

Aus dem Institut für Neuropathologie

(Prof. Dr. med. C. Stadelmann-Nessler)

der Medizinischen Fakultät der Georg-August-Universität Göttingen

**Entwicklung eines zellbasierten Nachweisverfahrens für  
Serum-anti-Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein-  
Antikörper**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizinischen Fakultät der

Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Alexander Fichtner

aus

Bad Oldesloe

Göttingen 2024

Dekan:	Prof. Dr. med. W. Brück
Referent/in:	Prof. Dr. med. C. Stadelmann-Nessler
Ko-Referent/in:	Prof. Dr. F. Odoardi
Drittreferent/in:	Prof. Dr. med. R. Dressel

Datum der mündlichen Prüfung: 03.12.2024

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "Entwicklung eines zellbasierten Nachweisverfahrens für Serum-anti-Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein-Antikörper" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den 05.05.2024

.....

(Unterschrift)

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>IV</b>
<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>V</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>VI</b>
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1 Zellen des zentralen Nervensystems .....	3
1.2 Oligodendrozyten.....	4
1.2.1 Aufbau und Funktion der Oligodendrozyten .....	4
1.2.2 Myelinscheide.....	4
1.2.3 Ablauf der Myelinisierung während der Entwicklung .....	5
1.2.4 Rolle der Oligodendrozyten bei demyelinisierenden Erkrankungen.....	6
1.2.5 Oligodendrozyten und der Prozess der Remyelinisierung.....	7
1.3 Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein .....	8
1.3.1 Struktur des Myelin-Oligodendrozyten-Glykoproteins .....	8
1.3.2 Funktion des Myelin-Oligodendrozyten-Glykoproteins .....	9
1.3.3 Antigene Wirkung des Myelin-Oligodendrozyten-Glykoproteins .....	9
1.4 Multiple Sklerose .....	11
1.4.1 Ätiologie und Pathogenese der MS.....	11
1.4.2 Klinik und Verlauf der MS.....	12
1.4.3 Diagnostik der MS.....	13
1.4.4 Therapie bei der MS.....	15
1.5 MOG-IgG-assoziierte Erkrankungen .....	16
1.5.1 Definition und Epidemiologie der MOG-IgG-assoziierten Erkrankungen.....	16
1.5.2 Klinisches Spektrum der MOG-IgG-assoziierten Erkrankungen .....	16
1.5.3 Diagnostik der MOG-IgG-assoziierten Erkrankungen.....	18
1.5.4 Liquorbefunde der MOG-IgG-assoziierten Erkrankungen.....	18
1.5.5 Therapieoptionen der MOG-IgG-assoziierten Erkrankungen .....	20
1.5.6 Spezielle Krankheitsbilder der MOG-IgG-assoziierten Erkrankungen.....	21
1.6 Fragestellung der Dissertation.....	26
<b>2 Material und Methoden .....</b>	<b>27</b>
2.1 Materialien .....	27
2.1.1 Chemikalien.....	27
2.1.2 Laborkits .....	28
2.1.3 Enzyme .....	29
2.1.4 Gebrauchswaren .....	29
2.1.5 Geräte .....	30
2.1.6 Sterilität der Lösungen, Medien und Gebrauchswaren .....	31
2.1.7 Puffer und Medien .....	31

2.1.8	Eukaryontische und prokaryontische Zellen.....	32
2.1.9	Antikörper für Zellkulturansätze.....	32
2.1.10	Antikörper für Durchflusszytometrie.....	32
2.1.11	Synthetisierte Primer für PCR von MOG .....	33
2.1.12	DNA .....	33
2.1.13	DNA-Längenstandards.....	33
2.1.14	Vektoren.....	34
2.1.15	DNA-Vektor-Konstrukte.....	34
2.1.16	Softwareprogramme zur Bearbeitung und Auswertung von Daten.....	34
2.1.16	Seren der Patient*innen.....	34
2.2	Molekular-biochemische Methoden .....	36
2.2.1	Polymerase-Ketten-Reaktion .....	36
2.2.2	Agarose-Gelelektrophorese des PCR-Produktes.....	37
2.2.3	Gelextraktion der DNA aus Agarosegel.....	38
2.2.4	Ligation der PCR-Produkte in den Vektor.....	38
2.2.5	Transformation der DNA-Vektor-Konstrukte in <i>Escherichia coli</i> .....	39
2.2.6	Inkubation von <i>Escherichia coli</i> auf Agarplatten und in LB-Medium .....	39
2.2.7	Extraktion der Vektor-DNA aus chemisch kompetenten <i>E. coli</i> .....	39
2.2.8	DNA-Extraktion mit EndoFree® DNA Maxi Kit.....	40
2.2.9	Konzentrationsmessung des DNA-Gehaltes im Spektrometer.....	40
2.2.10	Handhabung eukaryontischer Zellen in der Zellkultur .....	41
2.2.11	Linearisierung der DNA-Vektor-Konstrukte durch Restriktionsenzyme .....	42
2.2.12	Transfektion des Vektors in eukaryontische Zellen.....	43
2.2.13	Färbung von Zellen und Untersuchung am Konfokalmikroskop.....	45
2.2.14	Zell-Sortierung mit Hilfe der Durchflusszytometrie.....	45
2.2.15	Inkubation der transfizierten Zellen mit Serum und durchflusszytometrische Analyse .....	46
<b>3</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>49</b>
3.1	Amplifikation des Myelin-Oligodendrozyten-Glykoproteins-Gens zur Herstellung eines fluoreszenzgekoppelten Fusionsproteins.....	49
3.2	Effizienz der Transformation des DNA-Vektor-Konstruktes in chemisch kompetente <i>E.-coli</i> -Zellen in Abhängigkeit von der Lösungsmenge .....	50
3.3	Effizienz der DNA-Extraktion und Gewinnung genügend großer Mengen des DNA-Vektor-Konstruktes aus <i>Escherichia coli</i> .....	52
3.4	Effizienz der Transfektion der DNA-Vektor-Konstrukte.....	53
3.5	Herstellung von transfizierten eukaryontischen Zellkulturen .....	53
3.6	Selektion der MOG-Transfektanten und Nachweis der Lo-kalisation der Genprodukte nach Expression.....	55
3.7	Anreicherung von transfizierten Zellen mit hoher Antikörper-Bindekapazität .....	57
3.8	Nachweis von anti-MOG-Antikörpern in Seren der Patient*innen.....	59
3.9	Detektion unterschiedlicher Subtypen der anti-MOG-Antikörper im Serum der Patient*innen.....	61
3.10	Auswertung der klinischen Daten der Patient*innen.....	62
3.11	Zeitlicher Verlauf des Nachweises von anti-MOG-Antikörpern im Serum ausgewählter Patient*innen.....	65

---

<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>67</b>
4.1	Anti-MOG-Antikörper bei demyelinisierenden Erkrankungen.....	67
4.2	Vorteil eines Zell-basierten Nachweisverfahrens von anti-MOG-Antikörpern.....	69
4.3	Klinische Relevanz des Nachweises von anti-MOG-Antikörpern bei demyelinisierenden Erkrankungen.....	73
4.4	Weitere neurale Antigene in demyelinisierenden Erkrankungen .....	77
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>78</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>79</b>

## Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1: Agarose-Gelelektrophorese der PCR-Produkte von MOG und Vergleichsbasenpaaren. ....</b>	<b>49</b>
<b>Abbildung 2: Insertion des MOG-Gens in den pcDNA™6.2/C-EmGFP-6W/TOPO®-Vektor. ....</b>	<b>50</b>
<b>Abbildung 3: Wachstumsmuster der Bakterien-Kolonien auf Agar-Platten.....</b>	<b>51</b>
<b>Abbildung 4: Ausschnitt des pcDNA™6.2/C-EmGFP/GW/CAT-Vektors.....</b>	<b>54</b>
<b>Abbildung 5: Nachweis der Expression von GFP-gekoppeltem MOG in transfizierten Zellen. ....</b>	<b>56</b>
<b>Abbildung 6: Bindekapazität von anti-MOG-Antikörpern in Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität von GFP. ....</b>	<b>57</b>
<b>Abbildung 7: Durchflusszytometrie von MOG-transfizierten Zellen .....</b>	<b>60</b>
<b>Abbildung 8: Verläufe der MOG-Antikörper im Serum ausgewählter Patienten*innen. ....</b>	<b>65</b>

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Diagnosekriterien der schubförmig-remittierenden Multiplen Sklerose .....	14
Tabelle 2: Diagnosekriterien der primär-progredienten Multiplen Sklerose.....	14
Tabelle 3: Kriterien zur Diagnose einer MOG-IgG-assoziierten Erkrankung.....	16
Tabelle 4: Indikationen zur Testung von MOG-Antikörpern .....	18
Tabelle 5: Diagnostische Kriterien der NMOSD .....	24
Tabelle 6: Chemikalien .....	27
Tabelle 7: Verwendete Laborkits .....	28
Tabelle 8: Genutzte Enzyme .....	29
Tabelle 9: Gebrauchswaren.....	29
Tabelle 10: Geräte .....	30
Tabelle 11: Puffer und Nährmedien .....	31
Tabelle 12: Verwendete prokaryote und eukaryote Zellen .....	32
Tabelle 13: Primär- und Sekundärantikörper der Zellkulturansätze .....	32
Tabelle 14: Primärantikörper und Sekundärantikörper für Durchflusszytometrie .....	32
Tabelle 15: MOG-Primer .....	33
Tabelle 16: DNA zur Gewinnung von MOG .....	33
Tabelle 17: Längenstandards der DNA für Gelelektrophorese .....	33
Tabelle 18: DNA-Vektoren für Transformation und Transfektion .....	34
Tabelle 19: Übersicht über die DNA-Vektor-Konstrukte .....	34
Tabelle 20: Softwareprogramme.....	34
Tabelle 21: Standard-PCR-Programm der Amplifikation im Gradienten-Verfahren .....	36
Tabelle 22: Protokoll des Reaktionsansatzes für die Polymerase-Ketten-Reaktion.....	37
Tabelle 23: Protokoll für die Ligation der PCR-Produkte in den Vektor .....	38
Tabelle 24: Restriktionsenzyme zur Linearisierung der DNA-Vektor-Konstrukte .....	42
Tabelle 25: Ansatz für den Verdau mit Restriktionsenzymen.....	42
Tabelle 26: Ansatz für die transiente Transfektion mit Lipofektamin .....	43
Tabelle 27: Ansatz für die stabile Transfektion mit Lipofektamin .....	44
Tabelle 28: Verdünnungen der Sekundärantikörper zur Durchflusszytometrie.....	47
Tabelle 29: Messwerte der Antikörper-Subtypen .....	61
Tabelle 30: Klinische Daten der 16 untersuchten Patient*innen.....	62
Tabelle 31: Diagnosen der untersuchten Patient*innen und MOG-Antikörper-Status .....	64



## Abkürzungsverzeichnis

Damit eine bessere Vergleichbarkeit ermöglicht werden kann, wurden die in der Literatur gebräuchlichen englischen Begriffe und Abkürzungen ohne Übersetzung übernommen.

ADEM	Akute disseminierte Enzephalomyelitis
ADCC	Antikörper-abhängige, zellvermittelte Zytotoxizität
Ak	Antikörper
APC	Allophycocyanin
AQP	Aquaporin
AS	Aminosäure(n)
Bp	Basenpaar(e)
cDNA	<i>Complementary Desoxyribonucleic Acid</i>
DAPI	Diamidin-2-phenylindol
dATP	Desoxy-Adenosintriphosphat
DMEM	<i>Dubecco's Modified Eagle Medium</i>
dCTP	Desoxy-Cytidinmonophosphat
dGTP	Desoxy-Guanosinmonophosphat
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>
dNTP	Desoxy-Ribonukleosidtriphosphate
dTTP	Desoxy-Thymidintriphosphat
EAE	Experimentelle autoimmune Enzephalitis
EDSS	<i>Expanded Disability Status Scale</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assays</i>
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i>
FCS	<i>Fetal bovine serum</i>
GFP	<i>Green fluorescent protein</i>
Ig	Immunglobulin
IVIg	Intravenöse Immunglobuline

---

KIS	Klinisch-isoliertes Syndrom
kb	Kilobasenpaare
LB	<i>Lysogenic broth</i>
LETM	Langstreckige transverse Myelitis
MBP	Myelin basisches Protein
mADEM	Multiphasische disseminierte Enzephalomyelitis
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
MOG	Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein
MOGAE	MOG-IgG-assoziierte Erkrankungen
MRT	Magnetresonanztomographie
MS	Multiple Sklerose
NMO	Neuromyelitis optica
NMOSD	NMO-Spektrum-Erkrankungen
OLIG2	Oligodendrozyten-Transkriptionsfaktor 2
ON	Optikusneuritis
OPZ	Oligodendrozyten-Progenitorzelle(n)
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
Pen. /Strep.	Penicillin/Streptomycin
Pos.	Positiv
rMOG	Rekombinantes Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein
Rpm	<i>Revolutions per minute</i>
TBE-Puffer	TRIS-Borat-EDTA-Puffer
TE-Puffer	TRIS-EDTA-Puffer
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
TM	Transverse Myelitis
ZSF	Zerebrospinale Flüssigkeit
ZNS	Zentrales Nervensystem

# 1 Einleitung

Bei den idiopathischen demyelinisierenden Erkrankungen des zentralen Nervensystems (ZNS) handelt es sich um eine heterogene Gruppe neurologischer Erkrankungen, bei denen es zu einer Schädigung der Myelinscheide von Axonen kommt. Im ZNS wird die Myelinscheide von den Fortsätzen der Oligodendrozyten, einer Subpopulation der Gliazellen, gebildet (Virchow 1854). Physiologischerweise dient sie als Schutz- und Isolationsschicht der Axone, wodurch eine schnelle Reizleitung im Gehirn und im Rückenmark ermöglicht wird (Rash 2010). Kommt es zu einer Schädigung der Myelinscheide, entwickeln betroffene Patient\*innen oftmals neurologische Symptome und Ausfallserscheinungen in Abhängigkeit von der Lokalisation der geschädigten Nervenfasern und dem Ausmaß ihrer Schädigung.

Die häufigste idiopathische demyelinisierende Erkrankung ist die multiple Sklerose (MS) (Feigin et al. 2017). Daneben gibt es eine ganze Reihe weiterer unterschiedlicher idiopathischer demyelinisierender Erkrankungen bei Kindern, Jugendlichen und Erwachsenen, die meist durch verschiedene autoimmun-entzündliche Prozesse entstehen können (Höftberger und Lassmann 2018). Diese unterscheiden sich untereinander bezüglich der Symptomausprägung, des klinischen Verlaufs, der anzuwendenden Therapieverfahren, des Therapieansprechens und der Prognose (Höftberger und Lassmann 2018).

Insbesondere wegen des Nachweises erhöhter Spiegel an Immunglobulinen (Ig) und dem Nachweis von oligoklonalen Banden in der zerebrospinalen Flüssigkeit (ZSF) von Patient\*innen mit MS (Kabat et al. 1948) wurde in den letzten Jahren und Jahrzehnten untersucht, ob Autoantikörper gegen ZNS-Strukturen bei der Pathogenese demyelinisierender Erkrankungen eine Rolle spielen. Auch die Tatsache, dass durch die Injektion Myelin-spezifischer Antikörper eine Demyelinisierung in Tiermodellen der MS mit experimenteller autoimmuner Enzephalomyelitis (EAE) verstärkt werden konnte, unterstützte diese Vermutung (Bornstein und Appel 1961; Krumbholz et al. 2012).

Ein wichtiges Oligodendrozyten-spezifisches Protein mit potenzieller antigener Wirkung, welches in den letzten Jahren in den Fokus der Forschung gerückt ist, ist das Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein (MOG). Dieses macht nur einen kleinen prozentualen Anteil der Myelinbestandteile (ca. 0,05%) aus, befindet sich aber auf der äußersten Lamelle der Myelinscheide von Oligodendrozyten, weswegen es einen guten Angriffspunkt für Autoantikörper bietet (Brunner et al. 1989). Zudem wurde herausgefunden, dass der Nachweis

von MOG-spezifischen Autoantikörpern relevant für die Therapieentscheidung und die Prognose von demyelinisierenden Erkrankungen ist (Berger und Reindl 2015).

MOG-IgG-assoziierte demyelinisierende Erkrankungen (MOGAE) können sich als unterschiedliche klinische Syndrome präsentieren. MOG-Antikörper finden sich insbesondere bei Kindern und Jugendlichen mit akuter disseminierter Enzephalomyelitis (ADEM) oder Varianten der ADEM (z. B. multiphasische ADEM (mADEM), ADEM gefolgt von einer Optikusneuritis (ADEM-ON)). Isolierte klinische Verlaufsformen wie die transverse Myelitis (TM) und monophasische oder rezidivierende isolierte Optikusneuritiden können ebenfalls MOG-Antikörper assoziiert sein. Schließlich sind auch etwa 27% der Aquaporin-4 (AQP4)-seronegativen Neuromyelitis-optica-Spektrum-Erkrankungen (NMOSD) positiv für MOG-Antikörper (Carnero Contentti et al. 2021). Außerdem können in seltenen Fällen auch bei Menschen mit N-methyl-D-Aspartat-Rezeptor-Enzephalitiden im Verlauf MOG-Antikörper nachgewiesen werden (Peschl et al. 2017b; Armangue et al. 2020), wobei bislang nur etwa 30 Fälle in der Literatur beschrieben worden sind (Berek et al. 2022).

Aus tierexperimentellen Studien und Zellkulturstudien geht klar hervor, dass MOG-Antikörper nur dann pathogen sind und zu einer Demyelinisierung führen, wenn sie konformationelle Epitope erkennen und binden (Brehm et al. 1999; von Büdingen et al. 2002). Deshalb sind zum Nachweis dieser MOG-Antikörper Methoden zu bevorzugen, bei denen die physiologische Konformation von MOG erhalten ist. Am besten eignen sich dafür Zellbasierte Antikörper-Assays, bei denen die Zellen zuvor mit dem MOG-Gen transfiziert wurden und in Folge dessen das MOG-Protein in die Zellmembran eingebaut haben (Brehm et al. 1999; Tea et al. 2020).

## 1.1 Zellen des zentralen Nervensystems

Das ZNS, welches für die Verarbeitung von nervalen Impulsen und für höhere neuronale Verschaltungen verantwortlich ist, besteht aus Neuronen und Gliazellen. Die Neurone dienen der Erzeugung und Weiterleitung elektrischer Signale (Rutecki 1992), wohingegen die Gliazellen diverse Funktionen ausüben, damit die Funktionalität der Neurone aufrechterhalten werden kann.

Die Neurone der weißen Substanz können elektrische Signale über ihre Dendriten aufnehmen und diese über ihr Soma sowie ihr Axon an andere Neurone weiterleiten. Als Verbindungsstellen zwischen den neuronalen Fortsätzen dienen die Synapsen (Burke 2007). Damit die Informationsweiterleitung zügig erfolgen kann, ist es wichtig, dass die Axone von einer isolierenden Schicht umgeben sind. Diese wird als Myelinscheide bezeichnet und im ZNS durch die Fortsätze der Oligodendrozyten gebildet (De Robertis et al. 1958).

Die Oligodendrozyten gehören neben den Astrozyten, den Ependymzellen und den Mikroglia zur Gruppe der Gliazellen. Die Funktion der Gliazellen ist wichtig dafür, dass eine adäquate Reizweiterleitung in den Neuronen stattfinden kann.

Die Astrozyten sind für die Aufrechterhaltung der Blut-Hirn-Schranke notwendig, wo sie die Aufnahme von Molekülen über Steuerung der Endothelzellen kontrollieren (Abbott et al. 2006). Sie modulieren die synaptische Signaltransduktion (Perea et al. 2009), unterstützen den Metabolismus von Transmittern und dienen der Homöostase des Elektrolythaushalts (Fünfschilling et al. 2012). Außerdem spielen sie eine wichtige Rolle bei der Reparatur von Schäden im ZNS (Sofroniew und Vinters 2010).

Die Ependymzellen kleiden die Ventrikelräume des Gehirns sowie den Zentralkanal im Rückenmark aus und bilden eine Barriere zwischen dem Liquor und dem Hirnparenchym. Eine Subpopulation spezialisierter Ependymzellen bildet den Plexus choroideus, der für die Produktion des Liquor cerebrospinalis verantwortlich ist (Engelhardt und Sorokin 2009).

Die Mikroglia entsprechen Gewebemakrophagen, die einen Teil des Immunsystems ausmachen und in einem Ruhestadium im Gehirn vorliegen (Barron 1995). Im Gegensatz zu anderen Gewebemakrophagen entstammen sie allerdings nicht den Zellen des hämatopoetischen Systems, sondern entwickeln sich im Laufe der embryonalen Entwicklung aus Vorläuferzellen innerhalb des Dottersacks, die dann in das Gehirn einwandern, bevor sich die Blut-Hirn-Schranke ausbildet (Goldmann et al. 2016).

## 1.2 Oligodendrozyten

### 1.2.1 Aufbau und Funktion der Oligodendrozyten

Die Oligodendrozyten, die erstmalig von Pío del Río Hortega (1882–1945) entdeckt worden sind, dienen in erster Linie der Isolation der axonalen Fortsätze der Neurone im ZNS (Rash 2010). Sie kommen nur im ZNS vor und sind dort v. a. in der weißen Substanz zu finden. Sie besitzen mehrere Zellfortsätze, mit denen sie die Myelinscheide im ZNS ausbilden. Im peripheren Nervensystem hingegen werden die Myelinscheiden von Schwann-Zellen gebildet (Boullerne 2016).

Jeder Fortsatz eines Oligodendrozyten kann ein begrenztes Segment der Myelinscheide um ein Axon herum ausbilden. Da ein Oligodendrozyt mehrere Fortsätze besitzt und zwischen mehreren Axonen lokalisiert ist, kann er verschiedene Axone segmentweise umhüllen. Dort wo zwei benachbarte Myelinsegmente aufeinandertreffen, verbleibt ein myelinfreies Areal, der sog. Ranvier'sche Schnürring (Boullerne 2016). An den Ranvier'schen Schnürringen ist die Dichte an spannungsabhängigen Natrium-Ionenkanälen sehr hoch, was für eine sehr schnelle Reizweiterleitung, die sog. saltatorische Erregungsleitung, notwendig ist (Ritchie und Rogart 1977). Durch Kopplung der Fortsätze der Astrozyten mit den paranodalen Anteilen der Myelinscheiden im Bereich der Schnürringe entsteht ein axogliales Synzytium, welches die Isolierung der Axone verstärkt und somit einen Ionenverlust vorbeugen kann (Rash 2010).

Zudem unterstützen die Oligodendrozyten den Metabolismus innerhalb der Axone, indem Metabolite vom Soma der Oligodendrozyten über die einzelnen Myelinschichten zum Axoplasma über Gap junctions transportiert werden (Fünfschilling et al. 2012; Morrison et al. 2013). Zudem besteht die Annahme, dass die aktivitätsabhängige Plastizität in Oligodendrozyten neuronale Schaltkreise beeinflussen kann (Forbes und Gallo 2017).

### 1.2.2 Myelinscheide

Das Myelin wurde 1854 zum ersten Mal von Rudolf Virchow entdeckt, der es für eine von Neuronen sezernierte Füllsubstanz hielt (Virchow 1854). Erst durch die Entwicklung neuer Färbetechniken konnte gezeigt werden, dass das Myelin nicht im Axon, sondern um dieses herum lokalisiert ist (Boullerne 2016). Das Myelin entspricht einer besonderen Form und Anordnung der aus einer Doppellipidschicht aufgebauten Zellmembran, die für die Ausbildung der Myelinscheide von Bedeutung ist.

Die Myelinscheide entwickelt sich um die Axone herum und besteht aus multiplen aufgerollten Lamellen der Zellmembran von Oligodendrozytenfortsätzen. Zwischen den einzelnen myelinisierten Abschnitten der Axone liegen die Myelin-freien Ranvier'schen Schnürringe. Man unterteilt die Myelinscheide eines Oligodendrozytenfortsatzes in ein zentrales internodales Segment mit zwei an den Enden befindlichen paranodalen Segmenten. Diese wiederum grenzen an die Ranvier'schen Schnürringe und werden vom internodalen Segment jeweils durch juxtapanodale Segmente abgegrenzt (Hildebrand et al. 1993). Diese Einteilung erfolgt aufgrund des unterschiedlichen Aufbaus und der unterschiedlichen molekularen Zusammensetzung der Myelinscheide in diesen verschiedenen Segmenten.

Die zur Myelinscheide spezialisierte Zellmembran der Oligodendrozytenfortsätze besteht aus spezifischen Lipiden und Proteinen, die für die Funktionalität der Myelinscheide von Bedeutung sind (Aggarwal et al. 2011). Ein wichtiges Protein, welches für den Aufbau der Myelinlamellen und deren Integrität von Bedeutung ist, ist das Myelin Basische Protein (MBP). Dieses befindet sich insbesondere im Bereich der internodalen Myelinsegmente (Schwob et al. 1985).

### 1.2.3 Ablauf der Myelinisierung während der Entwicklung

Die Myelinisierung der Axone im ZNS ist ein sehr komplexer Prozess, der in der fetalen Periode allerdings einer spezifischen bzw. regulierten Abfolge nach verläuft. Zuerst kommt es zur Myelinisierung von Axonen, deren Neurone für Basisfertigkeiten notwendig sind. Später werden Axone der Neurone höher geschalteter neuronaler Zentren myelinisiert (Brody et al. 1987; Kinney et al. 1988). Des Weiteren können im Lauf der fetalen Entwicklung Neurone nachgewiesen werden, deren Axone nur partiell myelinisiert sind und somit auch nicht-myelinisierte Segmente aufweisen (Tomassy et al. 2014).

Damit eine Myelinisierung im fetalen ZNS stattfinden kann, müssen sich Stammzellen zu Oligodendrozyten-Progenitor-Zellen (OPZ) differenzieren. Diese Stammzellen weisen eine Expression des Oligodendrozyten-Transkriptionsfaktors 2 (OLIG2) auf, welcher später auch in ausgereiften Oligodendrozyten nachweisbar ist (Jakovcevski et al. 2009). Die frühesten OPZ können um die 10. Gestationswoche herum im Vorderhirn nachgewiesen werden. Diese OPZ besitzen nur wenige und kaum verzweigte Fortsätze (Jakovcevski und Zecevic 2005) und exprimieren den *Platelet-derived growth factor Receptor alpha* sowie NG2-Proteglykane (Pringle et al. 1992; Pringle und Richardson 1993).

Aus den OPZ entwickelt sich ein weiteres Stadium an Vorläuferzellen der Oligodendrozyten, die nicht mehr teilungsfähig sind. Sie exprimieren die membranständigen Glykoproteine O1 und O4 (Jakovcevski et al. 2009). Erst beim Nachweis einer Expression der beiden Hauptproteine des Myelins und den zuerst exprimierten Proteinen, nämlich des MBP und des Proteolipid-Proteins, wird von reifen Oligodendrozyten gesprochen (Verity und Campagnoni 1988). Diese können ab der 18. Gestationswoche im Vorderhirn nachgewiesen werden (Jakovcevski und Zecevic 2005) und besitzen die Fähigkeit, die Axone zu myelinisieren.

#### **1.2.4 Rolle der Oligodendrozyten bei demyelinisierenden Erkrankungen**

Als diejenigen Zellen, die die Myelinscheide im ZNS ausbilden, spielen Oligodendrozyten eine wichtige Rolle im Rahmen von demyelinisierenden Erkrankungen. Bei der Demyelinisierung kommt es zu einer Schädigung der Myelinscheide und möglicherweise zu einer zumindest partiellen Schädigung der Axone. Ein Defekt in der Myelinscheide wiederum sorgt für eine inadäquate Erregungsweiterleitung in den Neuronen, wodurch neurologische Symptome in Abhängigkeit von der Lokalisation und Ausprägung der Schädigung entstehen (Love 2006).

Eine Demyelinisierung kann durch verschiedene Krankheiten verursacht werden. Dazu zählen idiopathische inflammatorische Erkrankungen, virale Infektionen, metabolische Entgleisungen (v. a. des Elektrolythaushaltes), hypoxisch-ischämische Veränderungen oder Kompressions-bedingte Schädigungen (Love 2006).

Bei der Demyelinisierung im Rahmen inflammatorischer Erkrankungen kann es entweder zu einer primären Schädigung des Myelins oder einer primären Schädigung der Oligodendrozyten kommen. Dies hängt jeweils von den verschiedenen pathophysiologischen Mechanismen ab, die bei den einzelnen demyelinisierenden Erkrankungen vorherrschen und zu teilweise unterschiedlichen pathologischen Mustern führen (Stadelmann et al. 2019). An der Demyelinisierung sind verschiedene Bestandteile des humoralen Immunsystems (z. B. Antikörper, Komplementfaktoren) und des zellulären Immunsystems (v. a. Lymphozyten, Makrophagen, Granulozyten, Mikroglia) beteiligt.



### 1.2.5 Oligodendrozyten und der Prozess der Remyelinisierung

Geschädigte Myelinscheiden können, sofern die Axone erhalten sind, wieder aufgebaut werden (sog. Remyelinisierung). Bereits 1906 hatte Otto Marburg die Idee, dass es sich bei gut abgrenzbaren Arealen mit dünnen Myelinschichten möglicherweise um Anzeichen einer Remyelinisierung handeln könnte.

Mit Hilfe der Elektronenmikroskopie konnte nachgewiesen werden, dass an den Rändern älterer Läsionen von MS-Patient\*innen einige Axone von glialen Zellfortsätzen umgeben waren, die am ehesten zu Oligodendrozyten gehörten (Périer und Grégoire 1965). Im Unterschied zur primären Myelinisierung im Rahmen der fetalen Entwicklung sind die neu gebildeten Myelinscheiden in demarkierten Arealen dünner und kürzer. Zudem wurde gezeigt, dass die Remyelinisierung bereits in frühen Läsionen beginnt und nicht erst im späten Stadium initiiert wird (Prineas et al. 1993). Außerdem ist die Erfolgsrate der Remyelinisierung in frühen Läsionen höher als diejenige in älteren Läsionen (Goldschmidt et al. 2009).

Für die Remyelinisierung innerhalb der Läsionsherde sind Oligodendrozyten-Vorläuferzellen verantwortlich (Gensert und Goldman 1997), die bis in das Erwachsenenalter im ZNS vorhanden sind (Dawson et al. 2003). Sie können in geringer Anzahl in den Läsionen nachgewiesen werden (Chang et al. 2002; Wolswijk 2002). Der Grund dafür, dass die Remyelinisierung nur in einem gewissen Grad erfolgreich ist, ist bisher noch nicht ausreichend erforscht worden (Franklin und Ffrench-Constant 2017).

### 1.3 Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein

Das Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein (MOG) ist ein von Oligodendrozyten synthetisiertes Protein, das nur in der Myelinscheide des ZNS, nicht aber in der Myelinscheide des peripheren Nervensystems, vorkommt. Beim Menschen wird es vom *MOG*-Gen kodiert, das sich auf Chromosom 6p21.3-p22 im Genlocus des humanen Leukozytenantigens befindet (Pham-Dinh et al. 1995). In der Medizin hat MOG eine wichtige Rolle als potenzielles Autoantigen, da bei Patient\*innen mit verschiedenen demyelinisierenden Erkrankungen körpereigene anti-MOG-Antikörper nachgewiesen werden konnten (siehe 1.5).

#### 1.3.1 Struktur des Myelin-Oligodendrozyten-Glykoproteins

Das Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein besteht aus 245 Aminosäuren (AS) und hat ein Molekulargewicht von 26-28 Kilodalton. Als transmembranäres Protein befindet es sich in der Zellmembran der Fortsätze von Oligodendrozyten und zwar nur im Bereich der äußersten Schicht der Myelinscheide (Brunner et al. 1989). Zudem ist es Bestandteil der Immunglobulin-(Ig)-Superfamilie. Es besitzt eine einzelne extrazelluläre variable Immunglobulindomäne sowie eine transmembranäre Domäne, eine zytoplasmatische Schleife, einen Membran-assoziierten Bereich und einen zytoplasmatischen Rest (Kroepfl et al. 1996).

Insgesamt wurden 15 verschiedene alternative Splicevarianten des MOG-Moleküls gefunden. Dabei gibt es zwei Formen, die in der gesamten Länge als alpha-1- und beta-1-Variante im fetalen Stadium exprimiert werden. Im postnatalen Alter hingegen werden alternative Splicevarianten exprimiert, die an der Zelloberfläche, dem endoplasmatischen Retikulum oder als sezerniertes Molekül gefunden werden können. Insbesondere bezüglich der sezernierten Isoform von MOG bestand die Annahme, dass sie bei der Pathogenese von demyelinisierenden Erkrankungen beteiligt sein könnte. Die Möglichkeit eines Kontakts mit dem peripheren Immunsystem durch Lücken in der Bluthirnschranke nach Sekretion des MOG-Proteins in die zerebrospinale Flüssigkeit (ZSF) würde dies untermauern (Boyle et al. 2007).

Des Weiteren zeigt MOG eine starke Homologie zu Butyrophilinen, ebenfalls Membranproteine der Ig-Superfamilie, die in sekretorischen Zellen der Brustdrüse gebildet werden (Gardinier et al. 1992). Aufgrund dieser Ähnlichkeit könnte möglicherweise eine Autoimmunreaktion durch molekulares Mimikry initiiert werden (Stefflerl et al. 2000; Guggenmos et al. 2004) und die Häufung von demyelinisierenden Erkrankungen bei Frauen erklären.

### 1.3.2 Funktion des Myelin-Oligodendrozyten-Glykoproteins

Während der Myelinisierung wird MOG als eines der späteren Proteine synthetisiert, weswegen es als Marker für die Reife von Oligodendrozyten genutzt werden kann (Gardinier und Matthieu 1993). Als Bestandteil der Myelinscheide im ZNS werden MOG verschiedene Funktionen zugeschrieben. Es wird davon ausgegangen, dass es aufgrund seiner Lokalisation an der Zelloberfläche (Scolding et al. 1989) und der Zugehörigkeit zur Ig-Superfamilie (Gardinier et al. 1992) als Adhäsionsmolekül oder Oberflächenrezeptor fungiert. Diese Theorie wird durch den Nachweis des L2/HNK-1-Epitops in MOG (Burger et al. 1993) untermauert, da selbiges auch im Myelin-assoziierten Glykoprotein und im Myelin Protein Zero vorkommt, die beide eine Funktion als Adhäsionsmolekül haben (Burger et al. 1992).

Es konnte außerdem gezeigt werden, dass MOG als Ligand für das DC-SIGN (engl. *Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin*) auf antigenpräsentierenden Zellen dient. Dies könnte dazu führen, dass MOG bei korrekter Konfiguration und Glykosylierung antigenpräsentierende Zellen in einem unausgereiften und toleranten Stadium hält und dadurch eine Autoimmunität verhindern würde (García-Vallejo et al. 2014).

Zudem wird vermutet, dass es die einzelnen benachbarten myelinisierten Nervenfasern miteinander verbindet (Burger et al. 1993). Diese Art der Verbindung findet nur im ZNS statt, und zwar zeitlich relativ spät während der Myelinisierung. Ein komplettes Fehlen eines funktionierenden MOG-Gens zeigt im tierexperimentellen Mausmodell hingegen keine neurologischen Ausfälle (Delarasse et al. 2003).

### 1.3.3 Antigene Wirkung des Myelin-Oligodendrozyten-Glykoproteins

Die ersten Anzeichen dafür, dass gegen MOG gerichtete Antikörper an einer Immunantwort beteiligt sind und zu einer Demyelinisierung führen, wurden von Lebar et al. gezeigt. Sie wiesen nach, dass Meerschweinchen, die mit dem M2 Protein immunisiert worden sind, *in vitro* Antikörper mit demyelinisierenden Eigenschaften gebildet hatten (Lebar et al. 1976).

Daraufhin konnte gezeigt werden, dass der monoklonale anti-MOG-spezifische 8-18C5-Antikörper in Lewis Ratten mit experimenteller autoimmuner Enzephalomyelitis (EAE) eine Demyelinisierung auslösen konnte (Linnington et al. 1988). Außerdem wurde festgestellt, dass das M2 Protein mit MOG identisch ist (Lebar et al. 1989) und dass anti-MOG-

Antikörper in vielen anderen Spezies eine wichtige Rolle bei der Demyelinisierung spielen (Bradl und Linington 1996).

Nachdem die Struktur von MOG genauer entschlüsselt worden war, wurde festgestellt, dass die N-terminale Domäne (AA 1-125) für die Bindung demyelinisierender Antikörper verantwortlich ist (Adelmann et al. 1995). Des Weiteren zeigten Versuche mit Weißbüschelaffen, dass die anti-MOG-Antikörper an spezifische Epitope der extrazellulären MOG-Domäne binden (von Büdingen et al. 2002). Zudem konnten Bernard et al zeigen, dass eine Injektion von MOG sowohl zu einer T-Zell-abhängigen als auch einer Autoantikörper-abhängigen Immunantwort führen können. Außerdem wurde festgestellt, dass insbesondere die extrazelluläre Ig-ähnliche Domäne von MOG den Komplementfaktor C1q binden kann (Bernard et al. 1997). Die T-Zell-Antwort gegenüber MOG ist dabei von einem Fc-Rezeptor-assoziierten Mechanismus abhängig (Mader et al. 2023; Spatola et al. 2023).

MOG-T-Zell-Rezeptor transgene Mäuse erkrankten spontan auch in Abwesenheit von MOG an einer EAE, da die T-Zellen mit dem Neurofilament M aufgrund seiner Sequenzhomologie zu MOG (AS 35-55) kreuzreagiert haben (Krishnamoorthy et al. 2009). Ferner wurden auch bei der Immunisierung von Lewis-Ratten mit dem MOG-Protein MOG<sub>1-20</sub>- und MOG<sub>35-55</sub>-spezifische T-Zellen generiert, die milde Symptome einer EAE auslösen konnten (Adelmann et al. 1995). Im Gegensatz dazu erkrankten braune Norwegerratten oder *Dark Agouti* Ratten nach Immunisierung mit MOG schwer an einer EAE (Steffler et al. 1999).

MOG-spezifische B-Lymphozyten in MOG-B-Zell-Rezeptor-transgenen Th/+ Mäusen sind hingegen nicht ausreichend, um spontan eine EAE auszulösen (Litzenburger et al. 1998). Sie erhöhen aber die Suszeptibilität, nach aktiver Immunisierung mit dem MOG-Protein eine EAE zu induzieren, da sie als antigen-präsentierende Zellen fungieren können (Hjelmström et al. 1998; Lyons et al. 1999; Lyons et al. 2002). Sie haben aber auch eine wichtige Rolle bei der Regeneration nach Ablauf einer EAE, da sie die Immunreaktion durch Produktion von Interleukin-10 beeinflussen können (Fillatreau et al. 2002).

## 1.4 Multiple Sklerose

Die multiple Sklerose (MS) bzw. Encephalomyelitis disseminata ist die häufigste idiopathische demyelinisierende Erkrankung des ZNS und weist die höchste Inzidenz in der nordamerikanischen sowie europäischen Bevölkerung auf (GBD 2016 Multiple Sclerosis Collaborators 2019). Sie tritt v. a. bei jungen Erwachsenen zwischen dem 20. und 40. Lebensjahr auf, kann sich aber auch als sog. pädiatrische MS bereits im Kindes- und Jugendalter vor dem 17. Lebensjahr (ca. 3-5% der Fälle) manifestieren (Reinhardt et al. 2014; Broia und Steinborn 2020). Insgesamt betrachtet sind Frauen 2-3-mal so häufig betroffen wie Männer (Orton et al. 2006). Im Vergleich von pädiatrischer MS und MS des Erwachsenenalters gibt es Unterschiede in Bezug auf Symptomatik, Verlauf und Therapie. Dazu zählt zum Beispiel, dass pädiatrische MS-Patient\*innen mehr Schübe erleiden und man im MRT häufig mehr Läsionen nachweisen kann. Aufgrund des früheren Erkrankungsalters entwickeln pädiatrische MS-Patient\*innen einen vergleichbaren Behinderungsgrad ein Jahrzehnt früher als erwachsene MS-Patient\*innen (Renoux et al. 2008).

### 1.4.1 Ätiologie und Pathogenese der MS

Bei der Demyelinisierung der Axone kommt es durch inflammatorische Prozesse zur Zerstörung der von den Oligodendrozytenfortsätzen gebildeten Myelinscheide, was in Abhängigkeit von den betroffenen Arealen zu verschiedenen neurologischen Symptomen führen kann (Lucchinetti et al. 2000). Der axonale Schaden ist dabei bei Kindern stärker als bei Erwachsenen (Pfeifenbring et al. 2015). Der genaue Entstehungsmechanismus der MS ist nicht eindeutig geklärt. Man weiß nicht sicher, ob es eine oder mehrere Ursachen gibt. Fakt ist jedoch, dass verschiedene genetische und umweltbedingte Risikofaktoren gefunden worden sind, die bei der Entwicklung der MS eine Rolle spielen, wie z. B. Vitamin-D-Mangel, Übergewicht, virale Infektionen (z. B. Epstein-Barr-Virus) und Tabakrauchen (Ascherio und Munger 2016; Yuan et al. 2021).

Die MS-Läsionen entwickeln sich über einen längeren Zeitraum und dies folgt einem gewissen Ablauf, so dass verschiedene Läsionstypen anhand der histopathologischen Veränderungen unterschieden werden können (Stadelmann et al. 2019). Eine zentrale Rolle zu Beginn der Demyelinisierung spielen Makrophagen, welche die zerstörten Myelinfragmente phagozytieren (Prineas und Connell 1978). Später sind auch Astrozyten, die bereits frühzeitig aktiviert werden, für den Verlauf der Erkrankung von Bedeutung, da sie u. a. zur Ausbildung einer glialen Narbe innerhalb der Läsionsherde führen (Ludwin et al. 2016).

Früher ging man davon aus, dass auch anti-MOG-Antikörper in der Pathogenese der MS eine wichtige Rolle spielen würden, da anti-MOG-Antikörper im Serum von MS-Patient\*innen nachgewiesen worden sind (Reindl et al. 1999). Zusätzlich hatten die MS-Läsionen starke immunpathologische Gemeinsamkeiten zur MOG-induzierten EAE (Genain et al. 1995; Genain und Hauser 1996). Dies konnte jedoch weitestgehend widerlegt werden (Hacohen et al. 2015; Ketelslegers et al. 2015). Der Nachweis der anti-MOG-Antikörper beruhte nämlich zuerst auf Verfahren, bei denen die Konformation von MOG nicht beachtet wurde. Zudem waren die gemessenen Antikörpertiter an der unteren Nachweisgrenze der jeweiligen Messmethode. Außerdem konnte in Tiermodellen mit EAE die Notwendigkeit von Konformations-spezifischen Epitopen gezeigt werden (Brehm et al. 1999; von Büdingen et al. 2004). Daraufhin wurden im Laufe der Zeit auch für die Diagnostik beim Menschen verschiedene neue Verfahren entwickelt, um die Konformation der Epitope naturgetreuer darzustellen (O'Connor et al. 2007; Waters et al. 2019). Dazu zählen insbesondere Zell-basierte Nachweisverfahren, deren Verwendung auch nach aktuellem Konsensus empfohlen wird (Jarius et al. 2018a; López-Chiriboga et al. 2018).

#### **1.4.2 Klinik und Verlauf der MS**

Bei der MS unterscheidet man zwei klinische Verlaufsformen, nämlich die schubförmig-remittierende und die progressive MS, bei welcher die primär progressive und die sekundär progressive Form unterschieden werden. Bei beiden Formen der progressiven MS kommt es zu schleichenden, aber kontinuierlichen neurologischen Beeinträchtigungen (Lublin und Reingold 1996; Lublin et al. 2014). Eine sekundäre Progredienz entsteht bei initial schubförmig-remittierender MS nach etwa 10-20 Jahren (Renoux et al. 2008).

Als Schub wird nach aktueller S1-Leitlinie das Auftreten eines oder mehrerer neurologischer Symptome bezeichnet, wobei eine Mindestdauer von 24 Stunden vorliegen muss, mindestens 30 Tage zu einem vorausgegangenem Schub Abstand sein müssen und die Symptome nicht durch andere Ursachen erklärt werden können (GNP 2023).

Zu den häufigen Symptomen einer Manifestation der MS zählen ein Visusverlust durch Optikusneuritis, Doppelbilder durch Hirnstammläsionen, und Symptome wie Lähmungsercheinungen oder Sensibilitätsverluste der Extremitäten aufgrund von entzündlichen Läsionen der langen Bahnen im Rückenmark oder Gangstörungen durch Läsionen im Kleinhirn (Huppke et al. 2014; Cavenaghi et al. 2017). Bei Kindern zeigen sich meist initial ver-

schiedene Symptome bei multifokalen Ausfällen, wohingegen Jugendliche sich eher mit einer geringeren Symptomatik vorstellen.

Beim klinisch isolierten Syndrom (KIS) handelt es sich um eine Episode MS-typischer Symptome, die mindestens 24 h andauern und keine Anzeichen für eine Enzephalopathie beinhalten sollten. Zudem sollten die revidierten McDonald-Kriterien (2017) der MS nicht zutreffen (Gaetani et al. 2018). Etwa 85% der MS-Patient\*innen haben initial ein KIS durchgemacht (Gaetani et al. 2017). Mit Hilfe der 2017 revidierten McDonald-Kriterien kann der Übergang eines KIS in eine MS früher diagnostiziert werden, als es bisher der Fall war (Gaetani et al. 2018).

### 1.4.3 Diagnostik der MS

In der MS-Diagnostik stehen neben der Anamnese und der klinischen Untersuchung die kraniale und spinale Magnetresonanztomographie (MRT) mit Gadolinium als Kontrastmittel im Vordergrund. Hier können die Läsionsherde in der T2-Wichtung dargestellt werden. Zu den MS-typischen Läsionsherden zählen periventrikuläre, (juxta)kortikale, infratentorielle und spinale Herde (Thompson et al. 2018). Häufig finden sich aber auch Läsionen im Bereich der Nervi optici, die aber auch bei anderen demyelinisierenden Erkrankungen vorkommen können. Frische und ältere Läsionen werden dadurch unterschieden, dass die älteren Läsionen im Gegensatz zu frischen Läsionen kein Kontrastmittel mehr aufnehmen (Thompson et al. 2018). In die revidierten McDonald-Kriterien (Tabelle 1 und 2) gehen der klinische Verlauf inklusive Laboranalysen sowie die Form und das Alter der MS-Läsionen in der MRT-Bildgebung ein. Wichtig ist hierbei v. a. die Dissemination in Raum und Zeit, also die Kombination aus Läsionsherden in verschiedenen MS-typischen Lokalisationen und Läsionsherden mit unterschiedlichem Läsionsalter (Thompson et al. 2018).

Laborchemische Veränderungen bei MS sind v. a. im Liquor cerebrospinalis zu finden. Als typische, aber nicht spezifische Veränderung können isolierte oligoklonale Banden bei ca. 95% der MS-Patient\*innen nachgewiesen werden (Link und Huang 2006). Dabei handelt es sich um intrathekal synthetisierte Immunglobuline vom IgG-Subtyp (Laterre et al. 1970). Ihr Vorliegen dient auch als prädiktiver Marker für den Übergang eines KIS in eine MS (Dobson et al. 2013) und nach den revidierten McDonald-Kriterien von 2017 gelten sie als Zusatzkriterium für das Vorliegen einer MS. Aufgrund fehlender spezifischer Veränderungen ist bei der Initialdiagnostik insbesondere auch eine Mitbeteiligung des ZNS durch infektiöse (z. B. Borreliose, Infektionen durch Eppstein-Barr-Virus, Masernvirus, Mumpsvi-

rus oder Rötelnvirus) oder autoimmune Erkrankungen (z. B. systemischer Lupus erythematoses, Anti-Phospholipid-Syndrom) auszuschließen. Dazu sollten neben serologischen Untersuchungen auch die Untersuchung elektrisch evozierter Potenziale und ein Elektroenzephalogramm durchgeführt werden.

**Tabelle 1: Diagnosekriterien der schubförmig-remittierenden Multiplen Sklerose basierend auf Thompson et al. (Thompson et al. 2018)**

Revidierte McDonald-Kriterien 2017 für schubförmig-remittierende Multiple Sklerose		
Anzahl der Schübe	Anzahl der Läsionen	Zusätzliche Diagnosekriterien
≥2	≥2	Keine
≥2	1	- <b>räumliche Dissemination</b> im MRT erfüllt <b>oder</b> - klinisch nachgewiesener Schub mit einer weiteren Läsion <b>oder</b> - historische Hinweise für zurückliegenden Schub wegen alter Läsionen
1	≥2	- <b>zeitliche Dissemination</b> im MRT erfüllt <b>oder</b> - ein weiterer klinisch nachgewiesener Schub <b>oder</b> - oligoklonale Banden isoliert im Liquor (nicht im Serum)
1	1	<b>Räumliche und zeitliche Dissemination</b> im MRT

**Tabelle 2: Diagnosekriterien der primär-progredienten Multiplen Sklerose nach Thompson et al. (Thompson et al. 2018)**

Revidierte McDonald-Kriterien 2017 für primär-progrediente Multiple Sklerose	
Klinische Symptome	Notwendige Zusatzkriterien
≥1 Jahr klinische nicht schubhafte Behinderungsprogression	Mindestens 2 der folgenden 3 Kriterien: - ≥ 1 T2-Läsion periventriculär, kortikal/juxtakortikal oder intratentoriell - ≥ 2 T2-Läsionen im spinalen MRT - isolierte oligoklonale Banden im Liquor



#### 1.4.4 Therapie bei der MS

Im akuten Schub wird bei der MS auf eine hochdosierte intravenöse Methylprednisolontherapie für drei bis fünf Tage (typischerweise 1g/ Tag bei Erwachsenen, 20 mg/kg Körpergewicht pro Tag bei Kindern) in Kombination mit einem Protonenpumpeninhibitor gesetzt. Wenn es darunter zu keiner Besserung kommt, sollte die Steroidpulstherapie wiederholt werden. Bei sehr schwerem Verlauf sollte zudem eine Plasmapherese in 5 Zyklen oder eine Immunadsorption durchgeführt werden (Jakimovski et al. 2022).

Im Anschluss daran sollte nach aktueller S1-Leitlinie immer eine immunmodulatorische Therapie erfolgen, da sie die Schubrate reduziert und dadurch zu einer Verbesserung der Prognose aufgrund der Reduktion irreversibler Schäden führt (GNP 2023). Hierfür ist bei der Einteilung des MS-Verlaufes eine milde bis moderate Form von einer hoch aktiven Form (z. B. starkes Defizit, schlechte Erholung, hohe Schubfrequenz, hoher Behinderungsgrad, frühe Pyramidenbahnbeteiligung, hohe Läsionslast) abzugrenzen. Die entsprechenden immunmodulatorischen Medikamente werden anhand ihrer Wirksamkeit, eine relative Reduktion der Schubrate zu ermöglichen, in insgesamt 3 Kategorien eingeteilt. Eine Zulassung bei Kindern ist jedoch stark variabel, altersabhängig und bisher nur teilweise in Studien überprüft (GNP 2023).

Die erste Kategorie (30-50% Reduktion) umfasst Beta-Interferone (je nach Präparat zugelassen ab 2/10/12 Jahren), Dimethylfumarat (zugelassen ab 13 Jahren), Diroximelfumarat (zugelassen ab > 18 Jahre), Glatirameracetat (zugelassen ab 12 Jahren) und Teriflunomid (zugelassen ab 10 Jahren) (Jakimovski et al. 2022). Die zweite Kategorie (50-60% Reduktion) beinhaltet Fingolimod (zugelassen ab 12 Jahren), Cladribin und Ozanimod (beide zugelassen ab > 18 Jahre). Zur dritten Kategorie (>60% Reduktion bzw. >40% Reduktion im Vergleich zu Kategorie 1) gehören Natalizumab, Ocrelizumab, Ofatumumab und Alemtuzumab (alle zugelassen ab > 18 Jahre). Alle nicht bei Kindern zugelassenen Medikamente werden bei (hoch-)aktiver Verlaufsform im Off-Label-Gebrauch verwendet (Chitnis et al. 2018). Dabei besteht bisher die beste Erfahrung mit Natalizumab (Huppke et al. 2008), wobei hier eine engmaschige Kontrolle notwendig ist, da die Gefahr der Entwicklung einer progressiven multifokalen Leukenzephalopathie (PML) durch eine Infektion mit dem JC-Virus besteht und die Therapie bei Nachweis einer JC-Virus-Infektion kontraindiziert ist (Huppke et al. 2015). Die anderen drei Medikamente der Kategorie 3 werden derzeit noch in Studien getestet.

## 1.5 MOG-IgG-assoziierte Erkrankungen

### 1.5.1 Definition und Epidemiologie der MOG-IgG-assoziierten Erkrankungen

Insbesondere bei Kindern und Jugendlichen sowie jungen Erwachsenen wurden in den letzten Jahren akute MOG-IgG-assoziierte idiopathische demyelinisierende Erkrankungen (MOGAE) des ZNS diagnostiziert (Hennes et al. 2017; Hegen und Reindl 2020). Der prozentuale Anteil an Patient\*innen mit positivem Nachweis von MOG-Antikörpern lag bei ca. 30% (Bruijstens et al. 2020a) mit einer jährlichen Inzidenz von ca. 0,31 auf 100.000 Einwohner (de Mol et al. 2020) und weiblicher Prädominanz bei einem Geschlechterverhältnis von 2:1 (Jurynczyk et al. 2017). Bei Erwachsenen mit demyelinisierenden Erkrankungen werden MOG-Antikörper hingegen viel seltener nachgewiesen (Held et al. 2021).

### 1.5.2 Klinisches Spektrum der MOG-IgG-assoziierten Erkrankungen

Zu den MOGAE zählen die akute disseminierte Enzephalomyelitis (ADEM) oder Varianten der ADEM (z. B. multiphasische ADEM (mADEM)), ADEM gefolgt von einer Optikusneuritis (ADEM-ON), Aquaporin-4-(AQP4)-seronegative Neuromyelitis-optica-Spektrum-Erkrankungen (NMOSD), monophasische oder rezidivierende isolierte Optikusneuritiden (ON), langstreckige transverse Myelitiden (LETM) und die N-methyl-D-Aspartat-Rezeptor-Enzephalitis mit überlappendem demyelinisierendem Syndrom (Peschl et al. 2017b; Armangue et al. 2020) (Tabelle 3).

**Tabelle 3: Kriterien zur Diagnose einer MOG-IgG-assoziierten Erkrankung**

<b>Abschnitt 1: Diagnosestellung bei Erfüllung aller vier nachfolgenden Kriterien:</b>
1. monophasische oder rezidivierende akute Optikusneuritis, Myelitis, Hirnstammenzephalitis, oder Enzephalitis, oder jedwede Kombination dieser Syndrome und
2. radiologische oder – nur bei Patient*innen mit Optikusneuritis – elektrophysiologische (VEP) Befunde, die mit einer demyelinisierenden Erkrankung des ZNS vereinbar sind, und
3. Nachweis von IgG-Autoantikörpern gegen das Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein (MOG), nachgewiesen in einem zellbasierten Assay, der humanes MOG in voller Länge als Zielantigen verwendet, und
4. Abwesenheit von <i>Red Flags</i> (Abschnitt 2) oder, falls <i>Red Flags</i> vorhanden sind, Bestätigung des MOG-IgG-Serostatus des Patient*innen in einem zweiten, methodisch unterschiedlichen Assay (oder, wenn kein anderer Assay verfügbar ist, in einer zweiten unabhängigen Probe)

<b>Red Flags bei der Diagnosestellung einer MOG-assoziierten Erkrankung</b>
<p>Krankheitsverlauf:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- chronisch fortschreitende Erkrankung (sehr selten bei MOG-IgG-positiven Patient*innen)</li> <li>- plötzliches Auftreten der Symptome, z. B. &lt; 4 h vom Beginn bis zum Maximum (ischämische Ursache erwägen), oder kontinuierliche Verschlechterung der Symptome über Wochen (Tumor, Sarkoidose etc. erwägen)</li> </ul>
<p>MRT:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Dawson-Finger-artige Läsion oder Läsion neben einem lateralen Ventrikel, die ovoid/rund ist oder mit einer inferioren Temporallappenläsion assoziiert ist</li> <li>- Aktivität im kranialen MRT im Gehirn mit kontinuierlicher Zunahme der Läsionslast zwischen Schüben (begrenzte Evidenz)</li> </ul>
<p>Liquor:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- bi- oder trispezifische MRZ-Reaktion (MS erwägen)</li> </ul>
<p>Serologie:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- MOG-IgG-Titer am oder nur knapp über dem assayspezifischen Cut-off; insbesondere (aber nicht ausschließlich), wenn das klinische Bild atypisch ist</li> <li>- MOG-IgM- und/oder MOG-IgA-positiv, aber MOG-IgG-negativ (klinische Signifikanz IgA/IgM-Ak unbekannt)</li> <li>- MOG-IgG-Positivität nur im Liquor, nicht im Serum (MOG-IgG wird typischerweise extrathekal produziert)</li> <li>- gleichzeitiges Vorliegen von AQP4-IgG und MOG-IgG („Doppelpositivität“; extrem selten; Wiederholung beider Tests empfohlen)</li> </ul>
<p>Sonstiges:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- klinische oder paraklinische Befunde, die auf andere Diagnosen hinweisen (z. B. Neurotuberkulose, Neuroborreliose, Neurosyphilis, Neurosarkoidose, Behçet-Syndrom, subakute kombinierte Degeneration des Rückenmarks, Lebersche hereditäre Optikusneuropathie, Vaskulitis, ZNS- Lymphom, Gliomatosis cerebri, paraneoplastische neurologische Syndrome, PRES, PML, Hinweise auf eine ZNS-Infektion)</li> </ul>

Abkürzungen: (AQP4) Aquaporin-4; (Ig) Immunglobulin; (MOG) Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein; (MRZ-Reaktion) Masern-, Röteln- und Zoster-Virus-Reaktion; (MS) Multiple Sklerose; (PML) progressive multifokale Leukenzephalopathie; (PRES) posteriores reversibles Enzephalopathie-Syndrom; (VEP) visuell evozierte Potenziale. Die Tabelle ist nach der SK2-Leitlinie erstellt worden und beruht ursprünglich auf Jarius et al. (Jarius et al. 2018a).

### 1.5.3 Diagnostik der MOG-IgG-assoziierten Erkrankungen

Im klinischen Alltag kann der Nachweis von MOG-IgG-Antikörpern für die Diagnosestellung der jeweiligen Krankheit zur Hilfe genommen werden, was für die entsprechende Therapieentscheidung wichtig ist. Außerdem kann der Nachweis von MOG-IgG-Antikörpern Hinweise auf den Verlauf und die Prognose der jeweiligen Erkrankung geben (Hacohen et al. 2015; Ketelslegers et al. 2015).

Zum Nachweis von MOG-IgG-Antikörpern sollten Verfahren verwendet werden, bei denen die Konformation der Epitope erhalten ist (O'Connor et al. 2007; Waters et al. 2019). Dazu zählen insbesondere Zell-basierte Nachweisverfahren, deren Verwendung auch nach aktuellem Konsensus bei bestimmten Konstellationen (Tabelle 4) empfohlen wird (Jarius et al. 2018a; López-Chiriboga et al. 2018). Dabei sollen IgG-spezifische Detektionsantikörper verwendet werden, da H+L-spezifische Sekundärantikörper ungeeignet sind (Banwell et al. 2023).

### 1.5.4 Liquorbefunde der MOG-IgG-assoziierten Erkrankungen

Charakteristische Veränderungen im Liquor sind für diese Erkrankungsgruppe im akuten Schub der Nachweis einer erhöhten Anzahl an Immunzellen, v. a. neutrophile Granulozyten, eine im Gegensatz zur MS meist fehlende intrathekale IgG-Synthese und dem Nachweis von oligoklonalen Banden in lediglich 10-20% der Fälle sowie Hinweise für eine Schrankenstörung (Jarius et al. 2020a; Jarius et al. 2020b).

**Tabelle 4: Indikationen zur Testung von MOG-Antikörpern bei akuten demyelinisierenden Erkrankungen des ZNS (Hemmer 2023)**

<b>Abschnitt 1: Testung auf MOG-Antikörper bei Erfüllen folgender Kriterien:</b>
1. monophasische oder rezidivierende akute Optikusneuritis, Myelitis, Hirnstammenzephalitis, oder Enzephalitis, oder jedwede Kombination dieser Syndrome und
2. radiologische oder – nur bei Patient*innen mit Optikusneuritis – elektrophysiologische (VEP) Befunde, die mit einer demyelinisierenden Erkrankung des ZNS vereinbar sind, und
3. mindestens einer der folgenden Befunde (a–y) aus Abschnitt 2.

#### **Abschnitt 2: Befunde**

## MRT:

- a. longitudinal extensive Rückenmarksläsion ( $\geq 3$  WKS, zusammenhängend) in der MRT (sog. LETM)
- b. longitudinal ausgedehnte Rückenmarksatrophie ( $\geq 3$  WKS, zusammenhängend) in der MRT bei Patientinnen mit einem Ereignis in der Vorgeschichte, das mit einer akuten Myelitis vereinbar ist
- c. Conus-medullaris-Läsion, insbesondere wenn sie zu Beginn vorhanden ist
- d. longitudinal ausgedehnte Läsion des Sehnervens (z. B.  $> 1/2$  der Länge zwischen Sehnervkopf und Chiasma, T2 oder T1/Gd)
- e. perioptisches Gd-Enhancement während akuter ON
- f. normales supratentoriales MRT bei Patient\*innen mit akuter ON und/oder Myelitis und/oder Hirnstammenzephalitis
- g. Hirn-MRT zeigt Läsionen, aber keine periventrikuläre Läsion, die ovoid/rund ist oder mit einer inferioren Temporallappenläsion assoziiert ist, keine Dawson-Finger-artige Läsion und keine juxtakortikale U-Faser-Läsion (Matthews-Jurynczyk-Kriterien)
- h. große, konfluierende T2-Läsion, auf ADEM hinweisend

## Fundoskopie:

- i. prominente(s) Papillenödem/Papillitis bei akuter ON

## Liquor:

- j. neutrophile Pleozytose oder Zellzahl im Liquor  $> 50/\mu\text{l}$
- k. Fehlen von liquorspezifischen OKB, egal ob bei Erst- oder bei Repunktion (gilt nur für kontinentaleuropäische Patient\*innen)

## Histopathologie:

- l. primäre Demyelinisierung mit intraläsionalen Komplement- und IgG-Ablagerungen mit früherer Diagnose einer „Pattern II MS“

## Klinische Präsentation:

- n. simultane bilaterale akute Optikusneuritis (ON)
- o. ungewöhnlich hohe Schubfrequenz oder Erkrankung hauptsächlich durch rekurrende ON gekennzeichnet
- p. besonders schweres Visusdefizit/Erblindung in einem/beiden Augen während oder nach akutem Schub
- q. besonders schwere oder häufige Episoden von akuter Myelitis oder Hirnstammenzephalitis
- r. persistierende Sphinkter- und/oder Erektionsstörung nach Myelitis
- s. Patient\*innen mit Diagnose einer „ADEM“, „rADEM“, „mADEM“ oder „ADEM-ON“
- t. akute respiratorische Insuffizienz, Bewusstseinsstörung, Verhaltensänderungen oder epileptische Anfälle (radiologische Anzeichen einer Demyelinisierung erforderlich!)

<p>u. Erkrankungsbeginn innerhalb von 4 Tagen bis etwa 4 Wochen nach einer Impfung</p> <p>v. ätiologisch unklare, therapierefraktäre persistierende Übelkeit mit Erbrechen oder hartnäckiger Schluckauf (kompatibel mit Area-postrema-Syndrom)</p> <p>w. gleichzeitiges Vorliegen von Teratom oder NMDAR-Enzephalitis (niedrige Evidenz)</p>
<p>Ansprechen auf Immuntherapie:</p> <p>x. häufiges Wiederaufflammen der Schubsymptome nach Ende der IVMP-Therapie oder steroidabhängige Symptome (einschließlich CRION)</p> <p>y. deutliche Zunahme der Schubrate nach Behandlung mit IFN-beta oder Natalizumab bei Patient*innen mit (vermuteter) MS (niedrige Evidenz)</p>
<p>Abkürzungen: (ADEM) akute disseminierte Enzephalomyelitis; (ADEM-ON) ADEM mit rekurrerender ON; (CRION) chronische rezidivierende entzündliche Optikusneuropathie; (CSF) Liquor cerebrospinalis; (Gd) Gadolinium; (IVMP) intravenöses Methylprednisolon; (LETM) longitudinal extensive transverse Myelitis; (MOG) Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein; (MRT) Magnetresonanztomographie; (MS) Multiple Sklerose; (NMDAR) N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptor; (OKB) oligoklonale IgG-Banden; (ON) Optikusneuritis; (VEP) visuell evozierte Potenziale; (WKS); Wirbelkörpersegmente; (ZNS) zentrales Nervensystem</p>

### 1.5.5 Therapieoptionen der MOG-IgG-assoziierten Erkrankungen

Nach den europäischen Konsensusempfehlungen sollte zur Therapie der MOGAE eine intravenöse Therapie mit Methylprednisolon (20-30 mg/kg Körpergewicht pro Tag) für 3-5 Tage durchgeführt werden, da ein gutes Ansprechen beobachtet werden konnte und die Symptome rückläufig waren. Eine Plasmapherese und die Gabe hochdosierter intravenöser Immunglobuline (IVIg) bei schubförmigen Krankheitsverlauf als weitere mögliche Therapiemaßnahmen zu erwägen (Bruijstens et al. 2020b). Zur Vorbeugung von Frührezidiven sollte im Anschluss an die Stoßtherapie eine mehrwöchige Therapie mit oralen Steroiden mit langsamer Dosisreduktion erfolgen (Wong et al. 2018). Für die Rezidivprophylaxe bei Kindern sind IVIg die erste Wahl. Neue Studien konnten zeigen, dass auch eine Interleukin-6-Blockade mit dem monoklonalen Antikörper Tocilizumab die Rezidivrate bei therapierefraktären Erkrankungen reduzieren kann (Ringelstein et al. 2022).

## 1.5.6 Spezielle Krankheitsbilder der MOG-IgG-assoziierten Erkrankungen

### 1.5.6.1 Akute disseminierte Enzephalomyelitis

Die akute disseminierte Enzephalomyelitis (ADEM) ist eine v. a. bei Kindern und jungen Erwachsenen auftretende idiopathische demyelinisierende Erkrankung des ZNS (Pohl et al. 2016). Der Häufigkeitsgipfel liegt zwischen dem 5. und 8. Lebensjahr und Jungen sind etwas häufiger als Mädchen betroffen (Tenenbaum et al. 2002; Pohl et al. 2007). Es wurde beobachtet, dass eine ADEM gehäuft nach einem Infekt der oberen Atemwege (Murphy und Austin 1985; Karussis und Petrou 2014; López-Chiriboga et al. 2018) oder einer Immunisierung wie z. B. einer Impfung (Chen et al. 2016; Jarius et al. 2022) auftreten kann. Erste Anzeichen für eine ADEM-artige Erkrankung, die in Assoziation zu einem Infekt auftrat, gab es bereits im 18. Jahrhundert (Lucas 1790).

Die Symptome der Patient\*innen mit einer ADEM treten plötzlich auf und umfassen multifokale neurologische Ausfälle, aber auch die Entwicklung einer Enzephalopathie, welche ein wichtiges diagnostisches Kriterium der ADEM darstellt. Unter Enzephalopathie versteht man Verhaltensänderungen, aber auch Bewusstseinsänderungen, welche nicht durch Fieber erklärbar sind (Krupp et al. 2013). Im Anschluss an die Symptomentwicklung kommt es meist zu einer raschen Erholung der neurologischen Funktionen. Im Gegensatz zur MS bleiben neurodegenerative Veränderungen meistens aus (Young et al. 2010).

Die demyelinisierenden Veränderungen bei der ADEM können als multiple Läsionen in mehreren Hirnlappen in der Magnetresonanztomographie (MRT) dargestellt werden. In der T2-Wichtung imponieren sie meist als diffuse, schlecht abgrenzbare, große (>1 cm) Läsionsherde und nehmen häufig Gadolinium-haltiges Kontrastmittel auf (Young et al. 2010; Hardy et al. 2016).

In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass sich bei bis zu 50% der Kinder und Jugendlichen sowie ca. 10-20% der Erwachsenen mit ADEM anti-MOG-Antikörper im Serum nachweisen ließen (O'Connor et al. 2007; Brilot et al. 2009; Lalive et al. 2011; Reindl et al. 2020). Die genaue Funktion von anti-MOG-Antikörpern bei der Pathogenese der ADEM ist noch nicht endgültig geklärt. Bei der Pathogenese der Demyelinisierung spielen aber eine Antikörper-abhängige Phagozytose, eine Komplement-abhängige Lyse des Myelins (Peschl et al. 2017a) sowie die Antikörper-abhängige, zellvermittelte Zytotoxizität (ADCC) eine wichtige Rolle (Spadaro et al. 2018).

Histopathologisch betrachtet sind die demyelinisierten Areale auf perivenöse Bereiche beschränkt. Das perivaskuläre Entzündungsinfiltrat besteht aus T-Zellen, mit Myelinfragmen-

ten beladenen Makrophagen und Granulozyten. Die Läsionsherde zeigen zudem häufiger ein ähnlich weit fortgeschrittenes Stadium auf (Young et al. 2010).

Wenn im Serum von Patient\*innen mit ADEM anti-MOG-Antikörper nachgewiesen werden können, spricht dies für eine bessere Prognose. Das Risiko, dass die Kriterien einer MS zutreffen, ist dabei ebenfalls deutlich geringer als bei Patient\*innen ohne erhöhte anti-MOG-Antikörper (Hacohen et al. 2015; Ketelslegers et al. 2015).

Die ADEM unterscheidet sich von der MS klinisch durch das Auftreten der enzephalopathischen Veränderungen, laborchemisch durch den Nachweis von anti-MOG-Autoantikörpern sowie dem Fehlen oligoklonaler Banden und in der Bildgebung durch unterschiedliche Morphologie und Lokalisation der Läsionsherde (Krupp et al. 2013).

### **1.5.6.2 Multiphasische disseminierte Enzephalomyelitis**

Bei der multiphasischen bzw. rezidivierenden disseminierten Enzephalomyelitis (mADEM bzw. rADEM) kommt es in einem Abstand von mindestens 3 Monaten zu einem oder mehreren weiteren ADEM-ähnlichen klinischen Episoden. Zudem finden sich ADEM-typische Läsionen in den MRT-Aufnahmen und im Liquor kann eine Pleozytose festgestellt werden. Außerdem ist auch eine Persistenz der anti-MOG-Antikörper im Serum nachweisbar, wenn diese beim primären Ereignis bereits nachweisbar waren (Baumann et al. 2016).

Die Abgrenzung zur MS kann schwierig sein, da auch sie episodisch zu neurologischen Symptomen führen kann. Da sowohl die klinischen Symptome als auch Veränderungen im Liquor nicht eindeutig dem einen oder anderen Krankheitsbild zugeschrieben werden können, sollte die MRT-Untersuchung zur Differentialdiagnose hinzugezogen werden (Tsai und Hung 1996). Wie bei der ADEM lassen sich auch bei der mADEM größere Läsionsherde als Hyperintensitäten in der T2-gewichteten Aufnahme nachweisen, wohingegen bei der MS meist kleinere Läsionen auftreten. Außerdem sind die Läsionen bei ADEM und mADEM eher in den peripheren subkortikalen Zonen der weißen Substanz zu finden, wohingegen sie bei der MS häufig im Bereich der periventrikulären Areale nachweisbar sind (Mizutani et al. 1994; Poser 1994; Khan et al. 1995).

Ein weiterer Aspekt bei Patient\*innen mit mADEM, der für die Differentialdiagnose zur MS eine wichtige Rolle spielt, ist der Nachweis von anti-MOG-Antikörpern. Diese sprechen gegen eine MS, wie in mehreren Studien untermauert werden konnte (Hacohen et al. 2015; Ketelslegers et al. 2015).



### 1.5.6.3 Neuromyelitis optica und Neuromyelitis-optica-Spektrum-Erkrankungen

Bei der klassischen Neuromyelitis optica (NMO), auch Dévic-Syndrom genannt, handelt es sich um eine idiopathische demyelinisierende Erkrankung des ZNS, bei der eine mono- oder bilaterale Optikusneuritis und eine akute Myelitis mit langstreckigen Läsionen des Rückenmarks (>3 Segmente) auftreten. Charakteristischerweise können bei Patient\*innen mit klassischer NMO gegen das Kanalprotein Aquaporin-4 (AQP4) gerichtete Autoantikörper (bis zu 80% der Fälle) nachgewiesen werden (Jarius et al. 2012; Jarius et al. 2020c). Das AQP4-Molekül befindet sich auf den Enden der Fortsätze der Astrozyten (Lennon et al. 2004; Lennon et al. 2005). Die Läsionsherde sind aufgrund des Expressionsmusters von Aquaporin-4 im Gehirn v. a. in den periventrikulären Arealen und im Rückenmark, dort v. a. um den Zentralkanal herum, zu finden (Wingerchuk et al. 2006; Krupp et al. 2013). Die NMO tritt insbesondere im Erwachsenenalter zwischen dem 30. bis 40. Lebensjahr auf, nur etwa 4% der Patient\*innen befinden sich im Kindesalter (Jarius et al. 2012). In Deutschland liegt das Geschlechterverhältnis von Mädchen zu Jungen bei ca. 2,6 : 1 und die jährliche Inzidenzrate beträgt 0,022 auf 100.000 Einwohner (Lechner et al. 2020). Im Gegensatz zur ADEM handelt es sich bei der klassischen NMO um eine primäre autoimmune Astrozytopathie, bei der es zu einem massiven Verlust von Astrozyten kommt, und nicht um eine primäre demyelinisierende Erkrankung (Parratt und Prineas 2010; Fujihara et al. 2012; Misu et al. 2013). Der Mechanismus beruht vermutlich auf Antikörper- und Komplement-abhängiger Zellyse sowie ADCC (Phuan et al. 2013; Ratelade et al. 2013; Ratelade et al. 2013; Wrzos et al. 2014). Die Komplement-abhängige Wirkung ist bei der NMO deutlich höher als bei MOGAE (Lerch et al. 2023). Anschließend kommt es sekundär aber auch zu einem Verlust von Oligodendrozyten und ihren Vorläuferzellen (Brück et al. 2012; Wrzos et al. 2014). Durch welche Mechanismen genau der Untergang der Oligodendrozyten induziert wird, ist nicht eindeutig geklärt. Man geht von einer Exzitotoxizität (Marignier et al. 2010) und einer Komplement-abhängigen Schädigung (Tradtrantip et al. 2017) aus. Im Jahr 2007 wurde für Erkrankungen mit Seropositivität für anti-AQP4-Antikörper die Bezeichnung der Neuromyelitis-optica-Spektrum-Erkrankungen (NMOSD) eingeführt (Wingerchuk et al. 2007). In 2015 wurden die Kriterien überarbeitet und seitdem zählen die klassische NMO, die Optikusneuritis (ON), die langstreckige transverse Myelitis (LETM) und kombinierte Formen genannter Erkrankungen zu den NMOSDs (Wingerchuk et al. 2015) (Tabelle 5). Außerdem hat man festgestellt, dass die typischen AQP4-Antikörper nur bei ca. 80% der Patient\*innen mit NMOSD-Phänotyp nachweisbar sind (Jarius et al. 2012; Jarius et al. 2020c), weshalb man AQP4-seropositive und AQP4-seronegative NMOSDs unterscheidet (Tan et al. 2016).

**Tabelle 5: Diagnostische Kriterien der NMOSD nach International Panel for NMO Diagnosis 2015 (Wingerchuk et al. 2015)**

<b>Abschnitt 1: Diagnostische Kriterien für NMOSD mit AQP4-IgG-Antikörper</b>
<p>1. mind. 1 von 6 Kernsymptomen:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Optikusneuritis</li> <li>- akute Myelitis</li> <li>- akutes Area-postrema-Syndrom (Schluckauf oder Übelkeit und Erbrechen ohne anderweitige Erklärung)</li> <li>- akutes Hirnstammsyndrom</li> <li>- symptomatische Narkolepsie oder akutes dienzebrales Syndrom mit NMOSD-typischer dienzebralem MRT-Läsion (periependymal 3. Ventrikel/ Thalamus/Hypothalamus)</li> <li>- symptomatisches zerebrales Syndrom mit NMOSD-typischer cerebraler MRT-Läsion (konfluierend subkortikal, periependymal Seitenventrikel, Corpus callosum, kortikospinaler Trakt)</li> </ul>
2. Positiver Nachweis AQP4-IgG-Antikörper in zellbasiertem Assay
3. Ausschluss von Differentialdiagnosen

<b>Abschnitt 2: Diagnostische Kriterien für NMOSD ohne AQP4-IgG-Antikörper</b>
<p>1. mind. 2 von 6 Kernsymptome (siehe Kasten 1) infolge eines oder mehrerer Schübe und alle drei der folgenden Voraussetzungen:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- mind. eines der Kernsymptome Optikusneuritis oder langstreckige Myelitis oder Area-postrema-Syndrom</li> <li>- räumliche Dissemination in der MRT (= mind. zwei Lokalisationen der Kernsymptome)</li> <li>- erfüllte MRT-Zusatzkriterien <ul style="list-style-type: none"> <li>- akute Optikusneuritis: N. opticus in der MRT über mind. die Hälfte seiner Länge T2-hyperintens oder KM-aufnehmend oder mit Beteiligung des Chiasmata oder cMRT unauffällig oder nur unspezifischen Läsionen</li> <li>- akute Myelitis: über mind. drei Wirbelkörpersegmente reichende akute Myelitis (longitudinale extensive transverse Myelitis (LETM)) oder über mind. drei Wirbelkörpersegmente reichende Atrophie bei Zustand nach Myelitis</li> <li>- Area-postrema-Syndrom: Läsion in dorsaler Medulla/Area postrema</li> <li>- Hirnstammsyndrom: periependymale Hirnstammläsion 4. Ventrikel</li> </ul> </li> </ul>
2. Fehlender Nachweis AQP4-IgG-Antikörper in zellbasiertem Assay
3. Ausschluss von Differenzialdiagnosen

Bei einigen Patient\*innen mit AQP4-seronegativer NMOSD konnten dafür Autoantikörper gegen MOG nachgewiesen werden (Mader et al. 2011). Dies trifft auf etwa 7-20% der Erwachsenen mit NMOSD zu, wohingegen die Inzidenz bei Kindern mit MOG-seropositiven NMOSD nicht eindeutig geklärt ist (Tenembaum et al. 2020). Des Weiteren ist das Geschlechterverhältnis der Betroffenen bei Kindern und Erwachsenen annähernd gleich und die Patient\*innen sind meist etwas jünger als Patient\*innen mit AQP4-seropositiver NMOSD. Außerdem haben die betroffenen Patient\*innen mit nachweisbaren anti-MOG-Antikörpern meist weniger schwerwiegende klinische Verläufe, zeigen eine erhöhte Beteiligung der kaudalen Rückenmarksanteile und erholen sich besser als Patient\*innen mit AQP4-Antikörpern oder Seronegativität für beide Antikörper (Kitley et al. 2014; Sato et al. 2014). Deshalb erfolgt bei AQP4-seropositiven NMOSDs zunächst eine immunsuppressive Therapie, die bei unzureichendem Ansprechen mit einer Antikörpertherapie ergänzt werden kann (Kümpfel et al. 2023).

Im Gegensatz zu den AQP4-seropositiven NMOSDs, die als primäre Astrozytopathien angesehen werden, handelt es sich bei den MOG-seropositiven NMOSDs um primär demyelinisierende Erkrankungen, bei denen die Oligodendrozyten geschädigt werden (Mader et al. 2011; Spadaro et al. 2015; Lechner et al. 2016; Fujihara 2019), so dass sie zur Gruppe der MOGAE gezählt werden.

## 1.6 Fragestellung der Dissertation

Das Ziel der hier vorgestellten Arbeit war es, ein Zell-basiertes Assay zum Nachweis von anti-MOG-Antikörpern zu entwickeln. Dazu wurde zunächst mittels Amplifikationsverfahren das MOG-Gen vervielfältigt und über Transformations- und Transfektionsansätze in humane Zellen integriert, wo es konformationsgetreu exprimiert werden sollte.

Anschließend wurden mit diesem Assay die Seren von neuropädiatrischen Patient\*innen der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin mit Verdacht auf eine demyelinisierende Erkrankung auf anti-MOG-Antikörper untersucht, um abzuklären, ob bei ihnen eine Erkrankung aus dem Formenkreis der MOG-IgG-assoziierten Erkrankungen vorgelegen hat.

Die klinische Relevanz dieser Untersuchungen ist die Abgrenzung von einer MOG-IgG-assoziierten Erkrankung gegenüber einer MS und anderen idiopathischen demyelinisierenden Erkrankungen. Der Grund dafür ist das unterschiedliche therapeutische Vorgehen bei den verschiedenen Erkrankungen und ihre unterschiedliche Prognose.

## 2 Material und Methoden

Diese Studie zur Messung von anti-MOG-Antikörpern als Serumbiomarker und die Verwendung der verschlüsselten und retrospektiv analysierten Daten von Patient\*innen wurde von der Ethikkommission der Universitätsmedizin Göttingen durch folgenden Antrag inklusive Amendement genehmigt (Antrag: 3/9/17; Amendement vom 19.07.2021). Alle Versuche sind im Einklang mit der Deklaration von Helsinki sowie nach institutionellen, bundesstaatlichen und staatlichen Richtlinien durchgeführt worden.

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Chemikalien

**Tabelle 6: Chemikalien**

Substanzen	Hersteller
AgarAgar (Kobe I)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Ampicillin-Natriumsalz	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Aqua ad iniectabilia	AlleMan Pharma GmbH, Rimbach
Blasticidin S HCl	Life Technologies GmbH, Darmstadt
Borsäure	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
dNTP (100 mM)	Life Technologies GmbH, Darmstadt
Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Dako Denmark A/S, Glostrup, Dänemark
Dubecco´s Modified Eagle Medium (DMEM)	Life Technologies GmbH, Darmstadt
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Merck KGaA, Darmstadt
Ethanol (> 99,8 %)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Merck KGaA, Darmstadt
Fetal Bovine Serum (FCS)	Merck KGaA, Darmstadt
Fluorescence Mounting Medium	DAKO Denmark A/S, Glostrup, Dänemark

Geneticin	Life Technologies GmbH, Darmstadt
Green GoTaq® Reaction Buffer	Promega GmbH, Mannheim
Hefeextrakt	Merck KGaA, Darmstadt
HEPES Buffer Solution (1 M)	Life Technologies GmbH, Darmstadt
Isopropanol (> 99%)	Merck KGaA, Darmstadt
Kanamycin-Sulfat	Life Technologies GmbH, Darmstadt
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Natriumcitrat	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
NEBuffer	New England Biolabs GmbH, Frankfurt a.M.
Paraformaldehyde	Merck Millipore, Merck KGaA, Darmstadt
Phosphat-buffered Saline (PBS)	Merck KGaA, Darmstadt
Penicillin/Streptomycin (100x)	Merck KGaA, Darmstadt
StarPure Agarose	STARLAB GmbH, Hamburg
S.O.C-Medium	Life Technologies GmbH, Darmstadt
Triton® X-100	MP Biomedicals, Illkirch, Frankreich
Trizmabase	Merck KGaA, Darmstadt
Trypton	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Xylol (> 96%)	Th. Geyer GmbH & Co. KG

### 2.1.2 Laborkits

**Tabelle 7: Verwendete Laborkits**

Laborkit	Hersteller
EndoFree® DNA Maxi Kit	Qiagen GmbH, Hilden
Gateway® BP Clonase® Enzyme Mix	Life Technologies GmbH, Darmstadt
Gateway® LR Clonase® Enzyme Mix	Life Technologies GmbH, Darmstadt
Lipofectamine® 3000 Transfection Kit	Life Technologies GmbH, Darmstadt
pcDNA™ 6.2/C-EMGFP-6W/TOPO® Kit	Life Technologies GmbH, Darmstadt
QIAquick® Gel Extraction Kit 250	Qiagen GmbH, Hilden
QIAprep® Spin Miniprep Kit	Qiagen GmbH, Hilden

### 2.1.3 Enzyme

**Tabelle 8: Genutzte Enzyme**

Enzymname	Hersteller
<i>Bam</i> HI-HF	Qiagen N.V., Hilden
<i>Bgl</i> II	New England Biolabs GmbH, Frankfurt a.M.
GoTaq®-DNA-Polymerase	Promega GmbH, Mannheim
<i>Hind</i> III-HF	New England Biolabs GmbH, Frankfurt a.M.
<i>Kpn</i> I-HF	New England Biolabs GmbH, Frankfurt a.M.
<i>Mlu</i> I-HF	New England Biolabs GmbH, Frankfurt a.M.
<i>Nde</i> I-HF	New England Biolabs GmbH, Frankfurt a.M.
Trypsin-EDTA (1x)	Life Technologies GmbH, Darmstadt

### 2.1.4 Gebrauchswaren

**Tabelle 9: Gebrauchswaren**

Gebrauchsware	Hersteller
Bio Rad Gelpufferkammer	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Bottle Top Filter	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
DURAN® Laborflasche (500 ml)	Merck KGaA, Darmstadt
Erlenmeyerkolben (250 ml/ 500 ml)	International GmbH, Hannover
Falcon (15 ml/ 50 ml)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
FALCON™ Zellsieb	Life Technologies GmbH, Darmstadt
Petrischalen (100 ml)	Greiner Bio One GmbH, Frickenhausen
Pipettenspitzen (10/100/1000µl)	STARLAB GmbH, Hamburg
Reaktionsgefäße (0,5/1,5/2 ml)	Eppendorf AG, Hamburg
Research Plus Pipetten	Eppendorf AG, Hamburg
Röhrchen (13 ml)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Serologische Pipetten (2/5/10/35 ml)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht

Steriles Falcon® (5 ml) Zellkulturflaschen Zellkulturplatten (6-Well und 24-Well)	BD Biosciences, San Jose, Kalifornien, USA Greiner Bio One GmbH, Frickenhausen Greiner Bio One GmbH, Frickenhausen
---	--

### 2.1.5 Geräte

**Tabelle 10: Geräte**

Gerät	Hersteller
ARPEGE 170 Stickstofftank	AIR LIQUIDE Medical GmbH, Düsseldorf
BD FACS ARIA™ II SORP Flow Cytometer Cell Sorter	BD Biosciences, San Jose, Kalifornien, USA
BD FACSCanto™ II	BD Biosciences, San Jose, Kalifornien, USA
Easypet	Eppendorf AG, Hamburg
Fluoreszenz-Mikroskop IX51	Olympus Deutschland GmbH, Hamburg
IKA® Schüttler 260 KS control	IKA®-Werke GmbH & CO. KG, Staufen
Inkubationsschrank	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Inkubationsschüttler	C. Gerhardt GmbH & Co. KG, Königswinter
Leica SM2000 R Schlittenmikrotom	Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch
Mastercycler® gradient	Eppendorf AG, Hamburg
Mikrowelle R-216 W	Sharp Electronics GmbH, Hamburg
Nano-Drop® Spectrometer ND-1000	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
Nunc™ 96-Well Mikrotiterplatten	Life Technologies GmbH, Darmstadt
PowerPac™ Basic power supply (300)	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Thermomixer	Eppendorf AG, Hamburg
Ultrazentrifuge J2-HS	Beckmann Coulter GmbH, Krefeld
Vakuumpumpe (VACUSAFE comfort)	Integra Biosciences GmbH, Konstanz
Wasserheizbad	GFL mbH, Burgwedel
Wärmeplatte	Life Technologies GmbH, Darmstadt
Werkbank (Hera Safe)	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Zell-Brutschrank	Nunc InterMed GmbH, Wiesbaden
Zentrifuge (5810 R und 5415 R)	Eppendorf AG, Hamburg



### 2.1.6 Sterilität der Lösungen, Medien und Gebrauchswaren

Die bei den Experimenten verwendeten Lösungen und die Medien für die Bakterienkultur wurden im Dampfdruckautoklaven bei 121° C und bei 1,5 bar sterilisiert. Lösungen, die eine Hitzeempfindlichkeit aufweisen, wurden durch einen Filter mit einer Porengröße von 0,2 µm steril filtriert. Gebrauchswaren wurden bei 180° C für 4 h hitzesterilisiert.

### 2.1.7 Puffer und Medien

Für die Herstellung des LB-Mediums (engl. *lysogeny broth*) und des LB-Agars wurden die notwendigen Bestandteile in bidestilliertem Wasser gelöst und die Lösungen autoklaviert. Nach dem Abkühlen der Lösung auf unter 60° C wurde Ampicillin (100 µg/ml) hinzugefügt. Die Komponenten für die Nährmedien, die in der Zellkultur benutzt worden sind, wurden in steriler Form bestellt und nach dem Ansetzen zusätzlich steril filtriert.

**Tabelle 11: Puffer und Nährmedien**

Medium/Puffer	Inhalt
LB-Medium (nach Miller) für Bakterienkultur:	10 g/L Trypton 5 g/L Hefeextrakt 10 g/L NaCl pH = 7
LB-Medium (nach Miller) für Agar-Platten:	10 g/L Trypton 5 g/L Hefeextrakt 10 g/L NaCl 15 g/L Agar pH = 7
Nährmedium für eukaryonte Zellen:	500 ml DMEM 50 ml FCS 5 ml Pen. /Strep.
Selektionsmedium für transfizierte Zellen:	49,625 ml Nährmedium (s.o.) 0,375 ml Blastocidin-Lösung

	(1 mg/ml)
10x TBE-Puffer für Gelelektrophorese:	108 g Trizma base 55 g Borsäure 40 ml EDTA (0,5 M)

### 2.1.8 Eukaryontische und prokaryontische Zellen

**Tabelle 12: Verwendete prokaryontische und eukaryontische Zellen**

Zellen	Hersteller
QBI-HEK-293A (Graham et al. 1977) One Shot™ TOP10 Chemically Component E. coli	Microbix Inc., Toronto, Canada Life Technologies GmbH, Darmstadt

### 2.1.9 Antikörper für Zellkulturansätze

**Tabelle 13: Primär- und Sekundärantikörper der Zellkulturansätze**

<b>Primärantikörper</b> Humanisierter IgG1-Anti-MOG- Antikörper (8-18 C5)	Norbert Goebels, Düsseldorf
<b>Sekundärantikörper</b> Alexa Fluor® 647 AffiniPure F(ab') <sub>2</sub> Fragment Goat Anti-Human IgG (H+L)	Jackson ImmunoResearch (Europe Ltd., Suffolk, UK)

### 2.1.10 Antikörper für Durchflusszytometrie

**Tabelle 14: Primärantikörper und Sekundärantikörper für Durchflusszytometrie**

Allophycocyanin (APC) AffiniPure F(ab') <sub>2</sub> Fragment Goat Anti-Human IgG (H+L)	Jackson ImmunoResearch (Europe Ltd., Suffolk, UK)
Alexa Fluor® 647 AffiniPure F(ab') <sub>2</sub>	Jackson ImmunoResearch (Europe Ltd., Suffolk, UK)

Fragment Goat Anti-Human IgM	folk, UK)
Fc5 $\mu$ fragment specific Mouse Anti-Human IgG1 Fc-PE (HP6001)	SouthernBiotech, Alabama, USA
IgA Antibody Mouse Anti-Human (IS11-8E10)	SouthernBiotech, Alabama, USA
IgG1 Antibody Mouse Anti-Human (IS11-12E4.23.20)	Miltenyi Biotec B.V. & CO. KG, Bergisch Gladbach, Nordrhein-Westphalen

### 2.1.11 Synthetisierte Primer für PCR von MOG

**Tabelle 15: MOG-Primer**

Primername	Primersequenz
TOPO-f-MOG	- CACCATGGCAAGCTTATCAAGA -
TOPO-r-MOG	- CTTGAAGAGCTACGAAATCCCTTC -

### 2.1.12 DNA

**Tabelle 16: DNA zur Gewinnung von MOG**

DNA	Hersteller
Homo sapiens MOG transcript $\alpha$ 1 cDNA Clone	Sino Biological Inc., Peking, China

### 2.1.13 DNA-Längenstandards

**Tabelle 17: Längenstandards der DNA für Gelelektrophorese**

DNA-Längenstandard	Hersteller
DNA-Hyper-Ladder I (1kb)	Bioline GmbH, Luckenwalde, Deutschland
Gene Ruler 100 bp Ladder	Life Technologies GmbH, Darmstadt

### 2.1.14 Vektoren

**Tabelle 18: DNA-Vektoren für Transformation und Transfektion**

Vektorname	Hersteller
pcDNA™ 6.2/C-EmGFP/GW/CAT-Vektor	Life Technologies GmbH, Darmstadt
pcDNA™ 6.2/C-EmGFP/GW/TOPO-Vektor	Life Technologies GmbH, Darmstadt

### 2.1.15 DNA-Vektor-Konstrukte

**Tabelle 19: Übersicht über die DNA-Vektor-Konstrukte**

DNA-Vektor-Konstrukt	Insertposition
pcDNA-EmGFP-MOG-Vektor	1653
pcDNA-EmGFP-CAT-Vektor	/

### 2.1.16 Softwareprogramme zur Bearbeitung und Auswertung von Daten

**Tabelle 20: Softwareprogramme**

Software name	Hersteller
Adobe Photoshop CS5 V12 WIN	Adobe Systems Inc., San José, Kalifornien
cellSens Dimension 1.7	Olympus Deutschland GmbH, Hamburg
ND-1000 V. 2.3.5	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen

### 2.1.16 Seren der Patient\*innen

Die Serumproben der Patient\*innen sind im Rahmen der Routinediagnostik während der Blutabnahme von den ärztlichen Mitarbeiter\*innen in der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin gewonnen worden. Die Restbestandteile, die nicht zur direkten Diagnostik verwendet worden sind, wurden bei -20°C in einem Gefrierschrank gelagert. In die Studie wurden die Seren von insgesamt 16 Patient\*innen eingeschlossen, die zunächst verblindet

---

untersucht worden sind. Die Seren stammen aus unterschiedlichen Zeitabständen im Krankheitsverlauf der Patient\*innen. Die Nutzung der Patientenserum erfolgte entsprechend der Regularien der Ethikkommission der Universitätsmedizin Göttingen.

## 2.2 Molekular-biochemische Methoden

### 2.2.1 Polymerase-Ketten-Reaktion

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) ist ein Verfahren, bei dem bestimmte DNA-Abschnitte mit Hilfe zweier Primer definiert und amplifiziert werden können. Zu Beginn der PCR wird die doppelsträngige DNA-Helix durch Erhitzen auf 95° C denaturiert. Dies bedeutet, dass sich die Wasserstoffbrücken der einzelnen, komplementären Basenpaare lösen und zwei einzelne DNA-Stränge entstehen. Anschließend können sich die beiden synthetischen DNA-Primer an die komplementären DNA-Sequenzen auf den beiden Einzelsträngen anlagern, was als Primer-Annealing bezeichnet wird. Im dritten Schritt, der Elongation bzw. Amplifikation, wird die Temperatur wieder so erhöht, dass die DNA-Polymerase bei ihrem Temperaturoptimum die Nukleotide in 5'-3'-Richtung miteinander verknüpfen kann (siehe Protokoll in Tabelle 21).

**Tabelle 21: Standard-PCR-Programm der Amplifikation im Gradienten-Verfahren**

Zyklus	Vorgang	Temperatur	Zeit
<b>1. Zyklus</b>	Präinkubation	95° C	2 min.
	Denaturierung	95° C	45 s
	Primer-Annealing	61° C	45 s
	Amplifikation	72° C ± 10° C	45 s
<b>2.-25. Zyklus</b>	Denaturierung	95° C	45 s
	Primer-Annealing	61° C ± 10° C	45 s
	Amplifikation	72° C	45 s
<b>Ende</b>	Amplifikationsverlängerung	72° C	30 min.
	Kühlung und Aufbewahrung	22° C	∞

Dazu wurde die PCR jeweils nach untenstehendem Protokoll (Tabelle 22) in einem Thermocycler (Eppendorf, Hamburg) nach dem Gradienten-Verfahren, welches für die Bestimmung der richtigen Annealing-Temperatur genutzt wird, durchgeführt. Hierbei kann jedes Reaktionsgefäß individuell erhitzt werden und so später durch mehrere verschiedenen Ansätze ermittelt werden, welche Temperatur die am besten geeignete für das jeweilige Primerannealing ist. Als Matrize für die PCR des Gens des Myelin-Oligodendrozyten-

Glykoproteins (MOG) wurde das Homo sapiens MOG transcript  $\alpha 1$  cDNA Clone (Sino Biological Inc., Peking, China) verwendet.

Zudem wurde eine thermostabile DNA-Polymerase aus thermophilen Bakterien (*Thermophilus aquaticus*) verwendet, da diese die hohen Temperaturen unbeschadet übersteht und die 25 PCR-Zyklen hinweg benutzt werden kann. Sie führt eine 3'-Überhang-Postamplifikation durch, die für die spätere Integration des PCR-Produktes in den Vektor benötigt wird.

**Tabelle 22: Protokoll des Reaktionsansatzes für die Polymerase-Ketten-Reaktion**

Chemikalien	Menge in $\mu\text{l}$
dH <sub>2</sub> O	32,5
5x GoTag-Puffer	10
dNTPs (2 mM)	0,5
TOPO-f-Primer	2,5
TOPO-r-Primer	2,5
cDNA-Template	1
GoTag-Polymerase	1
<b>Insgesamt</b>	<b>50</b>

### 2.2.2 Agarose-Gelelektrophorese des PCR-Produktes

Bei der Agarose-Gelelektrophorese wandern DNA-Moleküle aufgrund der negativen Ladung der Phosphatreste im Agarosegel zur Anode. Das Agarosegel ist in einem Puffer eingebettet und mit einem elektrischen Feld verbunden. Die Wanderungsgeschwindigkeit hängt dabei von der Größe der DNA-Moleküle ab, die durch die Poren innerhalb des Agarosegels wandern müssen, was kleineren Molekülen schneller gelingt als größeren Molekülen. Zum Nachweis der DNA-Moleküle wird der Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid (Merck KGaA, Darmstadt) verwendet. Dieser lagert sich zwischen die benachbarten Basenpaare der DNA ein und macht sie unter UV-Licht sichtbar.

Für die Gelelektrophorese wurde ein 2%-iges Agarosegel hergestellt. Dazu wurden zunächst 2 g Starpure Agarose (STARLAB GmbH, Hamburg) in 100 ml 1-fachem TBE-Puffer gelöst und das Gemisch in der Mikrowelle aufgekocht. Anschließend wurden dem

Gel 10  $\mu\text{l}$  Ethidiumbromid in einer Endkonzentration von 0,1  $\mu\text{l}/\text{ml}$  zugefügt. Daraufhin wurden die Lösungen mit den PCR-Produkten in die Geltaschen pipettiert. Dann lief die Elektrophorese für etwa 45 Minuten bei 120 mV. Durch den Abgleich mit einem Längensstandard (100 bp und 1000 bp) konnte die Größe der DNA-Moleküle ermittelt werden.

### 2.2.3 Gelextraktion der DNA aus Agarosegel

Bei der Gelextraktion wurden die PCR-Produkte mit dem QIAquick® Gel Extraction Kit 250 (Qiagen GmbH, Hilden) aus dem Agarosegel zurückgewonnen. Dabei wurde das Gel der ausgeschnittenen Geltaschen zunächst in einer Pufferlösung bei 60° C im Thermomixer (Eppendorf AG, Hamburg) aufgelöst und anschließend in weiteren Schritten mit verschiedenen Puffern gewaschen. Am Ende erhält man das gereinigte PCR-Produkt, indem es aus dem Sammelröhrchen mit Wasser eluiert wird. Die Isolation des gereinigten PCR-Produktes erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers.

### 2.2.4 Ligation der PCR-Produkte in den Vektor

Die PCR-Produkte wurden mit Hilfe des pcDNA™6.2/C-EMGFP-6W/TOPO® Kits (Life Technologies GmbH, Darmstadt) in den TOPO-Vektor ligiert. Die Ligation erfolgt mit Hilfe der am TOPO-Vektor assoziierten Topoisomerasen. Diese integrieren die einzelsträngigen Poly-A-Überhänge der PCR-Produkte, die von der *GoTaq*-Polymerase während der PCR synthetisiert worden sind, hinter den Promotorbereich des Vektors. Für die Ligation wurde das von Life Technologies bereitgestellte Protokoll verwendet und die Chemikalien nach folgendem Schema (Tabelle 23) zusammengegeben:

**Tabelle 23: Protokoll für die Ligation der PCR-Produkte in den Vektor**

Chemikalien	Menge in $\mu\text{l}$
PCR-Produkt	0,5-3
Salt Solution (1,2 M NaCl; 0,06 M MgCl <sub>2</sub> )	1
dH <sub>2</sub> O	1-3,5
Vektor	1
<b>Insgesamt</b>	<b>6</b>



Bei einem Vektor handelt es sich um ein aus Bakterien gewonnenes DNA-Plasmid. Das Plasmid besitzt einen Replikationsursprung für die Replikation des Vektors, einen Promotorbereich für die Initiation der Transkription, einen Insertionsbereich für die Integration der verwendeten Gene sowie Resistenzgene für die beiden Antibiotika Blasticidin und für Ampicillin.

### **2.2.5 Transformation der DNA-Vektor-Konstrukte in *Escherichia coli***

Die Transformation des DNA-Vektor-Konstruktes in die One Shot™ TOP10 *Chemically Competent Escherichia coli* (*E. coli*) (Life Technologies GmbH, Darmstadt) dient seiner Vervielfältigung durch die hohe Zellteilungsrate der Bakterien. Für die Transformation wurden die 50 µl Bakterien-Aliquots zunächst aus dem Gefrierfach (- 80° C) entnommen und im Eisbad aufgetaut. Nach halbstündiger Inkubation mit 2 µl des Konstruktes im Eisbad wurden die Bakterien für 30 Sekunden bei 42° C schockerhitzt und dann direkt wieder auf Eis gegeben. Danach wurden sie zusammen mit 250 µl S.O.C.-Medium (Life Technologies GmbH, Darmstadt) für eine Stunde im Thermomixer bei 300 rpm und 37° C inkubiert.

### **2.2.6 Inkubation von *Escherichia coli* auf Agarplatten und in LB-Medium**

Im Anschluss an die Transformation des DNA-Vektor-Konstruktes in die chemisch kompetenten *E.-coli*-Zellen wurden 5-50 µl der Bakteriensuspension auf einer Agarplatte aus Agarosegel und LB-Medium nach Miller, die 100 ml Ampicillin (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe) enthielten, über Nacht für 24 h bei 37° C im Inkubationsschrank kultiviert. Am folgenden Tag wurden einzelne Bakterienkolonien mitsamt der Pipettenspitze von der LB-Agar-Platte isoliert und mit 3 ml Ampicillin-haltigem LB-Medium in ein Röhrchen gegeben und kultiviert. Dieses wurde dann für weitere 24 h bei 190 rpm und 37° C in den Inkubationsschüttler (C. Gerhardt GmbH & Co. KG, Königswinter) gestellt.

### **2.2.7 Extraktion der Vektor-DNA aus chemisch kompetenten *E. coli***

Nach 24 h wurde die Vektor-DNA dann aus den Bakterien extrahiert, wofür das QIAprep® Spin Miniprep Kit (Qiagen GmbH, Hilden) nach dem Protokoll des Herstellers verwendet wurde. Das QIAprep® Spin Miniprep Kit nutzt das Prinzip der alkalischen Lyse

zur Zerstörung der Bakterienzellen. Nach Durchführung der alkalischen Lyse wurde das Lysat in ein Filtrerröhrchen gegeben und das DNA-Vektor-Konstrukt, welches an die Silikagel-Membran bindet, in mehreren Schritten aufgereinigt. Am Ende wurde das Pellet des DNA-Vektor-Konstruktes mit 30  $\mu$ l bidestilliertem Wasser wieder in Lösung gebracht. Für den Nachweis der korrekten Amplifikation der Zielgene wurden die Lösungen der DNA-Vektor-Konstrukte anschließend zur Sequenzierung an Sequence Laboratories Göttingen GmbH (Göttingen, Niedersachsen) geschickt.

### **2.2.8 DNA-Extraktion mit EndoFree® DNA Maxi Kit**

Mit dem EndoFree® DNA Maxi Kit (Qiagen GmbH, Hilden) wurden größere Mengen an DNA-Vektor-Konstrukt gewonnen. Dafür wurde 1 ml der zuvor verwendeten Bakterien-suspension zusammen mit 250 ml LB-Medium in einen 500 ml Erlenmeyerkolben gegeben und für 24 h im Inkubationsschüttler bei 190 rpm und 37° C inkubiert. Am darauffolgen- den Tag konnte dann die Extraktion der Vektor-DNA mit dem Kit erfolgen, für deren Anwendung das Protokoll von Qiagen verwendet wurde. Im Anschluss wurde die DNA-Konzentration mit Hilfe des Spektralphotometers (siehe 2.2.9) gemessen.

### **2.2.9 Konzentrationsmessung des DNA-Gehaltes im Spektrometer**

Mit Hilfe des Nano-Drop® Spektralphotometer ND-1000 (PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen) konnte der DNA-Gehalt des extrahierten DNA-Vektor-Konstruktes gemessen werden. Vor der Messung wurde das Gerät mit 1  $\mu$ l bidestilliertem Wasser gerei- nigt und dann mit 1  $\mu$ l bidestilliertem Wasser auf den Nullwert kalibriert. Für die Konzentrationsmessung wurde 1  $\mu$ l der DNA-Vektor-Konstrukt-Lösung auf den Applikationsort aufgetragen. Die Konzentrationsmessung erfolgte bei 230 nm nach dem Lambert-Beerschen-Gesetz ( $E = \epsilon \cdot c \cdot d$ ), laut dem die Konzentration eines Moleküls direkt propor- tional mit dessen Extinktion korreliert.

### 2.2.10 Handhabung eukaryontischer Zellen in der Zellkultur

Die Arbeit mit den Zellen in der Zellkultur fand immer unter einer Sterilwerkbank (Hera-Safe von Heraeus Holding GmbH, Hanau) sowie unter sterilen Bedingungen statt. Für die Experimente wurden menschliche embryonale Nierenzellen „HEK-293A“ („*Human Embryonic Kidney*“-Zellen, QBI-HEK-293A Microbix Inc., Toronto, Canada) verwendet. Diese wurden nach dem Auftauen aus dem ARPEGE 170 Stickstofftank (Air Liquide Medical GmbH, Düsseldorf) mit 10 ml des Nährmediums in Zellkulturflaschen (Greiner Bio One GmbH, Frickenhausen) mit Belüftungskappen und einem Fassungsvermögen von 250 ml bei 37° C im Brutschrank (Nunc InterMed GmbH, Wiesbaden) kultiviert. Am folgenden Tag wurde das Nährmedium gewechselt.

Das Nährmedium wurde aus 500 ml *Dubecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) (Life Technologies GmbH, Darmstadt), 50 ml FCS (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) sowie 5 ml Penicillin /Streptomycin (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) angesetzt und über einen Filter in eine Glasflasche steril filtriert. Es wurde bei 8° C im Kühlschrank gelagert und vor jeder Anwendung im Wasserbad auf 37° C erwärmt.

Je nach Zellmenge in den Zellkulturflaschen mussten die Zellen alle zwei bis sieben Tage geteilt werden. Vor jeder Teilung wurden die Zellen mit 10 ml PBS gewaschen und mit 2 ml 0,05%-iger Trypsin-EDTA-Lösung (Life Technologies GmbH, Darmstadt) für 2 Minuten inkubiert, die beide zuvor auf 37° C erwärmt wurden. Anschließend wurden 9 ml Medium zum Trypsin-EDTA zugegeben, die losgelösten Zellen vom Boden der Zellkulturflaschen abgespült und in ein 15 ml Falcon gegeben. Danach wurden die 11 ml Zellsuspension in einer Zentrifuge (Eppendorf AG, Hamburg) bei 20° C und 900 rpm für 7 Minuten zentrifugiert, damit sich die Zellen am Boden des Falcons absetzen konnten. Die verwendete Geschwindigkeit hat den Vorteil, dass sich die abgestorbenen Zellen nicht im Pellet absetzen, sondern verworfen werden können. Dann wurde der Überstand mit einer Vakuumpumpe (Integra Biosciences GmbH, Konstanz) abgesaugt und das Zellpellet in 10 ml neuem Medium resuspendiert. Zuletzt wurden dann 1-5 ml der Zellsuspension zusammen mit 5-9 ml Medium in eine neue Zellkulturflasche gegeben, so dass insgesamt 10 ml Volumen in der Zellkulturflasche vorhanden waren. Nach Durchschwenken wurden die Zellkulturflaschen dann wieder bei 37° C im Brutschrank kultiviert.

### 2.2.11 Linearisierung der DNA-Vektor-Konstrukte durch Restriktionsenzyme

Für die stabile Transfektion wurden die DNA-Vektor-Konstrukte mit Hilfe von für jeden Vektor spezifischen Restriktionsenzymen behandelt (Tabelle 24), die dafür sorgen, dass das Konstrukt nur an einer bestimmten Stelle geschnitten wird, ohne dabei das für das Fusionsprotein kodierende Areal zu zerstören.

**Tabelle 24: Restriktionsenzyme zur Linearisierung der DNA-Vektor-Konstrukte**

Vektor	Verwendete Restriktionsenzyme
pcDNA-EmGFP-MOG-Vektor	<i>MhoI</i>
pcDNA-EmGFP-CAT-Vektor	<i>MhoI</i>

Für den Verdau wurde folgender Ansatz (Tabelle 25) verwendet, der eine Stunde im Wasserbad bei 37 C inkubiert wurde:

**Tabelle 25: Ansatz für den Verdau mit Restriktionsenzymen**

Komponenten	Menge in $\mu\text{l}$
Restriktionsenzym	2
DNA-Vektor-Konstrukt	1000 ng
NEB-Puffer	10
Destilliertes Wasser	auf 50
<b>Insgesamt</b>	<b>50</b>

Danach wurden die Ansätze zusätzlich mit 5-fach Volumen PE-Puffer und 750  $\mu\text{l}$  PB-Puffer aus dem QIAprep® Spin Miniprep Kit (Qiagen GmbH, Hilden) für jeweils 1 Minute in der Zentrifuge gewaschen. Dann wurde der restliche Puffer durch eine weitere Minute Zentrifugieren entfernt und die DNA-Vektor-Konstrukte mit 100 ml bidestilliertem Wasser in ein Eppendorfgefäß eluiert.

### 2.2.12 Transfektion des Vektors in eukaryontische Zellen

Die Transfektion des DNA-Vektor-Konstruktes in die eukaryontischen HEK-293A-Zellen erfolgte nach dem Prinzip der Lipofektion. Die Lipofektion ist eine Methode der Transfektion, bei der die DNA-Vektor-Moleküle mit Lipiden einen Komplex bilden (= Lipoplex), der von den Zielzellen per Endozytose aufgenommen wird. Im Anschluss daran wird das Lipoplex in ein Endosom aufgenommen und das DNA-Vektor-Konstrukt in das Zytosol der Zelle entlassen. Für die Transfektion wurde das Lipofectamine® 3000 Transfection Kit (Life Technologies GmbH, Darmstadt) benutzt, wobei zwei unterschiedliche Volumina des Lipofectamins verwendet wurden. Nach Zugabe des Lipofectamin-Ansatzes wurden die Zellen für 48 h im Brutschrank kultiviert und bei der stabilen Transfektion danach in einem Selektionsmedium in den 6-Well-Zellkulturplatten weiter kultiviert, welches 3,3 µg/ml Blastocidin (Life Technologies GmbH, Darmstadt) enthielt.

#### 2.2.12.1 Transiente Transfektion

Bei der transienten Transfektion wurden die Zellen in eine 24-Well-Zellkulturplatte gegeben, und zwar 0,5 ml Zellsuspension pro Well in einer 10-fachen Verdünnung. Einen Tag später wurde dann nach 10-15 Minuten Inkubationszeit der Transfektionsansatz mit dem DNA-Vektor-Konstrukt nach dem Protokoll des Lipofectamine® 3000 Transfection Kits zu den Zellen hinzugegeben (Tabelle 26).

**Tabelle 26: Ansatz für die transiente Transfektion mit Lipofektamin**

Ablauf		Komponenten	Menge
1. Schritt	Vermischen von Lipofectamine™ 3000 Reagent mit Opti-MEM™ Medium	Lipofectamine™ 3000 Reagent	0,75 µl
		Opti-MEM™ Medium	25 µl
2. Schritt	Herstellen des DNA-Master-Mix	Opti-MEM™ Medium	25 µl
		DNA (0,5-5 µg/µl)	1 µg
		P3000™ Reagent (2 µg/µl)	2 µl
3. Schritt	Zugabe des DNA-Master-Mix zur Lipofectamin-Lösung	Gelöste DNA mit P3000™ Reagent	25 µl
		Gelöstes Lipofectamine™ 3000 Reagent	25 µl

Da die DNA-Vektor-Produkte nicht linearisiert waren, wurden sie nicht in das Genom der Zellen integriert, sondern verbleiben im Zytoplasma. Nach weiteren 48 h wurden die Zellen mit 1 ml Paraformaldehyd (Merck Millipore, Merck KGaA, Darmstadt) fixiert und für 1 Stunde mit Diamidin-2-phenylindol (DAPI) (Dako Denmark A/S, Glostrup, Dänemark) in einer Verdünnung von 1:10.000 angefärbt. Sowohl vor als auch nach dem Färben wurden die Paraformaldehyd-fixierten Zellen jeweils 3-mal in PBS gewaschen.

### 2.2.12.2 Stabile Transfektion

Bei der stabilen Transfektion wird das linearisierte DNA-Vektor-Konstrukt in die Zellen gebracht. Dieses wird dann in den Zellkern transportiert und in das Genom der Zielzelle integriert. Die Ansätze für die stabile Transfektion wurden in einem anderen Mengenverhältnis als bei der transienten Transfektion zusammengesetzt, da die Zellen nun in einer 6-Well-Zellkulturplatte ohne Deckplättchen kultiviert worden sind (Tabelle 27). Ebenso wie bei der transienten Transfektion wurden auch bei der stabilen Transfektion die HEK-293A-Zellen am Vortag bei 10-facher Verdünnung auf die 6-Well-Zellkulturplatte aufgetragen, um Haftung am Boden zu finden und um sich teilen zu können.

**Tabelle 27: Ansatz für die stabile Transfektion mit Lipofektamin**

Ablauf		Komponenten	Menge
1. Schritt	Vermischen von Lipofectamine™ 3000 Reagent mit Opti-MEM™ Medium	Lipofectamine™ 3000 Reagent	3,75 µl
		Opti-MEM™ Medium	125 µl
2. Schritt	Herstellen des DNA-Master-Mix	Opti-MEM™ Medium	125 µl
		DNA (0,5-5 µg/µl)	5 µg
		P3000™ Reagent (2 µg/µl)	10 µl
3. Schritt	Zugabe des DNA-Master-Mix zur Lipofectamin-Lösung	Gelöste DNA mit P3000™ Reagent	125 µl
		Gelöstes Lipofectamine™ 3000 Reagent	125 µl

### 2.2.13 Färbung von Zellen und Untersuchung am Konfokalmikroskop

Zur Untersuchung der transfizierten HEK-293A-Zellen unter dem Fluoreszenz-Mikroskop IX51 (Olympus Deutschland GmbH, Hamburg) wurden die Kerne dieser Zellen mit Hilfe von DAPI (Dako Denmark A/S, Glostrup, Dänemark) gefärbt. Dazu wurde 1 µl DAPI in bereits vorliegender Verdünnung von 1:10 in 1 ml PBS gegeben und das Gefäß abgedunkelt. Dann wurden die Deckgläser in den 24-Well-Zellkulturplatten dreimal mit PBS gewaschen und mit 30 µl DAPI mit einer Verdünnung von 1:10.000 für 15 Minuten unter Lichtausschluss inkubiert. Im Anschluss daran wurden die Deckgläser wiederum dreimal mit PBS sowie einmal mit destilliertem Wasser gewaschen. Zuletzt wurde 1 Tropfen Fluorescence Mounting Medium (DAKO Denmark A/S, Glostrup, Dänemark) hinzugegeben. Nun konnten die Deckgläser in den 24-Well-Zellkulturplatten unter dem Fluoreszenz-Mikroskop IX51 untersucht werden. Um zu überprüfen, ob die transfizierten Zellen auch wirklich MOG an der Membranoberfläche exprimiert haben, wurden der humanisierte IgG1-anti-MOG-Antikörper (8-18 C5) als Primär-Antikörper (Linnington et al. 1984), freundlicherweise bereitgestellt von Norbert Goebels aus Düsseldorf, und der Alexa Fluor® 647-conjugated AffiniPure F(ab')<sub>2</sub> Fragment Goat Anti Human (Jackson Immuno-Research, Europe Ltd., Suffolk, UK) als Sekundäntikörper zugesetzt (Verhältnis siehe 2.1.15).

### 2.2.14 Zell-Sortierung mit Hilfe der Durchflusszytometrie

Mit Hilfe des BD FACS ARIA™ II SORP Flow Cytometer Cell Sorter von BD™ Biosciences (Kalifornien, USA) wurden GFP-positive Zellen (MOG-Transfektanten) selektiert und anschließend weiterkultiviert. Dazu wurde zunächst das alte Nährmedium aus den Zellkulturflaschen durch Pipettieren entfernt. Die Zellen wurden dann mit 10 ml PBS gewaschen und mit 2 ml 0,05%-iger Trypsin-EDTA-Lösung (Life Technologies GmbH, Darmstadt) für 2 Minuten inkubiert. Dann wurden die Zellen mit 10 ml neuem Nährmedium vom Boden der Zellkulturflasche abgelöst (siehe 2.2.10) und die Lösung in einem Falcon bei 1200 rpm für 5 min. zentrifugiert. Nach dem Zentrifugieren wurde das Pellet in 10 ml PBS gelöst und durch ein steriles 40 µm FALCON™ Zellsieb (Life Technologies GmbH, Darmstadt) gegeben. Danach wurde die Zellsuspension erneut zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde dann in einem Volumen von 500 µl PBS in ein steriles 5 ml Falcon® (BD Biosciences, San Jose, Kalifornien, USA) überführt. Die GFP-positiven HEK-293-Zellen wurden im Cell Sorter separiert und in einem 5 ml Falcon

Röhrchen mit 1 ml Nährmedium aufgefangen. Dabei wurde einerseits geschaut, welche Zellen eine hohe Fluoreszenzintensität durch die Fluoreszenzfähigkeit von GFP hatten. Des Weiteren wurde in der FACS-Analyse die Bindekapazität der MOG-transfizierten Zellen überprüft. Hierzu wurde der humanisierte IgG1 anti-MOG-Antikörper (8-18 C5) in einer Verdünnung von 1:80 als Primärantikörper und der Allophycocyanin (APC) AffiniPure F(ab)<sup>2</sup> Fragment Goat anti-Human IgG (H+L) von Jackson ImmunoResearch (Europe Ltd., Suffolk, UK) in einer Verdünnung von 1:100 als Sekundärantikörper verwendet.

Nach dem Sortieren der Zellen wurde die Zellsuspension wieder zentrifugiert und zweimal gewaschen, indem das Pellet mit 10 ml PBS resuspendiert und erneut zentrifugiert worden ist. Am Ende wurde die Zellsuspension zusammen mit dem Nährmedium, welches einen entsprechenden Selektionsfaktor besaß, in eine Zellkulturflasche gegeben und weiter gezüchtet.

### **2.2.15 Inkubation der transfizierten Zellen mit Serum und durchflusszytometrische Analyse**

Für die Inkubation der transfizierten Zellen wurden Serumproben von insgesamt 16 Patient\*innen randomisiert analysiert. Diese wurden zwischen 2015 und 2019 im Rahmen von Routineblutabnahmen gesammelt und bei -20°C aufbewahrt. Die Informationen zu den Patient\*innen lagen bei Testung nicht vor. Sie waren zuvor durch Nummerierung verschlüsselt worden. Die klinischen, laborchemischen und radiologischen Daten dieser Patienten wurden retrospektiv betrachtet und ausgewertet. Die klinischen Daten sind im Ergebnisteil in der Tabelle 30 zusammengefasst. Diese Untersuchungen sind von der Ethikkommission unter der Antragsnummer (3/9/17) genehmigt worden und die Zustimmungen der Proband\*innen lagen vor. Proben wurden als positiv gewertet, wenn sie über dem Mittelwert plus drei Standardabweichungen von den Kontrollen (Wert: 1,3 + 1,2) lagen.

Mit Hilfe der fluoreszenzbasierten Durchflusszytometrie sollte nachgewiesen werden, ob die MOG-transfizierten Zellen im Serum vorkommende Antikörper gebunden haben. Dazu wurden die MOG-transfizierten Zellen einerseits und die Empty-Vektor-transfizierten Zellen als Kontrolle andererseits aus den Zellkulturflaschen aufgearbeitet, mit Patient\*innenseren inkubiert und nach Zugabe eines sekundären Fluoreszenz-markierten anti-human Immunglobulin-Antikörpers im Durchflusszytometer analysiert.

Dafür mussten die Zellen zunächst von den Böden der Zellkulturflaschen gelöst werden. Dazu wurde als Erstes das alte Nährmedium aus den Zellkulturflaschen abgesaugt. Die



Zellen wurden dann mit 10 ml PBS gewaschen und mit 2 ml 0,05%-iger Trypsin-EDTA-Lösung (Life Technologies GmbH, Darmstadt) für 2 Minuten inkubiert. Dann wurden die Zellen vom Boden der Zellkulturflasche mit 10 ml neuem Nährmedium abgelöst und die Lösung in einem Falcon zentrifugiert. Nach dem Zentrifugieren wurde das Zellpellet in 10 ml neuem Nährmedium gelöst und erneut zentrifugiert. Für eine konzentrierte Zellsuspension wurde das Zellpellet dann in 500-1500 µl Nährmedium gelöst und im Falcon in einer bedeckten Styroporbox auf Eis gelagert.

Im nächsten Schritt wurde das Serum 1:10 vorverdünnt, indem 2,5 µl Serum zu 22,5 µl Nährmedium gegeben wurde. Davon wurden dann 10 µl zusammen mit 40 µl der auf Eis gelagerten Zellsuspension in ein Well einer Nunc™ 96-Well Mikrotiterplatte (Life Technologies, Darmstadt) gegeben, so dass das Patient\*innen-Serum insgesamt in einer Verdünnung von 1:50 vorlag. Das Serum einer/s Patient\*in wurde jeweils separat mit der Zellsuspension der MOG-transfizierten Zellen und mit der Zellsuspension der Empty-Vektor-Zellen in einem Well inkubiert. Zudem gab es einen Kontrollansatz mit 0,5 µl des humanisierten IgG1 anti-MOG-Antikörpers (8-18 C5) als Primär-Antikörper (Linington et al. 1984) auf 40 µl Zellsuspension in einer Verdünnung von 1:80, der ebenfalls zu beiden Zellsuspensionen hinzugefügt wurde.

**Tabelle 28: Verdünnungen der Sekundärantikörper zur Durchflusszytometrie**

Sekundärantikörper	Verdünnung
Allophycocyanin (APC) AffiniPure F(ab') <sub>2</sub> Fragment Goat Anti-Human IgG (H+L)	1:50
Mouse Anti-Human IgG1 Fc-PE (HP6001)	1:50
IgG1 Antibody Mouse Anti-Human (IS11-12E4.23.20)	1:200
Alexa Fluor® 647 AffiniPure F(ab') <sub>2</sub> Fragment Goat Anti-Human IgM, Fc5µ fragment specific	1:25
IgA Antibody Mouse Anti-Human (IS11-8E10)	1:25

Die 96 Well Polystyrol Microplatte wurde nun im zugedeckten Eisbehälter für 15 Minuten auf den IKA® Schüttler 260 KS control (IKA®-Werke GmbH & CO. KG, Staufen) gestellt. Danach wurden die Kammern mit 100 µl FACS-Puffer aus PBS und 2%iger FCS-Lösung aufgefüllt und die Zellsuspensionen in der 96 Well Polystyrol Microplatte für 5 Minuten bei 1200 rpm zentrifugiert. Der Überstand der Lösung wurde verworfen, die Zell-

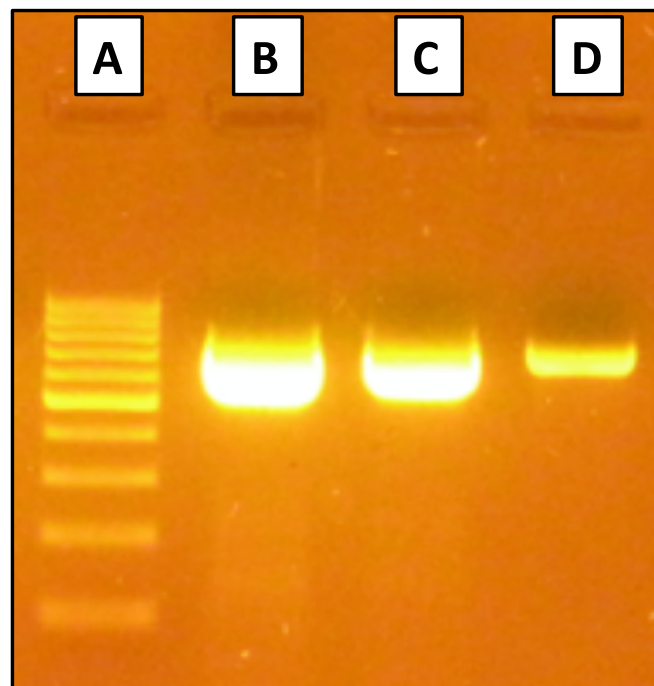
pellets in den Kammern wurden in 150  $\mu$ l Puffer gelöst und erneut zentrifugiert. Dieses Procedere wurde dann noch einmal wiederholt.

Als Nächstes wurden die Pellets in 50  $\mu$ l einer Lösung resuspendiert, die den Sekundär-Antikörper (Tabelle 28) enthielt und für weitere 15 min. im zugedeckten Eisbehälter auf dem Schüttler inkubiert. Dann wurde die 96-Well Mikrotiterplatte zweimal mit jeweils 150  $\mu$ l FACS-Puffer gewaschen. Das Pellet wurde schließlich in 100  $\mu$ l FACS-Pufferlösung gelöst und die Fluoreszenzintensität des sekundären Antikörpers in einem BD FACSCanto™ II von BD™ Biosciences (Kalifornien, USA) quantifiziert.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Amplifikation des Myelin-Oligodendrozyten-Glykoproteins-Gens zur Herstellung eines fluoreszenzgekoppelten Fusionsproteins

Das *MOG*-Gen wurde mittels PCR aus dem Homo sapiens *MOG* transcript  $\alpha 1$  cDNA Clone (Sino Biological Inc.) amplifiziert, damit es in ausreichenden Mengen für die spätere Ligation in den TOPO-Vektor vorlag. Eine erfolgreiche Genamplifikation und Herstellung des PCR-Produktes von *MOG* haben wir mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese ermittelt. Ein positives Ergebnis lag vor, wenn die Banden der PCR-Produkte mit den entsprechenden Vergleichsbasenpaaren unter UV-Licht verglichen wurden (Abbildung 1). So konnte außerdem ausgeschlossen werden, dass neben den gewünschten PCR-Produkten unerwünschte Nebenprodukte entstanden sind.



**Abbildung 1: Agarose-Gelelektrophorese der PCR-Produkte von *MOG* und Vergleichsbasenpaaren.** In der ersten Kammer (A) befinden sich die Vergleichsbasenpaare mit einem Längenstandard von 100 bp. In den anderen drei Kammern befinden sich die verschiedenen Ansätze der *MOG*-PCR, deren Annealing in verschiedenen Kammern mit jeweils unterschiedlichen Annealing-Temperaturen durchgeführt worden sind (B = 56,5°C; C = 61,8°C; D = 67°C).

Mit den Ergebnissen der Gelelektrophorese konnten wir auch darauf zurückschließen, welche Annealing-Temperatur beim Gradientenverfahren der PCR am besten geeignet war, da wir hier mehrere Temperaturen miteinander verglichen haben. Es zeigte sich kein großer Unterschied zwischen den drei getesteten Temperaturen, dennoch haben wir aufgrund des Ergebnisses der Gelelektrophorese 56,5°C als Annealing-Temperatur weiterverwendet. Dann haben wir die gesamte Lösung des PCR-Ansatzes mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und das PCR-Produkt durch die Gelextraktion gewonnen.

### 3.2 Effizienz der Transformation des DNA-Vektor-Konstruktes in chemisch kompetente *E.-coli*-Zellen in Abhängigkeit von der Lösungsmenge

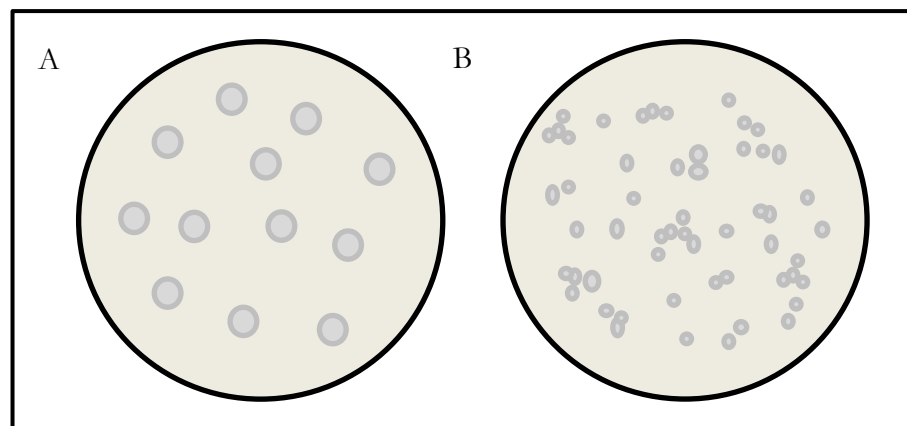
Da für die Transformation der DNA-Vektor-Konstrukte in die chemisch kompetenten *E.-coli*-Zellen immer die gleiche Menge der Lösung des DNA-Vektor-Konstruktes, nämlich 2 µl, verwendet worden ist, ist die Effizienz der späteren Kultivierung der transformierten Bakterien von der vorherigen Ligation des PCR-Produktes in den TOPO-Vektor abhängig gewesen (Abbildung 2). Diese erfolgte durch die an dem Vektor befindlichen Topoisomerasen nach räumlicher Annäherung des PCR-Produktes und des Vektors in der Reaktionslösung. Dabei war die Wahl auf den TOPO-Vektor gefallen, da dieser das PCR-Produkt von MOG in direkte Nähe zum Genlocus des *EmGFP*-Gens ligiert.



**Abbildung 2: Insertion des MOG-Gens in den pcDNA<sup>TM</sup>6.2/C-EmGFP-6W/TOPO®-Vektor.** Die Insertionsstelle für MOG befindet sich in einem Bereich hinter dem CMV-Promotor ( $P_{CMV}$ ) und dem Herpes-Simplex-Virus-Thymidinkinase-(TK)-Polyadenylierungssignal (TK pA). Die Insertion von MOG zwischen die Bindungsstellen *attB1* und *attB2* erfolgte mittels assoziierter Topoisomerasen (TOPO). Dem MOG-Gen ist das *EmGFP*-Gen vorgeschaltet, nachfolgend findet man das V5 Epitop (modifiziert nach Life Technologies GmbH, Darmstadt).

Für die Ligation in den Vektor wurden unter Anwendung des Herstellerprotokolls (siehe 2.2.4) verschiedene Mengen an PCR-Produkt-Lösung (0,5/1/2 µl) verwendet. Es zeigte

sich, dass entweder viele kleine, sich überwachsende oder einzelne, große Bakterienkolonien auf den Ampicillin-geimpften LB-Agar-Platten gewachsen sind (Abbildung 3). Insbesondere wenn die PCR-Produkt-Lösung geringer war, nämlich 0,5-1  $\mu\text{l}$ , bildeten sich die großen, einzeln wachsenden Bakterienkolonien aus. Für die weiteren Versuche kamen nur diese großen, einzeln wachsenden Bakterienkolonien in Frage, da man nur bei ihnen davon ausgehen konnte, dass alle Bakterien der Kolonie aus einem einzelnen Bakterienklon entstanden sind. Eine hohe Effizienz von Ligation und Transformation wurde dementsprechend an dieser Form der Bakterienkolonien ausgemacht. Die genetische Identität der Bakterien ist für den Erhalt der gleichen genetischen Sequenz des ligierten PCR-Produktes von großer Bedeutung gewesen. Daraufhin wurden mehrere einzelne dieser Kolonien in einem Falcon kultiviert, wobei ein adäquates Bakterienwachstum anhand einer starken Trübung der Bakteriensuspensionen festgemacht worden ist.



**Abbildung 3: Wachstumsmuster der Bakterien-Kolonien auf Agar-Platten.** (A) Vereinzelt große Kolonien sind mit erkennbarem Abstand zueinander gewachsen. (B) Multiple kleine Kolonien sind gewachsen, die sich an vielen Bereich überlappen.

### 3.3 Effizienz der DNA-Extraktion und Gewinnung genügend großer Mengen des DNA-Vektor-Konstruktes aus *Escherichia coli*

Die DNA-Extraktion wurde mit dem QIAprep® Spin Miniprep Kit durchgeführt, um das aufgereinigte DNA-Vektor-Konstrukt aus den transformierten Bakterien zu erhalten. Die Effizienz der somit gewonnenen DNA wurde durch die Messung der Konzentration des DNA-Vektor-Produktes mit Hilfe des Nano-Drop® Spektrometers ND-1000 ermittelt. Im Anschluss daran wurden dann nur diejenigen Extraktionslösungen an Sequence Laboratories Göttingen GmbH (Göttingen, Niedersachsen) gesendet, welche einen verhältnismäßig hohen DNA-Gehalt von  $\geq 100$  ng/ $\mu$ l aufgewiesen haben. Bei Sequence Laboratories wurde die DNA-Sequenz der DNA-Vektor-Konstrukte dann auf ihre Korrektheit hin überprüft.

Wenn die von Sequence Laboratories bestimmte Basenabfolge mit der korrekten Basenabfolge des PCR-Produkts von MOG übereingestimmt hatte, konnte das DNA-Vektor-Konstrukt nun in größeren Mengen mit Hilfe des EndoFree® DNA Maxi Kit (Qiagen GmbH, Hilden) gewonnen werden. Dafür wurden dann diejenigen Bakterienstämme in größeren Mengen kultiviert, von deren DNA-Vektor-Konstrukt die korrekte Basensequenz zuvor nachgewiesen worden war. Die hohen DNA-Mengen waren für die nachfolgend angestrebte Transfektion des DNA-Vektor-Konstruktes in die eukaryonten HEK-293A-Zellen von Bedeutung und wurden vor Anwendung ebenfalls mit Hilfe des Nano-Drop® Spektrometers ND-1000 ermittelt. Bei genügend hohem DNA-Gehalt ( $> 100$  ng/ $\mu$ l) wurde die DNA ebenfalls noch einmal an Sequence Laboratories (Göttingen, Niedersachsen) und nach Mitteilung der Korrektheit der Basenabfolge für die weiteren Versuche verwendet. So konnte sichergestellt werden, dass eine korrekte DNA-Vorlage für das MOG-Protein in die eukaryonten Zellen eingebracht werden konnte, wodurch die Konformation von MOG nicht gestört sein sollte.

### 3.4 Effizienz der Transfektion der DNA-Vektor-Konstrukte

Die Transfektion der DNA-Vektor-Konstrukte mit Hilfe des Lipofectamine® 3000 Transfection Kit (Life Technologies GmbH, Darmstadt) in eukaryonte Zellen wurde zunächst transient durchgeführt, um die Effizienz der Transfektion beurteilen zu können. Dafür wurden zwei unterschiedliche Ansätze verwendet. Bei der transienten Transfektion wurde das zirkuläre DNA-Vektor-Konstrukt in die eukaryonten Zellen transfiziert. Dass die transiente Transfektion erfolgreich war, konnten wir nach Fixierung und Anfärbung der Zellen mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops (Olympus Deutschland GmbH, Hamburg) nachweisen. Diejenigen Zellen, die das DNA-Vektor-Konstrukt aufgenommen hatten, konnten daran erkannt werden, dass sie das Fusionsprotein aus dem zu untersuchenden MOG-Protein und dem fluoreszierenden GFP membranständig exprimiert haben. Unter dem Fluoreszenzmikroskop konnte nachgewiesen werden, dass ein Großteil der mit DAPI angefärbten Zellen ebenfalls das GFP-Molekül, welches mit dem MOG-Protein gekoppelt war, exprimiert hatten.

### 3.5 Herstellung von transfizierten eukaryontischen Zellkulturen

Da eukaryonte Zellen, welche die jeweiligen Gene als DNA-Vektor-Konstrukte in ihr Genom inkorporiert haben, gewonnen werden sollten, wurde eine stabile Transfektion mit dem Lipofectamine® 3000 Transfection Kit (Life Technologies GmbH, Darmstadt) durchgeführt. Im Gegensatz zur transienten Transfektion wurden die DNA-Vektor-Konstrukte für die stabile Transfektion mit Hilfe von spezifischen Restriktionsenzymen (siehe 2.2.12.2) an einer Stelle linearisiert, damit die Integration des DNA-Vektor-Konstruktes in das Genom der eukaryonten Zellen erfolgen konnte. Wichtig bei der Auswahl der Restriktionsenzyme war, dass die Schnittstelle außerhalb des kodierenden Bereichs des MOG-GFP-Fusionsgens lag. Dadurch ist es möglich, dass die eukaryonten Zellen das MOG-GFP-Fusionsgen in ihre DNA einbauen, permanent behalten und bei der Zellteilung auf die Tochterzellen verteilen. Außerdem wird das MOG-GFP-Fusionsprotein dann im Rahmen der normalen Proteinbiosynthese exprimiert sowie modifiziert und in die Zellmembranen der entsprechenden Zellen eingebaut.

So konnten über einige Zeit Zellkulturen, in denen die Zellen das jeweilige inkorporierte Gen exprimierten, kultiviert werden. Um eine Kontrolle über die stabile Transfektion zu erhalten, wurden die Zellen unter dem Konfokalmikroskop beobachtet. In den mit MOG-transfizierten Zellen konnte festgestellt werden, dass die Transfektion erfolgreich war, da

eine grüne Fluoreszenz unter dem Konfokalmikroskop nachweisbar war, was zeigte, dass das an MOG gekoppelte GFP exprimiert worden ist.

Zusätzlich wurde eine Transfektion mit dem linearisierten Kontrollvektor pcDNA<sup>TM</sup> 6.2/C-EmGFP/YFP-GW/CAT (Life Technologies GmbH, Darmstadt) durchgeführt (Abbildung 4), der kein integriertes *MOG*-Gen besitzt, sondern bei dem sich das *CAT*-Gen im Insertionsbereich befindet, aber auch das GFP-Gen beinhaltet. Die Zellen mit transfiziertem Kontrollvektor wurden später für die Vergleichsmessung bei der Durchflusszytometrie benötigt, da hier die Differenz der Fluoreszenzintensitäten ermittelt wurden.



**Abbildung 4: Ausschnitt des pcDNA<sup>TM</sup>6.2/C-EmGFP/GW/CAT-Vektors.** Der Kontrollvektor weist im Bereich der Insertionsstelle für *MOG* das *CAT*-Gen auf. P<sub>CMV</sub> = CMV-Promotor (P<sub>CMV</sub>), EmGFP = , attB1/attB2 = attachment sites B1/B2, CAT = Chloramphenicolacetyltransferase, TK pA = Herpes-Simplex-Virus-Thymidinkinase-(TK)-Polyadenylierungssignal, V5 = V5 Epitop (modifiziert nach Life Technologies GmbH, Darmstadt).

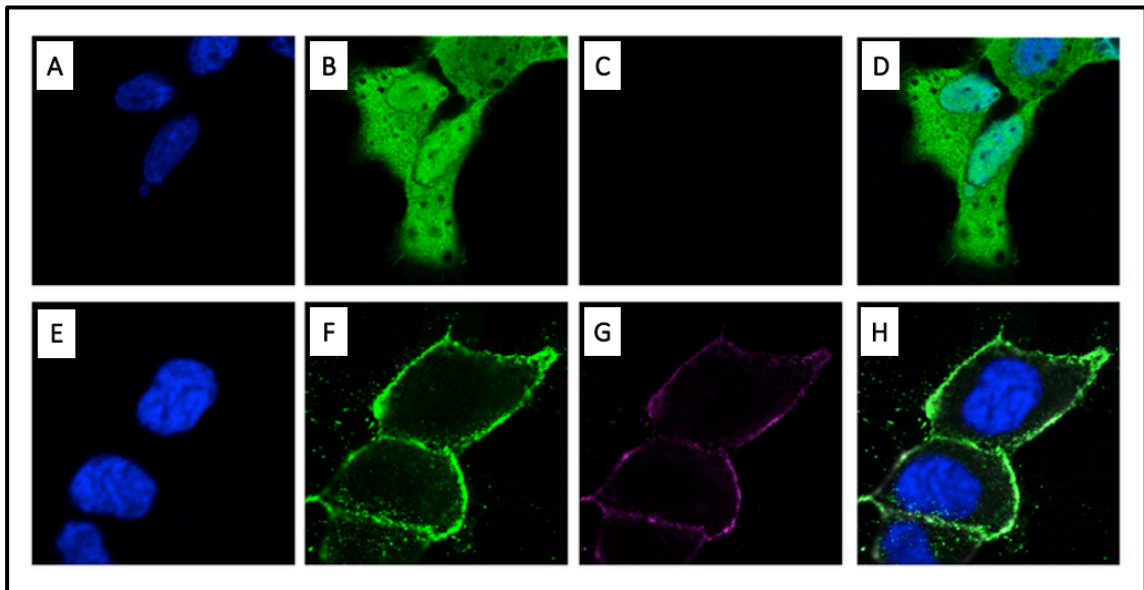


### 3.6 Selektion der MOG-Transfektanten und Nachweis der Lokalisation der Genprodukte nach Expression

Damit in den Zellkulturflaschen nur noch diejenigen Zellen vorhanden waren, welche das transfizierte DNA-Vektor-Produkt besaßen und ins Genom integriert hatten, wurde dem üblichen Nährmedium neben dem Penicillin-/Streptomycin-Gemisch noch ein weiteres Antibiotikum, nämlich Blastocidin, hinzugegeben. Gegen Blastocidin sind nur die transfizierten Zellen resistent, da sich auf dem DNA-Vektor-Konstrukt auch ein Resistenzgen für Blastocidin befindet. Das Resistenzgen wird erst nach der Inkorporation des DNA-Vektor-Konstruktes in das Genom exprimiert. Das Genprodukt des Resistenzgens kann der bakteriostatischen Wirkung von Blastocidin entgegenwirken. Dies gilt für alle Zellen, die mit dem pcDNA-EmGFP-MOG-Vektor und pcDNA-EmGFP-CAT-Vektor transfiziert worden sind. Die Selektion konnte man nach einigen Wochen durch das Vorhandensein von fluoreszierenden Zellhaufen in den Zellkulturflaschen unter dem Konfokalmikroskop nachweisen (Abbildung 5).

Die mit dem pcDNA-EmGFP-CAT-Kontrollvektor transfizierten Zellen zeigten eine grüne Fluoreszenz im Bereich des Zytoplasmas und des Zellkerns (Abbildung 5B+D), jedoch keine spezifische membranständige Fluoreszenz. Das ließ darauf schließen, dass GFP ohne Fusion mit MOG nach der Genexpression v. a. in diesen beiden genannten Zellkompartimenten lokalisiert ist, aber nicht in die Zellmembran eingebaut wird. Zusätzlich wurde bewiesen, dass in den Kontrollvektor-Zellen kein MOG-Protein vorhanden war, da keine Fluoreszenz nachgewiesen worden ist, wenn der anti-MOG-Antikörper und der Fluoreszenz-gekoppelte Sekundärantikörper hinzugegeben worden sind (Abbildung 5C).

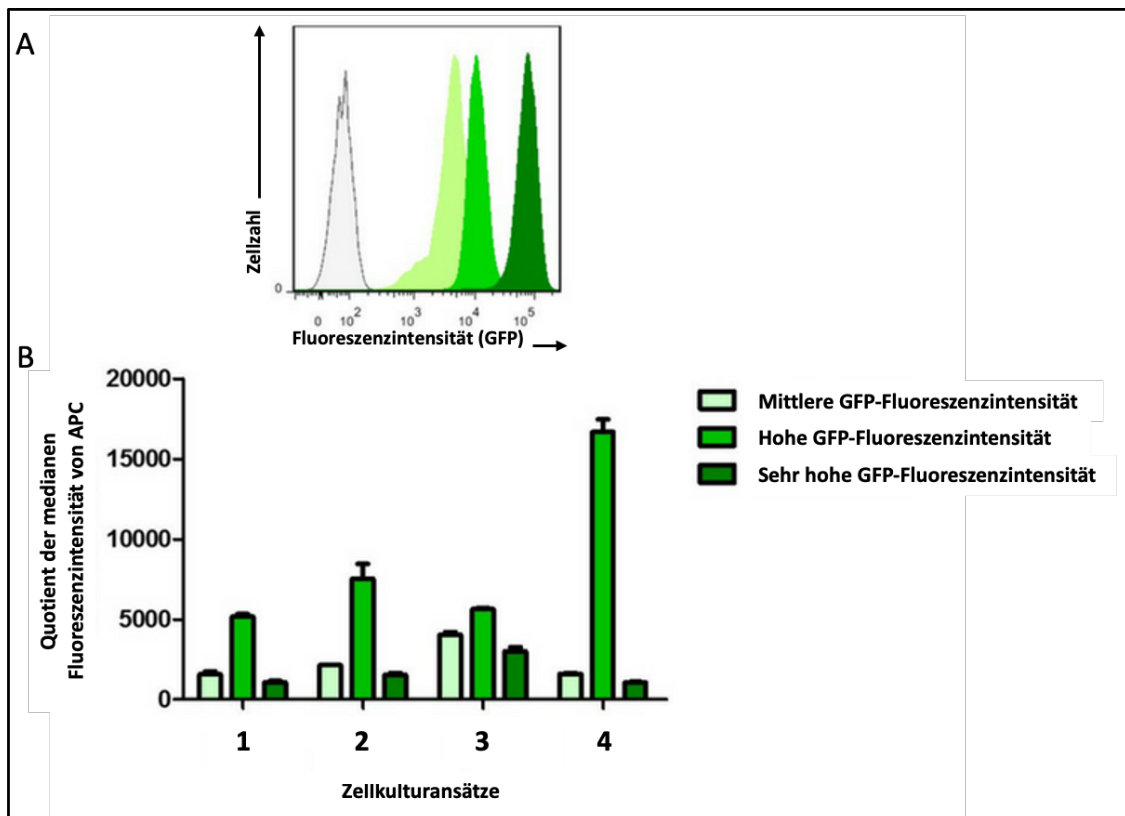
Im Gegensatz dazu zeigten die MOG-transfizierten Zellen eine starke membranständige grüne Fluoreszenz durch Integration von GFP in die Zellmembran (Abbildung 5F) bei fehlendem Nachweis im Zytoplasma oder im Zellkern (Abbildung 5F+H). Zudem konnte in der Reaktion mit dem anti-MOG-Antikörper und dem Fluoreszenz-gekoppelten Sekundärantikörper eine starke pinkfarbene membranständige Fluoreszenz nachgewiesen werden (Abbildung 5C), die durch Bindung des Fluoreszenz-markierten Sekundärantikörpers an den MOG-spezifischen Primärantikörper zustande kam. Diese Befunde waren der Beweis dafür, dass das *MOG*-Gen nach der Transfektion von den HEK-293A-Zellen exprimiert und als MOG-GFP-Fusionsprotein in die Zellmembran integriert worden ist.



**Abbildung 5: Nachweis der Expression von GFP-gekoppeltem MOG in transfizierten Zellen.** Obere Reihe mit Kontrollvektor-Zellen: (A) DAPI-Kernfärbung, (B) Zytoplasmatische Expression von GFP, (C) Fehlende Bindung des Fluoreszenz-gekoppelten Sekundärantikörper an den anti-MOG-Antikörper, (D) Überlagerung von A und B. Untere Reihe mit MOG-transfizierten Zellen: (E) DAPI-Kernfärbung, (F) Membranständige Fluoreszenz von GFP, (G) Nachweis von MOG an der Zellmembran mittels indirekter Immunfluoreszenz durch anti-MOG-Antikörper und Fluoreszenz-gekoppelten Sekundärantikörper (H) Überlagerung von E und F.

### 3.7 Anreicherung von transfizierten Zellen mit hoher Antikörper-Bindekapazität

In der Durchflusszytometrie konnte gezeigt werden, dass es in mehreren verschiedenen Zellkulturansätzen jeweils Zellen gab, die eine unterschiedlich starke grüne Fluoreszenzintensität des GFPs aufwiesen (Abbildung 6A). Daraus wurde geschlussfolgert, dass sie der Ausdruck einer unterschiedlich hohen Expressionsrate des MOG-GFP-Fusionsgens ist. Deshalb wurden diese Zellen anhand ihrer Fluoreszenzintensität für GFP in Zellen mit einer mittleren, einer hohen und einer sehr hohen GFP-Fluoreszenzintensität unterteilt. Anschließend wurde ihre Fähigkeit überprüft, spezifische anti-MOG-Antikörper zu binden.



**Abbildung 6: Bindekapazität von anti-MOG-Antikörpern in Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität von GFP.** (A) Histogramm von MOG-GFP-Transfektanten (grün) mit unterschiedlich starker GFP-Fluoreszenzintensität und nicht-transfizierten HEK-293A-Zellen (grau) als Autofluoreszenzkontrolle. (B) MOG-Antikörper-Bindekapazität der GFP-positiven MOG-Transfektanten aus A. Die in (B) angegebene mediane Fluoreszenzintensität entspricht der Fluoreszenzintensität des sekundären APC-gelabelten anti-IgG Antikörpers, mit dem die Serum MOG-Antikörper detektiert wurden, die spezifisch an die MOG-Transfektante gebunden hatten.

Als indirektes Maß für die Fähigkeit der Zellen, anti-MOG-Antikörper spezifisch zu binden, diente die Bestimmung der medianen Fluoreszenzintensität des APC-gelabelten anti-IgG-Sekundärantikörpers, der die an MOG gebundenen Primärantikörper auf den MOG-transfizierten Zellen detektieren konnte (Abbildung 6B). Die höchste Fluoreszenzaffinität für APC und somit die beste Bindekapazität der anti-MOG-Antikörper zeigten die Zellen mit jeweils hoher GFP-Fluoreszenzintensität, weswegen dies die Zellen waren, die am meisten MOG in ihre Zellmembran integriert hatten. Diese Zellen wurden dann mittels FACS selektiert und weiter auf dem Spezialmedium mit Blasticidin kultiviert (siehe 2.2.12).

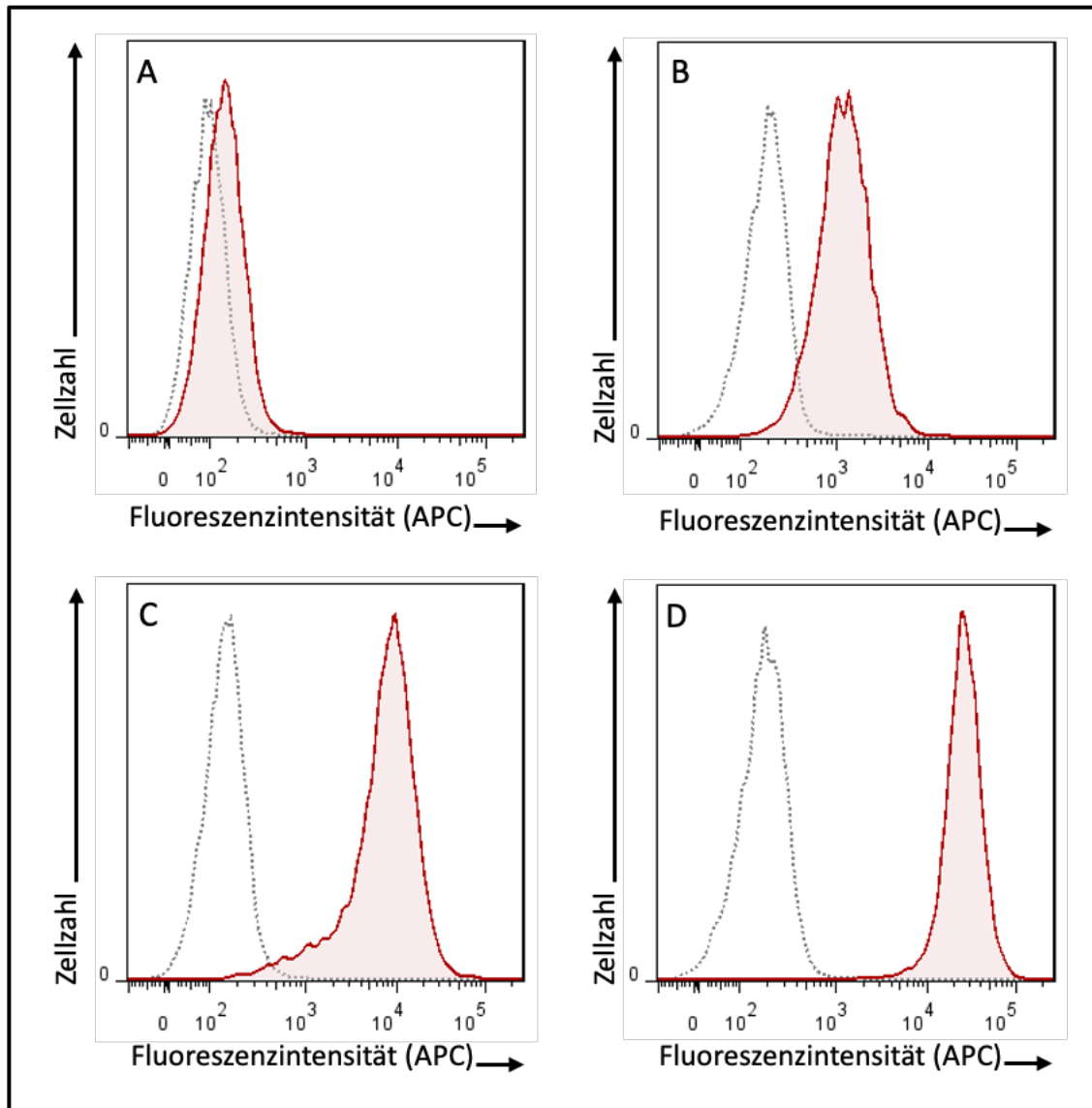
### 3.8 Nachweis von anti-MOG-Antikörpern in Seren der Patient\*innen

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie konnte gezeigt werden, dass körpereigene Autoantikörper gegen MOG in den untersuchten Seren von 6 der insgesamt 16 untersuchten Patient\*innen nachweisbar waren (Tabelle 29). Dabei wurde jedes einzelne Serum jeweils mit MOG-transfizierten Zellen (Abbildung 7, rote Kurve) und Kontroll-Vektor-transfizierten Zellen (Abbildung 7, gestrichelte Kurve) inkubiert, und eine mögliche MOG-spezifische Antikörperbindung mit Hilfe eines APC-markierten Sekundärantikörpers detektiert.

Anschließend wurde der Quotient der medianen Fluoreszenzintensität (MFI) aus der Antikörperbindung der MOG-transfizierten Zellen und der Kontroll-Vektor-transfizierten Zellen gebildet. Der Cut-Off-Wert für einen positiven Nachweis von anti-MOG-Antikörpern im Serum der Patient\*innen wurde von einer vorherigen Messung gesunder Erwachsener (Kontrollgruppe) bestimmt (siehe 2.2.15). Der hierbei bestimmte Mittelwert (+/- 3 Standardabweichungen) wurde dabei als Grenzwert für positive bzw. negative Ergebnisse genommen und betrug 2,5. Bei jeder Messreihe wurde zudem vorab der humanisierte anti-MOG-Antikörper (8-18 C5) als Positivkontrolle mitbestimmt, um die Qualität der MOG-Transfektanten zu beurteilen. Die gemessenen Werte der Quotienten der MFI von MOG-transfizierten und Kontroll-Vektor-transfizierten Zellsuspensionen wurden dann in fünf Gruppen unterteilt. Dabei wurden Messwerte von <2,5 als negativ, von 2,5-10 als niedrig positiv, von 10-50 als mäßig positiv, von 50-100 als hoch positiv und Werte >100 als sehr hoch positiv gewertet.

Die Histogramme der medianen Fluoreszenzintensitäten der Durchflusszytometrie zeigen, dass in Patient\*innen unterschiedlich hohe Konzentrationen an MOG-Antikörpern im Serum nachgewiesen werden können. Somit ist in Abbildung 7A ein Patient\*innen mit negativem Antikörpernachweis dargestellt (Messwert: 1,6). In den Abbildung 7B-D hingegen erkennt man Patient\*innen mit niedrigem Antikörpertiter (Abbildung 7B; Messwert: 6,1), hohem Antikörpertiter (Abbildung 7C; Messwert: 53,7) und sehr hohem Antikörpertiter (Abbildung 7D; Messwert: 135).

Die medianen Fluoreszenzintensitäten der Seren, die mit den Kontrollvektor-Zellen inkubiert worden sind, waren in etwa vergleichbar und Ausdruck einer fehlenden Antikörperbindung an die MOG-negativen Empty-Vektor-Kontrolltransfektanten.



**Abbildung 7: Durchflusszytometrie von MOG-transfizierten Zellen (rot) und Kontroll-Vektor-transfizierten Zellen (grau) nach Inkubation mit unterschiedlichen Patient\*innenserum.** An die Transfektanten gebundene MOG-Antikörper wurden anschließend mit einem sekundären APC-gelabelten anti-humanen IgG-Antikörper detektiert, dessen mediane Fluoreszenzintensität durchflusszytometrisch quantifiziert wurde. **(A)** Keine MOG-Antikörper im Patientenserum vorhanden (MFI-Quotient: 1,6). **(B)** Geringe MOG-Antikörper-Konzentration im Serum (MFI-Quotient: 6,1). **(C)** Patientenserum mit mittlerer MOG-Antikörper-Konzentration (MFI-Quotient: 53,7). **(D)** Patientenserum mit hoher MOG-Antikörper-Konzentration (MFI-Quotient: 135).

### 3.9 Detektion unterschiedlicher Subtypen der anti-MOG-Antikörper im Serum der Patient\*innen

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die Seren der Patient\*innen unterschiedliche MOG-spezifische Antikörper-Isotypen enthielten. Zunächst wurde mit Isotyp-spezifischen Sekundärantikörpern überprüft, ob MOG-IgG-, -IgM- und -IgA-Antikörper im Serum vorhanden waren. Es zeigte sich, dass die meisten im Serum nachgewiesenen anti-MOG-Antikörper vom IgG-Typ waren (Tabelle 29). Dann wurde geschaut, ob unterschiedliche IgG-Subtypen nachweisbar waren. Insgesamt fanden wir heraus, dass beim Großteil der Patient\*innen, bei denen anti-MOG-Antikörper nachgewiesen worden sind, IgG-Antikörper des IgG1-Subtyps im Serum dominierten.

**Tabelle 29: Messwerte der Antikörper-Subtypen**

Pat.-Nr.	MOG-IgG	MOG-IgG1	MOG-IgM	MOG-IgA
1	13,8	1,3	/	/
2	26,4	11,1	0,5	30,1
3	1,8	1,2	1,3	0,9
4	3,5	1,8	0,9	/
5	1,1	/	1,0	1,0
6	0,9	/	/	/
7	2,6	/	1,1	/
8	1,8	/	/	/
9	46,3	36,3	/	/
10	1,0	/	/	/
11	1,0	/	1,0	/
12	1,4	/	0,9	/
13	4,1	1	/	1
14	1,8	/	/	/
15	1,7	1,2	1,1	0,9
16	1,8	/	/	1,0

### 3.10 Auswertung der klinischen Daten der Patient\*innen

Insgesamt wurden nach Etablierung des Assays die Blutseren von 16 Patient\*innen, jeweils acht Patientinnen und acht Patienten, die in der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin der Universitätsmedizin Göttingen behandelt worden sind, verblindet untersucht.

Die Kinder stellten sich entweder mit neurologischen Symptomen einer demyelinisierenden Erkrankung zum Zeitpunkt der initialen Symptomatik bzw. zur Primärdiagnostik oder aufgrund einer Zweitbegutachtung bei extern gestellter primärer (Verdachts-)Diagnose einer entzündlich demyelinisierenden Erkrankung vor. Das Durchschnittsalter bei Symptombeginn betrug 11,75 Jahre bei einer Altersspanne von 5 bis 17 Jahren. Die einzelnen Daten zur Symptomatik, zu Laborbefunden und zu den Befunden der bildgebenden Verfahren wurden retrospektiv erhoben und sind in Tabelle 30 zusammengefasst.

Da ein Teil der Patient\*innen erst zu einer Zweitbegutachtung in der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin vorstellig geworden sind, lagen nicht für alle von ihnen Blutproben vom Zeitpunkt der Erstmanifestation der Symptome vor.

**Tabelle 30: Klinische Daten der 16 untersuchten Patient\*innen**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
<b>Geschlecht</b>	M	M	W	W	W	W	M	W	M	M	M	M	M	W	W	W
<b>Alter bei Erstdiagnose</b>	6	14	8	10	13	15	7	17	15	14	11	16	6	5	15	16
<b>Vorausgehender Infekt</b>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+
<b>Vorausgehende Impfung</b>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
<b>Symptomatik:</b>																
<b>(A) Optikusneuritis</b>	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-
<b>(B) Sensibilitätsstörungen</b>	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+
<b>(C) Motorische Störungen</b>	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+
<b>(D) Sprachstörungen</b>	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-
<b>(E) Enzephalopathie</b>	-	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-
<b>(F) Blasenentleerungsstörungen</b>	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
<b>(G) Mastdarmstörungen</b>	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<b>Liquorbefund:</b>																
<b>(A) Pleozytose</b>	+	+	/	/	/	/	/	/	+	/	+	+	+	+	/	/
<b>- Granulozyten</b>	-	-	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	-	/	/



- Lymphozyten	+	+	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	+	/	/
- Monozyten	+	+	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	-	/	/
<b>(B) Intrathekale Immunglobulinsynthese</b>	-	+	-	-	-	/	/	-	-	+	/	+	+	-	/	-
<b>(C) Oligoklonale Banden</b>	-	-	-	-	+	/	/	-	+	+	+	+	-	-	/	+
<b>MRT-Läsionen:</b>																
<b>(A) Cortikale Läsionen</b>	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-
<b>(B) Marklagerläsionen</b>											+		+	+	+	
- Periventrikulär	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-		+	+	+	+	+
- Balken und Balkenstrahlung	-	-		-	+	+	-	-	+	-		+	+	-	-	-
- Sonstige	-	+		-	+	+	+	-	+	+	+		-	+	+	-
<b>(C) Kleinhirn</b>	-	-		-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-
<b>(D) Hirnstamm</b>	-	+		-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+
<b>(E) Rückenmark</b>										-	+	+		-	-	-
- Kurzstreckig	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-
- Langstreckig	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>(F) Optikusbefall</b>	-		+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-
<b>MOG-Antikörpertiter</b>																
	+	+	++	+	-	-	-	++	+	-	-	-	+	-	+	-
<b>Verlauf</b>																
<b>(A) Singulärer Verlauf</b>	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+
<b>(B) Rezidivierender Verlauf</b>	-	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-
+ = vorhanden; - = nicht vorhanden; *extern mit anderen Assays nachgewiesene positive MOG-Titer																

Von diesen 16 Patient\*innen zeigten acht einen positiven Nachweis von anti-MOG-Antikörpern im Serum, sechs davon in den von uns untersuchten Serumproben (Nr. 1, 3, 4, 9, 13, 15) und zwei Patient\*innen (Nr. 3, 8) bei extern untersuchten Serumproben, da hier keine Serumproben aus der Zeit der Erstmanifestation der Symptome vorlagen. Dabei hatten 3 Patient\*innen eine niedrig positive (Nr. 4, 7, 13) und 3 Patient\*innen eine mäßig positive Antikörperkonzentration (Nr. 1, 2, 9) bei den initialen Messungen.

Bei diesen acht Patient\*innen mit positivem Nachweis von anti-MOG-Antikörpern konnte eine MOG-IgG-assoziierte Erkrankung mit folgenden klinischen Manifestationen diagnostiziert werden (Nr. 1, 2, 3, 4, 8, 9, 13, 15): eine longitudinale extensive transverse Myelitis (LETM), eine akute disseminierte Enzephalomyelitis (ADEM), eine multiphasische ADEM (mADEM), eine monophasische monolaterale Optikusneuritis (ON), eine rezidivierende

bilaterale ON, zwei mADEM mit rezidivierenden Optikusneuritiden (ADEM-ON) und eine nicht näher definierbare entzündlich demyelinisierende Erkrankungen (Tabelle 31).

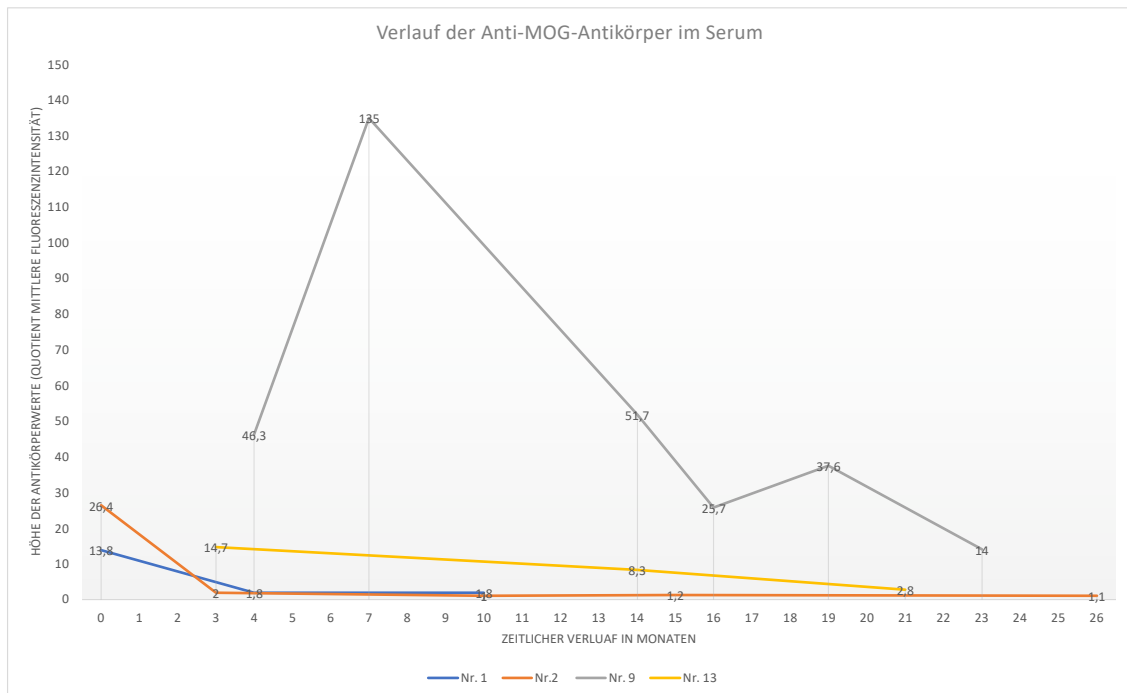
Bei den acht Patient\*innen ohne Nachweis von anti-MOG-Antikörpern wurde in einem Fall die Diagnose einer MOG-negativen mADEM (Nr. 5), in einem Fall die Diagnose einer MOG-negativen ADEM (Nr. 14) mit Nachweis einer zusätzlich vorliegenden metachromatische Leukodystrophie (positiver Nachweis des Enzymdefekts der Arylsulfatase A) und in 6 Fällen die Diagnose einer MS (Nr. 6, 7, 10, 11, 12, 16) gestellt.

**Tabelle 31: Diagnosen der untersuchten Patient\*innen und MOG-Antikörper-Status**

Pat.-Nr.	Diagnose	MOG-Nachweis
1	Longitudinale extensive transverse Myelitis	+
2	Akute disseminierte Enzephalomyelitis	+
3	Multiphasische akute disseminierte Enzephalomyelitis mit rezidivierenden Optikusneuritiden	+
4	Rezidivierende bilaterale Optikusneuritis	+
5	Multiphasische akute disseminierte Enzephalomyelitis	-
6	Multiple Sklerose	-
7	Multiple Sklerose	-
8	Monolaterale Optikusneuritis	+
9	Multiphasische akute disseminierte Enzephalomyelitis mit rezidivierenden Optikusneuritiden	+
10	Multiple Sklerose	-
11	Multiple Sklerose	-
12	Multiple Sklerose	-
13	Multiphasische akute disseminierte Enzephalomyelitis	+
14	Multiphasische akute disseminierte Enzephalomyelitis + metachromatische Leukodystrophie	-
15	MOG-IgG-assoziierte-Erkrankung (nicht weiter spezifiziert)	+
16	Multiple Sklerose	-
+ = Nachweis von anti-MOG-Antikörpern, - = kein Nachweis von anti-MOG-Antikörpern		

### 3.11 Zeitlicher Verlauf des Nachweises von anti-MOG-Antikörpern im Serum ausgewählter Patient\*innen

Nachdem die Messungen der verblindeten Serumproben abgeschlossen waren und die Proben retrospektiv analysiert worden sind, stellte sich heraus, dass von einigen Patient\*innen mehrere Serumproben im Verlauf ihrer Erkrankung untersucht worden waren (Abbildung 8).



**Abbildung 8: Verläufe der MOG-Antikörper im Serum ausgewählter Patient\*innen.** Patient Nr. 1 hat einen mäßig positiven MOG-Antikörper-Wert bei Symptombeginn, der nach wenigen Wochen wieder abfällt. Patient Nr. 2 hat einen ebenfalls mäßig positiven MOG-Antikörper-Wert, der höher als Patient Nr. 1 ist, und ebenfalls über die Zeit abfällt. Patient Nr. 9 hat bei der ersten Messung 4 Monate nach Symptombeginn einen moderat hohen MOG-Antikörper-Wert, der im Verlauf auf einen sehr hohen Wert steigt und dann auch wieder abfällt, jedoch selbst 23 Monate nach Symptombeginn moderat hoch ist. Patient Nr. 13 hat moderat hohe Werte, die erst langsam wieder über Monate abfallen.

Dabei wurde festgestellt, dass die Antikörperwerte bei einigen Patient\*innen, z. B. Nr. 9 und Nr. 13, teilweise über einen längeren Zeitraum erhöht geblieben sind. Patient Nr. 9 hatte zeitweise sogar sehr hohe Antikörperkonzentrationen im Serum. Bei anderen Patient\*innen kam es nach initial erhöhten Werten bei der nachfolgenden Kontrollmessung

zum Abfall der Antikörperkonzentrationen unter die Nachweisgrenze des zellbasierten Antikörpermessverfahrens (z. B. Nr. 1 und Nr. 2). Der Patient Nr. 9 hat eine mADEM mit rezidivierenden Optikusneuritiden. Die erste Serumprobe wurde 4 Monate nach Symptombeginn kurz nach einem erneuten Schub gewonnen. Der sehr hohe Antikörperwert von 135 im 7. Monat nach Symptombeginn korreliert ebenfalls mit einem weiteren klinischen Schub mit enzephalitischen Beschwerden und Optikusneuritis.

## 4 Diskussion

### 4.1 Anti-MOG-Antikörper bei demyelinisierenden Erkrankungen

Das Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein (MOG) ist ein Protein innerhalb der äußersten Schicht der Myelinscheide von Axonen im ZNS. Es macht nur einen kleinen prozentualen Anteil aus und wird ausschließlich im ZNS exprimiert (Brunner et al. 1989). Aufgrund seiner Lokalisation und seiner antigenen Wirkung ist es Ziel körpereigener Autoantikörper (Lebar et al. 1976), die bei der Entstehung verschiedener idiopathischer demyelinisierender Erkrankungen des ZNS von Kindern, Jugendlichen und jungen Erwachsenen eine wichtige Rolle spielen (Rostasy und Reindl 2013; Reindl et al. 2017). Zu diesen sog. MOG-IgG-assoziierten Erkrankungen (MOGAE) zählen u. a. die akute disseminierte Enzephalomyelitis (ADEM) und Varianten der ADEM (z. B. multiphasische ADEM (mADEM)), ADEM gefolgt von einer Optikusneuritis (ADEM-ON)), Aquaporin-4-(AQP4)-seronegative Neuromyelitis-optica-Spektrum-Erkrankungen (NMOSD), monophasische oder rezidivierende isolierte Optikusneuritiden (ON), langstreckige transverse Myelitiden (LETM) und die N-methyl-D-Aspartat-Rezeptor-Enzephalitis mit überlappendem demyelinisierendem Syndrom (Peschl et al. 2017b; Armangue et al. 2020). Bei Kindern lassen sich bereits bei der Erstmanifestation einer erworbenen idiopathischen demyelinisierenden Erkrankung (engl. *acquired demyelinating syndrome*) serologisch in bis zu 40-50% der Fälle anti-MOG-Antikörper nachweisen (Hacohen et al. 2015; Hegen und Reindl 2020).

Entgegen der früheren Vermutung, dass anti-MOG-Antikörper an der Pathogenese der MS beteiligt sind, sind sie nach neueren Erkenntnissen allenfalls in einigen wenigen, atypischen Fällen der MS nachweisbar (Chan et al. 2010; Hacohen et al. 2015; Ketelslegers et al. 2015; Jarius et al. 2018b; Cobo-Calvo et al. 2020). Eine Rolle in der Pathogenese der MS wurde zunächst deswegen vermutet, da anti-MOG-Antikörper direkt innerhalb von MS-Läsionen nachgewiesen wurden (Genain et al. 1999) und da die Injektion des MOG-Proteins bzw. der Peptidfragmente von MOG in verschiedenen Tierarten zur Entwicklung einer der MS morphologisch ähnlichen, demyelinisierenden Erkrankung, nämlich der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE), geführt hat (Genain et al. 1995; Genain und Hauser 1996). Zudem wurden anti-MOG-Antikörper im Serum und Liquor von MS-Patient\*innen gefunden, die jedoch keinerlei Pathogenität besaßen (Reindl et al. 1999). Weitere Untersuchungen zeigten jedoch, dass die Konformation von MOG in den jeweili-

gen Assays für den Nachweis pathogener anti-MOG-Antikörper und somit das verwendete Nachweisverfahren von großer Bedeutung sind (Brehm et al. 1999; von Büdingen et al. 2002). Hierbei rückten Zell-basierte Assays mit lebenden, MOG-transfizierten Zellen in den Vordergrund, da so MOG in richtiger Konformation auf der Membranoberfläche präsentiert werden konnte. Sie wurden zur Methode der ersten Wahl für den Nachweis von pathogenen anti-MOG-Antikörpern (Yeh und Nakashima 2019).

Erst vor kurzer Zeit konnte die potenzielle Pathogenität humaner anti-MOG-Antikörper untermauert werden. Spadaro et al. gewannen anti-MOG-Antikörper von erkrankten Patient\*innen, wiesen eine murine Kreuzreaktivität nach und injizierten die aufgereinigten Antikörper in zwei verschiedenen EAE-Modelle, in denen zusammen mit spezifischen T-Zellen eine Demyelinisierung hervorgerufen wurde (Spadaro et al. 2018). Aber auch hier entsprach das Muster der Demyelinisierung am ehesten einer MS-Läsion vom Typ II (Lucchinetti et al. 2000), wie sie bereits aus anderen Tiermodellen bekannt war.

Aus den hier genannten Gründen und Erkenntnissen wurde im Rahmen dieser Doktorarbeit versucht, einen Zell-basierten Assay mit MOG-transfizierten HEK-293A-Zellen als diagnostisches Verfahren für die Routinediagnostik im Institut für Neuropathologie des Universitätsklinikums Göttingen zu etablieren. Dies gelang, indem das MOG-Gen aus humaner DNA mittels PCR amplifiziert wurde und dann in einen Vektor integriert wurde. Daraufhin diente die bakterielle Transformation der Gewinnung genügend großer DNA-Mengen des DNA-Vektor-Konstruktes und eine Transfektion dieses Konstruktes in die besagten HEK-293A-Zellen.

Zudem konnte an einem Kollektiv von insgesamt 16 Patient\*innen, die in der Klinik für Kinder und Jugendmedizin mit V.a. eine demyelinisierende Erkrankung behandelt worden waren, das Vorhandensein von anti-MOG-Antikörpern im Serum (verblindet) überprüft werden und retrospektiv mit den klinischen und paraklinischen Parametern korreliert werden.

## 4.2 Vorteil eines Zell-basierten Nachweisverfahrens von anti-MOG-Antikörpern

Die große Bedeutung von Zell-basierten Assays zum Nachweis humanpathogener anti-MOG-Antikörper beruht darauf, dass eine native Konformation von MOG für die Bindung der pathogenen Antikörper benötigt wird (Brehm et al. 1999; von Büdingen et al. 2002; von Büdingen et al. 2004; de Graaf et al. 2012; Spadaro et al. 2018). Die Bindestellen der Antikörper an verschiedenen Lokalisationen von MOG als Antigenen, die sog. Epitope, befinden sich nämlich im Bereich der Immunglobulin-ähnlichen Domäne. Diese ist der einzige extrazellulär gelegene Molekülanteil des MOG-Proteins (Kroepfl et al. 1996). Darüber hinaus hat die native, dreidimensionale Konformation des MOG-Moleküls Einfluss auf die Exposition der Epitope gegenüber den Antikörpern, welche in einem linearisierten oder denaturierten MOG-Molekül verändert sind (Menge et al. 2011). Aus diesen Gründen haben wir die MOG-transfizierten HEK-293A-Zellen für unser Assay verwendet.

Brehm et al. konnten bereits 1999 zeigen, dass *Enzyme-linked immunosorbent assays* (ELISA) und Western Blotting nicht adäquat zwischen pathogenen demyelinisierenden und nicht-pathogenen, nicht-demyelinisierenden anti-MOG-Antikörpern unterscheiden können (Brehm et al. 1999). Bei beiden genannten Verfahren wurden die anti-MOG-Antikörper sowohl bei Patient\*innen mit MS als auch bei Patient\*innen mit bakterieller oder viraler Enzephalitis sowie gesunden Kontroll-Probanden gefunden (Reindl et al. 1999; von Büdingen et al. 2002). Außerdem gab es Studien mit ELISA und Western Blotting, deren Ergebnisse in anderen Studien nicht reproduzierbar waren. Ein Beispiel ist die Studie von Lampasona et al., die argumentierten, dass mittels Western Blotting nachgewiesene anti-MOG-Antikörper vom IgM-Typ als prädiktive Marker für die MS genutzt werden könnten (Lampasona et al. 2004), was jedoch durch andere Studien nicht belegt werden konnte. Bereits Brehm et al. haben daher postuliert, dass Zell-basierte Assays geeigneter sind, um pathogene bzw. demyelinisierende anti-MOG-Antikörper im Serum nachzuweisen (Brehm et al. 1999). In zahlreichen weiteren Studien konnten diese Erkenntnisse untermauert werden (Reindl et al. 2020).

Im Jahr 2007 haben O'Connor et al. das Tetramer-Radioimmunassay als neue Methode entwickelt, um Konformations-abhängige anti-MOG-Antikörper im Serum von Patient\*innen nachzuweisen. Sie wollten mit ihrem Verfahren die Valenz von MOG als Antigen erhöhen, indem sie die extrazelluläre MOG-Domäne mit einem Streptavidinmonomer gekoppelt haben, welches sich spontan zu einem Tetramer zusammenlagern kann. Sie zeigten, dass anti-MOG-Antikörper besser durch Verfahren nachgewiesen werden können, in

denen die native Konformation von MOG beachtet wird und erhalten ist. Zudem konnten Sie noch einmal zeigen, dass das ELISA ein deutlich weniger sensitives und spezifisches Verfahren für den Nachweis von pathogenen anti-MOG-Antikörpern ist (O'Connor et al. 2007).

Die Zell-basierten Nachweisverfahren bieten den Vorteil, dass das MOG-Protein in originaler Länge und Konformation sowie Lokalisation innerhalb der Zellmembran der transfizierten Zellen synthetisiert wird. Diese Faktoren erhöhen die Sensitivität des anti-MOG-Antikörper-Nachweises im Vergleich zu verkürzten MOG-Proteinen (Kitley et al. 2014; Sato et al. 2014).

Insbesondere bei Anwendung einer stabilen Transfektion, wie sie auch in dieser Studie genutzt worden ist, sorgt der Einbau des linearisierten DNA-Vektor-Konstruktes ins Genom der HEK-293A-Zellen dafür, dass MOG wie jedes andere Protein dieser Zellen bei der Proteinexpression adäquat prozessiert und posttranslational (u. a. durch Glykosylierung) modifiziert wird (Kim et al. 2020). Somit zeigt sich hier auch der Vorteil der auch von uns verwendeten stabilen Transfektion gegenüber der transienten Transfektion. Würde man nur eine transiente Transfektion durchführen, müssten häufig neue transfizierte Zellkulturen erzeugt werden. So würde es zudem zu möglichen Ungleichheiten innerhalb der Messreihen kommen. Zur Überprüfung der Transfektion nutzten wir die Kopplung des MOG-Proteins mit dem GFP-Protein, dessen Gen nahe der Integrationsstelle des *MOG*-Gens innerhalb des TOPO-Vektors lag (Shimomura et al. 1962; Shuman 1994; Tsien 1998). Bereits unter dem Konfokalmikroskop konnten wir sehen, dass das MOG-GFP-Fusionsprotein in die Zellmembran der HEK-293A-Zellen integriert worden war.

Um nun zu schauen, dass die Konformation des in die Membran integrierten MOG-Proteins erhalten war, inkubierten wir die Zellkulturansätze mit einem humanisierten monoklonalen anti-MOG-Antikörper und detektierten dessen spezifische Bindung mit einem sekundären Fluorochrom-markierten anti-human-IgG-Antikörper. Mit Hilfe der Durchflusszytometrie konnten wir das Bindeverhalten der anti-MOG-Antikörper analysieren und nachweisen, dass ein Großteil der Zellen eine sehr starke Bindung der anti-MOG-Antikörper an das MOG-Protein aufwies. Da hier eine 100%ige Korrelation der korrekten Synthese und Integration von MOG und der medianen Fluoreszenzintensität von GFP vorlag, haben wir diejenigen Zellen zur Weiterkultivierung mittels Durchflusszytometrie aussortiert, deren Bindekapazität am höchsten war (siehe 3.7).

Zu den Vorteilen der Durchflusszytometrie gehört, dass es sich hierbei um ein quantitatives Verfahren handelt, welches unabhängig von der subjektiven Abschätzung des Begut-



achters ist (Tea et al. 2020). Ein anderes Verfahren zur Auswertung der Zell-basierten Assays ist die mikroskopische Untersuchung mittels Immunfluoreszenzfärbung durch Fluorochrom-gekoppelte Sekundärantikörper und Vergabe eines Immunfluoreszenz-Scores. Dieses Verfahren weist aber Limitationen auf, da es nur semiquantitativ und Betrachter-abhängig ist (Mader et al. 2011; Reindl und Waters 2019). Kim et al. konnten vor Kurzem zwar zeigen, dass die Ergebnisse der beiden Auswertungsverfahren (Durchflusszytometrie vs. Immunfluoreszenz) recht übereinstimmende Ergebnisse hervorgebracht haben, dennoch sollte die Durchflusszytometrie aus o.g. Gründen bevorzugt werden (Kim et al. 2020). Des Weiteren gibt es auch bei der Auswahl des Sekundärantikörpers zur Detektion des Primärantikörpers unterschiedliche Studien. In mehreren Studien und auch bei uns wurde herausgefunden, dass die meisten anti-MOG-Antikörper vom IgG1-Subtyp sind (Mader et al. 2011). Waters et al. haben beschrieben, dass die Messergebnisse mit einem IgG1-spezifischen Sekundärantikörper eine höhere Spezifität aufzeigten als mit dem IgG(H+L)-Antikörper, da dieser zusätzlich in einigen Proben Primärantikörper vom IgM-Typ gebunden hatte. Dies konnten Kim et al. allerdings nicht bestätigen, da sie gleiche Ergebnisse mit dem IgG1- und IgG(H+L)-Antikörper erzielten und bei ihnen keine IgM-Antikörper durch den IgG(H+L)-Antikörper gebunden worden waren (Kim et al. 2020). Ein Unterschied zur Studie von Waters et al. war jedoch, dass sie kaum pädiatrische Patient\*innen in ihrer untersuchten Kohorte eingeschlossen hatten. Auch in unserer Studie wurde der IgG(H+L)-Antikörper als Sekundärantikörper verwendet. Daneben haben wir zusätzlich IgG1-, IgM- und IgA-Antikörper für die genaue Charakterisierung des Antikörper-Isotyp-Spektrums verwendet. Dabei zeigten die meisten Patient\*innen mit Erhöhung von IgG auch eine Erhöhung von IgG1 (Mader et al. 2022). Ferner konnte man nur vereinzelt auch deutliche Erhöhungen von IgM-Antikörpern nachweisen.

Der Nachweis von anti-MOG-IgM-Antikörpern hat nur einen geringen diagnostischen Wert, da bei bestimmter Verdünnung (1:20) nicht zwischen unterschiedlichen Patient\*innengruppen und Kontrollseren unterschieden werden kann (Waters et al. 2015). Frühere Ergebnisse, welche die Annahme hervorbrachten, dass anti-MOG-IgM-Antikörper eine Rolle in der Pathogenese demyelinisierender Erkrankungen hätten, sind möglicherweise auf eine Bindung über C1q oder des DC-SIGN zu erklären (Lampasona et al. 2004; Waters et al. 2015). Pedreño et al konnten zeigen, dass anti-MOG-Antikörper vom IgM- oder IgA-Typ in den Seren von bis zu 19% der Kinder mit MOG-IgG-assoziierten demyelinisierenden Erkrankungen vorkommen, aber einen geringen bis keinen Krankheits-relevanten Wert haben (Pedreño et al. 2019).

Mayer et al. fanden heraus, dass insbesondere die Epitopregion im Bereich des Prolin42 bei einer Großzahl an Patient\*innen (v. a. Kinder) von den humanen anti-MOG-Antikörpern gebunden wird und bei ca. 50% der Patient\*innen sogar das einzige Epitop war, gegen das Antikörper vorlagen (Mayer et al. 2013). Außerdem konnte in der gleichen Studie gezeigt werden, dass im Lauf der Zeit von bis zu 5 Jahren kein molekularer Epitop-Switch stattgefunden hat. Des Weiteren entdeckte man, dass mehrere unterschiedliche Antikörper, die gegen verschiedene Epitope gerichtet waren, insbesondere bei Patient\*innen mit wiederholten Schüben auftraten, der Großteil der Patient\*innen jedoch nur eine Antikörperpopulation aufwies (Tea et al. 2019). Bislang wurde unsererseits keine genauere Analyse Epitop-spezifischer anti-MOG-Antikörper durchgeführt. Da hier eine potenzielle klinische Relevanz besteht, ist eine Überlegung sinnvoll, dies in Zukunft zu etablieren.

### 4.3 Klinische Relevanz des Nachweises von anti-MOG-Antikörpern bei demyelinisierenden Erkrankungen

In der Diagnostik einer idiopathischen demyelinisierenden Erkrankung des ZNS ist der Nachweis von anti-MOG-Antikörpern in mehrerlei Hinsicht von Bedeutung. Ein positiver Nachweis von anti-MOG-Antikörpern ist bei der genauen Diagnosestellung hilfreich, da die MOG-IgG-assoziierten Erkrankungen (MOGAE) mittlerweile eine eigenständige Subgruppe der demyelinisierenden Erkrankungen bilden. Somit hängen vom Nachweis der anti-MOG-Antikörper auch die entsprechenden Therapieverfahren, Vorhersagen zu den Krankheitsverläufen und die Prognose ab. Da mehrfach gezeigt werden konnte, dass ein Großteil der Kinder und Jugendlichen mit erstmaliger neurologischer Symptomatik, die auf eine idiopathische demyelinisierende Erkrankung hinweist, anti-MOG-Antikörper im Blut haben (ca. 40-50%), sollte eine Bestimmung des MOG-Titers im Serum auch immer im Rahmen der allgemeinen Diagnostik einer solchen Erkrankung durchgeführt werden (Lechner et al. 2016; Hegen und Reindl 2020).

Der Nachweis von anti-MOG-Antikörpern kann insbesondere beim erstmaligem Auftreten von Symptomen, aber auch im Verlauf einer demyelinisierenden Erkrankung in Zusammenschau mit der Klinik, anderen Laborparametern (u. a. Liquoranalytik) und bildgebenden Verfahren (v. a. MRT) bei der Diagnosefindung der entsprechenden demyelinisierenden Erkrankung sehr hilfreich sein (Hacohen et al. 2015; Ketelslegers et al. 2015). Hierbei spricht ein eindeutig positiver Nachweis von anti-MOG-Antikörpern dafür, dass bei den betroffenen Patient\*innen auch bei bislang einmaligem klinischem Ereignis eine anti-MOG-IgG-abhängige Erkrankung zu diagnostizieren ist, welche monophasisch oder multiphasisch verlaufen kann. Sollten jedoch die McDonald-Kriterien für MS bei den Patient\*innen zutreffen und anti-MOG-Antikörper im Serum nachgewiesen worden seien, ist immer eine Reevaluation der Befunde initiiert, da gezeigt werden konnte, dass solche Patient\*innen einen eher MS-atypischen Verlauf entwickeln (Waters et al. 2020). Somit spricht ein Nachweis von anti-MOG-Antikörpern eher gegen die Diagnose einer MS (Hacohen et al. 2015; Ketelslegers et al. 2015; Waters et al. 2015; Jarius et al. 2018b; Cobo-Calvo et al. 2020; Waters et al. 2020). In unserer Kohorte von 16 Patient\*innen konnte gezeigt werden, dass alle Patient\*innen mit positivem anti-MOG-Antikörpern (57%) auch ein für die MOGAE typisches klinisches Bild (Symptomatik, Liquorbefunde, MRT-Bildgebung) zeigten. Ebenso konnte bei denjenigen Patient\*innen mit dem typischen Bild einer MS (37,5%) keine Erhöhung von MOG-Antikörpern im Serum nachgewiesen werden. Oligoklonale Banden im Liquor, die eher MS typisch sind und bei 4 der 6 MS-Patient\*innen nachweisbar

waren, waren auch bei zwei Patient\*innen mit multiphasischem Verlauf einer anti-MOG-Erkrankung nachweisbar. Hierzu sind in der Literatur auch Fälle beschrieben (Jarius et al. 2020a). Weitere Unterschiede im Liquor von MOGAE- und MS-Patient\*innen ist der vermehrte Nachweis von neutrophilen Granulozyten, was in unseren Analysen bei häufig fehlenden Liquoruntersuchungen und -befunden nicht nachvollziehbar war (Vlad et al. 2023).

Daneben spricht ein Nachweis von anti-MOG-Antikörpern meist für einen milderen Verlauf der Erkrankung, einen geringeren Grad der Behinderung (EDSS-Scores, engl. *Expanded Disability Status Scale*), ein weitestgehend gutes Abklingen der Läsionen in den MRT-Untersuchungen im Verlauf und einer Besserung der neurologischen Symptomatik, insbesondere bei Patient\*innen mit anti-MOG-Antikörper-seropositiven NMOSDs (Waters et al. 2020). Waters et al. konnten zeigen, dass ein Großteil der MOG-positiven Patient\*innen ihrer längerfristig untersuchten Kohorte auch bei bestehender Seropositivität nur ein einmaliges Auftreten von Symptomen hatten. Zudem zeigten sie, dass die Konversion zu einem seronegativen Status mit einem geringeren Risiko für ein erneutes Auftreten von Symptomen vergesellschaftet ist (Waters et al. 2020). Der erstgenannte Befund von Waters et al. ist allerdings widersprüchlich zu den Aussagen anderer Studien, in denen eine persistierende Seropositivität von anti-MOG-Antikörpern mit weiteren klinischen Schüben assoziiert ist (Jurynczyk et al. 2017; López-Chiriboga et al. 2018). In unserer Kohorte gab es einen Fall (Nr. 9) mit ADEM-ON, bei dem der Patient zahlreiche Schübe in Form von Optikusneuritiden erlitt, und bei dem noch 27 Monate nach Symptombeginn erhöhte anti-MOG-Antikörper-Werte im Serum nachgewiesen werden konnten. Die Werte waren zu Symptombeginn und dann bei der Messung nach 7 Monaten am höchsten. Da sich nicht alle Patient\*innen bei Symptombeginn in der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin der Universitätsmedizin Göttingen vorgestellt haben und teilweise nur einmal zur Zweitmeinung vorgestellt worden sind, konnte auch nicht bei allen die Antikörperbestimmung über einen längeren Zeitraum erfolgen. Generell ist es hier jedoch sinnvoll, dass insbesondere prospektive Studien durchgeführt werden, die dann den positiven prädiktiven Wert der Persistenz von anti-MOG-Antikörpern genauer analysieren können (Hegen und Reindl 2020). Im Gegensatz zur MS, für die eine schubunabhängige Krankheitsprogression typisch ist, ist bei den MOGAE auch bei multiphasischem Verlauf keine allzu starke Krankheitsprogression mit zurückbleibenden Schädigungen zu erwarten. Im Gegensatz zu den MOGAE findet man bei den MOG-negativen und AQP4-positiven NMOSDs häufiger neurologische Einschränkungen, die seltener rückläufig sind (Hümmert et al. 2023).

Das genaue Therapieschema einer demyelinisierenden Erkrankung hängt natürlich von der genauen zugrunde liegenden Krankheit selbst und den dafür erprobten Therapieverfahren

ab, dennoch konnte auch hier bereits gezeigt werden, dass Patient\*innen mit anti-MOG-Antikörpern auf gewisse Therapieverfahren besser ansprechen als MOG-seronegative Patient\*innen (Cobo-Calvo et al. 2019). Da gerade anti-MOG-Antikörper-seropositive Kinder meist einen monophasischen Verlauf erleben, sollte eine langfristige Therapie mit immunmodulierenden Substanzen nur absolut begrenzt stattfinden, zumal die akute Schubtherapie mit Kortikosteroiden typischerweise bei den MOGAE sehr erfolgreich ist. Bei Patient\*innen mit einem multiphasischen Krankheitsverlauf kann eine Schubprophylaxe in Erwägung gezogen werden. Dafür käme beispielsweise eine Therapie mit intravenösen Immunglobulinen, die Gabe von anti-CD20-Antikörpern oder eine immunsuppressive Therapie (z. B. Azathioprin, Mycophenolat-Mofetil) in Frage (Bruijstens et al. 2020b). Da gerade bei jungen Kindern noch unbekannt ist, welche Veränderungen der Gehirnentwicklung durch rezidivierende Erkrankungen entstehen können, ist es wichtig, einen rezidivierenden Krankheitsverlauf genauer hervorsagen zu können (Jarius et al. 2016; Hacohen et al. 2018). Bartels et al. konnten vor kurzem einen Volumenverlust und ein fehlendes altersentsprechendes Gehirnwachstum bei Patient\*innen mit ADEM nachweisen (Bartels et al. 2023). Außerdem konnte gezeigt werden, dass die bei der MS verwendeten immunmodulierenden Therapien (z. B. Interferon-beta und Glatirameracetat) bei den MOGAE zu keinerlei Verbesserung der klinischen Symptome geführt haben (Hacohen et al. 2018).

Kürzlich konnten Tea et al. in einer großen Kohortenstudie zeigen, dass nicht nur der alleinige Nachweis von anti-MOG-Antikörpern von prognostischer Relevanz ist, sondern auch die genaue Bestimmung der Höhe der Antikörpertiter. Sie stellten fest, dass Patient\*innen mit höheren Antikörpertitern schwerwiegendere klinische Verläufe (z. B. ON) hatten. Außerdem konnte eine Korrelation zwischen dem Aktivitätszustand des Krankheitsverlaufes und der Höhe der Antikörpertiter festgestellt werden (Tea et al. 2019), was ebenfalls von Held et al. nachgewiesen worden ist (Held et al. 2021). Gastaldi et al. haben zudem zeigen können, dass erhöhte Antikörpertiter ein Indikator für einen rezidivierenden Verlauf sein können und eine Serokonversion zu negativen anti-MOG-Titern eine 95%ige Risikoreduktion bedeutet (Gastaldi et al. 2023).

Weitere prognostische Marker der MOGAE sind Leichtketten von Neurofilamenten im Serum, deren Höhe ebenfalls mit erhöhtem Progressionsrisiko korrelieren (Wendel et al. 2022). Im Blut-zirkulierende MOG-spezifische B-Zellen haben keine gute Korrelation mit den MOG-Antikörpertitern, bieten aber auch ein potenzielles Target für künftige Therapien (Winklmeier et al. 2019).

Diese Erkenntnisse machen deutlich, dass Zell-basierte Nachweisverfahren von MOG-Antikörpern eine wichtige Rolle für die Diagnose und auch Prognose von demyelinisierenden Erkrankungen spielen. Die Notwendigkeit für die korrekte Konformation konnte auch von Schanda et al. gezeigt werden, die eine unterschiedliche Wirkung von MOG-Antikörper auf die unterschiedlichen Isoformen von MOG gezeigt haben (Schanda et al. 2021). Auch ist es sinnvoll, die Serumproben wegzufrieren, um die Antikörpertiter Verläufe besser vergleichen zu können. In unserem Fall kann diese Information im klinischen Alltag von den behandelnden Ärzt\*innen in Zukunft dazu verwendet werden, Therapieverfahren und Kontrolluntersuchungen an die Höhe der Antikörpertiter anzupassen.

Bei der Abnahme von Blut für die serologische Diagnostik bei Patient\*innen mit Antikörper-abhängigen demyelinisierenden Erkrankungen sollte zudem beachtet werden, dass die Abnahme direkt nach dem Symptombeginn erfolgt. Außerdem sollte festgelegt werden, in welchem Abstand die Antikörpertiter kontrolliert werden. Eine erneute serologische Untersuchung sollte dann ebenfalls bei Auftreten neuer Symptome durchgeführt werden, um eine mögliche Korrelation zwischen persistierender oder erneut ansteigendem Antikörper-Titer zu erhalten.

Wie in den letzten Jahren bereits gezeigt werden konnte, umfassen diejenigen demyelinisierenden Erkrankungen, bei denen pathogene anti-MOG-Antikörper nachgewiesen werden können, ein ganzes Spektrum unterschiedlicher klinischer Krankheitsbilder. Auch wir konnten zeigen, dass die Patient\*innen mit positivem anti-MOG-Antikörper-Nachweis diverse Krankheitsformen und -verläufe zeigten.

#### 4.4 Weitere neurale Antigene in demyelinisierenden Erkrankungen

Die Möglichkeit der Entwicklung solcher Zell-basierten Assays kann in Zukunft dazu dienen, die Seren von Patient\*innen mit demyelinisierenden Erkrankungen auf mehrere potenzielle pathogene Autoantikörper zu testen. Entweder kann versucht werden, transfizierte Zellen zu erhalten, die gleichzeitig mehrere antigene Moleküle an ihrer Oberfläche exprimieren, oder es besteht die Möglichkeit, Co-Kulturen von Zellen zu entwickeln, die jeweils ein bestimmtes antigenes Molekül zusammen mit einem Fluorochrom exprimieren, das die Zuordnung des Antigens ermöglicht.

In Frage käme hierbei insbesondere das Wasserkanalprotein Aquaporin-4. Dieses spielt eine wichtige Rolle bei der Neuromyelitis optica und den NMOSDs (Lennon et al. 2004; Wingerchuk et al. 2007). Im Rahmen der NMOSDs ist es wichtig, dass seropositive von seronegativen Formen abgegrenzt werden müssen. Bei den seropositiven NMOSDs gibt es jedoch den Unterschied, dass bei einigen Patient\*innen anti-AQP4-Antikörper und bei anderen Patient\*innen anti-MOG-Antikörper nachweisbar sind (Mewes et al. 2022). Auch hier konnte gezeigt werden, dass Patient\*innen mit anti-MOG-Antikörper im Gegensatz zu Patient\*innen mit anti-AQP4-Antikörpern oder seronegativen Patient\*innen weniger Schübe und ein besseres Erholen von den neurologischen Symptomen aufweisen (Sato et al. 2014).

## 5 Zusammenfassung

Das Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein ist ein Protein der äußersten Schicht der Myelinscheide, welches im Rahmen von idiopathischen demyelinisierenden Erkrankungen eine wichtige Rolle spielt. Der Nachweis anti-MOG-spezifischer Autoantikörper hat in den letzten Jahrzehnten an klinischer Relevanz, insbesondere bei Patient\*innen im Kinder und Jugendalter, zugenommen. Dies liegt nicht nur darin begründet, dass bestimmte Entitäten demyelinisierender Erkrankungen über einen Antikörpernachweis mitdefiniert werden, sondern dass sich auch die Vorhersagekraft der Antikörperbestimmungen für den klinischen Verlauf und die Prognose wahrscheinlich in Zukunft verbessern werden. Hierbei spielen insbesondere Zell-basierte Assays zum Nachweis der anti-MOG-Antikörper eine wichtige Rolle, da sie aufgrund der Konformations-abhängigen Detektion antigener Epitope einen spezifischen Nachweis für pathogene Antikörper erbringen. Dies war der Grund, ein Zell-basiertes Assay für das Institut für Neuropathologie herzustellen und die in der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin untersuchten Patient\*innen auf anti-MOG-Antikörper hin zu untersuchen.

Mit unserer Studie konnten wir zuerst zeigen, dass Zellen mit regelhaft konformiertem MOG-Protein für ein Zell-basiertes Assay zum Nachweis von Antikörpern im Serum von Patient\*innen mit Hilfe von PCR, Transformation und stabiler Transfektion erschaffen werden können. Außerdem konnten wir in den Analysen der Durchflusszytometrie zeigen, dass diese Zellen in der Lage sind, anti-MOG-Antikörper spezifisch zu binden. Und schließlich konnten diese Zellen dazu verwendet werden, anti-MOG-Antikörper im Patient\*innenserum nachzuweisen oder auszuschließen. Bei der von uns untersuchten Kohorte ( $n = 16$ ) konnte in 50% der Fälle ein positiver Nachweis von anti-MOG-Antikörpern erfolgen. Die diagnostizierten Erkrankungen zählten alle zu den MOG-IgG-assoziierten Erkrankungen. Alle sechs Fälle mit multipler Sklerose waren MOG-Antikörper negativ.

Zell-basierte Antikörper-Nachweisverfahren eignen sich auch, um in der Zukunft neue pathogene Antikörper für Entmarkungserkrankungen zu definieren und nachzuweisen.

Abschließend ist zu sagen, dass die Antikörperdiagnostik mittels Zell-basierter Assays zumindest bei jedem Kind mit initialer Symptomatik einer demyelinisierenden Erkrankung durchgeführt werden sollte und bei positivem Antikörpernachweis auch weitere serologische Untersuchungen in gewissen Zeitabständen erfolgen sollten.



## 6 Literaturverzeichnis

- Abbott NJ, Rönnbäck L, Hansson E (2006): Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat Rev Neurosci* 7, 41–53
- Adelmann M, Wood J, Benzel I, Fiori P, Lassmann H, Matthieu JM, Gardinier MV, Dornmair K, Linington C (1995): The N-terminal domain of the myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG) induces acute demyelinating experimental autoimmune encephalomyelitis in the Lewis rat. *J Neuroimmunol* 63, 17–27
- Aggarwal S, Yurlova L, Simons M (2011): Central nervous system myelin: structure, synthesis and assembly. *Trends Cell Biol* 21, 585–593
- Armangue T, Olivé-Cirera G, Martínez-Hernandez E, Sepulveda M, Ruiz-García R, Muñoz-Batista M, Ariño H, González-Álvarez V, Felipe-Rucián A, Jesús Martínez-González M, et al. (2020): Associations of paediatric demyelinating and encephalitic syndromes with myelin oligodendrocyte glycoprotein antibodies: a multicentre observational study. *Lancet Neurol* 19, 234–246
- Ascherio A, Munger KL (2016): Epidemiology of Multiple Sclerosis: From Risk Factors to Prevention-An Update. *Semin Neurol* 36, 103–114
- Banwell B, Bennett JL, Marignier R, Kim HJ, Brilot F, Flanagan EP, Ramanathan S, Waters P, Tenembaum S, Graves JS, et al. (2023): Diagnosis of myelin oligodendrocyte glycoprotein antibody-associated disease: International MOGAD Panel proposed criteria. *Lancet Neurol* 22, 268–282
- Barron KD (1995): The microglial cell. A historical review. *J Neurol Sci* 134 Suppl, 57–68
- Bartels F, Baumgartner B, Aigner A, Cooper G, Blaschek A, Wendel E, Bertolini A, Karenfort M, Baumann M, Cleaveland R, et al. (2023): Impaired Brain Growth in Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein Antibody-Associated Acute Disseminated Encephalomyelitis. *Neurology(R) neuroimmunology & neuroinflammation* 10
- Baumann M, Hennes E-M, Schanda K, Karenfort M, Kornek B, Seidl R, Diepold K, Lauffer H, Marquardt I, Strautmanis J, et al. (2016): Children with multiphasic disseminated encephalomyelitis and antibodies to the myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG): Extending the spectrum of MOG antibody positive diseases. *Mult Scler* 22, 1821–1829
- Berek K, Grams A, Uprimny C, Prieschl M, Ramberger M, Unterberger I, Deisenhammer F, Reindl M, Hegen H (2022): Anti-NMDA receptor encephalitis and MOG-associated demyelination – a case report with long-term follow-up and a systematic review. *BMC Neurology* 22, 434
- Berger T, Reindl M (2015): Antibody biomarkers in CNS demyelinating diseases - a long

and winding road. *Eur J Neurol* 22, 1162–1168

Bernard CC, Johns TG, Slavin A, Ichikawa M, Ewing C, Liu J, Bettadapura J (1997): Myelin oligodendrocyte glycoprotein: a novel candidate autoantigen in multiple sclerosis. *J Mol Med* 75, 77–88

Bornstein MB, Appel SH (1961): The Application of Tissue Culture to the Study of Experimental “Allergic” Encephalomyelitis. I. Patterns of Demyelination. *J Neuropathol Exp Neurol* 20, 141–157

Boullerne AI (2016): The history of myelin. *Exp Neurol* 283, 431–445

Boyle LH, Traherne JA, Plotnek G, Ward R, Trowsdale J (2007): Splice variation in the cytoplasmic domains of myelin oligodendrocyte glycoprotein affects its cellular localisation and transport. *J Neurochem* 102, 1853–1862

Bradl M, Linington C (1996): Animal models of demyelination. *Brain Pathol* 6, 303–311

Brehm U, Piddlesden SJ, Gardinier MV, Linington C (1999): Epitope specificity of demyelinating monoclonal autoantibodies directed against the human myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG). *J Neuroimmunol* 97, 9–15

Brilot F, Dale RC, Selter RC, Grummel V, Kalluri SR, Aslam M, Busch V, Zhou D, Cepok S, Hemmer B (2009): Antibodies to native myelin oligodendrocyte glycoprotein in children with inflammatory demyelinating central nervous system disease. *Ann Neurol* 66, 833–842

Brody BA, Kinney HC, Kloman AS, Gilles FH (1987): Sequence of central nervous system myelination in human infancy. I. An autopsy study of myelination. *J Neuropathol Exp Neurol* 46, 283–301

Brola W, Steinborn B (2020): Pediatric multiple sclerosis - current status of epidemiology, diagnosis and treatment. *Neurol Neurochir Pol*

Brück W, Popescu B, Lucchinetti CF, Markovic-Plese S, Gold R, Thal DR, Metz I (2012): Neuromyelitis optica lesions may inform multiple sclerosis heterogeneity debate. *Ann Neurol* 72, 385–394

Bruijstens AL, Lechner C, Flet-Berliac L, Deiva K, Neuteboom RF, Hemingway C, Wassmer E, E.U. paediatric MOG consortium, Baumann M, Bartels F, et al. (2020a): E.U. paediatric MOG consortium consensus: Part 1 - Classification of clinical phenotypes of paediatric myelin oligodendrocyte glycoprotein antibody-associated disorders. *Eur J Paediatr Neurol* 29, 2–13

Bruijstens AL, Wendel E-M, Lechner C, Bartels F, Finke C, Breu M, Flet-Berliac L, de Chalus A, Adamsbaum C, Capobianco M, et al. (2020b): E.U. paediatric MOG consortium consensus: Part 5 - Treatment of paediatric myelin oligodendrocyte glycoprotein antibody-associated disorders. *Eur J Paediatr Neurol* 29, 41–53

Brunner C, Lassmann H, Waehneldt TV, Matthieu JM, Linington C (1989): Differential

- ultrastructural localization of myelin basic protein, myelin/oligodendroglial glycoprotein, and 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase in the CNS of adult rats. *J Neurochem* 52, 296–304
- Burger D, Perruisseau G, Simon M, Steck AJ (1992): Comparison of the N-linked oligosaccharide structures of the two major human myelin glycoproteins MAG and P0: assessment of the structures bearing the epitope for HNK-1 and human monoclonal immunoglobulin M found in demyelinating neuropathy. *J Neurochem* 58, 854–861
- Burger D, Steck AJ, Bernard CC, Kerlero de Rosbo N (1993): Human myelin/oligodendrocyte glycoprotein: a new member of the L2/HNK-1 family. *J Neurochem* 61, 1822–1827
- Burke RE (2007): Sir Charles Sherrington's the integrative action of the nervous system: a centenary appreciation. *Brain* 130, 887–894
- Carnero Contentti E, Lopez PA, Pettinicchi JP, Pappolla A, Miguez J, Patrucco L, Cristiano E, Vrech C, Tkachuk V, Liwacki S, et al. (2021): What percentage of AQP4-ab-negative NMOSD patients are MOG-ab positive? A study from the Argentinean multiple sclerosis registry (RelevarEM). *Mult Scler Relat Disord* 49, 102742
- Cavenaghi VB, Dobrianskyj FM, Olival GS do, Carneiro RPCD, Tilbery CP (2017): Characterization of the first symptoms of multiple sclerosis in a Brazilian center: cross-sectional study. *Sao Paulo Med J* 135, 222–225
- Chan A, Decard BF, Franke C, Grummel V, Zhou D, Schottstedt V, Toyka KV, Hemmer B, Gold R (2010): Serum antibodies to conformational and linear epitopes of myelin oligodendrocyte glycoprotein are not elevated in the preclinical phase of multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)* 16, 1189–1192
- Chang A, Tourtellotte WW, Rudick R, Trapp BD (2002): Premyelinating oligodendrocytes in chronic lesions of multiple sclerosis. *N Engl J Med* 346, 165–173
- Chen W-T, Huang Y-C, Peng M-C, Wang M-C, Lin K-P (2016): Acute Disseminated Encephalomyelitis After Influenza Vaccination: A Case Report. *Crit Care Nurse* 36, e1-6
- Chitnis T, Arnold DL, Banwell B, Brück W, Ghezzi A, Giovannoni G, Greenberg B, Krupp L, Rostásy K, Tardieu M, et al. (2018): Trial of Fingolimod versus Interferon Beta-1a in Pediatric Multiple Sclerosis. *N Engl J Med* 379, 1017–1027
- Cobo-Calvo A, Sepúlveda M, Rollot F, Armangué T, Ruiz A, Maillart E, Papeix C, Audoin B, Zephir H, Biotti D, et al. (2019): Evaluation of treatment response in adults with relapsing MOG-Ab-associated disease. *J Neuroinflammation* 16, 134
- Cobo-Calvo Á, d'Indy H, Ruiz A, Collongues N, Kremer L, Durand-Dubief F, Rollot F, Casey R, Vukusic S, De Seze J, Marignier R (2020): Frequency of myelin oligodendrocyte glycoprotein antibody in multiple sclerosis: A multicenter cross-sectional study. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm* 7, e649

- Dawson MRL, Polito A, Levine JM, Reynolds R (2003): NG2-expressing glial progenitor cells: an abundant and widespread population of cycling cells in the adult rat CNS. *Mol Cell Neurosci* 24, 476–488
- de Graaf KL, Albert M, Weissert R (2012): Autoantigen conformation influences both B- and T-cell responses and encephalitogenicity. *J Biol Chem* 287, 17206–17213
- de Mol CL, Wong Y, van Pelt ED, Wokke B, Siepmann T, Neuteboom RF, Hamann D, Hintzen RQ (2020): The clinical spectrum and incidence of anti-MOG-associated acquired demyelinating syndromes in children and adults. *Mult Scler* 26, 806–814
- De Robertis E, Gerschenfeld HM, Wald F (1958): Cellular mechanism of myelination in the central nervous system. *J Biophys Biochem Cytol* 4, 651–656
- Delarasse C, Daubas P, Mars LT, Vizler C, Litzemberger T, Iglesias A, Bauer J, Della Gaspera B, Schubart A, Decker L, et al. (2003): Myelin/oligodendrocyte glycoprotein-deficient (MOG-deficient) mice reveal lack of immune tolerance to MOG in wild-type mice. *J Clin Invest* 112, 544–553
- Dobson R, Ramagopalan S, Davis A, Giovannoni G (2013): Cerebrospinal fluid oligoclonal bands in multiple sclerosis and clinically isolated syndromes: a meta-analysis of prevalence, prognosis and effect of latitude. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 84, 909–914
- Engelhardt B, Sorokin L (2009): The blood-brain and the blood-cerebrospinal fluid barriers: function and dysfunction. *Semin Immunopathol* 31, 497–511
- Feigin VL, Abajobir AA, Abate KH, Abd-Allah F, Abdulle AM, Abera SF, Abyu GY, Ahmed MB, Aichour AN, Aichour I, et al. (2017): Global, regional, and national burden of neurological disorders during 1990–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *The Lancet Neurology* 16, 877–897
- Fillatreau S, Sweeney CH, McGeachy MJ, Gray D, Anderton SM (2002): B cells regulate autoimmunity by provision of IL-10. *Nat Immunol* 3, 944–950
- Forbes TA, Gallo V (2017): All Wrapped Up: Environmental Effects on Myelination. *Trends Neurosci* 40, 572–587
- Franklin RJM, Ffrench-Constant C (2017): Regenerating CNS myelin - from mechanisms to experimental medicines. *Nat Rev Neurosci* 18, 753–769
- Fujihara K (2019): Neuromyelitis optica spectrum disorders: still evolving and broadening. *Curr Opin Neurol* 32, 385–394
- Fujihara K, Misu T, Nakashima I, Takahashi T, Bradl M, Lassmann H, Takano R, Nishiyama S, Takai Y, Suzuki C, et al. (2012): Neuromyelitis optica should be classified as an astrocytopathic disease rather than a demyelinating disease. *Clinical and Experimental Neuroimmunology* 3, 58–73
- Fünfschilling U, Supplie LM, Mahad D, Boretius S, Saab AS, Edgar J, Brinkmann BG,

- Kassmann CM, Tzvetanova ID, Möbius W, et al. (2012): Glycolytic oligodendrocytes maintain myelin and long-term axonal integrity. *Nature* **485**, 517–521
- Gaetani L, Fanelli F, Riccucci I, Eusebi P, Sarchielli P, Pozzilli C, Calabresi P, Prosperini L, Di Filippo M (2017): High risk of early conversion to multiple sclerosis in clinically isolated syndromes with dissemination in space at baseline. *J Neurol Sci* **379**, 236–240
- Gaetani L, Prosperini L, Mancini A, Eusebi P, Cerri MC, Pozzilli C, Calabresi P, Sarchielli P, Di Filippo M (2018): 2017 revisions of McDonald criteria shorten the time to diagnosis of multiple sclerosis in clinically isolated syndromes. *J Neurol* **265**, 2684–2687
- García-Vallejo JJ, Ilarregui JM, Kalay H, Chamorro S, Koning N, Unger WW, Ambrosini M, Montserrat V, Fernandes RJ, Bruijns SCM, et al. (2014): CNS myelin induces regulatory functions of DC-SIGN-expressing, antigen-presenting cells via cognate interaction with MOG. *J Exp Med* **211**, 1465–1483
- Gardinier MV, Matthieu JM (1993): Cloning and cDNA sequence analysis of myelin/oligodendrocyte glycoprotein: a novel member of the immunoglobulin gene superfamily. *Schweiz Arch Neurol Psychiatr* (1985) **144**, 201–207
- Gardinier MV, Amiguet P, Linington C, Matthieu JM (1992): Myelin/oligodendrocyte glycoprotein is a unique member of the immunoglobulin superfamily. *J Neurosci Res* **33**, 177–187
- Gastaldi M, Foadelli T, Greco G, Scaranzin S, Rigoni E, Masciocchi S, Ferrari S, Mancinelli C, Brambilla L, Mancardi M, et al. (2023): Prognostic relevance of quantitative and longitudinal MOG antibody testing in patients with MOGAD: a multicentre retrospective study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **94**, 201–210
- GBD 2016 Multiple Sclerosis Collaborators (2019): Global, regional, and national burden of multiple sclerosis 1990-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet Neurol* **18**, 269–285
- Genain null, Hauser null (1996): Allergic Encephalomyelitis in Common Marmosets: Pathogenesis of a Multiple Sclerosis-like Lesion. *Methods* **10**, 420–434
- Genain CP, Nguyen MH, Letvin NL, Pearl R, Davis RL, Adelman M, Lees MB, Linington C, Hauser SL (1995): Antibody facilitation of multiple sclerosis-like lesions in a nonhuman primate. *J Clin Invest* **96**, 2966–2974
- Genain CP, Cannella B, Hauser SL, Raine CS (1999): Identification of autoantibodies associated with myelin damage in multiple sclerosis. *Nat Med* **5**, 170–175
- Gensert JM, Goldman JE (1997): Endogenous progenitors remyelinate demyelinated axons in the adult CNS. *Neuron* **19**, 197–203
- GNP (2023): S1-Leitlinie Pädiatrische Multiple Sklerose. Gesellschaft für Neuropädiatrie e.V., Online: <https://register.awmf.org/de/leitlinien/detail/022-014> (abgerufen am

01.12.2023).

Goldmann T, Wieghofer P, Jordão MJC, Prutek F, Hagemeyer N, Frenzel K, Amann L, Staszewski O, Kierdorf K, Krueger M, et al. (2016): Origin, fate and dynamics of macrophages at central nervous system interfaces. *Nat Immunol* 17, 797–805

Goldschmidt T, Antel J, König FB, Brück W, Kuhlmann T (2009): Remyelination capacity of the MS brain decreases with disease chronicity. *Neurology* 72, 1914–1921

Guggenmos J, Schubart AS, Ogg S, Andersson M, Olsson T, Mather IH, Linington C (2004): Antibody cross-reactivity between myelin oligodendrocyte glycoprotein and the milk protein butyrophilin in multiple sclerosis. *J Immunol* 172, 661–668

Hacohen Y, Absoud M, Deiva K, Hemingway C, Nytrova P, Woodhall M, Palace J, Wassmer E, Tardieu M, Vincent A, et al. (2015): Myelin oligodendrocyte glycoprotein antibodies are associated with a non-MS course in children. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm* 2, e81

Hacohen Y, Wong YY, Lechner C, Jurynczyk M, Wright S, Konuskan B, Kalser J, Poulat AL, Maurey H, Ganelin-Cohen E, et al. (2018): Disease Course and Treatment Responses in Children With Relapsing Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein Antibody-Associated Disease. *JAMA Neurol* 75, 478–487

Hardy TA, Reddel SW, Barnett MH, Palace J, Lucchinetti CF, Weinshenker BG (2016): Atypical inflammatory demyelinating syndromes of the CNS. *Lancet Neurol* 15, 967–981

Hegen H, Reindl M (2020): Recent developments in MOG-IgG associated neurological disorders. *Ther Adv Neurol Disord* 13, 1756286420945135

Held F, Kalluri SR, Berthele A, Klein A-K, Reindl M, Hemmer B (2021): Frequency of myelin oligodendrocyte glycoprotein antibodies in a large cohort of neurological patients. *Mult Scler J Exp Transl Clin* 7, 20552173211022767

Hemmer B (2023): Diagnose und Therapie der Multiplen Sklerose, Neuromyelitis-optica-Spektrum-Erkrankungen und MOG-IgG-assoziierten Erkrankungen, S2k-Leitlinie, 2023, in: Deutsche Gesellschaft für Neurologie (Hrsg.), Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie. Online: [www.dgn.org/leitlinien](http://www.dgn.org/leitlinien) (abgerufen am 15.10.2023).

Hennes E-M, Baumann M, Schanda K, Anlar B, Bajer-Kornek B, Blaschek A, Brantner-Inthaler S, Diepold K, Eisenkölbl A, Gotwald T, et al. (2017): Prognostic relevance of MOG antibodies in children with an acquired demyelinating syndrome. *Neurology* 89, 900–908

Hildebrand C, Remahl S, Persson H, Bjartmar C (1993): Myelinated nerve fibres in the CNS. *Prog Neurobiol* 40, 319–384

Hjelmström P, Juedes AE, Fjell J, Ruddle NH (1998): B-cell-deficient mice develop experimental allergic encephalomyelitis with demyelination after myelin oligodendrocyte glyco-

protein sensitization. *J Immunol* 161, 4480–4483

Höftberger R, Lassmann H (2018): Inflammatory demyelinating diseases of the central nervous system. *Handb Clin Neurol* 145, 263–283

Hümmert MW, Stern C, Paul F, Duchow A, Bellmann-Strobl J, Ayzenberg I, Schwake C, Kleiter I, Hellwig K, Jarius S, et al. (2023): Cognition in patients with neuromyelitis optica spectrum disorders: A prospective multicentre study of 217 patients (CogniNMO-Study). *Mult Scler* 29, 819–831

Huppke B, Ellenberger D, Rosewich H, Friede T, Gärtner J, Huppke P (2014): Clinical presentation of pediatric multiple sclerosis before puberty. *Eur J Neurol* 21, 441–446

Huppke P, Stark W, Zürcher C, Huppke B, Brück W, Gärtner J (2008): Natalizumab use in pediatric multiple sclerosis. *Arch Neurol* 65, 1655–1658

Huppke P, Hummel H, Ellenberger D, Pfeifenbring S, Stark W, Huppke B, Brück W, Gärtner J (2015): JC virus antibody status in a pediatric multiple sclerosis cohort: prevalence, conversion rate and influence on disease severity. *Mult Scler* 21, 382–387

Jakimovski D, Awan S, Eckert SP, Farooq O, Weinstock-Guttman B (2022): Multiple Sclerosis in Children: Differential Diagnosis, Prognosis, and Disease-Modifying Treatment. *CNS Drugs* 36, 45–59

Jakovcevski I, Zecevic N (2005): Sequence of oligodendrocyte development in the human fetal telencephalon. *Glia* 49, 480–491

Jakovcevski I, Filipovic R, Mo Z, Rakic S, Zecevic N (2009): Oligodendrocyte development and the onset of myelination in the human fetal brain. *Front Neuroanat* 3, 5

Jarius S, Ruprecht K, Wildemann B, Kuempfel T, Ringelstein M, Geis C, Kleiter I, Kleinschnitz C, Berthele A, Brettschneider J, et al. (2012): Contrasting disease patterns in seropositive and seronegative neuromyelitis optica: A multicentre study of 175 patients. *J Neuroinflammation* 2, 14

Jarius S, Ruprecht K, Kleiter I, Borisow N, Asgari N, Pitarokoili K, Pache F, Stich O, Beume L-A, Hümmert MW, et al. (2016): MOG-IgG in NMO and related disorders: a multicenter study of 50 patients. Part 2: Epidemiology, clinical presentation, radiological and laboratory features, treatment responses, and long-term outcome. *J Neuroinflammation* 13, 280

Jarius S, Paul F, Aktas O, Asgari N, Dale RC, de Seze J, Franciotta D, Fujihara K, Jacob A, Kim HJ, et al. (2018a): [MOG encephalomyelitis: international recommendations on diagnosis and antibody testing]. *Nervenarzt* 89, 1388–1399

Jarius S, Ruprecht K, Stellmann JP, Huss A, Ayzenberg I, Willing A, Trebst C, Pawlitzki M, Abdelhak A, Grüter T, et al. (2018b): MOG-IgG in primary and secondary chronic progressive multiple sclerosis: a multicenter study of 200 patients and review of the literature. *J*

Neuroinflammation 15, 88

Jarius S, Pellkofer H, Siebert N, Korporal-Kuhnke M, Hümmert MW, Ringelstein M, Rommer PS, Ayzenberg I, Ruprecht K, Klotz L, et al. (2020a): Cerebrospinal fluid findings in patients with myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG) antibodies. Part 1: Results from 163 lumbar punctures in 100 adult patients. *J Neuroinflammation* 17, 261

Jarius S, Lechner C, Wendel EM, Baumann M, Breu M, Schimmel M, Karenfort M, Marina AD, Merckenschlager A, Thiels C, et al. (2020b): Cerebrospinal fluid findings in patients with myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG) antibodies. Part 2: Results from 108 lumbar punctures in 80 pediatric patients. *J Neuroinflammation* 17, 262

Jarius S, Paul F, Weinshenker BG, Levy M, Kim HJ, Wildemann B (2020c): Neuromyelitis optica. *Nat Rev Dis Primers* 6, 85

Jarius S, Bieber N, Haas J, Wildemann B (2022): MOG encephalomyelitis after vaccination against severe acute respiratory syndrome coronavirus type 2 (SARS-CoV-2): case report and comprehensive review of the literature. *J Neurol* 269, 5198–5212

Jurynczyk M, Messina S, Woodhall MR, Raza N, Everett R, Roca-Fernandez A, Tackley G, Hamid S, Sheard A, Reynolds G, et al. (2017): Clinical presentation and prognosis in MOG-antibody disease: a UK study. *Brain* 140, 3128–3138

Kabat EA, Glusman M, Knaub V (1948): Quantitative estimation of the albumin and gamma globulin in normal and pathologic cerebrospinal fluid by immunochemical methods. *Am J Med* 4, 653–662

Karussis D, Petrou P (2014): The spectrum of post-vaccination inflammatory CNS demyelinating syndromes. *Autoimmun Rev* 13, 215–224

Ketelslegers IA, Van Pelt DE, Bryde S, Neuteboom RF, Catsman-Berrevoets CE, Hamann D, Hintzen RQ (2015): Anti-MOG antibodies plead against MS diagnosis in an Acquired Demyelinating Syndromes cohort. *Mult Scler* 21, 1513–1520

Khan S, Yaqub BA, Poser CM, al Deeb SM, Bohlega S (1995): Multiphasic disseminated encephalomyelitis presenting as alternating hemiplegia. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 58, 467–470

Kim Y, Hyun J-W, Woodhall MR, Oh Y-M, Lee J-E, Jung JY, Kim SY, Lee MY, Kim S-H, Kim W, et al. (2020): Refining cell-based assay to detect MOG-IgG in patients with central nervous system inflammatory diseases. *Mult Scler Relat Disord* 40, 101939

Kinney HC, Brody BA, Kloman AS, Gilles FH (1988): Sequence of central nervous system myelination in human infancy. II. Patterns of myelination in autopsied infants. *J Neuropathol Exp Neurol* 47, 217–234

Kitley J, Waters P, Woodhall M, Leite MI, Murchison A, George J, Küker W, Chandratre S, Vincent A, Palace J (2014): Neuromyelitis optica spectrum disorders with aquaporin-4 and



myelin-oligodendrocyte glycoprotein antibodies: a comparative study. *JAMA Neurol* 71, 276–283

Krishnamoorthy G, Saxena A, Mars LT, Domingues HS, Mentele R, Ben-Nun A, Lassmann H, Dornmair K, Kurschus FC, Liblau RS, Wekerle H (2009): Myelin-specific T cells also recognize neuronal autoantigen in a transgenic mouse model of multiple sclerosis. *Nat Med* 15, 626–632

Kroepfl JF, Viise LR, Charron AJ, Linington C, Gardinier MV (1996): Investigation of myelin/oligodendrocyte glycoprotein membrane topology. *J Neurochem* 67, 2219–2222

Krumbholz M, Derfuss T, Hohlfeld R, Meinl E (2012): B cells and antibodies in multiple sclerosis pathogenesis and therapy. *Nat Rev Neurol* 8, 613–623

Krupp LB, Tardieu M, Amato MP, Banwell B, Chitnis T, Dale RC, Ghezzi A, Hintzen R, Kornberg A, Pohl D, et al. (2013): International Pediatric Multiple Sclerosis Study Group criteria for pediatric multiple sclerosis and immune-mediated central nervous system demyelinating disorders: revisions to the 2007 definitions. *Mult Scler* 19, 1261–1267

Kümpfel T, Giglhuber K, Aktas O, Ayzenberg I, Bellmann-Strobl J, Häußler V, Havla J, Hellwig K, Hümmert MW, Jarius S, et al. (2023): Update on the diagnosis and treatment of neuromyelitis optica spectrum disorders (NMOSD) - revised recommendations of the Neuromyelitis Optica Study Group (NEMOS). Part II: Attack therapy and long-term management. *J Neurol*

Lalive PH, Häusler MG, Maurey H, Mikaeloff Y, Tardieu M, Wiendl H, Schroeter M, Hartung HP, Kieseier BC, Menge T (2011): Highly reactive anti-myelin oligodendrocyte glycoprotein antibodies differentiate demyelinating diseases from viral encephalitis in children. *Mult Scler* 17, 297–302

Lampasona V, Franciotta D, Furlan R, Zanaboni S, Fazio R, Bonifacio E, Comi G, Martino G (2004): Similar low frequency of anti-MOG IgG and IgM in MS patients and healthy subjects. *Neurology* 62, 2092–2094

Laterre EC, Callewaert A, Heremans JF, Sfaello Z (1970): Electrophoretic morphology of gamma globulins in cerebrospinal fluid of multiple sclerosis and other diseases of the nervous system. *Neurology* 20, 982–990

Lebar R, Boutry JM, Vincent C, Robineaux R, Voisin GA (1976): Studies on autoimmune encephalomyelitis in the guinea pig. II. An in vitro investigation on the nature, properties, and specificity of the serum-demyelinating factor. *J Immunol* 116, 1439–1446

Lebar R, Baudrimont M, Vincent C (1989): Chronic experimental autoimmune encephalomyelitis in the guinea pig. Presence of anti-M2 antibodies in central nervous system tissue and the possible role of M2 autoantigen in the induction of the disease. *J Autoimmun* 2, 115–132

Lechner C, Baumann M, Hennes E-M, Schanda K, Marquard K, Karenfort M, Leiz S, Pohl

- D, Venkateswaran S, Pritsch M, et al. (2016): Antibodies to MOG and AQP4 in children with neuromyelitis optica and limited forms of the disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 87, 897–905
- Lechner C, Breu M, Wendel E-M, Kornek B, Schanda K, Baumann M, Reindl M, Rostásy K (2020): Epidemiology of Pediatric NMOSD in Germany and Austria. *Front Neurol* 11, 415
- Lennon VA, Wingerchuk DM, Kryzer TJ, Pittock SJ, Lucchinetti CF, Fujihara K, Nakashima I, Weinshenker BG (2004): A serum autoantibody marker of neuromyelitis optica: distinction from multiple sclerosis. *Lancet* 364, 2106–2112
- Lennon VA, Kryzer TJ, Pittock SJ, Verkman AS, Hinson SR (2005): IgG marker of optic-spinal multiple sclerosis binds to the aquaporin-4 water channel. *J Exp Med* 202, 473–477
- Lerch M, Schanda K, Lafon E, Würzner R, Mariotto S, Dinoto A, Wendel EM, Lechner C, Hegen H, Rostásy K, et al. (2023): More Efficient Complement Activation by Anti-Aquaporin-4 Compared With Anti-Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein Antibodies. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm* 10, e200059
- Linington C, Webb M, Woodhams PL (1984): A novel myelin-associated glycoprotein defined by a mouse monoclonal antibody. *J Neuroimmunol* 6, 387–396
- Linington C, Bradl M, Lassmann H, Brunner C, Vass K (1988): Augmentation of demyelination in rat acute allergic encephalomyelitis by circulating mouse monoclonal antibodies directed against a myelin/oligodendrocyte glycoprotein. *Am J Pathol* 130, 443–454
- Link H, Huang Y-M (2006): Oligoclonal bands in multiple sclerosis cerebrospinal fluid: an update on methodology and clinical usefulness. *J Neuroimmunol* 180, 17–28
- Litzenburger T, Fässler R, Bauer J, Lassmann H, Linington C, Wekerle H, Iglesias A (1998): B lymphocytes producing demyelinating autoantibodies: development and function in gene-targeted transgenic mice. *J Exp Med* 188, 169–180
- López-Chiriboga AS, Majed M, Fryer J, Dubey D, McKeon A, Flanagan EP, Jitprapaikulsan J, Kothapalli N, Tillema J-M, Chen J, et al. (2018): Association of MOG-IgG Serostatus With Relapse After Acute Disseminated Encephalomyelitis and Proposed Diagnostic Criteria for MOG-IgG-Associated Disorders. *JAMA neurology* 75, 1355–1363
- Love S (2006): Demyelinating diseases. *J Clin Pathol* 59, 1151–1159
- Lublin FD, Reingold SC (1996): Defining the clinical course of multiple sclerosis: results of an international survey. National Multiple Sclerosis Society (USA) Advisory Committee on Clinical Trials of New Agents in Multiple Sclerosis. *Neurology* 46, 907–911
- Lublin FD, Reingold SC, Cohen JA, Cutter GR, Sørensen PS, Thompson AJ, Wolinsky JS, Balcer LJ, Banwell B, Barkhof F, et al. (2014): Defining the clinical course of multiple sclerosis: the 2013 revisions. *Neurology* 83, 278–286

- Lucas J (1790): An Account of Uncommon Symptoms Succeeding the Measles; with Some Additional Remarks on the Infection of Measles and Small Pox. *Lond Med J* 11, 325–331
- Lucchinetti C, Brück W, Parisi J, Scheithauer B, Rodriguez M, Lassmann H (2000): Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination. *Ann Neurol* 47, 707–717
- Ludwin SK, Rao VT, Moore CS, Antel JP (2016): Astrocytes in multiple sclerosis. *Mult Scler* 22, 1114–1124
- Lyons JA, San M, Happ MP, Cross AH (1999): B cells are critical to induction of experimental allergic encephalomyelitis by protein but not by a short encephalitogenic peptide. *Eur J Immunol* 29, 3432–3439
- Lyons J-A, Ramsbottom MJ, Cross AH (2002): Critical role of antigen-specific antibody in experimental autoimmune encephalomyelitis induced by recombinant myelin oligodendrocyte glycoprotein. *Eur J Immunol* 32, 1905–1913
- Mader S, Gredler V, Schanda K, Rostasy K, Dujmovic I, Pfaller K, Lutterotti A, Jarius S, Di Pauli F, Kuenz B, et al. (2011): Complement activating antibodies to myelin oligodendrocyte glycoprotein in neuromyelitis optica and related disorders. *J Neuroinflammation* 8, 184
- Mader S, Kümpfel T, Meinl E (2022): Pathomechanisms in demyelination and astrocytopathy: autoantibodies to AQP4, MOG, GFAP, GRP78 and beyond. *Curr Opin Neurol* 35, 427–435
- Mader S, Ho S, Wong HK, Baier S, Winklmeier S, Riemer C, Rübsamen H, Fernandez IM, Gerhards R, Du C, et al. (2023): Dissection of complement and Fc-receptor-mediated pathomechanisms of autoantibodies to myelin oligodendrocyte glycoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 120, e2300648120
- Marignier R, Nicolle A, Watrin C, Touret M, Cavagna S, Varrin-Doyer M, Cavillon G, Rogemond V, Confavreux C, Honnorat J, Giraudon P (2010): Oligodendrocytes are damaged by neuromyelitis optica immunoglobulin G via astrocyte injury. *Brain* 133, 2578–2591
- Mayer MC, Breithaupt C, Reindl M, Schanda K, Rostásy K, Berger T, Dale RC, Brilot F, Olsson T, Jenne D, et al. (2013): Distinction and temporal stability of conformational epitopes on myelin oligodendrocyte glycoprotein recognized by patients with different inflammatory central nervous system diseases. *J Immunol* 191, 3594–3604
- Menge T, Lalive PH, von Büdingen HC, Genain CP (2011): Conformational epitopes of myelin oligodendrocyte glycoprotein are targets of potentially pathogenic antibody responses in multiple sclerosis. *Journal of Neuroinflammation* 8, 161
- Mewes D, Kuchling J, Schindler P, Khalil AAA, Jarius S, Paul F, Chien C (2022): Diagnosis of Neuromyelitis Optica Spectrum Disorder (NMOSD) and MOG Antibody-Associated Disease (MOGAD). *Klin Monbl Augenheilkd* 239, 1315–1324

- Misu T, Höftberger R, Fujihara K, Wimmer I, Takai Y, Nishiyama S, Nakashima I, Konno H, Bradl M, Garzuly F, et al. (2013): Presence of six different lesion types suggests diverse mechanisms of tissue injury in neuromyelitis optica. *Acta Neuropathol* 125, 815–827
- Mizutani K, Atsuta J, Shibata T, Azuma E, Ito M, Sakurai M (1994): Consecutive cerebral MRI findings of acute relapsing disseminated encephalomyelitis. *Acta Paediatr Jpn* 36, 709–712
- Morrison BM, Lee Y, Rothstein JD (2013): Oligodendroglia metabolically support axons and maintain structural integrity. *Trends Cell Biol* 23
- Murphy J, Austin J (1985): Spontaneous infection or vaccination as cause of acute disseminated encephalomyelitis. *Neuroepidemiology* 4, 138–145
- O'Connor KC, McLaughlin KA, De Jager PL, Chitnis T, Bettelli E, Xu C, Robinson WH, Cherry SV, Bar-Or A, Banwell B, et al. (2007): Self-antigen tetramers discriminate between myelin autoantibodies to native or denatured protein. *Nat Med* 13, 211–217
- Orton S-M, Herrera BM, Yee IM, Valdar W, Ramagopalan SV, Sadovnick AD, Ebers GC, Canadian Collaborative Study Group (2006): Sex ratio of multiple sclerosis in Canada: a longitudinal study. *Lancet Neurol* 5, 932–936
- Parratt JDE, Prineas JW (2010): Neuromyelitis optica: a demyelinating disease characterized by acute destruction and regeneration of perivascular astrocytes. *Mult Scler* 16, 1156–1172
- Pedreño M, Sepúlveda M, Armangué T, Sabater L, Martínez-Hernandez E, Arrambide G, Blanco Y, Llufríu S, Martínez-Lapiscina EH, Mulero P, et al. (2019): Frequency and relevance of IgM, and IgA antibodies against MOG in MOG-IgG-associated disease. *Mult Scler Relat Disord* 28, 230–234
- Perea G, Navarrete M, Araque A (2009): Tripartite synapses: astrocytes process and control synaptic information. *Trends Neurosci* 32, 421–431
- Périer O, Grégoire A (1965): Electron microscopic features of multiple sclerosis lesions. *Brain* 88, 937–952
- Peschl P, Schanda K, Zeka B, Given K, Böhm D, Ruprecht K, Saiz A, Lutterotti A, Ros-tásy K, Höftberger R, et al. (2017a): Human antibodies against the myelin oligodendrocyte glycoprotein can cause complement-dependent demyelination. *J Neuroinflammation* 14, 208
- Peschl P, Bradl M, Höftberger R, Berger T, Reindl M (2017b): Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein: Deciphering a Target in Inflammatory Demyelinating Diseases. *Front Immunol* 8, 529
- Pfeifenbring S, Bunyan RF, Metz I, Röver C, Huppke P, Gärtner J, Lucchinetti CF, Brück W (2015): Extensive acute axonal damage in pediatric multiple sclerosis lesions. *Ann Neu-*

rol 77, 655–667

Pham-Dinh D, Della Gaspera B, Kerlero de Rosbo N, Dautigny A (1995): Structure of the human myelin/oligodendrocyte glycoprotein gene and multiple alternative spliced isoforms. *Genomics* 29, 345–352

Phuan P-W, Zhang H, Asavapanumas N, Leviten M, Rosenthal A, Tradtrantip L, Verkman AS (2013): C1q-targeted monoclonal antibody prevents complement-dependent cytotoxicity and neuropathology in in vitro and mouse models of neuromyelitis optica. *Acta Neuropathol* 125, 829–840

Pohl D, Hennemuth I, von Kries R, Hanefeld F (2007): Paediatric multiple sclerosis and acute disseminated encephalomyelitis in Germany: results of a nationwide survey. *Eur J Pediatr* 166, 405–412

Pohl D, Alper G, Van Haren K, Kornberg AJ, Lucchinetti CF, Tenenbaum S, Belman AL (2016): Acute disseminated encephalomyelitis: Updates on an inflammatory CNS syndrome. *Neurology* 87, S38-45

Poser CM (1994): The epidemiology of multiple sclerosis: a general overview. *Ann Neurol* 36 Suppl 2, S180-193

Prineas JW, Connell F (1978): The fine structure of chronically active multiple sclerosis plaques. *Neurology* 28, 68–75

Prineas JW, Barnard RO, Kwon EE, Sharer LR, Cho ES (1993): Multiple sclerosis: remyelination of nascent lesions. *Ann Neurol* 33, 137–151

Pringle NP, Richardson WD (1993): A singularity of PDGF alpha-receptor expression in the dorsoventral axis of the neural tube may define the origin of the oligodendrocyte lineage. *Development* 117, 525–533

Pringle NP, Mudhar HS, Collarini EJ, Richardson WD (1992): PDGF receptors in the rat CNS: during late neurogenesis, PDGF alpha-receptor expression appears to be restricted to glial cells of the oligodendrocyte lineage. *Development* 115, 535–551

Rash JE (2010): Molecular disruptions of the panglial syncytium block potassium siphoning and axonal saltatory conduction: pertinence to neuromyelitis optica and other demyelinating diseases of the central nervous system. *Neuroscience* 168, 982–1008

Ratelade J, Asavapanumas N, Ritchie AM, Wemlinger S, Bennett JL, Verkman AS (2013): Involvement of antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity in inflammatory demyelination in a mouse model of neuromyelitis optica. *Acta Neuropathol* 126, 699–709

Reindl M, Waters P (2019): Myelin oligodendrocyte glycoprotein antibodies in neurological disease. *Nat Rev Neurol* 15, 89–102

Reindl M, Linington C, Brehm U, Egg R, Dilitz E, Deisenhammer F, Poewe W, Berger T (1999): Antibodies against the myelin oligodendrocyte glycoprotein and the myelin basic

protein in multiple sclerosis and other neurological diseases: a comparative study. *Brain* 122 (Pt 11), 2047–2056

Reindl M, Jarius S, Rostasy K, Berger T (2017): Myelin oligodendrocyte glycoprotein antibodies: How clinically useful are they? *Current Opinion in Neurology* 30, 295–301

Reindl M, Schanda K, Woodhall M, Tea F, Ramanathan S, Sagen J, Fryer JP, Mills J, Tee-gen B, Mindorf S, et al. (2020): International multicenter examination of MOG antibody assays. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm* 7

Reinhardt K, Weiss S, Rosenbauer J, Gärtner J, von Kries R (2014): Multiple sclerosis in children and adolescents: incidence and clinical picture - new insights from the nationwide German surveillance (2009-2011). *Eur J Neurol* 21, 654–659

Renoux C, Vukusic S, Confavreux C (2008): The natural history of multiple sclerosis with childhood onset. *Clin Neurol Neurosurg* 110, 897–904

Ringelstein M, Ayzenberg I, Lindenblatt G, Fischer K, Gahlen A, Novi G, Hayward-Könnecke H, Schippling S, Rommer PS, Kornek B, et al. (2022): Interleukin-6 Receptor Blockade in Treatment-Refractory MOG-IgG-Associated Disease and Neuromyelitis Optica Spectrum Disorders. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm* 9, e1100

Ritchie JM, Rogart RB (1977): Density of sodium channels in mammalian myelinated nerve fibers and nature of the axonal membrane under the myelin sheath. *Proc Natl Acad Sci USA* 74, 211–215

Rostasy K, Reindl M (2013): Role of autoantibodies in acquired inflammatory demyelinating diseases of the central nervous system in children. *Neuropediatrics* 44, 297–301

Rutecki PA (1992): Neuronal excitability: voltage-dependent currents and synaptic transmission. *J Clin Neurophysiol* 9, 195–211

Sato DK, Callegaro D, Lana-Peixoto MA, Waters PJ, de Haidar Jorge FM, Takahashi T, Nakashima I, Apostolos-Pereira SL, Talim N, Simm RF, et al. (2014): Distinction between MOG antibody-positive and AQP4 antibody-positive NMO spectrum disorders. *Neurology* 82, 474–481

Schanda K, Peschl P, Lerch M, Seebacher B, Mindorf S, Ritter N, Probst M, Hegen H, Di Pauli F, Wendel E-M, et al. (2021): Differential Binding of Autoantibodies to MOG Isoforms in Inflammatory Demyelinating Diseases. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm* 8, e1027

Schwob VS, Clark HB, Agrawal D, Agrawal HC (1985): Electron microscopic immunocytochemical localization of myelin proteolipid protein and myelin basic protein to oligodendrocytes in rat brain during myelination. *J Neurochem* 45, 559–571

Scolding NJ, Frith S, Linington C, Morgan BP, Campbell AK, Compston DA (1989): Myelin-oligodendrocyte glycoprotein (MOG) is a surface marker of oligodendrocyte maturation.

tion. *J Neuroimmunol* 22, 169–176

Shimomura O, Johnson FH, Saiga Y (1962): Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*. *J Cell Comp Physiol* 59, 223–239

Shuman S (1994): Novel approach to molecular cloning and polynucleotide synthesis using vaccinia DNA topoisomerase. *J Biol Chem* 269, 32678–32684

Sofroniew MV, Vinters HV (2010): Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol* 119, 7–35

Spadaro M, Gerdes LA, Mayer MC, Ertl-Wagner B, Laurent S, Krumbholz M, Breithaupt C, Högen T, Straube A, Giese A, et al. (2015): Histopathology and clinical course of MOG-antibody-associated encephalomyelitis. *Ann Clin Transl Neurol* 2, 295–301

Spadaro M, Winklmeier S, Beltrán E, Macrini C, Höftberger R, Schuh E, Thaler FS, Gerdes LA, Laurent S, Gerhards R, et al. (2018): Pathogenicity of human antibodies against myelin oligodendrocyte glycoprotein. *Ann Neurol* 84, 315–328

Spatola M, Chuquisana O, Jung W, Lopez JA, Wendel E-M, Ramanathan S, Keller CW, Hahn T, Meindl E, Reindl M, et al. (2023): Humoral signatures of MOG-antibody-associated disease track with age and disease activity. *Cell Rep Med* 4, 100913

Stadelmann C, Timmler S, Barrantes-Freer A, Simons M (2019): Myelin in the Central Nervous System: Structure, Function, and Pathology. *Physiol Rev* 99, 1381–1431

Stefflerl A, Brehm U, Storch M, Lambrecht-Washington D, Bourquin C, Wonigeit K, Lassmann H, Linington C (1999): Myelin oligodendrocyte glycoprotein induces experimental autoimmune encephalomyelitis in the „resistant“ Brown Norway rat: disease susceptibility is determined by MHC and MHC-linked effects on the B cell response. *J Immunol* 163, 40–49

Stefflerl A, Schubart A, Storch M, Amini A, Mather I, Lassmann H, Linington C (2000): Butyrophilin, a milk protein, modulates the encephalitogenic T cell response to myelin oligodendrocyte glycoprotein in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 165, 2859–2865

Tan CT, Mao Z, Qiu W, Hu X, Wingerchuk DM, Weinshenker BG (2016): International consensus diagnostic criteria for neuromyelitis optica spectrum disorders. *Neurology* 86, 491–492

Tea F, Lopez JA, Ramanathan S, Merheb V, Lee FXZ, Zou A, Pilli D, Patrick E, van der Walt A, Monif M, et al. (2019): Characterization of the human myelin oligodendrocyte glycoprotein antibody response in demyelination. *Acta Neuropathol Commun* 7, 145

Tea F, Pilli D, Ramanathan S, Lopez JA, Merheb V, Lee FXZ, Zou A, Liyanage G, Bassett CB, Thomsen S, et al. (2020): Effects of the Positive Threshold and Data Analysis on Hu-

- man MOG Antibody Detection by Live Flow Cytometry. *Front Immunol* 11
- Tenembaum S, Chamoles N, Fejerman N (2002): Acute disseminated encephalomyelitis: a long-term follow-up study of 84 pediatric patients. *Neurology* 59, 1224–1231
- Tenembaum S, Yeh EA, Consortium (GJCF-ICC) TG-JFIC, Abboud H, Alroughani R, Altintas A, Amezcua L, Apiwattanakul M, Asgari N, Banwell B, et al. (2020): Pediatric NMO/D: A Review and Position Statement on Approach to Work-Up and Diagnosis. *Front Pediatr* 8
- Thompson AJ, Banwell BL, Barkhof F, Carroll WM, Coetzee T, Comi G, Correale J, Fazekas F, Filippi M, Freedman MS, et al. (2018): Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria. *Lancet Neurol* 17, 162–173
- Tomassy GS, Berger DR, Chen H-H, Kasthuri N, Hayworth KJ, Vercelli A, Seung HS, Lichtman JW, Arlotta P (2014): Distinct profiles of myelin distribution along single axons of pyramidal neurons in the neocortex. *Science* 344, 319–324
- Tradtrantip L, Yao X, Su T, Smith AJ, Verkman AS (2017): Bystander mechanism for complement-initiated early oligodendrocyte injury in neuromyelitis optica. *Acta Neuropathol* 134, 35–44
- Tsai ML, Hung KL (1996): Multiphasic disseminated encephalomyelitis mimicking multiple sclerosis. *Brain Dev* 18, 412–414
- Tsien RY (1998): The green fluorescent protein. *Annu Rev Biochem* 67, 509–544
- Verity AN, Campagnoni AT (1988): Regional expression of myelin protein genes in the developing mouse brain: in situ hybridization studies. *J Neurosci Res* 21, 238–248
- Virchow R (1854): Ueber das ausgebreitete Vorkommen einer dem Nervenmark analogen Substanz in den thierischen Geweben. *Archiv f pathol Anat* 6, 562–572
- Vlad B, Reichen I, Neidhart S, Hilty M, Lekaditi D, Heuer C, Eisele A, Ziegler M, Reindl M, Lutterotti A, et al. (2023): Basic CSF parameters and MRZ reaction help in differentiating MOG antibody-associated autoimmune disease versus multiple sclerosis. *Front Immunol* 14, 1237149
- von Büdingen H-C, Hauser SL, Fuhrmann A, Nabavi CB, Lee JI, Genain CP (2002): Molecular characterization of antibody specificities against myelin/oligodendrocyte glycoprotein in autoimmune demyelination. *Proc Natl Acad Sci USA* 99, 8207–8212
- von Büdingen H-C, Hauser SL, Ouallet J-C, Tanuma N, Menge T, Genain CP (2004): Frontline: Epitope recognition on the myelin/oligodendrocyte glycoprotein differentially influences disease phenotype and antibody effector functions in autoimmune demyelination. *Eur J Immunol* 34, 2072–2083
- Waters P, Woodhall M, O'Connor KC, Reindl M, Lang B, Sato DK, Juryńczyk M, Tackley G, Rocha J, Takahashi T, et al. (2015): MOG cell-based assay detects non-MS patients with



inflammatory neurologic disease. *Neurology(R) Neuroimmunology & Neuroinflammation* 2, e89

Waters P, Fadda G, Woodhall M, O'Mahony J, Brown RA, Castro DA, Longoni G, Irani SR, Sun B, Yeh EA, et al. (2020): Serial Anti-Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein Antibody Analyses and Outcomes in Children With Demyelinating Syndromes. *JAMA neurology* 77, 82–93

Waters PJ, Komorowski L, Woodhall M, Lederer S, Majed M, Fryer J, Mills J, Flanagan EP, Irani SR, Kunchok AC, et al. (2019): A multicenter comparison of MOG-IgG cell-based assays. *Neurology* 92, e1250–e1255

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. *Mult Scler* 28, 1553–1561

Wingerchuk DM, Lennon VA, Pittock SJ, Lucchinetti CF, Weinshenker BG (2006): Revised diagnostic criteria for neuromyelitis optica. *Neurology* 66, 1485–1489

Wingerchuk DM, Lennon VA, Lucchinetti CF, Pittock SJ, Weinshenker BG (2007): The spectrum of neuromyelitis optica. *Lancet Neurol* 6, 805–815

Wingerchuk DM, Banwell B, Bennett JL, Cabre P, Carroll W, Chitnis T, de Seze J, Fujihara K, Greenberg B, Jacob A, et al. (2015): International consensus diagnostic criteria for neuromyelitis optica spectrum disorders. *Neurology* 85, 177–189

Winklmeier S, Schlüter M, Spadaro M, Thaler FS, Vural A, Gerhards R, Macrini C, Mader S, Kurne A, Inan B, et al. (2019): Identification of circulating MOG-specific B cells in patients with MOG antibodies. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm* 6, 625

Wolswijk G (2002): Oligodendrocyte precursor cells in the demyelinated multiple sclerosis spinal cord. *Brain* 125, 338–349

Wong YYM, Hacohen Y, Armangue T, Wassmer E, Verhelst H, Hemingway C, van Pelt ED, Catsman-Berrevoets CE, Hintzen RQ, Deiva K, et al. (2018): Paediatric acute disseminated encephalomyelitis followed by optic neuritis: disease course, treatment response and outcome. *Eur J Neurol* 25, 782–786

Wrzos C, Winkler A, Metz I, Kayser DM, Thal DR, Wegner C, Brück W, Nessler S, Bennett JL, Stadelmann C (2014): Early loss of oligodendrocytes in human and experimental neuromyelitis optica lesions. *Acta Neuropathol* 127, 523–538

Yeh EA, Nakashima I (2019): Live-cell based assays are the gold standard for anti-MOG-Ab testing. *Neurology* 92, 501–502

Young NP, Weinshenker BG, Parisi JE, Scheithauer B, Giannini C, Roemer SF, Thomsen KM, Mandrekar JN, Erickson BJ, Lucchinetti CF (2010): Perivenous demyelination: associ-

ation with clinically defined acute disseminated encephalomyelitis and comparison with pathologically confirmed multiple sclerosis. *Brain* 133, 333–348

Yuan S, Xiong Y, Larsson SC (2021): An atlas on risk factors for multiple sclerosis: a Mendelian randomization study. *J Neurol* 268, 114–124

## Danksagung

Ganz besonderen Dank möchte ich Frau Prof. Dr. med. Christine Stadelmann-Nessler für die Möglichkeit aussprechen, dass ich meine Dissertation mit dem Thema „Entwicklung eines zellbasierten Nachweisverfahrens für Serum-anti-Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein-Antikörper“ in Ihrem Institut durchführen konnte.

Zudem möchte ich Frau Dr. rer. nat. Nadine Kramann ganz herzlichen Dank für die Einarbeitung in den Laborbereich und ihre Unterstützung und der guten Betreuung bei der Durchführung der Experimente (insbesondere bei den Versuchen zur Klonalität und Transfektion sowie in der Zellkultur) sowie bei Fragestellungen jedweder Hinsicht aussprechen.

Außerdem bedanke ich mich herzlich bei Herrn Dr. med. Stefan Nessler für die Zusammenarbeit bei der Untersuchung der Patient\*innenproben mit den transfizierten Zellen, der Auswertung der FACS-Analysen und der Auswertung der klinischen Daten der Patient\*innen.

Mein weiterer Dank gilt allen anderen, nicht genannten Mitarbeiter\*innen des Instituts für Neuropathologie der Universitätsmedizin Göttingen für die gute Zusammenarbeit und Unterstützung (v.a. Mareike Gloth, Olga Kowatsch, Katja Schulz) sowie das Beantworten meiner Fragen und eine freundliche Arbeitsatmosphäre.