hierzu wurde ein vorgefertigter Mastermix verwendet. Nach der photometrischen Konzentrationsbestimmung wurde das Volumen des RNA-Eluats ausgerechnet, welches 1 µg RNA enthält (V_{RNA}). Der vorbereitete Ansatz für die Durchführung der cDNA-Synthese ist in Tab. 5 dargestellt.

Tab. 5: Ansatz für die Durchführung der reversen Transkription

| Stammlösung | Volumen |
|--------------------------|-----------------------------------|
| RNA-Eluat | V_{RNA} mit 1 μg RNA |
| nukleasefreies Wasser | ad 16 μl |
| qScript cDNA 5x SuperMix | 4 μl |
| | 20 μl |

Nach Vermischen der Lösung mittels *Vortexer* und kurzem Abzentrifugieren (*Quick-run* bis etwa 9.500 g) wurde die RNA-Lösung im *Thermocycler* transkribiert; das Protokoll ist in Tab. 6 dargestellt.

Tab. 6: Protokoll für die Durchführung der reversen Transkription

| Schritt | Temperatur | Dauer |
|--|------------|------------------|
| 1. Primerhybridisierung | 25 °C | 5 min |
| 2. Synthese | 40 °C | 30 min |
| 3. Denaturierung/Inaktivierung RT | 85 °C | 5 min |
| 4. Lagerung | 4 °C | bis zur Entnahme |

Die anschließende Lagerung erfolgte bei -20 °C. Verbleibende RNA nach Durchführung der cDNA-Synthese wurde bei -80 °C kryokonserviert.

3.3.7 Quantitative Echtzeit-PCR

Zur Quantifizierung der vorliegenden cDNA wurde die quantitative *Real-Time*-Polymerasekettenreaktion (qPCR) genutzt, welche eine zu diesem Zweck häufig angewandte Methode darstellt und sowohl eine absolute als auch eine relative Quantifizierung ermöglicht (Livak und Schmittgen 2001).

Bei der PCR handelt es sich um eine molekularbiologische Standardmethode, mit der es möglich ist, auch kleine Mengen DNA selektiv zu vervielfältigen. Benötigt werden dazu eine hitzestabile DNA-Polymerase (*Taq*-Polymerase, benannt nach dem Bakterium *Thermus aquaticus*, welches in heißen Quellen und Geysiren lebt (Brock und Freeze 1969)), die zu vervielfältigende DNA, zwei Oligonukleotidprimer sowie Pufferlösung und Nukleotide. In einem initialen Denaturierungsschritt kommt es bei etwa 94 °C zur Auftrennung der Doppelstrangstruktur der Ausgangs-DNA. Anschließend folgt die Hybridisierung der Primer an die beiden Einzelstränge (Annealing) und dann die Synthese der komplementären Stränge durch die *Taq*-Polymerase (Elongation), wobei diese beiden Schritte gemeinsam bei einer Temperatur von 61 °C

durchgeführt werden können. Dieser Zyklus wird so oft wiederholt, bis die gewünschte Menge DNA vorhanden ist, wobei es pro Zyklus unter optimalen Bedingungen zu einer Verdopplung der Menge der Ausgangs-DNA kommt (Mülhardt 2013).

Bei der qPCR wird diese Methode um eine parallele Quantifizierung der Nukleinsäuren während der PCR-Zyklen erweitert. Hierzu sind verschiedene Technologien etabliert, wobei für diese Arbeit die SYBR-Green-Farbstoffchemie verwendet wurde. Dieser Farbstoff lagert sich unspezifisch an jedwede Doppelstrang-DNA (dsDNA) an, wodurch mit steigender DNA-Menge die Fluoreszenzintensität proportional ansteigt und durch einen Fluoreszenzdetektor quantifiziert wird. Als letzter Schritt der qPCR wird eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt: Hierbei kommt es durch einen langsamen Temperaturanstieg zur Dissoziation der dsDNA und somit zur temperaturabhängigen Abnahme der Fluoreszenzintensität. Die Schmelztemperatur des DNA-Moleküls wird unter anderem durch die Moleküllänge und den Guanin-Cytosin-Gehalt der Nukleinsäure beeinflusst. Eine abweichende Schmelzkurve kann bei der Bildung von Primer-Dimeren oder unspezifischen PCR-Produkten beobachtet werden (Life Technologies Corporation 2012).

Zur Durchführung der qPCR wurde ein vorgefertigter *Mastermix* genutzt. Die Ansätze für die Durchführung der qPCR sind in Tab. 7 dargestellt und wurden nach dem Pipettieren abzentrifugiert (1 min bei 480 g).

Tab. 7: Ansatz für die Durchführung der qPCR

| Stammlösung | Volumen |
|--|----------------|
| PowerUp SYBR Green 2x Mastermix | 5 µl |
| Primerlösung <i>forward</i> + <i>reverse</i> (10 µM) | 0,5 µl |
| nukleasefreies Wasser | ad 9,5 µl |
| cDNA | 0,5 µl |
| | 10 µl |

Pro Zelllinie und Zielgen wurden je zwei technische Replikate amplifiziert. Das PCR-Protokoll wurde mittels QuantStudio 3 und der QuantStudio Design and Analysis Software v1.4.3 (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) vorbereitet und durchgeführt und ist in Tab. 8 dargestellt.

Tab. 8: Protokoll für die Durchführung der qPCR

* Temperaturänderung 1,6 °C/s, wenn nicht anders angegeben

| Prozess | Temperatur | Dauer * |
|---|------------|-------------------------|
| 1. Initiale Denaturierung | 95 °C | 10 min |
| 2. 40 PCR-Zyklen: | | |
| – Denaturierung | 95 °C | 15 s |
| – Primerhybridisierung und Amplifikation | 61 °C | 1 min |
| 3. Schmelzkurvenanalyse | 95 °C | 15 s (Anstieg 0,1 °C/s) |

3.3.8 Statistische Auswertung

Zur relativen Quantifizierung der Genexpression wurde die $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Methode verwendet (Livak und Schmittgen 2001). Hierbei wird die relative Expression der Zielgene im Vergleich zu einem Referenzgen (engl. *housekeeping gene*), welches für grundlegende zelluläre Funktionen benötigt und somit in allen Zellen des Körpers stabil exprimiert wird, berechnet. Es existiert eine Vielzahl solcher Gene, welche zu diesem Zweck etabliert sind (Jonge et al. 2007); in dieser Arbeit wurde HPRT-1 (Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase 1) (Brouwer et al. 2006; Oturai et al. 2016) ausgewählt, welches für ein Enzym des Purinstoffwechsels codiert (Agrahari et al. 2019).

Aus den Ct-Werten (*Cycle threshold*) der jeweils zwei technischen Replikate pro LCL und Gen wurde der Mittelwert bestimmt und dieser weiter für die Berechnung von $2^{-\Delta\Delta C_t}$ verwendet. Aus den $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Werten aller LCL eines Spenders (biologische Replikate) wurde wiederum der Mittelwert berechnet, welcher anschließend für die statistische Auswertung herangezogen wurde. Für diese Berechnungen sowie für die Darstellung der Ergebnisse der Auswertung der Fragebögen wurde Microsoft Excel (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA) genutzt.

Anschließend erfolgte die statistische Auswertung mittels GraphPad PRISM 8 Windows (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). Zum Vergleich zweier Gruppen wurde der ungepaarte *t*-Test mit Welch-Korrektur verwendet; für den Vergleich von drei oder mehr Gruppen wurden der einfaktorielle Welch-ANOVA- sowie zur Post-hoc-Analyse der Dunnett-T3-Test genutzt. Die Berechnung der Korrelationskoeffizienten erfolgte, da es sich um metrische Daten handelte, nach Pearson; für die Signifikanzberechnung der Korrelation wurde hier der zweiseitige, gepaarte *t*-Test genutzt.

Das Signifikanzniveau α wurde auf 0,05 festgelegt. Für die Darstellung der Signifikanzen wurde folgende Nomenklatur verwendet:

| | | |
|------|---|--------------|
| * | = | $p < 0,05$ |
| ** | = | $p < 0,01$ |
| *** | = | $p < 0,001$ |
| **** | = | $p < 0,0001$ |

Je nach Fragestellung wurden die Spender in verschiedene Subgruppen eingeteilt. Für den folgenden Ergebnisteil wurden entsprechend die relativen Expressionen der in Abschnitt 5.1.1 dargestellten Anzahl der Zelllinien verwendet und mehrfach aufbereitet.

4 Ergebnisse

4.1 Beschreibung des Patientenkollektives

Bei allen Studienteilnehmern der MS-Gruppe lag die Diagnose einer Multiplen Sklerose vor. 21 der 32 Probanden waren weiblich (65,6 %), elf männlich (34,4 %). Das Durchschnittsalter bei Studieneintritt lag bei 39,1 Jahren (siehe Tab. 9).

Tab. 9: weiterführende Patientendaten

MW = Mittelwert, SD = standard deviation (Standardabweichung), Min = Minimalwert, Max = Maximalwert, LZ = Lebenszeit

| | <i>MW ± SD</i> | <i>Min</i> | <i>Max</i> |
|-----------------------------------|----------------|------------|------------|
| Alter bei Studieneintritt | 39,1 ± 9,3 | 23 | 56 |
| Alter bei erstem MS-Schub | 31,8 ± 9,3 | 19 | 52 |
| Erkrankungsdauer [Jahre] | 7,3 ± 6,1 | 0 | 21 |
| Erkrankungsdauer [% der LZ] | 18,3 ± 14,5 | 0 | 44 |
| Anzahl Schübe in letzten 2 Jahren | 1,7 ± 1,8 | 0 | 9 |

4.1.1 Erkrankungsverlauf

Das Durchschnittsalter beim Auftreten des ersten diagnostizierten Krankheitsschubes lag bei 31,8 Jahren. Die Krankheitsdauer lag im Mittel bei 7,3 Jahren beziehungsweise 18,3 % der Lebenszeit, die durchschnittliche Schubzahl in den letzten zwei Jahren lag bei 1,7 (siehe Tab. 9).

Bei allen Patienten lag eine schubförmig remittierende MS vor. Jeweils ein Patient berichtete von einer vor dem ersten Erkrankungsschub stattgehabten Durchfallerkrankung, infektiösen Mononukleose bzw. einer erfolgten Hepatitis-A-Impfung. Das zeitliche Intervall zwischen den beiden ersten Krankheitsschüben lag zwischen einem Monat und acht Jahren (*MW* = 12,2 Monate; *n* = 23). Bei neun Patienten war dieses nicht erinnerlich oder es lag bei Studieneintritt der erste Schub vor. Eine Patientin berichtete von einer positiven Familienanamnese.

4.1.2 Symptome beim ersten Krankheitsschub

Die am häufigsten beim ersten Krankheitsschub auftretenden Symptome waren Sensibilitätsstörungen (22/32 = 68,8 %), Sehstörungen (19/32 = 59,4 %) und Gangstörungen/Ataxie (15/32 = 46,9 %). Neun der 32 Patienten berichteten von Fatigue (28,1 %), vier von Paresen (12,5 %), jeweils drei von Blasen-/Mastdarm-, Sprechstörungen oder

Spastiken/Krämpfen (9,4 %) und jeweils ein Patient von Libidoverlust oder Schwindel (3,1 %). 14 der Patienten erhielten zum Studienzeitpunkt eine Therapie mittels Natalizumab (43,8 %); weitere verabreichte MS-Medikamente waren Fingolimod (4/32 = 12,5 %), Interferon β , Alemtuzumab, Glatirameracetat und Fumarsäuredimethylester (je 1/32 = 3,1 %). Zehn Patienten (31,3 %) erhielten zu diesem Zeitpunkt keine MS-spezifische Therapie.

4.1.3 Vorliegen von Risikofaktoren

Elf der Patienten gaben an, aktive Raucher zu sein (34,4 %).

Bei 14 Teilnehmern war in der Vergangenheit ein Vitamin-D-Mangel bekannt und/oder bestand aktuell eine Substitution (43,8 %). Sieben verneinten eine zurückliegende Vitamin-D-Defizienz, elf gaben „unbekannt“ an; aufgrund der retrospektiv nicht möglichen Differenzierung wurde diese als Vitamin-D-Status „nicht bekannt“ zusammengefasst (56,3 %).

Bezüglich durchgemachter viraler Infektionserkrankungen zeigten sich folgende Häufigkeiten: Zwölf Patienten hatten im Kindesalter Mumps (37,5 %), acht Masern (25 %), zehn Röteln (31,3 %) und 21 Windpocken (65,6 %), lediglich vier konnten sich an ein zurückliegendes Pfeiffersches Drüsenfieber erinnern (12,5 %).

Weitere anamnestisch erfragte Daten, zum Beispiel Nebenerkrankungen oder Essgewohnheiten, ergaben keine ausreichend großen Subgruppen und werden deshalb nicht berücksichtigt.

4.2 Etablierung lymphoblastoider Zelllinien

Es gelang bei 35 von 38 MS-Patienten nach Immortalisierung der PBMC mittels EBV die Etablierung mindestens einer lymphoblastoiden Zelllinie; bei den drei verbleibenden zeigte sich kein stabiles Zellwachstum. Zu 32 dieser 35 Probanden konnten Patienten- und Erkrankungsdaten mittels der Fragebögen erhoben werden, sodass insgesamt 95 Zelllinien von 32 verschiedenen erkrankten Spendern in diese Arbeit eingeschlossen werden konnten. In der Kontrollgruppe konnten 29 Zelllinien aus dem Blut von zehn anonymen Spendern immortalisiert und entsprechend in das weitere Procedere einbezogen werden. Von allen 124 Zelllinien gelang erfolgreich die Isolation von Gesamt-RNA sowie die cDNA-Synthese mit darauffolgender Durchführung der qPCR. Das Verhältnis $A_{260\text{ nm}} : A_{280\text{ nm}}$ in der Absorptionsmessung lag für die RNA aller Zelllinien im Normbereich.

Bei den PBMC, die beim Ansetzen der Zellkulturen nicht mittels EBV immortalisiert, sondern nur mit Nährmedium aufgefüllt wurden, konnte sowohl bei MS- als auch bei Kontrollprobanden kein spontanes Wachstum von LCL beobachtet werden.

4.3 Quantitative Echtzeit-PCR

Es wurde die Expression der EBV-spezifischen Gene EBNA-2 und -1 sowie der retroviralen Sequenzen HERV-K *GAG*, -H *ENV59*, -W1 *ENV* und -Fc1 *ENV* in lymphoblastoiden Zelllinien von MS-Patienten und gesunden Kontrollprobanden (im Folgenden MSLCL und coLCL) quantifiziert. Da pro Zelllinie zwei technische Replikate analysiert wurden, wurden insgesamt 190 Messwerte aus der MS- und 58 Messwerte aus der Kontrollgruppe in die statistische Auswertung aufgenommen.

Die Quantifizierung gelang für alle Gene außer HERV-Fc1 *ENV* bei allen Zelllinien, wobei einige cDNA-Proben bei abweichenden Schmelzkurven mehrfach quantifiziert werden mussten.

Bei HERV-Fc1 zeigten sich sowohl bei Patienten als auch bei Kontrollen in größerem Maße abweichende Schmelzprodukte bzw. eine quantitativ nicht detektierbare Expression; dies betraf 48 von 190 Messungen in der MS- und 21 von 58 Messungen in der Kontrollgruppe. In diesen Fällen wurde für die relative Genexpression der Wert „0“ für die statistische Berechnung verwendet. Insgesamt ließ sich für HERV-Fc1 *ENV* eine niedrige, teils unterhalb der Nachweisgrenze liegende Expression feststellen, während die verbleibenden Gene von allen LCL stabil exprimiert wurden.

4.4 Relative Genexpression von MS-Patienten und Kontrollen

Zunächst erfolgte die Gegenüberstellung der relativen Expression der untersuchten Gene zwischen den 32 MS-Patienten und den zehn Kontrollprobanden. Hier zeigte sich bei fünf der sechs Gene eine signifikante, 1,57- bis 1,9-fach höhere Genexpression in der MS- im Vergleich zur Kontrollgruppe. Lediglich die Expression von HERV-Fc1 *ENV* zeigte hier keine signifikante Differenz (siehe Tab. 10 und Abb. 4).

Tab. 10: Relative Genexpression von MS-Patienten (MSLCL) und Kontrollen (coLCL)

MW = Mittelwert, SD = standard deviation (Standardabweichung), p = Signifikanzwert (Welch-t-Test), Fettschreibung = statistisch signifikant

| Gen | <i>MW ± SD</i> | | <i>Differenz</i> MS – co | <i>Quotient</i> MS / co | <i>p</i> |
|----------------------------|------------------------|------------------------|-----------------------------|----------------------------|--------------------|
| | coLCL (<i>n</i> = 10) | MSLCL (<i>n</i> = 32) | | | |
| EBNA-2 | 0,6697 ± 0,2178 | 1,170 ± 0,4598 | 0,4998 | 1,75 | < 0,0001 |
| EBNA-1 | 0,8261 ± 0,6733 | 1,569 ± 1,263 | 0,7430 | 1,9 | 0,0225 |
| HERV-K <i>GAG</i> | 0,8026 ± 0,3557 | 1,258 ± 0,6531 | 0,4558 | 1,57 | 0,0085 |
| HERV-H <i>ENV59</i> | 1,2880 ± 1,005 | 2,403 ± 2,205 | 1,1150 | 1,87 | 0,0333 |
| HERV-W1 <i>ENV</i> | 0,8376 ± 0,3598 | 1,410 ± 0,7977 | 0,5721 | 1,68 | 0,0033 |
| HERV-Fc1 <i>ENV</i> | 0,9554 ± 0,7136 | 1,256 ± 1,032 | 0,3004 | 1,31 | 0,3119 |

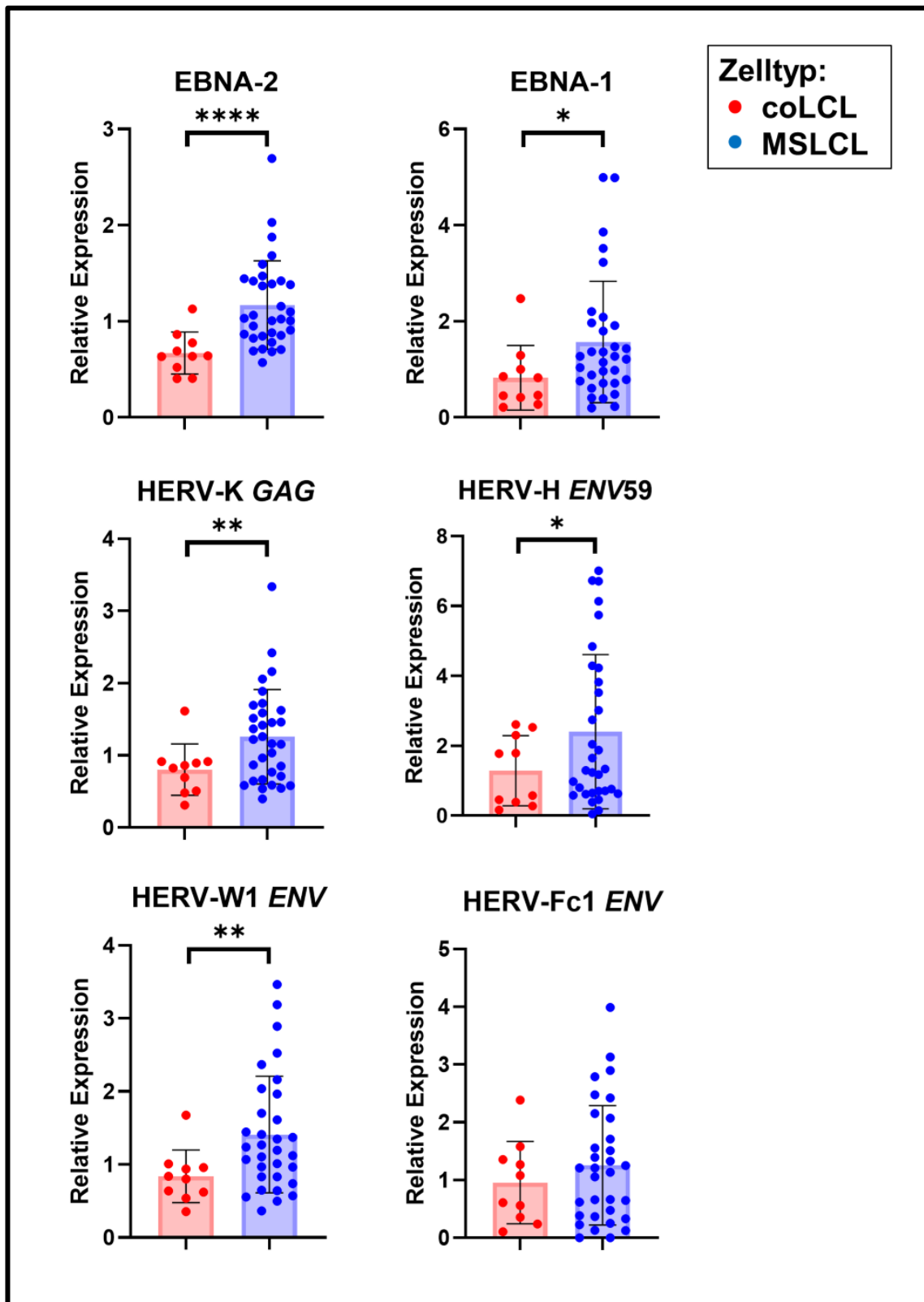


Abb. 4: Vergleich der Genexpression bei MS-Patienten und Kontrollen. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung der relativen Expressionen der bezeichneten Gene bei MS-Patienten (MSLCL) und Kontrollen (coLCL) sowie die relativen Expressionen aller eingeschlossenen Spender. Signifikanzen nach Welch-t-Test.

** = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$; **** = $p < 0,0001$.*

4.5 Geschlechtsabhängigkeit der Genexpression

Zunächst wurde die Genexpression zwischen Männern (m) und Frauen (w) des gesamten Probandenkollektives, das heißt unter Zusammenschluss von MS- und Kontrollgruppe, verglichen. Hier ließ sich für keines der beiden Geschlechter eine erhöhte Genexpression gegenüber dem anderen nachweisen (siehe Tab. 11).

Tab. 11: Relative Genexpression von Männern und Frauen

MW = Mittelwert, SD = standard deviation (Standardabweichung), p = Signifikanzwert (Welch-t-Test), Fettschreibung = statistisch signifikant

| Gen | MW ± SD | | Differenz w – m | Quotient w / m | p |
|---------------------|-------------------|-------------------|--------------------|-------------------|--------|
| | männlich (n = 16) | weiblich (n = 26) | | | |
| EBNA-2 | 1,011 ± 0,3904 | 1,075 ± 0,5121 | 0,06385 | 1,06 | 0,6511 |
| EBNA-1 | 1,392 ± 1,279 | 1,393 ± 1,153 | 0,0008125 | 1,0 | 0,9984 |
| HERV-K GAG | 1,112 ± 0,4792 | 1,173 ± 0,7061 | 0,06119 | 1,05 | 0,7400 |
| HERV-H ENV59 | 1,977 ± 1,729 | 2,237 ± 2,225 | 0,2597 | 1,13 | 0,6748 |
| HERV-W1 ENV | 1,151 ± 0,5811 | 1,349 ± 0,8470 | 0,1974 | 1,17 | 0,3765 |
| HERV-Fc1 ENV | 0,9477 ± 0,8580 | 1,330 ± 1,016 | 0,3822 | 1,4 | 0,2000 |

Anschließend erfolgte die Auswertung getrennt nach MS- und Kontrollgruppe. Hier ließ sich bei Frauen für die Gene EBNA-2, EBNA-1, HERV-K GAG und HERV-W1 ENV eine signifikant höhere Expression in der MS- im Vergleich zur Kontrollgruppe feststellen; dieser Expressionsunterschied war bei den männlichen Probanden nicht nachweisbar (siehe Abb. 5).

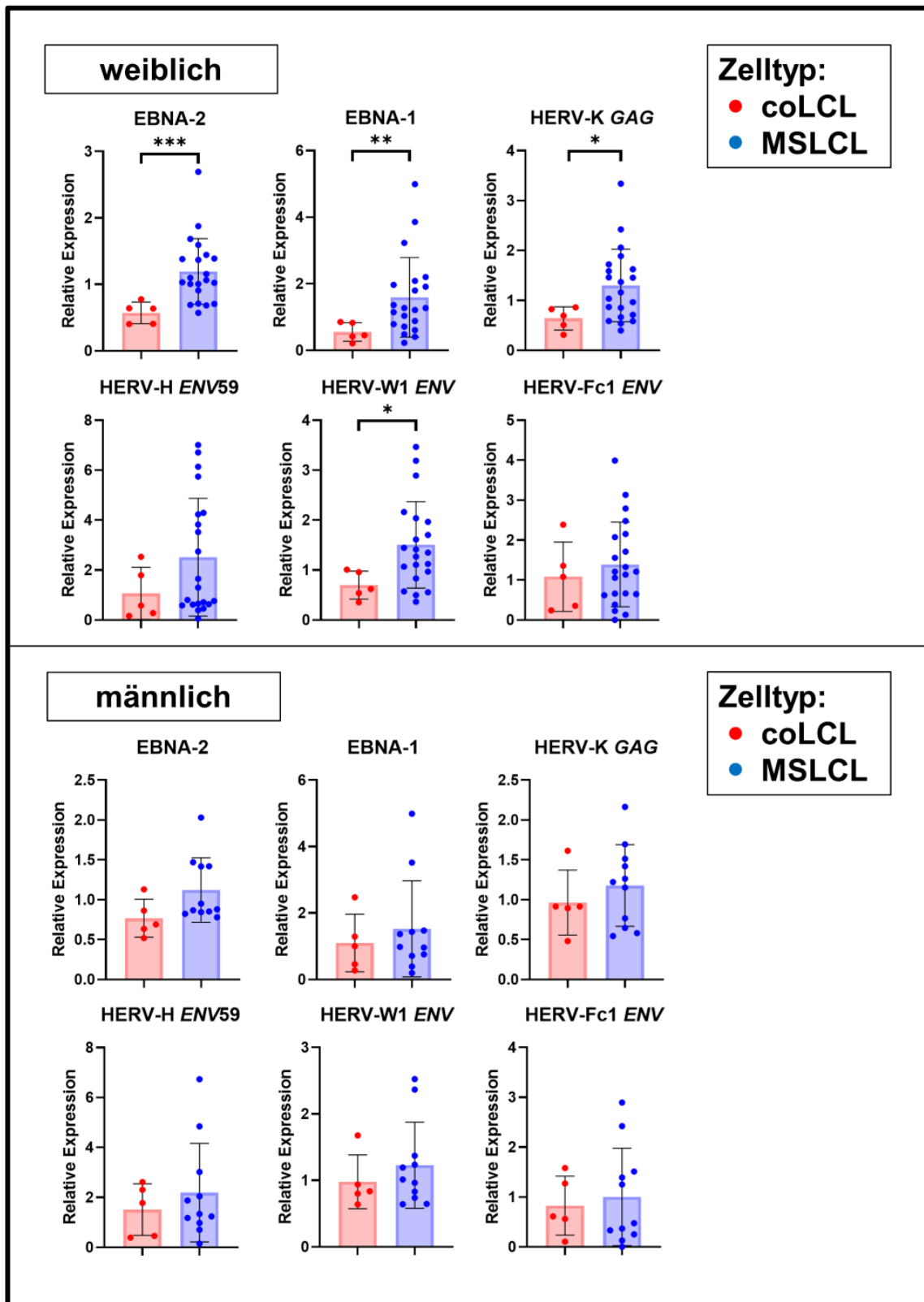


Abb. 5: Vergleich der Genexpression bei Männern und Frauen. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung der relativen Expressionen der bezeichneten Gene bei MS-Patienten (MSLCL) und Kontrollen (coLCL) sowie die relativen Expressionen aller eingeschlossenen Spender. Der obere Teil der Abbildung zeigt den Vergleich für Frauen, der untere den für Männer. Signifikanzen nach Dunnett-Test. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$; **** = $p < 0,0001$.

4.6 Korrelationen zwischen den untersuchten Genen

Die Expression der beiden EBV-Gene zeigte erwartungsgemäß sowohl bei den Patienten als auch bei den Kontrollen eine mittelstarke positive Korrelation zueinander (siehe Abb. 6).

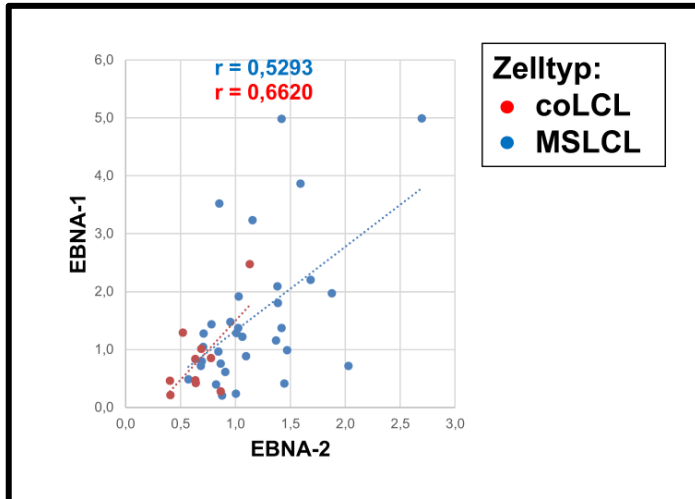


Abb. 6: Korrelationen zwischen EBNA-2 und -1. Dargestellt sind die relativen Expressionen der beiden Gene aller eingeschlossenen Spender aus MS- (MSLCL) und Kontrollgruppe (coLCL) sowie der Korrelationskoeffizient als Trendlinie.

Zwischen EBNA-2 bzw. -1 und den HERV-Genen ließen sich mehrfach signifikante Korrelationen feststellen (siehe Abb. 7 und Abb. 8); insbesondere die Expressionen von HERV-K GAG bzw. HERV-W1 ENV zeigten in der MS-Gruppe eine positive Korrelation mit EBNA-2, welche in der Kontrollgruppe nicht nachweisbar war.

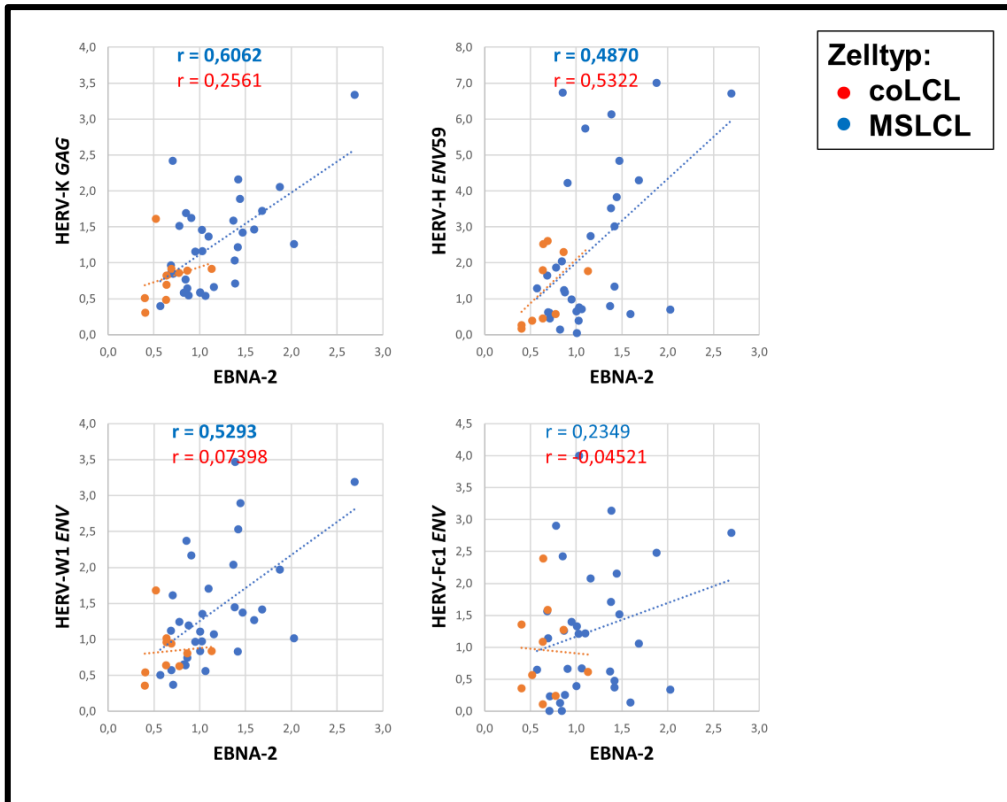


Abb. 7: Korrelationen zwischen EBNA-2 und endogenen Retroviren. Dargestellt sind die relativen Expressionen der bezeichneten Gene aller eingeschlossenen Spender aus MS- (MSLCL) und Kontrollgruppe (coLCL) sowie der Korrelationskoeffizient als Trendlinie.

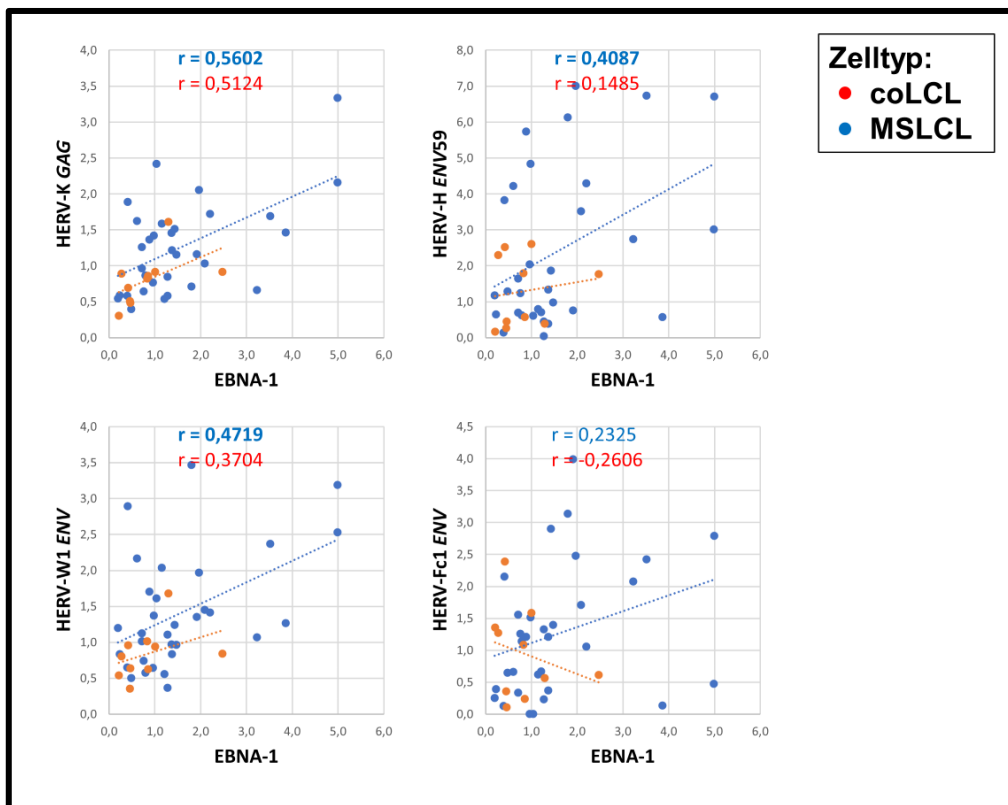


Abb. 8: Korrelationen zwischen EBNA-1 und endogenen Retroviren. Dargestellt sind die relativen Expressionen der bezeichneten Gene aller eingeschlossenen Spender aus MS- (MSLCL) und Kontrollgruppe (coLCL) sowie der Korrelationskoeffizient als Trendlinie.

Auch zwischen den retroviralen Genen zeigten sich bei den MS-Patienten Korrelationen, wobei HERV-K *GAG* und HERV-W1 *ENV* auch in der Kontrollgruppe eine starke positive Korrelation aufwiesen (siehe Abb. 9).

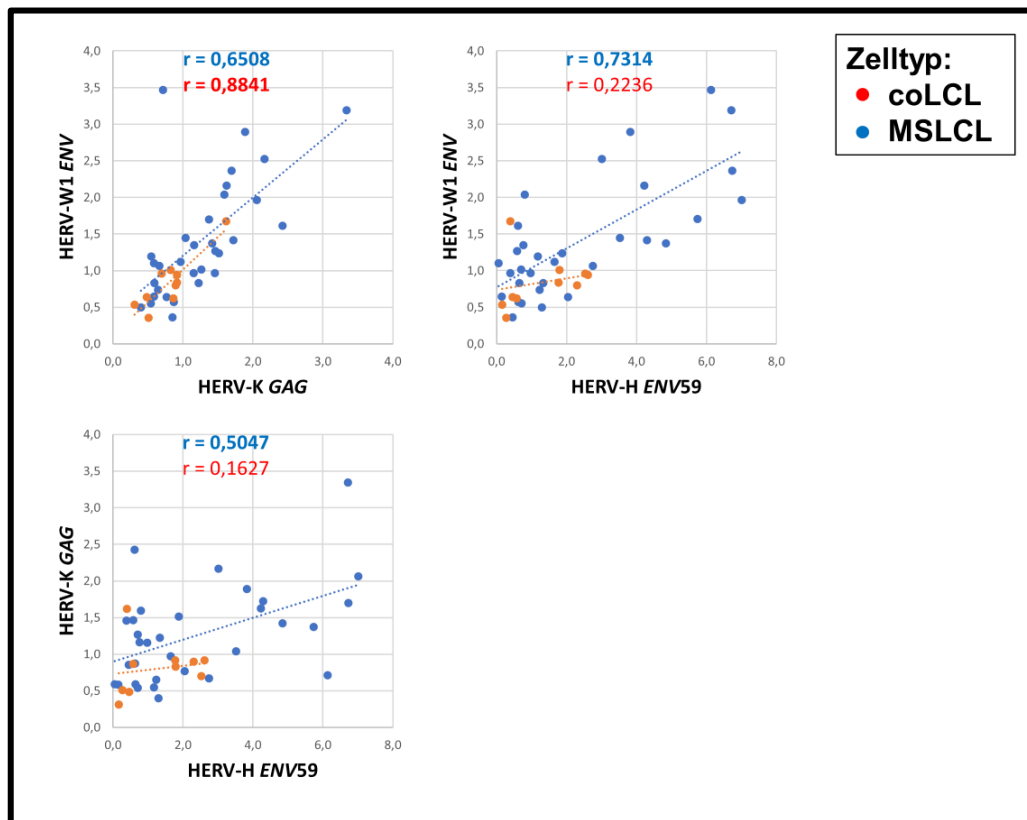


Abb. 9: Korrelationen zwischen ausgewählten Retroviren. Dargestellt sind die relativen Expressionen der bezeichneten HERV aller eingeschlossenen Spender aus MS- (MSLCL) und Kontrollgruppe (coLCL) sowie der Korrelationskoeffizient als Trendlinie. Es wurde sich auf die Darstellung signifikanter Korrelationen beschränkt.

Eine Übersicht über die Korrelationen zwischen allen untersuchten Genen findet sich in Tab. 12.

Tab. 12: Korrelationen der Genexpression bei MS-Patienten

blau = MSLCL, rot = coLCL, Fettschreibung = statistisch signifikant

r = Korrelationskoeffizient nach Pearson, p = Signifikanzwert (zweiseitiger, gepaarter t -Test)

| | | EBNA- 2 | EBNA- 1 | HERV- K GAG | HERV- H ENV59 | HERV- W1 ENV | HERV- Fc1 ENV |
|--------------------------|-------|-----------------|-----------------|---------------------|---------------------|-----------------|------------------|
| EBNA-2 | r | | 0,6620 | 0,2561 | 0,5322 | 0,07398 | -0,04521 |
| | (p) | | (0,0371) | (0,4751) | (0,1133) | (0,8390) | (0,9013) |
| EBNA-1 | r | 0,5293 | | 0,5124 | 0,1485 | 0,3704 | -0,2606 |
| | (p) | (0,0018) | | (0,1299) | (0,6823) | (0,2921) | (0,4671) |
| HERV-K GAG | r | 0,6062 | 0,5602 | | 0,1627 | 0,8841 | -0,08786 |
| | (p) | (0,0002) | (0,0009) | | (0,6534) | (0,0007) | (0,8093) |
| HERV-H ENV59 | r | 0,4870 | 0,4087 | 0,5047 | | 0,2236 | 0,7037 |
| | (p) | (0,0047) | (0,0202) | (0,0032) | | (0,5347) | (0,0231) |
| HERV- W1 ENV | r | 0,5293 | 0,4719 | 0,6508 | 0,7314 | | 0,1777 |
| | (p) | (0,0018) | (0,0064) | (<0,0001) | (<0,0001) | | (0,6234) |
| HERV- Fc1 ENV | r | 0,2349 | 0,2325 | 0,3104 | 0,5174 | 0,4962 | |
| | (p) | (0,1957) | (0,2003) | (0,0951) | (0,0024) | (0,0039) | |

4.7 Abhängigkeit der Genexpression von biographischen Patientendaten

Zum Auffinden möglicher Zusammenhänge zwischen der Genexpression und den, den Fragebögen entnommenen, Patientencharakteristika wurden die MS-Patienten entsprechend ihrer biographischen Daten in verschiedene Subgruppen eingeteilt.

4.7.1 Zusammenhänge mit nicht krankheitsspezifischen Patientendaten

Bezüglich der nicht MS-spezifischen Patientendaten ist im Rahmen dieser Arbeit nur ein Vergleich zwischen zwei oder mehr MS-Subgruppen möglich, da diese Informationen bei den anonymen Kontrollen aus Datenschutzgründen nicht erhoben werden konnten.

Bei jüngeren Patienten – hier festgelegt als unter 40 Jahren – zeigte sich eine signifikant stärkere Expression von EBNA-1 als bei älteren Patienten (siehe Abb. 10 und Tab. 13).

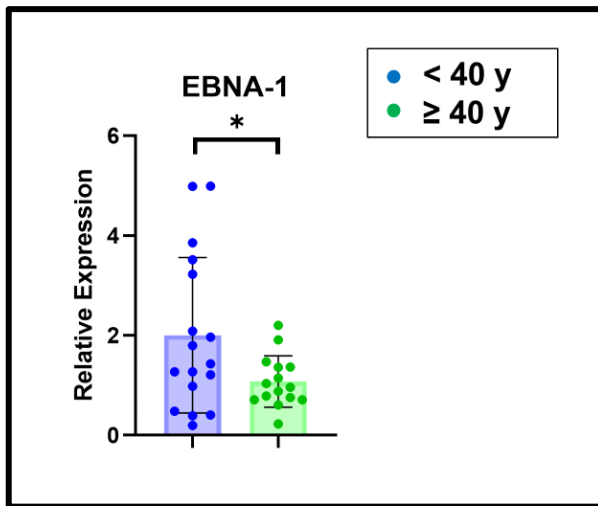


Abb. 10: Vergleich der Expression von EBNA-1 in Abhängigkeit vom Probandenalter bei Studieneintritt. Dargestellt sind die relativen Expressionen aller eingeschlossenen Spender mit Mittelwert und Standardabweichung pro Gruppe. Einteilung der MS-Patienten gemäß deren Alter bei Studieneintritt. Signifikanz nach Welch-t-Test. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$; **** = $p < 0,0001$.

In Abhängigkeit von Rauchverhalten und Vitamin-D-Status (siehe Tab. 13) konnten keine signifikanten Expressionsunterschiede nachgewiesen werden.

Tab. 13: Relative Genexpression in Abhängigkeit von nicht MS-spezifischen Patientendaten
 MW = Mittelwert, p = Signifikanzwert (Welch-t-Test), NR = Nichtraucher, n. b. = nicht bekannt, Fettschreibung = statistisch signifikant

| | | EBNA -2 | EBNA -1 | HERV- K GAG | HERV-H ENV59 | HERV- W1 ENV | HERV- Fc1 ENV |
|----------------------------------|-----|------------|---------------|----------------|-----------------|-----------------|------------------|
| Alter bei Studieneintritt | | | | | | | |
| < 40 y (n = 17) | MW | 1,242 | 2,004 | 1,262 | 2,991 | 1,597 | 1,471 |
| ≥ 40 y (n = 15) | MW | 1,088 | 1,076 | 1,255 | 1,738 | 1,197 | 1,012 |
| | p | 0,3430 | 0,0315 | 0,9761 | 0,1021 | 0,1474 | 0,2112 |
| Rauchverhalten | | | | | | | |
| Raucher (n = 11) | MW | 1,230 | 1,733 | 1,344 | 2,798 | 1,690 | 1,135 |
| NR (n = 21) | MW | 1,138 | 1,483 | 1,214 | 2,197 | 1,263 | 1,319 |
| | p | 0,5537 | 0,6139 | 0,5432 | 0,5007 | 0,1924 | 0,6177 |
| Vitamin-D-Mangel | | | | | | | |
| bekannt (n = 14) | MW | 1,210 | 1,666 | 1,361 | 2,295 | 1,360 | 1,534 |
| n. b. (n = 18) | MW | 1,138 | 1,494 | 1,179 | 2,487 | 1,448 | 1,039 |
| | p | 0,6815 | 0,7071 | 0,4719 | 0,8124 | 0,7548 | 0,2021 |

Auch bezüglich typischer viraler Infektionserkrankungen des Kinder- und Jugendalters ließ sich kein Zusammenhang feststellen (siehe Tab. 14).

Tab. 14: Relative Genexpression in Abhängigkeit von typischen viralen Infektionserkrankungen
MW = Mittelwert, p = Signifikanzwert (Welch-t-Test), Fettschreibung = statistisch signifikant

| | | EBNA- 2 | EBNA- 1 | HERV- K GAG | HERV-H ENV59 | HERV- W1 ENV | HERV- Fc1 ENV |
|---|-----------|--------------------|--------------------|------------------------|-------------------------|-------------------------|--------------------------|
| bekannter Z. n. Mumps | | | | | | | |
| ja (n = 12) | <i>MW</i> | 1,213 | 1,125 | 1,246 | 2,527 | 1,506 | 1,467 |
| nein (n = 20) | <i>MW</i> | 1,144 | 1,836 | 1,266 | 2,329 | 1,352 | 1,129 |
| | <i>p</i> | 0,6877 | 0,0719 | 0,9309 | 0,8180 | 0,6219 | 0,4332 |
| bekannter Z. n. Masern | | | | | | | |
| ja (n = 8) | <i>MW</i> | 1,241 | 1,120 | 1,107 | 2,066 | 1,519 | 1,615 |
| nein (n = 24) | <i>MW</i> | 1,146 | 1,719 | 1,309 | 2,516 | 1,373 | 1,136 |
| | <i>p</i> | 0,5971 | 0,0992 | 0,2989 | 0,6236 | 0,6828 | 0,3642 |
| bekannter Z. n. Röteln | | | | | | | |
| ja (n = 10) | <i>MW</i> | 1,142 | 1,303 | 1,229 | 2,453 | 1,402 | 1,477 |
| nein (n = 22) | <i>MW</i> | 1,182 | 1,690 | 1,272 | 2,381 | 1,413 | 1,155 |
| | <i>p</i> | 0,8035 | 0,3075 | 0,8615 | 0,9406 | 0,9728 | 0,5063 |
| bekannter Z. n. Windpocken | | | | | | | |
| ja (n = 21) | <i>MW</i> | 1,153 | 1,477 | 1,246 | 2,132 | 1,249 | 1,305 |
| nein (n = 11) | <i>MW</i> | 1,200 | 1,745 | 1,281 | 2,922 | 1,716 | 1,163 |
| | <i>p</i> | 0,7545 | 0,6038 | 0,8787 | 0,3350 | 0,1620 | 0,7002 |
| bekannter Z. n. infektiöser Mononukleose | | | | | | | |
| ja (n = 4) | <i>MW</i> | 1,070 | 2,128 | 1,283 | 1,023 | 1,149 | 0,5830 |
| nein (n = 28) | <i>MW</i> | 1,184 | 1,489 | 1,255 | 2,601 | 1,447 | 1,352 |
| | <i>p</i> | 0,6265 | 0,5084 | 0,9536 | 0,0665 | 0,2795 | 0,2233 |

4.7.2 Zusammenhänge mit krankheitsspezifischen Patientendaten

Da sich bestimmte Eigenschaften nur bei MS-Patienten beschreiben lassen, wurde hier ein Vergleich der Genexpression sowohl mit der Kontrollgruppe als auch zwischen den einzelnen Subgruppen durchgeführt. Es ließen sich diesbezüglich bei keiner der untersuchten Eigenschaften signifikante Unterschiede zwischen den MS-Subgruppen feststellen, sondern lediglich zwischen einzelnen Subgruppen und den Kontrollen (siehe Tab. 15). Aus diesem Grunde werden hier lediglich die Signifikanzwerte des Vergleichs zwischen MS-Sub- und Kontrollgruppen dargestellt. EBNA-2 zeigte bei den meisten Subgruppen gegenüber den Kontrollen eine signifikant erhöhte Expression ohne stärkere Unterschiede zwischen den MS-Gruppen.

Tab. 15: Relative Genexpression in Abhängigkeit von MS-spezifischen Patientendaten

MW = Mittelwert, p = Signifikanzwert (Dunnett-Test), LZ = Lebenszeit, Fettschreibung = signifikant

| | | EBNA- 2 | EBNA- 1 | HERV- K GAG | HERV-H ENV59 | HERV- W1 ENV | HERV- Fc1 ENV |
|---|----|---------------|---------------|----------------|-----------------|-----------------|------------------|
| coLCL (n = 10) | MW | 0,6697 | 0,8261 | 0,8026 | 1,288 | 0,8376 | 0,9554 |
| Alter bei Erstdiagnose | | | | | | | |
| ≤ 30 y (n = 15) | MW | 1,235 | 2,092 | 1,372 | 3,033 | 1,574 | 1,510 |
| | p | 0,0062 | 0,0412 | 0,0659 | 0,0569 | 0,0197 | 0,2944 |
| > 30 y (n = 17) | MW | 1,112 | 1,107 | 1,158 | 1,847 | 1,265 | 1,032 |
| | p | 0,0015 | 0,6048 | 0,1246 | 0,6978 | 0,1658 | 0,9944 |
| Krankheitsdauer | | | | | | | |
| < 10 y (n = 18) | MW | 1,090 | 1,781 | 1,139 | 2,289 | 1,385 | 1,079 |
| | p | 0,0118 | 0,1036 | 0,3561 | 0,3367 | 0,0983 | 0,9728 |
| ≥ 10 y (n = 14) | MW | 1,272 | 1,297 | 1,412 | 2,550 | 1,441 | 1,483 |
| | p | 0,0006 | 0,2392 | 0,0016 | 0,1665 | 0,0234 | 0,4122 |
| Krankheitsdauer | | | | | | | |
| < 20 % der LZ (n = 17) | MW | 1,063 | 1,482 | 1,125 | 2,108 | 1,313 | 1,064 |
| | p | 0,0245 | 0,2811 | 0,3929 | 0,5480 | 0,1823 | 0,9817 |
| ≥ 20 % der LZ (n = 15) | MW | 1,291 | 1,667 | 1,409 | 2,738 | 1,520 | 1,474 |
| | p | 0,0002 | 0,0957 | 0,0030 | 0,0599 | 0,0101 | 0,4104 |
| Anzahl Schübe in den letzten 2 y | | | | | | | |
| ≤ 1 (n = 16) | MW | 1,111 | 1,505 | 1,364 | 2,959 | 1,502 | 1,027 |
| | p | 0,0045 | 0,3043 | 0,0233 | 0,0535 | 0,0158 | 0,9935 |
| > 1 (n = 16) | MW | 1,228 | 1,633 | 1,153 | 1,847 | 1,318 | 1,485 |
| | p | 0,0026 | 0,0852 | 0,2588 | 0,7266 | 0,1740 | 0,4178 |
| Gehstrecke | | | | | | | |
| eingeschränkt (n = 11) | MW | 1,110 | 1,112 | 1,282 | 2,855 | 1,697 | 1,585 |
| | p | 0,0016 | 0,6153 | 0,0199 | 0,1304 | 0,0277 | 0,3638 |
| unbegrenzt (n = 21) | MW | 1,201 | 1,808 | 1,246 | 2,167 | 1,259 | 1,083 |
| | p | 0,0016 | 0,0484 | 0,1039 | 0,3649 | 0,1136 | 0,9653 |
| aktuelle Medikation | | | | | | | |
| Natalizumab (n = 14) | MW | 1,241 | 1,825 | 1,411 | 3,175 | 1,648 | 1,838 |
| | p | 0,0126 | 0,1822 | 0,0704 | 0,1002 | 0,0284 | 0,1277 |
| andere (n = 8) | MW | 1,061 | 0,9713 | 1,087 | 1,589 | 1,306 | 0,8331 |
| | p | 0,0707 | 0,9919 | 0,7666 | 0,9967 | 0,7036 | 0,9990 |
| keine (n = 10) | MW | 1,156 | 1,689 | 1,181 | 1,975 | 1,160 | 0,7784 |
| | p | 0,0490 | 0,4278 | 0,4991 | 0,9147 | 0,5408 | 0,9963 |

Patienten, die bei ihrem ersten Erkrankungsschub höchstens 30 Jahre alt waren, zeigten eine höhere Expression von EBNA-1 und HERV-W1 *ENV* als die Kontrollgruppe (siehe Abb. 11).

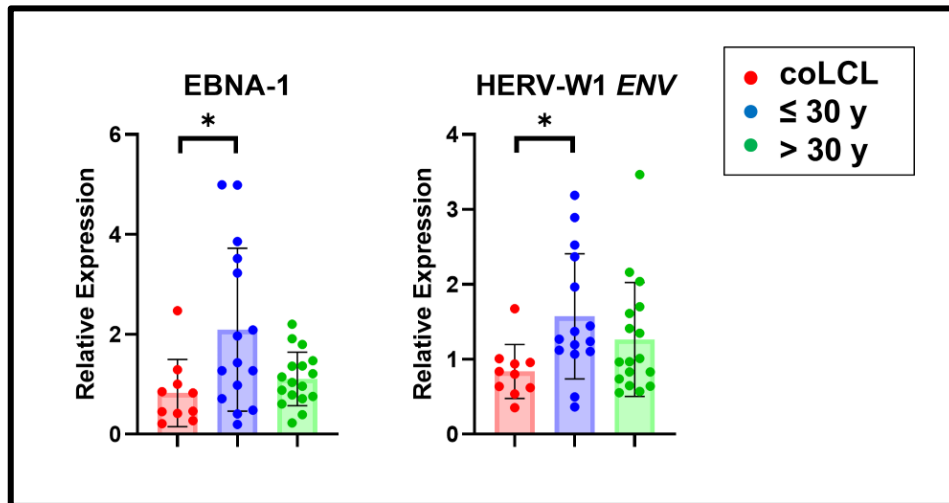


Abb. 11: Vergleich der Genexpression in Abhängigkeit vom Alter bei Erstdiagnose. Dargestellt sind die relativen Expressionen von EBNA-1 und HERV-W1 *ENV* aller eingeschlossenen Spender mit Mittelwert und Standardabweichung pro Gruppe. Einteilung der MS-Patienten gemäß deren Alter bei Erstdiagnose, coLCL = Kontrollgruppe.. Signifikanz nach Dunnett-Test. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$; **** = $p < 0,0001$.

Eine seit längerer Zeit vorliegende MS-Erkrankung – hier definiert als mindestens zehn Jahre bzw. mindestens 20 % der Lebenszeit – ging mit einer stärkeren Expression von HERV-K *GAG* einher (siehe Abb. 12).

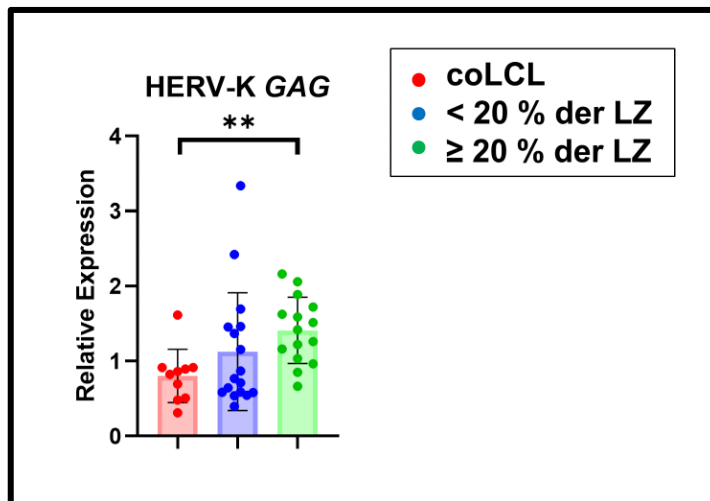


Abb. 12: Vergleich der Expression von HERV-K *GAG* in Abhängigkeit von der Lebenszeit (LZ) mit MS. Dargestellt sind die relativen Expressionen aller eingeschlossenen Spender mit Mittelwert und Standardabweichung pro Gruppe. Einteilung der MS-Patienten gemäß ihrer anteiligen Lebenszeit mit MS, coLCL = Kontrollgruppe.. Signifikanz nach Dunnett-Test. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$; **** = $p < 0,0001$.

Patienten mit MS-bedingt eingeschränkter Gehstrecke zeigten ein höheres Maß an Expression von HERV-W1 *ENV*. Demgegenüber ließ sich bei Probanden ohne Gehstreckeneinschränkung eine stärkere Expression von EBNA-1 feststellen (siehe Abb. 13).

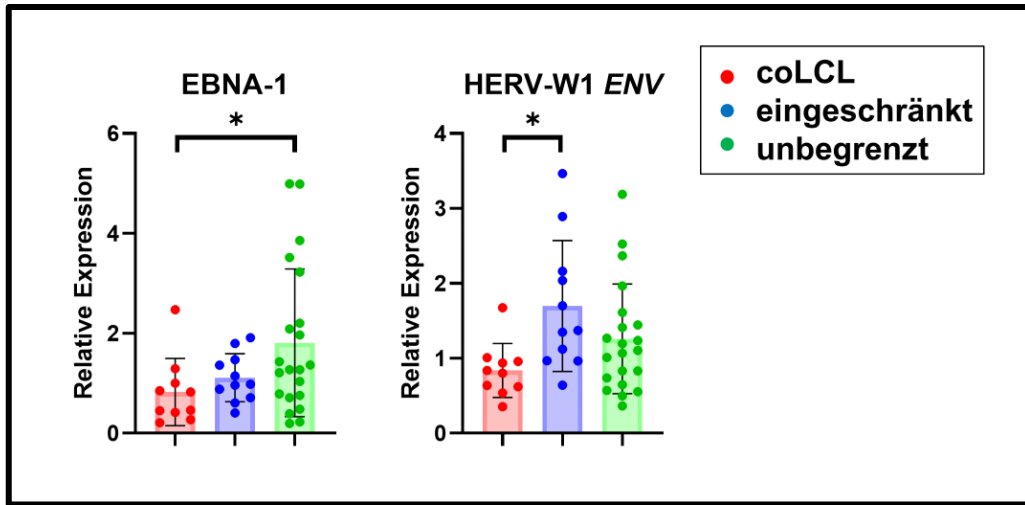


Abb. 13: Vergleich der Genexpression in Abhängigkeit von der MS-bedingten Gehstreckeneinschränkung. Dargestellt sind die relativen Expressionen von EBNA-1 und HERV-W1 *ENV* aller eingeschlossenen Spender mit Mittelwert und Standardabweichung pro Gruppe. Einteilung der MS-Patienten gemäß ihrer Gehstreckeneinschränkung, coLCL = Kontrollgruppe. Signifikanz nach Dunnett-Test. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$; **** = $p < 0,0001$.

Weiterhin zeigten Patienten mit aktueller Natalizumab-Therapie eine stärkere Expression von HERV-W1 *ENV* (siehe Abb. 14).

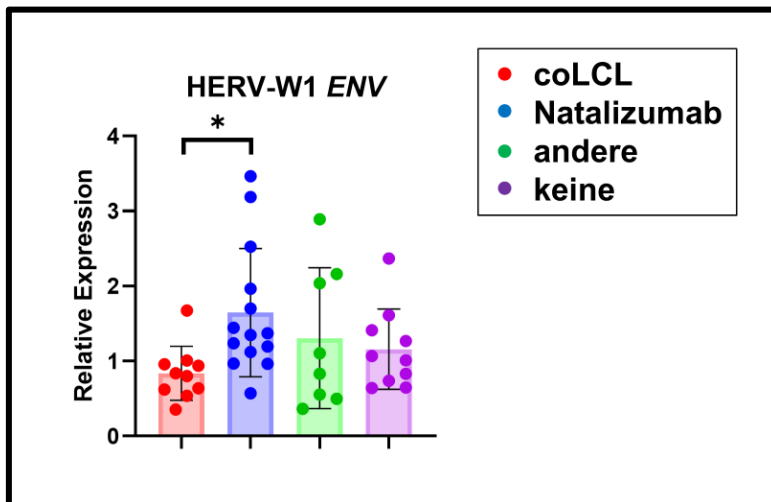


Abb. 14: Vergleich der Expression von HERV-W1 *ENV* in Abhängigkeit von der aktuellen MS-Medikation. Dargestellt sind die relativen Expressionen aller eingeschlossenen Spender mit Mittelwert und Standardabweichung pro Gruppe. Einteilung der MS-Patienten gemäß ihrer spezifischen Therapie, coLCL = Kontrollgruppe. Signifikanz nach Dunnett-Test. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$; **** = $p < 0,0001$.

4.7.3 Korrelationen zwischen Genexpression und ausgewählten biographischen Patientendaten

Zur Präzisierung potentieller Zusammenhänge wurde eine Korrelationsanalyse zwischen der Genexpression und dem Alter bei Studieneintritt, dem Alter bei erstem Krankheitsschub, der Dauer der Erkrankung und der Anzahl der Schübe in den letzten zwei Jahren durchgeführt (siehe Tab. 16).

Tab. 16: Korrelationen zwischen Genexpression und ausgewählten biographischen Patientendaten
r = Korrelationskoeffizient nach Pearson, *p* = Signifikanzwert (zweiseitiger, gepaarter *t*-Test),
 Fettschreibung = statistisch signifikant

| | EBNA-2 | EBNA-1 | HERV- K GAG | HERV- H ENV59 | HERV- W1 ENV | HERV- Fc1 ENV |
|---------------------------------------|---------------------|-----------------------------------|------------------------|--------------------------|-------------------------|----------------------------------|
| | <i>r (p)</i> | <i>r (p)</i> | <i>r (p)</i> | <i>r (p)</i> | <i>r (p)</i> | <i>r (p)</i> |
| Alter bei Studieneintritt | -0,1276 (0,4863) | -0,5803 (0,0005) | -0,09713 (0,5969) | -0,1885 (0,3016) | -0,1856 (0,3090) | -0,1048 (0,5681) |
| Alter bei erstem MS-Schub | -0,3080 (0,0864) | -0,4925 (0,0042) | -0,1825 (0,3174) | -0,2182 (0,2303) | -0,1971 (0,2796) | -0,2053 (0,2597) |
| Krankheitsdauer [y] | 0,2774 (0,1243) | -0,1342 (0,4641) | 0,1314 (0,4734) | 0,04591 (0,8030) | 0,01789 (0,9226) | 0,1546 (0,3980) |
| Krankheitsdauer [% LZ] | 0,2944 (0,1020) | -0,000139 (0,9994) | 0,1450 (0,4283) | 0,1201 (0,5125) | 0,05355 (0,7710) | 0,1888 (0,3007) |
| Anzahl Schübe (letzte 2 y) | 0,1130 (0,5379) | 0,1123 (0,5406) | -0,1356 (0,4594) | 0,07807 (0,6710) | 0,2655 (0,1420) | 0,4007 (0,0231) |

Es zeigte sich eine jeweils negative Korrelation zwischen dem Patientenalter bei Studieneintritt bzw. bei erstem MS-Schub und der EBNA-1-Expression (siehe Abb. 15). Außerdem ließ sich eine schwache positive Korrelation zwischen der Anzahl der Schübe und der Expression von HERV-Fc1 ENV feststellen. Eine Korrelation zwischen Erkrankungsdauer und Genexpression ließ sich nicht nachweisen.

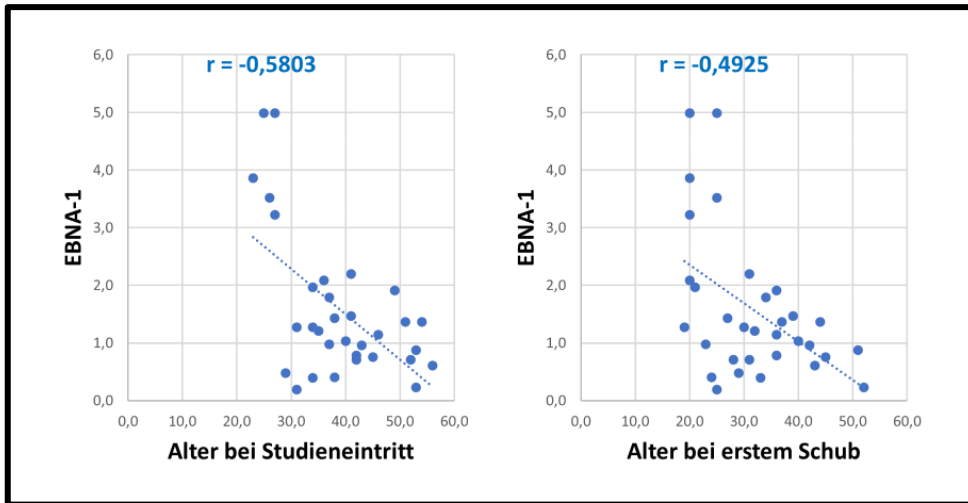


Abb. 15: Korrelationen zwischen EBNA-1 und dem Alter bei Studieneintritt sowie beim ersten Schub. Dargestellt sind die relativen Genexpressionen aller eingeschlossenen Patienten in Abhängigkeit von deren Alter sowie der Korrelationskoeffizient als Trendlinie.

5 Diskussion

In dieser Arbeit wurde die Expression von EBV- und HERV-Genen in lymphoblastoiden Zelllinien (LCL) von MS-Patienten und gesunden Spendern relativ quantifiziert. Ziel war es, mögliche Expressionsunterschiede zwischen den beiden Gruppen darzustellen und Korrelationen mit potenziellen MS-Risikofaktoren und Patienteneigenschaften sowie zwischen den verschiedenen Genen aufzufinden. LCL bieten sich hierfür an, da es sowohl *in vitro* als auch *in vivo* nach Infektion mit EBV zur Etablierung solcher kommt.

5.1 Methodisches Vorgehen und Fehlerbetrachtung

Bei der Probandenauswahl wirkt einschränkend, dass die Patienten verschiedene MS-Therapien erhielten, deren Einfluss auf die Genexpression nicht genau bekannt ist, und dass diese sich in verschiedenen Krankheitsstadien befanden (von Erstdiagnose bis zu einer seit vielen Jahren bestehenden Erkrankung). Bei den Kontrollspendern war lediglich das Geschlecht bekannt, sodass ein Vergleich mit der Patientengruppe bezüglich einiger biographischer Daten nicht möglich war. Die geringere Anzahl an eingeschlossenen Kontrollprobanden wurde durch eine eingeschränkte Verfügbarkeit bedingt. Deren Blut wurde aus Spenden der Transfusionsmedizin bezogen, sodass es sich um eine begrenzte Ressource handelte, die vor allem auch der klinischen Nutzung dient. Eine Verwendung von Frischblut gesunder Spender ausschließlich im Rahmen dieser Studie, war durch das Ethikvotum nicht abgedeckt.

Einer geringen Zahl an Probanden – auch innerhalb der MS-Subgruppenanalyse – wurde begegnet, indem sowohl biologische als auch technische Replikate für jeden Spender angefertigt und ausgewertet wurden.

Das Epstein-Barr-Virus zeigt eine hohe Seroprävalenz von etwa 95 % in der erwachsenen Bevölkerung. Der individuelle Serostatus der Probanden in dieser Studie, sowohl der Patienten als auch der Kontrollen, war nicht bekannt. Bei MS-Patienten ist von einer EBV-Seroprävalenz von praktisch 100 % auszugehen (Abrahamyan et al. 2020; Bjornevik et al. 2022). In dieser Arbeit wird eine solche sowohl für Patienten als auch für Kontrollen angenommen.

Die Immortalisierung der PBMC (mononukleäre Zellen des peripheren Blutes) erfolgte mit Überständen desselben EBV-Stammes und somit des gleichen EBV-Gentyps. In den Zellkulturansätzen, die nicht mittels EBV immortalisiert wurden, zeigte sich bei keinem der Spender ein spontanes Wachstum. Durch das Fehlen von Wachstumsfaktoren in den isolierten PBMC und dem gewählten Medium (siehe Abschnitt 3.1.2) kam es erwartungsgemäß zu keiner Zellvermehrung. Nach dem Zugeben von Viruspartikeln jedoch kommt es zu einer frischen Infektion der Zellen, wodurch stabile und vitale Zelllinien entstehen können.

Die Isolation der Gesamt-RNA mit Hilfe der *single-step*-Methode und die cDNA-Synthese wurden gemäß etablierter Standards für die geplante weitere Verwendung durchgeführt.

Das Verhältnis $A_{260\text{ nm}} : A_{280\text{ nm}}$ bei der Absorptionsspektrometrie lag für alle Zelllinien zwischen 2,05 und 2,18, sodass von einer ausreichenden Reinheit der isolierten RNA auszugehen war.

Aus den Ergebnissen der qPCR wurde die relative Genexpression nach der $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Methode berechnet. Als Referenzen wurde HPRT-1 (Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase 1, Enzym des Purinstoffwechsels) verwendet. Dessen Expression zeigte sich in allen Zelllinien – wie bei einem *housekeeping gene* zu erwarten – stabil und es ließen sich keine abweichenden Schmelzprodukte feststellen. Somit ist von einer zuverlässigen Standardisierung und Vergleichbarkeit der Zielgene auszugehen.

5.1.1 HERV-Fc1 ENV

Für HERV-Fc1 *ENV* wurden bei der qPCR in größerem Maße abweichende Schmelzprodukte oder eine Expression unterhalb der Nachweisgrenze festgestellt (insgesamt 69 von 248 Messungen in beiden Studiengruppen), weshalb auf eine weitere Diskussion der Daten bezüglich dieses Genproduktes verzichtet wird. Um hier belastbare Daten zu finden, sollten entweder die Verwendung eines anderen Primers oder aber die Durchführung einer höheren Zahl an PCR-Zyklen reevaluiert werden.

5.2 Einordnung des Patientenkollektives

Die MS zeichnet sich durch ein vorwiegendes Auftreten im jungen Erwachsenenalter (Erstdiagnose meist zwischen dem 20. und 40. Lebensjahr) und einer Bevorzugung des weiblichen Geschlechts aus. Die Patientengruppe in dieser Arbeit war bei Auftreten des ersten Krankheitsschubes im Durchschnitt 31,8 Jahre alt, der Anteil der Frauen lag bei 65,6 %. Dies entspricht in der Tendenz den epidemiologischen Zahlen in Deutschland. So zeigt sich die höchste altersspezifische Inzidenz bei den 25- bis 39-jährigen, der Anteil der Frauen an der Prävalenz liegt bei 72,3 % (Holstiege et al. 2017).

Bei allen Patienten bestand die Diagnose einer schubförmig remittierenden MS (RRMS). Diese Verlaufsform ist mit anteilig 78,9 % die häufigste in Deutschland (Stahmann und Haas 2021). Im Sinne einer besseren Vergleichbarkeit wurden in diese Arbeit nur Patienten mit schubförmigem Verlauf eingeschlossen.

In Tab. 17 ist die Symptommhäufigkeit beim Auftreten des ersten Krankheitsschubes in der Patientengruppe dieser Arbeit verglichen mit den epidemiologischen Daten der DMSG (Deutsche Multiple Sklerose Gesellschaft) aus dem Jahre 2020 dargestellt. Zwar zeigen sich leicht

abweichende Häufigkeiten, tendenziell entsprechen sich die Daten jedoch. Vor allem bestätigen sich Sensibilitäts- und Visusstörungen als häufigste Erstmanifestationen der MS.

Erwähnt werden muss, dass die Symptome in beiden Datensätzen unterschiedlich differenziert beziehungsweise beschrieben wurden, sodass eine Zuordnung und Vergleichbarkeit nur eingeschränkt möglich ist.

Insgesamt entspricht die einbezogene Patientengruppe also weitestgehend dem epidemiologischen Durchschnitt in Deutschland.

Tab. 17: Häufigkeit der Krankheitssymptome beim ersten MS-Schub

¹ (Stahmann und Haas 2021)

² entsprechend Spastik, Krämpfen, Paresen und Sprechstörungen

³ entsprechend Gangstörungen/Ataxie

| Symptomatik | Eigenes Patientenkollektiv | MS-Register 2020 ¹ |
|--|-------------------------------|----------------------------------|
| Sensibilitätsstörung | 68,8 % | 47,7 % |
| Visusstörung | 59,4 % | 32,8 % |
| motorische Störungen ² | 28,1 % | 30,8 % |
| Kleinhirn-/Hirnstammfunktionsstörungen ³ | 46,9 % | 17,6 % / 16,0 % |
| affektive/kognitive Störung, Fatigue, psychiatrisch | 28,1 % | 10,0 % |
| Blasen-/Darmfunktionsstörung | 9,4 % | 6,0 % / 1,7 % |
| sexuelle Störungen | 3,1 % | 1,7 % |

5.3 Die nukleären EBV-Antigene als Krankheitsfaktoren

Sowohl EBNA-2 als auch EBNA-1 zeigten eine signifikant höhere Expression in MS-Patienten als in Kontrollprobanden. Die meisten Studien, die eine Quantifizierung dieser Gene vornehmen, tun dies indirekt über den Nachweis spezifischer Antikörper. Demgegenüber wurde in der vorliegenden Arbeit direkt die RNA beziehungsweise cDNA quantifiziert.

EBNA-2:

In LCLs konnte gezeigt werden, dass mehrere MS-Risiko-Loci in der Nähe von EBNA-2-Bindungsstellen liegen und dass diese im Vergleich zu nicht infizierten „normalen“ B-Lymphozyten dysreguliert sind (Afrasiabi et al. 2019; Ricigliano et al. 2015). EBV ist dadurch in der Lage, die Expression dieser Risikogene zu beeinflussen (Keane et al. 2021b). Ferner sind verschiedene EBNA-2-Allele mit einem erhöhten Erkrankungsrisiko assoziiert als andere

(Varvatsi et al. 2021; Mechelli et al. 2015). Korrelationen mit weiteren untersuchten Daten zeigten sich für EBNA-2 nicht.

EBNA-1:

In einer Studie konnten in LCL von MS-Patienten erhöhte Antikörper gegen EBNA-1 nachgewiesen werden, nicht aber bei Gesunden; ferner wurde eine verringerte Immunreaktion durch CD8-positive T-Zellen beobachtet (Pender et al. 2009). Diese sind normalerweise in der Lage, EBV-infizierte Zellen auszuschalten. Im Blut von MS-Patienten kommt es nach Stimulation mit EBNA-1 zu einer erhöhten humoralen Immunantwort in Form einer erhöhten mRNA-Expression von Interleukin-2 und Interferon- γ verglichen mit Gesunden (Rafiee et al. 2021). Auch für EBNA-1 konnte eine Abhängigkeit des MS-Risikos vom Vorliegen bestimmter Allele gezeigt werden (Varvatsi et al. 2021).

In der vorliegenden Studie zeigte EBNA-1 zum Zeitpunkt der Untersuchung bei jüngeren Patienten eine deutlich stärkere Expression, auch ein negativer Zusammenhang zwischen Alter bei Studieneintritt und der Expressionsstärke konnte nachgewiesen werden. Außerdem ließ sich eine negative Korrelation zwischen dem Alter bei Erstdiagnose und der EBNA-1-Expression feststellen. Passend dazu zeigten Studien, dass es eine Assoziation zwischen hohen EBNA-1-Titern bei Diagnosestellung und einer geringeren Latenz zwischen klinischer Manifestation einer EBV-Infektion und der Erstmanifestation einer MS gibt (Endriz et al. 2017).

Dass die Expression von EBNA-1 vor allem bei Patienten ohne ausgeprägte krankheitsassoziierte Behinderung (im Sinne einer verringerten Gehstrecke) erhöht war, ist am ehesten dadurch zu erklären, dass EBNA-1 bei jüngeren Patienten mit einem kürzeren Verlauf seit Erstdiagnose der MS verstärkt exprimiert wurde (siehe Tab. 13 und 15 sowie Abb. 10 und 12).

Mehrere Studien zeigten auch einen Zusammenhang zwischen EBNA-1-Expression beziehungsweise -Immunreaktion und der Krankheitsaktivität (Farrell et al. 2009; Mrad et al. 2021; Lünemann et al. 2010). Demgegenüber konnten in der vorliegenden Studie keine Korrelation zu den uns bekannten Patientenangaben (Gehstreckeneinschränkung, Schübe, Verlaufsform) feststellen. Auch in einer britischen Population konnte kein Zusammenhang zwischen Anti-EBNA-1-Titern und Alter bei Erstdiagnose, Krankheitsdauer und krankheitsbedingter Behinderung festgestellt werden (Ingram et al. 2010).

Insgesamt also scheint klar, dass EBNA-1 im Zusammenhang mit MS steht. Unklar verbleibt, ob es eine relevante Rolle im Pathomechanismus spielt und inwiefern es den Krankheitsverlauf beeinflusst.

5.4 Erhöhte Expression von HERV-K, -H und -W

HERV-K:

HERV-K *GAG* zeigte eine signifikant höhere Expression bei MS-Patienten. In unserer Gruppe wurde die HERV-K-Transkription mittels RNA-Sequenzierung weiter differenziert, wobei HERV-K18 die stärkste Expression zeigte (Wieland et al. 2022). Dies bestätigt Beobachtungen, die bereits in anderen Publikationen beschrieben wurden (La Hera et al. 2013; Tai et al. 2008). Die Expression von HERV-K *GAG* zeigte eine signifikante Korrelation mit EBNA-2 (siehe Abb. 7), wobei sich die Beobachtung auf MS-Patienten beschränkte. Für HERV-K18 wurde auch eine Transaktivierung durch EBV beschrieben (Sutkowski et al. 2004; Sutkowski et al. 2001): Diese wird über die Bindung des Glykoprotein 350 an den Rezeptor CD21 ruhender B-Lymphozyten vermittelt (Hsiao et al. 2006), über welchen auch die Endozytose des Virus in die Wirtszelle initiiert wird. HERV-K18 *env* wirkt darüber hinaus als Superantigen und ist so in der Lage, primäre T-Lymphozyten in großer Menge zu aktivieren und so eine starke und potentiell überschießende Immunreaktion auszulösen (Sutkowski et al. 2001). Die Korrelation zwischen dem EBV-Antigen EBNA-2 und HERV-K *GAG* könnte statistischer Ausdruck dieser Transaktivierung sein. Die Immunreaktion kann mit den vorliegenden Daten nicht nachgewiesen werden.

Patienten mit längerer Krankheitsdauer zeigten eine stärkere HERV-K-Expression. Diese Beobachtung suggeriert, dass Retroviren nicht nur bei Erkrankungsbeginn eine Rolle spielen, sondern auch für eine längere Manifestation beziehungsweise die Aufrechterhaltung der MS von Bedeutung sein können.

HERV-H:

Auch HERV-H *ENV59* zeigte eine stärkere Expression bei MS-Patienten; bis auf eine geringfügige positive Korrelation mit EBNA-2 und -1 waren keine weiteren Zusammenhänge feststellbar. Für HERV-H *ENV62* besteht Evidenz, dass es ein Risikofaktor für MS sein könnte (Brudek et al. 2009; Brütting et al. 2016). Aufgrund der großen statistischen Standardabweichung lassen sich aus den vorliegenden Ergebnissen keine belastbaren Aussagen zu einer Beteiligung des untersuchten Retrovirus treffen.

HERV-W:

Wie für die schon erwähnten retroviralen Sequenzen ließ sich auch bei HERV-W1 *ENV* eine signifikant höhere Expression bei MS-Patienten feststellen. In PBMC wurden in verschiedenen Studien bereits erhöhte Expressionslevel von Syncytin-1 in MS-Patienten verglichen mit Kontrollen beschrieben (Garcia-Montojo et al. 2020). Auch eine erhöhte Expression in

zerebralem Gewebe von MS-Patienten im Vergleich zu gesundem Gewebe konnte gezeigt werden (Laufer et al. 2009; Antony et al. 2006).

Möglicherweise ist die Infektion mit EBV der entscheidende Faktor, der im Rahmen einer genetischen Prädisposition bei MS-Patienten zu einer pathologisch erhöhten Transkription von HERV-W1 *ENV* führt. Es zeigte sich hier eine positive Korrelation zwischen der Expression dieses retroviralen Elements mit EBNA-2 und geringer auch EBNA-1, welche sich auf die Patientengruppe beschränkte. In italienischen Populationen konnten neben einer Korrelation zwischen EBNA-1-Titern und MSR-V-Expression (Mameli et al. 2013) vor allem eine Transaktivierung der HERV-W-Expression – sowohl MSR-V als auch HERV-W1 – durch EBV festgestellt werden, welche über das EBV-Glykoprotein 350 und unter Beteiligung von NF- κ B (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells*) vermittelt wird (Mameli et al. 2012).

Patienten mit einer eingeschränkten Gehstrecke im Sinne einer dauerhaften Behinderung zeigten eine signifikant höhere HERV-W1 *ENV*-Expression in der qRT-PCR als Kontrollen und auch tendenziell höhere als Patienten ohne Einschränkungen. Für MSR-V konnte mehrfach eine Korrelation zwischen dem Retrovirus – in Form von DNA aus PBMC, dem Nachweis des Hüllproteins in PBMC-Kulturen oder der RNA- und DNA-Quantifizierung im Liquor – und krankheitsbedingten Einschränkungen beziehungsweise der Krankheitsaktivität beschrieben werden (Garcia-Montojo et al. 2013; García-Montojo et al. 2014; Rolland et al. 2005; Sotgiu et al. 2006; Sotgiu et al. 2010). Ferner stellten wir eine tendenziell höhere Expression von HERV-W1 *ENV* bei jungen Patienten fest. Möglicherweise ist eine stärkere Expression also mit einer höheren Krankheitsaktivität und in diesem Zusammenhang auch mit einer früheren klinischen Manifestation assoziiert.

5.4.1 Korrelationen zwischen verschiedenen Retroviren

Zwischen mehreren endogenen Retroviren konnte eine positive Korrelation festgestellt werden (siehe Tab. 12). Die größte zeigte sich zwischen HERV-K *GAG* und -W1 *ENV* und war sowohl bei MS-Patienten als auch bei Kontrollen feststellbar. Eine Korrelation zwischen HERV-H *ENV59* und -W1 *ENV* sowie geringer auch zwischen HERV-H *ENV59* und -K *GAG* beschränkte sich auf MS-Patienten. Dies könnte dafür sprechen, dass nicht nur mehrere Retroviren an der Pathogenese beteiligt sind, sondern sich auch gegenseitig in ihrer Expression und Aktivität beeinflussen. Weitere Untersuchungen diesbezüglich könnten Aufschluss geben.

5.5 Die Rolle verschiedener Risiko- und Krankheitsfaktoren auf die Genexpression

5.5.1 Frauen als prädisponiertes Geschlecht der Multiplen Sklerose

Bei Frauen zeigte sich eine signifikant höhere Expression beider EBV-Gene bei MS-Erkrankten (siehe Abb. 5 und Tab. 11), was bei Männern nicht nachweisbar war. Aufgrund der in den Subgruppen niedrigen Probandenzahlen (Frauen 21 : 5 und Männer 11 : 5) ist diese Beobachtung nicht als signifikant zu werten, ist aber aufgrund der Geschlechterpräferenz der MS durchaus plausibel. So konnte gezeigt werden, dass sowohl das Geschlecht als auch Östrogen die Expression bestimmter MS-Risiko- und EBV-Gene beeinflussen (Keane et al. 2021a). Ebenda zeigte sich eine negative Korrelation zwischen EBNA-2 und dem, unter anderem antiinflammatorisch wirksamen (Ysraelit und Correale 2019), ESR2 (Östrogenrezeptor), was entsprechend mit einem proinflammatorischen Zusammenhang zwischen EBNA-2 und Östrogen vereinbar wäre. Interessanterweise konnte in einer Kohorte in Norddeutschland gezeigt werden, dass erwachsene Frauen häufiger eine Seropositivität bezüglich EBV aufweisen als Männer – abhängig vom Messverfahren lag der Unterschied zwischen dem Faktor 1,9 und 5,5 – und ebenfalls über höhere Antikörpertiter verfügten (im Median etwa um den Faktor 1,5) (Wagner et al. 1994).

Auch für HERV-K und -W ließ sich eine signifikant höhere Expression bei MS-Erkrankten in der Gruppe der Frauen nachweisen, auch hier mit oben genannter Einschränkung. In einem Mausmodell konnte nach Simulation einer Virusinfektion eine höhere Expression retroviraler Elemente in verschiedenen ZNS-Regionen nachgewiesen werden, wobei hier weibliche Mäuse einen deutlich höheren Anstieg der Genexpression zeigten (Cipriani et al. 2022). Für die HERV-K-Familie ist ebenfalls eine Transaktivierung durch weibliche Sexualhormone – wenn auch hier im Zusammenhang mit dem Mammakarzinom – beschrieben (Ejthadi et al. 2005; Golan et al. 2008; Nguyen et al. 2019). Für HERV-W1 *ENV* lassen sich diesbezüglich keine belastbaren Daten finden.

Zusammenfassend lassen sich sowohl für EBV-spezifische Gene als auch für endogene Retroviren Hinweise finden, dass eine Transaktivierung mit weiblichen Sexualhormonen im Zusammenhang stehen könnte, was einen vielversprechenden Ansatz zur Erklärung der Geschlechterpräferenz der MS darstellt.

5.5.2 Rauchverhalten

Es besteht Evidenz, dass Rauchen ein relevanter Faktor für die Entstehung und einen aggressiveren Verlauf der MS ist (Rosso und Chitnis 2020; Arneth 2020). In mehreren Arbeiten konnte eine Assoziation zwischen dem Rauchstatus und der Antikörperreaktion auf EBNA nachgewiesen werden (Simon et al. 2010; Hedström et al. 2020), doch auch gegenläufige Ergebnisse wurden beschrieben (Sundqvist et al. 2012). Bezüglich des Zusammenhangs zwischen dem Rauchverhalten und der Expression von endogenen Retroviren bei MS-Patienten gibt es keine Studien.

Hier wurden die Patienten eingeteilt in Raucher und Nichtraucher; ein Einfluss des Rauchverhaltens auf die Expression konnte für keines der untersuchten Gene nachgewiesen werden.

5.5.3 Vitamin-D-Status

Wir konnten keine signifikanten Expressionsunterschiede sowohl für die EBV- als auch für die HERV-Gene in Abhängigkeit vom Vitamin-D-Status feststellen. Demgegenüber ist die Studienlage für eine Rolle des Vitamin D als Risikofaktor der MS sehr vielversprechend.

Es gibt epidemiologisch reichlich Evidenz, dass ein Mangel an Vitamin D das Risiko für die Entwicklung einer MS erhöht (Rhead et al. 2016; Munger et al. 2004; McLaughlin et al. 2018). Außerdem rückt zunehmend die Wirksamkeit einer Vitamin-D-Supplementation als MS-Therapie ins Blickfeld. Aktuelle Studien konnten hierbei eine Reduktion von Fatigue (López-Muñoz et al. 2023; Lin et al. 2024) und radiologischen Läsionen (Langlois und Denimal 2023; Galus et al. 2023) sowie eine Immunmodulation, welche zu einer Reduktion der krankheitsbedingten Behinderung führt (Sparaco und Bonavita 2024), feststellen. Weiterhin konnte ein Zusammenhang zwischen dem Vorliegen von Vitamin-D-Rezeptor-Polymorphismen und dem MS-Risiko nachgewiesen werden (Imani et al. 2019).

Die immunmodulatorische Wirkung von Vitamin D umfasst in diesem Zusammenhang vor allem die Regulation von T- und B-Zelldifferenzierung und der Aktivität monozytärer Zellen sowie auf humoraler Ebene eine Erhöhung des antiinflammatorischen Interleukin-10 und eine Reduktion des proinflammatorischen Interleukin-17. Auch hat es einen positiven Einfluss auf die Integrität der Blut-Hirn-Schranke, deren Schädigung bekannter Teil des Pathomechanismus der MS ist (Galoppin et al. 2022; Carlberg und Mycko 2023).

Bezüglich der Rolle des EBV in diesem Zusammenhang gibt es Hinweise, dass eine inverse Korrelation zwischen dem Vitamin-D-Spiegel und der Immunreaktion auf EBNA-1 besteht; auch teilen sich EBNA-2 und der Vitamin-D-Rezeptor (VDR) DNA-Bindungsstellen, die als MS-Risiko-Loci gelten (Marcucci und Obeidat 2020). Möglicherweise könnte ein Mangel an Vitamin

D somit diese Bindungsstellen für EBV-Antigene freigeben beziehungsweise könnten durch eine Supplementation die Bindungsstellen besetzt und somit vor den Virusantigenen protektiert werden. Demgegenüber könnte auch die Bindung der EBNA die Bindung des VDR und somit die antiinflammatorische Wirkung des Vitamins hemmen.

Methodisch ist diese Arbeit dadurch eingeschränkt, dass die Angaben zum Vitamin-D-Status anamnestisch durch die Patienten erhoben wurden, wobei vielen Probanden dieser nicht bekannt war und auch keine sichere Aussage zur tatsächlichen aktuellen oder zurückliegenden Serumkonzentration gemacht werden kann. Eine objektive Erhebung der Vitamin-D-Konzentration und möglicherweise eine prospektive Untersuchung einer Substitution wären notwendig, um hier eine verlässlichere Aussage treffen zu können.

5.5.4 Andere Infektionskrankheiten

Während EBV als gesicherter Risikofaktor für die Entstehung der MS gilt, wurden und werden auch andere Viren als mögliche ätiologische Faktoren diskutiert. Dafür spricht zum Beispiel die Wirksamkeit einer Interferontherapie. Für verschiedene Herpesviren, zum Beispiel VZV, ist eine Reaktivierung unter immunmodulierender MS-Therapie beschrieben (Tarlinton et al. 2020). Eine überzeugende Evidenz besteht allerdings nur für das Epstein-Barr-Virus.

Wir konnten bezüglich anderer durchgemachter Infektionserkrankungen keine Expressionsunterschiede nachweisen. Auch hier basieren die Angaben auf anamnestischen Aussagen und sind somit nur bedingt objektivierbar. Eine Bestimmung des Serostatus der Patienten bezüglich der untersuchten Viruserkrankungen wäre sinnvoll, um eine zuverlässige Beurteilung treffen zu können.

5.5.5 Die Auswirkungen immunmodulierender Therapien

In dieser Studie zeigten Patienten, die unter Therapie mittels Natalizumab standen ($n = 14$), eher eine höhere Expression von HERV-W1 *ENV* als die Kontrollgruppe ($n = 10$; $p = 0,01$) beziehungsweise als Patienten ohne oder mit einer anderen Therapie ($n = 8$; nicht signifikant). Dies könnte darauf zurückgeführt werden, dass Patienten mit einer Natalizumab-Therapie eine höhere Krankheitsaktivität besitzen, da das Medikament primär für dieses Patientenkollektiv indiziert ist, und dass hier nicht der zeitliche Verlauf der Expression unter Therapie, sondern eine einzeitige Messung durchgeführt wurde.

Absehbares Ziel solcher Studien sollte es sein, neue Therapiemöglichkeiten für Erkrankungen wie die Multiple Sklerose zu etablieren. Natalizumab zeigt vor allem bei der RRMS gute Ergebnisse (Havrdova et al. 2009). Der Wirkmechanismus des humanisierten monoklonalen Antikörpers wird über die Bindung an die $\alpha 4$ -Untereinheit von Integrinen peripherer Immunzellen

vermittelt, was die Interaktion mit Endothelzellen und somit die Extravasation im Rahmen einer Inflammation attenuiert. Eine italienische Gruppe konnte zeigen, dass Natalizumab bei Patienten mit RRMS auch die Expression von Retroviren der HERV-W-Familie reduziert beziehungsweise die Antikörperreaktion auf diese moduliert (Arru et al. 2015; Arru et al. 2014).

Bezüglich der anderen HERV und der EBV-Gene zeigte sich in dieser Arbeit keine Abhängigkeit der Expression von der aktuellen MS-Therapie. Mehrere Studien beschreiben passend dazu keinen Einfluss einer Natalizumab-Therapie auf die Antikörperreaktion gegen EBNA-1 (Castellazzi et al. 2015; Raffel et al. 2014). Demgegenüber haben bisher zwei Studien gezeigt, dass der Anti-CD20-Antikörper Ocrelizumab, welcher auch in der MS-Therapie verwendet wird, durchaus die humorale Reaktion auf EBNA-1 reduziert (Zivadinov et al. 2022; Pham et al. 2023). Äquivalente Daten für Rituximab bestehen bisher nicht. Eine Auswertung diesbezüglich ist in dieser Arbeit aufgrund der geringen Zahl, der mit Anti-CD20-Antikörpern therapierten Probanden, nicht möglich.

Insgesamt ist die Studienlage bezüglich des Einflusses einer spezifischen MS-Therapie, insbesondere mit Natalizumab, auf die Genexpression von endogenen Retroviren und auch EBV-Genen limitiert. Das hier angewandte Studiendesign ist eher nicht geeignet einen solchen Einfluss nachzuweisen, da hier mehrzeitige prospektive Messungen in einer Kohorte notwendig wären, um einen Verlauf beurteilen zu können.

6 Literaturverzeichnis

Abrahamyan S, Eberspächer B, Hoshi M-M, Aly L, Luessi F, Groppa S, Klotz L, Meuth SG, Schroeder C, Grüter T, Tackenberg B, Paul F, Then-Bergh F, Kümpfel T, Weber F, Stangel M, Bayas A, Wildemann B, Heesen C, Zettl U, Warnke C, Antony G, Hessler N, Wiendl H, Bittner S, Hemmer B, Gold R, Salmen A, Ruprecht K (2020) Complete Epstein-Barr virus seropositivity in a large cohort of patients with early multiple sclerosis. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* 91:681–686. doi:10.1136/jnnp-2020-322941

Afrasiabi A, Parnell GP, Fewings N, Schibeci SD, Basuki MA, Chandramohan R, Zhou Y, Taylor B, Brown DA, Swaminathan S, McKay FC, Stewart GJ, Booth DR (2019) Evidence from genome wide association studies implicates reduced control of Epstein-Barr virus infection in multiple sclerosis susceptibility. *Genome Medicine* 11:26. doi:10.1186/s13073-019-0640-z

Agrahari AK, Krishna Priya M, Praveen Kumar M, Tayubi IA, Siva R, Prabhu Christopher B, George Priya Doss C, Zayed H (2019) Understanding the structure-function relationship of HPRT1 missense mutations in association with Lesch-Nyhan disease and HPRT1-related gout by in silico mutational analysis. *Computers in Biology and Medicine* 107:161–171. doi:10.1016/j.combiomed.2019.02.014

Allday MJ, Crawford DH, Griffin BE (1989) Epstein-Barr virus latent gene expression during the initiation of B cell immortalization. *The Journal of general virology* 70 (Pt 7):1755–1764. doi:10.1099/0022-1317-70-7-1755

Alvarez-Lafuente R, García-Montojo M, Las Heras V de, Domínguez-Mozo MI, Bartolome M, Benito-Martin MS, Arroyo R (2008) Herpesviruses and human endogenous retroviral sequences in the cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients. *Multiple sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)* 14:595–601. doi:10.1177/1352458507086425

Angelini DF, Serafini B, Piras E, Severa M, Coccia EM, Rosicarelli B, Ruggieri S, Gasperini C, Buttari F, Centonze D, Mechelli R, Salvetti M, Borsellino G, Aloisi F, Battistini L (2013) Increased CD8+ T cell response to Epstein-Barr virus lytic antigens in the active phase of multiple sclerosis. *PLoS Pathogens* 9:e1003220. doi:10.1371/journal.ppat.1003220

Antony JM, van Marle G, Opii W, Butterfield DA, Mallet F, Yong VW, Wallace JL, Deacon RM, Warren K, Power C (2004) Human endogenous retrovirus glycoprotein-mediated induction of redox reactants causes oligodendrocyte death and demyelination. *Nat Neurosci* 7:1088–1095. doi:10.1038/nn1319

Antony JM, Izad M, Bar-Or A, Warren KG, Vodjgani M, Mallet F, Power C (2006) Quantitative analysis of human endogenous retrovirus-W env in neuroinflammatory diseases. *AIDS research and human retroviruses* 22:1253–1259. doi:10.1089/aid.2006.22.1253

Antony JM, Ellestad KK, Hammond R, Imaizumi K, Mallet F, Warren KG, Power C (2007) The human endogenous retrovirus envelope glycoprotein, syncytin-1, regulates neuroinflammation and its receptor expression in multiple sclerosis: a role for endoplasmic reticulum chaperones in astrocytes. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 179:1210–1224. doi:10.4049/jimmunol.179.2.1210

Antony JM, DesLauriers AM, Bhat RK, Ellestad KK, Power C (2011) Human endogenous retroviruses and multiple sclerosis: innocent bystanders or disease determinants? *Biochimica et biophysica acta* 1812:162–176. doi:10.1016/j.bbadis.2010.07.016

- Arneth B (2020) Multiple Sclerosis and Smoking. *The American Journal of Medicine* 133:783–788. doi:10.1016/j.amjmed.2020.03.008
- Arru G, Leoni S, Pugliatti M, Mei A, Serra C, Delogu LG, Manetti R, Dolei A, Sotgiu S, Mameli G (2014) Natalizumab inhibits the expression of human endogenous retroviruses of the W family in multiple sclerosis patients: a longitudinal cohort study. *Multiple sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)* 20:174–182. doi:10.1177/1352458513494957
- Arru G, Caggiu E, Leoni S, Mameli G, Pugliatti M, Sechi GP, Sechi LA (2015) Natalizumab modulates the humoral response against HERV-Wenv73-88 in a follow-up study of Multiple Sclerosis patients. *Journal of the Neurological Sciences* 357:106–108. doi:10.1016/j.jns.2015.07.007
- Ascherio A, Munger KL (2007) Environmental risk factors for multiple sclerosis. Part I: the role of infection. *Ann Neurol*. 61:288–299. doi:10.1002/ana.21117
- Baecher-Allan C, Kaskow BJ, Weiner HL (2018) Multiple Sclerosis: Mechanisms and Immunotherapy. *Neuron* 97:742–768. doi:10.1016/j.neuron.2018.01.021
- Balada E, Vilardell-Tarrés M, Ordi-Ros J (2010) Implication of human endogenous retroviruses in the development of autoimmune diseases. *International Reviews of Immunology* 29:351–370. doi:10.3109/08830185.2010.485333
- Baltimore D (1970) RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumour viruses. *Nature* 226:1209–1211. doi:10.1038/2261209a0
- Bénit L, Calteau A, Heidmann T (2003) Characterization of the low-copy HERV-Fc family: evidence for recent integrations in primates of elements with coding envelope genes. *Virology* 312:159–168. doi:10.1016/S0042-6822(03)00163-6
- Bernig T, Richter N, Volkmer I, Staeger MS (2014) Functional analysis and molecular characterization of spontaneously outgrown human lymphoblastoid cell lines. *Mol Biol Rep* 41:6995–7007. doi:10.1007/s11033-014-3587-6
- Bhetariya PJ, Kriesel JD, Fischer KF (2017) Analysis of Human Endogenous Retrovirus Expression in Multiple Sclerosis Plaques. *Journal of emerging diseases and virology* 3. doi:10.16966/2473-1846.133
- Bjornevik K, Cortese M, Healy BC, Kuhle J, Mina MJ, Leng Y, Elledge SJ, Niebuhr DW, Scher AI, Munger KL, Ascherio A (2022) Longitudinal analysis reveals high prevalence of Epstein-Barr virus associated with multiple sclerosis. *Science (New York, N.Y.)*. doi:10.1126/science.abj8222
- Bray PF, Luka J, Culp KW, Schlight JP (1992) Antibodies against Epstein-Barr nuclear antigen (EBNA) in multiple sclerosis CSF, and two pentapeptide sequence identities between EBNA and myelin basic protein. *Neurology* 42:1798–1804. doi:10.1212/WNL.42.9.1798
- Brock TD, Freeze H (1969) *Thermus aquaticus* gen. n. and sp. n., a nonsporulating extreme thermophile. *Journal of Bacteriology* 98:289–297. doi:10.1128/jb.98.1.289-297.1969
- Brouwer APM de, van Bokhoven H, Kremer H (2006) Comparison of 12 reference genes for normalization of gene expression levels in Epstein-Barr virus-transformed lymphoblastoid cell lines and fibroblasts. *Mol Diag Ther* 10:197–204. doi:10.1007/BF03256458
- Brudek T, Christensen T, Aagaard L, Petersen T, Hansen HJ, Møller-Larsen A (2009) B cells and monocytes from patients with active multiple sclerosis exhibit increased surface expression

- of both HERV-H Env and HERV-W Env, accompanied by increased seroreactivity. *Retrovirology* 6:104. doi:10.1186/1742-4690-6-104
- Brütting C, Emmer A, Kornhuber M, Staeger MS (2016) A survey of endogenous retrovirus (ERV) sequences in the vicinity of multiple sclerosis (MS)-associated single nucleotide polymorphisms (SNPs). *Mol Biol Rep* 43:827–836. doi:10.1007/s11033-016-4004-0
- Cagol A, Schaedelin S, Barakovic M et al (2022) Association of Brain Atrophy With Disease Progression Independent of Relapse Activity in Patients With Relapsing Multiple Sclerosis. *JAMA Neurol* 79:682–692. doi:10.1001/jamaneurol.2022.1025
- Carlberg C, Mycko MP (2023) Linking Mechanisms of Vitamin D Signaling with Multiple Sclerosis. *Cells* 12:2391. doi:10.3390/cells12192391
- Castellazzi M, Delbue S, Elia F, Gastaldi M, Franciotta D, Rizzo R, Bellini T, Bergamaschi R, Granieri E, Fainardi E (2015) Epstein-Barr Virus Specific Antibody Response in Multiple Sclerosis Patients during 21 Months of Natalizumab Treatment. *Disease Markers* 2015:901312. doi:10.1155/2015/901312
- Cencioni MT, Mattoscio M, Magliozzi R, Bar-Or A, Muraro PA (2021) B cells in multiple sclerosis - from targeted depletion to immune reconstitution therapies. *Nat Rev Neurol* 17:399–414. doi:10.1038/s41582-021-00498-5
- Cheriyian J, Kim S, Wolansky LJ, Cook SD, Cadavid D (2012) Impact of inflammation on brain volume in multiple sclerosis. *Arch Neurol* 69:82–88. doi:10.1001/archneurol.2011.674
- Christensen T, Dissing Sørensen P, Riemann H, Hansen HJ, Munch M, Haahr S, Møller-Larsen A (2000) Molecular characterization of HERV-H variants associated with multiple sclerosis. *Acta neurologica Scandinavica* 101:229–238. doi:10.1034/j.1600-0404.2000.101004229.x
- Christensen T, Sørensen PD, Hansen HJ, Møller-Larsen A (2003) Antibodies against a human endogenous retrovirus and the preponderance of env splice variants in multiple sclerosis patients. *Multiple sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)* 9:6–15. doi:10.1191/1352458503ms867oa
- Christensen T, Petersen T, Thiel S, Brudek T, Ellermann-Eriksen S, Møller-Larsen A (2007) Gene-environment interactions in multiple sclerosis: innate and adaptive immune responses to human endogenous retrovirus and herpesvirus antigens and the lectin complement activation pathway. *Journal of neuroimmunology* 183:175–188. doi:10.1016/j.jneuroim.2006.09.014
- Cipriani C, Tartaglione AM, Giudice M, D'Avorio E, Petrone V, Toschi N, Chiarotti F, Miele MT, Calamandrei G, Garaci E, Matteucci C, Sinibaldi-Vallebona P, Ricceri L, Balestrieri E (2022) Differential Expression of Endogenous Retroviruses and Inflammatory Mediators in Female and Male Offspring in a Mouse Model of Maternal Immune Activation. *International journal of molecular sciences* 23. doi:10.3390/ijms232213930
- Cox LM, Maghzi AH, Liu S, Tankou SK, Dhang FH, Willocq V, Song A, Wasén C, Tauhid S, Chu R, Anderson MC, Jager PL de, Polgar-Turcsanyi M, Healy BC, Glanz BI, Bakshi R, Chitnis T, Weiner HL (2021) Gut Microbiome in Progressive Multiple Sclerosis. *Ann Neurol* 89:1195–1211. doi:10.1002/ana.26084
- Cree BAC, Hollenbach JA, Bove R, Kirkish G, Sacco S, Caverzasi E, Bischof A, Gundel T, Zhu AH, Papinutto N, Stern WA, Bevan C, Romeo A, Goodin DS, Gelfand JM, Graves J, Green AJ, Wilson MR, Zamvil SS, Zhao C, Gomez R, Ragan NR, Rush GQ, Barba P, Santaniello A, Baranzini SE, Oksenberg JR, Henry RG, Hauser SL (2019) Silent progression in

- disease activity-free relapsing multiple sclerosis. *Ann Neurol.* 85:653–666.
doi:10.1002/ana.25463
- Didonna A, Oksenberg JR (2015) Genetic determinants of risk and progression in multiple sclerosis. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 449:16–22.
doi:10.1016/j.cca.2015.01.034
- Dunmire SK, Verghese PS, Balfour HH (2018) Primary Epstein-Barr virus infection. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology* 102:84–92. doi:10.1016/j.jcv.2018.03.001
- Ejthadi HD, Martin JH, Junying J, Roden DA, Lahiri M, Warren P, Murray PG, Nelson PN (2005) A novel multiplex RT-PCR system detects human endogenous retrovirus-K in breast cancer. *Arch Virol* 150:177–184. doi:10.1007/s00705-004-0378-8
- Elkjaer ML, Frisch T, Tonazzolli A, Röttger R, Reynolds R, Baumbach J, Illes Z (2021) Unbiased examination of genome-wide human endogenous retrovirus transcripts in MS brain lesions. *Multiple sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)* 27:1829–1837.
doi:10.1177/1352458520987269
- El-Sayed A, Aleya L, Kamel M (2021) Microbiota's role in health and diseases. *Environmental science and pollution research international* 28:36967–36983. doi:10.1007/s11356-021-14593-z
- Emmer A, Gerlach K, Staege, M.S. and Kornhuber, M.E. (2011) Superantigen-Mediated Encephalitis. In: Daisuke Hayasaka (Hrsg) *Pathogenesis of Encephalitis*. InTech, S 213–234
- Emmer A, Staege MS, Kornhuber ME (2014) The retrovirus/superantigen hypothesis of multiple sclerosis. *Cell Mol Neurobiol* 34:1087–1096. doi:10.1007/s10571-014-0100-7
- Endriz J, Ho PP, Steinman L (2017) Time correlation between mononucleosis and initial symptoms of MS. *Neurology® Neuroimmunology & Neuroinflammation* 4:e308.
doi:10.1212/NXI.0000000000000308
- Epstein A (2015) Why and How Epstein-Barr Virus Was Discovered 50 Years Ago. *Current topics in microbiology and immunology* 390:3–15. doi:10.1007/978-3-319-22822-8_1
- Farrell RA, Antony D, Wall GR, Clark DA, Fisniku L, Swanton J, Khaleeli Z, Schmierer K, Miller DH, Giovannoni G (2009) Humoral immune response to EBV in multiple sclerosis is associated with disease activity on MRI. *Neurology* 73:32–38.
doi:10.1212/WNL.0b013e3181aa29fe
- Filippi M, Rocca MA, Martino G, Horsfield MA, Comi G (1998) Magnetization transfer changes in the normal appearing white matter precede the appearance of enhancing lesions in patients with multiple sclerosis. *Ann Neurol.* 43:809–814. doi:10.1002/ana.410430616
- Firouzi R, Rolland A, Michel M, Jouvin-Marche E, Hauw JJ, Malcus-Vocanson C, Lazarini F, Gebuhrer L, Seigneurin JM, Touraine JL, Sanhadji K, Marche PN, Perron H (2003) Multiple sclerosis-associated retrovirus particles cause T lymphocyte-dependent death with brain hemorrhage in humanized SCID mice model. *Journal of neurovirology* 9:79–93.
doi:10.1080/13550280390173328
- Gale CR, Martyn CN (1995) Migrant studies in multiple sclerosis. *Progress in Neurobiology* 47:425–448. doi:10.1016/0301-0082(95)80008-V

- Galoppin M, Kari S, Soldati S, Pal A, Rival M, Engelhardt B, Astier A, Thouvenot E (2022) Full spectrum of vitamin D immunomodulation in multiple sclerosis: mechanisms and therapeutic implications. *Brain communications* 4:fcac171. doi:10.1093/braincomms/fcac171
- Galus W, Chmiela T, Walawska-Hrycek A, Krzystanek E (2023) Radiological Benefits of Vitamin D Status and Supplementation in Patients with MS-A Two-Year Prospective Observational Cohort Study. *Nutrients* 15. doi:10.3390/nu15061465
- Garcia-Montojo M, Dominguez-Mozo M, Arias-Leal A, Garcia-Martinez Á, las Heras V de, Casanova I, Faucard R, Gehin N, Madeira A, Arroyo R, Curtin F, Alvarez-Lafuente R, Perron H (2013) The DNA copy number of human endogenous retrovirus-W (MSRV-type) is increased in multiple sclerosis patients and is influenced by gender and disease severity. *PLOS ONE* 8:e53623. doi:10.1371/journal.pone.0053623
- Garcia-Montojo M, Rodriguez-Martin E, Ramos-Mozo P, Ortega-Madueño I, Dominguez-Mozo MI, Arias-Leal A, García-Martínez MÁ, Casanova I, Galan V, Arroyo R, Álvarez-Lafuente R, Villar LM (2020) Syncytin-1/HERV-W envelope is an early activation marker of leukocytes and is upregulated in multiple sclerosis patients. *European Journal of Immunology* 50:685–694. doi:10.1002/eji.201948423
- García-Montojo M, La Hera B de, Varadé J, La Encarnación A de, Camacho I, Domínguez-Mozo M, Árias-Leal A, García-Martínez A, Casanova I, Izquierdo G, Lucas M, Fedetz M, Alcina A, Arroyo R, Matesanz F, Urcelay E, Alvarez-Lafuente R (2014) HERV-W polymorphism in chromosome X is associated with multiple sclerosis risk and with differential expression of MSRV. *Retrovirology* 11:2. doi:10.1186/1742-4690-11-2
- Giebler M, Staeger MS, Blauschmidt S, Ohm LI, Kraus M, Würfl P, Taubert H, Greither T (2018) Elevated HERV-K Expression in Soft Tissue Sarcoma Is Associated with Worsened Relapse-Free Survival. *Front. Microbiol.* 9:211. doi:10.3389/fmicb.2018.00211
- Golan M, Hizi A, Resau JH, Yaal-Hahoshen N, Reichman H, Keydar I, Tsarfaty I (2008) Human endogenous retrovirus (HERV-K) reverse transcriptase as a breast cancer prognostic marker. *Neoplasia (New York, N.Y.)* 10:521–533. doi:10.1593/neo.07986
- Gombash SE, Lee PW, Sawdai E, Lovett-Racke AE (2022) Vitamin D as a Risk Factor for Multiple Sclerosis: Immunoregulatory or Neuroprotective? *Frontiers in neurology* 13:796933. doi:10.3389/fneur.2022.796933
- Gonzalez-Lorenzo M, Ridley B, Minozzi S, Del Giovane C, Peryer G, Piggott T, Foschi M, Filippini G, Tramacere I, Baldin E, Nonino F (2024) Immunomodulators and immunosuppressants for relapsing-remitting multiple sclerosis: a network meta-analysis. *The Cochrane Database of Systematic Reviews* 1:CD011381. doi:10.1002/14651858.CD011381.pub3
- Handel AE, Williamson AJ, Disanto G, Handunnetthi L, Giovannoni G, Ramagopalan SV (2010) An updated meta-analysis of risk of multiple sclerosis following infectious mononucleosis. *PLOS ONE* 5:e12496. doi:10.1371/journal.pone.0012496
- Hassani A, Corboy JR, Al-Salam S, Khan G (2018) Epstein-Barr virus is present in the brain of most cases of multiple sclerosis and may engage more than just B cells. *PloS one* 13:e0192109. doi:10.1371/journal.pone.0192109
- Hauk A (2013) Quantifizierung von DNA durch Absorptionsmessung. *Biologie in unserer Zeit* 43:278. doi:10.1002/biuz.201390093

- Havrdova E, Galetta S, Hutchinson M, Stefoski D, Bates D, Polman CH, O'Connor PW, Giovannoni G, Phillips JT, Lublin FD, Pace A, Kim R, Hyde R (2009) Effect of natalizumab on clinical and radiological disease activity in multiple sclerosis: a retrospective analysis of the Natalizumab Safety and Efficacy in Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis (AFFIRM) study. *The Lancet Neurology* 8:254–260. doi:10.1016/S1474-4422(09)70021-3
- Hedström AK, Huang J, Brenner N, Butt J, Hillert J, Waterboer T, Kockum I, Olsson T, Alfredsson L (2020) Smoking and Epstein-Barr virus infection in multiple sclerosis development. *Sci Rep* 10:10960. doi:10.1038/s41598-020-67883-w
- Hemmer B., Gehring K. et al. (2024) Diagnose und Therapie der Multiplen Sklerose, Neuromyelitis-optica-Spektrum-Erkrankungen und MOG-IgG-assoziierten Erkrankungen, S2k-Leitlinie; www.dgn.org/leitlinien. www.dgn.org/leitlinien. Zugegriffen: 24. März 2025
- Hoennscheidt C, Max D, Richter N, Staeger MS (2009) Expression of CD4 on Epstein-Barr virus-immortalized B cells. *Scandinavian Journal of Immunology* 70:216–225. doi:10.1111/j.1365-3083.2009.02286.x
- Holmøy T, Vartdal F (2004) Cerebrospinal fluid T cells from multiple sclerosis patients recognize autologous Epstein-Barr virus-transformed B cells. *Journal of neurovirology* 10:52–56. doi:10.1080/13550280490261671
- Holstiege J, Steffen A, Goffrier B, Bätzing J (2017) Epidemiologie der Multiplen Sklerose – Eine populationsbasierte deutschlandweite Studie. Zentralinstitut für die kassenärztliche Versorgung in Deutschland. Versorgungsatlas-Bericht Nr. 17/09. doi:10.20364/VA-17.09
- Holstiege J, Akmatov MK, Klimke K, Dammertz L, Kohring C, Marx C, Frahm N, Peters M, Ellenberger D, Zettl UK, Rommer PS, Stahmann A, Bätzing J (2022) Trends in administrative prevalence of multiple sclerosis and utilization patterns of disease modifying drugs in Germany. *Multiple Sclerosis and Related Disorders* 59:103534. doi:10.1016/j.msard.2022.103534
- Houen G, Ruprecht K (2023) Editorial: Epstein-Barr Virus and multiple sclerosis. *Frontiers in immunology* 14:1330181. doi:10.3389/fimmu.2023.1330181
- Hsiao FC, Lin M, Tai A, Chen G, Huber BT (2006) Cutting edge: Epstein-Barr virus transactivates the HERV-K18 superantigen by docking to the human complement receptor 2 (CD21) on primary B cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 177:2056–2060. doi:10.4049/jimmunol.177.4.2056
- Imani D, Razi B, Motallebnezhad M, Rezaei R (2019) Association between vitamin D receptor (VDR) polymorphisms and the risk of multiple sclerosis (MS): an updated meta-analysis. *BMC Neurol* 19:339. doi:10.1186/s12883-019-1577-y
- Ingram G, Bugert JJ, Loveless S, Robertson NP (2010) Anti-EBNA-1 IgG is not a reliable marker of multiple sclerosis clinical disease activity. *European journal of neurology* 17:1386–1389. doi:10.1111/j.1468-1331.2010.03083.x
- International Multiple Sclerosis Genetics Consortium (2019) Multiple sclerosis genomic map implicates peripheral immune cells and microglia in susceptibility. *Science (New York, N.Y.)* 365. doi:10.1126/science.aav7188
- John M Coffin, Stephen H Hughes, Harold E Varmus (1997) Genetic Organization. In: Coffin JM, Hughes SH, Varmus HE (Hrsg) *Retroviruses*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York

- Johnston JB, Silva C, Holden J, Warren KG, Clark AW, Power C (2001) Monocyte activation and differentiation augment human endogenous retrovirus expression: implications for inflammatory brain diseases. *Ann Neurol.* 50:434–442. doi:10.1002/ana.1131
- Jonge HJM de, Fehrmann RSN, Bont ESJM de, Hofstra RMW, Gerbens F, Kamps WA, Vries EGE de, van der Zee AGJ, te Meerman GJ, Elst A ter (2007) Evidence based selection of housekeeping genes. *PLOS ONE* 2:e898. doi:10.1371/journal.pone.0000898
- Kappos L, Wolinsky JS, Giovannoni G, Arnold DL, Wang Q, Bernasconi C, Model F, Koendgen H, Manfrini M, Belachew S, Hauser SL (2020) Contribution of Relapse-Independent Progression vs Relapse-Associated Worsening to Overall Confirmed Disability Accumulation in Typical Relapsing Multiple Sclerosis in a Pooled Analysis of 2 Randomized Clinical Trials. *JAMA Neurol* 77:1132–1140. doi:10.1001/jamaneurol.2020.1568
- Karimi A, Esmaili N, Ranjkesh M, Zolfaghari MA (2019) Expression of human endogenous retroviruses in pemphigus vulgaris patients. *Mol Biol Rep* 46:6181–6186. doi:10.1007/s11033-019-05053-6
- Karrer U, Nadal D (2014) Epstein-Barr-Virus und infektiöse Mononukleose. EMH Swiss Medical Publishers 14(11):226–232. doi:10.5167/uzh-96029
- Keane JT, Afrasiabi A, Schibeci SD, Fewings N, Parnell GP, Swaminathan S, Booth DR (2021a) Gender and the Sex Hormone Estradiol Affect Multiple Sclerosis Risk Gene Expression in Epstein-Barr Virus-Infected B Cells. *Frontiers in immunology* 12:732694. doi:10.3389/fimmu.2021.732694
- Keane JT, Afrasiabi A, Schibeci SD, Swaminathan S, Parnell GP, Booth DR (2021b) The interaction of Epstein-Barr virus encoded transcription factor EBNA2 with multiple sclerosis risk loci is dependent on the risk genotype. *EBioMedicine* 71:103572. doi:10.1016/j.ebiom.2021.103572
- Khalil M, Teunissen CE, Otto M, Piehl F, Sormani MP, Gattringer T, Barro C, Kappos L, Comabella M, Fazekas F, Petzold A, Blennow K, Zetterberg H, Kuhle J (2018) Neurofilaments as biomarkers in neurological disorders. *Nat Rev Neurol* 14:577–589. doi:10.1038/s41582-018-0058-z
- Khan O, Rieckmann P, Boyko A, Selmaj K, Zivadinov R (2013) Three times weekly glatiramer acetate in relapsing-remitting multiple sclerosis. *Ann Neurol.* 73:705–713. doi:10.1002/ana.23938
- Knipe DM, Howley PM (Hrsg) (2021) *Fields virology*, 5th edition, volume 2. Wolters Kluwer, Philadelphia, PA
- Koch MW, Metz LM, Kovalchuk O (2013) Epigenetic changes in patients with multiple sclerosis. *Nat Rev Neurol* 9:35–43. doi:10.1038/nrneurol.2012.226
- Kremer D, Schichel T, Förster M, Tzekova N, Bernard C, van der Valk P, van Horssen J, Hartung H-P, Perron H, Küry P (2013) Human endogenous retrovirus type W envelope protein inhibits oligodendroglial precursor cell differentiation. *Ann Neurol.* 74:721–732. doi:10.1002/ana.23970
- Kremer D, Gruchot J, Weyers V, Oldemeier L, Göttle P, Healy L, Ho Jang J, Kang T Xu Y, Volsko C, Dutta R, Trapp BD, Perron H, Hartung H-P, Küry P (2019) pHERV-W envelope protein fuels microglial cell-dependent damage of myelinated axons in multiple sclerosis. *PNAS* 116:15216–15225. doi:10.1073/pnas.1901283116

- La Hera B de, Varadé J, García-Montojo M, Lamas JR, La Encarnación A de, Arroyo R, Fernández-Gutiérrez B, Alvarez-Lafuente R, Urcelay E (2013) Role of the human endogenous retrovirus HERV-K18 in autoimmune disease susceptibility: study in the Spanish population and meta-analysis. *PLOS ONE* 8:e62090. doi:10.1371/journal.pone.0062090
- La Hera B de, Varadé J, García-Montojo M, Alcina A, Fedetz M, Alloza I, Astobiza I, Leyva L, Fernández O, Izquierdo G, Antigüedad A, Arroyo R, Álvarez-Lafuente R, Vandebroecck K, Matesanz F, Urcelay E (2014) Human endogenous retrovirus HERV-Fc1 association with multiple sclerosis susceptibility: a meta-analysis. *PLOS ONE* 9:e90182. doi:10.1371/journal.pone.0090182
- Lander ES, Linton LM, Birren B et al (2001) Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409:860–921. doi:10.1038/35057062
- Langlois J, Denimal D (2023) Clinical and Imaging Outcomes after Vitamin D Supplementation in Patients with Multiple Sclerosis: A Systematic Review. *Nutrients* 15. doi:10.3390/nu15081945
- Laska MJ, Brudek T, Nissen KK, Christensen T, Møller-Larsen A, Petersen T, Nexø BA (2012) Expression of HERV-Fc1, a human endogenous retrovirus, is increased in patients with active multiple sclerosis. *Journal of virology* 86:3713–3722. doi:10.1128/JVI.06723-11
- Laufer G, Mayer J, Mueller BF, Mueller-Lantsch N, Ruprecht K (2009) Analysis of transcribed human endogenous retrovirus W env loci clarifies the origin of multiple sclerosis-associated retrovirus env sequences. *Retrovirology* 6:37. doi:10.1186/1742-4690-6-37
- Levin LI, Munger KL, Rubertone MV, Peck CA, Lennette ET, Spiegelman D, Ascherio A (2005) Temporal relationship between elevation of epstein-barr virus antibody titers and initial onset of neurological symptoms in multiple sclerosis. *JAMA* 293:2496–2500. doi:10.1001/jama.293.20.2496
- Lezhnyova VR, Martynova EV, Khaiboullin TI, Urbanowicz RA, Khaiboullina SF, Rizvanov AA (2020) The Relationship of the Mechanisms of the Pathogenesis of Multiple Sclerosis and the Expression of Endogenous Retroviruses. *Biology* 9:464. doi:10.3390/biology9120464
- Life Technologies Corporation (2012) Real-time PCR handbook. Thermo Fisher Scientific. Waltham, MA
- Lin X, Zarghami A, Jelinek GA, Simpson-Yap S, Neate S, Nag N (2024) Diet and omega-3 and vitamin D supplement use predict five-year fatigue and disability trajectories in people with multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis and Related Disorders* 86:105615. doi:10.1016/j.msard.2024.105615
- Liu A, Manuel AM, Dai Y, Zhao Z (2022) Prioritization of risk genes in multiple sclerosis by a refined Bayesian framework followed by tissue-specificity and cell type feature assessment. *BMC genomics* 23:362. doi:10.1186/s12864-022-08580-y
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25:402–408. doi:10.1006/meth.2001.1262
- Loosen SH, Doege C, Meuth SG, Luedde T, Kostev K, Roderburg C (2022) Infectious mononucleosis is associated with an increased incidence of multiple sclerosis: Results from a cohort study of 32,116 outpatients in Germany. *Frontiers in immunology* 13:937583. doi:10.3389/fimmu.2022.937583

- López-Muñoz P, Torres-Costoso AI, Fernández-Rodríguez R, Guzmán-Pavón MJ, Arenas-Arroyo SN de, Basco-López JÁ, Reina-Gutiérrez S (2023) Effect of Vitamin D Supplementation on Fatigue in Multiple Sclerosis: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Nutrients* 15. doi:10.3390/nu15132861
- Lublin F, Miller DH, Freedman MS, Cree BAC, Wolinsky JS, Weiner H, Lubetzki C, Hartung H-P, Montalban X, Uitdehaag BMJ, Merschhemke M, Li B, Putzki N, Liu FC, Häring DA, Kappos L (2016) Oral fingolimod in primary progressive multiple sclerosis (INFORMS): a phase 3, randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet* (London, England) 387:1075–1084. doi:10.1016/S0140-6736(15)01314-8
- Lublin FD, Reingold SC, Cohen JA et al (2014) Defining the clinical course of multiple sclerosis: the 2013 revisions. *Neurology* 83:278–286. doi:10.1212/WNL.0000000000000560
- Lublin FD, Häring DA, Ganjgahi H, Ocampo A, Hatami F, Čuklina J, Aarden P, Dahlke F, Arnold DL, Wiendl H, Chitnis T, Nichols TE, Kieseier BC, Bermel RA (2022) How patients with multiple sclerosis acquire disability. *Brain : a journal of neurology* 145:3147–3161. doi:10.1093/brain/awac016
- Lünemann JD, Jelčić I, Roberts S, Lutterotti A, Tackenberg B, Martin R, Münz C (2008) EBNA1-specific T cells from patients with multiple sclerosis cross react with myelin antigens and co-produce IFN-gamma and IL-2. *J Exp Med* 205:1763–1773. doi:10.1084/jem.20072397
- Lünemann JD, Tintoré M, Messmer B, Strowig T, Rovira A, Perkal H, Caballero E, Münz C, Montalban X, Comabella M (2010) Elevated Epstein-Barr virus-encoded nuclear antigen-1 immune responses predict conversion to multiple sclerosis. *Ann Neurol*. 67:159–169. doi:10.1002/ana.21886
- Luttmann W, Bratke K, Küpper M, Myrtek D (2014) Zellseparation. In: Luttmann W, Bratke K, Küpper M, Myrtek D (Hrsg) *Der Experimentator: Immunologie*. Springer Spektrum, Berlin, Heidelberg, S 51–72
- Maeda E, Akahane M, Kiryu S, Kato N, Yoshikawa T, Hayashi N, Aoki S, Minami M, Uozaki H, Fukayama M, Ohtomo K (2009) Spectrum of Epstein-Barr virus-related diseases: a pictorial review. *Japanese journal of radiology* 27:4–19. doi:10.1007/s11604-008-0291-2
- Mager DL, Stoye JP (2015) Mammalian Endogenous Retroviruses. *Microbiology spectrum* 3:MDNA3-0009-2014. doi:10.1128/microbiolspec.MDNA3-0009-2014
- Mameli G, Poddighe L, Mei A, Uleri E, Sotgiu S, Serra C, Manetti R, Dolei A (2012) Expression and activation by Epstein Barr virus of human endogenous retroviruses-W in blood cells and astrocytes: inference for multiple sclerosis. *PLOS ONE* 7:e44991. doi:10.1371/journal.pone.0044991
- Mameli G, Madeddu G, Mei A, Uleri E, Poddighe L, Delogu LG, Maida I, Babudieri S, Serra C, Manetti R, Mura MS, Dolei A (2013) Activation of MSR V-type endogenous retroviruses during infectious mononucleosis and Epstein-Barr virus latency: the missing link with multiple sclerosis? *PLOS ONE* 8:e78474. doi:10.1371/journal.pone.0078474
- Marcucci SB, Obeidat AZ (2020) EBNA1, EBNA2, and EBNA3 link Epstein-Barr virus and hypovitaminosis D in multiple sclerosis pathogenesis. *Journal of Neuroimmunology* 339:577116. doi:10.1016/j.jneuroim.2019.577116

- McLaughlin L, Clarke L, Khalilidehkordi E, Butzkueven H, Taylor B, Broadley SA (2018) Vitamin D for the treatment of multiple sclerosis: a meta-analysis. *J Neurol* 265:2893–2905. doi:10.1007/s00415-018-9074-6
- Mechelli R, Manzari C, Policano C, Annese A, Picardi E, Umeton R, Fornasiero A, D'Erchia AM, Buscarinu MC, Agliardi C, Annibali V, Serafini B, Rosicarelli B, Romano S, Angelini DF, Ricigliano VAG, Buttari F, Battistini L, Centonze D, Guerini FR, D'alfonso S, Pesole G, Salvetti M, Ristori G (2015) Epstein-Barr virus genetic variants are associated with multiple sclerosis. *Neurology* 84:1362–1368. doi:10.1212/WNL.0000000000001420
- Mi S, Lee X, Li X, Veldman GM, Finnerty H, Racie L, LaVallie E, Tang XY, Edouard P, Howes S, Keith JC, McCoy JM (2000) Syncytin is a captive retroviral envelope protein involved in human placental morphogenesis. *Nature* 403:785–789. doi:10.1038/35001608
- Miller G, Lipman M (1973) Comparison of the yield of infectious virus from clones of human and simian lymphoblastoid lines transformed by Epstein-Barr virus. *The Journal of experimental medicine* 138:1398–1412. doi:10.1084/jem.138.6.1398
- Miller G, Shope T, Lisco H, Stitt D, Lipman M (1972) Epstein-Barr virus: transformation, cytopathic changes, and viral antigens in squirrel monkey and marmoset leukocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 69:383–387. doi:10.1073/pnas.69.2.383
- Miller AE, Wolinsky JS, Kappos L, Comi G, Freedman MS, Olsson TP, Bauer D, Benamor M, Truffinet P, O'Connor PW (2014) Oral teriflunomide for patients with a first clinical episode suggestive of multiple sclerosis (TOPIC): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *The Lancet Neurology* 13:977–986. doi:10.1016/S1474-4422(14)70191-7
- Montalban X, Matthews PM, Simpson A, Petrie JL, Sammon C, Ramagopalan S, Disanto G, Kuhle J (2023) Real-world evaluation of ocrelizumab in multiple sclerosis: A systematic review. *Annals of Clinical and Translational Neurology* 10:302–311. doi:10.1002/acn3.51732
- Montalban X. (2024) 2024 Revisions of the McDonald Criteria; <https://ectrims.eu/mcdonald-diagnostic-criteria>. Zugegriffen: 24. März 2025
- Morandi E, Tanasescu R, Tarlinton RE, Constantinescu CS, Zhang W, Tench C, Gran B (2017) The association between human endogenous retroviruses and multiple sclerosis: A systematic review and meta-analysis. *PloS one* 12:e0172415. doi:10.1371/journal.pone.0172415
- Mrad MF, Saba ES, Nakib L, Khoury SJ (2021) Exosomes From Subjects With Multiple Sclerosis Express EBV-Derived Proteins and Activate Monocyte-Derived Macrophages. *Neurology® Neuroimmunology & Neuroinflammation* 8. doi:10.1212/NXI.0000000000001004
- Mueller-Lantzsch N, Sauter M, Weiskircher A, Kramer K, Best B, Buck M, Grässer F (1993) Human endogenous retroviral element K10 (HERV-K10) encodes a full-length gag homologous 73-kDa protein and a functional protease. *AIDS research and human retroviruses* 9:343–350. doi:10.1089/aid.1993.9.343
- Mülhardt C (Hrsg) (2013) *Der Experimentator Molekularbiologie/Genomics*. Springer Spektrum, Berlin, Heidelberg
- Munger KL, Zhang SM, O'Reilly E, Hernán MA, Olek MJ, Willett WC, Ascherio A (2004) Vitamin D intake and incidence of multiple sclerosis. *Neurology* 62:60–65. doi:10.1212/01.WNL.0000101723.79681.38

- Munger KL, Levin LI, O'Reilly EJ, Falk KI, Ascherio A (2011) Anti-Epstein-Barr virus antibodies as serological markers of multiple sclerosis: a prospective study among United States military personnel. *Multiple sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)* 17:1185–1193. doi:10.1177/1352458511408991
- Neuroradiologie Inselspital Bern Multiple Sklerose (MS). <https://neurorad.insel.ch/de/unser-angebot/diagnostische-schwerpunkte/entzuendliche-erkrankungen-des-zentralen-nervensystems-und-multiple-sklerose/multiple-sklerose>. Zugegriffen: 25. März 2025
- Nguyen TD, Davis J, Eugenio RA, Liu Y (2019) Female Sex Hormones Activate Human Endogenous Retrovirus Type K Through the OCT4 Transcription Factor in T47D Breast Cancer Cells. *AIDS research and human retroviruses* 35:348–356. doi:10.1089/AID.2018.0173
- Nielsen TR, Rostgaard K, Nielsen NM, Koch-Henriksen N, Haahr S, Sørensen PS, Hjalgrim H (2007) Multiple sclerosis after infectious mononucleosis. *Arch Neurol* 64:72–75. doi:10.1001/archneur.64.1.72
- Nissen KK, Laska MJ, Hansen B, Pedersen FS, Nexø BA (2012) No additional copies of HERV-Fc1 in the germ line of multiple sclerosis patients. *Virology* 9:188. doi:10.1186/1743-422X-9-188
- O'Gorman C, Lin R, Stankovich J, Broadley SA (2013) Modelling genetic susceptibility to multiple sclerosis with family data. *Neuroepidemiology* 40:1–12. doi:10.1159/000341902
- Ordoñez-Rodríguez A, Roman P, Rueda-Ruzafa L, Campos-Rios A, Cardona D (2023) Changes in Gut Microbiota and Multiple Sclerosis: A Systematic Review. *International journal of environmental research and public health* 20. doi:10.3390/ijerph20054624
- Oturai DB, Søndergaard HB, Börnsen L, Sellebjerg F, Christensen JR (2016) Identification of Suitable Reference Genes for Peripheral Blood Mononuclear Cell Subset Studies in Multiple Sclerosis. *Scandinavian Journal of Immunology* 83:72–80. doi:10.1111/sji.12391
- Parseval N de, Casella J, Gressin L, Heidmann T (2001) Characterization of the three HERV-H proviruses with an open envelope reading frame encompassing the immunosuppressive domain and evolutionary history in primates. *Virology* 279:558–569. doi:10.1006/viro.2000.0737
- Pender MP, Csurhes PA, Lenarczyk A, Pfluger CMM, Burrows SR (2009) Decreased T cell reactivity to Epstein-Barr virus infected lymphoblastoid cell lines in multiple sclerosis. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* 80:498–505. doi:10.1136/jnnp.2008.161018
- Perron H, Geny C, Laurent A, Mouriouand C, Pellat J, Perret J, Seigneurin JM (1989) Leptomeningeal cell line from multiple sclerosis with reverse transcriptase activity and viral particles. *Research in Virology* 140:551–561. doi:10.1016/S0923-2516(89)80141-4
- Perron H, Jouvin-Marche E, Michel M, Ounanian-Paraz A, Camelo S, Dumon A, Jolivet-Reynaud C, Marcel F, Souillet Y, Borel E, Gebuhrer L, Santoro L, Marcel S, Seigneurin JM, Marche PN, Lafon M (2001) Multiple sclerosis retrovirus particles and recombinant envelope trigger an abnormal immune response in vitro, by inducing polyclonal Vbeta16 T-lymphocyte activation. *Virology* 287:321–332. doi:10.1006/viro.2001.1045
- Perron H, Dougier-Reynaud H-L, Lomparski C, Popa I, Firouzi R, Bertrand J-B, Marusic S, Portoukalian J, Jouvin-Marche E, Villiers CL, Touraine J-L, Marche PN (2013) Human endogenous retrovirus protein activates innate immunity and promotes experimental allergic encephalomyelitis in mice. *PLOS ONE* 8:e80128. doi:10.1371/journal.pone.0080128

- Pham HPT, Saroukhani S, Lindsey JW (2023) The concentrations of antibodies to Epstein-Barr virus decrease during ocrelizumab treatment. *Multiple Sclerosis and Related Disorders* 70:104497. doi:10.1016/j.msard.2023.104497
- Raffel J, Dobson R, Gafson A, Mattoscio M, Muraro P, Giovannoni G (2014) Multiple sclerosis therapy and Epstein-Barr virus antibody titres. *Multiple Sclerosis and Related Disorders* 3:372–374. doi:10.1016/j.msard.2013.12.004
- Rafiee N, Ravanshad M, Asadi B, Kianfar R, Maleki A (2021) Investigation of IL-2 and IFN- γ to EBV Peptides in Stimulated Whole Blood among Multiple Sclerosis Patients and Healthy Individuals. *INT* 64:203–208. doi:10.1159/000517002
- Reiber H, Ungefehr S, Jacobi C (1998) The intrathecal, polyspecific and oligoclonal immune response in multiple sclerosis. *Multiple sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)* 4:111–117. doi:10.1177/135245859800400304
- Rhead B, Bäärnhielm M, Gianfrancesco M, Mok A, Shao X, Quach H, Shen L, Schaefer C, Link J, Gyllenberg A, Hedström AK, Olsson T, Hillert J, Kockum I, Glymour MM, Alfredsson L, Barcellos LF (2016) Mendelian randomization shows a causal effect of low vitamin D on multiple sclerosis risk. *Neurology. Genetics* 2:e97. doi:10.1212/NXG.0000000000000097
- Ricigliano VAG, Handel AE, Sandve GK, Annibali V, Ristori G, Mechelli R, Cader MZ, Salvetti M (2015) EBNA2 binds to genomic intervals associated with multiple sclerosis and overlaps with vitamin D receptor occupancy. *PLOS ONE* 10:e0119605. doi:10.1371/journal.pone.0119605
- Rolland A, Jouvin-Marche E, Saresella M, Ferrante P, Cavaretta R, Créange A, Marche P, Perron H (2005) Correlation between disease severity and in vitro cytokine production mediated by MSRVE (multiple sclerosis associated retroviral element) envelope protein in patients with multiple sclerosis. *Journal of neuroimmunology* 160:195–203. doi:10.1016/j.jneuroim.2004.10.019
- Rosso M, Chitnis T (2020) Association Between Cigarette Smoking and Multiple Sclerosis: A Review. *JAMA Neurol* 77:245–253. doi:10.1001/jamaneurol.2019.4271
- Santiago O, Gutierrez J, Sorlozano A, Dios Luna J de, Villegas E, Fernandez O (2010) Relation between Epstein-Barr virus and multiple sclerosis: analytic study of scientific production. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 29:857–866. doi:10.1007/s10096-010-0940-0
- Sawcer S, Hellenthal G, Pirinen M et al (2011) Genetic risk and a primary role for cell-mediated immune mechanisms in multiple sclerosis. *Nature* 476:214–219. doi:10.1038/nature10251
- Schrödel A (2010) Zellzählung mittels Neubauer Zählkammer. *Biologie in unserer Zeit* 40:298. doi:10.1002/biuz.201090074
- Serafini B, Rosicarelli B, Franciotta D, Magliozzi R, Reynolds R, Cinque P, Andreoni L, Trivedi P, Salvetti M, Faggioni A, Aloisi F (2007) Dysregulated Epstein-Barr virus infection in the multiple sclerosis brain. *J Exp Med* 204:2899–2912. doi:10.1084/jem.20071030
- Simon KC, van der Mei IAF, Munger KL, Ponsonby A, Dickinson J, Dwyer T, Sundström P, Ascherio A (2010) Combined effects of smoking, anti-EBNA antibodies, and HLA-DRB1*1501 on multiple sclerosis risk. *Neurology* 74:1365–1371. doi:10.1212/WNL.0b013e3181dad57e

- Sotgiu S, Arru G, Mameli G, Serra C, Pugliatti M, Rosati G, Dolei A (2006) Multiple sclerosis-associated retrovirus in early multiple sclerosis: a six-year follow-up of a Sardinian cohort. *Multiple sclerosis* (Houndmills, Basingstoke, England) 12:698–703. doi:10.1177/1352458506070773
- Sotgiu S, Mameli G, Serra C, Zarbo IR, Arru G, Dolei A (2010) Multiple sclerosis-associated retrovirus and progressive disability of multiple sclerosis. *Multiple sclerosis* (Houndmills, Basingstoke, England) 16:1248–1251. doi:10.1177/1352458510376956
- Sparaco M, Bonavita S (2024) Vitamin D Supplementation: Effect on Cytokine Profile in Multiple Sclerosis. *Journal of Clinical Medicine* 13:835. doi:10.3390/jcm13030835
- Speck P, Haan KM, Longnecker R (2000) Epstein-Barr virus entry into cells. *Virology* 277:1–5. doi:10.1006/viro.2000.0624
- Stahmann A, Haas J (2021) Berichtsband des MS-Register für das Jahr 2020; <https://www.msregister.de>. DMSG, MSFP. <https://www.msregister.de>. Zugriffen: 24. März 2025
- Stefano N de, Giorgio A, Battaglini M, Rovaris M, Sormani MP, Barkhof F, Korteweg T, Enzinger C, Fazekas F, Calabrese M, Dinacci D, Tedeschi G, Gass A, Montalban X, Rovira A, Thompson A, Comi G, Miller DH, Filippi M (2010) Assessing brain atrophy rates in a large population of untreated multiple sclerosis subtypes. *Neurology* 74:1868–1876. doi:10.1212/WNL.0b013e3181e24136
- Sundqvist E, Sundström P, Lindén M, Hedström AK, Aloisi F, Hillert J, Kockum I, Alfredsson L, Olsson T (2012) Lack of replication of interaction between EBNA1 IgG and smoking in risk for multiple sclerosis. *Neurology* 79:1363–1368. doi:10.1212/WNL.0b013e31826c1ab7
- Sutkowski N, Conrad B, Thorley-Lawson DA, Huber BT (2001) Epstein-Barr Virus Transactivates the Human Endogenous Retrovirus HERV-K18 that Encodes a Superantigen. *Immunity* 15:579–589. doi:10.1016/S1074-7613(01)00210-2
- Sutkowski N, Chen G, Calderon G, Huber BT (2004) Epstein-Barr virus latent membrane protein LMP-2A is sufficient for transactivation of the human endogenous retrovirus HERV-K18 superantigen. *Journal of virology* 78:7852–7860. doi:10.1128/JVI.78.14.7852-7860.2004
- Tai AK, O'Reilly EJ, Alroy KA, Simon KC, Munger KL, Huber BT, Ascherio A (2008) Human endogenous retrovirus-K18 Env as a risk factor in multiple sclerosis. *Multiple sclerosis* (Houndmills, Basingstoke, England) 14:1175–1180. doi:10.1177/1352458508094641
- Tarlinton RE, Martynova E, Rizvanov AA, Khaiboullina S, Verma S (2020) Role of Viruses in the Pathogenesis of Multiple Sclerosis. *Viruses* 12:643. doi:10.3390/v12060643
- Thacker EL, Mirzaei F, Ascherio A (2006) Infectious mononucleosis and risk for multiple sclerosis: a meta-analysis. *Ann Neurol*. 59:499–503. doi:10.1002/ana.20820
- Thompson AJ, Banwell BL, Barkhof F, Carroll WM, Coetzee T, Comi G, Correale J, Fazekas F, Filippi M, Freedman MS, Fujihara K, Galetta SL, Hartung HP, Kappos L, Lublin FD, Marrie RA, Miller AE, Miller DH, Montalban X, Mowry EM, Sorensen PS, Tintoré M, Traboulsee AL, Trojano M, Uitdehaag BMJ, Vukusic S, Waubant E, Weinshenker BG, Reingold SC, Cohen JA (2018) Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria. *The Lancet Neurology* 17:162–173. doi:10.1016/S1474-4422(17)30470-2

- Tortorella C, Codella M, Rocca MA, Gasperini C, Capra R, Bastianello S, Filippi M (1999) Disease activity in multiple sclerosis studied by weekly triple-dose magnetic resonance imaging. *J Neurol* 246:689–692. doi:10.1007/s004150050433
- Vacaras V, Muresanu DF, Buzoianu A-D, Nistor C, Vesa SC, Paraschiv A-C, Botos-Vacaras D, Vacaras C, Vithoukias G (2023) The role of multiple sclerosis therapies on the dynamic of human gut microbiota. *Journal of Neuroimmunology* 378:578087. doi:10.1016/j.jneuroim.2023.578087
- Varvatsi D, Richter J, Tryfonos C, Pantzaris M, Christodoulou C (2021) Association of Epstein-Barr virus latently expressed genes with multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis and Related Disorders* 52:103008. doi:10.1016/j.msard.2021.103008
- Wagner H-J, Hornef M, Teichert H-M, Kirchner H (1994) Sex Difference in the Serostatus of Adults to the Epstein-Barr Virus. *Immunobiology* 190:424–429. doi:10.1016/S0171-2985(11)80613-3
- Wallin MT, Culpepper WJ, Nichols E, Bhutta ZA, Gebrehiwot TT, Hay SI, Khalil IA, Krohn KJ, Liang X, Naghavi M, Mokdad AH, Nixon MR, Reiner RC, Sartorius B, Smith M, Topor-Madry R, Werdecker A, Vos T, Feigin VL, Murray CJL (2019) Global, regional, and national burden of multiple sclerosis 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *The Lancet Neurology* 18:269–285. doi:10.1016/S1474-4422(18)30443-5
- Wendel E-M, Bertolini A, Kousoulos L, Rauchenzauner M, Schanda K, Wegener-Panzer A, Baumann M, Reindl M, Otto M, Rostásy K (2022) Serum neurofilament light-chain levels in children with monophasic myelin oligodendrocyte glycoprotein-associated disease, multiple sclerosis, and other acquired demyelinating syndrome. *Multiple sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)* 28:1553–1561. doi:10.1177/13524585221081090
- Westerlind H, Ramanujam R, Uvehag D, Kuja-Halkola R, Boman M, Bottai M, Lichtenstein P, Hillert J (2014) Modest familial risks for multiple sclerosis: a registry-based study of the population of Sweden. *Brain : a journal of neurology* 137:770–778. doi:10.1093/brain/awt356
- Wieland L, Schwarz T, Engel K, Volkmer I, Krüger A, Tarabuko A, Junghans J, Kornhuber ME, Hoffmann F, Staeger MS, Emmer A (2022) Epstein-Barr Virus-Induced Genes and Endogenous Retroviruses in Immortalized B Cells from Patients with Multiple Sclerosis. *Cells* 11:3619. doi:10.3390/cells11223619
- Wilfinger WW, Mackey K, Chomczynski P (1997) Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity. *BioTechniques* 22:474-6, 478-81. doi:10.2144/97223st01
- Wolinsky JS, Arnold DL, Brochet B, Hartung H-P, Montalban X, Naismith RT, Manfrini M, Overell J, Koendgen H, Sauter A, Bennett I, Hubeaux S, Kappos L, Hauser SL (2020) Long-term follow-up from the ORATORIO trial of ocrelizumab for primary progressive multiple sclerosis: a post-hoc analysis from the ongoing open-label extension of the randomised, placebo-controlled, phase 3 trial. *The Lancet Neurology* 19:998–1009. doi:10.1016/S1474-4422(20)30342-2
- Xiaoyuan Zhou, Ryan Baumann, Xiaohui Gao et al (2022) Gut microbiome of multiple sclerosis patients and paired household healthy controls reveal associations with disease risk and course. *Cell* 185:3467-3486.e16. doi:10.1016/j.cell.2022.08.021

Ysraelit MC, Correale J (2019) Impact of sex hormones on immune function and multiple sclerosis development. *Immunology* 156:9–22. doi:10.1111/imm.13004

Zivadinov R, Jakimovski D, Ramanathan M, Benedict RH, Bergsland N, Dwyer MG, Weinstock-Guttman B (2022) Effect of ocrelizumab on leptomeningeal inflammation and humoral response to Epstein-Barr virus in multiple sclerosis. A pilot study. *Multiple Sclerosis and Related Disorders* 67:104094. doi:10.1016/j.msard.2022.104094

7 Thesen

1. Mittels des Epstein-Barr-Virus gelingt die Etablierung lymphoblastoider Zelllinien aus mononukleären Zellen des peripheren Bluts und somit die vergleichende Bestimmung der Expressionsmuster von MS-Erkrankten und gesunden Probanden.
2. In lymphoblastoiden Zelllinien von Erkrankten mit Multipler Sklerose zeigt sich eine höhere Expression von Genen des Epstein-Barr-Virus (EBNA-2 und -1) und verschiedenen endogenen Retroviren (HERV-K *GAG*, -W1 *ENV* und -H *ENV59*) als in LCL von Gesunden. Diese Viren könnten eine wichtige, aber noch nicht sicher geklärte Rolle in der Pathogenese der MS spielen.
3. In den LCL MS-Erkrankter imponiert eine stärkere Expression dieser EBV- und HERV-Gene bei Frauen im Vergleich zu Männern. Diese Expressionsunterschiede unterstützen somit die epidemiologischen Beobachtungen, dass Frauen häufiger an MS erkranken.
4. Es zeigt sich eine signifikante positive Korrelation zwischen der Expression von EBNA-1 und -2 und der HERV-Sequenzen -K *GAG* und -W1 *ENV*. Dies unterstützt die Hypothese einer Transaktivierung von endogenen Retroviren durch das Epstein-Barr-Virus.
5. Patienten, die schon in jüngeren Jahren an Multipler Sklerose erkrankt sind, zeigen eine höhere Expression von EBNA-1. Dies spricht dafür, dass das EBV beziehungsweise eine Reaktivierung des Virus eine grundlegende Rolle für Entstehung und Verlauf der Erkrankung spielt.
6. Für andere exogene Faktoren – untersucht wurden hier Vitamin D, Rauchverhalten sowie andere Infektionserkrankungen – ließen sich keine signifikanten Expressionsunterschiede der oben genannten untersuchten EBV-Gene und Retroviren feststellen. Auch konnte keine Reduktion der Genexpression unter immunmodulatorischer Therapie nachgewiesen werden.
7. Vereinzelt konnten Assoziationen zwischen der Expression der untersuchten Gene und krankheitsspezifischen Daten – Krankheitsverlauf und medikamentöse Therapie – gefunden werden, was ebenso den Zusammenhang zwischen MS und EBV sowie Retroviren unterstützt und möglicherweise Therapieansätze aufzeigt.

Erklärungen

(1) Ich erkläre, dass ich mich an keiner anderen Hochschule einem Promotionsverfahren unterzogen bzw. eine Promotion begonnen habe.

(2) Ich erkläre, die Angaben wahrheitsgemäß gemacht und die wissenschaftliche Arbeit an keiner anderen wissenschaftlichen Einrichtung zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht zu haben.

(3) Ich erkläre an Eides statt, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Alle Regeln der guten wissenschaftlichen Praxis wurden eingehalten; es wurden keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht.

Romanshorn, den 09.07.2025