

Aus der Neurologischen Universitätsklinik Tübingen
Abteilung Neurologie mit Schwerpunkt neurovaskuläre
Erkrankungen und Neuroonkologie

**Der Effekt von Natalizumab auf terminal differenzierte B-
Lymphozyten bei Patienten mit multipler Sklerose**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen**

vorgelegt von

Walz, Benjamin

2018

Dekan:

Professor. Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter:

Privatdozent Dr. F. Bischof

2. Berichterstatter:

Professor Dr. G. Pawelec

Tag der Disputation:

01.12.2017

I Inhaltsverzeichnis

I	Inhaltsverzeichnis.....	3
II	Abkürzungsverzeichnis.....	8
1.	Einleitung.....	10
1.1	Einleitung und Epidemiologie der multiplen Sklerose.....	10
1.2.	Ätiologie und Pathogenese.....	10
1.3.	Diagnostik und Verlaufsformen	13
1.4	Therapie der RRMS	16
1.4.1	Therapie des akuten Schubes.....	16
1.4.2	Dauertherapie	16
1.4.2.1	Basistherapie.....	16
1.4.2.2	Eskalationstherapie	17
1.4.3	Krankheitsspezifische Medikation	18
1.4.3.1	β Interferone.....	19
1.4.3.2	Glatirameracetat.....	19
1.4.3.3	Teriflunomid.....	20
1.4.3.4	Dimethylfumarat	20
1.4.3.5	Mitoxantron.....	21
1.4.3.6	Fingolimod.....	21
1.4.3.7	Natalizumab	21
1.4.3.8	Alemtuzumab	23
1.5	Einführung in das Immunsystem	23
1.5.1	Angeborenes Immunsystem.....	24
1.5.2	Grundlagen des erworbenes Immunsystems	25
1.5.2.1	T-Lymphozyten - Entwicklung und Differenzierung	25
1.5.2.2	B-Lymphozyten - Entwicklung und Aktivierung.....	26
1.5.2.3	B-Lymphozyten und multiple Sklerose	29

2. Fragestellung der Arbeit	30
3. Material und Methoden.....	31
3.1 Material.....	31
3.1.1 Tabelle verwendeter Lösungen	31
3.1.2 Tabelle verwendeter Chemikalien	32
3.1.3 Tabelle verwendeter Einwegmaterialien.....	32
3.1.4 Tabelle verwendeter Laborgeräte.....	34
3.1.5 Tabelle verwendeter Antikörper	35
3.1.6 Tabelle verwendeter Software.....	36
3.2 Patientengruppen und Kontrollgruppe	36
3.3 Bestimmung der Subpopulationen der B-Lymphozyten und Durchführung einer Serumanalyse	37
3.4 Immunphänotypisierung mit dem FACS-Gerät.....	37
3.4.1 Ficoll Gradient	37
3.4.2 Zellzahlbestimmung mit Hilfe der Neubauer Zählkammer	39
3.4.3 FACS-Färbung und Antikörperkonzentrationen	39
3.4.4 Immunphänotypisierung	41
3.4.5 FACS-Gerät und FACS-Messung	41
3.4.6 Auswertung der FACS-Daten.....	42
3.5 Bestimmung verschiedener Serumzytokine mittels ELISA-Technik	45
3.5.1 Durchführung der quantitativen Messungen mittels ELISA-Technik.....	46
3.5.2 Auswertung der ELISA-Messungen	48
3.6 Statistik.....	48
4. Ergebnisse	49
4.1 Vergleich der B-Zellpopulationen durch Immunphänotypisierung	52
4.2.1 Analyse des Anteils CD3-CD19+ der B-Lymphozyten an den PBMC ..	53
4.2.2 Es gibt keine statistisch signifikanten Unterschiede in den Anteilen der CD3-CD19+ B-Lymphozyten an den PBMC zwischen den verschiedenen Versuchsgruppen	54

4.3.1 Analyse des Anteils der CD3-CD19+CD20-CD27- naiven B-Lymphozyten an den CD3-CD19+ gesamten B-Lymphozyten	55
4.3.2 Der Anteil der CD3-CD19+CD20+CD27- naiven B-Lymphozyten an den.. gesamten B-Lymphozyten ist bei Natalizumabpatienten gegenüber gesunden Kontrollen statistisch signifikant verringert.....	56
4.4.1 Analyse des Anteils der CD3-CD19+CD20+CD27+ Gedächtniszellen an den CD3-CD19+ gesamten B-Lymphozyten	57
4.4.2 Der Anteil der CD3-CD19+CD20+CD27+ memory B-Lymphozyten an..... den gesamten B-Lymphozyten ist bei Natalizumabpatienten gegenüber gesunden Kontrollen statistisch signifikant erhöht.....	59
4.5.1 Vergleich des Anteils der CD3-CD19+CD20-CD27++ Plasmablasten an.. den gesamten CD3-CD19+ B-Lymphozyten zwischen den verschiedenen Versuchsgruppen	60
4.5.2 Es gibt keine statistisch signifikanten Unterschiede in den Anteilen der CD3-CD19+CD20-CD27++ Plasmablasten an den gesamten B-Lymphozyten zwischen den verschiedenen Versuchsgruppen	62
4.6 Serumanalysen bei MS Patienten und der gesunden Kontrollgruppe	64
4.6.1 Die Serumkonzentration von IgG ist bei MS Patienten mit Natalizumab... therapie gegenüber gesunden Kontrollen statistisch signifikant verringert	64
4.6.2 Es gibt keine statistisch signifikanten Unterschiede in den Serumkonzentrationen von IgA zwischen den verschiedenen Patientengruppen	66
4.6.3.1 Die Serumkonzentration von IgM ist bei MS Patienten mit Natalizumabtherapie gegenüber MS Patienten ohne krankheitsspezifische Therapie statistisch signifikant verringert	67
4.6.3.2 Die Serumkonzentration von IgM ist bei MS Patienten ohne krankheitsspezifische Therapie gegenüber gesunden Kontrollen - statistisch signifikant erhöht	67
4.6.4 Es gibt keine statistisch signifikanten Unterschiede in den Serumkonzentrationen von IgM zwischen den verschiedenen Patientengruppen	67

trationen von BAFF zwischen den verschiedenen Patientengruppen ..	68
4.6.5 Es gibt keine statistisch signifikanten Unterschiede in den Serumkonzentrationen von Il1 β zwischen den verschiedenen Patientengruppen.....	69
4.6.6 Die Serumkonzentration von Il21 ist bei MS Patienten mit Natalizumabtherapie gegenüber der gesunden Kontrollgruppe statistisch signifikant verringert	70
4.6.7 Die Serumkonzentration von Il35 ist bei MS Patienten mit Natalizumabtherapie gegenüber MS Patienten ohne krankheitsspezifische Therapie statistisch signifikant verringert.....	72
4.6.8 Die Serumkonzentration von TNF β ist bei MS Patienten mit Natalizumabtherapie gegenüber der gesunden Kontrollgruppe statistisch signifikant verringert	73
.....	
5. Diskussion	75
5.1 Unterschiede in der Frequenz der CD3-CD19+ B-Lymphozyten bei MS... Erkrankung	75
5.2 Unterschied in der Frequenz der CD3-CD19+ B-Lymphozyten bei Natalizumabtherapie	76
5.3 Unterschiede in der Frequenz der CD3-CD19+CD20+CD27- naiven B-Lymphozyten bei MS	77
5.4 Unterschiede in der Frequenz der CD3-CD19+CD20+CD27- naiven B-Lymphozyten unter Natalizumab	78
5.5 Unterschiede in der Frequenz der CD3-CD19+CD20+CD27+ memory B-Lymphozyten bei MS Erkrankung.....	79
5.6 Unterschiede in der Frequenz der CD3-CD19+CD20+CD27+ memory B-Lymphozyten unter Natalizumabtherapie	80
5.7 Unterschied in der Frequenz der CD3-CD19+CD20-CD27++ terminal differenzierten B- Lymphozyten bei MS.....	81
5.8 Unterschied in der Frequenz der CD3-CD19+CD20-CD27++ terminal differenzierten B- Lymphozyten bei Natalizumabtherapie	82

5.9 Unterschiede in den Serumkonzentrationen von IgG, IgA und IgM.....	83
5.10 Unterschiede in den Serumkonzentrationen von BAFF.....	85
5.11 Unterschiede in den Serumkonzentrationen von Il1 β	86
5.12 Unterschiede in den Serumkonzentrationen von Il21.....	88
5.13 Unterschiede in den Serumkonzentrationen von Il35.....	89
5.14 Unterschiede in den Serumkonzentrationen von TNF β	90
6. Zusammenfassung und Weiterentwicklung des Projekts	92
III Tabellenverzeichnis.....	94
IV Abbildungsverzeichnis	95
V Literaturverzeichnis.....	99
VI Erklärung zum Eigenanteil	110
VII Danksagung.....	111
VIII Lebenslauf	112

Abkürzungsverzeichnis

ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
ADCC	Antibody dependent cellular cytotoxicity
APC/ APZ	antigen presenting cell/ Antigen präsentierende Zelle
APRIL	A proliferation inducing ligand
ATP	Adenosintriphosphat
BAFF	B-cell activating factor of the TNF family
bFGF	Basic fibroblast growth factor
BHS	Blut-Hirn-Schranke
CD	Cluster of differentiation
DMD	Disease modifying drug
DMF	Dimethylfumarat
DMT	Disease modifying treatment
DNA	Desoxyribonucleic acid
EBV	Ebstein Bar Virus
EDSS	Expanded disability status scale
ELISA	Enzyme linked immuno absorbend assay
FACS	Fluorescence activated cell scanning
Fc	Fragment crystallizable
FasL	Fas Ligand
FOXP3	Factor forhead box P3
FSC	Forward scatter
GA	Glatiramer acetat
GDNF	Glial cell-line derived neurotropic factor
HHV6	Humanes Herpesvirus 6
HLA	Humanes Leukozytenantigen
IDZ	Interdigitierende dendritische Zellen
Ig	Immunglobulin
IL / II	Interleukin

INF / Inf	Interferon
JCV	John Cunningham Virus
LFA1	lymphocyte function associated antigen 1
LT	Lymphotoxin
MBP	Myelin basisches Protein
MOG	Myelin oligodendrozytisches Glykoprotein
MHC	Major Histocompatibility Complex
MRT	Magnetresonanztomografie
MS	Multiple Sklerose
NKZ	Natural Killer Zellen
NOD1	Nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 1
Nrf2	Nuclear factor related factor 2
NTZ	Natalizumab
PAMP	Pathogen activated molecular pattern
PBMC	Peripheral blood mononuclear cells
PML	Progressive multifokale Leukenzephalopathie
PPMS	Primär progrediente multiple Sklerose
PRR	Pathogen recognition receptor
RRMS	Relapsing remitting multiple sclerosis
SSC	Sideward scatter
SLE	Systemischer Lupus erythematodes
SPMS	Sekundär progrediente multiple Sklerose
TGF	Tumor growth factor
TMB	Tetramethylbenzidin
TLR	Toll-like Rezeptor
VCAM	Vascular cell adhesion protein
VLA	Very late antigen
VZV	Varizella Zoster Virus
ZNS	Zentrales Nervensystem

1. Einleitung

1.1 Einführung und Epidemiologie der multiplen Sklerose

Bei der multiplen Sklerose (Enzephalomyelitis disseminata) handelt es sich um eine chronisch-entzündliche Autoimmunerkrankung des zentralen Nervensystems, welche durch eine progressive Demyelinisierung mit konsekutiver Schädigung der Axone von Gehirn und Rückenmark gekennzeichnet ist [1]. Typische klinische Manifestationen sind neben Sehstörungen insbesondere Lähmungserscheinungen, Empfindungs- oder Koordinationsstörungen [1]; bei ausgeprägten oder langjährigen Verläufen der Erkrankung können schwere Behinderung oder Tod die Folge sein [2]. Die Prävalenz beträgt in Europa 83:100.000 Personen bei einer jährlichen Inzidenz von 4.3:100.000 [3], deutschlandweit sind schätzungsweise mehr als 100.000 Menschen betroffen [4]. In nördlichen Teilen Europas oder Nordamerikas ist die multiple Sklerose häufiger vertreten als in äquatornahen Ländern [5, 6], auch zeigen Menschen europäischer Abstammung selbst umweltunabhängig erhöhte Erkrankungs-raten [7, 8]. Frauen sind in etwa doppelt so häufig betroffen wie Männer [9, 10], wobei das vorwiegende Erkrankungsalter zwischen 20 und 50 Jahren mit einer Häufung um das 30. Lebensjahr liegt [9]. Die durchschnittliche Lebenserwartung wird durch MS um etwa 10-15 Jahre reduziert [11].

1.2 Ätiologie und Pathogenese

Die Ätiologie der multiplen Sklerose kann intensiver Forschungsarbeit zum Trotz bislang als nur ansatzweise geklärt gelten. Neben genetischen Faktoren wie Mutationen des HLA II Komplexes, unter anderem speziellen Polymorphismen von HLA DR15 Dw2 und –DQw6 [12], wird die Erkrankung mit verschiedenen Virusinfektionen wie EBV oder HHV6 in Verbindung gebracht [13]. Auch spricht das gehäufte Auftreten in äquatorfernen Ländern für einen Zusammenhang mit der Sonnenexpo-

sition, wobei insbesondere Vitamin D abhängige Transkriptionsfaktoren im Verdacht stehen, das Krankheitsrisiko zu verringern [9, 14]. Rauchen hingegen soll die Krankheitswahrscheinlichkeit um etwa das 1,5 - 2 fache steigern [15]. Während aufgrund des beschriebenen genetischen Aspektes eine familiäre Häufung der MS eindeutig gezeigt werden konnte [16], ist eine Assoziation von multipler Sklerose mit anderen Autoimmunerkrankungen wie Hashimoto Thyreoditis oder Psoriasis bei erstgradigen Verwandten umstritten [17, 18] .

Zentrale Rolle in der Pathogenese der MS spielt die Migration von Zellen des Immunsystems, insbesondere aktivierten T-Lymphozyten, aus der Blutbahn über die Bluthirnschranke in das zentrale Nervensystem [19]. Die Zellmigration durch die Blutgefäßwände ins periphere Gewebe stellt einen physiologisch streng regulierten Vorgang dar und wird als Diapedese bezeichnet [20]. Dies kann sowohl para- als auch transzellulär durch die Endothelzellen der Blutgefäße geschehen [21]. Initial vermittelt wird die Diapedese der Immunzellen durch transiente Bindungen von endothelialen P- und E-Selektinen an deren leukozytäre Selektin-Liganden, wodurch die Leukozyten abgebremst und zum Rollen gebracht werden [20]. Die Zyto- und Chemokin-abhängige Aktivierung der verlangsamten Leukozyten sorgt für eine Verstärkte Bindung von speziellen Adhäsionsproteinen auf der Leukozytenoberfläche, den Integrinen (u.a. lymphocyte function-associated antigen = LFA1), an Rezeptoren des Gefäßendothels (z.B. VCAM-1 = vascular cell adhesion molecule), wodurch der Leukozyt zum Stillstand kommt [20, 22]. Durch simultane Wirkung von Chemokinen auf die Immunzelle wird eine Alteration ihres Zytoskeletts verursacht; diese Formänderung begünstigt die Transmigration der Zelle in periphere Kompartimente [20]. Im Anschluss an die Extravasion wird die Immunzelle durch Chemokine wie CXCL8 und CCL2 an den Entzündungsort geleitet [23].

Um Funktion von Gehirn und Rückenmark vor Einflüssen des vaskulären Kompartiments selektiv abzuschirmen, besitzt das ZNS eine hochspezialisierte, mechanisch und metabolisch wirksame Diffusionsbarriere, die als Blut-Hirn-Schranke (BHS) bezeichnet wird [24]. Ihr morphologisches Korrelat bilden die zentralnervösen Blutgefäßwände, deren Endothelzellen durch dichte Interzellularproteinkomplexe, die Tight junctions verbunden sind [24]. Die für das ZNS charakteristische niedrige Permeabilität der Tight junctions (und damit geringe Diffusion v.a. hydrophiler Moleküle [25]) ist Folge biochemischer Interaktion des Endothels mit vaskulären Perizyten sowie bei nichtmeningealen, kapillären ZNS Gefäßen auch perivaskulärer Astrozytenfortsätzen [24, 26]. Letztere unterstützen die endothelabhängige BHS Integrität durch Sezernierung von Wachstums- und Differenzierungsfaktoren wie TGF- β , glial-derived neurotrophic factor (GDNF) und basic fibroblast growth factor (bFGF) [24, 27] und können durch Expressierung des proapoptotischen CD95 (FasL) als immunologische Barriere gegen die Leukodiapedese fungieren [28]. Zudem besitzen die Endothelzellen der BHS eine Vielzahl aktiver ATP-binding-cassette Transporter, um schädliche endogene Metabolite und Xenobiotika aus dem zentralnervösen Milieu hinaus zu befördern [24].

Es wird vermutet, dass bei MS eine insuffiziente oder (vermutlich primär entzündlich) geschädigte BHS eine leukozytäre Diapedese ins ZNS ermöglicht [29]. Dort kommt es zu einer T-Zell vermittelten, autoimmunen Entzündungsreaktion, welche gegen Bestandteile der axonalen Markscheiden (Myelin-basisches Protein = MBP und Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein = MOG) gerichtet ist [30]. Es wird angenommen, dass die Präformierung der T-Lymphozyten in der Peripherie gegen Myelinantigene über molekulare Mimikry viraler Epitope oder bisher unbekanntes Superantigene geschieht [31]. Den autoimmunen T-Zellen (v.a. T1-Helferzellen) wird dabei ihr spezifisches Autoantigen durch MHC II Moleküle auf der Oberfläche von Antigen präsentierenden Zellen innerhalb ZNS (z.B. Mikroglia oder dendritische Zellen) präsentiert [32]. Durch proinflammatorische T_H1 Zytokine wie INF γ kommt es

zur Chemotaxis von Makrophagen, dendritischen Zellen und B-Lymphozyten ins ZNS, was die Entzündungsreaktion noch weiter verstärkt [29]. Im Verlauf werden dabei nicht nur die Myelinscheiden zerstört, sondern auch die Axone selbst [33]. Reaktiv bilden sich narbige Plaques aus Astrozyten (reaktive Gliose), wodurch die Remyelinisierung betroffener Areale unvollständig bleibt [34]. In der Frühphase der Erkrankung ist eine unilaterale Visusverschlechterung mit Orbitaschmerzen im Rahmen einer Retrobulbärneuritis häufig, das weitere klinische Bild ist vom Befallsmuster der verschiedenen Areale der weißen Substanz abhängig [1, 35]. Dabei zeigen sich bei Befall des Großhirns eine allgemeine kognitive Leistungsminderung sowie Beeinträchtigungen der Exekutivfunktionen, während cerebelläre und im Hirnstamm lokalisierte Läsionen oft mit klinisch klar umschriebenen Erscheinungen wie Störungen der Okulomotorik oder beeinträchtigter Koordination bulbärer Muskulatur assoziiert sind [1]. Bei Beteiligung des Rückenmarks werden periphere motorische und sensible Ausfälle beobachtet [1]. Zudem sind eine generelle Fatigue und depressive Verstimmungen möglich [36].

1.3 Diagnostik und Verlaufsformen

Aufschluss zur Diagnostik einer MS können neben dem neurologischen Untersuchungsbefund die Beurteilung des Liquor cerebrospinalis sowie apparative und bildgebende Verfahren geben. Dabei haben sich als Goldstandard die sogenannten McDonald Kriterien etabliert, welche die Rolle der Bildgebung des ZNS mittels MRT weiter in den Vordergrund rücken [37, 38]. Für die Sicherung der Diagnose wird sowohl räumliche als auch zeitliche Dissemination von klinisch oder radiologisch evidenten Läsionen vorausgesetzt [38]. Das bedeutet, dass die Diagnose dann als gesichert gelten kann, wenn unterschiedlich lokalisierte Läsionen im ZNS an verschiedenen Zeitpunkten nachgewiesen werden können [38]. Die Untersuchung des Liquors auf oligoklonale Antikörperbanden ist zentraler Bestandteil der Diagnostik von MS [38, 39].

Schübe	Klinische Manifestationen	Weitere erforderliche Diagnostik
2	2	Keine, klinische Evidenz ausreichend
2	1	Räumliche Dissemination, gezeigt durch: <ul style="list-style-type: none"> • ≥ 1 T2 Läsion in mindestens 2 von 4 typischen MS-Regionen des ZNS (periventrikulär, juxtakortical, infratentoriell oder spinal) <p>Oder</p> <ul style="list-style-type: none"> • Abwarten einer weiteren klinischen Manifestation, die auf eine andere ZNS Läsion hinweist
1	2	Zeitliche Dissemination, gezeigt durch: <ul style="list-style-type: none"> • Gleichzeitiges Vorliegen asymptomatischer Gadolinium-anreichernder und -nichtanreichernder Läsionen zu jedem Zeitpunkt <p>Oder</p> <ul style="list-style-type: none"> • Eine neue T2 und/oder Gadolinium-anreichernde Läsion(en) im Folge MRT, ungeachtet ihrer zeitlichen Referenz zur vorangegangenen Bildgebung; <p>Oder</p> <ul style="list-style-type: none"> • Zweite klinische Manifestation
1	1	Räumliche Dissemination (siehe oben) Und Zeitliche Dissemination (siehe oben)

Neurologische Progression mit Verdacht auf PPMS		Mindestens 1 Jahr Progression plus 2 der folgenden Kriterien <ul style="list-style-type: none"> • ≥ 1 T2 Läsion in mindestens 2 von 4 typischen MS-Regionen des ZNS (periventrikulär, juxtakortical oder infratentoriell) • ≥ 2 spinale Läsionen • Nachweis einer intrathekalen IgG Synthese
---	--	---

Tabelle 1: Diagnosekriterien der MS nach McDonald, 2010 [38]

Die multiple Sklerose kann drei hauptsächliche Verlaufsformen annehmen. Am häufigsten (85%) ist die sogenannte relapsing remitting multiple sclerosis (RRMS), die auch als schubförmige MS bezeichnet wird [38]. Sie zeichnet sich durch meist subakut einsetzende, mehrere Tage bis Wochen bestehende klinische Symptomatik (Schub) und weitgehende Symptomarmut zwischen den Schüben aus [38]. Des Weiteren gibt es die primär progrediente MS (PP-MS), charakterisiert durch schubfreie kontinuierliche Verschlechterung der Klinik ohne Remission [38], sowie die sekundär progrediente (SP-MS) mit fortschreitender neurologischer Grundsymptomatik zwischen den Schüben [40].

Weniger als die Hälfte aller RRMS Verläufe münden nach 10 Jahren in eine SP-MS [40]. Die mittlere Lebenserwartung wird durch MS um 10 bis 15 Jahre reduziert [11]. In Kohortenstudien wurde die krankheitsassoziierte Letalität der MS mit ca.50% beziffert, jedoch hat sich die Überlebensrate in den letzten 20 Jahren durch neue therapeutische Möglichkeiten merklich verbessert [2]. Etwa die Hälfte der Patienten ist 30 Jahre nach der Diagnosestellung noch am Leben [11]. Als prognostisch ungünstige Faktoren werden ein erhöhtes Erkrankungsalter, eine frühzeitige cerebelläre oder motorische Beteiligung sowie hochfrequente Schübe mit Residuen angesehen [41]. Zur Klassifizierung des Beeinträchtigungsgrades durch die multiple Sklerose

wird der EDSS (Expanded Disability Status Scale) als numerischer Parameter (Skala 0-10) herangezogen [42].

1.4 Therapie der RRMS

1.4.1 Therapie des akuten Schubes

Als Schub wird bei der multiplen Sklerose eine subjektive oder objektivierte klinische Manifestation beschrieben, die mindestens 24 Stunden anhält, im Abstand von mehr als 30 Tagen zu vorangegangenen Schüben auftritt sowie nicht Temperatur- (Uthoffphänomen) oder Infekt-assoziiert ist [43]. Die Behandlung ist ab mittelschwerer schubassoziierter Verschlechterung der klinischen Symptome sicher indiziert [44]. Typischerweise erfolgt die Schubtherapie durch intravenöse Gabe von hochdosierten Glukokortikoiden (Methylprednisolon) über mehrere Tage [44]; bei unzureichendem Ansprechen kann nach 2-3 Wochen die Gabe von ACTH erfolgen [44]. Als Nebenwirkungen stehen metabolische Effekte wie Hyperglykämie und psychiatrische Beeinträchtigungen wie Stimmungsschwankungen im Vordergrund [45]. Bei weiterer Symptompersistenz kann eine Plasmapherese erwogen werden [44, 45]

1.4.2 Dauertherapie

Von der akuten Schubtherapie der MS muss die kontinuierliche Dauertherapie abgegrenzt werden, mit der die Krankheitsaktivität möglichst vollständig unterdrückt und das Auftreten neuer Krankheitsschübe und eine Zunahme der Symptome verhindert werden soll. Im Folgenden sollen die gängigen therapeutischen Strategien bei RRMS näher erläutert und die wichtigsten Medikamentengruppen vorgestellt werden.

1.4.2.1 Basistherapie

Für die dauerhafte Behandlung der RRMS werden als therapeutische Strategien die Basistherapie für milde Verlaufsformen und die Eskalationstherapie für eine (hoch-) aktive MS unterschieden [43]. Als bevorzugte Pharmaka unter den Erstlinien-DMDs

(=Disease modifying drugs) werden subkutan gegebenen Medikamente Beta Interferon oder Glatirameracetat oder die oralen Medikamente Teriflunomid und Dimethylfumarat verwendet [46].

1.4.2.2 Eskalationstherapie

Die Eskalationstherapie ist bei Patienten indiziert, die unter Basismedikation im „vorhergehenden Jahr mindestens einen Schub hatten und mindestens 9 T2-hyperintense Läsionen oder mindestens eine Gadolinium anreichernde Läsion im kraniellen MRT-Scan aufweisen“ [43] ; zu diesen Medikamente zählen die Immunmodulatoren Natalizumab, Alemtuzumab und Fingolimod [43]. Als zweite Wahl können die Immunsuppressiva Cyclophosphamid oder Mitoxantron zum Einsatz kommen [43].

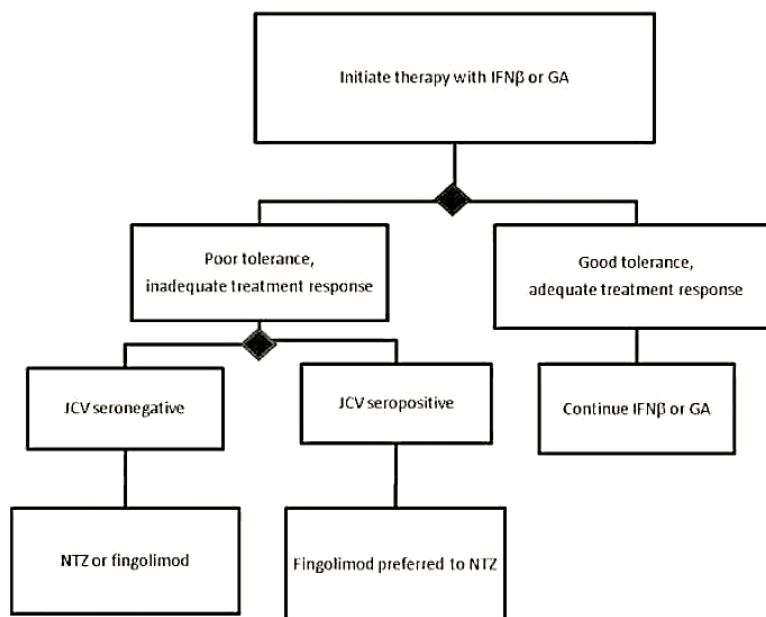


Abbildung 1: Therapieschema bei RRMS [47] Einleitung einer Basistherapie mit den DMDs Interferon β und Glatirameracetat; bei unzureichendem Ansprechen oder Tolerierung erfolgt ein Wechsel zur Eskalationstherapie mit Natalizumab oder Fingolimod.

Der Einsatz von Natalizumab oder Fingolimod ist bei einer schweren RRMS („2 oder mehr Schübe mit Behinderungsprogression im Jahr zuvor und in der kranialen MRT eine oder mehrere Gadolinium anreichernde Läsionen oder eine signifikante Erhöhung der T2-Läsionen im Vergleich zu einer kürzlich durchgeführten, 6–12 Monate alten MRT-Aufnahme“ [43]) bereits als Erstlinienmedikation möglich [43]. Bei Patienten, die mit Natalizumab behandelt werden, besteht bei einer Behandlungsdauer von über 24 Monaten ein erhöhtes Risiko, eine schwere opportunistische Infektion des ZNS, die Progressive Multifokale Leukenzephalopathie (PML) zu entwickeln [48]. Diese Infektion wird durch JCV ausgelöst [49]. Eine Ausweichtherapie für fulminante Krankheitsverläufe der MS kann gegebenenfalls die Verabreichung von Cyclophosphamid darstellen [43].

1.4.3 Krankheitsspezifische Medikation

In den vergangenen Jahren haben innovative therapeutische Interventionsmöglichkeiten die Behandlung der RRMS revolutioniert. Parallel zum besseren Verständnis der pathophysiologischen Prozesse haben sich neue medikamentöse Strategien etabliert, die als Immunmodulatoren in der Lage sind, gezielt Schritte der leukozytären Migration oder der autoinflammatorischen Kaskade zu beeinflussen. Zusammen mit klassischen Immunsuppressiva, die als direkte Inhibitoren der Proliferation von Immunzellen fungieren, bilden die Immunmodulatoren die maßgebliche Komponente des sogenannten Disease modifying treatment (DMT). Ziele des DMT sind eine langsamere Progression der Läsionen im ZNS sowie ein selteneres Auftreten von Schüben. Der Beginn der Therapie wird bei Vorliegen einer RRMS mit mindestens einem dokumentierten Schub innerhalb der letzten zwei Jahre empfohlen [46]. Allerdings gilt es anzumerken, dass die medikamentöse Intervention weder eine ursächliche Heilung der MS darstellt, noch ist ihre Anwendung aufgrund einer Anzahl an non-respondern und möglicher schwerwiegender Nebenwirkungen gänzlich unproblematisch.

1.4.3.1 β -Interferone

Bei Beta Interferonen handelt es sich um natürlicherweise im menschlichen Organismus vorkommende Zytokine [50]. Rekombinante Varianten von $\text{INF}\beta$ gehören zu den ältesten pharmakologisch verwendeten Immunmodulatoren und fungieren standardmäßig als Erstlinienmedikament zur Dauerbehandlung einer RRMS [50]. Ihre Wirkung entfaltet sich am $\text{INF}\beta$ Rezeptor, dessen Aktivierung die Freisetzung anti-entzündlicher Botenstoffe wie IL10 fördert [51]. Die Applikation von $\text{INF}\beta$ kann sowohl subkutan alle zwei Tage oder einmal wöchentlich intramuskulär erfolgen [52]. Für $\text{INF}\beta 1\text{b}$ wurde bei subkutaner Injektion jeweils eine Reduktion der Schübe um 34 % und ein reduziertes Auftreten neuer Läsionen nachgewiesen [53]. Auch eine zweiwöchentliche subkutane Anwendung von pegylierten $\text{INF}\beta$ als Retardpräparat ist möglich [54]. Zu den Nebenwirkungen von $\text{INF}\beta$ zählen insbesondere grippear-tige Nebenwirkungen wie Kopf- und Gliederschmerzen, depressive Verstimmungen und Transaminasenanstiege [55, 56]. Auch können neutralisierende Antikörper gegen $\text{INF}\beta$ gebildet werden, die den therapeutischen Effekt verringern [57].

1.4.3.2 Glatirameracetat

Glatirameracetat ist ein Polypeptidgemisch, welches strukturelle Ähnlichkeit mit dem Myelinbasischen Protein (MBP) besitzt [58]. Es bindet kompetitiv zum MBP an den MHC Komplex von Antigen präsentierenden Zellen (APC) und verhindert so die APC abhängige Aktivierung von T-Lymphozyten im ZNS [58]. Darüber hinaus wird das Verhältnis von TH1 und TH2 CD4^+ T-Zellen zu den TH2 Lymphozyten hin verschoben, welche durch Sezernierung antiinflammatorischer Zytokine wie IL10 und $\text{TGF}\beta$ der autoimmunen Kaskade entgegenwirken [59]. Der therapeutische Nutzen von Glatirameracetat umfasst eine verminderte Schubrate und eine signifikante Reduktion T2 aktiver Läsionen im MRT [60].

1.4.3.3 Teriflunomid

Teriflunomid wirkt als aktiver Metabolit von Leflunomid als Inhibitor der Dihydroorotatdehydrogenase und damit des letzten Schrittes der de novo Pyrimidinsynthese [61, 62]. Damit wird die Reproduktion von Immunzellen eingeschränkt [61]. Zusätzlich hindert der Wirkstoff die Interaktion von T-Lymphozyten mit Antigen-präsentierenden Zellen [62]. Ein positiver Effekt von Teriflunomid wurde hauptsächlich auf die Schubfrequenz beschrieben, wohingegen Daten zur Reduktion der Behinderungsprogression bei zum Teil eingeschränkter Aussagekraft durch hohe Drop-Out Raten widersprüchlich bleiben [63, 64]. Typische Nebenwirkungen umfassen Übelkeit, Diarrhoe und Transaminasenerhöhung, sowie ein möglicherweise erhöhtes teratogenes Risiko. [64, 65]

1.4.3.4 Dimethylfumarat

Bei Dimethylfumarat handelt es sich um einen immunmodulatorischen Fumarsäureester, der vermutlich über Aktivierung des Nuclear Factor related Factor 2 (Nrf 2) Transkriptionsfaktors wirkt [66]. Dieser stellt einen wichtigen Regulator antioxidativer und zytoprotektiver sowie entzündungshemmender Prozesse dar [66]. Neuere Forschungsergebnisse legen zudem nahe, dass durch Inhibition von TLR abhängiger M1- und K63-Polyubiquitin Kettenbildung innerhalb NFκB Pathways die Synthese proinflammatorischer Zytokine gehemmt wird [67]. In klinischen Studien wurde sowohl ein positiver Effekt auf die Schubrate als auch auf die Behinderungsprogression nachgewiesen [68]. Als ernstzunehmende Komplikation ist das Auftreten einer PML unter DMF Therapie beschrieben worden [69].

1.4.3.5 Mitoxantron

Das potente Zytostatikum Mitoxantron hemmt durch Interkalation mit der DNA und Moduierung der Topoisomerase II die Proliferation der Lymphozyten und Makrophagen [70]. Es ist sowohl für die RRMS als auch für die sekundär progrediente Form der MS zugelassen [71]. Aufgrund kardiotoxischer Nebenwirkungen besteht für Mitoxantron eine maximale kumulative Lebenszeitdosis [72].

1.4.3.6 Fingolimod

Bei Fingolimod (FTY720) handelt es sich um einen zur Gruppe der Sphingolipide gehörigen Immunmodulator [73]. Der Wirkstoff wird nach oraler Aufnahme durch die Sphingosinkinase-2 zum pharmakologisch aktiven Metaboliten FTY720-P phosphoryliert [73]. Das FTY720-P agonisiert den G-Protein gekoppelten Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptor (S1P) der B- und T- Lymphozyten [73]. Dadurch kommt es zu einer Internalisierung des Rezeptors in die Zelle und dessen anschließenden Abbau [73]. Durch diese Verringerung der Rezeptordichte wird die physiologische Sphingolipid-vermittelte Wanderung der Lymphozyten aus den Lymphknoten in die Zirkulation verringert [73]. In klinischen Studien wurde Fingolimod ein positiver Effekt auf die Krankheitsaktivität bei MS beschieden, allerdings nicht auf die Behinderungsprogression [74]. Zu den häufigsten Nebenwirkungen von Fingolimod zählen eine erhöhte Inzidenz von VZV Infektionen, atrioventrikuläre Überleitungsstörungen und Flüssigkeitseinstrom in die Netzhaut (Makulaödeme) [75, 76].

1.4.3.7 Natalizumab

Natalizumab ist als hocheffektiver Immunmodulator zentrales Element der Eskalationstherapie der RRMS. Der humanisierte monoklonale Antikörper inhibitiert die $\alpha 4$ Untereinheit des Zelladhäsionsmoleküls $\alpha 4\beta 1$ -Integrin auf der Lymphozytenoberflä

che und hemmt dadurch die $\alpha 4\beta 1$ -Integrin/V-CAM1-abhängige Diapedese von vorwiegend T- Lymphozyten durch die Blut-Hirn-Schranke (BHS) ins ZNS [77]. Somit kann verhindert werden, dass proinflammatorisch wirkende Zellen das Kompartiment ihrer autoimmunen Wirkung überhaupt erst erreichen [77]. Das Medikament ist als monatliche, intravenöse Monotherapie bei hochaktiver MS oder mangelhaftem Ansprechen nach Erstlinientherapie zugelassen [78]. Die placebokontrollierte Phase 3 Zulassungsstudie („AFFIRM“) ergab eine Reduktion der Schubfrequenz um 68% und eine Risikoreduktion der Behinderungsprogression um 42% [79]; inzwischen konnte die ausgezeichnete Wirkung von Natalizumab bei RRMS in mehreren Anwendungsbeobachtungen bestätigt werden [80]. Als gefürchtete Komplikation ist bei Natalizumabtherapie die progressive multifokalen Leukenzephalopathie (PML) beobachtet worden [81]. Dabei handelt es sich um eine akut-fortschreitende, durch JC Virus ausgelöste Demyelinisierung der weißen Hirnsubstanz, welche lokalisationsabhängig über massive motorische und kognitive Einbußen innerhalb kurzen Zeiträumen zum Tode führen kann [49]. Das Risiko einer PML unter Natalizumab steigt sowohl mit der Dauer der Immunotherapie und durch Vorbehandlung mit anderen Immunsuppressiva [82]. Bei dem JC Virus handelt es sich um einen den Polyomaviren zugehörigen DNA-Virus, dessen Genom nach ausgeheilter, meist asymptomatischer Erstinfektion in der Niere oder den Zellen des lymphatischen Systems persistieren kann [83]. Die Durchseuchungsrate mit dem JC Virus beträgt bei Erwachsenen schätzungsweise knapp 60% [84]. Unter Immunsuppression ist durch Virusreaktivierung oder Reinfektion das Auftreten einer PML möglich [49]. Nachzweijähriger Behandlung mit Natalizumab ist daher eine regelmäßige serologische Untersuchung auf JC Virus Antikörper zu empfehlen [43]. Während das PML Risiko bei Patienten ohne nachgewiesene Antikörper gegen JCV nahe Null beträgt [84], sollte bei positiver Serologie oder Serokonversion die Fortführung der Therapie einer Nutzen-Risiko Betrachtung unterzogen werden, gegebenenfalls auf ein anderes Medikament gewechselt werden [47]. Ferner sind unter Natalizumab infusionsassoziierte Kopfschmerzen oder anaphylaktische Reaktionen berichtet worden [79], ein Einfluss auf die Entstehung maligner Hauttumore wie dem Melanom scheint sich hingegen nicht

zu bestätigen [85]. Zudem kann der immunmodulatorische Effekt von Natalizumab durch das Auftreten neutralisierender Antikörper gegen den Wirkstoff (in unter 10% der Fälle) vermindert werden [86].

1.4.3.8 Alemtuzumab

Alemtuzumab ist ein monoklonaler, humanisierter Antikörper gegen CD52, welches auf der Oberfläche von reifen T- und B- Lymphozyten exprimiert wird [87]. Die Bindung der CD52+ Zellen durch Alemtuzumab führt zu einer antikörperabhängigen, zellvermittelten Zytotoxizität (ADCC = antibody dependent cellular cytotoxicity), welche hauptsächlich durch NK Zellen vermittelt wird [87, 88] . Die überlegene Effektivität von Alemtuzumab bei RRMS wurde mit Interferon beta als aktiver Vergleichssubstanz in einer Phase II und zwei Phase III Studien nachgewiesen [89, 90]. Alemtuzumab wird an fünf aufeinander folgenden Tagen und ein Jahr später an drei aufeinander folgenden Tagen verabreicht [87]. Zu den häufigsten Nebenwirkungen zählen allergische Infusionsreaktionen, Immunthrombozytopenie sowie Infektionen [87].

1.5 Einführung in das Immunsystem

Das Immunsystem stellt ein hochkomplexes, präzise abgestimmtes Zusammenspiel von Abwehrmechanismen dar, welches höhere Organismen vor schädlicher Einwirkung von Krankheitserregern oder Fremdstoffen schützen soll. Grob kann es in einen stammesgeschichtlich älteren Anteil, die angeborene Immunabwehr, sowie das jüngere adaptive Immunsystem unterteilt werden. Auch werden humorale und zelluläre Komponenten unterschieden. Im Laufe der Evolution haben Effektivität und Wirkspektrum des Immunsystems deutlich zugenommen [91]. Zu den wichtigsten Aufgaben der Immunabwehr gehören die Erkennung, Markierung und Beseitigung

eines in den Organismus eingedrungenen Pathogens. Zusätzlich soll über das adaptive Immunsystem die Gedächtnisbildung und somit eine bei Reinfektion effizientere und zielgerichtete immunologische Antwort sichergestellt werden.

1.5.1 Angeborenes Immunsystem

Das angeborene Immunsystem stellt eine Vielzahl schneller Abwehrmechanismen des Körpers dar, deren Aktivierung nicht an die antigenspezifische Identifikation eines Pathogens gebunden ist und die kein immunologisches Gedächtnis hervorbringen. Die Immunantwort erfolgt zunächst lokal bei Eindringen eines Erregers oder Fremdkörpers in den Organismus und wird durch Zellen wie Granulozyten, Mastzellen, mononukleäre Zellen (z.B. Makrophagen) und NK (natural killer) Zellen vermittelt [92]. Die Abwehrzellen können über die Erkennung charakteristischer körperfremder Molekülmuster (pathogen-associated-molecular-patterns = PAMPs) die Immunabwehr unverzüglich einleiten. Zu diesen molekularen Mustern zählen neben Zellwandbestandteilen von Bakterien oder Pilzen auch virale oder bakterielle Nukleinsäuresequenzen [92]. Die Erkennung der PAMPs geschieht durch relativ unspezifische Rezeptoren (Pathogen recognition receptors = PRR) wie Toll-like Rezeptoren für extrazelluläre oder NOD1-like Rezeptoren für intrazelluläre Pathogene [92]. Makrophagen und neutrophile Granulozyten können die so erkannten Erreger direkt phagozytieren und durch lysosomale Enzyme und toxische Radikale wie NO und H₂O₂ (respiratory burst) abtöten [93]. Dabei verstärken Makrophagen durch Ausschüttung der proinflammatorischen Zytokine IL1 β , IL6 und TNF α die lokale Abwehrreaktion [94]. Auch durch das Komplementsystem, welches Lyse oder Opsonierung von Erregern bewirkt, wird die zelluläre Immunantwort unterstützt [95]. Einen wichtigen regulierenden Einfluss auf Entzündungsreaktion üben u.a. hepatisch synthetisierte akut-Phase-Proteine aus [96]. Die phagozytierten Erregerbestandteile können von Makrophagen und dendritischen Zellen als Antigene den Zellen der adaptierten Immunabwehr (Lymphozyten) präsentiert werden und zeitverzögert eine spezifische

Immunantwort induzieren [92]. Eine Sonderstellung der angeborenen Abwehr nehmen die apoptotisch wirksamen NK Zellen ein, welche Pathogene nicht unmittelbar erkennen, sondern virusinfizierte Zellen über deren niedrige MHC I Expression identifizieren und abtöten [92].

1.5.2 Adaptives Immunsystem

Das adaptive Immunsystem ist Vermittler der spezifischen Abwehr. Seine Wirkung tritt zeitverzögert in Kraft, nimmt im Laufe des Lebens durch Gedächtnisbildung aber an Geschwindigkeit zu. Zelluläre Haupteffektoren sind T- und B- Lymphozyten sowie die aus B-Zellen entstehenden Plasmazellen [97]. Plasmazellen sind, zusammen mit ihrer Vorstufe, den Plasmablasten, für die Sezernierung der Immunglobuline zuständig [98], welche durch Bindung ihres spezifischen Antigens dieses unschädlich machen oder seine Elimination erleichtern. Immunglobuline können entweder membranständig als Rezeptoren auf der B-Zelloberfläche fungieren oder frei zirkulieren [97]. Ihre Hauptklassen umfassen IgM, IgD, IgG, IgE und IgA [99]. Ihre Monomere Grundstruktur besteht in jedem Fall aus je zwei leichten und zwei schweren Peptidketten, die wiederum aus konstanten und variablen Abschnitten bestehen; letztere bilden die Antigenbindungsstelle, die für alle klonalen Antikörper identisch ist [99].

1.5.2.1 T-Lymphozyten – Entwicklung und Differenzierung

T-Lymphozyten entstehen aus lymphatischen Vorläuferzellen, welche ursprünglich aus dem Knochenmark stammen; die eigentliche Differenzierung der T-Zellen läuft jedoch im Thymus ab [100]. Dort erfolgt nach V-DJ Umlagerung der betreffenden Gene die Synthese des (prä-) T-Zellrezeptors, der aus einer α und β Kette sowie dem Cofaktor CD3 besteht [101]. Mit der Expression der beiden Corezeptoren CD4 und CD8 (vorübergehend sind die Zellen für beides positiv [100]) beginnt die positive

Selektion der Zellen hinsichtlich ihrer Bindungsaffinität zu MHC I und II Oberflächenmolekülen [102]. Ohne Präsentation durch MHC Moleküle kann der T-Zellrezeptor nicht an sein betreffendes Antigen binden. Während MHC I ubiquitär auf allen kernhaltigen Zellen vorkommt, ist MHC II v.a. auf dendritische Zellen, Makrophagen und B-Lymphozyten beschränkt [103]. Vorwiegend MHC I quervernetzende T-Zellen werden zu CD8+ cytotoxischen T-Zellen, während MHC II bindende Zellen zu CD4+ T-Helferzellen (T_H-Zellen) heranreifen [102]. Im Mark des Thymus findet nachfolgend die negative Selektion der T-Lymphozyten statt, um zu gewährleisten, dass deren Affinität zu Selbst-Peptiden eine gewisse Schwelle nicht übersteigt [102]. Im Anschluss können die Lymphozyten als naive T-Zellen (T-Zellen ohne spezifischen Antigenkontakt) in periphere Kompartimente migrieren. Die weitere Reifung der naiven CD4 und CD8 T-Lymphozyten erfolgt in den T-Zonen des lymphatischen Gewebes [103]. Dort ansässige interdigitierende dendritische Zellen (IDZ) enthalten als wirksamste aller APZ diverse Costimulatoren (z.B. Protein B7), wodurch sie im Gegensatz zu Makrophagen und B-Zellen auch naive CD4- und CD8-Zellen aktivieren können [103]. Im Zuge dieser Aktivierung entwickeln sich CD8+ Zellen zu zytotoxischen T-Lymphozyten, welche über zytotoxisches Perforin und CD95 (FasL) die Zerstörung ihrer Zielzellen bewirken [104]. Naive CD4 Zellen hingegen differenzieren sich entweder zu T_H Effektorzellen (darunter T_H1, T_H2 und T_H17 Zellen) oder T_{reg} Zellen [105]. T-Helfer Zellen entfalten ihre Wirkung über die Stimulation anderer Komponenten des Immunsystems: T_H1 Zellen stimulieren beispielsweise Makrophagen und NK Zellen gegen intrazellulären Erreger und T_H2 Zellen unterstützen Granulozyten gegen extrazelluläre Erreger [103].

1.5.2.2 B-Lymphozyten – Entwicklung und Aktivierung

Die B-Lymphozyten sind neben den T-Lymphozyten die zentrale Komponente der adaptierten, zellvermittelten Immunabwehr. Analog zur Reifung der T-Zellen im Thymus reifen B-Lymphozyten aus lymphatischen Vorläuferzellen im Knochenmark, be-

vor sie ins Blut und sekundäre lymphatische Organe auswandern. Um eine größtmögliche Vielfalt an unterschiedlichen Antigenespezifitäten zu gewährleisten, durchlaufen die Zellen bei ihrer Differenzierung mehrere Umlagerungsprozesse der für B-Zellrezeptor bzw. Immunglobuline codierenden Gene. Zunächst differenziert sich die lymphatische Vorläuferzelle im Stroma des Knochenmarks unter Einfluss von Zytokinen zu einer pro-B-Zelle [106]. Diese beginnt mit dem genetischen Rearrangement des Locus der schweren Kette (heavy chain locus) über eine Verknüpfung zwischen D (diversity) und J (joining) Domäne, anschließend wird die VH (variable) Region an die entstandene DJ Sequenz angehängt [106]. Hat eine solche VH-DJ Umlagerung stattgefunden, kann eine vollständige μ -Kette (schwere Kette) synthetisiert werden und mit den Ersatzleichtkettenproteinen $\lambda 5$ und VpreB einen provisorischen prä-B-Zellrezeptor bilden [106]. Durch intrazelluläre Signale blockiert der prä-B-Zellrezeptor das weitere Rearrangement und induziert unter ständiger Zellteilung die Differenzierung der pro-B-Zelle zur prä-B-Zelle [106]. Nach Beendigung der Proliferation kommt es in den prä-B-Zellen zur Umlagerung des Locus der leichten Kette (light chain locus), welcher über eine V-J Verknüpfung innerhalb eines κ oder λ Kettengens erfolgt [106]. Schwere und leichte Kette können nun ein vollständiges IgM Molekül als ersten B-Zellrezeptor der unreifen B-Zelle bilden [107]. Unreife B-Zellen werden anschließend durch Zellen des Knochenmarks auf Selbsttoleranz geprüft, autoreaktive Lymphozyten gehen dabei apoptotisch zugrunde oder durchlaufen ein weiteres Rearrangement der Leichtkette (Rezeptor editing) [106]. Beim Verlassen des Knochenmarks entwickeln sich die unreifen B-Zellen zu reifen B-Zellen, die Immunglobuline der Klassen IgM als auch IgD exprimieren [107].

Zunächst rezirkulieren diese noch naiven B-Lymphozyten zwischen Blut und Lymphsystem. Sobald eine der Zellen in der Peripherie ihr spezifisches Antigen gebunden hat (z.B. über Präsentation durch dendritische Zellen), exprimiert sie auf ihrer Oberfläche vermehrt Adhäsionsmoleküle (z.B. LFA-1) [108]. Dies verschafft ihr nach Eintritt in die sekundären lymphatischen Organe wie Lymphknoten oder Milz eine feste Bindung im Übergangsbereich zwischen der T- und B-Zone und damit eine erhöhte

Kontaktwahrscheinlichkeit mit einer kognanten (d.h. für dasselbe Antigen spezifischen) T-Helferzelle [108]. Die Erkennung dieses gemeinsamen Antigens durch den T-Zellrezeptor eines TH-Lymphozyten ist zwingende Voraussetzung für die T-Zell abhängige B-Zell-Aktivierung [108]. Die Antigenpräsentation erfolgt auf einem MHC II Molekül der B-Zelloberfläche, nachdem das Antigen in Folge der B-Zellrezeptorbindung durch Endozytose aufgenommen und intrazellulär prozessiert wurde [108]. B- und T-Lymphozyt können dabei für verschiedene Epitope desselben Antigens spezifisch sein [108]. Durch Bindung des T-Zell-Rezeptors an den MHC II-Antigenfragment-Komplex auf der B-Zelloberfläche wird die T-lymphozytäre Expression von CD40 Ligand und Sezernierung von IL4 stimuliert [108]. Beide Faktoren induzieren die Proliferation und Weiterdifferenzierung der B-Zelle. Interagierende TH- und B-Lymphozyten wandern in die Marksinus der Lymphknoten bzw. zwischen T-Zone und rote Pulpa der Milz, um einen sogenannten Primärfokus zu bilden [108]. Dort erfolgt die Entwicklung einiger B-Lymphozyten zu Plasmablasten, welche für eine erste spezifische Antikörperproduktion verantwortlich sind [98].

Andere B-Zellen wandern unter dem Einfluss von CXCL13 in primäre Lymphfollikel, um mit Hilfe von T-Zellen und folliculären dendritischen Zellen Keimzentren zu bilden [108, 109]. Im Zuge der dort stattfindenden somatischen Hypermutation (Punktmutationen der V-Gene bei klonaler Vermehrung) werden die B-Lymphozyten im Keimzentrum hinsichtlich der Bindungsaffinität zu ihrem Antigen selektiert [108, 109]. Auch erfolgen ein oder mehrere Antikörperklassenwechsel zu anderen Isoformen [109]. Am Ende dieses Prozesses differenzieren sich hochspezifische, potentiell langlebige CD27+ B-Gedächtniszellen (memory) oder Plasmazellen heraus [110]. Letztere sind wichtige Effektoren der Antikörpersynthese [111]. Ein Teil dieser langlebigen Plasmazellen entwickelt sich auch direkt aus den bereits beschriebenen kurzlebigen Plasmablasten [111]. Das Gros der Plasmazellen des menschlichen Organismus persistiert im Knochenmark, welches ein für ihr Überleben geeignetes Mikromilieu bereitstellt [111] und steht dem Immunsystem entsprechend langfristig zur Verfügung.

1.5.2.3 B-Lymphozyten und multiple Sklerose

Obgleich die entscheidende Rolle der T-Lymphozyten bei der Entstehung der multiplen Sklerose unbestritten ist, sind B-Lymphozyten bei der Erforschung der Pathogenese der MS in den letzten Jahren in den Vordergrund gerückt. B-Lymphozyten sind bei MS mit einer ektopen Bildung von Keimzentren in den Meningen in Verbindung gebracht worden [112]. Dies geschieht u.a. als Folge CXCL13 vermittelter Chemotaxis von B-Zellen in den Liquor cerebrospinalis [113]. Intrathekale B-Lymphozyten sind Ursprung von Immunglobulinen, welche als sogenannte oligoklonale Banden bei multipler Sklerose nachgewiesen werden können [113, 114]. Die Antikörper tragen intrathekal zur Inflammation und Zerstörung des Myelins bei [114, 115]. Darüber hinaus fungieren B-Zellen als APC für autoreaktive T-Lymphozyten und induzieren deren klonale Expansion, Gedächtnisbildung und Zytokinfreisetzung [115]. Gleichzeitig sezernieren B-Zellen auch eigene proinflammatorische Zytokine wie IL6, TNF α und Lymphotoxin α [115].

Dem stehen die regulatorischen Eigenschaften der Übergangs-B-Lymphozyten und der regulatorischen B-Zellen gegenüber, welche das T-Zell supprimierende IL10 bzw. IL35 sezernieren [115]. Bei multipler Sklerose ist eine erhöhte IL6 Sekretion bei verminderter IL10 Ausschüttung gemessen worden [115]. Durch die Faktoren BAFF (=B Cell activating factor of the TNF family) und APRIL (A Proliferation-inducing ligand) können sich die intrathekalen B-Lymphozyten offenbar selbst erhalten [115, 116]. Im peripheren Blut wurden autoreaktive B-Zellen nachgewiesen, was einen cross-talk der intrathekalen und peripheren B-Lymphozyten nahelegt [115, 117]. Im Zuge dessen wird ein Antigentransport durch die B-Zellen in sekundäre lymphatische Organe und Stimulation und Rekrutierung weiterer T-Zellen in das ZNS vermutet [115].

2. Fragestellung der Arbeit

Die vorliegende Arbeit soll klären, inwieweit die Frequenzen von B-Lymphozyten sowie ihrer Subpopulationen durch das Vorliegen einer MS Erkrankung bzw. durch krankheitsspezifische Therapie mit dem humanen Antikörper Natalizumab quantitativ beeinflusst werden. Auch soll die Auswirkung der MS Erkrankung und der Immunotherapie mit Natalizumab auf die Konzentrationen verschiedener löslicher Antikörper und Zytokine im Blutserum ermittelt werden. Im Einzelnen sind dabei folgende Gesichtspunkte von Interesse:

1. Gibt es statistisch signifikante Unterschiede in der Frequenz der gesamten CD3-CD19+ B-Lymphozyten zwischen gesunden Individuen, MS Patienten ohne krankheitsspezifischer Therapie und MS Patienten mit Natalizumab?
2. Gibt es signifikante Unterschiede in den Frequenzen der CD3-CD19+CD20+CD27- naiven B- Lymphozyten zwischen gesunden Probanden, MS Patienten ohne Therapie und MS Patienten unter Natalizumab?
3. Gibt es signifikante Unterschiede in den Frequenzen der CD3-CD19+CD20+CD27++ memory B- Lymphozyten zwischen gesunden Probanden, MS Patienten ohne Therapie und MS Patienten mit Natalizumab?
4. Besonderes Augenmerk wird auf die Frage gerichtet, inwiefern die MS Erkrankung bzw. die Immunotherapie mit Natalizumab die terminal differenzierten B-Lymphozyten beeinflusst. Gibt es also signifikante Unterschiede in den Frequenzen der CD3-CD19+CD20-CD27++ terminal differenzierten B- Lymphozyten zwischen gesunden Probanden, MS Patienten ohne Therapie und MS Patienten mit Natalizumab?
5. Gibt es signifikante Unterschiede in den Serumkonzentrationen der löslichen IgG, IgA und IgM Antikörper sowie der Zytokine BAFF, IL1 β , IL21, IL35 und TNF β zwischen gesunden Personen, MS Patienten ohne krankheitsspezifische Therapie und Natalizumabpatienten?

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Tabelle verwendeter Lösungen

Lösungen	Hersteller
Aqua destilliert	Apotheke Universitätsklinikum, Tübingen
Bovine Serum Albumine (BSA) pH 7,0	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Austria
DMSO (Dimethylsulfoxide) C ₂ H ₆ OS	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
FACS Rinse	Becton & Dickinson, Heidelberg, Deutschland
FACS Safe	Becton & Dickinson, Heidelberg, Deutschland
FACS Flow	Becton & Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Fetal Calf Serum (FCS), inaktiviert	Invitrogen, Auckland, NZ
IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium) 12440 (1x) & L-Glutamine, 25mM HEPES GIBCO®	Invitrogen, Auckland, NZ
H ₂ SO ₄	-
LSM 1077 Lymphocyte Separation Medium	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Austria
PBS: Dulbecco's PBS (1x) without Ca & Mg, steril	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Austria
TrypanBlue Solution (0,4%)	SIGMA Chemical Co., St. Louis, USA

Tween-20 0,05%	BioRad, München, Deutschland
----------------	------------------------------

Tabelle 2: Verwendete Lösungen

3.1.2 Tabelle verwendeter Chemikalien

Chemikalien	Zusammensetzung
ELISA Coating-Puffer (1:10)	- 1,2 ml Coating Puffer (ELISA-Kit) - 10,8 ml destilliertes H ₂ O
ELISA Blocking-Puffer (1:10)	- 3 ml Assay Puffer A 20x (ELISA-Kit) - 27 ml destilliertes H ₂ O
ELISA Assay Puffer 1x (1:20)	- 5 ml Assay Puffer A 20x (ELISA-Kit) - 95 ml destilliertes H ₂ O
Wasch-Puffer (ELISA)	- 500 ml PBS - 0,05% Tween-20 (250 µl)
FACS-Puffer	- 500 ml PBS - 5g BSA - 1 ml NaN ₃

Tabelle 3: Verwendete Chemikalien

3.1.3 Tabelle verwendeter Einwegmaterialien

Einwegmaterial	Hersteller
15 ml Tube CELLSTAR®	Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland
50 ml Tube CELLSTAR®	Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland
96-well Zellkulturplatten Flat-Bottom, mit Deckel, Falcon®	Becton Dickison Labware, Franklin Lakes (USA)

96-well Zellkulturplatten U-Bottom, mit Deckel, CELLSTAR®	Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland
BD Microlance 3 Needles	BD Biosciences, Durham (USA)
Deckglas 24x50 mm	R. Langenbrinck, Emmendingen
EDTA KE/9ml Monovette®	Sarstedt, Nümbrecht
Eppendorf-Cups	Eppendorf AG, Hamburg
FACS-Tubes (PP-Tubes 1,3ml 8,55/44MM)	Greiner bio-one, Frickenhausen
Latex-Handschuhe, verschiedene Größen	Ansell, Tamworth (UK)
Neubauer-Zählkammer	Glaswarenfabrik Karl Hecht KG, Sondheim/Rhön
Objektträger Standard 76x26 mm	R. Langenbrinck, Emmendingen
Parafilm	Pechiney, Plastic Packaging Menasha (USA)
Pasteurpipetten, Einweg, 3ml	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Pipettenspitzen, verschiedene Größen	Sarstedt, Nümbrecht
Safety-Multifly®-Set	Sarstedt, Nümbrecht
Serologische Pipette costar® verschiedene Volumina	Corning Incorporated, Corning (USA)
Serologische Pipette Falcon® verschiedene Volumina	Becton Dickison Labware, Franklin Lakes (USA)
S-Monovette®	Sarstedt, Nümbrecht

Tabelle 4: Verwendete Einwegmaterialien

3.1.4 Tabelle verwendeter Laborgeräte

Laborgeräte	Hersteller
- 86°C Freezer	Forma Scientific, Inc., Marietta, Ohio, USA
Auflichtmikroskop Wilovert A	A Hund, Wetzlar
Analysewaage	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Computer, IBM® kompatibel	Fujitsu Siemens Computers, München
Elektrische Eppendorf-Pipette „Easypet“	Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, Wesseling-Berzdorf
ELISA Reader Labsystems Multiskan MK II, Driver Version 4.04	ThermoScientific, Braunschweig, Deutschland
Eppendorf-Pipetten (verschiedene Volumina und Ausführungen)	Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, Wesseling-Berzdorf
FACS CyAn™ ADP	Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland
Gilson-Pipetten, Pipetman (verschiedene Volumina)	Gilson, Inc., Middleton, USA
Glasspritzen, Fortuna® Optima®	Poulten & Graf GmbH, Wertheim, Deutschland
Kühlzentrifuge Heraeus Megafuge 1.0 R	Kendro Laboratory Products GmbH, Hanaus
Mikroskop Axioplan 2	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Sterilisator, A16/50, BJ 1922, Inh. 14,6ltr	WEBECO, Selmsdorf, Deutschland
Vortex Genie 2™	Bender & Hobein AG, Zürich, Schweiz

Tabelle 5: Verwendete Laborgeräte

3.1.5 Tabelle verwendeter Antikörper

Antigen	Klon	Fluorochrom	Ak-Konzentration	Hersteller
CD3	BW264/56	FITC	Keine Angabe d. Herstellers	Miltenyi Biotech GmbH, Bergisch-Gladbach, Deutschland
CD4	M-T466	PE	1 mg/ml	Miltenyi Biotech GmbH, Bergisch-Gladbach, Deutschland
CD4	MOPC-21	APC-H7	Keine Angabe d. Herstellers	BD Bioscience, San Jose, CA, USA
CD4	OKT-4	PB	Keine Angabe d. Herstellers	Ebioscience, San Diego, CA, USA
CD20	L27	APC-H7	100 µl/ml	BD Bioscience, San Jose, CA, USA
CD19	HIB-19	PB	Keine Angabe d. Herstellers	BioLegend, San Diego, CA, USA
CD27	O323	PE	Keine Angabe d. Herstellers	BioLegend, San Diego, CA, USA

Tabelle 6: Verwendete Antikörper

3.1.6 Tabelle verwendeter Software

Bezeichnung	Version	Hersteller
Excel 2013	15.0	Microsoft®
IBM® SPSS® Statistics	23.0.0	IBM®
Summit®	4.3 Build 2445	Dako Cytomation

Tabelle 7: Verwendete Software

3.2 Patientengruppen und Kontrollgruppe

gesunde Kontrollgruppe	Für die Studie wurden freiwillige gesunde Probanden herangezogen
Patienten ohne Therapie	Patienten mit RRMS ohne krankheitsspezifische Therapie
Patienten Natalizumabtherapie	Patienten mit RRMS unter Therapie mit Natalizumab

Tabelle 8: Darstellung der verschiedenen Versuchsgruppen

Die Patienten wurden aus der neurologischen Poliklinik sowie von den neurologischen Stationen der Universitätsklinik Tübingen rekrutiert. Sie erfüllten die überarbeiteten McDonald-Kriterien für MS [38]. Alle Patienten wurden aufgeklärt und gaben ihre schriftliche Zustimmung gemäß dem vom Ethikkomitee der Universität Tübingen genehmigten Protokoll.

3.3 Bestimmung der Subpopulationen der B-Lymphozyten und Durchführung einer Serumanalyse

Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit war die quantitative Beschreibung verschiedener Subpopulationen von B-Lymphozyten bei MS Patienten mit bzw. ohne krankheitsspezifischer Therapie mit Natalizumab sowie gesunden Individuen. Der Einfluss der MS und der medikamentösen Intervention mit Natalizumab auf die Frequenz unterschiedlicher B-Zellsubspezies sollte untersucht werden. Dabei wurden folgende Populationen mittels Immunphänotypisierung bestimmt: Die gesamten B-Lymphozyten (CD3- CD19+), die B-Gedächtniszellen (CD3- CD19+ CD20+ CD27+), die naiven B-Zellen (CD3- CD19+ CD20+ CD27-) und die Plasmablasten (CD3- CD19+ CD20- CD27+). Zusätzlich wurden die Konzentrationen verschiedener mit dem Immunsystem assoziierter Serumproteine durch ELISA ermittelt. Die Konzentrationen wurden zwischen den MS Patienten mit und ohne Natalizumabtherapie sowie gesunden Individuen vergleichend analysiert. Erfasst wurden die Immunglobuline IgG, IgA und IgM sowie die Zytokine BAFF, IL1 β , IL21, IL35 und TNF β .

3.4. Immunphänotypisierung mit dem FACS Gerät

3.4.1 Isolierung der PBMC durch Dichtezentrifugation

Zur Isolierung der PBMC (peripheral blood mononuclear cells), einem Zellkollektiv, zu dem unter anderem Lymphozyten und Monozyten gehören, wird der sogenannte Ficoll Gradient gemäß Protokoll von PAA als Dichtezentrifugationsverfahren angewendet (GmbH, P.L. Protocol for Use Lymphocyte Separation Medium LSM 1077. 2012.). Das Verfahren trennt die verschiedenen Blutbestandteile aufgrund ihrer dichteabhängigen Sedimentationseigenschaften derart, dass Monozyten und Lymphozyten eine deutlich abgrenzbare Bande bilden. Dazu werden zwei bis drei Röhrchen EDTA Blut von Patienten durch venöse Blutentnahme gewonnen, mit PBS 1:1 auf

ein Endvolumen von 30 ml verdünnt und das Vollblut/PBS Gemisch auf 15 ml des Ficoll Lymphozyten-Separationsmediums in ein 50 ml Falcon pipettiert. Aufgrund der höheren Massendichte des Lymphoprep Mediums ($\rho = 1,077 \text{ g/ml}$) bleiben die beiden Flüssigkeiten zunächst als zwei getrennte Phasen erhalten, es darf es zu keiner Vermengung des Blutes mit dem zytotoxischen Medium kommen. Nach einer 35 minütigen Zentrifugation bei 1800 U/min ohne Bremse und einer Temperatur von 22°C bilden sich dichteabhängig weitere Phasen aus. Erythrozyten und Granulozyten haben eine höhere Massendichte als das Lymphoprep Medium und sedimentieren sich als Bodensatz. Das Blutplasma bildet aufgrund seiner geringeren Dichte den Überstand. Die PBMC befinden sich zwischen Plasma und dem Separationsmedium in der sogenannten Interphase. Nun wird die Interphase, um weiterhin Kontakt mit dem Medium zu vermeiden, möglichst plasmanah mit einer Pipette entnommen mit PBS verdünnt. Nach zweimaliger Zentrifugation für 20 min bei 1500 U/min und 4°C wird jeweils der Überstand dekantiert und die PBMC in 5ml PBS aufgenommen.

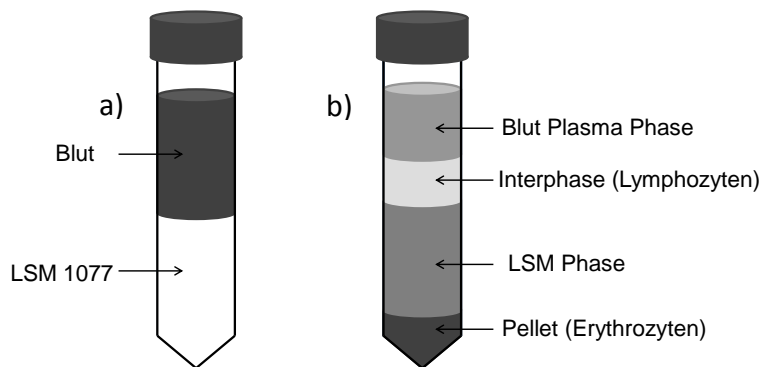


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Phasen a) vor und b) nach der Zentrifugation von EDTA Blut über dem Lymphoprep-Medium [118] a) Das mit PBS verdünnte EDTA Blut bleibt aufgrund seiner geringeren Dichte oberhalb des Separationsmediums in einer eigenen Phase b) Die PBMC, darunter die Lymphozyten bilden die sogenannte Interphase. Diese befindet sich oberhalb des Separationsmediums. Bodensatz bilden die Erythrozyten, der Überstand besteht vorwiegend aus Blutplasma.

3.4.2 Zellzählung in der Neubauer Zählkammer

Zur Bestimmung der Anzahl der isolierten PBMC werden diese mit Hilfe der sogenannten Neubauer Zählkammer unter dem Lichtmikroskop abgezählt. Hierfür werden aus der PBMC/PBS Suspension 20 µl in eine 96well Platte pipettiert und dort mit 20 µl des Färbemediums Trypanblau 1:1 vermengt. 20 µl der so erhaltenen Suspension werden nun zwischen Neubauer Zählkammer und Deckglas pipettiert und durch das Mikroskop betrachtet. In allen vier Quadranten der Kammer sind je 4x4 quadratische Felder eingezeichnet, innerhalb derer jeweils sämtliche PMBC gezählt werden. Der daraufhin errechnete Durchschnittswert n pro Quadrant wird zur Berechnung der Gesamtzellzahl N herangezogen. Dabei wird gemäß der Formel $N = n \times 2 \times 10^5 \times V$ vorgegangen, wobei V dem Volumen der PBMC/PBS Suspension entspricht.

3.4.3 FACS-Färbung und Antikörperkonzentrationen

Durch die errechnete Zellzahl können nun die benötigten Volumina an Zellsuspension für die Einfach- und 4-fach FACS Färbung ermittelt werden. Die Volumina sind dabei so zu wählen, dass für jede Einfachfärbung jeweils 10^5 Zellen und für jede 4-fach Färbung 10^6 Zellen verwertet werden können. Zusätzlich wird eine Leerprobe mit 10^5 Zellen angesetzt, deren Zellen ungefärbt bleiben. Nach Pipettieren der errechneten Volumina in eine 96well Platte wird diese mittels Zentrifugation für 4 min bei 1400 U/min und 4°C zweimalig in 200 µl FACS Puffer gewaschen. Zur Vermeidung unspezifischer Bindungen zwischen den Fc- und Fab-Anteilen der Antikörper werden für die Einzelfärbungen 25 µl eines Fc-Blocks (Verdünnung siehe Tabelle 9) bzw. 50 µl für die Mehrfachfärbung zu den Zellen gegeben. Die Inkubation des Fc Blocks erfolgt für 5 min bei 4°C im Kühlschrank, die Zellen werden anschließend nicht gewaschen. Nun werden die Antikörper in den Konzentrationen nach Tabelle 9 bzw. 10 hinzugefügt. Dabei werden für jede Einzelfärbung 5 µl des betreffenden

Antikörpers und 20 µl FACS Puffer und für die 4 fach Färbung je 10 µl aller Antikörper sowie 10 µl FACS Puffer verwendet. Nach 30 min Inkubation bei 4°C, bei welcher die Fluorochrom-konjugierten Antikörper vor Lichteinwirkung mittels Aluminiumfolie geschützt werden müssen, werden die Zellen wiederum zweimal bei 1400 U/min und 4°C mit 200 µl FACS Puffer gewaschen und zuletzt mit 400 µl FACS Puffer in 5ml FACS Tubes aufgenommen.

verwendete Antikörper	Ak-Konzentration in FACS-Puffer
CD3 FITC	1:100
CD4 PE	1:100
CD4 PB	1:100
CD4 APC-H7	1:20
Fc-Block humanes IgG	1:50

Tabelle 9: Ak-Konzentrationen der 1-fach Färbungen

verwendete Antikörper	Ak-Konzentration in FACS-Puffer
CD3 FITC	1:100
CD 20 APC-H7	1:25
CD 27 PE	1:50
CD 19 PB	1:100
Fc-Block humanes IgG	1:50

Tabelle 10: Ak-Konzentrationen der 4-fach Färbungen

3.4.4 Immunphänotypisierung

Jede Subpopulation von Zellen kann anhand ihrer spezifischen Konfiguration von intrazellulären oder Oberflächenantigenen charakterisiert werden. Die FACS Analyse ermöglicht über Färbung mit Fluorochrom-markierten Antikörpern die Darstellung der zellulären Antigenzusammensetzung. Dabei sind alle gleichfarbigen Antikörper jeweils spezifisch für ein Antigen, sodass jedes dieser Antigene einem Farbstoff zugeordnet werden kann. Durch Kombination verschiedener Antikörper kann die charakteristische Konstellation für jede Zelle sichtbar gemacht und die Zelle klassifiziert werden. Bei der Immunphänotypisierung der B-Zellpopulationen werden diese mittels 4 facher Färbung auf die Oberflächenantigene CD3, CD19, CD20 und CD27 untersucht. Ziel hiervon ist die quantitative Analyse der CD3- CD19+ B-Lymphozyten, der CD3- CD19+ CD20+ CD27+ B-Gedächtniszellen, der CD3- CD19+ CD20+ CD27- naiven B-Zellen und der CD3- CD19+ CD20- CD27+ Plasmablasten bei den beiden Patientengruppen und der gesunden Kontrollgruppe.

3.4.5 FACS-Gerät und FACS-Messung

Bei dem verwendeten Durchflusszytometer handelt es sich um das FACS-Gerät CyAn™ ADP von der Firma DakoCytomation. Das FACS Gerät verfügt über drei Laser verschiedener Wellenlängen (635nm, 488nm, 405nm). Die Zellen gelangen beim Durchlaufen des Röhrensystems des Zytometers durch einen Glasstubus, den sie dank elektrischer Spannung und Vibration einzeln passieren. Hier trifft das Laserlicht auf die Zellen, wird durch diese gestreut und gleichzeitig durch die zellgebundenen Fluorochromantikörper partiell absorbiert. Durch photoelektrische Anregung der Farbstoffe und konsekutive Lichtemission entsteht ein zusätzliches optisches Signal. Streuereignis und Fluoreszenzemission durch eine Zelle werden von spezialisierten Detektoren aufgenommen und vom Gerät als Event registriert. Jedes Event besitzt eine charakteristische Konstellation aus zwei Streuwinkeln (vorwärts

und seitwärts) sowie den für die gebundenen Fluorochrome charakteristischen Wellenlängen. Die Vorwärtsstreuung (Forward scatter, FS) kann über Größe, die Seitwärtsstreuung (Sideward scatter, SS) über Zellgranularität Aufschluss geben. Die emittierten Fluoreszenzsignale erlauben wiederum Rückschluss über die erfolgte Färbung und damit indirekt über die Oberflächenantigenstruktur einer Zelle.

3.4.6 Auswertung der FACS Messungen

Die Darstellung und Auswertung der zytometrischen Ergebnisse erfolgte mit dem Softwareprogramm Summit. Hier werden die gemessenen Parameter in logarithmischen Koordinatensystemen (Dotplots) gegeneinander aufgetragen. Jeder Punkt innerhalb des Dotplots entspricht dabei einem durch das FACS Gerät gemessenen Event. Der unten dargestellte Dotplot aus FS und SS erlaubt eine Vorselektierung der gefacsten Zellen (gating). Ausgewählt wird derjenige Bereich des SS/FS Plots, in welchem sich erfahrungsgemäß die PBMC und damit vitale Lymphozyten befinden.

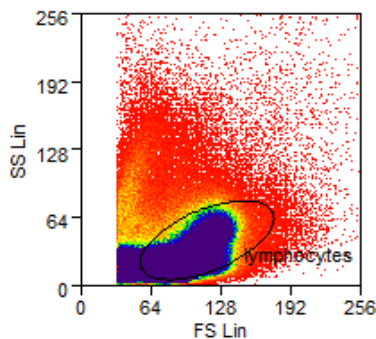


Abbildung 3: Darstellung des SS/FS Dotplots bei der FACS Analyse Im SS/ FS Dotplot werden die aus dem Blut der Probanden erhaltenen PBMC anhand ihrer Größe (FS = forward scatter) und Granularität (SS= Sideward scatter) differenziert. Im eingegrenzten Bereich (Gate) „lymphocytes“ befinden sich das Gros der PBMC und damit zahlreiche lebende Lymphozyten, die bei der FACS Messung detektiert werden sollen.

Die weiteren Dotplots tragen je zwei der Fluorochrome FITC, PE oder APCH7 gegeneinander auf, wobei ein Event dann als positiv für den betreffenden Farbstoff

definiert wird, wenn dessen Intensität näherungsweise den Wert 10^1 übersteigt bzw. sich in einer zweiten, abgrenzbaren Population von den ungefärbten Zellen absetzt. Wegen ähnlicher Emissionsspektren der Farbstoffe PE und FITC muss vor jeder 4 fach Färbung eine Kompensation aller verwendeten Fluorochrome gegeneinander erfolgen. Dies wird mittels Einzelfärbungen erreicht, wobei in den Dotplots jede Farbe gegen jeweils alle weiteren kompensiert wird. Zur Kompensation dient das Digital-Signal-Processing Kompensations-Verfahren der Summit Software.

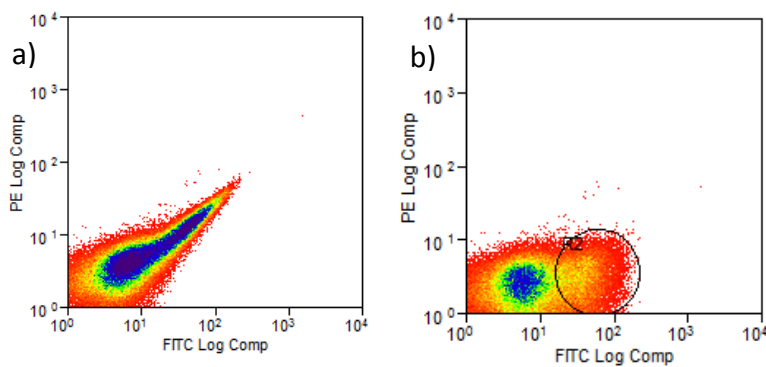


Abbildung 4: Darstellung zweier PE/FITC Dotplots nach Einzelfärbung der PBMC mit CD3 FITC vor und nach der Kompensation a) Darstellung der nach CD3 FITC gefärbten Zellen im PE/FITC Dotplot im nicht kompensierten Zustand. Die Färbereigenschaften der Zellpopulationen sind nicht abgrenzbar. b) PE/FITC Dotplot bei Färbung mit CD3 FITC nach der Kompensation. Die in „R2“ gateden Zellen sind positiv für CD3 FITC

Zusätzlich kann für die genaue Abgrenzung der Häufigkeitsgipfel (peaks) der gefärbten und ungefärbten Zellen die Signalintensität jedes Farbstoffs gegenüber der Eventanzahl (gesamt oder pro gate) in einem Histogramm dargestellt werden.

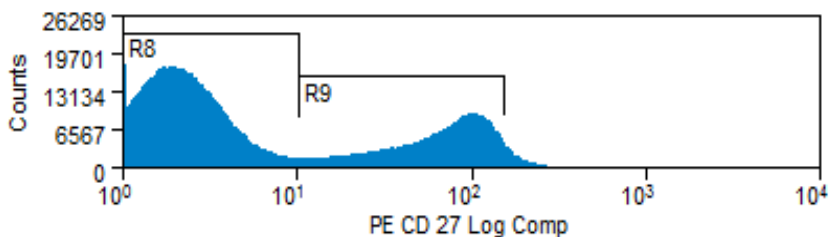


Abbildung 5: Histogramm zur Farbintensität in Relation zur Eventzahl Die Gegenüberstellung der Eventcounts (Ordinate) und der logarithmischen Intensität des Farbsignals, hier CD27 PE (Abzisse) erlaubt über die Abgrenzbarkeit der Häufigkeitsgipfel (peaks) die qualitative Unterscheidung zwischen ungefärbten (R8) und gefärbten (R9) Zellen.

Nachfolgend wird die 4 fach Färbung mit den Antikörpern CD3 FITC, CD19 PB, CD27 PE und CD20 APC-H7 durchgeführt.

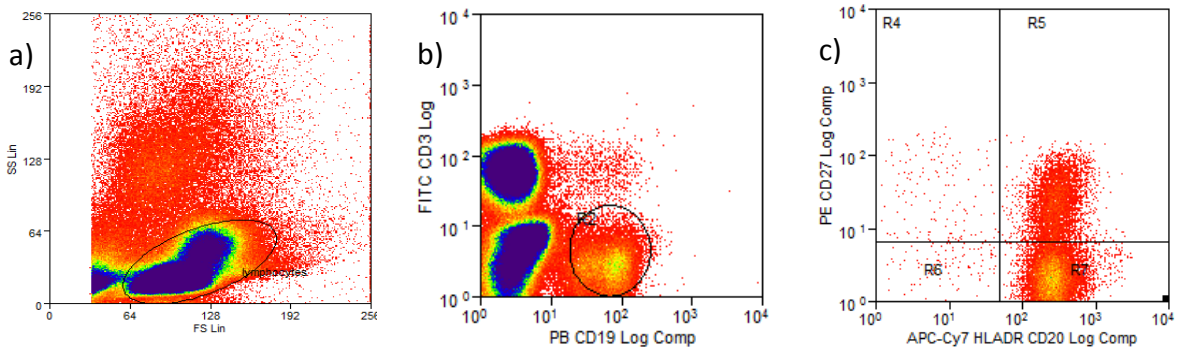


Abbildung 6: Darstellung der Dotplots SS/FS; CD3 FITC/ CD19 PB und CD 27 PE/ CD20 APCH7 bei der 4 fach FACS Färbung a) Im SS/ FS Dotplot werden die aus dem Blut der Probanden erhaltenen PBMC im Gate „lymphocytes“ selektiert. b) Im FITC/ PB Dotplot werden die in „lymphocytes“ der im SS/FS Dotplot gateden PBMC weiter auf ihre Färbeeigenschaften hinsichtlich der Antikörper CD3 FITC und CD19 PB analysiert. Die in Gate „R2“ eingegrenzten Zellen stellen die CD3-CD19+ B-Lymphozyten dar. c) Die in „R2“ gekennzeichneten CD3-CD19+ B- Lymphozyten werden im CD27 PE/ CD20 APCH7 Dotplot anhand ihrer CD20 und CD27 Expression in die verschiedenen B-Zellpopulationen, die CD3-CD19+CD20+CD27- naiven B Zellen, CD3-CD19+CD20+CD27+ B-Gedächtniszellen und CD3-CD19+CD20-CD27++ Plasmablasten, subklassifiziert.

Im dargestellten CD3 FITC/ CD19 PB Dotplot werden die CD3- CD19+ B-Lymphozyten sichtbar gemacht. Diese dienen für das nachfolgende CD27 PE/ CD20 APC-H7 Dotplot als gate („R2“). Es werden in diesem System folglich CD3-CD19+ B-Lymphozyten auf ihre Eigenschaften bezüglich CD27 und CD20 hin untersucht. Dabei werden sowohl die CD3-CD19+CD20+CD27- naiven B-Zellen, die CD3-CD19+CD20+CD27+ B-Gedächtniszellen und die CD3-CD19+CD20-CD27++ Plasmablasten anteilig an allen CD3-CD19+ B-Lymphozyten in % quantifiziert und die Werte in einer Exceltabelle notiert.

3.5 Bestimmung der Serumzytokine mittels ELISA Technik

Zusätzlich zu der Immunphänotypisierung werden mittels Elisa (Enzyme linked immunosorbend assay) die Konzentrationen der Antikörper IgG, IgA und IgM sowie der Zytokine BAFF, IL1 β , IL21, IL35 und TNF β , im Patientenserum ermittelt. Dabei kommt die Antigen Elisa Technik zum Einsatz, bei welcher zwei Antikörper an das zu detektierende Antigen binden (s. Abbildung 7).

Im Folgenden die verwendeten kits mit Herstellerangaben.

Kit	Hersteller
Human IgG Ready-SET-Go [®] Kit	eBioscience, Inc., San Diego, USA
Human IgA Ready-SET-Go [®] Kit	eBioscience, Inc., San Diego, USA
Human IgM Ready-SET-Go [®] Kit	eBioscience, Inc., San Diego, USA
Human IL-1 beta ELISA Ready-SET-Go! [®] Kit	eBioscience, Inc., San Diego, USA
Human IL21 Ready-SET-Go [®] Kit	eBioscience, Inc., San Diego, USA
Legend Max [®] Human IL35 Heterodimer Kit	BioLegend, Inc., San Diego, USA
Human TNFbeta Ready-SET-Go [®] Kit	eBioscience, Inc., San Diego, USA
Quantikine [®] ELISA BAFF Kit	R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN, USA

Tabelle 11: ELISA-kits mit Herstellerangaben

3.5.1 Durchführung der quantitativen Messungen mittels ELISA-Technik

Hier soll exemplarisch das Grundprinzip der vorgenommenen ELISA Messungen anhand des Protokolls für das Human IgG Ready-SET-Go® kit erläutert werden. Die Arbeitsschritte bei der ELISA Messung umfassen zwei Versuchstage. Am ersten Tag soll eine 96well ELISA Mikrotitrierplatte mit einem capture Antikörper beschichtet (gecoatet) werden. Zunächst erfolgt die Herstellung der Coating (1:10), Blocking (1:10) und Assay buffer A (1:20) durch Verdünnung der im kit enthaltenen Lösungen mit destilliertem Wasser. Mit dem Coating buffer wird der anti-human IgG capture Antikörper auf 1:250 verdünnt und zu je 100 µl/ well in die 96well Mikrotitrierplatte pipettiert. Die Platte wird abgedeckt und über 24 Stunden bei 4°C inkubiert. Nach zweimaligen Waschen der Platte mit 400 µl Washing buffer/ well (Herstellung aus 500 ml PBS und 25 µl 0,05% Tween-20) werden 250 µl/ well des Blocking buffers für 2 h auf der Platte inkubiert. Damit sollen unspezifische Bindungen verhindert werden. Es folgt nun die Anfertigung der Standard- und Probenverdünnungen.

Standardverd. mit Assay Buffer A

St. 1 - 100 ng/ml: 250 µl Assay Buffer A + 250 ul aus 200 ng/ml Standard

St. 2 - 50 ng/ml: 250 µl Assay Buffer A + 250 ul aus 100 ng/ml Standard1

St. 3 – 25 ng/ml: 250 µl Assay Buffer A + 250 ul aus 50 ng/ml Standard 2

St. 4 – 12,5 ng/ml: 250 µl Assay Buffer A + 250 ul aus 25 ng/ml Standard 3

St. 5 – 6,25 ng/ml: 250 µl Assay Buffer A + 250 ul aus 12,5 ng/ml Standard 4

St. 6 - 3,125 ng/ml: 250 µl Assay Buffer A + 250 ul aus 6,25ng/ml Standard 5

St. 7 – 1,56 ng/ml: 250 µl Assay Buffer A + 250 ul aus 3,125 ng/ml Standard 6

St. 8 – 0 g/ml: Assay Buffer A

Probenverdünnung (1:500.000-fach) in Assay Buffer A

Vorverdünnung 1 (1:100): 990 µl Assay Buffer A + 10 µl Serum

Vorverdünnung 2 (1:100): 990 µl Assay Buffer A + 10 µl aus Vorverdünnung 1

Endverdünnung 3 (1:50): 490 µl Assay Buffer A + 10 µl aus Vorverdünung 2

Die Platte wird nochmals zweimalig mit 400 µl/ well Washing buffer gewaschen und die hergestellten Standards und Proben zu 100 µl/ well pipettiert. Es erfolgt eine weitere Inkubation für 2 h bei Raumtemperatur. Anschließend wird die Platte viermal gewaschen (s.o.) und der HRP konjugierte anti-humane IgG Detektion Antikörper (Ak Konzentration 1:250 in Assay buffer) zu je 100 µl/ well hinzugegeben. Der Detektion Antikörper bindet spezifisch an ein anderes Epitop desselben Antigens wie der Coating Antikörper, wodurch sich das Antigen nun zwischen den beiden Antikörpern (Antigen- bzw Sandwich-ELISA Verfahren) befindet. Nach einer weiteren ein-stündigen Inkubation bei Raumtemperatur wird die Platte viermal gewaschen (s.o.) und 100 µl/ well der Substratlösung aus Tetramethylbenzidin (TMB) hinzugefügt. Die mit dem Detektionantikörper konjugierte HRP (Meerrettichperoxidase) katalysiert die Umsetzung des TMB mit Wasserstoffperoxid (H₂O₂) zu einem blauen, optisch aktiven Chromogen. Nach 15 min erfolgt die Zugabe von 100 µl/ well 2N Schwefelsäure (H₂SO₄). Dies führt zum Abbruch der Reaktion und zu einem gelben Farbumschlag des TMB durch Oxidation.

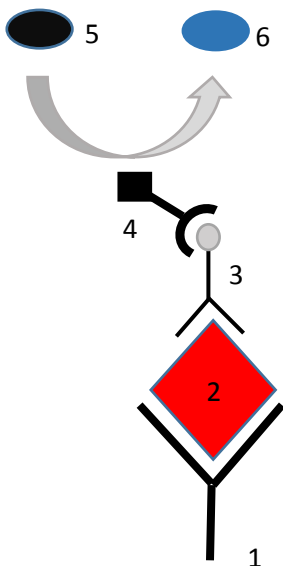


Abbildung 7: Schema der Sandwich ELISA Technik Der auf der Platte inkubierte Capture Antikörper (1) bindet das zu detektierende Antigen (2). Der anschließend hinzugefügte Detektionsantikörper (3) ist über Streptavidin an das Enzym HRP (4) gebunden, welches die Substratlösung aus H₂O₂ und Tetramethylbenzidin (5) katalytisch zu einem blauen Chromogen (6) umsetzt.

3.5.2 Auswertung der ELISA-Messungen

Die Auswertung der ELISA Messungen erfolgt mit Hilfe eines ELISA reader (Labsystems Multiskan MK II, Driver Version 4.04) der Wellenlänge 405nm, welcher in seiner Funktion einem optischen Photometer entspricht. Nach Kalibrierung mit einer Leerprobe können die verschiedenen Stärken der Extinktion durch die hergestellten Farblösungen in den Wells photometrisch bestimmt werden. Aus den ermittelten Extinktionen kann auf die Konzentrationen des Farbstoffs und damit der des Antigens geschlossen werden. Dabei dienen die Standardlösungen zur Festlegung einer linearen Standardkurve, deren Steigung dem Umrechnungsfaktor zwischen Extinktion und Konzentration des Farbstoffs entspricht.

3.6 Statistik

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte über das Programm SPSS (Version 23.0.0, IBM®). Zunächst wurden die Daten aus der Excel Tabelle in das Programm übernommen und mittels des Shapiro Wilk Tests auf Varianzgleichheit (= Normalverteilung) überprüft. Waren die Daten normalverteilt, wurde weiter mit dem T- Test für unabhängige Stichproben verfahren, um die verschiedenen Probandenkollektive auf Mittelwertsgleichheit zu überprüfen. Waren die Daten hingegen nicht normalverteilt, wurde mit dem nicht parametrischen Mann-Whitney U Test fortgefahren. Statistisch signifikante Ergebnisse werden ab einem Signifikanzniveau von $p \leq 0,05$ definiert.

4. Ergebnisse

Bei der Immunphänotypisierung mittels FACS Analyse wurden 30 Probanden einbezogen. Darunter befinden sich 10 Patienten mit RRMS ohne krankheitsspezifische Therapie, 10 Patienten mit RRMS unter Immunotherapie mit Natalizumab sowie 10 gesunde Probanden. Bei den treatment naiven MS Patienten beträgt das mittlere Patientenalter $42,9 \pm 14,1$ Jahre, das Geschlechterverhältnis 6 Männer zu 4 Frauen und die mittlere Krankheitsdauer $6,2 \pm 5,7$ Jahre bei einem EDSS von $1,9 \pm 1,0$. Bei den MS Patienten mit Natalizumabtherapie beträgt das durchschnittliche Alter $44,6 \pm 9,9$ Jahre, das Geschlechterverhältnis 8 Männer zu 2 Frauen und die Krankheitsdauer im Durchschnitt $14,3 \pm 10,4$ Jahre. Der mittlere EDSS beträgt $2,7 \pm 2,0$. Die gesunden Kontrollen weisen ein durchschnittliches Alter von $25,2 \pm 8,4$ Jahren sowie ein Geschlechterverhältnis von 6 Männern zu 4 Frauen auf.

Patient	MS	MS + Natalizumab	Gesunde Kontrollen
Mittleres Alter	$42,9 \pm 14,1$	$44,6 \pm 9,9$	$25,2 \pm 8,4$
Geschlecht m:w	6:4	8:2	6:4
Mittlere Krankheitsdauer	$6,2 \pm 5,7$	$14,3 \pm 10,4$	-
Mittlerer EDSS	$1,9 \pm 1,0$	$2,7 \pm 2,0$	-

Tabelle 12: Patienten- und Probandendaten der Immunphänotypisierung

Bei der Serumanalyse wurden Proben von 30 (+ 2) Probanden verwendet. Darunter befinden sich 10 Patienten mit RRMS ohne krankheitsspezifische Therapie, 10 Patienten mit RRMS unter Therapie mit Natalizumab und 10 gesunde Probanden. Bei den treatment naiven MS Patienten wurden für die Serumanalysen von IgA, IL21 und TNF β 11 Proben verwertet. Insgesamt, doch nie gleichzeitig in derselben Messung, kamen 12 therapiefreie Patienten zum Einsatz. Das durchschnittliche Alter beträgt für die treatment naiven Patienten $45,0 \pm 11,8$ Jahre, bei einem Geschlechterverhältnis von 4 Männern zu 8 Frauen und einer mittleren Krankheitsdauer $7,5 \pm 7,4$ von Jahren. Der mittlere EDSS beläuft sich auf $2,0 \pm 0,8$. Bei den Natalizumabpatienten beträgt das mittlere Alter $44,9 \pm 9,5$ Jahre, das Geschlechterverhältnis 8 Männer zu 2 Frauen und die mittlere Erkrankungsdauer $15,1 \pm 10,2$ Jahre mit einem EDSS von $3,4 \pm 2,1$. Bei den gesunden Probanden beläuft sich das durchschnittliche Alter auf $26,5 \pm 8,7$ Jahre und bei 6 Männern und 4 Frauen.

Patient	MS	MS + Natalizumab	Gesunde Kontrollen
Mittleres Alter	$45,0 \pm 11,8$	$44,9 \pm 9,5$	$26,5 \pm 8,7$
Geschlecht m:w	4:8	8:2	6:4
Mittlere Krankheitsdauer	$7,5 \pm 7,4$	$15,1 \pm 10,2$	-
Mittlerer EDSS	$2,0 \pm 0,8$	$3,4 \pm 2,1$	-

Tabelle 13: Patienten- und Probandendaten der Serumanalyse

Für die Immunphänotypisierung und Serumanalyse konnten jeweils nur teilweise die gleichen Patienten rekrutiert werden. Bei den MS Patienten mit Natalizumabtherapie und den gesunden Kontrollen stimmen pro Gruppe je 8 Individuen bei Serum- und FACS Analyse überein. Bei den treatment naiven MS Patienten stimmen bei Verwendung von 10 Probanden für die Serumanalyse 8 Individuen und bei 11 Serumprobanden 9 Individuen zwischen den beiden Experimentalgruppen überein.

Es muss klar hervorgehoben werden, dass sich die geringe Anzahl mit 10-12 Probanden pro Versuchsgruppe auf die Aussagekraft der vorliegenden Ergebnisse auswirkt. So können individuelle Faktoren, Messfehler oder Ausreißer eine größere Rolle spielen. Zudem ist der Altersunterschied zwischen gesunden Probanden und MS Patienten mit ungefähr 20 Jahren sehr deutlich. Bei den MS Patienten mit und ohne Natalizumabtherapie unterscheidet zwar sich nicht das Alter, jedoch das Geschlechterverhältnis, insbesondere bei den ELISA Messungen. Die genannten Faktoren können als mögliche Störvariablen für die Ergebnisse eine Rolle spielen. In diesem Kontext kann man bei dieser Dissertation am ehesten von einer Pilotstudie sprechen.

4.1 Vergleich der B-Zellpopulationen durch Immunphänotypisierung

Mittels FACS Analyse der PBMC sollten verschiedene Populationen der B-Lymphozyten quantitativ bestimmt werden. Die Ergebnisse wurden für die unterschiedlichen Probandenkollektive vergleichend analysiert. Ziel war es, den Einfluss der MS-Erkrankung und krankheitsspezifischer Therapie mit Natalizumab auf die Frequenz der B-Zell Subpopulationen zu erfassen. Zentrale Rolle spielte dabei die Untersuchung des Effekts der Immunotherapie mit Natalizumab auf Häufigkeit und Funktion der terminal differenzierten B-Lymphozyten (Plasmablasten). Zunächst wurden die gesamten B-Lymphozyten (CD3-CD19+) anteilig an den PBMC in % bestimmt und in einem Dotplot für die Fluorochrome CD3 FITC und CD19 PB dargestellt. Die Gesamtheit der CD3-CD19+ B-Lymphozyten war wiederum Ausgangspopulation (gate) für die Bestimmung der Frequenzen der CD3-CD19+CD20+CD27- naiven B-Lymphozyten, der CD3-CD19+CD20+CD27+ memory B-Zellen und der CD3-CD19+CD20-CD27++ Plasmablasten, wobei diese Populationen in einem weiteren Dotplot für die Farbstoffe CD27 PE und CD20 APCH7 dargestellt wurden. Die Mittelwerte für die einzelnen Versuchsgruppen wurden auf eine Nachkommastelle gerundet und durch statistische Tests verglichen.

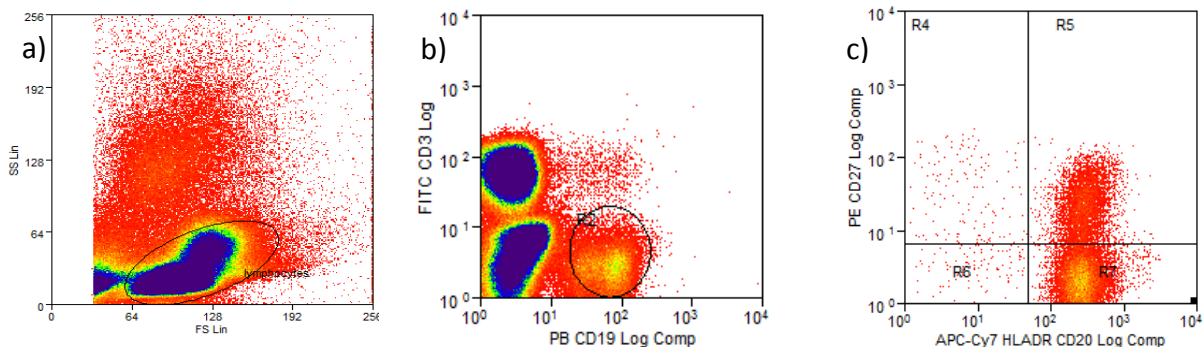


Abbildung 8: Durchflusszytometrische Bestimmung der CD3-CD19+ B-Lymphozyten und ihrer nach CD27 und CD 20 differenzierten Subpopulationen. a) Darstellung der zentrifugierten Zellen im SS/FS Dotplot und Selektion der PBMC im gate „lymphocytes“, da sich in diesem Bereich u.a zahlreiche Lymphozyten befinden b) Die im gate „lymphocytes“ enthaltenen PBMC werden im CD3 FITC/ CD19 PB Dotplot auf ihre Färbeeigenschaften hinsichtlich der beiden verwendeten fluoreszierenden Antikörper CD3 FITC und CD19 PB untersucht. Die CD3-CD19+ B-Lymphozyten befinden sich im gate „R2“ c) Die im gate „R2“ ausgewählten CD3-CD19+ B-Lymphozyten werden im CD27 PE/CD20 APCH7 Dotplot weiter auf ihre Färbeeigenschaften bezüglich der beiden verwendeten Antikörper CD27 PE und CD20 APCH7 untersucht

4.2.1 Analyse des Anteils der CD3-CD19+ B-Lymphozyten an den PBMC

Die erste zu analysierende Zellpopulation war die Gesamtheit der CD3-CD19+ B-Lymphozyten anteilig an den PBMC. Dazu wurden die aus dem EDTA Blut isolierten PBMC mit den Fluorochromen CD19 PB und CD3 FITC gelabelt und mittels FACS Analyse hinsichtlich ihres Oberflächenantigenprofils charakterisiert. Die erhaltenen Mittelwerte für die B-Lymphozytenanteile in % pro Versuchsgruppe sind in Tabelle 14 zusammengefasst.

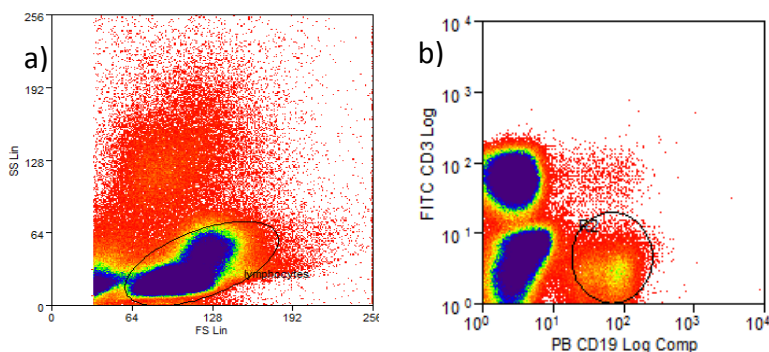


Abbildung 9: Bestimmung des Anteils der CD3-CD19+ B-Lymphozyten an den PBMC mittels FACS Analyse. a) Eingrenzung der PBMC im gate "lymphocytes" des SS/FS Dotplots b) Die mit den monoklonalen fluoreszierenden Antikörpern CD3 FITC und CD19 PB gelabelten PBMC werden im CD3 FITC/ CD19 PB Dotplot dargestellt. Das Gate „R2“ enthält die CD3-CD19+ B-Lymphozyten

Patientengruppe	MS ohne Therapie	MS mit Natalizumab	Gesunde Kontrolle
Ergebnisse	MW = 8,2%	MW = 8,5%	MW = 6,2%
CD3-CD19+ B-Lym- phozyten	SD = 4,1% n = 10	SD = 2,6% n = 10	SD = 2,8% n = 10

Tabelle 14: Anteile der CD3-CD19+ B-Lymphozyten an den PBMC

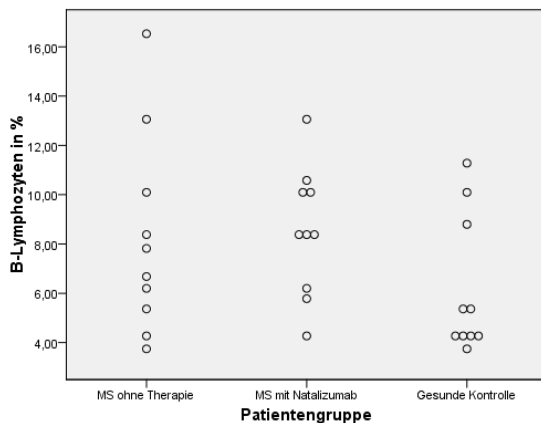


Abbildung 10: Anteile der CD3-CD19+ B-Lymphozyten an den PBMC bei den verschiedenen Versuchskollektiven Durch die FACS Analyse der mit den fluoreszierenden Antikörpern CD3 FITC und CD19 PB markierten PBMC wurde für jeden einzelnen Versuchsteilnehmer der drei Probandenkollektive der prozentuale Anteil der CD3-CD19+ B-Lymphozyten an den PBMC bestimmt. Jede der so ermittelten Prozentzahlen entspricht dem Wert genau eines MS Patienten ohne Therapie, eines MS Patienten mit Natalizumab oder eines gesunden Individuums.

4.2.2 Es gibt keine statistisch signifikanten Unterschiede in den Anteilen der CD3-CD19+ B-Lymphozyten an den PBMC zwischen den verschiedenen Versuchsgruppen

Zwischen den einzelnen Versuchsgruppen zeigen sich keine statistisch signifikanten Unterschiede in den Frequenzen der CD3-CD19+ B-Lymphozyten. Allerdings scheinen die B-Lymphozyten sowohl bei therapiefreien MS Patienten mit 8,2% ($p=0,315$) als auch Natalizumab-Patienten mit 8,5% ($p=0,105$) gegenüber der gesunden Kontrollgruppe (6,2%) tendenziell erhöht zu sein. Auch zeigt sich eine tendenziell erhöhte der B-Zell Frequenz durch die Therapie mit Natalizumab im Vergleich mit Therapie naiven MS Patienten ($p=0,436$).

4.3.1 Analyse des Anteils der CD3-CD19+CD20+CD27- naiven B-Lymphozyten an den CD3-CD19+ B-Lymphozyten

Bei der 4 fach FACS Färbung wurden zunächst die gesamten CD3-CD19+ B-Lymphozyten durch Färbung der PBMC mit den fluoreszierenden Antikörpern CD3 FITC und CD19 PB dargestellt. Die Population der CD3-CD19+ B-Lymphozyten wurde mit Hilfe zweier weiterer Färbungen mit CD20 APCH7 und CD27 PE genauer differenziert. Die Anteile der CD3-CD19+CD20+CD27- naiven B-Lymphozyten an den CD3-CD19+ gesamt B-Lymphozyten (in %) wurden ermittelt und die Mittelwerte pro Versuchsgruppe in Tabelle 15 zusammengefasst.

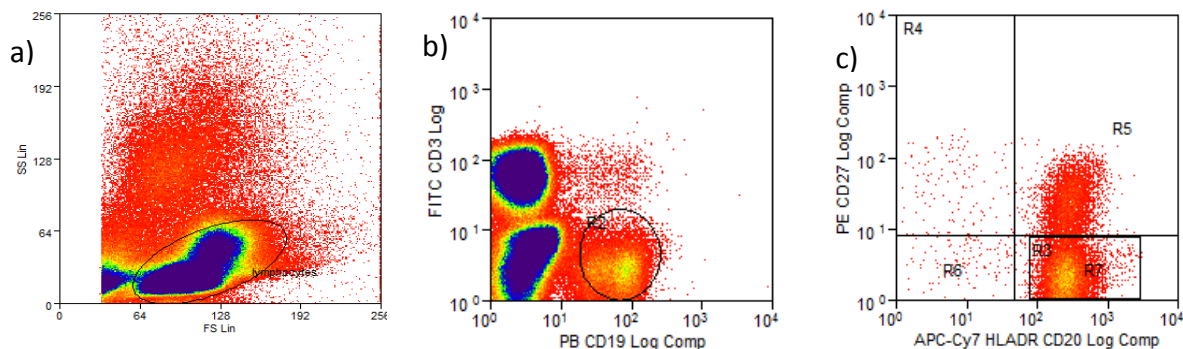


Abbildung 11: Bestimmung des Anteils der CD3-CD19+CD20+CD27- naiven B-Lymphozyten an den gesamten CD3-CD19+ B-Lymphozyten a) Selektion der aus dem Probandenblut gewonnenen PBMC im "lymphocytes" -gate des SS/FS Dotplots b) Darstellung der CD3-CD19+ B-Lymphozyten im gate „R2“ des CD3 FITC/ CD19 PB Dotplots nach Färbung der PBMC mit den Fluorochrom-Antikörpern CD3 FITC und CD19 PB c) Detektion der CD3-CD19+CD20+CD27- naiven B-Lymphozyten im gate „R7“ des CD20 APCH7/ CD27 PE Dotplots nach zusätzlicher Färbung der nach CD3 und CD 19 gefärbten PBMC mit den monoklonalen Fluorochrom-Antikörpern CD20 APCH7 und CD27 PE. Als Bezugspopulation für den CD20 APCH7 / CD27 PE Dotplot dient das gate „R2“ im CD3 FITC /CD19 PB Dotplot; das heißt nur die in „R2“ befindlichen CD3-CD19+ B-Lymphozyten werden weiter nach CD27 und CD20 differenziert.

Patientengruppe	MS ohne Therapie	MS mit Natalizumab	Gesunde Kontrolle
Ergebnisse	MW = 64,4%	MW = 54,9%	MW = 75,7%
CD3-CD19+ B-Lymphozyten	SD = 21,0%	SD = 22,8%	SD = 10,6%
	n = 10	n = 10	n = 10

Tabelle 15: Anteile der CD3-CD19+CD20+CD27- naiven B-Lymphozyten an den CD3-CD19+ gesamten B-Lymphozyten

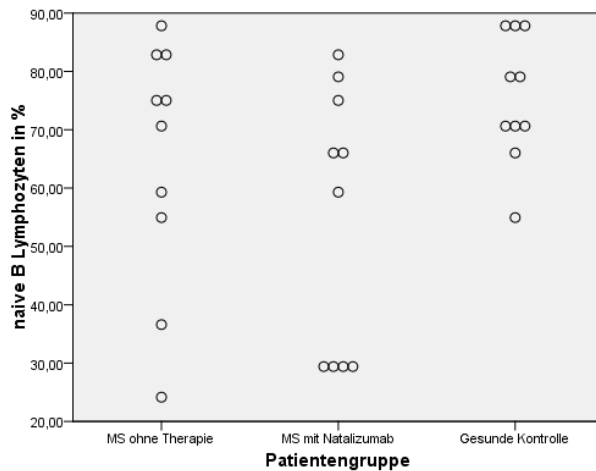


Abbildung 12: Anteile der CD3-CD19+CD20+CD27- naiven B-Lymphozyten an CD3-CD19+ B-Lymphozyten bei den verschiedenen Versuchskollektiven Durch die FACS Analyse der mit den fluoreszierenden Antikörpern CD3 FITC, CD19 PB, CD20 APCH7 und CD27 PE markierten PBMC wurde für jeden einzelnen Versuchsteilnehmer der drei Probandenkollektive der prozentuale Anteil der CD3-CD19+CD20+CD27- naiven B-Lymphozyten an den CD3-CD19+ B-Lymphozyten bestimmt. Jede der so ermittelten Prozentzahlen entspricht dem Wert genau eines MS Patienten ohne Therapie, eines MS Patienten mit Natalizumab oder eines gesunden Individuums.

4.3.2 Der Anteil der CD3-CD19+CD20+CD27- naiven B-Lymphozyten an den gesamten B-Lymphozyten ist bei Natalizumabpatienten gegenüber gesunden Kontrollen statistisch signifikant verringert

Der Anteil der CD3-CD19+CD20+CD27- naiven B-Lymphozyten an den gesamten B-Lymphozyten ist bei Patienten unter Natalizumabtherapie mit durchschnittlich 54,9% am niedrigsten. Statistisch signifikant ist der Unterschied im Vergleich zu den gesunden Kontrollen, welche mit 75,7% eine höhere Frequenz an naiven B-Lymphozyten aufweisen ($p=0,018$), nicht jedoch gegenüber den therapiefreien MS Patienten mit durchschnittlich 64,4% ($p=0,393$). Auch die MS Patienten ohne Therapie sind gegenüber den gesunden Kontrollen nur trendweise verringert ($p=0,315$). Zudem fällt bei den Natalizumabpatienten eine Teilung der Ergebnisse in zwei Gruppen auf, wobei vier Patienten besonders niedrige, die übrigen sechs hingegen hohe Werte aufweisen (s. Abb 12). Die durchschnittliche Verringerung der naiven B-Zellen

unter Natalizumab beruht hier also auf einer knappen Minderheit von vier Patienten mit niedrigen Werten statt auf einer allgemeinen Frequenzabnahme unter Therapie.

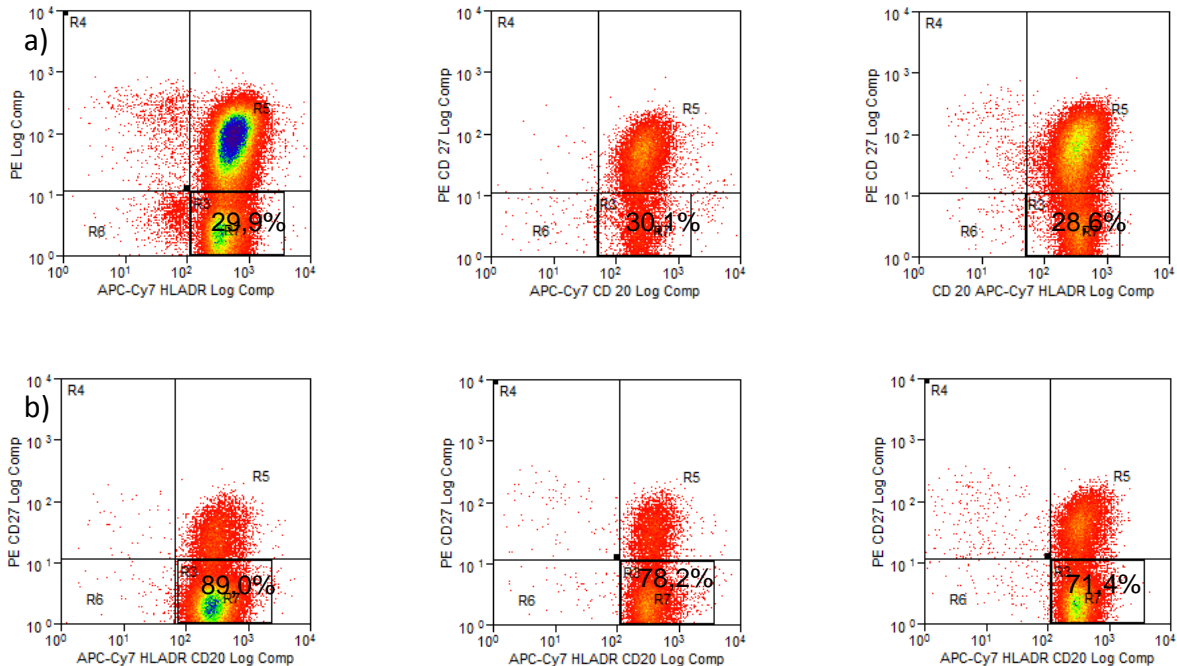


Abbildung 13: Exemplarische Darstellungen des Anteils der CD3-CD19+CD20+CD27- naiven B-Lymphozyten an den gesamten CD3-CD19+ B-Lymphozyten a) Die Anteile der naiven B-Lymphozyten an den gesamten B-Lymphozyten dreier Natalizumabpatienten mit besonders niedriger naiver B-Lymphozytenfrequenz betragen 29,9%; 30,1% und 28,6%. b) Die Anteile der naiven B-Lymphozyten an den gesamten B-Lymphozyten dreier gesunder Probanden betragen 89,0%; 78,2% und 71,4%.

4.4.1 Analyse des Anteils der CD3-CD19+CD20+CD27+ memory B-Lymphozyten an den gesamten B-Lymphozyten

Die CD3-CD19+CD20+CD27+ memory B-Lymphozyten stellen eine weitere Subpopulation der CD3-CD19+ B-Lymphozyten dar. Bei der 4-fach FACS-Färbung der PBMC wurden mit den Farbstoffen CD3-FITC und CD19-PB die CD3-CD19+ B-Lymphozyten dargestellt und diese durch die Farbstoffe CD20-APCH7 und CD27-PE weiter ausdifferenziert. Der prozentuale Anteil der CD3-CD19+CD20+CD27+ memory B-Lymphozyten an den CD3-CD19+ B-Lymphozyten wurde für die drei Versuchskollektive bestimmt und in Tabelle 16 zusammengefasst.

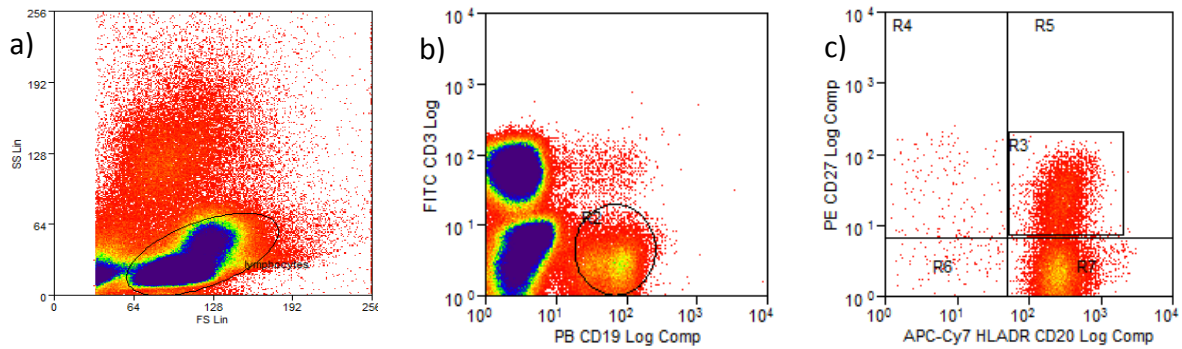


Abbildung 14: Bestimmung des Anteils der CD3-CD19+CD20+CD27+ memory B-Lymphozyten an den gesamten CD3-CD19+ B-Lymphozyten a) Eingrenzung der aus dem Probandenblut isolierten Zellen im "lymphocytes" -gate des SS/FS Dotplots b) Gating der CD3-CD19+ B-Lymphozyten in „R2“ im CD3 FITC/ CD19 PB Dotplot nach Färbung der PBMC mit CD3 FITC und CD19 PB c) Darstellung der CD3-CD19+CD20+-CD27+ memory B-Lymphozyten im gate „R3“ des CD20 APCH7/ CD27 PE Dotplots nach weiterer Färbung der mit CD3 und CD 19 markierten PBMC mit CD20 APCH7 und CD27 PE. Als Ausgangspopulation für den CD20 APCH7 / CD27 PE Dotplot dient das gate „R2“.

Patientengruppe	MS ohne Therapie	MS mit Natalizumab	Gesunde Kontrolle
Ergebnisse	MW = 33,4%	MW = 41,1%	MW = 20,1%
CD3-CD19+ B-Lym- phozyten	SD = 20,1% n = 10	SD = 21,2% n = 10	SD = 8,2% n = 10

Tabelle 16: Anteile der CD3-CD19+CD20+CD27+ memory B-Lymphozyten an den CD3-CD19+ gesamten B-Lymphozyten

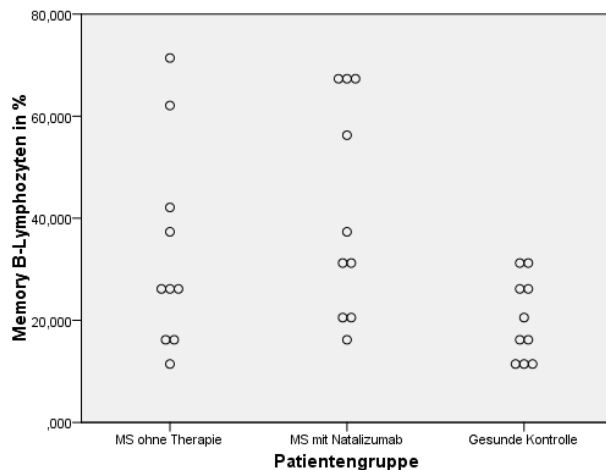


Abbildung 15: Anteile der CD3-CD19+CD20+CD27+ memory B-Lymphozyten an CD3-CD19+ B-Lymphozyten bei den verschiedenen Versuchskollektiven Durch die FACS Analyse der mit den fluoreszierenden Antikörpern CD3 FITC, CD19 PB, CD20 APCH7 und CD27 PE markierten PBMC wurde für jeden einzelnen Versuchsteilnehmer der drei Probandenkollektive der prozentuale Anteil der CD3-CD19+CD20+CD27- B-Lymphozyten an den CD3-CD19+ B-Lymphozyten bestimmt. Jede der so ermittelten Prozentzahlen entspricht dem Wert genau eines MS Patienten ohne Therapie, eines MS Patienten mit Natalizumab oder eines gesunden Individuums.

4.4.2 Der Anteil der CD3-CD19+CD20+CD27+ memory B-Lymphozyten an den gesamten B-Lymphozyten ist bei Natalizumabpatienten gegenüber gesunden Kontrollen statistisch signifikant erhöht

Der Anteil der CD3-CD19+CD20+CD27 memory B-Lymphozyten an den CD3-CD19+ B-Lymphozyten ist bei Natalizumabpatienten mit 41,6% gegenüber den anderen beiden Versuchsgruppen im Schnitt erhöht. Statistisch signifikant ist dieser Unterschied nur gegenüber der gesunden Kontrollgruppe mit durchschnittlich 20,1% ($p=0,008$), nicht jedoch gegenüber der therapiefreien MS Patientengruppe mit 33,4% ($p=0,481$). Die Werte der therapiefreien MS Patienten (33,4%) sind gegenüber der gesunden Kontrollgruppe (20,1%) ebenfalls nur trendweise erhöht ($p=0,067$). Vor dem Hintergrund der hier beobachteten durchschnittlichen Unterschiede und Trends muss angemerkt werden, dass die MS Patienten recht breit gestreute Messwerte aufweisen (s. Abb 15), besonders gilt dies für Natalizumabpat-

ienten mit vier hohen, drei mittleren und drei eher niedrigen Werten.

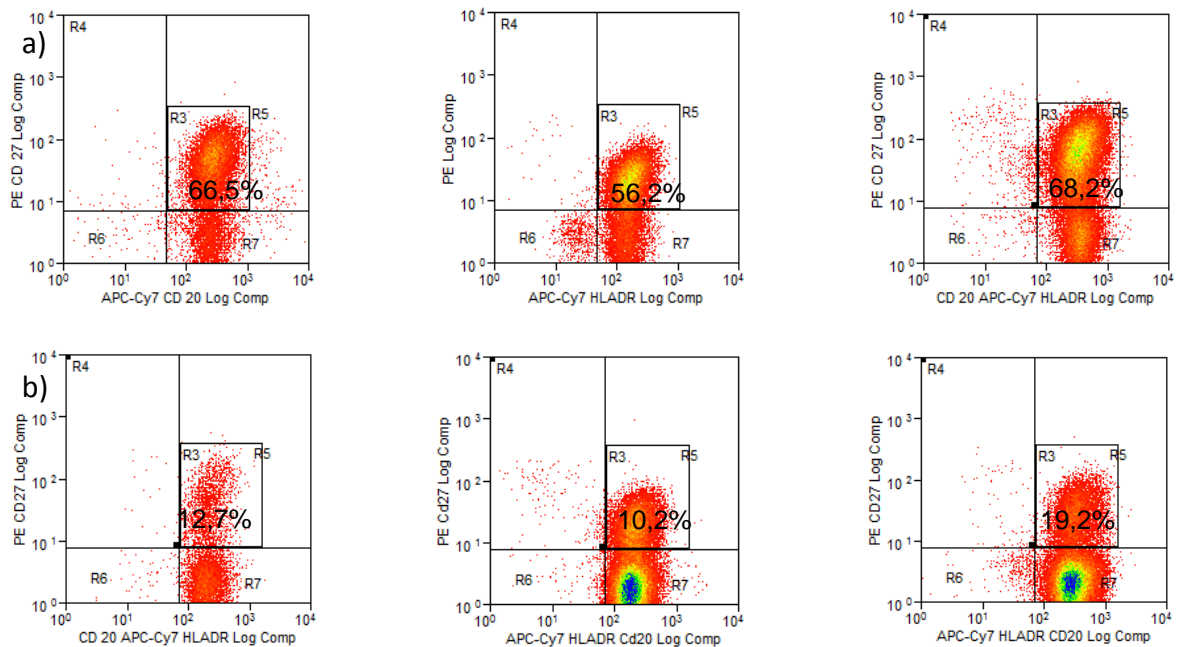


Abbildung 16: Exemplarische Darstellungen des Anteils der CD3-CD19+CD20+CD27+- memory B-Lymphozyten an den gesamten CD3-CD19+ B-Lymphozyten a) Die Anteile der memory B-Lymphozyten an den gesamten B-Lymphozyten dreier Natalizumabpatienten mit eher hohen Werten betragen 66,5%; 56,2% und 68,2%. b) Die Anteile der memory B-Lymphozyten an den gesamten B-Lymphozyten dreier gesunder Probanden betragen 12,7%; 10,2% und 19,2%.

4.5.1 Vergleich des Anteils der CD3-CD19+CD20-CD27++ Plasmablasten an den gesamten CD3-CD19+ B-Lymphozyten zwischen den verschiedenen Versuchsgruppen

Zentraler Bestandteil der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung von Alterationen in den Frequenzen der CD3-CD19+CD20-CD27++ terminal differenzierten B-Lymphozyten (Plasmablasten) anteilig an den gesamten CD3-CD19+ B-Lymphozyten zwischen den verschiedenen Versuchskollektiven. Durch die 4-fach FACS-Färbung der PBMC wurden mit den Farbstoffen CD3-FITC und CD19-PB die gesamten CD3-CD19+ B-Lymphozyten markiert und deren Subpopulationen durch die Farbstoffe CD20-APCH7 und CD27-PE ausdifferenziert.

Bei den CD3-CD19+CD20-CD27++ Plasmoplasten wurde darauf geachtet, dass nur deutlich CD27-positive Zellen (CD27++) für die Messungen berücksichtigt wurden. Die prozentualen Anteile der CD3-CD19+CD20-CD27++ terminal differenzierten B-Lymphozyten an den CD3-CD19+ B-Lymphozyten wurden für die drei Probandengruppen ermittelt und in Tabelle 17 aufgeführt.

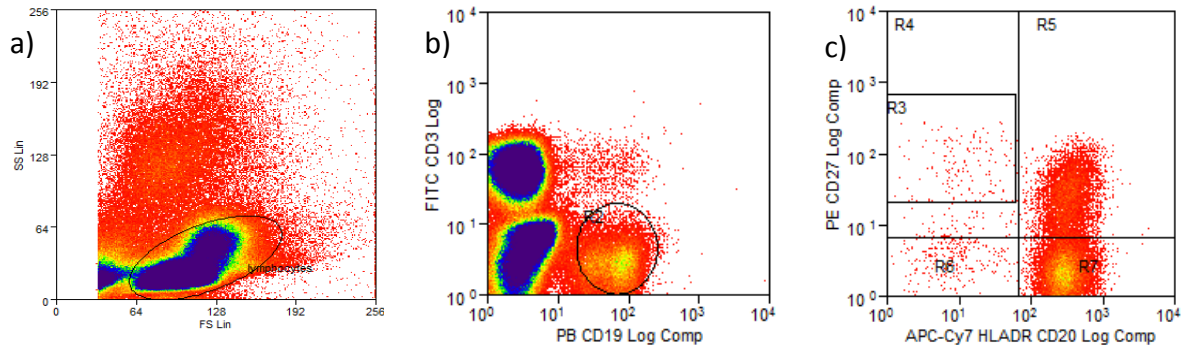


Abbildung 17: Bestimmung des Anteils der CD3-CD19+CD20-CD27++ terminal differenzierte B-Lymphozyten an den gesamten CD3-CD19+ B-Lymphozyten a) Eingrenzung der aus dem Probandenblut isolierten Zellen im "lymphocytes" -gate des SS/FS Dotplots b) Gating der CD3-CD19+ B-Lymphozyten in „R2“ im CD3 FITC/ CD19 PB Dotplot nach Färbung der PBMC mit CD3 FITC und CD19 PB c) Darstellung der CD3-CD19+CD20--CD27++ terminal differenzierte B-Lymphozyten im gate „R3“ des CD20 APCH7/ CD27 PE Dotplots nach weiterer Färbung der mit CD3 und CD 19 markierten PBMC mit CD20 APCH7 und CD27 PE. Als Ausgangspopulation für den CD20 APCH7 / CD27 PE Dotplot dient das gate „R2“.

Patientengruppe	MS ohne Therapie	MS mit Natalizumab	Gesunde Kontrolle
Ergebnisse	MW = 0,5%	MW = 0,5%	MW = 0,3%
CD3-CD19+ B-Lym- phozyten	SD = 0,5% n = 10	SD = 0,3% n = 10	SD = 0,3% n = 10

Tabelle 17: Anteile der CD3-CD19+CD20-CD27++ terminal differenzierten B-Lymphozyten an den CD3-CD19+ gesamten B-Lymphozyten

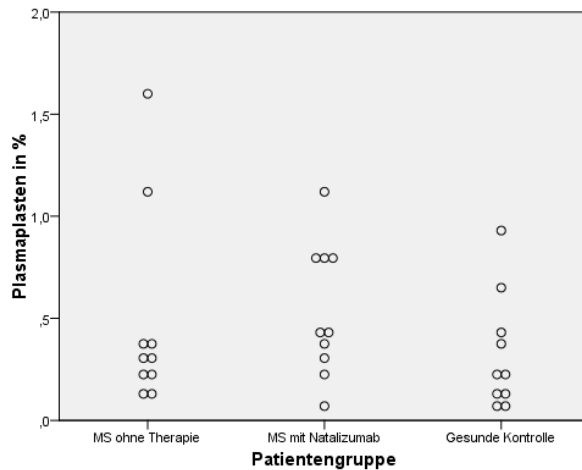


Abbildung 18: Anteile der CD3-CD19+CD20-CD27++ terminal differenzierten B-Lymphozyten an CD3-CD19+ B-Lymphozyten bei den verschiedenen Versuchskollektiven Durch die FACS Analyse der mit den fluoreszierenden Antikörpern CD3 FITC, CD19 PB, CD20 APCH7 und CD27 PE markierten PBMC wurde für jeden einzelnen Versuchsteilnehmer der drei Probandenkollektive der prozentuale Anteil der CD3-CD19+CD20+CD27- B-Lymphozyten an den CD3-CD19+ B-Lymphozyten bestimmt.

4.5.2 Es gibt keine statistisch signifikanten Unterschiede in den Anteilen der CD3-CD19+CD20-CD27++ Plasmoplasten an den gesamten B-Lymphozyten zwischen den verschiedenen Versuchsgruppen

Der Anteil der CD3-CD19+CD20-CD27++ Plasmoplasten an den CD3-CD19+ B-Lymphozyten ist bei der gesunden Kontrollgruppe mit 0,3% tendenziell geringer als bei den anderen beiden Versuchsgruppen mit je 0,5%. Signifikant ist dieser Unterschied allerdings weder gegenüber den therapiefreien MS Patienten ($p=0,481$) noch den MS Patienten unter Natalizumabtherapie ($p=0,105$). Auch zwischen den therapiefreien MS Patienten und den Natalizumabpatienten besteht, bei identischem Mittelwert, kein statistisch signifikanter Unterschied ($p=0,247$).

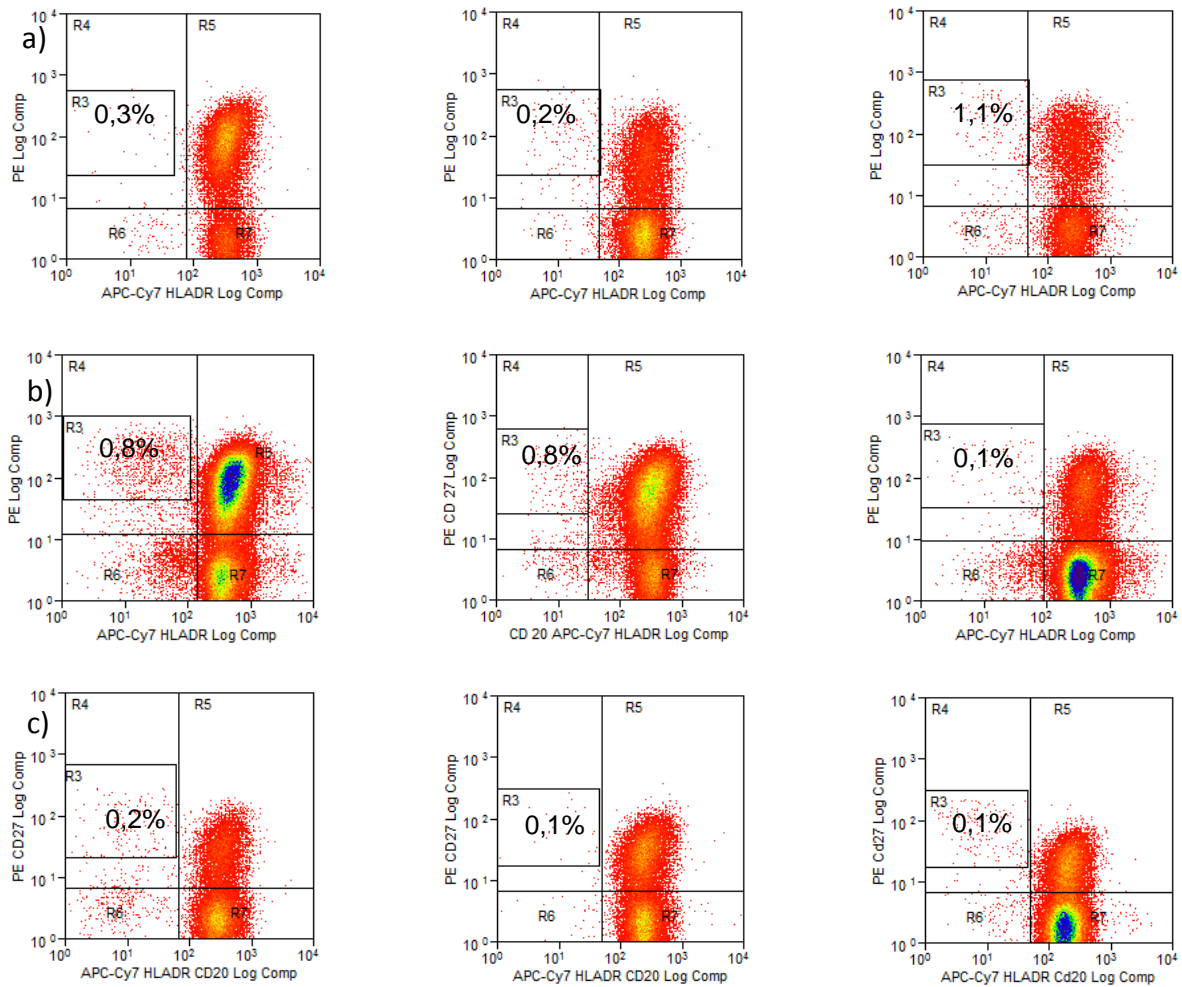


Abbildung 19: Exemplarische Darstellungen des Anteils der CD3-CD19+CD20-CD27++ terminal differenzierten B-Lymphozyten an den gesamten CD3-CD19+ B-Lymphozyten a) Die Anteile der terminal differenzierten B-Lymphozyten an den gesamten B-Lymphozyten dreier repräsentativer MS Patienten ohne krankheitsspezifische Therapie betragen 0,3%; 0,2% und 1,1%. b) Die Anteile der terminal differenzierten B-Lymphozyten an den gesamten B-Lymphozyten dreier repräsentativer MS Patienten mit Natalizumabtherapie betragen 0,8%; 0,8% und 0,1%. c) Die Anteile der terminal differenzierten B-Lymphozyten an den gesamten B-Lymphozyten dreier repräsentativer gesunder Probanden betragen 0,2%; 0,1% und 0,1%.

4.6 Serumanalysen bei MS Patienten und der gesunden Kontrollgruppe

Neben der Analyse der Frequenzen der verschiedenen B-Zellpopulationen durch die Immunphänotypisierung erfolgte die Serumanalyse mittels ELISA zur Bestimmung der Konzentrationen diverser mit dem Immunsystem assoziierter Serumpeptide und löslicher Antikörper. Die zu vergleichenden Probandenkollektive stellten abermals die therapiefreien MS Patienten, die MS Patienten mit Natalizumabtherapie sowie die gesunde Kontrollgruppe dar. Detektiert wurden die Konzentrationen der Immunglobuline IgG, IgA und IgM sowie der Zytokine BAFF, IL1 β , IL21, IL35 und TNF β . Da die untersuchten Serumproteine, auch unter Berücksichtigung der Ergebnisse der Immunphänotypisierung, wichtige Indikatoren der immunologischen Aktivität darstellen, ist ihre Rolle beim autoimmunen Geschehen der MS sowie der Immunotherapie mit Natalizumab von besonderem Interesse.

4.6.1 Die Serumkonzentration von IgG ist bei MS Patienten mit Natalizumabtherapie gegenüber gesunden Kontrollen statistisch signifikant verringert

In unseren Messungen ergaben sich keine Unterschiede in der IgG Serumkonzentration zwischen gesunden Individuen und MS Patienten ohne krankheitsspezifische Therapie ($p=0,739$). Allerdings konnte gezeigt werden, dass die Konzentration der gesamten IgG Antikörper unter Natalizumabtherapie gegenüber der gesunden Kontrollgruppe statistisch signifikant verringert ist ($p=0,006$), nicht jedoch gegenüber den MS Patienten ohne krankheitsspezifische Therapie ($p=0,053$). Die durchschnittliche IgG Serumkonzentration beträgt bei Natalizumabpatienten 15,3 mg/ml, bei therapiefreien MS Patienten 24,8 mg/ml und bei der gesunden Kontrollgruppe 24,2 mg/ml.

Patientengruppe	MS ohne Therapie	MS mit Natalizumab	Gesunde Kontrolle
Ergebnisse IgG in mg/ml	MW = 24,8 SD = 13,8 n = 10	MW = 15,3 SD = 4,4 n = 10	MW = 24,2 SD = 7,8 n = 10

Tabelle 18: Konzentrationen von IgG im Serum in mg/ml

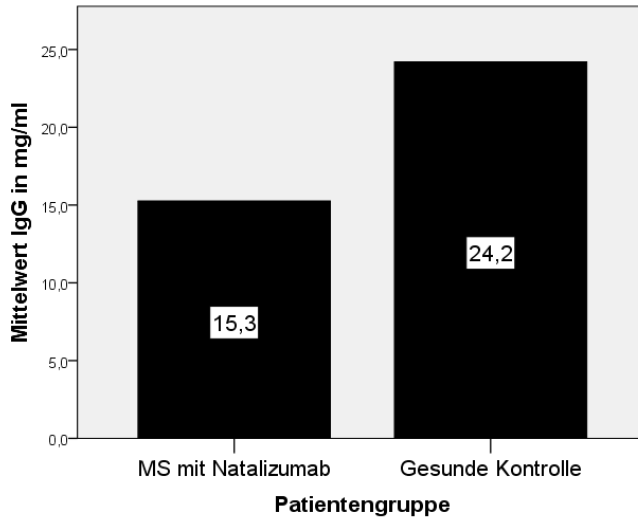


Abbildung 20: Die Serumkonzentration von IgG ist bei MS Patienten mit Natalizumabtherapie mit 15,3 mg/ml gegenüber gesunden Kontrollen mit 24,2 mg/ml signifikant verringert ($p=0,006$) Durch ELISA wurde die Konzentration von IgG im Probandenserum detektiert und im vorliegenden Balkendiagramm für die Gruppen MS mit Natalizumab und die gesunden Kontrollen dargestellt.

4.6.2 Es gibt keine statistisch signifikanten Unterschiede in den Serumkonzentrationen von IgA zwischen den verschiedenen Patientengruppen

Es gab keine Unterschiede in der IgA Konzentration zwischen therapielosen MS Patienten und gesunden Probanden ($p=0,968$). Bei den MS Patienten mit Natalizumab sind die Serumkonzentrationen von IgA im Vergleich zu den anderen Versuchsgruppen trendweise erhöht. Weder gegenüber den MS Patienten ohne krankheitsspezifische Therapie ($p=0,75$) noch gegenüber den gesunden Probanden ($p=0,195$) war dieser Unterschied jedoch signifikant. Die Konzentrationen waren im Mittelwert bei den Patienten unter Natalizumab 0,8 mg/ml, bei den MS Patienten ohne Therapie 1,7 mg/dl und bei den gesunden Kontrollen 1,6 mg/d

Patientengruppe	MS ohne Therapie	MS mit Natalizumab	Gesunde Kontrolle
Ergebnisse	MW = 1,7	MW = 0,8	MW = 1,6
IgA in mg/ml	SD = 1,2 n = 10	SD = 0,7 n = 10	SD = 1,4 n = 10

Tabelle 19: Konzentrationen von IgA im Serum in mg/ml

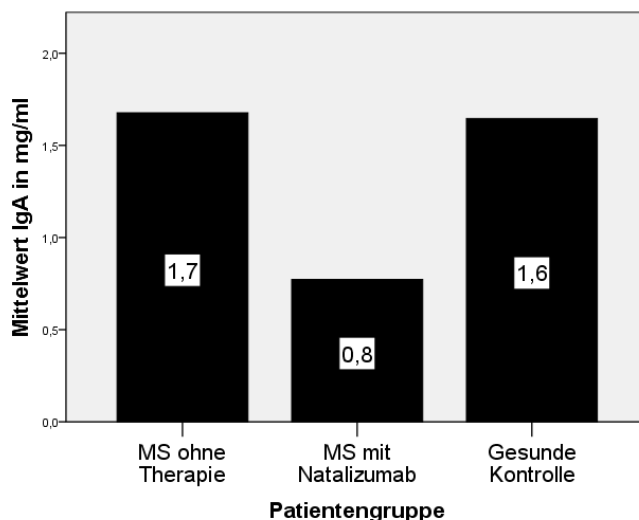


Abbildung 21: Es gibt keine signifikanten Unterschiede in den Serumkonzentrationen von IgA zwischen den verschiedenen Patientengruppen Die Konzentration von IgA im Serum der Probanden wurde mittels ELISA ermittelt und die Mittelwerte für die MS Patienten ohne Therapie, MS Patienten mit Natalizumab und die gesunde Kontrollgruppe in das Balkendiagramm übertragen

4.6.3.1 Die Serumkonzentration von IgM ist bei MS Patienten mit Natalizumabtherapie gegenüber MS Patienten ohne krankheitsspezifische Therapie statistisch signifikant verringert

Die Serumkonzentration von IgM zeigte sich bei den MS Patienten mit Natalizumabtherapie gegenüber den anderen beiden Versuchsgruppen verringert. Der Unterschied war gegenüber den MS Patienten ohne krankheitsspezifische Therapie statistisch signifikant ($p=0,002$), aber nicht gegenüber den gesunden Kontrollen ($p=0,089$). Die IgM Konzentrationen betrugen 4,9 mg/ml für die Natalizumabpatienten, 7,6 mg/ml für die therapiefreien MS Patienten und 6,2 mg/ml für die gesunde Kontrollgruppe.

4.6.3.2 Die Serumkonzentration von IgM ist bei MS Patienten ohne krankheitsspezifische Therapie gegenüber gesunden Kontrollen statistisch signifikant erhöht

Neben den MS Patienten unter Natalizumabtherapie ist die IgM Konzentration der therapiefreien MS Patienten mit durchschnittlich 7,6 mg/ml auch gegenüber den gesunden Kontrollen mit durchschnittlich 6,2 mg/ml statistisch signifikant erhöht ($p=0,029$).

Patientengruppe	MS ohne Therapie	MS mit Natalizumab	Gesunde Kontrolle
Ergebnisse	MW = 7,6	MW = 4,9	MW = 6,2
IgM in mg/ml	SD = 1,7 n = 11	SD = 1,7 n = 10	SD = 1,0 n = 10

Tabelle 20: Konzentrationen von IgM im Serum in mg/ml

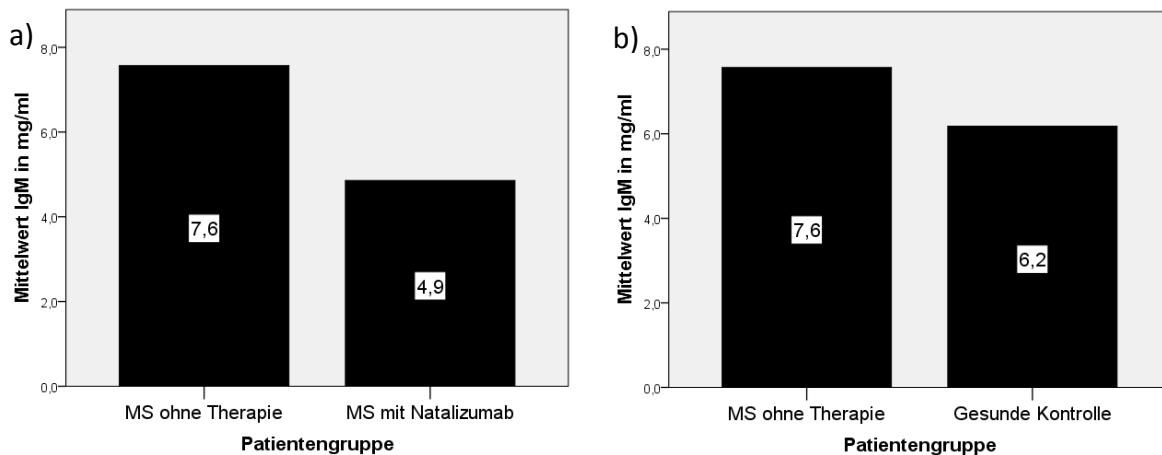


Abbildung 22: a) Die Serumkonzentration von IgM ist bei Natalizumabpatienten mit 4,9 mg/ml gegenüber MS Patienten ohne Therapie mit 7,6 mg/ml statistisch signifikant verringert ($p=0,002$) b) Die Serumkonzentration von IgM ist bei MS Patienten ohne krankheitsspezifische Therapie mit 7,6 mg/ml gegenüber gesunden Kontrollen mit 6,2 mg/ml statistisch signifikant erhöht ($p=0,029$) Durch Messungen mittels ELISA konnte die Konzentration von IgM im Probandenserum bestimmt werden. Die Mittelwerte für a) die MS Patienten ohne Therapie und MS Patienten mit Natalizumabtherapie sowie b) MS Patienten ohne Therapie und gesunde Kontrollen sind in den vorliegenden Balkendiagrammen zusammengefasst.

4.6.4 Es gibt keine statistisch signifikanten Unterschiede in den Serumkonzentrationen von BAFF zwischen den verschiedenen Patientengruppen

Die ELISA Serumanalyse ergab eine tendenzielle Verringerung der BAFF Serumwerte für MS Patienten ohne Therapie gegenüber gesunden Kontrollen. Signifikant war dieser Unterschied nicht ($p=0,824$). Für die MS Patienten mit Natalizumab zeigte sich eine tendenziell erhöhte Konzentration von BAFF, dies war weder gegenüber den therapiefreien MS Patienten ($p=0,28$) noch der Gruppe der gesunden Kontrollen ($p=0,092$) gegenüber statistisch signifikant. Die durchschnittlichen Werte der Konzentrationen von BAFF beliefen sich auf 1,5 $\mu\text{g/ml}$ bei den Natalizumabpatienten, 1,3 $\mu\text{g/ml}$ bei den MS Patienten ohne krankheitsspezifische Therapie und 1,3 $\mu\text{g/ml}$ bei den gesunden Kontrollen.

Patientengruppe	MS ohne Therapie	MS mit Natalizumab	Gesunde Kontrolle
Ergebnisse	MW = 1,3	MW = 1,5	MW = 6,2
BAFF in $\mu\text{g/ml}$	SD = 0,4 n = 10	SD = 0,3 n = 10	SD = 0,2 n = 10

Tabelle 21: Konzentrationen von BAFF im Serum in $\mu\text{g/ml}$

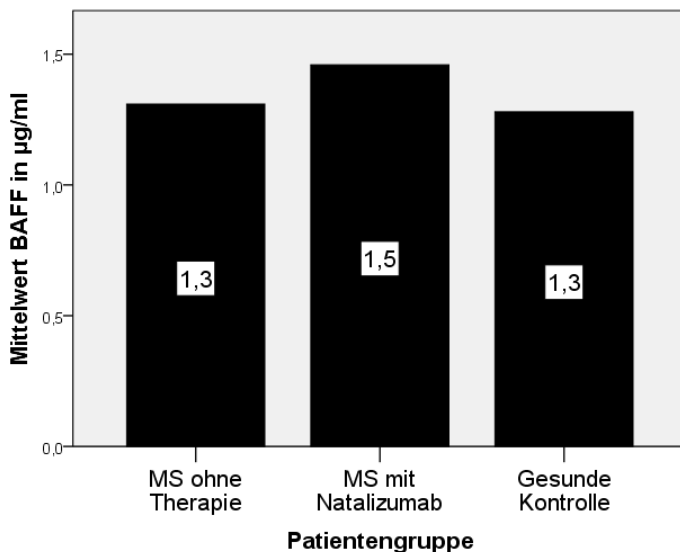


Abbildung 23: Es gibt keine signifikanten Unterschiede in den Serumkonzentrationen von BAFF zwischen den verschiedenen Patientengruppen Die Konzentration von BAFF im Serum der Probanden wurde mittels ELISA ermittelt und die Mittelwerte für die MS Patienten ohne Therapie, MS Patienten mit Natalizumab und die gesunde Kontrollgruppe in das Balkendiagramm übertragen

4.6.5 Es gibt keine statistisch signifikanten Unterschiede in den Serumkonzentrationen von $\text{IL1}\beta$ zwischen den verschiedenen Patientengruppen

Es konnte zwischen MS Patienten ohne Therapie und gesunden Versuchsteilnehmern kein signifikanter Unterschied der $\text{IL1}\beta$ Serumkonzentration festgestellt werden ($p=0,971$). Bei den MS Patienten mit Natalizumabtherapie zeigte sich eine tendenzielle Verringerung der Konzentration von $\text{IL1}\beta$ gegenüber MS Patienten ohne krankheitsspezifische Therapie ($p=0,912$) sowie gegenüber den gesunden Kontrollen ($p=0,853$).

Im Einzelnen betragen die durchschnittlichen Werte 4,2 pg/ml für die MS Patienten ohne Therapie, 3,1 pg/ml für die Natalizumabpatienten und 3,3 pg/ml für die gesunde Kontrollgruppe.

Patientengruppe	MS ohne Therapie	MS mit Natalizumab	Gesunde Kontrolle
Ergebnisse	MW = 4,2	MW = 3,1	MW = 3,3
Il1 β in pg/ml	SD = 3,3 n = 10	SD = 1,7 n = 10	SD = 1,3 n = 10

Tabelle 22: Konzentrationen von Il1 β im Serum in pg/ml

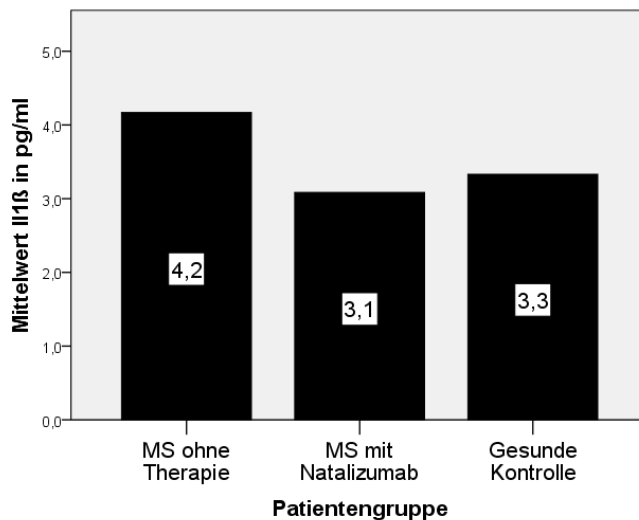


Abbildung 24: Es gibt keine signifikanten Unterschiede in den Serumkonzentrationen von Il1 β zwischen den verschiedenen Patientengruppen Die Konzentration von Il1 β im Serum der Probanden wurde mittels ELISA untersucht und die Durchschnittswerte für die MS Patienten ohne Therapie, MS Patienten mit Natalizumabtherapie und die gesunde Kontrollgruppe in das Balkendiagramm übernommen.

4.6.6 Die Serumkonzentration von Il21 ist bei MS Patienten mit Natalizumabtherapie gegenüber der gesunden Kontrollgruppe statistisch signifikant verringert

Die Serumanalyse ergab, dass die Konzentration von Il21 im Serum bei therapiefreien MS Patienten gegenüber gesunden Kontrollen nur trendweise erhöht ist

($p=0,701$). Darüber hinaus konnte bei MS Patienten mit Natalizumab gegenüber der gesunden Kontrollgruppe eine signifikante Verringerung von IL21 gemessen werden ($p=0,043$), allerdings nur eine trendweise Verringerung gegenüber den MS Patienten ohne Therapie ($p=0,088$). Die Konzentrationen von IL21 betragen durchschnittlich 29,7 pg/ml bei den Natalizumabpatienten, 79,9 pg/ml bei den therapienaiven MS Patienten und 59,2 pg/ml bei der gesunden Kontrollgruppe.

Patientengruppe	MS ohne Therapie	MS mit Natalizumab	Gesunde Kontrolle
Ergebnisse	MW = 79,9	MW = 29,7	MW = 59,2
IL21 in pg/ml	SD = 86,4 n = 11	SD = 20,1 n = 10	SD = 41,9 n = 10

Tabelle 23: Konzentrationen von IL21 im Serum in pg/ml

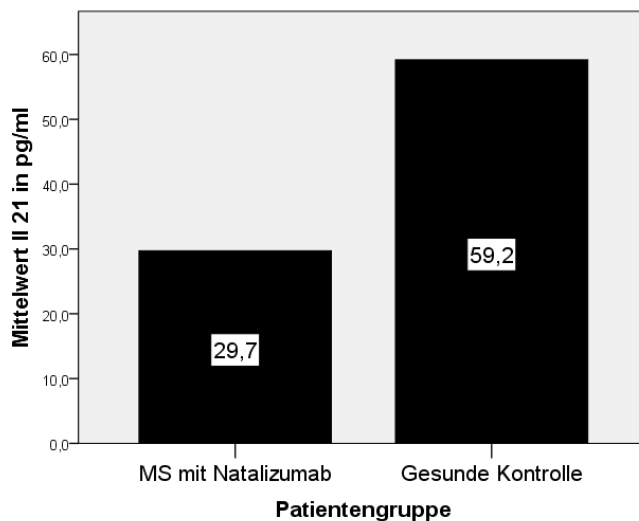


Abbildung 25: Die Serumkonzentration von IL21 ist bei MS Patienten mit Natalizumabtherapie mit 29,7 pg/ml gegenüber gesunden Kontrollen mit 59,2 pg/ml signifikant verringert ($p=0,043$) Die durch ELISA ermittelte Konzentration von IL21 im Serum wurde im vorliegenden Balkendiagramm für die Gruppen MS mit Natalizumab und die gesunden Kontrollen aufgeführt.

4.6.7 Die Serumkonzentration von II35 ist bei MS Patienten mit Natalizumabtherapie gegenüber MS Patienten ohne krankheitsspezifische Therapie statistisch signifikant verringert

Es konnte bei den ELISA Messungen gezeigt werden, dass die Konzentration von II35 im Serum bei MS Patienten ohne Therapie gegenüber gesunden Individuen nur tendenziell erhöht ist ($p=0,517$). Bei Patienten mit Natalizumabtherapie ist die II35 Konzentration gegenüber den MS Patienten ohne Therapie statistisch signifikant verringert ($p=0,019$), jedoch nur trendweise gegenüber der gesunden Kontrollgruppe ($p=0,099$). Die Mittelwerte betragen 2,8 pg/ml für die MS Patienten unter Natalizumabtherapie, 17,5 pg/ml für die MS Patienten ohne krankheitsspezifische Therapie und 14,4 pg/ml für die gesunde Kontrollgruppe.

Patientengruppe	MS ohne Therapie	MS mit Natalizumab	Gesunde Kontrolle
Ergebnisse	MW = 17,5	MW = 2,8	MW = 14,4
II35 in pg/ml	SD = 16,0 n = 10	SD = 8,2 n = 10	SD = 19,4 n = 10

Tabelle 24: Konzentrationen von II35 im Serum in pg/ml

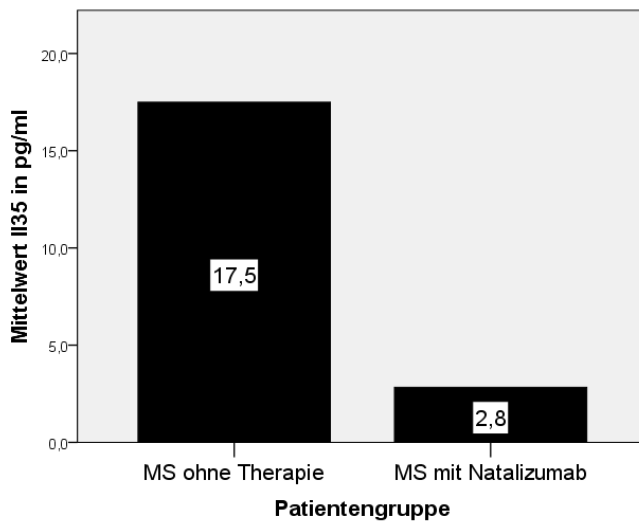


Abbildung 26: Die Serumkonzentration von IL35 ist bei MS Patienten mit Natalizumabtherapie mit 2,8 pg/ml gegenüber MS Patienten ohne Therapie mit 17,5 pg/ml signifikant verringert ($p=0,019$). Die durch Serumanalyse ermittelte Konzentration von IL35 wurde im vorliegenden Balkendiagramm für die Gruppen MS ohne Therapie und MS mit Natalizumab dargestellt.

4.6.8 Die Serumkonzentration von TNF β ist bei MS Patienten mit Natalizumabtherapie gegenüber der gesunden Kontrollgruppe statistisch signifikant verringert

Die ELISA Messung von TNF β ergaben bei trendweiser Verringerung für MS Patienten ohne Therapie keinen signifikanten Unterschied gegenüber gesunden Kontrollen ($p=0,314$). Allerdings zeigte sich bei den Patienten mit Natalizumabtherapie gegenüber der gesunden Kontrollgruppe eine statistisch signifikante Verringerung der TNF β Konzentration ($p=0,037$), aber nicht gegenüber den MS Patienten ohne Therapie ($p=0,133$). Die Mittelwerte sind 0,7 $\mu\text{g/ml}$ für die MS Patienten unter Natalizumabtherapie, 1,1 $\mu\text{g/ml}$ für die MS Patienten ohne Therapie und 1,6 $\mu\text{g/ml}$ für die gesunde Kontrollgruppe.

	MS ohne Therapie	MS mit Natalizumab	Gesunde Kontrolle
Ergebnisse	MW = 1,1	MW = 0,7	MW = 1,6
TNF β in $\mu\text{g/ml}$	SD = 0,8 n = 11	SD = 0,3 n = 10	SD = 1,2 n = 10

Tabelle 25: Konzentrationen von TNF β im Serum in $\mu\text{g/ml}$

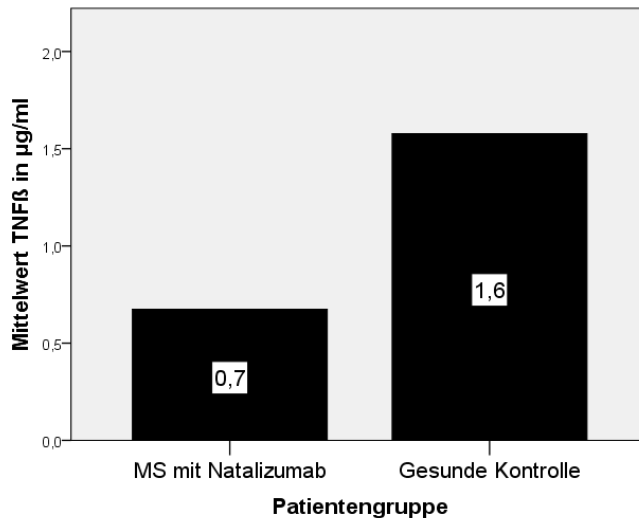


Abbildung 27: Die Serumkonzentration von TNF β ist bei MS Patienten mit Natalizumabtherapie mit 0,7 $\mu\text{g/ml}$ gegenüber gesunden Kontrollen mit 1,6 $\mu\text{g/ml}$ signifikant verringert ($p=0,037$)
Mittels ELISA wurde die Serumkonzentration von TNF β detektiert. Die Mittelwerte sind in einem Balkendiagramm für die Gruppen MS mit Natalizumab und die gesunden Kontrollen aufgenommen.

5. Diskussion

5.1 Unterschied in der Frequenz der CD3-CD19+ B-Lymphozyten bei MS Erkrankung

Unsere Untersuchungen ergaben keinen statistisch signifikanten Unterschied in der Frequenz der CD3-CD19+ gesamten B-Lymphozyten zwischen therapiefreien MS Patienten und gesunden Individuen. Tendenziell scheint die B-Zellfrequenz bei vorliegender MS Erkrankung aber leicht erhöht zu sein.

In der Literatur finden sich diesbezüglich unterschiedliche Angaben. Nach Haas et al. wirkt sich die MS Erkrankung negativ sowohl auf absolute Anzahl der Gesamt-B-Lymphozyten als auch auf ihren Anteil an den gesamten PBMC im peripheren Blut aus [119]. Komplementär dazu wird eine Erhöhung verschiedener B-Lymphozytenpopulationen im Liquor cerebrospinalis festgestellt, welche mit einer intrathekalen Konzentrationserhöhung des chemotaktisch wirksamen CXCL13 korreliert [119]. Die naheliegende Vermutung, dass die vermehrte Migration der B-Lymphozyten ins ZNS für die periphere Minderung der B-Zell-Frequenz hauptverantwortlich ist, kann jedoch angesichts der weiterhin im Vergleich zum peripheren Blut geringen B-Zellkonzentration im ZNS angezweifelt werden [120]. Eine neuere Studie von Hadid et al. kommt hingegen zu dem Ergebnis, dass sich die Konzentration der Gesamt-B-Zellen durch die MS erhöht [121]. Hier werden als möglicher Hauptgrund krankheitsassoziierte Veränderungen der B-Zellhomöostase postuliert [121]. Welcher Mechanismus den Veränderungen der B-Zellkonzentration genau zu Grunde liegt und ob diese eine Ursache oder eher Folge der Erkrankung sind, gilt es weiterhin zu klären.

5.2 Unterschied in der Frequenz der CD3-CD19+ B-Lymphozyten bei Natalizumabtherapie

Unsere Untersuchungen ergeben keine statistisch signifikanten Frequenzunterschiede der CD3-CD19+ gesamten B-Lymphozyten durch Natalizumab. Es scheint jedoch eine trendweise Erhöhung der B-Lymphozytenfrequenz durch die Natalizumabtherapie gegenüber den anderen beiden Versuchsgruppen zu bestehen.

In der Literatur wird hingegen eine signifikante Erhöhung der B-Zellkonzentration unter Natalizumab von mehreren Quellen beschrieben. Planas et al. konnten durch quantitative Analyse unterschiedlicher B-Zellpopulationen zeigen, dass die periphere B-Zellvermehrung vor allem auf eine verstärkte Freisetzung von CD34+CD38+ lymphoiden B-Progenitorzellen aus dem Knochenmark zurückzuführen ist [122]. Ursache hierfür ist vermutlich die Natalizumab-vermittelte Inhibition und Downregulierung des Retentionsfaktors $\alpha 4\beta 1$ Integrin auf der Progenitorzelloberfläche, wodurch deren physiologische Adhäsion in primären lymphatischen Organen im Rahmen der Lymphozytenreifung aufgehoben wird [123]. Über die Hemmung von $\alpha 4\beta 1$ Integrin durch Natalizumab sollen ebenfalls vermehrt Mantenzell-like-B-Lymphozyten und Gedächtnis-B-Lymphozyten aus Milz und Payerschen Plaques freigesetzt werden [122]. Der verringerten B-Lymphozytenmigration ins ZNS unter Natalizumab wird für die Erhöhung peripherer B-Zellzahlen eine eher untergeordnete Bedeutung beigemessen [120, 122]. Im Liquor cerebrospinalis verringert Natalizumab nicht nur die Konzentration der B-Lymphozyten, sondern eliminiert auch in einigen Fällen intrathekale oligoklonale Antikörperbanden [124]. Da intrathekale B-Zellen und oligoklonale Antikörper als pathogenetische Faktoren der MS etabliert sind [114, 115], könnte dieser Mechanismus für die Krankheitsremission unter Therapie eine gewisse Rolle spielen. Eine Langzeitstudie von Koudriavtseva et al. ergab, dass die B-Zellkonzentrationen im peripheren Blut auch nach 48 Monaten Dauertherapie noch konstant erhöht sind [120]. Differenzen zwischen unseren Ergebnissen und jenen

der Literatur könnten von unserem kleinen Probandenkollektiv herrühren, sodass sich bei einer höheren Probandenzahl möglicherweise eine statistisch signifikante statt nur trendweise Erhöhung der B-Lymphozyten ergeben hätte.

5.3 Unterschiede in der Frequenz der CD3-CD19+CD20+CD27- naiven B-Lymphozyten bei MS

Unsere Messungen zeigen, dass MS Patienten eine geringere Frequenz CD3-DC19+CD20+CD27- naiver B-Lymphozyten aufweisen. Statistisch signifikant ist der Unterschied jedoch nicht.

Unsere Ergebnisse stehen im Gegensatz zu bisher durchgeführten Studien. Gemäß Haas et al. ist die Frequenz der CD20+CD27-IgD+ naiven B-Lymphozyten anteilig an den CD19+ gesamten B-Zellen bei MS Patienten gegenüber gesunden Kontrollen signifikant erhöht [119]. Ob diese Frequenzerhöhung auf einer absoluten Vermehrung der naiven B-Zellen im Blut beruht oder lediglich relativ aufgrund der Verminderung der Frequenzen anderer B-lymphozytärer Subpopulationen wie der CD27+ (class-switched und unswitched) memory B-Lymphozyten zu verzeichnen ist, wird hingegen nicht geklärt [119]. Zwar stellen naive B-Zellen Lymphozyten ohne stattgehabten spezifischen Antigenkontakt und subsequente Aktivierung dar, im Tiermodell konnte jedoch gezeigt werden, dass naive B-Zellen anit inflammatorischer Effektorzytokine wie Il10 sezernieren, die physiologisch zur Regulation von Selbsttoleranz und Containment autoimmuner Krankheitsbilder wie rheumatoider Arthritis beitragen [125, 126]. Wiederum konnte eine Überproduktion von Il10 durch B-Zellen mit SLE und dem Sjögren Syndrom in Verbindung gebracht werden [127, 128]. Nach Duddy et al. ist bei MS eine verringerte Sekretion von Il10 durch naive B-Lymphozyten nachgewiesen worden [125]. Diese Ergebnisse legen nahe, dass die protektive Wirkung von Il10 bei der autoimmunen Pathogenese nur in umschriebenen Konzentrationsbereichen gelten könnte. Weitere Forschungsarbeit ist für ein genaueres Verständnis der immunologischen Rolle naiver B-Lymphozyten notwendig.

5.4 Unterschiede in der Frequenz der CD3-CD19+CD20+CD27- naiven B-Lymphozyten unter Natalizumab

In unseren Untersuchungen zeigte sich der Anteil der CD3-CD19+CD20+CD27- naiven B-Lymphozyten an den gesamten B-Lymphozyten bei Patienten mit Natalizumabtherapie gegenüber der gesunden Kontrolle statistisch signifikant erniedrigt. Diese durchschnittliche Verminderung war bei uns auf besonders niedrige Messwerte bei einer knappen Minderheit von vier Patienten zurückzuführen, während die anderen sechs Natalizumabpatienten hohe Messwerte aufwiesen. Gegenüber therapiefreien MS Patienten lässt sich zumindest eine trendweise Verringerung der naiven B-Zellen unter Natalizumab beobachten.

Die von uns ermittelte Tendenz stimmt mit den Ergebnissen verschiedener Studien überein. So konnten Haas et al. eine signifikante Verringerung des Anteils der CD20+CD27-IgD+ naiven B-Lymphozyten an den CD19+ B-Lymphozyten unter Natalizumab nachweisen [119]. Auch Planas et al. ermittelten bei Natalizumabpatienten einen niedrigeren Anteil von CD27-IgD+ naiven B-Lymphozyten an CD19+ gesamt-B-Lymphozyten [122]. Interessant ist, dass sich die hierbei gemessene Verringerung naiver B-Lymphozyten auf deren relativen Anteil an den B-Zellen bezieht: Angesichts der Natalizumab-assoziierten Steigerung der B-Lymphozytenkonzentration und Verschiebungen der Proportionen zwischen den B-Zellsubpopulationen im Blut [122, 129] muss dies keinen absoluten Rückgang der peripheren naiven B-Zellen bedeuten. In einer Studie von Zanotti et al. wurde unter Natalizumab eine erhöhte absolute Konzentration naiver B-Zellen im Blut gemessen [130]. Allerdings fällt der Effekt von Natalizumab auf die Homöostase naiver B-Zellen im Vergleich zu B-Gedächtniszellen und Marginalzonen-like B-Zellen eher gering aus, da naive B-Lymphozyten den Retentionsfaktor $\alpha 4\beta 1$ Integrin, welcher durch Natalizumab gehemmt wird, nur schwach exprimieren [122]. Somit ist die Frequenzverminderung naiver B-Zellen möglicherweise durch die überproportionale Steigerung anderer B-Zellpopulationen unter Natalizumab zu erklären.

5.5. Unterschiede in der Frequenz der CD3-CD19+CD20+CD27+ memory B-Lymphozyten bei MS Erkrankung

Der Anteil der CD3-CD19+CD20+CD27+ memory B-Lymphozyten an den CD3-CD19+ B-Lymphozyten ist bei therapiefreier MS Erkrankung gegenüber der gesunden Kontrollgruppe trendweise erhöht.

Unsere gemessene Tendenz steht im Widerspruch zu den Ergebnissen älterer Studien. Nach Haas et al. ist die Frequenz von sowohl IgD+ unswitched als auch IgD-switched CD19+CD27+ memory B-Lymphozyten bei Patienten mit aktiver RRMS gegenüber gesunden Kontrollen jeweils signifikant vermindert [119]. Laut der Studie migrieren bei aktiver RRMS vermehrt Isotyp-switched IgD- CD19+CD27+ memory B-Lymphozyten aus dem Blut in den Liquor cerebrospinalis, wobei sich eine Inverse Korrelation zwischen der Konzentration dieser Zellen im Liquor und peripheren Blut zeigt [119]. Die IgD- switched CD19+CD27+ memory B-Lymphozyten reagieren dabei von allen B-Zell Subtypen am sensibelsten auf den chemotaktisch wirksamen Faktor CXCL13, welcher bei erhöhter Krankheitsaktivität der RRMS vermehrt im Plexus chorioideus und meningealen Gefäßen, den Hauptstrukturen leukozytärer Diapedese in den Liquor, exprimiert wird [119, 131]. Nach Duddy et al. werden aktivierte CD19+CD27+ memory B-Lymphozyten physiologisch mit der Sezernierung proinflammatorischer Zytokine wie Tumor Nekrose Faktor α und Lymphotoxin α in Verbindung gebracht, welche eine wichtige Rolle bei der Immunstimulation und der Follikelgenese spielen [125]. Bei multipler Sklerose wird entsprechend eine ektoper meningeale Bildung von Keimzentren beschrieben durch welche sich die intrathekale Lymphozytenpopulation selbst erhalten kann [112, 115]. Für das genaue Verständnis der pathogenetischen Bedeutung der intrathekalen Akkumulation isotyp-switched memory B-Lymphozyten bei RRMS bedarf es weiterer Forschung. Die Diskrepanz zwischen unserer Studie und den bisherigen Ergebnissen könnte zum Beispiel durch eine Verzerrung unserer Werte durch Störvariablen und unsere kleine Probandenzahl bedingt sein.

5.6 Unterschiede in der Frequenz der CD3-CD19+CD20+CD27+ memory B-Lymphozyten unter Natalizumabtherapie

Unsere Experimente ergeben, dass der Anteil der CD3-CD19+CD20+CD27+ memory B-Lymphozyten an den CD3-CD19+ B-Lymphozyten unter Natalizumabtherapie gegenüber der gesunden Kontrollgruppe signifikant erhöht ist. Gegenüber der therapiefreien MS Patientengruppe ist die CD3-CD19+CD20+CD27+ memory B-Zellfrequenz bei Natalizumabpatienten lediglich trendweise erhöht.

Der von uns beobachtete Trend stimmt mit den Angaben aus der Literatur überein. So kommen Mellergård et al. in einer Verlaufsstudie zu dem Ergebnis, dass sich der Anteil von CD19+CD27+ memory B-Lymphozyten an den gesamt-CD19+ B-Lymphozyten bei MS Patienten nach Beginn der Natalizumabtherapie gegenüber den prätherapeutischen Baselinewerten signifikant erhöht [132]. Gleichzeitig wurde in der Studie eine Steigerung der absoluten CD19+ gesamt-B-Lymphozytenkonzentration im peripheren Blut nach Therapiebeginn festgestellt [132]. Auch Planas et al. konnten nachweisen, dass der Anteil der CD27+ memory B-Zellen an CD19+ B-Zellen innerhalb der ersten 6 Monaten nach Therapiebeginn mit Natalizumab signifikant ansteigt und für die Dauer der 30-monatigen Therapie konstant erhöht bleibt [122]. Als Grund für die Frequenzerhöhung der CD19+CD27+ Gedächtnis- B-Lymphozyten unter Natalizumab wird eine veränderte B-Zell-Homöostase vermutet [122]. Die Hemmung des Adhäsionsmoleküls $\alpha 4\beta 1$ Integrin durch Natalizumab verringert die Integrin-abhängige Retention von Mantelzell-like-B-Lymphozyten und Gedächtnis-B-Lymphozyten in sekundären lymphatischen Organen wie der Milz und dem GALT [122]. Dadurch werden diese Zellen vermehrt ins periphere Blut freigesetzt [122]. Die durch Natalizumab verursachte Verminderung der leukozytären Transmigration durch die Blut-Hirn-Schranke trägt zur Frequenzsteigerung der CD20+CD27+ memory B-Zellen in der Peripherie nur untergeordnet bei [119]. Ein potentiell negativer Einfluss von Natalizumab auf das B-Zellhoming in menigeale Follikel [133, 134] könnte aber für den therapeutischen Effekt eine Rolle spielen.

5.7 Unterschied in der Frequenz der CD3-CD19+CD20-CD27++ terminal differenzierten B- Lymphozyten bei MS

Der Anteil der CD3-CD19+CD20-CD27++ Plasmablasten an den CD3-CD19+ B-Lymphozyten ist bei therapiefreien MS Patienten tendenziell höher als bei der gesunden Kontrollgruppe. Es besteht jedoch kein statistisch signifikanter Unterschied.

In der Literatur finden sich diesbezüglich unterschiedliche Angaben. Entgegen unseren Messungen zeigt sich die Frequenz der CD20-CD27+ Plasmablasten im peripheren Blut nach Rovituso et al. bei unbehandelten MS Patienten gegenüber gesunden Kontrollen signifikant erhöht [135]. Nach Haas et al. wiederum weisen gesunde Individuen und unbehandelte MS Patienten eine fast identische Frequenz von Plasmablasten anteilig an den gesamten B-Lymphozyten im Blut auf, allerdings werden Plasmablasten in dieser Studie durch die Antigenkonstellation CD20-CD38+CD138+HLA-DR+ charakterisiert [119]. Zudem kommt die Studie zu dem Schluss, dass zwischen der intrathekalen Konzentration des chemotaktisch aktiven Faktors CXCL13 und der Plasmablastenfrequenz im Liquor cerebrospinalis keine signifikante Korrelation besteht, dementsprechend wird auf eine geringe migratorische Kapazität anitgensezernierender Zellen wie Plasmazellen und Plasmablasten aus dem Blut in den Liquor geschlossen [119]. Die Erhöhung der Plasmablastenfrequenz im Liquor bei aktiver MS kann im Hinblick auf die unveränderte Frequenz dieser Zellen im peripheren Blut darauf hinweisen, dass sich Antikörper sezernierende Zellen des Liquors aus bereits eingewanderten B-Zelllinien wie den isotyp-switched memory B-Zellen rekrutieren und sich einige Zellpopulationen intrathekal selbst zu erhalten scheinen [116, 119]. Plasmablasten konnten von Cepok et al. als Haupteffektor der intrathekalen IgG Synthese identifiziert werden, auch korrelierte die Frequenz der Plasmablasten im Liquor von allen B-Zellsubpopulationen am stärksten mit der Anzahl und Ausdehnung T1 gewichteter Läsionen im MRT [136]. Die Heterogenität dieser Ergebnisse könnte durch allgemein sehr niedrige Frequenz

der Plasmablasten sowie deren rasche Fluktuation zwischen verschiedenen Kompartimenten erklärbar sein.

5.8 Unterschiede in der Frequenz der CD3-CD19+CD20-CD27++ terminal differenzierten B- Lymphozyten bei Natalizumabtherapie

Die zentrale Frage dieser Arbeit ist, inwiefern sich die Immunotherapie mit Natalizumab auf den Anteil der CD3-CD19+CD20-CD27++ terminal differenzierten B-Lymphozyten (Plasmablasten) an den CD3-CD19+ gesamt-B-Lymphozyten auswirkt. In unseren Experimenten konnten wir zeigen, dass MS Patienten unter Natalizumab und therapiefreie MS Patienten eine identische Plasmablastenfrequenz aufweisen. Auch zwischen Natalizumabpatienten und gesunden Kontrollen, welche eine geringfügig geringere Frequenz terminal differenzierter B-Lymphozyten besitzen, besteht kein statistisch signifikanter Unterschied.

In der Literatur gibt es diesbezüglich unterschiedliche Angaben. Übereinstimmend mit unseren Messungen kommen Haas et al. zu dem Ergebnis, dass der Anteil der Plasmablasten an den gesamten B-Zellen unter Natalizumab im Vergleich zu unbehandelten MS Patienten unverändert ist [119]. Hingegen ist bei Rovituso et al. die Frequenz der Plasmablasten im peripheren Blut unter Natalizumab im Vergleich zu therapiefreier MS signifikant verringert [135]. Dies steht im Widerspruch zu unseren Ergebnissen. In einer Studie von Villar et al. konnte eine signifikante Reduktion der Plasmablasten im Liquor cerebrospinalis durch die Therapie mit Natalizumab nachgewiesen werden [137]. Es wird vermutet, dass Natalizumab eine Freisetzung von Plasmablasten und anderen Antikörper-sezernierenden Zellen aus dem intrathekalen Kompartiment in die Peripherie bewirkt, indem es die intrathekale VLA-4-abhängige Verankerung dieser Zellen inhibiert [137]. Auch könnte Natalizumab das B-Zellhoming in ektope menigeale Follikel inhibieren und damit den intrathekalen B-Zell Pool und den Pool Antikörper sezernierender Zellen verringern [133, 134]. Die

Frequenzminderung von Antikörper sezernierenden Zellen und der von ihnen produzierten Immunglobuline im Liquor gelten als Marker für eine erfolgreiche Therapieresponse unter Natalizumab [137]. Während die Immunotherapie bei allen Patienten der Studie zu einer signifikant verminderten CD4+ T-Helferzellkonzentration im Liquor führte, ließ sich nur bei Patienten mit optimalem Ansprechen auf die Therapie eine signifikante Reduktion intrathekaler B-Lymphozyten und Plasmablasten feststellen [137]. Warum die Redistribution der Plasmablasten aus dem Liquor in die Peripherie unter Natalizumab zu keinem messbaren reziproken Anstieg der Plasamblastenfrequenz im Blut zu führen scheint, muss durch weitere Forschung untersucht werden. Auch gilt es zu klären, welche individuellen Voraussetzungen eine günstige Therapieresponse unter Natalizumab durch verminderte Plasmablasten- und Antikörperkonzentrationen im Liquor determinieren.

5.9 Unterschiede in den Serumkonzentrationen von IgG, IgA und IgM

Unsere Messungen ergeben, dass die Serumkonzentration von IgG bei therapiefreien MS Patienten gegenüber gesunden Kontrollen lediglich trendweise erhöht ist. Auch konnten wir zeigen, dass die Konzentration der gesamten IgG Antikörper im Serum unter Natalizumabtherapie gegenüber der gesunden Kontrollgruppe signifikant verringert ist. Gegenüber MS Patienten ohne Therapie besteht hingegen nur eine trendweise Verringerung der IgG Konzentration durch Natalizumab. Übereinstimmend mit unseren Messungen kommen Mehta et al. zu dem Ergebnis, dass es keine signifikanten Unterschiede in den Serumkonzentrationen von IgG zwischen MS Patienten und gesunden Individuen gibt [138]. Entgegen unseren Ergebnissen zeigten sich in einer Studie von Selter et al. jedoch signifikant verringerte IgG Serumkonzentrationen unter Natalizumab im Vergleich zu therapie-naiven MS Patienten [133]. Auch dies könnte wieder von unserem kleinen Patientenkollektiv herrühren, da wir immerhin eine trendweise Verringerung von IgG unter Natalizumab beobachten konnten. In unseren Versuchen konnten wir nachweisen, dass es keine

signifikanten Unterschiede in der Serumkonzentration von IgA zwischen den Versuchsgruppen gibt. Dies stimmt mit Messungen von Selter et al. überein, wonach Natalizumab die Serumkonzentration von IgA kaum beeinflusst [133]. Bei uns war die IgM Serumkonzentration der therapiefreien MS Patienten gegenüber den gesunden Kontrollen statistisch signifikant erhöht. Zudem zeigte sich in unseren Versuchen die Serumkonzentration von IgM bei den Natalizumab Patienten gegenüber den MS Patienten ohne krankheitsspezifische Therapie signifikant verringert. Übereinstimmend mit unseren Ergebnissen konnten Selter et al. eine signifikante Verringerung von IgM im Serum durch Natalizumab im Vergleich zu therapie-naiven MS Patienten nachweisen [133].

Nach Selter et al. ist die Verringerung der IgG und IgM Antikörper im Serum durch Natalizumab wahrscheinlich auf die veränderte B-Zellhomöostase unter Therapie zurückzuführen [133]. Dies könnte eine Verringerung der B-Zellfollikelbildung im lymphatischen System und damit eine verminderte Differenzierung der B-Lymphozyten zu Antikörper-sezernierenden Zellen zur Folge haben [133, 139]. Auch wird vermutet, dass durch Natalizumab die Integrin-/VLA-4 abhängige Zellretention und das Homing von Plasmablasten in Nischen des Knochenmarks, wo sie sekretorisch besonders aktiv sind, negativ beeinflusst werden [133]. Eine Ausnahme hiervon bilden IgA sezernierende Zellen, deren Homöostase in geringerem Ausmaß von VLA-4 abhängig ist [133, 140]. Zudem konnte bei guter Response gegenüber Natalizumab eine signifikante Verringerung der intrathekalen IgM- und IgG-Synthese bei gleichzeitiger Abnahme der intrathekalen Konzentration von B-Zellen sowie Antikörper-sezernierenden Zellen demonstriert werden [137]. Eine hypothetische Ursache dafür könnte die Inhibition des B-Zellhomings in ektopye menigeale Follikel durch Natalizumab darstellen [133, 134], aus welchen sich die Immunzellen des Liquors partiell rekrutieren. Die pathomechanische Rolle der intrathekalen (oligoklonalen) Antikörper bei der Schädigung des Myelins ist inzwischen gut etabliert [114, 115]. Hingegen stellt sich die Frage, ob die Verringerung von peripherem IgG und IgM unter Natalizumab ursächlich zur Krankheitsremission beiträgt oder reines Beiprodukt der

veränderten B-Zellhomöostase ist.

5.10 Unterschiede in den Serumkonzentrationen von BAFF

Das Zytokin BAFF (B cells activating factor of the TNF family) gehört zur Familie der Tumornekrose Faktoren und ist ein wichtiger Differenzierungsfaktor der B-Lymphozyten [141]. BAFF wird u.a. von Monozyten und dendritischen Zellen produziert [141]. Es kann sowohl als Transmembranprotein oder nach Cleavage-Prozessen als löslicher Faktor vorliegen [141]. BAFF stellt einen wichtigen Überlebensfaktor reifer und unreifer der B-Zellen dar und kann die Entwicklung von unreifen B-Lymphozyten zu Übergangs-B-Lymphozyten unterstützen [142]. Erhöhte BAFF Konzentrationen werden mit Autoimmunerkrankungen wie SLE in Verbindung gebracht [141]. BAFF als Überlebensfaktor der B-Lymphozyten wird im ZNS konstitutiv von Astrozyten sezerniert [143]. Dies könnte bei der Selbsterhaltung der B-Zellen in ektopen meningealer Follikeln [116] bei MS von Bedeutung sein.

Die ELISA Serumanalyse ergab keinen Unterschied in der BAFF Serumkonzentration zwischen therapiefreien MS Patienten und gesunden Kontrollen. Auch konnte eine für die MS Patienten mit Natalizumab tendenziell erhöhte Konzentration von BAFF nachgewiesen werden. Dies war weder gegenüber den therapiefreien MS Patienten noch den gesunden Kontrollen gegenüber statistisch signifikant. Über die Serumkonzentrationen von BAFF bei MS finden sich unterschiedliche Angaben in der Literatur. Gemäß Kannel et al. ist die Serumkonzentration von BAFF bei MS Patienten gegenüber gesunden Kontrollen signifikant erhöht [144]. Allerdings umfasst die Gruppe der MS Patienten in dieser Studie auch Individuen unter Basis- bzw. immunsuppressiver Therapie [144]. Interessanterweise waren in der Studie die BAFF Konzentrationen im Serum bei klinisch stabiler MS höher als während aktiver RRMS [144].

Eine neuere Studie von Dooley et al. hat jedoch eine nahezu identische BAFF Serumkonzentration zwischen gesunden Individuen und unbehandelten MS Patienten festgestellt [145]. Auch zwischen unbehandelten MS Patienten und Patienten mit Natalizumab gab es keine signifikanten Unterschiede der BAFF Konzentration [145]. Beides deckt sich mit unseren Messergebnissen. In derselben Studie korrelierte die BAFF Konzentration der gesamten Kohorte, darunter MS Patientenkollektive mit unterschiedlichen DMDs, positiv mit der peripheren Frequenz der Übergangs-B-Zellen und negativ mit der Frequenz der case switched memory B-Lymphozyten [145]. Unter den Übergangs-B-Zellen wird eine erhöhte Anzahl autoreaktiver Zellen und damit einerseits ein Zusammenhang mit autoimmuner Pathogenese, andererseits aber auch regulierende Eigenschaften postuliert [145, 146]. Nach den Ergebnissen von Puthenparampil ist die BAFF Konzentration im Liquor cerebrospinalis bei MS Patienten mit nachweisbaren oligoklonalen Banden im Liquor bei Einsetzen der klinischen Symptomatik im Vergleich zu gesunden Kontrollen und Patienten mit negativem Liquorbefund signifikant verringert [147]. Als Grund wird eine Absorption von BAFF durch die intrathekalen B-Lymphozyten vermutet [147].

5.11 Unterschiede in den Serumkonzentrationen von Il1 β

Bei Il1 β handelt es sich um ein proinflammatorisches Zytokin, welches vorwiegend von monozytären Zellen sezerniert wird [148]. Seine Wirkungen, vermittelt durch den Il1 Oberflächenrezeptor, umfassen neben der Kostimulation von T- Zellen auch die Anregung der B-Zellproliferation sowie die Produktion weiterer proinflammatorischer Zytokine [149]. Bei MS konnten in den zentralnervösen Läsionen erhöhte Konzentrationen von Il1 β nachgewiesen werden [150]. Es wird vermutet, dass Il1 β zur Expression von Entzündungsmediatoren im ZNS, zu strukturellen Veränderungen der Blut-Hirn-Schranke sowie zur direkten Apoptose von Neuronen und Oligodendrozyten beiträgt [149].

In unseren Messungen wiesen MS Patienten ohne Therapie eine trendweise erhöhte Konzentration von IL1 β im Serum auf als gesunde Kontrollen. Bei MS Patienten mit Natalizumab konnte eine tendenzielle Verringerung der Konzentration von IL1 β gegenüber Therapie-naiven MS Patienten nachgewiesen werden. Statistisch signifikant waren diese Unterschiede nicht. Die Angaben in der Literatur zur Konzentration von IL1 β bei MS sowie unter Immunotherapie mit Natalizumab sind widersprüchlich. Nach Ergebnissen von Dujmovic et al. zeigte sich die Konzentration von IL1 β im Serum bei MS Patienten gegenüber der gesunden Kontrollgruppe signifikant erhöht [149], was im Widerspruch zu unseren Messungen steht. Eine von Mellergård et al. durchgeführte Studie kommt hingegen zu dem Ergebnis, dass es keine signifikanten Konzentrationsunterschiede von IL1 β zwischen gesunden Kontrollen und unbehandelten MS Patienten gibt [151]. Dieses Resultat wiederum steht im Einklang mit unseren Daten. Außerdem konnten in der Studie von Mellergård et al. bei einer Längsschnittuntersuchung zwischen MS Patienten vor und nach einem Jahr intravenöser Therapie mit Natalizumab keine signifikanten Veränderungen der Serumkonzentration von IL1 β festgestellt werden [151]. Auch dies deckt sich mit unseren Ergebnissen. Gleichzeitig wurde nach einem Jahr Natalizumabtherapie eine Verringerung diverser proinflammatorischer Zytokine, darunter neben IL1 β auch IL6 und IL8, im Liquor cerebrospinalis festgestellt [151], was zu einer Minderung des entzündlichen Geschehens im ZNS und damit zur Besserung der klinischen Symptomatik beitragen könnte. Dabei war für keines dieser Zytokine eine simultane Konzentrationserhöhung im peripheren Blut zu verzeichnen, was aufgrund der Sequestration von Immunzellen in der Peripherie durch Natalizumab eigentlich zu erwarten gewesen wäre [151]. Daher werden bezüglich sekretorisch aktiver Immunzellen weitere therapieassoziierte homöostatische Veränderungen, beispielsweise Alterationen des Homings in sekundäre lymphatische Organe, postuliert [151]. Es wäre interessant zu wissen, inwiefern auch peripheres IL1 β zur autoimmunen Pathogenese beiträgt und die Diskrepanz zwischen den vorangegangenen Studienergebnissen hinsichtlich der IL1 β Serumkonzentration bei MS etwa auch mit Unterschieden in Krankheitsverlauf bei den einzelnen Patienten in Verbindung stehen könnte.

5.12 Unterschiede in den Serumkonzentrationen von IL21

Das Zytokin IL21 wird von TH17-Zellen, TH2-Zellen und NK-Zellen sezerniert und wirkt an dem von diversen Immun- und nicht-Immunzellen exprimierten IL21 Oberflächenrezeptor [152]. IL21 wirkt stimulierend auf die Aktivierung, Proliferation und das Überleben von TH-Zellen und B-Lymphozyten [152]. Dabei wird die Differenzierung von B-Zellen zu Antikörper sezernierenden Plasmazellen angeregt [153] sowie Antikörperproduktion gefördert [154]. Gleichzeitig inhibiert IL21 die Entstehung von antiinflammatorischen Treg Zellen zu Gunsten erhöhter proinflammatorischer TH17-Zellen [155-157] und verstärkt die Resistenz der CD4+CD25- T-Effektorzellen gegen die suppressive Wirkung der CD4+CD25+ regulatorischen T-Zellen [158]. IL21 konnte mit Autoimmunerkrankungen wie rheumatoider Arthritis in Verbindung gebracht werden [159].

Die Serumanalyse ergab eine trendweise Erhöhung von IL21 bei unbehandelter MS gegenüber gesunden Kontrollen. Zudem ließ sich eine verminderte IL21 Konzentration bei MS Patienten mit Natalizumab gegenüber den anderen beiden Patientenkollektiven nachweisen. Statistisch signifikant war dieser Unterschied gegenüber der gesunden Kontrollgruppe, allerdings nicht gegenüber den MS Patienten ohne krankheitsspezifische Therapie. Bisherige Daten über IL21 bei MS sind widersprüchlich, auch finden sich über die Rolle der Natalizumabtherapie nur spärliche Angaben. Zwar wird übereinstimmend mit unseren Messungen bei Wang et al. keine Veränderung der IL21 Serumkonzentration zwischen MS Patienten und gesunden Kontrollen festgestellt [160]; jedoch konnten Tegla et al. auf mRNA Ebene eine vermehrte IL21 Expression während eines MS Relapses aufzeigen [161]. Außerdem erbrachten Romme Christensen et al. mit Messung einer vermehrten IL21- und IL21 Rezeptorexpression durch CD4+ T-Zellen bei progressiver MS erste Hinweise einer MS assoziierten erhöhten Sensitivität des Immunsystems für IL21 [162]. Die erhöhte IL21 und IL21R Expression gilt nach Tzartos et al. auch für CD4+ T-Zellen innerhalb MS spezifischer Läsionen im ZNS [163]. Interessanterweise gab es gemäß einer Studie von

Wu et al. jedoch keine erhöhten IL21 Spiegel im Liquor bei multipler Sklerose [164]. Es wird vermutet, dass IL21 durch die beschriebene Treg-Zell-Suppression bei simultaner TH17 up-Regulation zur Progression der MS beiträgt, TH17 Zellen wird dabei eine zentrale Rolle in der Pathogenese der autoimmunen Inflammation bei MS beigemessen [152]. Allerdings sind etwaige Effekte von IL21 auf B-Lymphozyten, Makrophagen oder Mikroglia im Hinblick auf die MS bisher kaum erforscht [152]. Auch fehlen bezüglich der Auswirkung von Natalizumab auf die IL21 Serumkonzentration bislang kohärente Daten. Im Hinblick auf Ergebnisse von Studien mit Alemtuzumab bzw. Mitoxantron, deren Applikation jeweils zu einer Senkung des IL21 Spiegels bzw. -expression bei MS Patienten führte [162, 165], kann jedoch die von uns gemessene Verringerung der IL21 Konzentration zumindest als plausibel angenommen werden und könnte mit einer Besserung der MS Symptomatik assoziiert sein. Zur Erlangung genauer Erkenntnisse über die Rolle von IL21 bezüglich Pathogenese und therapieassoziierter Remission der MS ist weitere Forschungsarbeit erforderlich.

5.13 Unterschiede in den Serumkonzentrationen von IL35

Bei IL35 handelt es sich um ein hauptsächlich von CD4+CD25+ Foxp3+ Treg – Zellen sezerniertes Zytokin mit inhibitorischem Einfluss andere Immunzellen [166]. Weitere mit Treg – Zellen assoziierte Zytokine wie IL10 und TGF β haben ebenfalls einen immunsuppressiven Effekt [167]. Für die Pathogenese von Autoimmunität bei MS wurde eine Fehlregulation von Treg-Zellen mehrfach beschrieben [168-170].

Bei unseren ELISA Messungen zeigten sich keine signifikanten Konzentrationsunterschiede von IL35 zwischen gesunden Probanden und unbehandelten MS Patienten. Allenfalls konnte bei MS Patienten ohne Therapie eine nicht signifikante Erhöhung der IL35 Konzentration gegenüber gesunden Individuen beobachtet werden. Die IL35 Konzentration im Serum bei Patienten mit Natalizumabtherapie war gegen-

über MS Patienten ohne Therapie signifikant verringert. Auch bestand eine trendweise Verringerung der IL35 Serumkonzentration bei der Natalizumabgruppe gegenüber den gesunden Kontrollen.

Im Einklang mit unseren Ergebnissen konnten in einer aktuellen Studie von Jafarzadeh et al. trotz tendenzieller Erhöhung der IL35 Werte für MS Patienten ohne Therapie keine signifikanten Unterschiede der Serumkonzentration von IL35 zwischen unbehandelten MS Patienten und gesunden Kontrollen festgestellt werden [171]. Eine Studie von Stenner et al. ergab, dass die Frequenz von Foxp3+ Treg – Zellen im peripheren Blut durch Natalizumab nicht signifikant beeinträchtigt wird [172]. Außerdem war Natalizumab nicht in der Lage, die MS-assoziierte Funktionsminderung der Tregs wiederherzustellen [172]. Es wird daher vermutet, dass der therapeutische Effekt von Natalizumab nicht wesentlich von der Wirkung regulatorischer T-Zellen abhängt [172]. Ob sich trotz der unveränderten Frequenz und Funktion der Tregs durch Natalizumab dennoch ein Unterschied in der Serumkonzentration von IL35 unter Therapie manifestieren kann, wie es in unserem Experiment der Fall war, muss durch weitere Messungen geklärt werden.

5.14 Unterschiede in den Serumkonzentrationen von TNFβ

Tumor Nekrose Faktor beta (TNFβ), auch Lymphotoxin α genannt, ist ein von T-Lymphozyten sezerniertes proinflammatorisches Zytokin [173, 174]. Es ist eng mit TNFα verwandt und bindet kompetitiv an denselben TNF Rezeptor, obgleich die Wirkung der beiden Zytokine nicht bei allen Zielzellen identisch ist [174].

Unsere Messung von TNFβ ergab für MS Patienten trendweise verringerte Serumkonzentrationen als bei gesunden Kontrollen. Bei den Patienten mit Natalizumabtherapie wurde gegenüber den anderen beiden Versuchsgruppen eine verminderte Konzentration festgestellt. Der Unterschied ist gegenüber der gesunden Kontroll-

gruppe statistisch signifikant, aber nicht gegenüber den MS Patienten ohne Therapie. In der Literatur fehlt es an Daten über die Serumkonzentrationen von TNF β bei multipler Sklerose und Natalizumabtherapie. Bekannt ist jedoch, dass mononukleäre Zellen im peripheren Blut und im Liquor cerebrospinalis bei MS mit einer erhöhten TNF β Sezernierung in Verbindung gebracht werden konnten [175]. Sollte dies mit erhöhten Serumwerten von TNF β korrelieren, stünde das im Widerspruch zu unseren Ergebnissen.

Nach einer Studie von Rieckmann et al. ist die gemessene TNF β Freisetzung durch Immunzellen während eines akuten Schubes besonders ausgeprägt [176]. Neben den PBMC konnte die Produktion von TNF β auch bei Zellen des ZNS, vorwiegend bei Astrozyten, nachgewiesen werden [177]. An der Blut-Hirn-Schranke soll TNF β zu einer erhöhten endothelialen Expression von Adhäsionsmolekülen führen, wodurch verstärkt Immunzellen zentralnervöse Kompartimente migrieren [178]. Zudem konnte von Selmaj et al. in vitro eine direkte zellschädigende Wirkung von TNF β auf Oligodendrozyten beobachtet werden [179]. Es liegt also die Vermutung nahe, dass TNF β ähnlich wie TNF α zum Entzündungs- und Demyelinisationsprozess im ZNS bei der multiplen Sklerose beiträgt [180]. Insofern könnte die von uns gemessene TNF β Verringerung mit Natalizumab im Einklang mit den erniedrigten Konzentrationen diverser proinflammatorischer Zytokine in Liquor und Blut unter der immunmodulierenden Therapie stehen [151] und damit zu einer verminderten Schubfrequenz und Krankheitsprogression beitragen. Zur Bestätigung unserer Ergebnisse sind weitere Studien vonnöten, von denen wir uns ein besseres Verständnis der pathomechanischen Rolle von TNF β bei MS erhoffen.

6. Zusammenfassung und Weiterentwicklung des Projekts

Dem allgemeinen Verständnis der multiplen Sklerose als T-Zell-vermittelte Krankheit zum Trotz sind in den vergangenen Jahren vermehrt B-Lymphozyten als pathogenetischer Faktor der autoimmunen Erkrankung in den Mittelpunkt des wissenschaftlichen Interesses gerückt. Wenig erforscht ist dabei die Rolle der B-Zellen bei der immunmodulatorischen Therapie der multiplen Sklerose. Entsprechend wurden in der vorliegenden Arbeit MS Patienten ohne krankheitsspezifische Therapie, mit immunmodulatorischer Therapie mit dem humanen Antikörper Natalizumab sowie gesunde Individuen hinsichtlich ihrer Frequenzen von CD3-CD19+ B-Lymphozyten an den PBMC und der CD3-CD19+CD20+CD27-naiven B-Lymphozyten, CD3-CD19+CD20+CD27+ memory B-Lymphozyten und CD3-CD19+CD20-CD27++ terminal differenzierten B-Lymphozyten an den CD3-CD19+ gesamten B-Lymphozyten per FACS-Analyse verglichen. Darüber hinaus wurden für die drei Versuchskollektive die Serumkonzentrationen der Antikörperklassen IgG, IgA und IgM sowie der Zytokine BAFF, IL1 β , IL21, IL35 und TNF β per ELISA-Messung ermittelt. Wir konnten nachweisen, dass der Anteil der CD3-CD19+CD20+CD27-naiven B-Lymphozyten an den CD3-CD19+ B-Lymphozyten bei Patienten mit Natalizumabtherapie gegenüber gesunden Kontrollen im Durchschnitt statistisch signifikant verringert war, dies kam jedoch durch eine Frequenzminderung bei vier von zehn der Natalizumabpatienten statt einer allgemeinen Frequenzabnahme zu Stande. Der Anteil der CD3-CD19+CD20+CD27+ memory B-Lymphozyten an den CD3-CD19+ B-Lymphozyten zeigte sich bei Natalizumabpatienten gegenüber gesunden Individuen als signifikant erhöht. Kaum verändert blieben hingegen die Frequenzen der CD3-CD19+ B-Zellen an den PBMC sowie die Frequenz der CD3-CD19+CD20-CD27++ terminal differenzierten B-Lymphozyten an den CD3-CD19+ gesamten B-Lymphozyten. In unseren ELISA Messungen konnten wir zeigen, dass die Konzentration der gesamten IgG Antikörper im Serum unter Natalizumabtherapie gegenüber der gesunden Kontrollgruppe signifikant verringert ist. Zusätzlich ist die IgM Serumkonzentration der therapiefreien MS Patienten gegenüber den gesunden Kontrollen statistisch signifikant

erhöht. Zudem zeigte sich die Serumkonzentration von IgM bei den Patienten unter Natalizumabtherapie gegenüber den MS Patienten ohne krankheitsspezifische Therapie signifikant verringert. Erstmals ließ sich eine verminderte IL21 Konzentration bei MS Patienten mit Natalizumab gegenüber der gesunden Kontrollgruppe nachweisen. Außerdem konnten wir erstmalig eine signifikante Verringerung der IL35 Serumkonzentration bei der Natalizumabgruppe gegenüber unbehandelten MS Patienten. Bei den Patienten mit Natalizumabtherapie wurde gegenüber der gesunden Kontrollgruppe erstmals eine verminderte TNF β Konzentration festgestellt.

Aufgrund der vergleichsweise niedrigen Probandenzahl pro Gruppe kann die vorliegende Dissertation am ehesten als eine Pilotstudie angesehen werden. Zudem ist aufgrund der Heterogenität der Probandenkollektive der Einfluss von Störfaktoren (hier v.a. Unterschiede in Alter und Geschlecht zwischen den Versuchsgruppen) auf die Ergebnisse nicht auszuschließen. Deswegen sind weitere Untersuchungen erforderlich, um die hier erbrachten Ergebnisse zu überprüfen. Wir erhoffen uns dennoch ein besseres Verständnis des Einflusses der B-Lymphozyten und ihrer Subpopulationen auf die Krankheitsentstehung und –aktivität der MS sowie ihrer Rolle bei klinischer Remission unter immunmodulatorischer Therapie. Langfristiges Ziel dabei ist die Erforschung möglicher neuer therapeutischer Angriffspunkte bei multipler Sklerose und die Vorhersage individueller Therapieresponse.

III Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Diagnostische Kriterien nach McDonald, 2010	14
Tabelle 2: Verwendete Lösungen	31
Tabelle 3: Verwendete Chemikalien	32
Tabelle 4: Verwendete Einwegmaterialien	32
Tabelle 5: Verwendete Laborgeräte	34
Tabelle 6: Verwendete Antikörper	35
Tabelle 7: Verwendete Software	36
Tabelle 8: Darstellung der verschiedenen Versuchsgruppen	36
Tabelle 9: Ak-Konzentrationen der 1-fach Färbungen	40
Tabelle 10: Ak-Konzentrationen der 4-fach Färbungen	40
Tabelle 11: ELISA-kits mit Herstellerangaben	45
Tabelle 12: Patienten- und Probandendaten der Immunphänotypisierung	49
Tabelle 13: Patienten- und Probandendaten der Serumanalyse	50
Tabelle 14: Anteile der CD3-CD19+ B-Lymphozyten an den PBMC	53
Tabelle 15: Anteile der CD3-CD19+CD20+CD27- naiven B-Lymphozyten an den CD3-CD19+ gesamten B-Lymphozyten	55
Tabelle 16: Anteile der CD3-CD19+CD20+CD27+ memory B-Lymphozyten an den CD3-CD19+ gesamten B-Lymphozyten	58
Tabelle 17: Anteile der CD3-CD19+CD20-CD27++ terminal differenzierten B- Lymphozyten an den CD3-CD19+ gesamten B-Lymphozyten	61
Tabelle 18: Konzentrationen von IgG im Serum in mg/ml	65
Tabelle 19: Konzentrationen von IgA im Serum in mg/ml	66
Tabelle 20: Konzentrationen von IgM im Serum in mg/ml	67
Tabelle 21: Konzentrationen von BAFF im Serum in µg/ml	69
Tabelle 22: Konzentrationen von Il1β im Serum in pg/ml	70
Tabelle 23: Konzentrationen von Il21 im Serum in pg/ml	71
Tabelle 24: Konzentrationen von Il35 im Serum in pg/ml	72

Tabelle 25: Konzentrationen von TNF β im Serum in $\mu\text{g/ml}$ 74

IV Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Therapieschema bei RRMS	17
Abbildung 2: Schematische Darstellung der Phasen a) vor und b) nach der Zentrifugation von EDTA Blut über dem Lymphoprep-Medium	38
Abbildung 3: Darstellung des SS/FS Dotplots bei der FACS.....	42
Abbildung 4: Darstellung zweier PE/FITC Dotplots nach Einzelfärbung der PBMC mit CD3 FITC vor und nach der Kompensation.....	43
Abbildung 5: Histogramm zur Farbintensität in Relation zur Eventzahl	43
Abbildung 6: Darstellung der Dotplots SS/FS; CD3 FITC/ CD19 PB und CD 27 PE/ CD20 APCH7 bei der 4 fach FACS Färbung.....	44
Abbildung 7: Schema der Sandwich ELISA Technik	47
Abbildung 8: Durchflusszytometrische Bestimmung der CD3-CD19+ B-Lymphozyten und ihrer nach CD27 und CD20 differenzierten Subpopulationen...	52
Abbildung 9: Bestimmung des Anteils der CD3-CD19+ B-Lymphozyten an den PBMC mittels FACS-Analyse	53
Abbildung 10: Anteile der CD3-CD19+ B-Lymphozyten an den PBMC bei den verschiedenen Versuchskollektiven	54
Abbildung 11: Bestimmung des Anteils der CD3-CD19+CD20+CD27- naiven B-Lymphozyten an den gesamten CD3-CD19+ B-Lymphozyten	55
Abbildung 12: Anteile der CD3-CD19+CD20+CD27- naiven B-Lymphozyten an CD3-CD19+ B-Lymphozyten bei den verschiedenen Versuchskollektiven	56
Abbildung 13: Exemplarische Darstellungen des Anteils der CD3-CD19+CD20+CD27- naiven B-Lymphozyten an den gesamten CD3-CD19+ B-Lymphozyten	57
Abbildung 14: Bestimmung des Anteils der CD3-CD19+CD20+CD27+ memory B-Lymphozyten an den gesamten CD3-CD19+ B-Lymphozyten	58
Abbildung 15: Anteile der CD3-CD19+CD20+CD27+ memory B-Lymphozyten an CD3-CD19+ B-Lymphozyten bei den verschiedenen Versuchskollektiven	59

Abbildung 16: Exemplarische Darstellungen des Anteils der CD3- CD19+CD20+CD2+- memory B-Lymphozyten an den gesamten CD3-CD19+ B- Lymphozyten	60
Abbildung 17: Bestimmung des Anteils der CD3-CD19+CD20-CD27++ terminal differenzierte B-Lymphozyten an den gesamten CD3-CD19+ B-Lymphozyten	61
Abbildung 18: Anteile der CD3-CD19+CD20-CD27++ terminal differenzierten B- Lymphozyten an CD3-CD19+ B-Lymphozyten bei den verschiedenen Versuchskollektiven.....	62
Abbildung 19: Exemplarische Darstellungen des Anteils der CD3-CD19+CD20- CD27++ terminal differenzierten B-Lymphozyten an den gesamten CD3-CD19+ B- Lymphozyten	63
Abbildung 20: Die Serumkonzentration von IgG ist bei MS Patienten mit Natalizumabtherapie mit 15,3 mg/ml gegenüber gesunden Kontrollen mit 24,2 mg/ml signifikant verringert ($p=0,006$)	65
Abbildung 21: Es gibt keine signifikanten Unterschiede in den Serumkonzentrationen von IgA zwischen den verschiedenen Patientengruppen .	66
Abbildung 22: a) Die Serumkonzentration von IgM ist bei Natalizumabpatienten mit 4,9 mg/ml gegenüber MS Patienten ohne Therapie mit 7,6 mg/ml statistisch signifi- kant verringert ($p=0,002$) b) Die Serumkonzentration von IgM ist bei MS Patienten ohne krankheitsspezifische Therapie mit 7,6 mg/ml gegenüber gesunden Kontrollen mit 6,2 mg/ml statistisch signifikant erhöht ($p=0,029$).....	68
Abbildung 23: Es gibt keine signifikanten Unterschiede in den Serum- konzentrationen von BAFF zwischen den verschiedenen Patientengruppen	69
Abbildung 24: Es gibt keine signifikanten Unterschiede in den Serum- konzentrationen von IL1 β zwischen den verschiedenen Patientengruppen	70
Abbildung 25: Die Serumkonzentration von IL21 ist bei MS Patienten mit Natalizumabtherapie mit 29,7 pg/ml gegenüber gesunden Kontrollen mit 59,2 pg/ml signifikant verringert ($p=0,043$)	71

Abbildung 26: Die Serumkonzentration von IL35 ist bei MS Patienten mit Natalizumabtherapie mit 2,8 pg/ml gegenüber MS Patienten ohne Therapie mit 17,5 pg/ml signifikant verringert ($p=0,019$)	73
Abbildung 27: Die Serumkonzentration von TNF β ist bei MS Patienten mit Natalizumabtherapie mit 0,7 $\mu\text{g/ml}$ gegenüber gesunden Kontrollen mit 1,6 $\mu\text{g/ml}$ signifikant verringert ($p=0,037$)	74

V Literaturverzeichnis

1. Compston, A. and A. Coles, *Multiple sclerosis*. Lancet, 2002. **359**(9313): p. 1221-31.
2. Scalfari, A., et al., *Mortality in patients with multiple sclerosis*. Neurology, 2013. **81**(2): p. 184-92.
3. Pugliatti, M., et al., *The epidemiology of multiple sclerosis in Europe*. Eur J Neurol, 2006. **13**(7): p. 700-22.
4. Hein, T. and W. Hopfenmuller, [*Projection of the number of multiple sclerosis patients in Germany*]. Nervenarzt, 2000. **71**(4): p. 288-94.
5. Kurtzke, J.F., *Epidemiology and multiple sclerosis*. Rev Neurol, 2002. **35**(12): p. 1177.
6. Simpson, S., Jr., et al., *Latitude is significantly associated with the prevalence of multiple sclerosis: a meta-analysis*. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 2011. **82**(10): p. 1132-41.
7. Hogancamp, W.E., M. Rodriguez, and B.G. Weinshenker, *The epidemiology of multiple sclerosis*. Mayo Clin Proc, 1997. **72**(9): p. 871-8.
8. Lewis, G.W., *Ethnic factors in multiple sclerosis: a review and critique of the epidemiological literature*. Int J Epidemiol, 1988. **17**(1): p. 14-20.
9. Milo, R. and E. Kahana, *Multiple sclerosis: geoepidemiology, genetics and the environment*. Autoimmun Rev, 2010. **9**(5): p. A387-94.
10. Koutsouraki, E., V. Costa, and S. Baloyannis, *Epidemiology of multiple sclerosis in Europe: a review*. Int Rev Psychiatry, 2010. **22**(1): p. 2-13.
11. in *Multiple Sclerosis: Current Status and Strategies for the Future*, J.E. Joy and R.B. Johnston, Jr., Editors. 2001: Washington (DC).
12. Martin, R., *Genetics of multiple sclerosis--how could disease-associated HLA-types contribute to pathogenesis?* J Neural Transm Suppl, 1997. **49**: p. 177-94.
13. Ascherio, A. and K.L. Munger, *Environmental risk factors for multiple sclerosis. Part I: the role of infection*. Ann Neurol, 2007. **61**(4): p. 288-99.
14. Harandi, A.A., et al., *Vitamin D and multiple sclerosis*. Iran J Neurol, 2014. **13**(1): p. 1-6.
15. Hedstrom, A.K., et al., *Smoking and multiple sclerosis susceptibility*. Eur J Epidemiol, 2013. **28**(11): p. 867-74.
16. Dyment, D.A., G.C. Ebers, and A.D. Sadovnick, *Genetics of multiple sclerosis*. Lancet Neurol, 2004. **3**(2): p. 104-10.
17. Barcellos, L.F., et al., *Clustering of autoimmune diseases in families with a high-risk for multiple sclerosis: a descriptive study*. Lancet Neurol, 2006. **5**(11): p. 924-31.
18. Ramagopalan, S.V., et al., *Autoimmune disease in families with multiple sclerosis: a population-based study*. Lancet Neurol, 2007. **6**(7): p. 604-10.
19. Fletcher, J.M., et al., *T cells in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis*. Clin Exp Immunol, 2010. **162**(1): p. 1-11.

20. Petri, B. and M.G. Bixel, *Molecular events during leukocyte diapedesis*. FEBS J, 2006. **273**(19): p. 4399-407.
21. Vestweber, D., *Adhesion and signaling molecules controlling the transmigration of leukocytes through endothelium*. Immunol Rev, 2007. **218**: p. 178-96.
22. Ransohoff, R.M., P. Kivisakk, and G. Kidd, *Three or more routes for leukocyte migration into the central nervous system*. Nat Rev Immunol, 2003. **3**(7): p. 569-81.
23. Murphy, K., P. Travers, and M. Walport, *Janeway-Immunologie*, ed. S.A.V.H. 2009. 2009 115-6.
24. Dyrna, F., et al., *The blood-brain barrier*. J Neuroimmune Pharmacol, 2013. **8**(4): p. 763-73.
25. Ohno, K., K.D. Pettigrew, and S.I. Rapoport, *Lower limits of cerebrovascular permeability to nonelectrolytes in the conscious rat*. Am J Physiol, 1978. **235**(3): p. H299-307.
26. Dente, C.J., et al., *Pericytes augment the capillary barrier in in vitro cocultures*. J Surg Res, 2001. **97**(1): p. 85-91.
27. Igarashi, Y., et al., *Glial cell line-derived neurotrophic factor induces barrier function of endothelial cells forming the blood-brain barrier*. Biochem Biophys Res Commun, 1999. **261**(1): p. 108-12.
28. Bechmann, I., et al., *FasL (CD95L, Apo1L) is expressed in the normal rat and human brain: evidence for the existence of an immunological brain barrier*. Glia, 1999. **27**(1): p. 62-74.
29. Murphy, K., P. Travers, and M. Walport, *Janeway-Immunologie*, ed. S.A.V.H. 2009. 2009 785.
30. de Rosbo, N.K. and A. Ben-Nun, *T-cell responses to myelin antigens in multiple sclerosis; relevance of the predominant autoimmune reactivity to myelin oligodendrocyte glycoprotein*. J Autoimmun, 1998. **11**(4): p. 287-99.
31. Stinissen, P., J. Raus, and J. Zhang, *Autoimmune pathogenesis of multiple sclerosis: role of autoreactive T lymphocytes and new immunotherapeutic strategies*. Crit Rev Immunol, 1997. **17**(1): p. 33-75.
32. Chastain, E.M., et al., *The role of antigen presenting cells in multiple sclerosis*. Biochim Biophys Acta, 2011. **1812**(2): p. 265-74.
33. Trapp, B.D., et al., *Axonal transection in the lesions of multiple sclerosis*. N Engl J Med, 1998. **338**(5): p. 278-85.
34. Nair, A., T.J. Frederick, and S.D. Miller, *Astrocytes in multiple sclerosis: a product of their environment*. Cell Mol Life Sci, 2008. **65**(17): p. 2702-20.
35. Kahana, E., M. Alter, and S. Feldman, *Optic neuritis in relation to multiple sclerosis*. J Neurol, 1976. **213**(2): p. 87-95.
36. Braley, T.J. and R.D. Chervin, *Fatigue in multiple sclerosis: mechanisms, evaluation, and treatment*. Sleep, 2010. **33**(8): p. 1061-7.
37. Simon, J.H., et al., *Standardized MR imaging protocol for multiple sclerosis: Consortium of MS Centers consensus guidelines*. AJNR Am J Neuroradiol, 2006. **27**(2): p. 455-61.

38. Milo, R. and A. Miller, *Revised diagnostic criteria of multiple sclerosis*. Autoimmun Rev, 2014. **13**(4-5): p. 518-24.
39. Kilsdonk, I.D., F. Barkhof, and M.P. Wattjes, *2010 revisions to McDonald criteria for diagnosis of multiple sclerosis: impact of 3-Tesla magnetic resonance imaging*. Ann Neurol, 2011. **70**(1): p. 182-3.
40. Weinshenker, B.G., et al., *The natural history of multiple sclerosis: a geographically based study. I. Clinical course and disability*. Brain, 1989. **112 (Pt 1)**: p. 133-46.
41. Bergamaschi, R., *Prognostic factors in multiple sclerosis*. Int Rev Neurobiol, 2007. **79**: p. 423-47.
42. Kurtzke, J.F., *Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS)*. Neurology, 1983. **33**(11): p. 1444-52.
43. <http://www.dgn.org/leitlinien/2333-ll-31-2012-diagnose-und-therapie-der-multiplen-sklerose#therapie>
44. Berkovich, R., *Treatment of acute relapses in multiple sclerosis*. Neurotherapeutics, 2013. **10**(1): p. 97-105.
45. Ontaneda, D. and A.D. Rae-Grant, *Management of acute exacerbations in multiple sclerosis*. Ann Indian Acad Neurol, 2009. **12**(4): p. 264-72.
46. Gajofatto, A. and M.D. Benedetti, *Treatment strategies for multiple sclerosis: When to start, when to change, when to stop?* World J Clin Cases, 2015. **3**(7): p. 545-55.
47. Mary A. Willis, MD; Jeffrey A. Cohen, MD Semin Neurol. 2013;33(1):37-44. http://www.medscape.com/viewarticle/805134_7
48. McGuigan, C., et al., *Stratification and monitoring of natalizumab-associated progressive multifocal leukoencephalopathy risk: recommendations from an expert group*. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 2016. **87**(2): p. 117-25.
49. Saribas, A.S., et al., *JC virus-induced Progressive Multifocal Leukoencephalopathy*. Future Virol, 2010. **5**(3): p. 313-323.
50. Kieseier, B.C., *The mechanism of action of interferon-beta in relapsing multiple sclerosis*. CNS Drugs, 2011. **25**(6): p. 491-502.
51. Clerico, M., G. Contessa, and L. Durelli, *Interferon-beta1a for the treatment of multiple sclerosis*. Expert Opin Biol Ther, 2007. **7**(4): p. 535-42.
52. Panitch, H., et al., *Randomized, comparative study of interferon beta-1a treatment regimens in MS: The EVIDENCE Trial*. Neurology, 2002. **59**(10): p. 1496-506.
53. Castro-Borrero, W., et al., *Current and emerging therapies in multiple sclerosis: a systematic review*. Ther Adv Neurol Disord, 2012. **5**(4): p. 205-20.
54. Kieseier, B.C. and P.A. Calabresi, *PEGylation of interferon-beta-1a: a promising strategy in multiple sclerosis*. CNS Drugs, 2012. **26**(3): p. 205-14.
55. McCormack, P.L. and L.J. Scott, *Interferon-beta-1b: a review of its use in relapsing-remitting and secondary progressive multiple sclerosis*. CNS Drugs, 2004. **18**(8): p. 521-46.
56. Hurwitz, B.J., et al., *Tolerability and safety profile of 12- to 28-week treatment with interferon beta-1b 250 and 500 microg QOD in patients with relapsing-remitting*

- multiple sclerosis: a multicenter, randomized, double-blind, parallel-group pilot study.* Clin Ther, 2008. **30**(6): p. 1102-12.
57. Hemmer, B., et al., *Immune response to immunotherapy: the role of neutralising antibodies to interferon beta in the treatment of multiple sclerosis.* Lancet Neurol, 2005. **4**(7): p. 403-12.
 58. Schrempf, W. and T. Ziemssen, *Glatiramer acetate: mechanisms of action in multiple sclerosis.* Autoimmun Rev, 2007. **6**(7): p. 469-75.
 59. Arnon, R. and R. Aharoni, *Mechanism of action of glatiramer acetate in multiple sclerosis and its potential for the development of new applications.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101 Suppl 2**: p. 14593-8.
 60. Comi, G., M. Filippi, and J.S. Wolinsky, *European/Canadian multicenter, double-blind, randomized, placebo-controlled study of the effects of glatiramer acetate on magnetic resonance imaging--measured disease activity and burden in patients with relapsing multiple sclerosis.* European/Canadian Glatiramer Acetate Study Group. Ann Neurol, 2001. **49**(3): p. 290-7.
 61. Warnke, C., O. Stuve, and B.C. Kieseier, *Teriflunomide for the treatment of multiple sclerosis.* Clin Neurol Neurosurg, 2013. **115 Suppl 1**: p. S90-4.
 62. Zeyda, M., et al., *Disruption of the interaction of T cells with antigen-presenting cells by the active leflunomide metabolite teriflunomide: involvement of impaired integrin activation and immunologic synapse formation.* Arthritis Rheum, 2005. **52**(9): p. 2730-9.
 63. Confavreux, C., et al., *Oral teriflunomide for patients with relapsing multiple sclerosis (TOWER): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial.* Lancet Neurol, 2014. **13**(3): p. 247-56.
 64. He, D., et al., *Teriflunomide for multiple sclerosis.* Cochrane Database Syst Rev, 2016. **3**: p. CD009882.
 65. Kieseier, B.C. and M. Benamor, *Pregnancy outcomes following maternal and paternal exposure to teriflunomide during treatment for relapsing-remitting multiple sclerosis.* Neurol Ther, 2014. **3**(2): p. 133-8.
 66. Scannevin, R.H., et al., *Fumarates promote cytoprotection of central nervous system cells against oxidative stress via the nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 pathway.* J Pharmacol Exp Ther, 2012. **341**(1): p. 274-84.
 67. McGuire, V.A., et al., *Dimethyl fumarate blocks pro-inflammatory cytokine production via inhibition of TLR induced M1 and K63 ubiquitin chain formation.* Sci Rep, 2016. **6**: p. 31159.
 68. Fox, R.J., et al., *Placebo-controlled phase 3 study of oral BG-12 or glatiramer in multiple sclerosis.* N Engl J Med, 2012. **367**(12): p. 1087-97.
 69. van Kester, M.S., J.N. Bouwes Bavinck, and K.D. Quint, *PML in Patients Treated with Dimethyl Fumarate.* N Engl J Med, 2015. **373**(6): p. 583-4.
 70. Sissi, C., et al., *DNA-interactive anticancer aza-anthrapyrazoles: biophysical and biochemical studies relevant to the mechanism of action.* Mol Pharmacol, 2001. **59**(1): p. 96-103.

71. Fox, E.J., *Management of worsening multiple sclerosis with mitoxantrone: a review*. Clin Ther, 2006. **28**(4): p. 461-74.
72. Kingwell, E., et al., *Cardiotoxicity and other adverse events associated with mitoxantrone treatment for MS*. Neurology, 2010. **74**(22): p. 1822-6.
73. Brinkmann, V., J.G. Cyster, and T. Hla, *FTY720: sphingosine 1-phosphate receptor-1 in the control of lymphocyte egress and endothelial barrier function*. Am J Transplant, 2004. **4**(7): p. 1019-25.
74. La Mantia, L., et al., *Fingolimod for relapsing-remitting multiple sclerosis*. Cochrane Database Syst Rev, 2016. **4**: p. CD009371.
75. Arvin, A.M., et al., *Varicella-zoster virus infections in patients treated with fingolimod: risk assessment and consensus recommendations for management*. JAMA Neurol, 2015. **72**(1): p. 31-9.
76. Cohen, J.A. and J. Chun, *Mechanisms of fingolimod's efficacy and adverse effects in multiple sclerosis*. Ann Neurol, 2011. **69**(5): p. 759-77.
77. Rice, G.P., H.P. Hartung, and P.A. Calabresi, *Anti-alpha4 integrin therapy for multiple sclerosis: mechanisms and rationale*. Neurology, 2005. **64**(8): p. 1336-42.
78. http://www.ema.europa.eu/docs/de_DE/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000603/WC500044686.pdf
79. Polman, C.H., et al., *A randomized, placebo-controlled trial of natalizumab for relapsing multiple sclerosis*. N Engl J Med, 2006. **354**(9): p. 899-910.
80. van Pesch, V., C.J. Sindic, and O. Fernandez, *Effectiveness and safety of natalizumab in real-world clinical practice: Review of observational studies*. Clin Neurol Neurosurg, 2016. **149**: p. 55-63.
81. Borchardt, J. and J.R. Berger, *Re-evaluating the incidence of natalizumab-associated progressive multifocal leukoencephalopathy*. Mult Scler Relat Disord, 2016. **8**: p. 145-50.
82. Sorensen, P.S., et al., *Risk stratification for progressive multifocal leukoencephalopathy in patients treated with natalizumab*. Mult Scler, 2012. **18**(2): p. 143-52.
83. Ferenczy, M.W., et al., *Molecular biology, epidemiology, and pathogenesis of progressive multifocal leukoencephalopathy, the JC virus-induced demyelinating disease of the human brain*. Clin Microbiol Rev, 2012. **25**(3): p. 471-506.
84. Bloomgren, G., et al., *Risk of natalizumab-associated progressive multifocal leukoencephalopathy*. N Engl J Med, 2012. **366**(20): p. 1870-80.
85. Pharaon, M., et al., *Risk for nevus transformation and melanoma proliferation and invasion during natalizumab treatment: four years of dermoscopic follow-up with immunohistological studies and proliferation and invasion assays*. JAMA Dermatol, 2014. **150**(8): p. 901-3.
86. Calabresi, P.A., et al., *The incidence and significance of anti-natalizumab antibodies: results from AFFIRM and SENTINEL*. Neurology, 2007. **69**(14): p. 1391-403.

87. Hartung, H.P., O. Aktas, and A.N. Boyko, *Alemtuzumab: a new therapy for active relapsing-remitting multiple sclerosis*. *Mult Scler*, 2015. **21**(1): p. 22-34.
88. Seidel, U.J., P. Schlegel, and P. Lang, *Natural killer cell mediated antibody-dependent cellular cytotoxicity in tumor immunotherapy with therapeutic antibodies*. *Front Immunol*, 2013. **4**: p. 76.
89. Investigators, C.T., et al., *Alemtuzumab vs. interferon beta-1a in early multiple sclerosis*. *N Engl J Med*, 2008. **359**(17): p. 1786-801.
90. Klotz, L., et al., [*Alemtuzumab for relapsing-remitting multiple sclerosis. Results of two randomized controlled phase III studies*]. *Nervenarzt*, 2013. **84**(8): p. 984-94.
91. <https://www.britannica.com/science/immune-system/Evolution-of-the-immune-system>
92. Lüllmann-Rauch, R., *Taschenlehrbuch Histologie*, ed. Georg Thieme Verlag KG 2003. 2009 288-289.
93. Murphy, K., P. Travers, and M. Walport, *Janeway-Immunologie*, ed. S.A.V.H. 2009. 2009 66.
94. Arango Duque, G. and A. Descoteaux, *Macrophage cytokines: involvement in immunity and infectious diseases*. *Front Immunol*, 2014. **5**: p. 491.
95. Sarma, J.V. and P.A. Ward, *The complement system*. *Cell Tissue Res*, 2011. **343**(1): p. 227-35.
96. Gabay, C. and I. Kushner, *Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation*. *N Engl J Med*, 1999. **340**(6): p. 448-54.
97. Lüllmann-Rauch, R., *Taschenlehrbuch Histologie*, ed. Georg Thieme Verlag KG 2003. 2009 290.
98. Murphy, K., P. Travers, and M. Walport, *Janeway-Immunologie*, ed. S.A.V.H. 2009. 2009 488-9.
99. Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al. *Molecular Biology of the Cell*. 4th edition. New York: Garland Science; 2002. B Cells and Antibodies.
100. Zuniga-Pflucker, J.C., *T-cell development made simple*. *Nat Rev Immunol*, 2004. **4**(1): p. 67-72.
101. Murphy, K., P. Travers, and M. Walport, *Janeway-Immunologie*, ed. S.A.V.H. 2009. 2009 359.
102. Yates, A.J., *Theories and quantification of thymic selection*. *Front Immunol*, 2014. **5**: p. 13.
103. Lüllmann-Rauch, R., *Taschenlehrbuch Histologie*, ed. Georg Thieme Verlag KG 2003. 2009 295-301
104. Harty, J.T., A.R. Tvinnereim, and D.W. White, *CD8+ T cell effector mechanisms in resistance to infection*. *Annu Rev Immunol*, 2000. **18**: p. 275-308.
105. Zhu, J., H. Yamane, and W.E. Paul, *Differentiation of effector CD4 T cell populations (*)*. *Annu Rev Immunol*, 2010. **28**: p. 445-89.
106. Murphy, K., P. Travers, and M. Walport, *Janeway-Immunologie*, ed. S.A.V.H. 2009. 2009 327-40.

107. Wang, L.D. and M.R. Clark, *B-cell antigen-receptor signalling in lymphocyte development*. Immunology, 2003. **110**(4): p. 411-20.
108. Murphy, K., P. Travers, and M. Walport, Janeway-Immunologie, ed. S.A.V.H. 2009. 2009 483-97.
109. Nacionales, D.C., et al., *B cell proliferation, somatic hypermutation, class switch recombination, and autoantibody production in ectopic lymphoid tissue in murine lupus*. J Immunol, 2009. **182**(7): p. 4226-36.
110. Agematsu, K., *Memory B cells and CD27*. Histol Histopathol, 2000. **15**(2): p. 573-6.
111. Nutt, S.L., et al., *The generation of antibody-secreting plasma cells*. Nat Rev Immunol, 2015. **15**(3): p. 160-71.
112. Serafini, B., et al., *Detection of ectopic B-cell follicles with germinal centers in the meninges of patients with secondary progressive multiple sclerosis*. Brain Pathol, 2004. **14**(2): p. 164-74.
113. Krumbholz, M., et al., *Chemokines in multiple sclerosis: CXCL12 and CXCL13 up-regulation is differentially linked to CNS immune cell recruitment*. Brain, 2006. **129**(Pt 1): p. 200-11.
114. Obermeier, B., et al., *Related B cell clones that populate the CSF and CNS of patients with multiple sclerosis produce CSF immunoglobulin*. J Neuroimmunol, 2011. **233**(1-2): p. 245-8.
115. Claes, N., et al., *B Cells Are Multifunctional Players in Multiple Sclerosis Pathogenesis: Insights from Therapeutic Interventions*. Front Immunol, 2015. **6**: p. 642.
116. Lesley, R., et al., *Reduced competitiveness of autoantigen-engaged B cells due to increased dependence on BAFF*. Immunity, 2004. **20**(4): p. 441-53.
117. Fraussen, J., et al., *Autoantigen induced clonal expansion in immortalized B cells from the peripheral blood of multiple sclerosis patients*. J Neuroimmunol, 2013. **261**(1-2): p. 98-107.
118. Haas Maria-Ruth (2015), N-Glykosylierung von T Helfer Zell-Populationen bei Patienten mit Multipler Sklerose. Medizinische Dissertationsschrift, Universität Tübingen
119. Haas, J., et al., *B cells undergo unique compartmentalized redistribution in multiple sclerosis*. J Autoimmun, 2011. **37**(4): p. 289-99.
120. Koudriavtseva, T., et al., *Long-term follow-up of peripheral lymphocyte subsets in a cohort of multiple sclerosis patients treated with natalizumab*. Clin Exp Immunol, 2014. **176**(3): p. 320-6.
121. Habib, J., et al., *Blood B Cell and Regulatory Subset Content in Multiple Sclerosis Patients*. J Mult Scler (Foster City), 2015. **2**(2).
122. Planas, R., et al., *Natalizumab treatment perturbs memory- and marginal zone-like B-cell homing in secondary lymphoid organs in multiple sclerosis*. Eur J Immunol, 2012. **42**(3): p. 790-8.
123. Zohren, F., et al., *The monoclonal anti-VLA-4 antibody natalizumab mobilizes CD34+ hematopoietic progenitor cells in humans*. Blood, 2008. **111**(7): p. 3893-5.

124. Warnke, C., et al., *Natalizumab exerts a suppressive effect on surrogates of B cell function in blood and CSF*. *Mult Scler*, 2015. **21**(8): p. 1036-44.
125. Duddy, M., et al., *Distinct effector cytokine profiles of memory and naive human B cell subsets and implication in multiple sclerosis*. *J Immunol*, 2007. **178**(10): p. 6092-9.
126. Mauri, C., et al., *Prevention of arthritis by interleukin 10-producing B cells*. *J Exp Med*, 2003. **197**(4): p. 489-501.
127. Lipsky, P.E., *Systemic lupus erythematosus: an autoimmune disease of B cell hyperactivity*. *Nat Immunol*, 2001. **2**(9): p. 764-6.
128. Llorente, L., et al., *In vivo production of interleukin-10 by non-T cells in rheumatoid arthritis, Sjogren's syndrome, and systemic lupus erythematosus. A potential mechanism of B lymphocyte hyperactivity and autoimmunity*. *Arthritis Rheum*, 1994. **37**(11): p. 1647-55.
129. Krumbholz, M., et al., *Natalizumab disproportionately increases circulating pre-B and B cells in multiple sclerosis*. *Neurology*, 2008. **71**(17): p. 1350-4.
130. Zanotti, C., et al., *Peripheral accumulation of newly produced T and B lymphocytes in natalizumab-treated multiple sclerosis patients*. *Clin Immunol*, 2012. **145**(1): p. 19-26.
131. Cepok, S., et al., *Accumulation of class switched IgD-IgM- memory B cells in the cerebrospinal fluid during neuroinflammation*. *J Neuroimmunol*, 2006. **180**(1-2): p. 33-9.
132. Mellergard, J., et al., *Increased B cell and cytotoxic NK cell proportions and increased T cell responsiveness in blood of natalizumab-treated multiple sclerosis patients*. *PLoS One*, 2013. **8**(12): p. e81685.
133. Selter, R.C., et al., *Natalizumab treatment decreases serum IgM and IgG levels in multiple sclerosis patients*. *Mult Scler*, 2013. **19**(11): p. 1454-61.
134. Corcione, A., et al., *Recapitulation of B cell differentiation in the central nervous system of patients with multiple sclerosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. **101**(30): p. 11064-9.
135. Rovituso, D., et al., *B1 cells are unaffected by immune modulatory treatment in remitting-relapsing multiple sclerosis patients*. *J Neuroimmunol*, 2014. **272**(1-2): p. 86-90.
136. Cepok, S., et al., *Short-lived plasma blasts are the main B cell effector subset during the course of multiple sclerosis*. *Brain*, 2005. **128**(Pt 7): p. 1667-76.
137. Villar, L.M., et al., *Immunological markers of optimal response to natalizumab in multiple sclerosis*. *Arch Neurol*, 2012. **69**(2): p. 191-7.
138. Mehta, P.D. and S.P. Mehta, *Quantitation of IgG and albumin in CSF and serum from multiple sclerosis patients by enzyme-linked immunosorbent assay*. *Acta Neurol Scand*, 1987. **75**(2): p. 125-9.
139. Finke, D., et al., *CD4+CD3- cells induce Peyer's patch development: role of alpha4beta1 integrin activation by CXCR5*. *Immunity*, 2002. **17**(3): p. 363-73.

140. Mora, J.R. and U.H. von Andrian, *Differentiation and homing of IgA-secreting cells*. Mucosal Immunol, 2008. **1**(2): p. 96-109.
141. Mackay, F. and J.L. Browning, *BAFF: a fundamental survival factor for B cells*. Nat Rev Immunol, 2002. **2**(7): p. 465-75.
142. Rowland, S.L., et al., *BAFF receptor signaling aids the differentiation of immature B cells into transitional B cells following tonic BCR signaling*. J Immunol, 2010. **185**(8): p. 4570-81.
143. Krumbholz, M., et al., *BAFF is produced by astrocytes and up-regulated in multiple sclerosis lesions and primary central nervous system lymphoma*. J Exp Med, 2005. **201**(2): p. 195-200.
144. Kannel, K., et al., *Changes in Blood B Cell-Activating Factor (BAFF) Levels in Multiple Sclerosis: A Sign of Treatment Outcome*. PLoS One, 2015. **10**(11): p. e0143393.
145. Dooley, J., et al., *Immunologic profiles of multiple sclerosis treatments reveal shared early B cell alterations*. Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm, 2016. **3**(4): p. e240.
146. Vossenkamper, A., P.M. Lutalo, and J. Spencer, *Translational Mini-Review Series on B cell subsets in disease. Transitional B cells in systemic lupus erythematosus and Sjogren's syndrome: clinical implications and effects of B cell-targeted therapies*. Clin Exp Immunol, 2012. **167**(1): p. 7-14.
147. Puthenparampil, M., et al., *BAFF is decreased in the cerebrospinal fluid of multiple sclerosis at clinical onset*. J Neuroimmunol, 2016. **297**: p. 63-7.
148. Hsi, E.D. and D.G. Remick, *Monocytes are the major producers of interleukin-1 beta in an ex vivo model of local cytokine production*. J Interferon Cytokine Res, 1995. **15**(1): p. 89-94.
149. Dujmovic, I., et al., *The analysis of IL-1 beta and its naturally occurring inhibitors in multiple sclerosis: The elevation of IL-1 receptor antagonist and IL-1 receptor type II after steroid therapy*. J Neuroimmunol, 2009. **207**(1-2): p. 101-6.
150. Cannella, B. and C.S. Raine, *The adhesion molecule and cytokine profile of multiple sclerosis lesions*. Ann Neurol, 1995. **37**(4): p. 424-35.
151. Møllergaard, J., et al., *Natalizumab treatment in multiple sclerosis: marked decline of chemokines and cytokines in cerebrospinal fluid*. Mult Scler, 2010. **16**(2): p. 208-17.
152. Ghalamfarsa, G., et al., *IL-21 and IL-21 receptor in the immunopathogenesis of multiple sclerosis*. J Immunotoxicol, 2016. **13**(3): p. 274-85.
153. Ettinger, R., et al., *IL-21 induces differentiation of human naive and memory B cells into antibody-secreting plasma cells*. J Immunol, 2005. **175**(12): p. 7867-79.
154. Eto, D., et al., *IL-21 and IL-6 are critical for different aspects of B cell immunity and redundantly induce optimal follicular helper CD4 T cell (Tfh) differentiation*. PLoS One, 2011. **6**(3): p. e17739.
155. Deenick, E.K. and S.G. Tangye, *Autoimmunity: IL-21: a new player in Th17-cell differentiation*. Immunol Cell Biol, 2007. **85**(7): p. 503-5.

156. Nurieva, R., et al., *Essential autocrine regulation by IL-21 in the generation of inflammatory T cells*. *Nature*, 2007. **448**(7152): p. 480-3.
157. Korn, T., et al., *IL-21 initiates an alternative pathway to induce proinflammatory T(H)17 cells*. *Nature*, 2007. **448**(7152): p. 484-7.
158. Peluso, I., et al., *IL-21 counteracts the regulatory T cell-mediated suppression of human CD4+ T lymphocytes*. *J Immunol*, 2007. **178**(2): p. 732-9.
159. Zanin-Zhorov, A., et al., *Selective oral ROCK2 inhibitor down-regulates IL-21 and IL-17 secretion in human T cells via STAT3-dependent mechanism*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014. **111**(47): p. 16814-9.
160. Wang, H.H., et al., *Interleukin-17-secreting T cells in neuromyelitis optica and multiple sclerosis during relapse*. *J Clin Neurosci*, 2011. **18**(10): p. 1313-7.
161. Tegla, C.A., et al., *Dual role of Response gene to complement-32 in multiple sclerosis*. *Exp Mol Pathol*, 2013. **94**(1): p. 17-28.
162. Romme Christensen, J., et al., *Systemic inflammation in progressive multiple sclerosis involves follicular T-helper, Th17- and activated B-cells and correlates with progression*. *PLoS One*, 2013. **8**(3): p. e57820.
163. Tzartos, J.S., et al., *IL-21 and IL-21 receptor expression in lymphocytes and neurons in multiple sclerosis brain*. *Am J Pathol*, 2011. **178**(2): p. 794-802.
164. Wu, A., et al., *Cerebrospinal fluid IL-21 levels in Neuromyelitis Optica and multiple sclerosis*. *Can J Neurol Sci*, 2012. **39**(6): p. 813-20.
165. Zhang, X., et al., *Differential reconstitution of T cell subsets following immunodepleting treatment with alemtuzumab (anti-CD52 monoclonal antibody) in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis*. *J Immunol*, 2013. **191**(12): p. 5867-74.
166. Ye, S., et al., *Interleukin-35: the future of hyperimmune-related diseases?* *J Interferon Cytokine Res*, 2013. **33**(6): p. 285-91.
167. Buc, M., *Role of regulatory T cells in pathogenesis and biological therapy of multiple sclerosis*. *Mediators Inflamm*, 2013. **2013**: p. 963748.
168. Feger, U., et al., *Increased frequency of CD4+ CD25+ regulatory T cells in the cerebrospinal fluid but not in the blood of multiple sclerosis patients*. *Clin Exp Immunol*, 2007. **147**(3): p. 412-8.
169. Haas, J., et al., *Reduced suppressive effect of CD4+CD25high regulatory T cells on the T cell immune response against myelin oligodendrocyte glycoprotein in patients with multiple sclerosis*. *Eur J Immunol*, 2005. **35**(11): p. 3343-52.
170. Viglietta, V., et al., *Loss of functional suppression by CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with multiple sclerosis*. *J Exp Med*, 2004. **199**(7): p. 971-9.
171. Jafarzadeh, A., et al., *Circulating levels of interleukin-35 in patients with multiple sclerosis: evaluation of the influences of FOXP3 gene polymorphism and treatment program*. *J Mol Neurosci*, 2015. **55**(4): p. 891-7.
172. Stenner, M.P., et al., *Effects of natalizumab treatment on Foxp3+ T regulatory cells*. *PLoS One*, 2008. **3**(10): p. e3319.

173. Suresh, M., et al., *Role of lymphotoxin alpha in T-cell responses during an acute viral infection*. J Virol, 2002. **76**(8): p. 3943-51.
174. Porter, A.G., *Human tumour necrosis factors-alpha and -beta: differences in their structure, expression and biological properties*. FEMS Microbiol Immunol, 1990. **2**(4): p. 193-9.
175. Navikas, V., et al., *Augmented expression of tumour necrosis factor-alpha and lymphotoxin in mononuclear cells in multiple sclerosis and optic neuritis*. Brain, 1996. **119** (Pt 1): p. 213-23.
176. Rieckmann, P., et al., *Tumor necrosis factor-alpha messenger RNA expression in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis is associated with disease activity*. Ann Neurol, 1995. **37**(1): p. 82-8.
177. Lieberman, A.P., et al., *Production of tumor necrosis factor and other cytokines by astrocytes stimulated with lipopolysaccharide or a neurotropic virus*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86**(16): p. 6348-52.
178. Cavender, D.E., D. Edelbaum, and M. Ziff, *Endothelial cell activation induced by tumor necrosis factor and lymphotoxin*. Am J Pathol, 1989. **134**(3): p. 551-60.
179. Selmaj, K., et al., *Cytokine cytotoxicity against oligodendrocytes. Apoptosis induced by lymphotoxin*. J Immunol, 1991. **147**(5): p. 1522-9.
180. Navikas, V. and H. Link, *Review: cytokines and the pathogenesis of multiple sclerosis*. J Neurosci Res, 1996. **45**(4): p. 322-33.

VI Erklärungen zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde im Hertie-Institut für klinische Hirnforschung in der Abteilung Neuroimmunologie unter der Betreuung von PD Dr. Felix Bischof durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte in Zusammenarbeit mit meinem Doktorvater PD Dr. Felix Bischof und meinem Betreuer Yashar Abbasi.

Die FACS-Analyse wurden nach Einarbeitung durch die MTA Evelyn Dubois von mir eigenständig durchgeführt und ausgewertet. Die Serumanalyse wurde durch die MTA Evelyn Dubois durchgeführt und von mir selbst ausgewertet.

Die statistische Auswertung erfolgte nach Anleitung von PD Dr. Felix Bischof durch mich.

Ich versichere, das Manuskript selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, den 30.6.2017

VII Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt meinem Doktorvater Herrn PD Dr. Felix Bischof. Einerseits für die Etablierung dieses interessanten Projekts, andererseits für seine fachliche und organisatorische Unterstützung bei dessen Ausarbeitung. Dr. Bischofs exzellente ärztliche und wissenschaftliche Expertise sowie seine erstklassige Betreuung haben entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Außerdem wäre die Rekrutierung der Patienten für dieses Projekt ohne die Mithilfe der neurologischen Poliklinik der Universitätsklinik Tübingen undenkbar gewesen. Dabei danke ich den ärztlichen Kollegen Herrn Johannes Tünnerhoff, Herrn Dr. Christoph Ruschil und Frau Maria-Ioanna Stefanou sowie dem gesamten Team der neurologischen Poliklinik.

Des Weiteren danke ich Frau Evelyn Dubois für ihre sachkundige Einweisung in den Laborbetrieb. Ihre umfassende und didaktisch kompetente Einführung in die experimentellen Arbeitsschritte war eine unverzichtbare Stütze in der praktischen Ausarbeitung dieses Projekts.

Besonders danke ich meinem Kommilitonen und Freund Herrn Claudius Speer für seine versierten und differenzierten Anmerkungen bei fachlichen Fragestellungen und die freundschaftliche Zusammenarbeit innerhalb der Arbeitsgruppe.

Zuletzt danke ich meinen Eltern, die mich über das gesamte Studium immer motiviert und unterstützt haben.