



TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN  
Fakultät für Medizin – Lehrstuhl für Neurologie

**Auswirkung anti-CD20-vermittelter B-Lymphozytendepletion  
auf die Frequenz regulatorischer T-Lymphozyten und  
die Funktion anderer Antigen präsentierender Zellen**

Eva Maria Schleich

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

Vorsitzender: Prof. Dr. Ernst J. Rummeny

Prüfer der Dissertation:

1. Prof. Dr. Martin Weber
2. apl. Prof. Dr. Ulrich Keller

Die Dissertation wurde am 25.01.2016 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die promotionsführende Einrichtung am 15.02.2017 angenommen.

KLINIKUM RECHTS DER ISAR

Neuro-Kopf-Zentrum

Neurologische Klinik und Poliklinik

Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Bernhard Hemmer

**Auswirkung anti-CD20-vermittelter  
B-Lymphozytendepletion auf die Frequenz  
regulatorischer T-Lymphozyten und die Funktion  
anderer Antigen präsentierender Zellen**

---

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der Technischen Universität München

Vorgelegt von

Eva Maria Schleich

geboren am 28.10.1986 in München

2016

Meinen Eltern

*„Mit jedem Tag stellte ich fest, dass mich schrittweise meine Kraft verließ.“*

Augustus Frederick d'Este (1794-1848) über Multiple Sklerose

## **INHALTSVERZEICHNIS**

Tabellenverzeichnis .....	5
Abbildungsverzeichnis .....	6
Abkürzungsverzeichnis .....	7
1. Einleitung .....	9
1.1 Multiple Sklerose .....	9
1.1.1 Epidemiologie und Ätiologie .....	9
1.1.2 Pathogenese .....	11
1.1.3 Symptome und Diagnostik .....	13
1.2 NMO .....	17
1.2.1 Epidemiologie und Ätiologie .....	17
1.2.2 Pathogenese .....	18
1.2.3 Symptome und Diagnostik .....	19
1.3 Therapie von MS und NMO .....	21
1.4 Rituximab – Aufbau und Wirkmechanismus .....	22
1.5 Fragestellung .....	23
2. Material und Methoden .....	25
2.1 Material .....	25
2.1.1 Geräte .....	25
2.1.2 Software .....	25
2.1.3 Verbrauchsmaterialien .....	26
2.1.4 Chemikalien und Reagenzien .....	26
2.1.5 Antikörper .....	27
2.1.6 Medien und Pufferlösungen .....	27
2.2 Methoden .....	28
2.2.1 Studiendesign und Probandenkriterien .....	28
2.2.2 PBMC-Herstellung zur Kryokonservierung .....	30
2.2.3 Versuchsaufbau .....	32
2.2.4 PBMC-Aufbereitung und Zellzählung .....	33
2.2.5 FACS-Analyse .....	33
2.2.5.1 Quantitative Bestimmung der Leukozytensubpopulationen .....	35
2.2.5.2 Darstellung der SLAM-Expriemierung von Monozyten nach LPS-Stimulation .....	36
2.2.6 MACS-Separation zur Monozytenaufreinigung .....	36
2.2.7 Quantitative TNF $\alpha$ -Messung mittels Elispot .....	38

2.2.8 Statistische Auswertung .....	41
3. Ergebnisse.....	42
3.1 Einfluss von Rituximab auf die relativen Häufigkeiten von Leukozytensubpopulationen .....	42
3.1.1 Die relative Häufigkeit der Lymphozyten .....	44
3.1.2 Die Frequenz regulatorischer T-Zellen .....	45
3.1.3 Die relative Häufigkeit der Monozyten .....	47
3.2 Einfluss von Rituximab auf die Monozytenaktivität.....	49
3.2.1 FACS-Analyse der SLAM-Exprimierung von Monozyten unter LPS-Stimulation .....	50
3.2.2 Elispot-Analyse der TNF $\alpha$ -Produktion von Monozyten nach LPS-Stimulation .....	54
4. Diskussion.....	59
4.1 Grundlagen der B- und T-Zellinteraktion .....	59
4.2 Rituximab und das zelluläre Immunsystem .....	63
4.3 Einblicke in die MS-Therapie .....	72
4.4 Limitationen der Studie .....	75
5. Zusammenfassung.....	77
6. Summary.....	78
Literaturverzeichnis .....	79
Danksagung .....	91

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: EDSS Einteilung .....	16
Tabelle 2: Gruppenaufteilung.....	30
Tabelle 3: Relative Häufigkeiten von CD4 <sup>+</sup> , CD8 <sup>+</sup> und CD14 <sup>+</sup> Leukozytensubpopulationen .....	43
Tabelle 4: % SLAM exprimierender CD14 <sup>+</sup> Zellen Gruppe 1 - 4 .....	51
Tabelle 5: TNF $\alpha$ produzierende Zellen/3.000 Zellen im Elispot Gruppe 1 - 4 .....	55

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Weltkarte zum Erkrankungsalter bei MS .....	10
Abbildung 2: Graphische Darstellung des Übergang von RRMS zu SPMS.....	14
Abbildung 3: Schema zur Entstehung monoklonaler Antikörper.....	23
Abbildung 4: „Buffy coat“ aus PBMCs über Biocollphase .....	31
Abbildung 5: Emissions- und Exitationsspektren der Fluoreszenzfarbstoffe APC, PE und FITC.....	34
Abbildung 6: FACS SSC/FSC Diagramm mit „Leukozyten-gate“ .....	35
Abbildung 7: MACS-Separation - Isolation der Monozyten aus der LS Säule .....	38
Abbildung 8: MACS-Separation - Versuchsaufbau .....	38
Abbildung 9: Probenanordnung auf Elispotplatte.....	40
Abbildung 10: Darstellung der regulatorischen T-Lymphozyten in der FACS Auswertung.....	46
Abbildung 11: Punktediagramm Gruppen 1 und 2: CD4 <sup>+</sup> 25 <sup>+</sup> 127 <sup>-</sup> Zellen in allen CD4 <sup>+</sup> Zellen.....	46
Abbildung 12: Punktediagramm Gruppen 3 und 4: CD4 <sup>+</sup> 25 <sup>+</sup> 127 <sup>-</sup> Zellen in allen CD4 <sup>+</sup> Zellen.....	47
Abbildung 13: FACS CD14/FSC Diagramm.....	47
Abbildung 14: Punktediagramm Gruppen 1 und 2: CD14 <sup>+</sup> Zellen in allen CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup> /CD14 <sup>+</sup> Zellen ....	48
Abbildung 15: Punktediagramm Gruppen 3 und 4: CD14 <sup>+</sup> Zellen in allen CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup> /CD14 <sup>+</sup> Zellen ....	49
Abbildung 16: SLAM-Exprimierung in Abhängigkeit der LPS-Konzentration .....	51
Abbildung 17: SLAM-Exprimierung nach LPS-Stimulation der Gruppen 1 und 2.....	52
Abbildung 18: SLAM-Exprimierung nach LPS-Stimulation der Gruppen 3 und 4.....	53
Abbildung 19: Boxplot SLAM-Exprimierung bei 250 pg LPS/ml im Gruppenvergleich 3 und 4 .....	53
Abbildung 20: Elispot wells .....	54
Abbildung 21: TNF α-Produktion nach LPS-Stimulation der Gruppen 1 und 2 .....	56
Abbildung 22: TNF α-Produktion nach LPS-Stimulation der Gruppen 3 und 4 .....	56
Abbildung 23: Boxplot TNF α-Produktion bei 250 pg LPS/ml im Gruppenvergleich 3 und 4.....	58
Abbildung 24: Differenzierung CD4 <sup>+</sup> T-Zellen durch Zytokine.....	61

## Abkürzungsverzeichnis

AK	Antikörper
APC	Allophycocyanin
APC	Antigen presenting cell/Antigen präsentierende Zelle
AQP4	Aquaporin 4
BCIP®	5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat
BCL	B-Cell lymphoma/B-Zelllymphom
BCLL	Chronische B-Lymphozytenleukämie
BCM	B- Cell medium/B-Zellmedium
BCR	B cell receptor/B-Zellrezeptor
BSA	Bovines Serum Albumin
CD	Cluster of differentiation/Zelldifferenzierungsmarker
CIS	Clinically isolated syndrome/Klinisch isoliertes Syndrom
DLCBCL	Diffuse large B-cell lymphoma/Diffuses großzelliges B-Zelllymphom
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium/Dulbecco's modifiziertes Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
EAE	Experimentelle autoimmune Encephalomyelitis
EBV	Ebstein Barr Virus
EDSS	Expanded disability status scale/Erweiterte Skala des Schweregrads der Behinderung
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
Elispot	Enzyme linked immuno spot assay/Enzymgekoppelter Immunmodulatorenachweis
FACS	Fluorescence activated cell sorting/Fluoreszenzaktivierte Zellsortierung
FCS	Fetal calfs serum/ Fötales Kälberserum
FITC	Fluoreszinoisothiozyanat
FSC	Forward scatter/ Vorwärtsstreulichtbereich
HHV 6	Humanes Herpesvirus 6
HLA	Human leukocyte antigen/Humanes Leukozytenantigen
HSV 1	Herpes simplex Virus 1
IgD (G, M)	Immunglobulin D (G, M)
IL-2 (-3,..., -23)	Interleukin 2 (-3,..., -23)
INF	Interferon
LPS	Lipopolysaccharid
MACS	Magnetically activated cell sorting/Magnetisch aktivierte Zellsortierung

MALT	Mukosa assoziiertes lymphatisches Gewebe
MHC	Major histocompatibility complex/Haupthistokompatibilitätskomplex
MOG	Myelin Oligodendrozyten Glykoprotein
MRT	Magnet Resonanz Tomographie
MS	Multiple Sklerose
NBT	Nitroblau Tetrazolium
NHL	Non- Hodgkin- Lymphom
NMO	Neuromyelitis Optica
NNO	Neuritis nervi optici/Entzündung des Nervus Optikus
OAPs	Orthogonal arrays of particles/Orthogonale Anordnung von Partikeln
PBMC	Peripheral blood mononuclear cells/Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PBS	Phosphate buffered saline/Phosphat gepufferte Salzlösung
PE	Phycoerythrin
PPMS	Primary progressive multiple sclerosis/Primär progrediente Multiple Sklerose
Rpm	Rounds per minute/Umdrehungen pro Minute
RPMI-1640	Roswell Park Memorial Institute Zellkulturmedium-1640
RRMS	Relapsing remitting multiple sclerosis/Schubförmig remittierende Multiple Sklerose
SD	Standard deviation/Standardabweichung
SEM	Standard error of the mean/Standardfehler des Mittelwerts
SLAM	Signalling lymphocyte activation molecule/Aktivierung signalisierendes Lymphozytenmolekül
SPMS	Sekundary progressive multiple Sclerosis/Sekundär progrediente Multiple Sklerose
SSC	Side scatter/Seitwärtsstreulichtbereich
TCR	T-cell receptor/ T-Zellrezeptor
TGF $\beta$	Transforming growth factor $\beta$
TLR	Toll like receptor/Toll-ähnlicher Rezeptor
TNF $\alpha$	Tumornekrosefaktor $\alpha$
T <sub>reg</sub>	Regulatorische T-Lymphozyten
ZNS	Zentrales Nervensystem

Ländernamen unter 2.1 Material sind entsprechend ISO-3166 ALPHA-2 abgekürzt.

Der Term „Patienten“ ist in dieser Arbeit als geschlechtsneutrale Abkürzung von „Patienten/-innen“ zu verstehen.

## 1. Einleitung

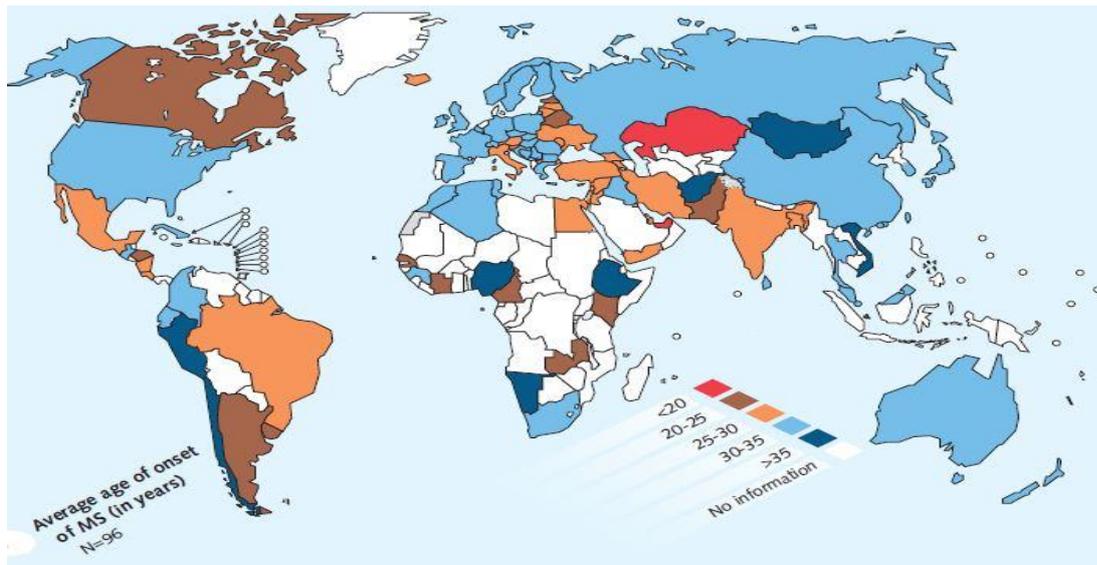
Neuroimmunologie befasst sich mit Interaktionen zwischen Immunsystem und zentralem Nervensystem. Ein Ziel der neuroimmunologischen Forschung ist es, zum weiteren Verständnis von autoimmunen Krankheiten, wie der Multiplen Sklerose und der Neuromyelitis Optica, beizutragen [Miller, A. et al., 2009]. Bei beiden Erkrankungen kommt es zu einer autoimmun vermittelten Inflammation und Demyelinisierung von Nerven innerhalb des zentralen Nervensystems. Trotz intensiver Forschung konnten noch nicht alle zugrundeliegenden immunologischen Pathomechanismen identifiziert werden. Gerade die Kenntnis über inflammatorische Wechselwirkungen innerhalb des zellulären Immunsystems, ist essentiell für eine zielgerichtete und effektive Therapie von Patienten mit MS oder NMO.

### 1.1 Multiple Sklerose

Augustus Frederick d'Este (1794- 1848) hinterließ in seinen Tagebüchern die erste Beschreibung typischer Symptome einer Multiplen Sklerose. Die pathologischen Veränderungen im ZNS wurden kurz darauf erstmals ca. 1837 von Robert Carswell und 1842 von Jean Cruveilhier entdeckt und beschrieben. Erst 1868 beschrieb Jean-Martin Charcot den pathologischen Zusammenhang zwischen einer „sclérose en plaques“ und der klinischen MS-Symptomatik [Landtblom, A.M. et al., 2010].

#### 1.1.1 Epidemiologie und Ätiologie

In Deutschland leben ca. 100.000-120.000 Menschen mit der Diagnose MS. Weltweit sind es etwa 2,5 Millionen Menschen. Sowohl Inzidenz, als auch Prävalenz variieren weltweit stark. In Nordamerika, Nordeuropa und im Süden Australiens können die höchsten Prävalenzwerte festgestellt werden [Noseworthy, J.H. et al., 2000]. Die Verteilung auf der Nordhalbkugel folgt dabei einem Nord-Südgefälle. Die Prävalenz der MS beträgt in Europa 60 bis 100/100.000 Einwohner [Kroner-Milsch, A. et al., 2012]. Die Inzidenz wird für Europa als 4/100.000/Jahr angegeben. Einzelne Regionen wie Schottland, Sardinien und Ost-Norwegen weisen eine höhere Inzidenz auf [Pugliatti, M. et al., 2006]. Es findet sich ein für Autoimmunerkrankungen typisches Verteilungsmuster zwischen Frauen und Männern von 3:1 [Bove, R. et al., 2013]. Der Erkrankungsbeginn lag 2008 im Mittel bei 29,2 Jahren [WHO, 2008]. Abbildung 1 stellt eine weltweite Übersicht des durchschnittlichen Erkrankungsalters in den Ländern dar.



**Abbildung 1: Weltkarte zum Erkrankungsalter bei MS** [WHO, 2008]

Auf Grund des frühen Erkrankungsalters zählt die MS zu einem der häufigsten Gründe für eine nicht angeborene Behinderung beim jungen Erwachsenen [Noseworthy, J.H. et al., 2000]. Die Ätiologie von MS ist noch nicht umfassend bekannt. Es konnten jedoch einige Risikofaktoren ermittelt werden, die zur Krankheitsentstehung beitragen:

Eine genetische Disposition spiegelt sich im gehäuftem Auftreten von MS innerhalb einzelner Familien wider. Verwandte ersten Grades haben ein 20-faches Erkrankungsrisiko. Bei homozygoten Zwillingen steigt das Risiko sogar 200-fach im Vergleich zur Normalbevölkerung [Kroner-Milsch, A. et al., 2012]. Auch die völkerkundliche Abstammung nimmt Einfluss auf die Häufigkeit von MS: Die Prävalenz in Schottland liegt deutlich über der von England. Der Prävalenzunterschied folgt der geografischen Grenze, sodass eine schottische Abstammung als Risikofaktor angesehen werden muss [Rothwell, P.M. et al., 1998]. Auch in Sardinien liegt die Prävalenzrate deutlich über dem italienischen Durchschnitt [Pugliatti, M. et al., 2006]. Die für das MHC-System codierende HLA-DR2 (=DRB1\*1501) Frequenz wurde in allen Ländern außer Sardinien, als genereller genetischer Risikofaktor innerhalb der europäischen Bevölkerung identifiziert [Noseworthy, J.H. et al., 2000]. Bei der genetischen Disposition handelt es sich um einen polygenen Prozess, bei dem weitere nicht MHC kodierende Loci eine Rolle spielen. Diese nehmen einzeln nur einen geringen Einfluss, haben aber in Kombination mit HLA-DRB1, HLA-DRB2 oder DRBQ Varianten in IL-2 und IL-7 Rezeptoren Auswirkungen auf das Immunsystem (z.B. HLA-DRB1/EVI5). Es ändert sich bei solch einer Konstellation unter anderem das Verhältnis von ungebundenen zu membrangebundenen IL-7, IL-2 und TNF-Rezeptoren [Oksenberg, J.R., 2013]. Es konnte kein Zusammenhang zwischen HLA-DRB1-Allelen und dem Schweregrad der MS-Erkrankung festgestellt werden [Van der Walt, A. et al., 2011].

Durch Migration wird das Erkrankungsrisiko beeinflusst. Dies impliziert, dass Umweltfaktoren Einfluss auf den Ausbruch von MS nehmen. Studien haben belegt, dass sich diese Umwelteinflüsse vor allem in den ersten 15 Lebensjahren auf das persönliche Erkrankungsrisiko auswirken [Kroner-Milsch, A. et al., 2012].

Das Epstein Barr Virus (EBV) ist dabei der stärkste bekannte Risikofaktor für MS. Bei 99% der Patienten mit MS wurde eine EBV-Seropositivität durch eine frühere Infektion nachgewiesen [Bagert, B.A., 2009]. EBV-Infektionen in der Jugend bedingen ein 15-mal höheres MS-Erkrankungsrisiko im Vergleich zur Normalbevölkerung. Bei einer EBV Infektion im Erwachsenenalter resultiert ein 30-mal höheres Risiko an MS zu erkranken [Ascherio, A., 2013]. Auf welche Weise die EBV Infektion zur MS Entstehung beiträgt ist unklar. Antigenmimicry, langlebige B-Zell-Klone, sowie eine zytotoxische T-Zellantwort auf infizierte B-Zellen werden diskutiert [Bagert, B.A., 2009]. Ein Zusammenhang von anderen Virusinfektionen (z.B. HHV-6, HSV 1) und der Erkrankung an MS konnte in Studien bisher nicht eindeutig nachgewiesen werden [Kroner-Milsch, A. et al., 2012].

Die Prävalenz von Multipler Sklerose ist in Gebieten mit geringerer Sonneneinstrahlung, respektive einem geringeren Vitamin D Angebot erhöht [Kroner-Milsch, A. et al., 2012]. In neuen Studien schien ein Vitamin D Mangel sowohl das Risiko der MS Entwicklung nach einem klinisch isolierten Syndrom zu erhöhen, als auch die Progression der MS zu fördern [Deluca, H.F. et al., 2001].

Auch Rauchen und Adipositas in der Kindheit werden zu den Risikofaktoren gerechnet [Ascherio, A., 2013].

Es wird angenommen, dass die individuelle Suszeptibilität für Multiple Sklerose von einer Kombination aus genetischer Disposition mit verschiedenen Umweltfaktoren abhängt. Ein spezifischer auslösender ätiologischer Faktor konnte bisher nicht identifiziert werden.

### **1.1.2 Pathogenese**

Zum besseren Verständnis der Pathogenese von MS werden hauptsächlich Studien am Tiermodell der MS, der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE) durchgeführt. Dabei werden vorwiegend Mäuse mit Antigenen, wie unter anderem Myelin Oligodendrozyten Glykoprotein immunisiert [Amiry-Moghaddam, M. et al.]. Dies führt zu einer histopathologisch mit MS vergleichbaren Erkrankung [Yanaba, K. et al., 2008]. Anhand der an EAE erkrankten Mäuse konnten wichtige Rückschlüsse auf immunpathologische Abläufe bei Multipler Sklerose beim Menschen gezogen werden [Constantinescu, C.S. et al., 2011]. Fest steht, dass eine autoimmun vermittelte Reaktion zum selektiven Verlust von Myelinscheiden im ZNS führt und direkt oder indirekt vermittelte Axonschäden bedingt [Kleinschnitz, C. et al., 2007]. Welche immunologischen Wechselwirkungen genau ablaufen, ist nicht in allen Einzelheiten geklärt. Auch das Zielantigen, auf

Grund dessen es zur Zerstörung der Myelinscheide aus Oligodendrozyten kommt, wurde noch nicht identifiziert [Lassmann, H. et al., 2005]. Lange Zeit wurde die Entstehung und Aufrechterhaltung der Autoimmunreaktionen bei MS ausschließlich T-Lymphozyten zugeschrieben [Hellings, N. et al., 2002; Stinissen, P. et al., 1999; Stinissen, P. et al., 1997]. Neuere Erkenntnisse verdeutlichen zudem die pathophysiologische Bedeutung von B-Zellen [Disanto, G. et al., 2012; Franciotta, D. et al., 2008; Krumbholz, M. et al., 2012]. Bei MS findet sich dementsprechend eine proinflammatorische Dysregulation von B- und T-Lymphozyten. Zudem kommt es durch TNF  $\alpha$ , aktivierte Makrophagen sowie einer antikörpervermittelten Immunreaktion zu einer direkten Zerstörung der Oligodendrozyten [Lock, C.B. et al., 2003]. Aus nicht geklärter Ursache erfolgt in chronischen Läsionen trotz Anwesenheit von Vorläufer-Oligodendrozyten keine komplette Remyelinisierung [Miron, V.E. et al., 2011]. Eine neurodegenerative Komponente, welche das gesamte Gehirnparenchym betrifft, wird bei MS diskutiert [Moore, G.R., 2010].

Die autoimmunen B- und T-Zell-Interaktionen laufen bei MS-Patienten heterogen ab und resultieren in unterschiedlichen Krankheitsausprägungen [Moore, G.R., 2010]. Es werden verschiedene Pathomechanismen für aktiv fulminante und chronische Verläufe diskutiert [Frohman, E.M. et al., 2006]. Bei den meisten Patienten können die Plaques im ZNS einem der vier immunologischen Muster zugeordnet werden [Hernandez-Pedro, N.Y. et al., 2013]:

Typ I: T-Zell vermittelte Zerstörung der Oligodendrozyten durch Makrophagen.

Typ II: T-Zellen und AK sind nachweisbar. Die Demyelinisierung entsteht durch spezifische AK und das Komplementsystem. Dies stellt die häufigste Konstellation bei MS-Patienten dar.

Typ III: Es handelt sich um eine distale Oligodentropathie, welcher eine Apoptose folgt.

Typ IV: Einer primären Oligodendrozyten-Schädigung folgt eine sekundäre Demyelinisierung.

In fast allen aktiven Läsionen lassen sich zudem Makrophagen und Mikroglia nachweisen. Daher wurde vor allem für die Plaquetypen III und IV diskutiert, ob eine TLR vermittelte Makrophagenaktivierung initial zur Zerstörung der Myelinscheide beiträgt [Sriram, S., 2011].

Die auf Grund der immunpathologischen Vorgänge bei MS entstehenden Demyelinisierungsherde sind histopathologisch scharf abgrenzbar und weisen Axone komplett ohne Myelinscheide innerhalb eines vernarbten Gliazellgewebes auf [Lassmann, H. et al., 2005].

### 1.1.3 Symptome und Diagnostik

Ohne isolierende Oligodendrozyten ist die axonale Leitgeschwindigkeit herabgesetzt oder unterbrochen [Lock, C.B. et al., 2003]. Der Verlust der Myelinscheide führt im inflammatorischen Milieu zu dauerhaften Axonschäden [Irvine, K.A. et al., 2008]. Das klinische Bild von MS wird dementsprechend durch das Ausmaß und die Lokalisation der demyelinisierten Läsionen bestimmt.

Erstes Frühsymptom ist bei 20 % der Patienten eine Neuritis nervi optici (NNO) [Francis, C.E., 2013]. Diese äußert sich durch eine plötzliche, meist einseitige Visusverschlechterung mit verändertem Farb- und Kontrastsehen und periorbitalen Schmerzen [Chen, L. et al., 2005]. Sind zum Zeitpunkt der NNO im MRT keine Herde nachweisbar, besteht trotzdem ein 25 %-Risiko innerhalb der nächsten 15 Jahre an MS zu erkranken [Kroner-Milsch, A. et al., 2012].

Zu Beginn der MS besteht oft eine Schwäche in den Extremitäten mit leichter Ataxie. Die Muskeleigenreflexe sind meist erhöht [Masuhr, K.F. et al., 2013]. Je nach Verlauf entwickeln sich später manifeste Paresen, bis hin zur spastischen Paraparese. Auch Sensibilitätsstörungen sind sehr häufig und äußern sich unter anderem als Parästhesien, Dysästhesien oder neuropathische Schmerzen. Ein elektrisierendes Gefühl die Wirbelsäule hinab bei Kopfbeugung (Lhermitte Zeichen) deutet auf eine Läsion im cervikalen Spinalmark hin [Sa, M.J., 2012]. Symptome aufgrund einer Rückenmarksbeteiligung sind bei MS eher unilateral oder asymmetrisch ausgeprägt [Weinshenker, B.G. et al., 2006].

In späteren Stadien lassen sich oft cerebelläre Symptome, wie Ataxie, Aktionstremor und Nystagmus erkennen. Es kann zu einer skandierten Sprache oder bei Hirnstammläsionen zu anderen Dysarthrien kommen [Kroner-Milsch, A. et al., 2012]. Die Entwicklung einer Epilepsie wird nur in Einzelfällen beobachtet [Sa, M.J., 2012].

Blasen- und Mastdarmstörungen sind ein typisches Symptom einer länger bestehenden MS [Yang, C.C., 2013]. 75 % der MS-Patienten haben im Spätstadium Blasenstörungen. Die Art der Blasenentleerungsstörung wird von der Lage der demyelinisierten Läsion bestimmt [Kroner-Milsch, A. et al., 2012]. Auch sexuelle Dysfunktionen treten häufig bei MS-Patienten beider Geschlechter auf [Fletcher, S.G. et al., 2009].

Die Mehrzahl der MS-Patienten leidet an Fatigue, einem körperlichen und geistigen Erschöpfungszustand [Cook, K.F. et al., 2013]. Des Weiteren führt eine Erkrankung an MS bei 40-65 % der Patienten zu kognitiven Einschränkungen [Jongen, P.J. et al., 2012]. Auch Depressionen treten gehäuft bei MS-Patienten auf. Eine depressionsauslösende Plaque-Lokalisation konnte bisher nicht identifiziert werden [Kroner-Milsch, A. et al., 2012].

Sowohl die Schwere der Symptomatik als auch der Krankheitsverlauf bei MS sind individuell verschieden. Es werden vornehmlich die folgenden klinischen Erkrankungsverläufe unterschieden:

Schubförmig remittierende Multiple Sklerose – RRMS

Die RRMS stellt mit 85% den häufigsten MS Phänotyp bei Diagnose dar [Keegan, B.M. et al., 2002]. Die Symptome treten bei RRMS in Schüben auf. Diese können in unterschiedlicher Frequenz auftreten und dauern meist etwa eine Woche bis einen Monat [Vollmer, T., 2007]. Nach den Schüben kommt es entweder zur vollständigen Restitution, oder es bleibt – häufig bei länger bestehender RRMS – ein neurologisches Defizit bestehen. Zwischen den Schüben darf per Definition einer RRMS jedoch keine Krankheitsprogression nachweisbar sein [Lublin, F.D. et al., 1996]. Der erste Schub vor MS-Diagnose wird als klinisch isoliertes Syndrom bezeichnet [Murray, T.J., 2006].

Sekundär progrediente Multiple Sklerose – SPMS

Bei etwa der Hälfte der RRMS-Fälle geht der schubförmige Verlauf nach ungefähr 10 Jahren in eine progrediente MS-Erkrankung über [He, D. et al., 2013]. Neue Erkenntnisse implizieren, dass der Übergang zur SPMS eher vom Patientenalter als von der Erkrankungsdauer abhängig ist [Tutuncu, M. et al., 2013]. Bei SPMS kommt es durch akkumulierte Axonschäden zur kontinuierlichen Zustandsverschlechterung [Vollmer, T., 2007]. Zusätzlich kann es zu einer schubweisen Verstärkung der Symptomatik kommen [Keegan, B.M. et al., 2002].

In Abbildung 2 sind der Verlauf von RRMS und SPMS in Abhängigkeit des pathophysiologischen Krankheitsgeschehens graphisch dargestellt.

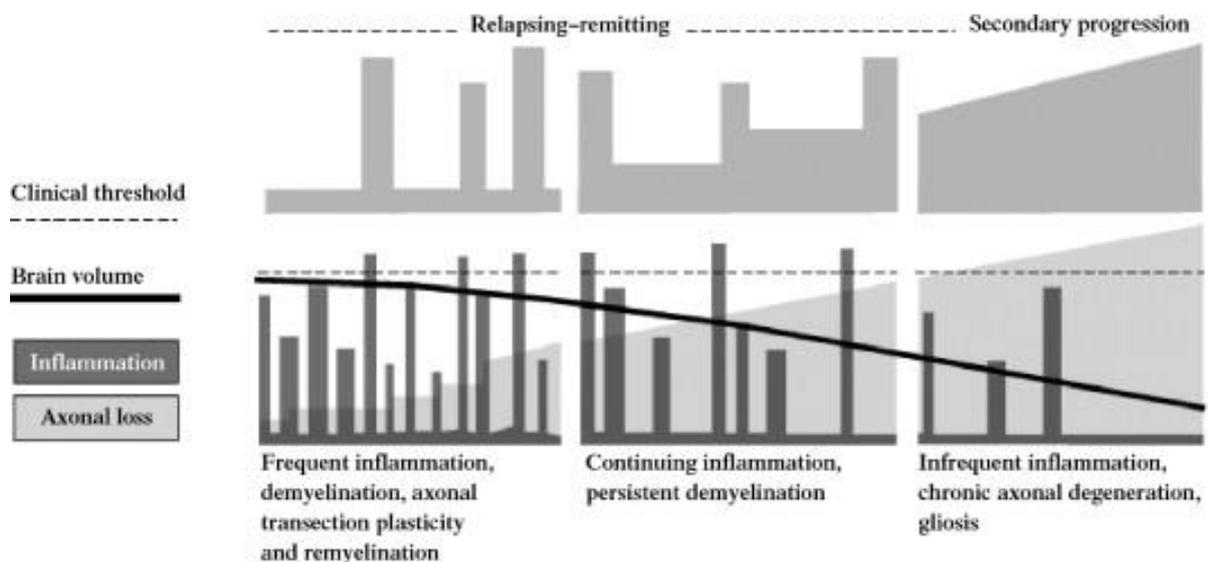


Abbildung 2: Graphische Darstellung des Übergang von RRMS zu SPMS

[Vollmer, T., 2007]

### Primär progrediente Multiple Sklerose – PPMS

Besteht seit Krankheitsbeginn eine kontinuierliche Krankheitsprogression, handelt es sich um eine PPMS [Keegan, B.M. et al., 2002]. Im Krankheitsverlauf kann es lediglich zu kleinen Verbesserungen oder einer verzögerten Zustandsverschlechterung kommen. Schübe treten im Unterschied zur SPMS jedoch nicht auf [Lublin, F.D. et al., 1996]. Eine PPMS führt im Krankheitsverlauf früh zu hochgradigen Behinderungen [Confavreux, C. et al., 2006].

Als prognostisch günstig gelten ein frühes Erkrankungsalter, weibliches Geschlecht, eine vollständige Genesung zwischen den Schüben sowie NNO und vorwiegend sensorische Symptome [Keegan, B.M. et al., 2002]. Männliches Geschlecht, ein primär progressiver Verlauf sowie vorwiegend cerebelläre Symptomatik werden hingegen als prognostisch ungünstig angesehen [Weinshenker, B.G. et al., 1991]. Eine hohe Schubfrequenz scheint den Behinderungsgrad im späten Erkrankungsstadium nicht zwingend zu beeinflussen [Scalfari, A. et al., 2013]. Schübe können durch Infektionen oder psychischen Stress ausgelöst werden [Mitsonis, C.I. et al., 2009]. Wenn MS-Symptome durch Wärme verschlechtert werden, spricht man vom Uthoff-Phänomen [Sa, M.J., 2012].

Für die klinische Verlaufsbeurteilung kann der Grad der Behinderung anhand der „Expanded Disability Status Scale“ (EDSS) eingeteilt werden. Dabei werden acht Funktionssysteme (Pyramidenbahn, Zerebellum, Hirnstamm, mentale Funktionen des Großhirns, Visus, Sensibilität, Blase/Mastdarm, sonstige neurologische Defizite) nach ihrer Funktionalität in Schweregrade eingeteilt. Je nach Einteilung in allen Funktionssystemen kann ein EDSS-Wert von 0-10 ermittelt werden [Kurtzke, J.F., 1983]. Eine genaue Beschreibung der EDSS-Werte ist in Tabelle 1 aufgelistet. Ab einem EDSS von 6 ist die Gehfähigkeit eingeschränkt und ein Stock als Gehhilfe von Nöten. Diesen Wert erreichen 50% der Patienten nach 15 Jahren [Weinshenker, B.G., 1994].

Die Diagnose Multiple Sklerose wird klinisch mit Hilfe der McDonald Kriterien gestellt: Die klinischen Symptome müssen dabei mit einer räumlichen und zeitlichen Dissemination der Herde im MRT Befund einhergehen [McDonald, W.I. et al., 2001]. Es ist allerdings sinnvoll MRT und weitere Diagnostik nur bei starkem klinischen MS-Verdacht aufgrund eines CIS und nicht als Screening einzusetzen [Polman, C.H. et al., 2011]. Sind die klinischen Symptome in Kombination mit MRT Befunden nicht eindeutig, können auch eine Liquoranalyse oder visuell evozierte Potentiale zur Diagnosefindung eingesetzt werden [McDonald, W.I. et al., 2001]. Bei der Analyse des Liquors lässt sich anhand des Albumin Liquor/Serum Quotienten eine Blut-Hirn-Schrankenstörung nachweisen. Zudem stellen sich intrathekal synthetisierte IgG Autoantikörper als oligoklonale Banden in der Elektrophorese dar [Andersson, M. et al., 1994]. Der Nachweis oligoklonaler Banden bildet ein

wichtiges diagnostisches Kriterium [Link, H. et al., 2006]. Eine andere autoimmune oder neurologische Erkrankung, welche die klinischen Symptome besser erklären kann, muss vor Diagnose einer Multiplen Sklerose ausgeschlossen werden. Bei Patienten mit NMO ähnlicher Symptomatik muss durch Aquaporin 4 AK Nachweis eine NMO-Erkrankung von der MS-Diagnose abgegrenzt werden [Polman, C.H. et al., 2011].

EDSS	Beschreibung
0	Normaler neurologischer Untersuchungsbefund (alle FS Grad 0)
1,0	Keine Behinderung, minimale Zeichen in 1 FS (Grad 1)
1,5	Keine Behinderung, minimale Zeichen in > 1 FS (Grad 1)
2,0	Minimale Behinderung in 1 FS (Grad 2)
2,5	Minimale Behinderung in 2 FS (Grad 2)
3,0	Mäßige Behinderung in einem FS (Grad 3), oder milde Behinderung in 3–4 FS (Grad 2)
3,5	Uneingeschränkt gehfähig mit mäßiger Behinderung in einem FS (Grad 3) und leichte Behinderung in 1–2 FS (Grad 2); oder 2 FS Grad 3; oder 5 FS Grad 2
4,0	Gehfähig ohne Hilfe oder Pause für 500 m; selbständig für 12 Std. am Tag trotz relativ schwerer Behinderung mit einem FS Grad 4 (andere Grad 0 oder 1) oder Kombination geringerer Schweregrade, die vorausgehende Schritte übertrifft
4,5	Gehfähig ohne Hilfe oder Pause für 300 m; die meiste Zeit des Tages auf; vollschichtig arbeitsfähig, aber gegebenenfalls mit Einschränkung und auf leichte Hilfe angewiesen
5,0	Gehfähig ohne Hilfe oder Pause für 200 m; Schwere der Behinderung beeinträchtigt, volle Tagesaktivitäten
5,5	Gehfähig ohne Hilfe oder Pause für 100 m; Schwere der Behinderung erlaubt keine volle Tagesaktivität
6,0	Intermittierende oder ständige einseitige Gehhilfe benötigt um 100 m mit oder ohne Pause zu gehen
6,5	Ständige beidseitige Gehhilfe benötigt, um 20 m ohne Pause zu gehen
7,0	Unfähig, auch mit Hilfe mehr als 5 m zu gehen, weitgehend auf Rollstuhl angewiesen; fährt selbst mit Standardrollstuhl, Transfer eigenständig; sitzt ca. 12 Std. im Rollstuhl
7,5	Unfähig, mehr als ein paar Schritte zu gehen; auf den Rollstuhl beschränkt, bei Transfer Hilfe benötigt; fährt selbst, kann aber nicht den ganzen Tag in normalem Rollstuhl verbringen; elektrischer Rollstuhl wird möglicherweise benötigt
8,0	Weitgehend bettlägerig oder im Stuhl/Rollstuhl; kann die meiste Zeit des Tages außerhalb des Bettes sein; viele Funktionen der Selbstpflege erhalten; hat effektive Armfunktion
8,5	Weitgehend bettlägerig für die meiste Zeit des Tages; einige Armfunktionen erhalten; einige Funktionen der Selbstpflege erhalten
9,0	Hilfloser, bettlägeriger Patient; kann kommunizieren und essen
9,5	Vollkommen hilfloser, bettlägeriger Patient; unfähig, effektiv zu kommunizieren oder zu essen/schlucken
10,0	Tod durch MS

**Tabelle 1: EDSS Einteilung**

[Kroner-Milsch, A. et al., 2012]

Neben der klinischen Symptomatik liefert eine MRT Untersuchung wichtige Informationen für die Diagnostik und den Verlauf von MS. Typischerweise ist im MRT Befund eine periventrikuläre Lokalisation der Herde in der weißen Substanz zu erkennen [Reiche, W. et al., 2000]. Oft lassen sich auch vereinzelt Herde in der grauen Substanz (vor allem um kleine Venolen), in der Medulla oblongata oder exzentrisch im Spinalmark nachweisen. Bei 90% der MS-Patienten ist der Balken mit betroffen [Kroner-Milsch, A. et al., 2012]. Mittels MRT kann die typische Streuung der Läsionslokalisationen dargestellt werden [Trabouisee, A.L. et al., 2006]. Zudem können Störungen der Blut-Hirnschranke innerhalb der Läsionen identifiziert und neue von alten Läsionen unterschieden werden [Zivadinov, R. et al., 2006]. Durch ein spezielles MRT Verfahren konnte bei MS-Patienten auch in normal erscheinenden Bezirken der weißen Substanz eine Blut-Hirnschrankenstörung nachgewiesen werden [Cramer, S.P. et al., 2013]. Mit neuen MRT Techniken können des Weiteren der Grad der Demyelinisierung, Axonschäden und Entzündungsareale dargestellt werden. Zudem kann die Läsion, welche am meisten zur Krankheitsprogression beiträgt, identifiziert werden [Rovira, A. et al., 2008].

### **1.2 NMO**

1894 beschrieb Eugène Devic das gleichzeitige Vorliegen einer beidseitigen Neuritis nervi optici mit einer akuten transversen Myelitis als Neuromyelitis Optica [Devic, C., 1894]. Die NMO wird daher auch als „Devic’s disease“ bezeichnet. Lange Zeit wurde sie für eine Unterform der Multiplen Sklerose gehalten, da sich die beiden Krankheitsbilder stark ähneln können. Bei beiden Erkrankungen kann es sowohl zu einer NNO, als auch zu einer Myelitis und entzündlich demyelinisierten Herden im ZNS kommen [Wingerchuk, D.M. et al., 2007]. Durch die Entdeckung spezifischer pathognomonischer Antikörper konnte die NMO jedoch eindeutig von der MS abgegrenzt werden und gilt heute als eigenständige demyelinisierende Autoimmunerkrankung [Lennon, V.A. et al., 2004]. Sie ist neben der MS die wohl häufigste entzündlich demyelinisierende Erkrankung des ZNS [Asgari, N., 2013].

#### **1.2.1 Epidemiologie und Ätiologie**

Die Prävalenz der NMO liegt etwa bei 1 zu 100.000 Einwohnern weltweit [Kim, W. et al., 2011]. NMO ist somit wesentlich seltener als Multiple Sklerose und tritt vorwiegend bei ethnischen Gruppen ohne kaukasischen Ursprung auf. Im Vergleich zur MS lässt sich vor allem in Volksgruppen aus Japan, Ost - Asien und Indien eine erhöhte NMO-Fallzahl erkennen [Wingerchuk, D.M. et al., 2007]. Die in Ost - Asien verbreitete opticospinale Variante der MS wurde aufgrund ihrer übereinstimmenden Klinik schon lange Zeit mit der NMO verglichen [Weinshenker, B.G., 2003]. Durch NMO-AK Marker konnte nachgewiesen werden, dass es sich bei opticospinaler MS und NMO höchstwahrscheinlich um

identische Krankheitsbilder handelt [Lennon, V.A. et al., 2004]. Demyelinisierende Krankheiten treten bei afrikanischen Volksgruppen sehr selten auf. Im Falle einer solchen Diagnose handelt es sich dann jedoch bei fast allen Fällen um NMO [Wingerchuk, D.M. et al., 2007]. In mehreren Studien fiel auf, dass Frauen fünf bis neunmal häufiger von Neuromyelitis Optica betroffen sind als Männer [Lana-Peixoto, M.A., 2008; Weinshenker, B.G., 2003]. Der Erkrankungsmedian liegt im Unterschied zur MS erst bei 39 Jahren [Kantarci, O.H. et al., 2005].

Die Ätiologie der Neuromyelitis Optica ist nicht genau bekannt. Es lässt sich ein gehäuftes Auftreten mit anderen Autoimmunerkrankungen und eine familiäre Häufung von NMO- und MS-Fällen erkennen [Asgari, N. et al., 2012]. Im Gegensatz zur MS, scheint bei NMO jedoch keine Korrelation zwischen dem Vorhandensein des HLA-DRB1 Allels und der Erkrankung gegeben zu sein [Kira, J., 2003]. Das HLA Klasse II Molekül DPB1\*0501 wurde hingegen bei asiatischen Patienten mit NMO signifikant häufiger nachgewiesen [Wang, H. et al., 2011; Yamasaki, K. et al., 1999]. Es wird jedoch kontrovers diskutiert, ob DPB1\*0501 die Suszeptibilität für NMO erhöht, da dieses HLA Allel bei 60 % aller Asiaten nachgewiesen werden konnte, in Europa jedoch nur selten auftritt [Wingerchuk, D.M. et al., 2007]. In einer anderen Studie wiesen NMO-Patienten eine erhöhte HLA-DQB1\*0402 Frequenz auf [Asgari, N. et al., 2012]. Bei einigen NMO-Patienten konnte ein Zusammenhang zwischen Krankheitsausbruch und diversen Infektionen beobachtet werden. Infektionen mit *Helicobacter pylori* und *Chlamydia pneumoniae* stehen in Verdacht eine NMO-AK-Reaktion auslösen zu können [Yoshimura, S. et al., 2013]. Eine Entstehung von NMO-AK durch molekulare Mimikry oder durch eine fehlerhafte Immunantwort gegen zugrunde gehende Zellen, welche Aquaporin 4 (AQP4) in der Membran tragen, wird in Erwägung gezogen [Levy, M. et al., 2014].

### **1.2.2 Pathogenese**

NMO-AK binden spezifisch an das integrale Membranprotein Aquaporin 4 [Lennon, V.A. et al., 2005]. AQP4 wird in geringer Menge in Lunge, Magen, Skelettmuskel und Innenohr gefunden, hauptsächlich aber von Astrozyten im Gehirn exprimiert. Es ist ein Wasserionenkanal, welcher in zwei Isoformen vorhanden sein kann [Amiry-Moghaddam, M. et al., 2003]. NMO-AK können nur sogenannte OAPs erkennen, welche ausschließlich von der M23 Isoform des AQP4-Kanals gebildet werden [Nicchia, G.P. et al., 2009]. Die unterschiedliche Verteilung der Isoformen könnte erklären, warum AK-Reaktionen gegen AQP4-Kanäle bei Neuromyelitis Optica nur innerhalb des ZNS, nicht aber in peripheren Organen nachgewiesen werden können [Asgari, N. et al., 2011].

AQP4 ist zwar im gesamten Gehirn nachzuweisen, kommt jedoch am Nervus opticus und im Rückenmark in sehr hohen Konzentrationen vor. Immunhistochemisch wurde es zudem vermehrt im Hypothalamus und der Membran ependymaler Zellen dargestellt [Pitcock, S.J. et al., 2006]. Auch

endotheliale Zellen der Blut-Hirnschranke können AQP4 in geringem Maße herstellen [Amiry-Moghaddam, M. et al., 2003]. AQP4 findet sich in der Blut-Hirnschranke zudem im Dystroglykan-Proteinkomplex in den Fußfortsätzen von Astrozyten [Lennon, V.A. et al., 2005]. AQP4-Kanäle in subpialen und perivaskulären Fußfortsätzen tragen essentiell zur Wasserhomöostase im Gehirn bei [Amiry-Moghaddam, M. et al., 2003].

Auf welche Art und Weise es durch die NMO spezifischen AQP4 AK zu einer Entzündungsreaktion mit folgender Demyelinisierung kommt, wird in diversen Studien diskutiert:

Die AK-Bindung an den AQP4-Kanal führt bei Anwesenheit von Komplementfaktoren zu einer direkten Zerstörung der Astrozyten [Kinoshita, M. et al., 2009]. Durch die inflammatorische Komplementreaktion kommt es auch zur Zerstörung der umliegenden Oligodentrozyten. Zudem ändert sich durch eine Bindung von NMO-AK an AQP4 dessen Polarisation, was eine Erhöhung der Permeabilität der Astrozyten-Endothelgrenze zur Folge hat [Asgari, N. et al., 2011]. Eine Auswirkung auf die Permeabilität der gesamten Blut-Hirnschranke ist somit denkbar. Proinflammatorische Zellen des Immunsystems könnten so besser ins ZNS emigrieren und die Entzündungsreaktion aufrechterhalten. Der Wasserfluss durch AQP4-Kanäle wird durch die AQP4-AK nicht beeinflusst [Nicchia, G.P. et al., 2009]. Es kommt jedoch zu einer NMO-AK induzierten Verringerung der AQP4-Kanäle, die zudem mit einer niedrigeren Expression des Glutamattransporters EAAT2 in Astrozyten einhergeht [Hinson, S.R. et al., 2008]. Durch AQP4-AK wird somit die Glutathomöostase des Gehirns beeinflusst. Es konnte gezeigt werden, dass sich die Akkumulation von Glutamat toxisch auf Oligodentrozyten auswirkt [Marignier, R. et al., 2010]. NMO-AK führen dementsprechend zu einer Demyelinisierung, die sowohl vom Komplementsystem vermittelt wird, als auch davon unabhängig abläuft.

### **1.2.3 Symptome und Diagnostik**

Die Symptome der Neuromyelitis Optica werden wie bei MS von der Lage der demyelinisierten Herde bestimmt. Diese korreliert bei NMO im MRT Befund mit den Hauptlokalisationen der AQP4-Kanäle [Pittock, S.J. et al., 2006]. Der klinische Verlauf einer Neuromyelitis Optica ist im Schnitt schwerwiegender, als der einer Multiplen Sklerose [Weinshenker, B.G. et al., 2006].

Abhängig von der AQP4-Verteilung ist vor allem der Sehnerv, sowie das Rückenmark betroffen. Läsionen können aber auch im Hirnstamm, Basalganglien und Kleinhirn gefunden werden [Graber, D.J. et al., 2008]. Die Erkrankung tritt daher in den meisten Fällen erstmals durch eine NNO in Erscheinung. Diese ist bei 20 % der NMO-Patienten bilateral ausgeprägt und verläuft im Vergleich zur NNO bei MS schwerwiegender [Levin, M.H. et al., 2013]. Begleitend, oder im Intervall, lässt sich im Spinalmark eine transverse Myelitis nachweisen. Diese äußert sich als beidseitige motorische

Schwäche oder Lähmung, Empfindungsstörung distal der Läsion, Nervenwurzelschmerz oder Sphinkterstörung [Szczepiorkowski, Z.M. et al., 2010]. Wie bei MS können bei spinaler Beteiligung paroxysmale tonische Spasmen auftreten und das Lhermitte-Zeichen ausgelöst werden [Wingerchuk, D.M. et al., 2007].

NMO verläuft entweder monophasisch oder schubförmig remittierend [Weinshenker, B.G. et al., 2006]. Der prognostisch bessere monophasische Verlauf kann nur bei 20 % der NMO-Patienten diagnostiziert werden. Die initiale NMO-Attacke verläuft hierbei zwar heftig, die 5-Jahres Überlebensrate beträgt jedoch 90 %. [Szczepiorkowski, Z.M. et al., 2010]. Bei einem schubförmigen Verlauf kommt es zu Schüben mit Optikusneuritis oder transverser Myelitis oder einer Kombination von beidem. Nach jeder Attacke verbleibt ein Defizit [Weinshenker, B.G. et al., 2006]. Diese Form der NMO hat eine schlechte Prognose und führt bei 50 % der Patienten zu Erblindung oder Rollstuhlpflicht auf Grund einer Tetra- oder Paraparese [Szczepiorkowski, Z.M. et al., 2010]. Ist der Hirnstamm mit betroffen, kann es zu Schluckauf, Schwindel oder Atemlähmung kommen [Wingerchuk, D.M. et al., 2007]. Bei 30 % der Patienten mit schubförmig remittierendem Verlauf kommt es innerhalb von 5 Jahren zum Tod durch Atemlähmung. Zwischen den Schüben erfolgt bei NMO keine Krankheitsprogression, daher prägt die Frequenz und Schwere der Schübe den klinischen Verlauf [Szczepiorkowski, Z.M. et al., 2010]. Ist der NMO-Patient bei Erstdiagnose über 50 Jahre alt, kommt es meist frühzeitig zu einer raschen motorischen Behinderung oder dem Tod [Collongues, N. et al., 2013].

Momentan werden die von Wingerchuk aufgestellten und 2007 überarbeiteten Kriterien zur NMO Diagnose angewandt. Es wird darin das Vorhandensein einer Optikusneuritis und einer Myelitis gefordert. Zusätzlich sollen 2 der folgenden 3 Nebenkriterien erfüllt sein [Wingerchuk, D.M. et al., 2006]:

- Nachweis einer spinalen Läsion im MRT, welche sich mindestens über 3 vertebrale Segmente erstreckt.
- Der MRT Befund bei Erkrankungsbeginn darf im Verteilungsmuster der Herde nicht für eine MS Diagnose sprechen.
- Seropositivität für NMO IgG AK

Mittlerweile wurde mittels MRT nachgewiesen, dass die Herde neben dem Rückenmark und Nervus Optikus im gesamten Gehirn auftreten können [Wingerchuk, D.M., 2007]. „Wolken-ähnliche Läsionen“, sowie Läsionen periventrikulär und im Hypothalamus sind typisch für NMO [Shimizu, Y.,

2010]. Der Nachweis weiterer Läsionslokalisationen neben dem Rückenmark und Nervus Optikus schließt eine NMO also nicht aus [Wingerchuk, D.M. et al., 2006].

AQP4-AK können bei 70-80 % der NMO Patienten nachgewiesen werden [Levy, M. et al., 2014]. Die Schwere der NMO Symptomatik scheint mit der Höhe des Antikörper Spiegels zu korrelieren [Tanaka, K., 2007]. Wie bei MS wird der Grad an Behinderung mittels EDSS angegeben.

### **1.3 Therapie von MS und NMO**

Bei NMO reagiert das Immunsystem auf das AQP4-Antigen auf Astrozyten, wohingegen bei MS eine Immunreaktion gegen Oligodendrozyten vermutet wird [Yoshida, M., 2010]. Bei beiden Erkrankungen kommt es letztlich zu einer inflammatorischen Zerstörung der Myelinscheide [Wegner, C., 2013]. Immunologische Vorgänge innerhalb der B- und T-Zellregulation, welche die autoimmun vermittelte Demyelinisierung ermöglichen, spielen bei NMO und MS eine Rolle. Bei NMO ist ein Behandlungsbeginn so früh wie möglich essentiell, um weitere Schübe hinauszuzögern und die damit assoziierte Behinderung zu vermeiden [Nomura, K., 2013]. Die MS-Therapie hat das gleiche Ziel und soll den Beginn einer Progression hinausschieben. MS- und auch NMO-Patienten profitieren von einem individuellen, umfassenden Behandlungskonzept. Dieses umfasst, neben immunsuppressiven oder -modulatorischen Medikamenten, auch symptomorientierte und psychologische Aspekte und Therapien. In der medikamentösen Therapie gibt es einige Unterschiede zwischen den beiden Krankheiten. Im weiteren Verlauf wird lediglich auf die wichtigsten immunsuppressiven und immunmodulatorischen Therapien bei MS und NMO eingegangen:

#### Behandlung des akuten Schubs

Leichte MS-Verläufe bedürfen oft keiner Therapie. Bei mittleren bis schweren akuten MS-Schüben und bei NMO-Schüben gilt eine intravenöse hochdosierte Corticosteroidgabe (z.B. Methylprednisolon) als das Mittel der Wahl [Berkovich, R., 2013; Nomura, K., 2013]. Der Schub wird abgemildert, da Corticosteroide Entzündungen reduzieren, die Apoptose von Leukozyten initiieren, die kapillare Permeabilität normalisieren sowie die Migration von polymorphkernigen Leukozyten unterdrücken können [Sato, D. et al., 2012]. Bei MS kann dadurch zwar eine schnellere Genesung erreicht werden, Corticosteroide wirken sich jedoch nicht auf das Maß der Rehabilitation aus. ACTH stellt bei MS eine Alternative zu Corticosteroiden dar [Berkovich, R., 2013]. Zeigen Corticosteroide keine ausreichende Wirkung, sollte bei NMO frühzeitig eine Plasmapherese begonnen werden [Morgan, S.M. et al., 2013]. Auch bei einem akuten MS-Schub ohne Corticosteroidansprechen deuten Studienergebnisse auf einen positiven Effekt der Plasmapherese hin [Berkovich, R., 2013]. Durch Plasmapherese können Plasmabestandteile wie Antikörper, Komplementfaktoren, Zytokine und

Chemokine extrakorporal eliminiert werden. Es sind mehrere Sitzungen nötig und die AK-Produktion muss mit zusätzlichen Immunsuppressiva gestoppt werden [Szczepiorkowski, Z.M. et al., 2010].

### Krankheitsmodulierende Therapie

Bei RRMS bilden u.a. Interferon  $\beta$  und Glatirameracetat die Erstlinientherapie [Tullman, M.J., 2013]. IFN  $\beta$  kann neben der Schubprophylaxe bei RRMS auch bei SPMS zur Krankheitskontrolle eingesetzt werden [Tullman, M.J., 2013]. Andere Medikamente, die zur Behandlung von RRMS/SPMS empfohlen werden, sind Fingolimod, Natalizumab, Teriflunomid und Mitoxantron [Minagar, A., 2013]. Für PPMS gibt es bislang keine Therapie, die den Krankheitsverlauf nachweislich bessert [Tullman, M.J., 2013].

Als Schubprophylaxe bei NMO werden Corticosteroide niedrig dosiert weitergegeben [Sato, D. et al., 2012]. INF  $\beta$  führt bei NMO im Gegensatz zu MS zu einer Exazerbation der Symptomatik, weshalb eine frühe diagnostische Unterscheidung der beiden Erkrankungen wichtig ist [Warabi, Y. et al., 2007]. Alternativ können Immunsuppressiva wie Azathioprin, Tacrolimus, Mycophenolatmofetil und Mitoxantron zur NMO Therapie eingesetzt werden [Nomura, K., 2013]. Sowohl eine Behandlung mit Azathioprin und nachfolgend oralem Prednisolon als auch eine Rituximabtherapie konnten die Schubintervalle bei NMO verlängern [Kim, S.M. et al., 2013]. Die Schubanzahl korreliert mit dem Verlust der Nervenfasernfunktion. Durch diese Therapien kann die Funktionalität der Nervenfasern daher länger aufrechterhalten werden [Sato, D. et al., 2012].

Neben den genannten Therapiemöglichkeiten werden für MS und NMO aktuell eine Vielzahl an erfolgsversprechenden immunmodulatorischen Medikamenten evaluiert [Berkovich, R., 2013]. Dazu gehört auch der monoklonale AK Rituximab und seine Nachfolger Ocrelizumab und Ofatumumab.

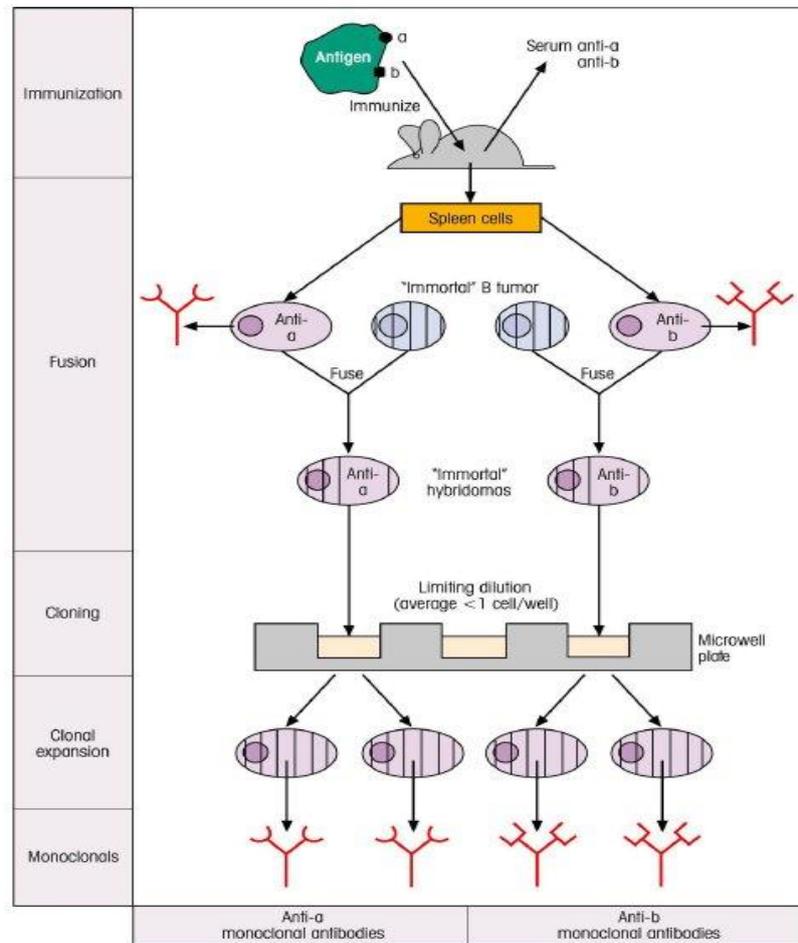
## **1.4 Rituximab – Aufbau und Wirkmechanismus**

Rituximab ist ein chimärer, monoklonaler Antikörper [Minagar, A., 2013]. Monoklonale AK sind identisch, da sie vom selben B-Lymphozyten produziert wurden (Abbildung 3). Bei chimären Antikörpern ist lediglich der konstante Teil humanen Ursprungs. Die variable AK-Region besteht aus Mausproteinen [Delves, P.J., 2011]. Rituximab bindet mit seiner variablen Region an das CD20 Oberflächenantigen. B-Zellen exprimieren CD20 bis zur Differenzierung zu Plasmazellen [Tedder, T.F. et al., 1994]. T-Zellen und andere hämatopoetische Stammzellen exprimieren kein CD20. Die Rituximab-Bindung führt über zytotoxische Effekte des Komplementsystems und Zellinteraktionen zur Apoptose der CD20<sup>+</sup> Zellen [Maloney, D.G., 2012].

Die Pharmakokinetik von Rituximab weist interindividuell eine große Spannweite auf, wobei die Serumkonzentrationen mit dem klinischen Ansprechen korrelieren [Plosker, G.L. et al., 2003].

**Abbildung 3: Schema zur Entstehung monoklonaler Antikörper**

[Delves, P.J., 2011]



## 1.5 Fragestellung

Rituximab wird aktuell als „off-label use“ erfolgreich bei autoimmun vermittelten Erkrankungen wie MS und NMO eingesetzt. Bei einer Therapie mit Rituximab werden alle CD20<sup>+</sup> B-Zellen eliminiert. Dadurch werden B-Zellen mit proinflammatorischen Funktionen, wie Antigenpräsentation, Zytokinproduktion sowie Aktivierung von Makropagen und T-Zellen ausgeschaltet [Duddy, M. et al., 2006]. Auch B-Gedächtniszellen werden depletiert. Dies könnte dazu beitragen, dass auch nach Therapieende keine neuen AK produzierenden Plasmazellen entstehen. Bereits vorhandene langlebige AK produzierende Plasmazellen werden durch Rituximab nicht eliminiert, weshalb sich der Antikörperspiegel in MS oder NMO unter Therapie nicht ändert. Der therapeutische Erfolg einer Rituximabbehandlung scheint daher nicht auf einer Hemmung der AK-Synthese zu beruhen. Er kann bei MS und NMO eher einer direkten Unterdrückung von proinflammatorischen B-Zellinteraktionen zugeschrieben werden [Hauser, S.L. et al., 2008]. Dies stützt die These, dass in der Genese der MS

und NMO neben der humoralen B-Zellantwort vor allem antigenpräsentierende B-Zellfunktionen eine große Rolle spielen.

Die Ergebnisse einer vorangehenden Studie an EAE erkrankten Mäusen unter B-Zelldepletion verdeutlichen diese Annahme [Weber, M.S. et al., 2010]: Bei einer durch das rekombinante Protein MOG bedingten EAE wurde der Krankheitsverlauf durch eine B-Zelldepletion abgemildert. Die Frequenz von TH1 und TH17 Zellen sank durch die B-Zelldepletion. B-Zellen scheinen durch ihre Funktion als proteinpräsentierende Zellen die proinflammatorischen T-Zellen zu stimulieren. Eine durch das MOG (35-55) Peptid ausgelöste EAE wurde hingegen durch B-Zelldepletion verschlechtert. B-Zellen werden durch Peptidantigene nicht aktiviert. Sie scheinen bei diesem Krankheitsverlauf daher eine ausschließlich regulatorische, antiinflammatorische Rolle zu spielen.

Durch eine anti-CD20-Behandlung nahm die Zahl regulatorischer T-Zellen in beiden EAE-Modellen der Mausstudie ab. Die Aktivität von Monozyten stieg hingegen nach B-Zell-Eliminierung unabhängig vom EAE-Modell an [Weber, M.S. et al., 2010]. Regulatorische B- und T-Zellen könnten dementsprechend einen wichtigen regulatorischen Effekt auf Monozyten ausüben. Eine Rituximabtherapie könnte bei MS oder NMO demnach die Unterdrückung proinflammatorischer APC Funktionen von Monozyten einschränken. Dies könnte bei einzelnen MS-Patienten zu einer Exazerbation der inflammatorischen Demyelinisierung führen. Dies impliziert, dass die genaue Kenntnis über Auswirkungen einer Rituximabtherapie auf das zelluläre Immunsystem von Patienten mit neuroinflammatorischen Erkrankungen, essentiell für eine sichere immunmodulatorische Therapie ist. Diese Arbeit soll einen Einblick auf die zelluläre Immunkonstellation nach kompletter B-Zelldepletion mittels Rituximab bei Patienten mit neuroinflammatorischen Erkrankungen (vorrangig MS und NMO) geben. Es werden Fragen zu folgenden Themenkomplexen erörtert:

Regulatorische T-Zellen könnten auch bei MS/NMO wichtige antiinflammatorische Funktionen ausüben. Wird die Frequenz regulatorischer T-Zellen und anderer Leukozytensubpopulationen durch Rituximab beeinflusst?

Rituximab eliminiert sowohl pro- als auch antiinflammatorische CD20<sup>+</sup> B-Zellen. Lassen sich aus den Ergebnissen Rückschlüsse über regulatorische Funktionen der B-Zellen bei MS und NMO ziehen?

B-Zellen und Monozyten scheinen als APCs eine wesentliche Rolle in der Pathogenese von MS und NMO einzunehmen. Ändert eine Rituximabtherapie die Frequenz und proinflammatorische Aktivität von Monozyten?

Welche Rolle spielen APCs bei MS/NMO?

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte

Accujet® pro	Brand GmbH + Co KG, Wertheim, DE
AID EliSpot reader	Autoimmun Diagnostika, Straßberg, DE
Analog Vortex Mixer	VWR, Darmstadt, DE
Centrifuge 5810R	Eppendorf, Hamburg, DE
CyAn ADP9C Durchflusszytometer	Beckman Coulter GmbH, Krefeld, DE
Finnpipette-F2 (8 Kanal, 12 Kanal)	Thermo scientific, Waltham, US
Galaxy mini Fuge	VWR, Darmstadt, DE
Inkubator	Binder, Tuttlingen, DE
Kryokonservierungstank 24 K	tec-lab GmbH, Taunusstein, DE
Lichtmikroskop	VWR, Darmstadt, DE
MACS® Separator	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, DE
Multifuge 3SR Plus	Haraeus, Newport Pagnell, GB
Neubauer Zählkammer	Optik Labor, Friedrichsdorf, DE
Pico Fuge	Stratagene, La Jolla, US
Pipetten Research (20 µl, 200 µl, 1000 µl)	Eppendorf, Hamburg, DE
Sterilbank	Kojair Tec Oy, Vilppula, FI
Tecan Genios plate reader	Tecan Group Ltd., Männedorf, CH
Waage	Sartorius AG, Göttingen, DE
Wasserbad	Memmert, Schwabach, DE
Wasserdeionisierungsanlage Milli-Q	EMD Millipore Corporation, Billerica, US

#### 2.1.2 Software

Microsoft office Word 2007	Microsoft Corporation, Redmond, US
Microsoft office Excel 2007	Microsoft Corporation, Redmond, US
AID EliSpot software	Autoimmun Diagnostika, Straßberg, DE
FlowJo 7.6.1	Tree Star Inc., Ashland, US
Summit V4.3.01	Beckman Coulter GmbH, Krefeld, DE

### 2.1.3 Verbrauchsmaterialien

Alliquot Gefäße Cryo.S™ 1,5 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, DE
Cellstar® 15 ml tubes	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, DE
Cellstar® 50 ml tubes	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, DE
Cellstar® 96 flat-well Zellkulturplatten	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, DE
Cellstar® 96 U-well Zellkulturplatten	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, DE
Cellstar® Glaspipetten (2,0 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, DE
Cellstar® Zellkulturflaschen 550ml (175 cm <sup>2</sup> )	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, DE
EDTA Blutentnahmeröhrchen S-monovette 9 ml	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, DE
Eppendorf Gefäße (1,5 ml, 2,0 ml)	Eppendorf, Hamburg, DE
Spritzenvorsatzfilter	Sartorius AG, Göttingen, DE
Falcon® FACS Röhrchen 5 ml	BD Biosciences, Heidelberg, DE
MACS® Pre-Separation Filters 30 µm	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, DE
MACS® Separation Columns LS	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, DE
Microtubes 1,2 ml Bulk PP	Starlab GmbH, Hamburg, DE
MultiScreen® HTS IP 0.45 µm, sterile Filterplatten	Millipore Ireland B.V., Tullagreen, IE
Pipettenspitzen ≤ 10 µl, ≤ 200 µl, ≤ 1000 µl	Eppendorf, Hamburg, DE
Plastipak Luer™ Lok™ 50 ml	BD Biosciences, Heidelberg, DE
PS Abdeckplatte steril	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, DE
Zellkulturtestplatten 24 well	TPP®, Trasadingen, CH

### 2.1.4 Chemikalien und Reagenzien

0,5 M EDTA pH 8.0	Calbiochem, Bad-Soden, DE
Biocoll Separation Solution 1,077 g/ml	Biochrom AG, Berlin, DE
Bovines Serumalbumin (BSA) Pulver	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, DE
DMEM mit 4,5 g/l D-Glucose	PAA Laboratories GmbH, Pasching, AT
DMSO	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, DE
Dulbecco's PBS 1x ohne Ca & Mg	PAA Laboratories GmbH, Pasching, AT
Ethanol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, DE
Fötiales Kälberserum (FCS)	GIBCO, Paisley, UK
L-Glutamin	GIBCO, Paisley, UK
LPS (Lipopolysaccharid)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, DE
Penicillin/Streptomycin	GIBCO, Paisley, UK
Peroxidase Solution B	KPL, Gaithersburg, US
RPMI 1640 Kulturmedium	PAA Laboratories GmbH, Pasching, AT

Sigmafast BCIP®/NBT Tabletten	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, DE
Streptavidin alkaline phosphatase	EMD Millipore Corporation, Billerica, US
Trypanblau	GIBCO, Paisley, UK
Tween 20	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, DE

### 2.1.5 Antikörper

Anti- CD4-APC	BD Biosciences, Heidelberg, DE
Anti- CD8a-PE	eBioscience Inc., San Diego, US
Anti- CD14-FITC	BD Biosciences, Heidelberg, DE
Anti- CD14 MicroBeads	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, DE
Anti- CD19-APC	BD Biosciences, Heidelberg, DE
Anti- CD20 MicroBeads	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, DE
Anti- CD25-FITC	BD Biosciences, Heidelberg, DE
Anti- CD127-PE	BD Biosciences, Heidelberg, DE
Anti- CD150-PE (SLAMF)	BD Biosciences, Heidelberg, DE
FcR Blocking Reagent, human	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, DE
TNF $\alpha$ -Capture Antibody	EMD Millipore Corporation, Billerica, US
TNF $\alpha$ -Detection Antibody	EMD Millipore Corporation, Billerica, US

### 2.1.6 Medien und Pufferlösungen

#### B-Zellmedium (BCM)

500 ml RPMI • 5 ml Penicillin/Streptomycin • 5 ml L-Glutamin • 50 ml FCS

FCS wurde im Vorfeld aliquotiert und zur Aufbewahrung eingefroren, um die Inhaltsstoffe stabil zu erhalten. Vor Verwendung wurde es bei Raumtemperatur auf Eis aufgetaut. Durch diese schonende Erwärmung konnte die Präzipitation gering gehalten werden.

Um das BCM herzustellen, wurden Penicillin/Streptomycin, L-Glutamin und FCS in den oben angegebenen Mengen steril in das RPMI Kulturmedium filtriert. Das BCM wurde danach auf 50 ml Gefäße aufgeteilt, um die Gefahr einer Verunreinigung und dadurch bedingten Ergebnisverfälschung möglichst gering zu halten.

#### Einfriermedium

30 ml BCM • 10 ml FCS • 10 ml DMSO

BCM und FCS wurden vermischt. Um die Wärmeentfaltung gering zu halten, wurde DMSO erst danach langsam hinzugegeben. Das Medium wurde unter sterilen Bedingungen filtriert.

### FACS-Puffer

2 % FCS in PBS

Die Mischung des Puffers erfolgte unter sterilen Bedingungen.

### MACS-Puffer

500 ml PBS • 2,5 g FCS • 2 ml EDTA 0,5M

Das FCS wurde zusammen mit EDTA 0,5M in 10 ml PBS gegeben und mittels Vortex vermischt. Diese Lösung wurde danach steril in 490 ml PBS filtriert.

In Vorversuchen zu dieser Studie stellte sich heraus, dass MACS-Puffer mit BSA zu einer unspezifischen Aktivierung der Leukozyten führte. In der Studie wurde daher MACS-Puffer mit FCS, statt dem üblicheren BSA verwendet. Im Elispot wurde weiterhin PBS mit 0,5 % BSA als Lösungsflüssigkeit verwendet, da in diesem Versuchsschritt kein Einfluss von BSA auf die Zellaktivität beobachtet werden konnte.

### BCIP/NBT Substrat

Zur Herstellung des Substrats wurde eine „Sigmafast BCIP®/NBT Brausetablette“ mit 0,15 mg/ml BCIP® und 0,30 mg/ml NBT in 10ml deionisiertem Wasser aufgelöst.

## **2.2 Methoden**

### **2.2.1 Studiendesign und Probandenkriterien**

Bei der Studie handelte es sich um eine parallelisierte, offene, randomisierte Studie, welche von der Ethikkommission der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München genehmigt wurde. Durchgeführt wurde sie im Zeitraum 2010-2011 von der Neurologischen Klinik und Poliklinik des Klinikums rechts der Isar, in Zusammenarbeit mit der III. Medizinischen Klinik und Poliklinik.

Ziel der Studie war es, den Effekt einer B-Zelldepletion mittels CD20 AK Rituximab auf die Frequenzen von Monozyten, B- und T-Lymphozyten darzustellen. Besonderes Augenmerk lag dabei auf der relativen Häufigkeit regulatorischer T-Zellen. Zudem sollte die Aktivität der Monozyten unter Rituximabtherapie anhand des SLAM (CD150) Oberflächenmoleküls und der TNF  $\alpha$ -Produktion gemessen werden. Auch die immunologische Grundkonstellation bei Patienten mit neuroinflammatorischen Erkrankungen, wie MS und NMO, könnte einen Einfluss auf die Ergebnisse haben. Um diesen erkennen zu können, wurden zudem Patienten mit anderen Grunderkrankungen mit und ohne Rituximabtherapie untersucht.

Die für die Studie geeigneten Patienten wurden umfassend über das Ziel der Studie informiert. Nach Einwilligung wurden meist einmalig 18 ml Blut abgenommen, welches zu PBMCs verarbeitet wurde. Es wurden PBMCs von 91 Patienten aus den folgenden 4 Gruppen analysiert:

1. Hämatonkologische Patienten mit B-Zell-Lymphom/-Leukämie unter Rituximab Therapie
2. Patienten ohne neuroimmunologische Grunderkrankung, gegebenenfalls mit B-Zell-Lymphom/-Leukämie ohne medikamentöse Therapie
3. Patienten mit neuroinflammatorischer Grunderkrankung unter Rituximab Therapie, vorrangig mit Multipler Sklerose oder Neuromyelitis Optica
4. Patienten mit neuroinflammatorischer Grunderkrankung ohne medikamentöse Therapie, vorrangig mit Multipler Sklerose oder Neuromyelitis Optica

Eine detaillierte Auflistung der Zusammensetzung aller 4 Gruppen ist in Tabelle 2 dargestellt. Die Patientenproben der Gruppen 1+2 und 3+4 wurden hinsichtlich Alter und Geschlecht parallelisiert und im direkten Vergleich ausgewertet. Durch paarweises Matching entstehen strukturgleiche Gruppen, deren Ergebnisse sich besser vergleichen lassen [Weiß, D.C., 2010].

Die Patientenkriterien wurden im Vorfeld der Studie wie folgt festgelegt:

Für die Studie wurden in Gruppe 1 und 3 nur Patienten unter Rituximab-Monotherapie aufgenommen. In der Studie sollte nicht die akute Wirkungsphase einer Rituximabdosierung, sondern die langfristigen Auswirkungen der B-Zelldepletion auf das Immunsystem dargestellt werden. Daher wurden ausschließlich Patienten ausgewählt, deren gesamte Therapiedauer bereits mindestens 1 Monat betrug. Die letzte Rituximabgabe musste dabei mindestens 1 Woche vor der Blutentnahme erfolgt sein. Als Kontrollprobanden in den Gruppen 2 und 4 wurden nur Personen zugelassen, welche in der Vorgeschichte noch nie mit Rituximab behandelt worden waren. Bei den Kontrollgruppen ließ sich so eine Beeinflussung der Leukozytensubpopulationen durch einen länger zurückliegenden Therapieeffekt von  $\alpha$  CD20 ausschließen. Bei allen Probanden sollte des Weiteren der Einfluss einer anderweitigen immunmodulatorischen, oder -suppressiven Therapie weitgehend ausgeschlossen sein, um eine Verfälschung der Ergebnisse zu vermeiden. Es wurden daher nur Probanden in die Studie eingeschlossen, die mindestens 3 Monate vor Studienbeginn keine Steroidtherapien erhalten hatten.

Bei Chemotherapiezyklen, oder anderen immunmodulatorischen/ -suppressiven Therapien, wurde der Mindestabstand zur Blutentnahme auf 6 Monate festgelegt.

Gruppennummer		1	2	3	4	
Gruppenbezeichnung		B-Zell-Lymphom α CD20	„gesunde“ Kontrolle	MS/NMO α CD20	MS/NMO Kontrolle	Gesamtanzahl
<b>Probandenanzahl</b>		<b>23</b>	<b>23</b>	<b>22</b>	<b>23</b>	<b>91</b>
<b>Geschlecht</b>	männlich	13	13	4	5	35
	weiblich	10	10	18	18	56
<b>Alter (Jahre)</b>	Mittelwert (min-max)	63 (28-87)	61 (27-86)	45 (18-69)	42 (17-69)	52 (17-87)
<b>αCD20 Therapie-dauer (Monate)</b>	Mittelwert (min-max)	15 (1-66)	0	15 (2-47)	0	15 (1-66)
<b>Erkrankung</b>	NMO	0	0	11	1	12
	MS nicht näher bezeichnet	0	0	3	6	9
	RRMS	0	0	3	4	7
	SPMS	0	0	1	3	4
	PPMS	0	0	1	1	2
	sonstige neuroimmunologische Erkrankung	0	0	3	1	4
	CIS	0	0	0	7	7
	folikuläres BCL	9	0	0	0	9
	Mantelzelllymphom	6	0	0	0	6
	MALT	3	0	0	0	3
	DLCBCL	2	0	0	0	2
	lymphoblastisches BCL	1	0	0	0	1
	nicht weiter spezifiziertes B-NHL	2	1	0	0	3
	BCLL	0	1	0	0	1
	Infarkt/ischämisches Ereigniss	0	7	0	0	7
	Epilepsie	0	3	0	0	3
	Schwindel	0	3	0	0	3
sonstige Erkrankungen (weder immunologisch noch Lymphom)	0	8	0	0	8	

Tabelle 2: Gruppeneinteilung

### 2.2.2 PBMC-Herstellung zur Kryokonservierung

PBMCs werden in der Regel aus Vollblut gewonnen und bestehen aus peripheren mononukleären Blutzellen, welche einen runden Zellkern besitzen [Fuss, I.J. et al., 2009]. Dies beinhaltet Leukozytensubpopulationen, wie Lymphozyten und Monozyten.

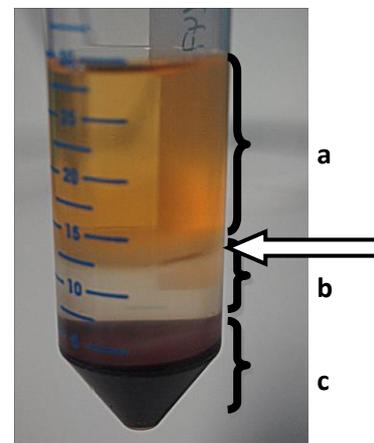
Die abgenommenen Blutproben wurden bis zur PBMC-Herstellung stets gekühlt gelagert. Letztere erfolgte maximal 12 Stunden nach Blutentnahme. Pro Proband wurden 2 x 9 ml EDTA-Blut mit der gleichen Menge an PBS verdünnt. In zwei konisch zulaufenden Mischgefäßen („tubes“) wurden 9 ml Biocoll vorgelegt. Die verdünnten Blutproben wurden je mit einer Glaspipette vorsichtig auf die Biocollphase gefüllt, sodass zwei getrennte Phasen erhalten blieben. Die Röhrchen wurden 20 Minuten bei 1250 rpm in 4 °C zentrifugiert.

Durch die Zentrifugalkraft und die Dichteigenschaften von Biocoll entstehen dabei mehrere Schichten: Biocoll enthält laut Herstellerangabe Polysucrose, ein hydrophiles Polymer. Es hat, wie Ficoll, eine spezifische Dichte von 1,077 g/ml [Heine, H. et al., 2003]. Da Erythrozyten eine höhere Dichte als die Biocoll-Lösung haben, sedimentieren sie beim Zentrifugieren auf dem Gefäßgrund [Fuss, I.J. et al., 2009]. Biocoll fördert als hochpolymerer Zucker die Erythrozytenagglutination, was zusätzlich zu einer Sedimentationsbeschleunigung führt [Heine, H. et al., 2003]. Plasma, inklusive kleinerer Plasmabestandteile, hat ein geringeres spezifisches Gewicht als die Biocoll-Lösung und lagert sich daher als Phase über dieser ab. Periphere mononukleäre Zellen bilden hingegen auf Grund ihrer Dichteigenschaften einen sichtbaren Saum auf der Biocollphase, den so genannten „Buffy coat“ (Abbildung 4). Die PBMCs können so gezielt abpipettiert werden.

#### Abbildung 4: „Buffy coat“ aus PBMCs über Biocollphase

Die PBMCs sind nach dem Zentrifugieren als grauer Saum (Buffy coat) über der durchsichtigen Biocollphase sichtbar (siehe Pfeil).

- a) Plasmaüberstand
- b) Ficollphase
- c) Erythrozyten



Die so entstandenen PBMCs wurden in ausreichend PBS (mindestens 40ml) gelöst und für 10 Minuten bei 1250 rpm in 4 °C zentrifugiert. Sofern nicht anders angegeben, wurden die Proben stets auf diese Weise zentrifugiert. Nach dem Zentrifugieren entsteht ein Zellpellet am Gefäßgrund und ein flüssiger Überstand, welcher verworfen wird. Das Zellpellet wurde erneut in ausreichend PBS resuspendiert. Der Waschvorgang wurde insgesamt dreimal durchgeführt, um noch enthaltene

anderweitige Plasmabestandteile zu entfernen und so eine möglichst hohe Reinheit der mononukleären Zellen zu erhalten. Nach dem letzten Waschschrift wurden die aufgereinigten PBMCs in 1,5 ml BCM resuspendiert und gleichmäßig auf je 2 Aliquotgefäße aufgeteilt. In jedes Aliquotgefäß wurden 750 µl Einfriermedium zugegeben. Das darin enthaltene DMSO lagert sich in den Zellen ein und stabilisiert die Zellwand, indem es während des Einfrierprozesses eine zellschädigende intrazelluläre Eiskristallbildung und Dehydratation verhindert [Bakken, A.M., 2006]. Die aliquotierten PBMCs konnten daher nach schonendem Einfrieren (-80°C) bis zur Versuchsdurchführung in einem Stickstofftank bei mindestens -196°C kryokonserviert werden. Das in den Aliquotgefäßen vorhandene BCM und FCS ergab für die Zeit nach dem Auftauen ein gutes Nährmedium, sodass die Zahl der vitalen mononukleären Zellen nach der Kryokonservierung sehr hoch blieb.

Negative Auswirkungen der Kryokonservierung auf die Vitalität der PBMCs sollten dennoch ausgeschlossen werden. In einem Vorversuch wurden daher sofort nach Blutentnahme hergestellte PBMC-Proben mit nach Kryokonservierung aufgetauten PBMCs verglichen. Der Anteil an vitalen Zellen war vergleichbar und es ergaben sich keine relevanten Unterschiede im Ansprechen auf eine LPS-Stimulation.

### **2.2.3 Versuchsaufbau**

Von jedem Patienten waren 4 kryokonservierte PBMC-Aliquots vorhanden, wovon meist 2 für die Studie verwendet wurden. Die restlichen aliquotierten PBMCs dienten Vorversuchen oder wurden als Probenarchiv weiterhin kryokonserviert. Vor Studienbeginn wurde, auf Grund von Inkubationszeiten, Materialgegebenheiten und einer einzuhaltenden Kühlkette, die gleichzeitige PBMC-Bearbeitung von 8 Probanden als ideal ermittelt. Die einzelnen Versuche liefen auf Basis eines identischen, vorher erarbeiteten Schemas ab und erstreckten sich über 3 Tage. Begonnen wurde mit der PBMC-Aufbereitung und Zellzählung (2.2.4). Daraufhin wurden  $1 \times 10^6$  Zellen für die FACS-Analyse der Leukozytensubpopulationen (2.2.5.1) und  $1,75 \times 10^6$  Zellen für die FACS-Analyse der SLAM-Exprimierung von Monozyten unter LPS-Stimulation (2.2.5.2) verwendet. Aus der restlichen PBMC-Suspension wurde mittels MACS-Separation eine hochreine Monozytensuspension hergestellt (2.2.6). Im Elispot wurde die TNF  $\alpha$ -Produktion dieser Monozyten unter Stimulation mit steigenden LPS-Konzentrationen analysiert (2.2.7). Die Zellsuspensionen wurden zwischen den einzelnen Arbeitsschritten stets auf Eis gelagert. Der detaillierte Versuchsablauf und die angewandten Analysemethoden sind im Folgenden beschrieben. Pro Versuch wurden parallel Proben aller 4 Gruppen analysiert, um versuchsbedingte Unterschiede in den Gruppen zu minimieren.

### 2.2.4 PBMC-Aufbereitung und Zellzählung

Die aliquotierten PBMCs wurden aus der Kryokonservierung genommen. Sobald sie aufgetaut waren, wurden die PBMCs eines Probanden in 10 ml DMEM gelöst. DMEM ist ein standardisiertes Nährmedium für Zellkulturen mit einem hohen Nährstoffanteil. Die PBMC-Lösungen wurden zentrifugiert und das resultierende Zellpellet wurde erneut in 10 ml DMEM resuspendiert. Um die jeweils individuelle Zellkonzentration in der Zellsuspension zu bestimmen, wurden jeder Probe 50 µl entnommen. Nach Mischung mit 50 µl Trypanblau wurde die so verdünnte Zellsuspension in die Vertiefung einer Neubauer Zählkammer pipettiert. Trypanblau kann sich nur in Zellen mit defekter Zellmembran einlagern. Es werden daher nur abgestorbene oder apoptotische Zellen blau angefärbt [Strober, W., 2001]. Bei der Ansicht unter dem Lichtmikroskop konnten so die vitalen Zellen innerhalb einer Zählkammereinheit identifiziert und ausgezählt werden. Es wurde stets der Mittelwert aus mehreren ausgezählten Großquadraten gebildet. Um die Zellkonzentration der 10 ml DMEM-Zellsuspension zu erhalten, wurde folgende Formel angewendet:

$$\text{Zellzahl/10 ml} \triangleq N \times F \times 10 \times 10.000$$

N = Mittelwert der Zellauszählung pro Großquadrat

F = Verdünnungsfaktor. Bei Mischung von 50 µl Trypanblau und 50 µl Zellsuspension ergibt sich eine Halbierung der Zellkonzentration. Der entsprechende Verdünnungsfaktor ist 2.

10 = Durch Multiplikation mit dem Faktor 10 ergibt sich die Anzahl der Zellen pro µl.

10.000 = Durch den Faktor 10.000 kann die Zellzahl/10 ml angegeben werden.

### 2.2.5 FACS-Analyse

Bei der FACS-Analyse handelt es sich um eine fluoreszenzbasierte Durchflusszytometrie. Mit dieser Methode können biochemische Bestandteile und die Zusammensetzung von Zellpopulationen anhand ihrer Lichtstreuung oder einem Fluoreszenzsignal quantitativ erfasst werden. Die optischen Signale einer Zelle hängen von ihrer Größe und ihrem strukturellen Aufbau ab. Zusätzlich können unterschiedliche physiologische und biochemische Zellbestandteile mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert werden [Gross, A. et al., 2015]. Es werden beispielsweise mit fluoreszierenden Farbstoffen gekoppelte AK gegen CD-Proteine verwendet. Durch die spezifische Oberflächenmolekülbindung können so verschiedene Zellsubpopulationen differenziert werden.

Die Zellen einer Suspension werden zur Analyse durch eine hochpräzise Küvette geleitet. In dieser werden sie in einer schnell fließenden, partikelfreien Trägerflüssigkeit in einem hydrodynamischen

Strom gebündelt und durchqueren einzeln einen Laserstrahl [Gross, A. et al., 2015]. Die dabei für jede Zelle individuell entstehende Emission von Streulicht oder Fluoreszenz wird im FACS-Gerät über Linsen, teildurchlässige Spiegel und Filter auf Photomultiplier geleitet und verstärkt. Das Vorwärtstreulicht (engl.: „forward scatter“, FSC), die gerade Weiterleitung des Lichts im Bereich des 180° Winkels, ist ein Maß für das Volumen einer Zelle. Die Granularität einer Zelle und die Beschaffenheit ihres Zellkerns werden durch das Spektrum des Seitwärtstreulichts (engl.: „side scatter“, SSC), d.h. des Lichtstreuungsbereich um den 90° Winkel, definiert [Shapiro, v.H.M., 2003].

Mit fluoreszierenden AK markierte Oberflächenmoleküle können durch die vom AK ausgestrahlte Wellenlänge und deren Signalintensität quantifiziert werden. Diese Messung erfolgt, indem Elektronen der Fluoreszenzfarbstoffe mittels monochromatischem Laserstrahl angeregt werden. Nach Passage des Lasers fallen die Elektronen wieder auf ihr energetisch niedrigeres Ausgangsniveau zurück. Dabei wird Energie in Form von Photonen mit höherer Wellenlänge frei. Jeder Fluoreszenzfarbstoff besitzt ein spezifisches Emissionsspektrum. Die Fluoreszenzintensität ist proportional zu der Menge an Oberflächenmolekülen pro Zelle, welche AK mit Fluoreszenzmolekülen gebunden haben. Um unterschiedliche Oberflächenmoleküle zu markieren, können mehrere Fluoreszenzfarbstoffe gleichzeitig verwendet werden, falls die Farbstoffe durch dieselbe Wellenlänge angeregt werden. Damit eine eindeutige Zuordnung der Farbsignale zu den markierten Oberflächenmolekülen möglich ist, müssen die Farbstoffe verschiedene Emissionsspektren besitzen. Je weiter diese Wellenlängenspektren auseinanderliegen, desto weniger überlagern sich die Farbsignale. Abbildung 5 stellt die Eigenschaften der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe dar.

Licht- und Farbdetektoren wandeln die eintreffenden Lichtsignale in elektronische Daten um. Die erhaltenen Informationen wurden berechnet und in Form von Graphen dargestellt.

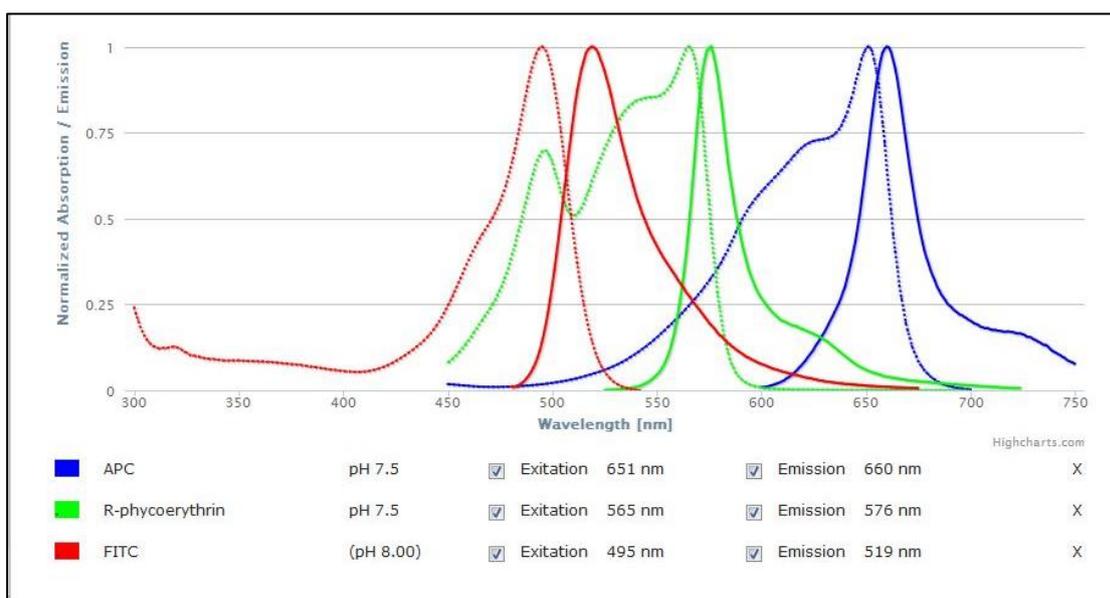


Abbildung 5: Emissions- und Exitationsspektren der Fluoreszenzfarbstoffe APC, PE und FITC

(<http://www.fluorophores.tugraz.at>, 20.09.12, 14:25 Uhr)

### 2.2.5.1 Quantitative Bestimmung der Leukozytensubpopulationen

Für die quantitative Analyse der Lymphozytensubpopulationen mittels FACS wurden  $1 \times 10^6$  PBMC Zellen verwendet. Die dementsprechende Menge in ml wurde aus den PBMCs in 15 ml ‚falcon tubes‘ pipettiert und anschließend zentrifugiert. Nach Resuspension in 400  $\mu$ l FACS-Puffer folgten zwei weitere Waschschr itte in ‚96-U-well-Platten‘ nach je vier Minuten Zentrifugieren. Nach dem letzten Schritt wurden die Zellpellets in 50  $\mu$ l AK-Lösung aufgemischt. Für je die Hälfte der Zellsuspension wurden folgende AK-Lösungen verwendet:

CD19-APC, CD14-FITC, CD8-PE je im Mischverhältnis 1:10 in FACS-Puffer gelöst.

Diese Lösung wurde verwendet, um in der FACS-Analyse die quantitative Verteilung von CD19<sup>+</sup> B-Zellen, CD14<sup>+</sup> Monozyten, sowie CD8<sup>+</sup> T-Zellen in den analysierten PBMCs darstellen zu können.

CD 4-APC, CD25-FITC je im Mischverhältnis 1:10 zusammen mit CD127-PE im Mischverhältnis 1:100 in FACS-Puffer gelöst.

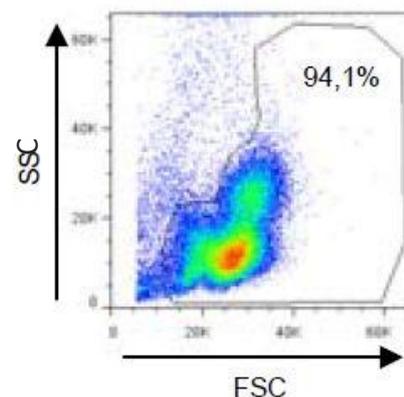
Diese AK-Lösung diente der Markierung von regulatorischen CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten für die FACS-Analyse. Sie exprimieren das Oberflächenmolekül CD25 in hoher Quantität. Für eine sichere Identifikation wird zudem das Fehlen von CD127 nachgewiesen [Su, H. et al., 2012].

Um eine Lichteinwirkung auf die Fluoreszenzfarbstoffe auszuschließen, wurde die AK-Zellsuspension in Dunkelheit 30 Minuten lang bei Raumtemperatur inkubiert. Danach erfolgten drei Waschschr itte (je 4 Minuten zentrifugieren) mit Resuspension in 200  $\mu$ l FACS-Puffer nach den ersten beiden Schritten. Zuletzt wurden die Proben in 400  $\mu$ l FACS-Puffer resuspensiert, in FACS-Röhrchen übertragen und im FACS analysiert.

Dazu wurden die AK markierten PBMCs in einem FSC/SSC Diagramm dargestellt. Aufgrund ihrer zellulären Beschaffenheit können sie von anderen Zellpopulationen und Zellfragmenten abgegrenzt werden (Abbildung 6).

**Abbildung 6: FACS SSC/FSC Diagramm mit ‚Leukozyten-gate‘**

Das ‚Leukozyten-gate‘ wurde an der typischen Anordnung vitaler Zellpopulationen ausgerichtet. Im Beispieldiagramm liegen 94,1% der Fluoreszenzsignale der PBMCs in dem Gate. Bei den Punkten außerhalb des Gates handelt es sich auf Grund der Lage im Diagramm um abgestorbene Zellen und Zellteile.



Alle mittels „Leukozyten-gate“ ausgewählten PBMCs konnten anhand ihrer AK-markierten Oberflächenmoleküle den einzelnen Leukozytensubpopulationen zugeordnet und in weiteren Graphen quantifiziert werden.

### **2.2.5.2 Darstellung der SLAM-Exprimierung von Monozyten nach LPS-Stimulation**

Die CD15 (SLAM) Exprimierung von Monozyten nach LPS-Stimulation sollte mittels FACS bestimmt werden. Aus einem PBMC wurde dazu die entsprechende Flüssigkeitsmenge für  $1,75 \times 10^6$  Zellen in ein 15 ml Falcon-Gefäß übertragen und zentrifugiert. Das PBMC-Pellet wurde in 1 ml BCM wieder aufgelöst. In einer ,96-well'-Platte wurden je 25 µl LPS-Lösung in aufsteigender Konzentration von 0 über 31, 62, 125, 250 auf 500 pg/ml in sechs wells vorgelegt. Um eine Zellkonzentration von 25000 Zellen/well zu erreichen, wurden diese wells mit je 250 µl der Zellsuspension aufgefüllt. Dadurch wurde in jedem well ein LPS-Mischverhältnis von 1:11 erreicht.

Die ,96-well'-Platten wurden stets für 24 Stunden bei 37 °C im Brutschrank inkubiert, um die volle Ausprägung des LPS-Stimulationseffektes zu ermöglichen. Die Zellen lagerten sich während der Inkubationszeit in den flachen wells am Boden ab und bildeten unter LPS-Stimulation Zellcluster. Die am Grund anhaftenden Zellen mussten danach wieder in die Lösung mobilisiert werden. Es zeigte sich in Vorversuchen, dass sich die Zellen durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren besser vom Grund lösten, als bei Benutzung eines Zellschabers. Nach Anwendung ersterer Methode, wurde die Zellsuspension auf eine neue ,U-96 well'-Platte übertragen. Es folgten zwei vier-minütige Zentrifugationsschritte. Nach dem zweiten Zentrifugieren erfolgte ein Aufmischen in 50 µl AK-Lösung/well. Diese setzte sich folgendermaßen zusammen:

CD 14-FITC und CD 150-PE je im Mischverhältnis 1:10 in FACS-Puffer gelöst.

Mit dieser Lösung wurden CD14<sup>+</sup>/CD150<sup>+</sup> Monozyten für die FACS-Analyse markiert.

Nach einer lichtgeschützten Inkubationszeit von 30 Minuten bei 4°C folgten 3 Waschschrte mit Zentrifugieren (4 min) und Resuspension in 200 µl FACS-Puffer. Die so vorbereiteten Proben wurden mit 200 µl FACS-Puffer verdünnt und in FACS-Röhrchen für die FACS-Analyse übertragen.

### **2.2.6 MACS-Separation zur Monozytenaufreinigung**

Mittels der MACS Separation ist es möglich hochreine Zellpopulationen aus gemischten Suspensionen jeglicher Gewebearten zu erhalten. Die Zellsortierung funktioniert nach dem Prinzip der magnetischen Markierung spezifischer Zellpopulationen. Dazu werden AK gegen Oberflächenmarker verwendet, deren Expression für die zu isolierende Zellpopulation spezifisch ist. Die magnetische Kennzeichnung kommt durch die Verwendung monoklonaler AK zustande. Diese

sind mit superparamagnetischen Partikeln (Durchmesser 50 nm), sogenannten ‚MicroBeads‘ versehen [Miltenyi, 2012].

Zur MACS-Separation werden Plastiksäulen mit einer ferromagnetischen Matrix im Lumen in eine magnetische Halterung geklemmt. Dadurch entsteht im Lumen der Säule ein Magnetfeld mit einer erhöhten magnetischen Flussdichte. Wird nun eine Zellsuspension durch diese Säulen gefiltert, verbleiben alle mittels MicroBeads magnetisch markierten Zellen in der Säule. Die unmarkierten Lösungsbestandteile und Zellen hingegen verlassen mit der Spülflüssigkeit die Säule [Miltenyi, S. et al., 1990].

Bei der so genannten „Negativ-Selektion“, werden unerwünschte Zellen markiert und so aus dem Zellgemisch entfernt. Wenn die gewünschte Zellpopulation markiert wird und dadurch magnetisch in der Säule zurück gehalten wird, spricht man von „Positiv-Selektion“. Die hochreine Zellpopulation kann aus der Säule isoliert und weiterverwendet werden.

### Positiv-Selektion von Monozyten

Da im Elispot ausschließlich das Aktivierungspotential der Monozyten nachgewiesen werden sollte, war es nötig die Monozytenpopulation aus den PBMCs zu isolieren. Dies gelang unter Verwendung der „Positiv-Selektion“ des Oberflächenmarkers CD14. Die PBMCs wurden dazu nach Zentrifugation in 10 ml MACS-Puffer resuspendiert. Diese Lösung wurde erneut zentrifugiert und erneut in 80 µl MACS Puffer aufgelöst. Nun wurden 20 µl CD14-MicroBeads zugegeben. Die CD14-MicroBeads lösen laut Hersteller Miltenyi Biotec keine Zellaktivierung aus, da sie keine zytoplasmatische Domäne besitzen. Nach einer Inkubationsphase von 15 Minuten bei 4 °C, folgten zwei erneute Waschschrte mit anschließender Resuspension in 500 ml MACS-Puffer. Die PBMC-Lösung wurde so von ungebundenen CD14-MicroBeads bereinigt.

Zur Selektion der markierten Monozyten wurden LS-Säulen in der magnetischen MACS-Halterung befestigt und mit aufgesteckten MACS-PreSeparation-filters verwendet (Abbildung 8). Diese Säulen wurden mit 3 ml MACS-Puffer gespült, bevor die Zellsuspension eingefüllt wurde. Durch Nachspülen mit 3 x 3ml MACS Puffer wurden nicht markierte Zellen und Zellbestandteile aus der LS-Säule entfernt. Danach konnten die CD14<sup>+</sup> Zellen durch Verwendung des zugehörigen Stempels mit 5 ml MACS Puffer aus der LS-Säule gespült werden (Abbildung 7). Um den so aufgereinigten Monozyten ein gutes Nährmedium zur Verfügung zu stellen, wurden sie zentrifugiert und in 1 ml BCM resuspendiert.

### Abbildung 8: MACS-Separation - Versuchsaufbau

Nicht ferromagnetisch markierte Zellen und Lösungsbestandteile werden mittels MACS-Puffer in das mit 1 beschriftete Röhrchen gespült. Die CD14<sup>+</sup> Zellen verbleiben in der LS-Säule auf Höhe des orangenen Magneten.



### Abbildung 7: MACS-Separation - Isolation der Monozyten aus der LS Säule

CD14<sup>+</sup> Zellen werden in MACS-Puffer mittels zugehörigem Stempel aus der LS-Säule in ein neues Röhrchen (mit 2 beschriftet) gespült.



## 2.2.7 Quantitative TNF $\alpha$ -Messung mittels Elispot

Mit Hilfe der Elispot-Technik, können von Zellen produzierte Immunmodulatoren, wie AK und Zytokine, mittels Enzymkoppelung nachgewiesen werden. Dies ist möglich, indem ein spezifischer Erstantikörper („capture AK“) auf der Membran am Grund der Elispot-Mikrotiterplatte bindet und so immobilisiert wird. Noch freie unspezifische Proteinbindungsstellen müssen mit einer FCS- oder BSA-Lösung blockiert werden. Die zugegebene spezifische Zellpopulation wird mit einem Stimulus versehen, welcher die gewünschte zu analysierende Sekretion triggert. Während einer erschütterungsfreien Inkubationszeit werden die von der Zelle produzierten Immunmodulatoren an umliegende „capture AK“ gebunden. Diesen Komplex kann man unter Zugabe eines dafür spezifischen Zweitantikörpers („detection AK“) markieren. Durch Zugabe passender Enzyme, wird mit dem „detection AK“ eine Farbreaktion ausgelöst, welche die abgegebenen Immunmodulatoren oder Botenstoffe indirekt sichtbar macht. Da sich die Zellen immer am gleichen Platz befanden, kann davon ausgegangen werden, dass jeder sichtbare Punkt auf der Elispot Platte einzig die Immunmodulatore- und Botenstoffproduktion einer Zelle symbolisiert [Lehmann, P.V., 2005].

### TNF $\alpha$ -Produktion von Monozyten unter LPS-Stimulation

Pro Versuch wurden die einzelnen wells von 2 sterilen Elispot-Platten für 1 Minute mit 15  $\mu$ l 35 % Ethanol benetzt. Durch diese Desinfektion sollte eine Verunreinigung verhindert und so ideale Voraussetzungen für die Enzymreaktion geschaffen werden. Der Ethanol wurde dreimal mit 150  $\mu$ l sterilem PBS/well ausgewaschen. Daraufhin wurde eine AK-Lösung aus TNF  $\alpha$  „capture AK“ und PBS im Verhältnis 1:100 hergestellt. Die wells der Elispot-Platten wurden mit 100  $\mu$ l dieser AK-Suspension bedeckt und über mindestens zehn Stunden bei 4°C inkubiert. Ungebundener „capture AK“ wurde danach entleert. Alle wells wurden mittels Multikanalpipette 3x mit 150  $\mu$ l sterilem deionisiertem Wasser gewaschen. Die Platten wurden nach jedem Waschschrift auf einem Papiertuch ausgeklopft, um eine möglichst gründliche Entfernung ungebundener „capture AK“ zu gewährleisten. Die freien Proteinbindungsstellen der so präparierten Elispot-Platten wurden mit 150  $\mu$ l BCM/well geblockt und für mindestens zwei Stunden bei 37 °C inkubiert.

Um die in der MACS Separation aufgereinigten Monozyten für den Elispot verwenden zu können, wurden sie zentrifugiert und in 1 ml BCM resuspendiert. Daraufhin wurde die Zellkonzentration, wie unter 2.2.4 Zellzählung beschrieben, ausgezählt. Die entsprechende ml Anzahl für 60.000 Zellen wurde in ein Eppendorfgefäß pipettiert und bis zu einer Gesamtmenge von 2 ml mit BCM aufgefüllt. Dies entspricht einer Gesamtzellkonzentration von 30.000 Monozyten pro ml.

Nach Beendigung der Inkubationszeit der Elispot-Platten wurde der BCM-Überstand verworfen. Pro Patient wurden insgesamt 18 wells der Elispot-Platten mit je 100  $\mu$ l Monozytensuspension gefüllt. Daraus entsteht eine Zellkonzentration von 3.000 Monozyten/well. Zellen einer reinen PBMC Zellsuspension wurden als Kontrolle mit einer Konzentration von 15.000 PBMCs/well in 18 wells pipettiert. Da innerhalb von PBMCs von einem durchschnittlichen Monozytenanteil von 20 % ausgegangen werden kann, ergab sich in den wells der PBMC-Kontrolle ebenfalls eine Konzentration von ca. 3.000 Monozyten/well. Die Signalhäufigkeit der PBMC-Kontrolle war somit visuell vergleichbar mit dem Signal der Monozyten. In Vorversuchen wurde ermittelt, dass sich die einzelnen Zellsignale bei der Zellzahl von 3.000/ well am deutlichsten darstellen lassen. Bei höheren Zellkonzentrationen/ well war eine deutliche Abgrenzbarkeit der Punkte zueinander, auf Grund einer zu starken Hintergrundfärbung und eines konfluieren der Punkte untereinander, nicht mehr möglich.

Die in jedem well in gleicher Konzentration vorhandenen Monozyten wurden daraufhin nach folgendem Schema mit LPS stimuliert:

In jedes well wurden 10  $\mu$ l LPS-Lösung pipettiert. Die LPS-Konzentration stieg dabei pro Proband nach je 3 wells von 0 auf 31, 62, 125, 250 und 500 pg LPS/ml. Diese 6 LPS-Konzentrationen stellten sich in Vorversuchen am aussagekräftigsten dar. In die wells der PBMC-Kontrolle wurde die LPS-Lösung nach gleichem Schema zugegeben. Die Anordnung auf den Elispotplatten ist in Abbildung 9 dargestellt.

Platte 1					Platte 2			PBMC Kontrolle:	
LPS in $\mu\text{g/ml}$ :		0	31	62	125	250	500		LPS in $\mu\text{g/ml}$ :
Monozyten:	Proband 1	○○○	○○○	○○○	○○○	○○○	○○○	○○○	0
	Kontrolle 1	○○○	○○○	○○○	○○○	○○○	○○○	○○○	31
	Proband 2	○○○	○○○	○○○	○○○	○○○	○○○	○○○	62
	Kontrolle 2	○○○	○○○	○○○	○○○	○○○	○○○	○○○	125
	Proband 3	○○○	○○○	○○○	○○○	○○○	○○○	○○○	250
	Kontrolle 3	○○○	○○○	○○○	○○○	○○○	○○○	○○○	500
	Proband 4	○○○	○○○	○○○	○○○	○○○	○○○	○○○	
	Kontrolle 4	○○○	○○○	○○○	○○○	○○○	○○○	○○○	

Abbildung 9: Probenanordnung auf Elispotplatte

Um ein ausreichendes Stimulationsfenster zu gewährleisten und das Erregungsplateau der LPS-Stimulation abbilden zu können, wurden die Zellen in LPS-Lösung für 18 Stunden bei 37 °C inkubiert.

Die Zellen wurden nach Inkubation verworfen. Die ausgeleerten Elispot-Platten wurden danach 6x mit 200  $\mu\text{l}$  PBS/0,01 % Tween 20 pro well gewaschen, um eine LPS getriggerte zelluläre Enzymaktivität zu einem späteren Zeitpunkt zu verhindern. In jedes well wurden 100  $\mu\text{l}$  „detection Ak“ Lösung („detection-Ak“ in PBS/0,5% BSA im Verhältnis 1:250) gegeben. Die empfohlene Inkubationszeit von mindestens zwei Stunden bei 37 °C wurde stets eingehalten. So konnte ein Komplex aus „capture AK“ mit TNF  $\alpha$  und „detection AK“ entstehen. Hiernach erfolgten erneut sechs Waschschrte mit 200  $\mu\text{l}$  PBS/0,01 % Tween 20 pro well, um ungebundenen „detection AK“ auszuwaschen. Es wurden 100  $\mu\text{l}$ /well Streptavidin alkaline phosphatase/PBS Lösung (Mischverhältnis 1: 1.000) zugegeben. Streptavidin alkaline phosphatase bindet an den TNF  $\alpha$  markierenden „detection AK“. Diese Bindungsreaktion wird durch eine 15-minütige Inkubationszeit im Dunkeln bei Raumtemperatur verbessert. Um ungebundene Überschüsse zu entfernen, folgten drei Waschschrte mit 200  $\mu\text{l}$  PBS/0,01 % Tween 20 pro well, gefolgt von 3x 200  $\mu\text{l}$  sterilem PBS pro well.

Auf die so vorbereiteten wells wurden 100  $\mu\text{l}$  BCIP/NBT Substrat gegeben und unter Aufsicht belassen. Durch Interaktion von Substrat und Streptavidin alkaline phosphatase kommt es zu einer chemischen Farbreaktion. Sobald sich dunkle lila Punkte entwickelten, spätestens aber nach fünf Minuten, wurde das BCIP/NBT Substrat mit Leitungswasser sehr gründlich ausgespült. Bei den fertigen Elispot-Platten wurden zum Trocknen die abziehbaren Plastikböden entfernt. Danach wurden die Elispot-Platten lichtdicht verpackt und bis zur Analyse im „EliSpot Reader“ bei Raumtemperatur gelagert.

### 2.2.8 Statistische Auswertung

Alle Berechnungen waren zweiseitig. Die Nullhypothese musste in allen Auswertungen auf einem Signifikanzniveau von 5 % abgewiesen werden. Diese jeweilige Irrtumswahrscheinlichkeit ist als p-Wert in den Ergebnissen vermerkt. Alle p-Werte < 0,05 gelten als signifikant, < 0,01 als hoch signifikant und < 0,001 also höchst signifikant [Weiß, D.C., 2010]. Kategorische Daten wurden in relativen Frequenzen berechnet. Folgende statistische Tests kamen zur Anwendung:

t-Test: Mit dem t-Test können Mittelwerte von zwei unverbundenen Stichproben miteinander verglichen werden. In der Nullhypothese wird die Gleichheit der Mittelwerte von zwei Gruppen angenommen. Die Werte müssen für diesen Lagetest zwingend normalverteilt sein. Er eignet sich daher in Studien mit zwei unabhängigen Therapiegruppen [Weiß, D.C., 2010]. Um den richtigen t-Test anzuwenden, müssen die Varianzen vorher anhand des Levene-Tests auf Varianzhomogenität geprüft werden. Die Frequenzen der Monozyten wiesen eine Normalverteilung der Werte auf und wurden anhand des t-Tests beurteilt.

Mann Whitney U-Test: Der U-Test von Mann und Whitney eignet sich ebenfalls zum Vergleich von zwei unverbundenen Stichproben. Die Werte müssen, im Gegensatz zum t-Test, jedoch keine Normalverteilung aufweisen, sondern nur einem gleichen Verteilungsmuster folgen [Weiß, D.C., 2010]. Die Frequenzen der regulatorischen T-Lymphozyten wiesen eine schiefe Verteilung auf. Die Unterschiede des Median von T<sub>reg</sub> Frequenzen wurden daher mit dem Mann Whitney U-Test analysiert. Ebenso wurde die Tendenz des Median der SLAM-Expression und TNF  $\alpha$ -Produktion von Monozyten unter LPS-Stimulation mit diesem Test verglichen.

Siegel Tukey Test: Beim Siegel Tukey Test handelt es sich um einen nicht parametrischen Test. Mit ihm können Unterschiede in der Werteverteilung zwischen zwei Gruppen dargestellt werden [Duller, D.C., 2008]. Die Variabilität der SLAM-Expression der Monozyten in den Gruppen mit und ohne Rituximabtherapie konnte mittels Siegel Tukey Tests für jede LPS-Konzentration verglichen und interpretiert werden.

F-Test: Der F-Test testet ebenso die Gleichheit zweier Varianzen. Es wird eine Normalverteilung vorausgesetzt [Weiß, D.C., 2010]. Die Variabilität der TNF  $\alpha$ -Produktion im Elispot wurde mit dem F-Test für alle LPS-Konzentrationen innerhalb der Referenzgruppen verglichen.

ANOVA (analysis of variance): Die Varianzanalyse wird angewandt, um signifikante Unterschiede in der Verteilung zweier oder mehrerer Varianzen nachzuweisen. Die Varianzen innerhalb der Gruppe werden mit der Varianz zwischen den Gruppen verglichen.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Einfluss von Rituximab auf die relativen Häufigkeiten von Leukozytensubpopulationen

Es wurde untersucht, ob sich eine anti-CD20 vermittelte Depletion der B-Lymphozyten durch Rituximab auf die quantitative Zusammensetzung der Leukozytensubpopulationen auswirkt. Besonderes Augenmerk lag dabei auf der relativen Häufigkeit von Monozyten und regulatorischen T-Zellen. Monozyten scheinen in der Genese von demyelinisierten Läsionen bei MS und NMO eine große Rolle zu spielen. Regulatorische T-Zellen könnten hingegen bei MS eine wichtige antiinflammatorische Aufgabe übernehmen. Die neuroimmunologischen Gruppen mit und ohne Therapie sowie die neuroimmunologisch gesunden und hämatoonkologischen Patienten mit und ohne Therapie wurden verglichen. So konnte beurteilt werden, wie sich eine B-Zelldepletion mit Rituximab bei Patienten mit unterschiedlichen immunologischen Grundkonstellationen auf die Frequenzen der restlichen Leukozytensubpopulationen auswirkt.

Die gesamte Leukozytenzahl unterteilt sich physiologisch in einen Lymphozytenanteil von 20-45 % und einen Monozytenanteil von 2-8 % [Berg, F.v.d.; Jan C. Behrends, M.H., E. Wischmeyer, 2010]. Der restliche Anteil besteht aus polymorphkernigen Granulozyten. Diese fehlen aufgrund ihrer Dichteigenschaften in den PBMCs. PBMCs bestehen daher fast ausschliesslich aus Lymphozyten und Monozyten.

In jeder Versuchsgruppe wurden die Frequenzen von CD19<sup>+</sup> B-Zellen, CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen, CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup>/CD127<sup>-</sup> regulatorischen T-Zellen, sowie CD14<sup>+</sup> Monozyten in den PBMCs ermittelt. Die relative Häufigkeit von B-Zellen wurde über CD19 Bindung nachgewiesen. CD19 ist ein B-Zellen spezifisches Oberflächenmolekül. Wie auch CD20, ist es auf B-Zellen bis zur Differenzierung zu Plasmazellen vorhanden. Bei CD20 als Oberflächenmarker wäre eine Unterscheidung zwischen B-Zelldepletion und Blockierung bei fehlendem CD20 Signal nicht möglich gewesen.

Die relativen Häufigkeiten von B-Zellen, T-Zellen und Monozyten innerhalb der PBMCs wurden mittels FACS-Analyse ausgewertet. Dabei wurden die Leukozyten im FSC/SSC Diagramm dargestellt und in einem „gate“ markiert (siehe Abbildung 6). Die relativen Anteile der CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD14<sup>+</sup>, CD19<sup>+</sup> Leukozytensubpopulationen wurden innerhalb dieses „Leukozyten-gates“ anhand ihrer spezifischen Oberflächenmoleküle und ihres typischen Volumens ermittelt.

Das therapiebedingte Fehlen von B-Zellen in den Gruppen 1 und 3 sollte in der Auswertung ausgeglichen werden. Für jede Subpopulation wurden daher die Prozentsätze zusätzlich im Verhältnis zu T-Zellen (CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>) sowie zu T-Zellen mit Monozyten (CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>/CD14<sup>+</sup>) berechnet. Die Prozentwerte von T-Lymphozyten und Monozyten aller 4 Gruppen sind somit untereinander vergleichbar.

Alle relativen Häufigkeiten der Leukozytensubpopulationen, einschließlich zugehöriger p-Werte der Gruppenvergleiche, sind in Tabelle 3 zusammengefasst.

Patienten ohne neuroimmunologische Erkrankung		Gruppe 1: B-Zelllymphom αCD20	Gruppe 2: Kontrolle „gesund“	p-Wert
CD19 <sup>+</sup> pro PBMCs	Mittelwert % (+/-SEM)	0,1 (+/-0)	12,5 (+/-4,2)	<0,0001
CD4 <sup>+</sup> pro PBMCs	„	21,3 (+/-2,5)	28,2 (+/-2,2)	0,037
CD8 <sup>+</sup> pro PBMCs	„	21,8 (+/-2,1)	13,4 (+/-1,4)	0,006
CD14 <sup>+</sup> pro PBMCs	„	28,6 (+/-2,4)	21,6 (+/-1,9)	0,048
CD4 <sup>+</sup> pro CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup>	„	48,1 (+/-3,9)	66,9 (+/-2,6)	0,001
CD4 <sup>+</sup> pro CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup> /CD14 <sup>+</sup>	„	29,2 (+/-3,2)	43,9 (+/-2,5)	0,002
CD8 <sup>+</sup> pro CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup> /CD14 <sup>+</sup>	„	30,5 (+/-2,9)	21,3 (+/-1,7)	0,031
CD14 <sup>+</sup> pro CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup> /CD14 <sup>+</sup>	„	40,3 (+/-3,4)	34,9 (+/-2,3)	0,194
Neuroimmunologische Patienten		Gruppe 3: MS/NMO αCD20	Gruppe 4: MS/NMO Kontrolle	p-Wert
CD19 <sup>+</sup> pro PBMCs	Mittelwert % (+/-SEM)	0,2 (+/-0,1)	7,9 (+/-1,1)	<0,0001
CD4 <sup>+</sup> pro PBMCs	„	37,7 (+/-2,5)	35,9 (+/-1,5)	0,420
CD8 <sup>+</sup> pro PBMCs	„	16,8 (+/-1,8)	15,5 (+/-1,1)	0,768
CD14 <sup>+</sup> pro PBMCs	„	22,3 (+/-2,5)	16,4 (+/-1,4)	0,159
CD4 <sup>+</sup> pro CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup>	„	69,2 (+/-2,2)	69,8 (+/-1,9)	0,803
CD4 <sup>+</sup> pro CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup> /CD14 <sup>+</sup>	„	48,6 (+/-2,9)	53,2 (+/-2,0)	0,271
CD8 <sup>+</sup> pro CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup> /CD14 <sup>+</sup>	„	21,3 (+/-2,0)	22,9 (+/-1,5)	0,370
CD14 <sup>+</sup> pro CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup> /CD14 <sup>+</sup>	„	30,0 (+/-3,7)	23,9 (+/-2,1)	0,163

Tabelle 3: Relative Häufigkeiten von CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> und CD14<sup>+</sup> Leukozytensubpopulationen

### 3.1.1 Die relative Häufigkeit der Lymphozyten

#### B-Zellen (CD19<sup>+</sup>)

Alle CD19<sup>+</sup> Zellen innerhalb des „Leukozyten-gates“ wurden in einem CD19/FSC Diagramm dargestellt und berechnet.

Die Gruppen 1 und 3 stellen die Immunkonstellation unter Rituximabtherapie dar. In diesen Gruppen sollten bei Therapieansprechen keine CD19<sup>+</sup> B-Zellen vorhanden sein. In beiden Gruppen konnte mittels der FACS-Analyse ein Therapieerfolg im Sinne einer B-Zellelimination von > 99 % nachgewiesen werden (Häufigkeit B-Zellen Gruppe 1:  $\mu$  0,1 % (SEM +/- 0), Gruppe 3:  $\mu$  0,2 % (SEM +/- 0,1)).

In den Gruppen 2 und 4 wurde das Immunsystem der Patienten nicht durch eine Rituximabtherapie beeinflusst. In der überwiegend gesunden Referenzgruppe 2 zeigte sich ein B-Zellanteil in den PBMCs von im Mittel 12,5% (SEM +/- 4,2). Bei Patienten mit neuroimmunologischer Erkrankung ohne Therapie (Gruppe 4), wurde im Durchschnitt ein leicht geringerer Anteil B-Zellen ermittelt: 7,9% (SEM +/- 1,1). Dieser Unterschied der Mittelwerte war mit einer Wahrscheinlichkeit von > 5 % nicht signifikant.

#### T-Zellen (CD4<sup>+</sup>,CD8<sup>+</sup>)

Zur Analyse der relativen Häufigkeiten der T-Zellsubpopulationen wurden ihre CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> Oberflächenmoleküle innerhalb des „Leukozyten-gates“ identifiziert. Die T-Zellsubtypen wurden in einem CD4/FSC Diagramm und einem CD8/FSC Diagramm dargestellt und berechnet.

Die relative Häufigkeit der CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten innerhalb der CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>/CD14<sup>+</sup> PBMC-Populationen war bei hämatoonkologischen Patienten mit Rituximabtherapie (Gruppe 1) mit 29,2 % (SEM +/- 3,2) signifikant niedriger als in Gruppe 2 (43,9 % (SEM +/- 2,5)). Im Vergleich fiel der Anteil an CD4<sup>+</sup> Zellen in Gruppe 3 mit 48,6 % (SEM +/- 2,9) und in Gruppe 4 mit 53,2 % (SEM +/- 2,0) ähnlich aus. Es konnte somit bei unbehandelten und mit Rituximab therapierten MS-/NMO-Patienten kein signifikanter Unterschied in der Frequenz der CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten nachgewiesen werden.

Der relative Anteil der CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten an den CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>/CD14<sup>+</sup> Zellen war bei hämatoonkologischen Patienten mit Rituximabtherapie (Gruppe 1) mit im Mittel 30,5 % (SEM +/- 2,9) im Vergleich zu Gruppe 2 signifikant erhöht. Alle anderen Gruppen wiesen untereinander vergleichbare Mittelwerte auf (Gruppe 2:  $\mu$  21,3 % (SEM +/- 1,7), Gruppe 3:  $\mu$  21,3 % (SEM +/- 2,0), Gruppe 4:  $\mu$  22,9 % (SEM +/- 1,5)). Es konnte somit bei unbehandelten und mit Rituximab

therapierten MS-/NMO-Patienten kein signifikanter Unterschied in der Frequenz der CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten nachgewiesen werden.

Bei B-Lymphom Probanden unter Therapie (Gruppe 1) konnte mit 0,93 ein leicht verringerter CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> Quotient ermittelt werden. Ein Verhältnis von CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten zwischen 1,4 und 2,5 gilt als physiologisch [Amadori, A. et al., 1995].

In Gruppe 2 lag der CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> Quotient bei 2,02, in Gruppe 3 bei 2,25 und in Gruppe 4 bei 2,31.

Die Ergebnisse zeigten insgesamt, dass eine Rituximabtherapie bei Patienten mit MS/NMO keine signifikanten Auswirkungen auf den relativen Anteil von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen innerhalb der CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>/CD14<sup>+</sup> Leukozyten bewirkt. Durch alleinige Feststellung der CD4<sup>+</sup> T-Zellfrequenz können keine Rückschlüsse gezogen werden, ob sich die Verteilung der relativen Häufigkeiten innerhalb der CD4<sup>+</sup> T-Zellsubtypen (TH1, TH2, TH17 und regulatorische T-Zellen) durch eine Rituximabtherapie ändert. Die Ergebnisse der weiteren Analysen zur Bestimmung der Frequenz regulatorischer T-Zellen, als exemplarische Subgruppe der CD4<sup>+</sup> T-Zellen, werden im weiteren Verlauf dargestellt.

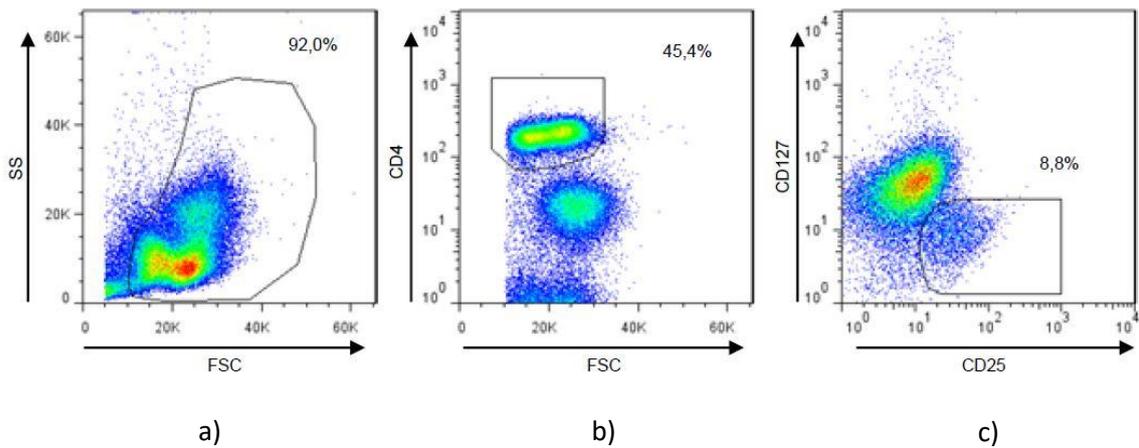
### **3.1.2 Die Frequenz regulatorischer T-Zellen**

Um den Effekt einer Rituximabtherapie auf CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup>/CD127<sup>-</sup> regulatorische T-Zellen beim Menschen abzubilden, wurde die Frequenz regulatorischer T-Zellen innerhalb der CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>/CD14<sup>+</sup> Zellen in den Gruppen verglichen.

CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurden in einem CD127/CD25 Diagramm dargestellt. Die regulatorischen T-Zellen liegen darin im CD25 positiven und CD127 negativen Quadranten. Sie können als Wolke eindeutig von der größeren CD127<sup>+</sup> Subpopulation der CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen abgegrenzt werden (Abbildung 10).

In Gruppe 3 mit MS-/NMO-Patienten unter Therapie wurde der Median der regulatorischen T-Zell Frequenzen bei 6,8 % (25/75 % Perzentil: 5,6-8,4) ermittelt. Dieser lag in der nicht therapierten Vergleichsgruppe 4 mit 5,2 % (25/75 % Perzentil: 4,5-6,6) deutlich niedriger. Der Unterschied ist mit einem p-Wert von 0,022 signifikant.

Im Vergleich der Gruppen 1 und 2 wurde bei hämatoonkologischen Patienten unter Rituximabtherapie ebenso ein höherer relativer Anteil regulatorischer T-Zellen an den CD4<sup>+</sup> T-Zellen als bei neuroimmunologisch gesunden Patienten ohne Therapie gemessen (Median Gruppe 1: 9,0 % (25/75% Perzentil: 7,1-13,8), Median Gruppe 2: 6,0 % (25/75% Perzentil: 4,8-7,3)). Der p-Wert dieses Gruppenvergleichs betrug < 0.001 und ist somit höchst signifikant.



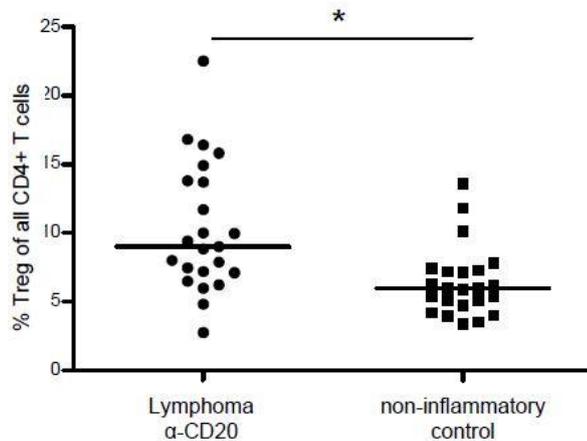
**Abbildung 10: Darstellung der regulatorischen T-Lymphozyten in der FACS Auswertung**

- a) Leukozytengate
- b) Gate über CD4<sup>+</sup> T-Zellen
- c) regulatorische T-Zellen mit Gate markiert

In Abbildung 11 und Abbildung 12 ist die Frequenzerhöhung der regulatorischen T-Lymphozyten unter anti-CD20 Therapie (Gruppe 1 und 3) im Vergleich zu den nicht mit Rituximab therapierten Kontrollgruppen abgebildet. Man kann erkennen, dass das Verteilungsmuster der regulatorischen T-Zellen innerhalb der Gruppen einer schiefen Verteilung folgt. Auch scheint die Frequenz regulatorischer T-Lymphozyten bei Patienten mit MS/NMO ohne Therapie nicht niedriger als in der neurologisch gesunden Kontrollgruppe 2 zu liegen. Neuroimmunologische Erkrankungen wie MS/NMO scheinen folglich keinen Einfluss auf die Frequenz regulatorischer T-Zellen zu nehmen.

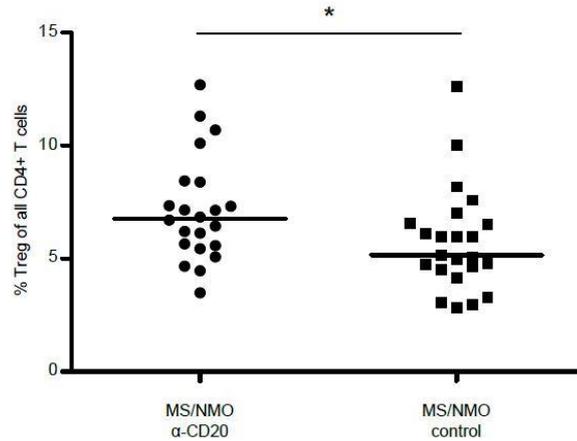
**Abbildung 11: Punktediagramm Gruppen 1 und 2: CD4<sup>+</sup>25<sup>+</sup>127<sup>-</sup> Zellen in allen CD4<sup>+</sup> Zellen**

Die horizontalen Linien stellen den Mittelwert dar. \* p-Wert: < 0.001



**Abbildung 12: Punktediagramm Gruppen 3 und 4: CD4<sup>+</sup>25<sup>+</sup>127<sup>-</sup> Zellen in allen CD4<sup>+</sup> Zellen**

Die horizontalen Linien stellen den Mittelwert dar. \* p-Wert: 0.022



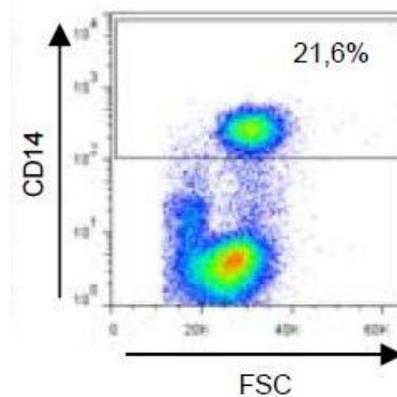
Zusammenfassend zeigte sich, dass eine Therapie mit Rituximab den relativen Anteil der regulatorischen T-Lymphozyten an den CD4<sup>+</sup> T-Zellen signifikant erhöht. Sowohl bei neuroimmunologischen Patienten als auch bei hämatoonkologischen Patienten konnte dieser Effekt der CD20 Depletion nachgewiesen werden. Der Einfluss von Rituximab auf die T<sub>reg</sub>-Frequenz innerhalb der CD4<sup>+</sup> T-Zellen scheint unabhängig von der Grunderkrankung zu sein.

### 3.1.3 Die relative Häufigkeit der Monozyten

Bisher wurde der Einfluss von Rituximab auf die Frequenzen von B-Zellen und CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, sowie CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup>/CD127<sup>-</sup> T-Zellen untersucht. Nachdem diese relativen Häufigkeiten der Leukozytensubpopulationen ermittelt worden waren, sollte auch der relative Anteil von Monozyten in den PBMCs quantifiziert werden. Dazu wurden die Monozyten innerhalb des Leukozytengates in einem CD14/FSC- Diagramm abgebildet (Abbildung 13 ). Die CD14<sup>+</sup> Monozyten stellen sich dabei als klar abgrenzbare Populationswolke im CD14 positiven Bereich des Diagramms dar.

**Abbildung 13: FACS CD14/FSC Diagramm**

Das Gate liegt im CD14 positiven Bereich. Die Monozytenpopulation ist eindeutig abzugrenzen.



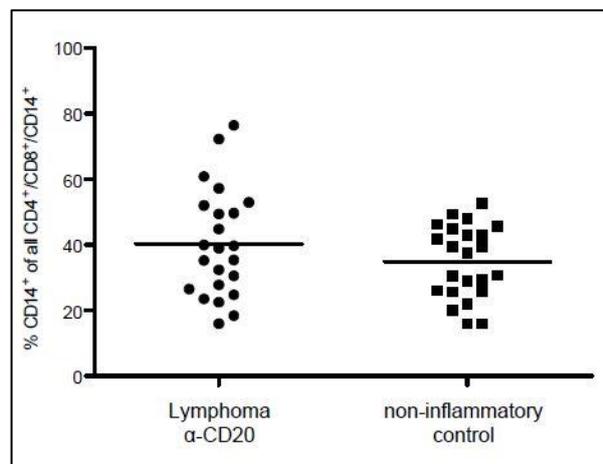
In allen CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>/CD14<sup>+</sup> Zellen fanden sich bei Gruppe 1 im Mittel 40,3 % (SEM +/- 3,4) Monozyten. In der nicht therapierten neuroimmunologisch gesunden Vergleichsgruppe 2 fiel der Anteil von Monozyten in allen CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>/CD14<sup>+</sup> Zellen auf durchschnittlich 34,9 % (SEM +/- 2,3). Die hämatookologischen Patienten unter Rituximabtherapie wiesen dementsprechend zwar einen höheren Monozytenanteil als Probanden der unbehandelten in Gruppe 2 auf, dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant.

In den neuroimmunologischen Gruppen fiel das Ergebnis des Gruppenvergleichs ähnlich aus: Bei MS-/NMO-Patienten unter Rituximabeinfluss lag der relative Monozytenanteil innerhalb der CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>/CD14<sup>+</sup> Zellen bei  $\mu$  30,0 % (SEM +/- 3,7). In Gruppe 4 mit unbehandelten MS-/NMO-Patienten ergab sich im Mittel eine relative Häufigkeit von 23,9 % (SEM +/- 2,1) Monozyten innerhalb der CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>/CD14<sup>+</sup> Zellen. Auch hier lag die Frequenz der Monozyten bei Patienten unter Rituximabtherapie im Mittel zwar über der von unbehandelten MS-/NMO-Patienten, die Differenz war jedoch ebenfalls nicht signifikant.

Die Verteilung der Frequenzen von Monozyten innerhalb der CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>/CD14<sup>+</sup> Zellen wurde in den folgenden Punktediagrammen visualisiert (Abbildung 14 und Abbildung 15). Die Patienten unter  $\alpha$  CD20 Therapie (Gruppe 1 und 3) wurden mit ihrer jeweiligen Referenzgruppe ohne Therapie (Gruppe 2 und 4) gegenübergestellt.

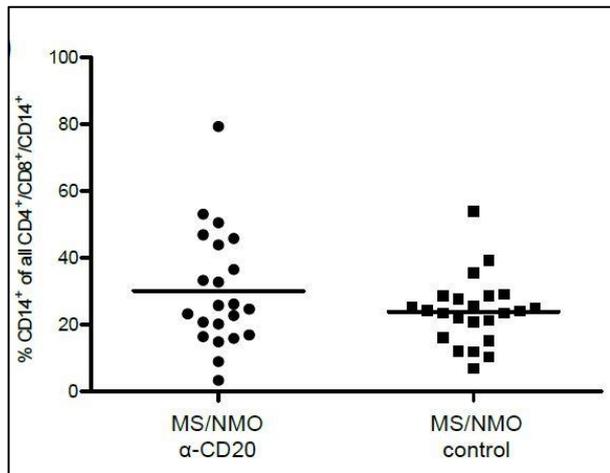
**Abbildung 14: Punktediagramm Gruppen 1 und 2: CD14<sup>+</sup> Zellen in allen CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>/CD14<sup>+</sup> Zellen**

Die horizontalen Linien stellen den Mittelwert dar. p-Wert: 0.194



**Abbildung 15: Punktediagramm Gruppen 3 und 4:  
CD14<sup>+</sup> Zellen in allen CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>/CD14<sup>+</sup> Zellen**

Die horizontalen Linien stellen den  
Mittelwert dar. p-Wert: 0.163



Der relative Anteil von Monozyten innerhalb der Leukozyten wurde in beiden Gruppenvergleichen durch eine Rituximabtherapie nicht signifikant verändert. Rituximab scheint dementsprechend, unabhängig von der immunologischen Grundkonstellation, keinen Einfluss auf die Frequenz von Monozyten auszuüben. Durch die Frequenzanalyse des CD14 Oberflächenmoleküls kann lediglich eine Aussage über die relative Anzahl von Monozyten, nicht aber über deren Aktivitätsstatus getroffen werden.

### 3.2 Einfluss von Rituximab auf die Monozytenaktivität

In der Studie von Weber et al. 2010 zeigte sich ein Anstieg der Monozytenaktivität bei EAE-Mäusen nach Rituximab-Verabreichung. Um in dieser Arbeit einen Einfluss von Rituximab auf Monozyten beim Menschen darstellen zu können, wurden aufgereinigte Monozytenpopulationen aus den PBMCs der Probanden analysiert. Eine Überprüfung der Monozytenreinheit nach MACS mittels CD14-FITC-AK Markierung (Mischverhältnis 1:10 in FACS Puffer) ergab bei den meisten Proben in der FACS-Analyse eine Reinheit von > 93 %.

Der Aktivitätsstatus der Monozyten wurde mit Hilfe von LPS-Stimulation bestimmt. LPS ist ein physiologischer Bestandteil von bakteriellen Membranen. Es wird vom menschlichen angeborenen Immunsystem als potentiell pathogenes Antigen erkannt und löst eine Abwehrreaktion aus [Rossol, M. et al., 2011]. Monozyten können LPS über LPS binding protein, CD14 und TLR erkennen und gehen dadurch in einen aktivierten Zustand über [Lu, Y.C. et al., 2008]. Monozyten exprimieren nach

Aktivierung mit LPS den „signalling lymphocyte activation molecule“ (SLAM) genannten Oberflächenmarker CD150 [Farina, C. et al., 2004]. Eine erfolgreiche LPS-Stimulation kann daher durch CD150-Messung nachgewiesen werden. Zudem schütten proinflammatorisch aktivierte Monozyten TNF  $\alpha$  aus. Die Monozytenaktivität nach LPS-Stimulation wurde daher anhand der SLAM-Exprimierung und TNF  $\alpha$ -Produktion gemessen.

Die CD150-Exprimierung von CD14<sup>+</sup> Zellen nach Stimulation durch LPS wurde per FACS analysiert. Die TNF  $\alpha$ -Produktion wurde anhand der Farbsignale auf Elispot Platten quantifiziert. Die Stimulierbarkeit der CD150-Exprimierung und der TNF  $\alpha$ -Produktion der Monozyten wurde jeweils für sechs LPS-Konzentrationen (0, 31, 62, 125, 250, 500 pg/ml) ausgewertet und innerhalb der Gruppen verglichen.

### **3.2.1 FACS-Analyse der SLAM-Exprimierung von Monozyten unter LPS-Stimulation**

Nach der FACS-Analyse wurden die CD14<sup>+</sup> Monozyten in einem Auswahlfenster festgelegt. Die so ausgewählten Monozyten wurden in jeder LPS-Konzentrationsstufe in einem SLAM/FSC-Diagramm abgebildet. Als Referenz für eine Monozytenaktivierung wurde im CD150 positiven Bereich ein zweites Gate gesetzt. Dieses Gate wurde an einer nicht aktivierten Zellpopulation bei 0 LPS ausgerichtet und in der Auswertung bei jeder LPS-Konzentration in der Ausgangslage belassen. Mit steigenden LPS-Konzentrationen erhöht sich die Monozytenaktivität und die CD150 positiven Fluoreszenzsignale nehmen somit zu. Die SLAM-Exprimierung in Abhängigkeit der LPS-Konzentration konnte daher als Prozentwert im Gate abgelesen werden. Auch die Ausgangsniveaus der CD150-Exprimierung konnten zwischen den Gruppen verglichen werden. Innerhalb jeder Gruppe wurde die Monozytenaktivität für die LPS-Konzentrationen 0, 31, 62, 125, 250 und 500 pg/ml bestimmt (Abbildung 16).

In allen Gruppen konnte ein Anstieg der Monozytenaktivität in Abhängigkeit der LPS-Konzentration nachgewiesen werden. Unterschiede in der Aktivitätsausprägung zwischen Gruppen mit und ohne Rituximab wurden ausgewertet. Um einen Trend innerhalb einer Verteilung darzustellen, wurde der Median der SLAM-Exprimierung berechnet. Eine Zusammenfassung der Ergebnisse ist in Tabelle 4 dargestellt. Der Median eignet sich für Trenddarstellungen besser als der Mittelwert. Zusätzlich wurde die Varianz der Exprimierungen ermittelt.

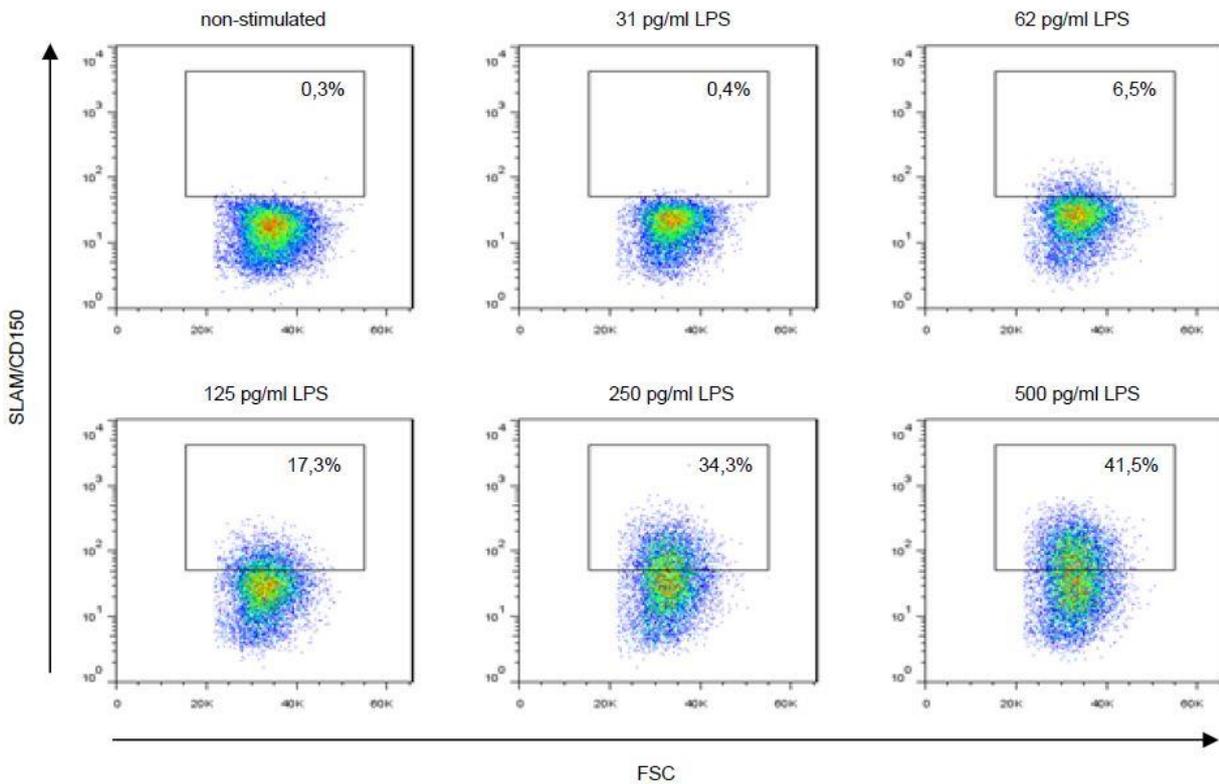


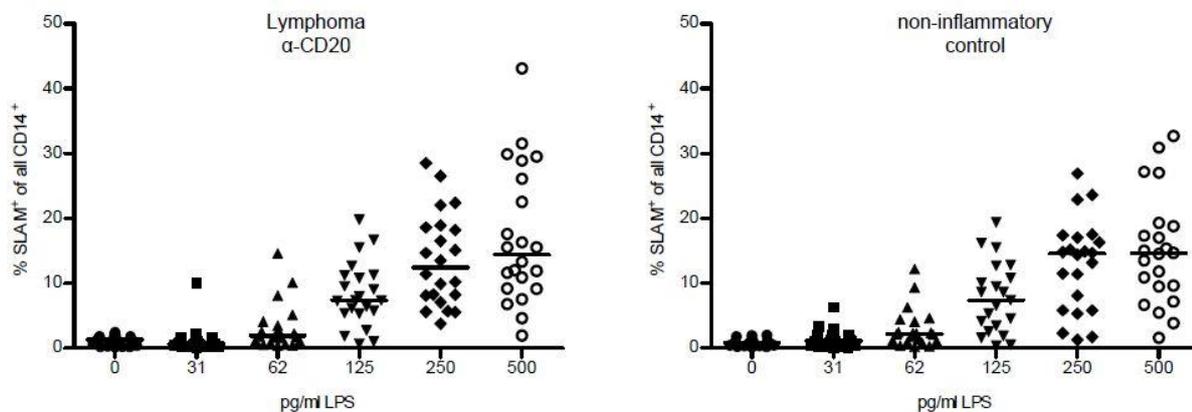
Abbildung 16: SLAM-Expression in Abhängigkeit der LPS-Konzentration

Der relative Anteil aktivierter CD150<sup>+</sup> Monozyten kann in jeder LPS-Konzentration im Gate abgelesen werden.

% SLAM exprimierender CD 14 <sup>+</sup> Zellen							
LPS Konzentration		LPS 0	LPS 31	LPS 62	LPS 125	LPS 250	LPS 500
Gruppe 1	Median	1,26	0,71	1,90	7,39	12,45	14,40
	25/75 % Perzentil	0,44 - 1,65	0,33 - 1,10	1,12 - 3,25	5,47 - 11,10	8,14 - 18,50	9,61 - 25,20
Gruppe 2	Median	0,77	1,09	2,13	7,41	14,55	14,60
	25/75 % Perzentil	0,45 - 1,13	0,35 - 1,95	1,01 - 4,07	3,42 - 10,80	6,40 - 16,83	9,53 - 18,43
Gruppe 3	Median	0,36	0,38	1,46	5,91	12,10	12,00
	25/75 % Perzentil	0,23 - 0,73	0,26 - 0,73	0,49 - 3,20	3,79 - 16,20	8,29 - 21,50	9,97 - 33,30
Gruppe 4	Median	0,37	0,58	1,48	6,47	8,32	7,56
	25/75 % Perzentil	0,23 - 0,75	0,35 - 1,05	0,50 - 3,56	2,05 - 10,16	6,04 - 12,60	5,53 - 11,75

Tabelle 4: % SLAM exprimierender CD14<sup>+</sup> Zellen Gruppe 1 - 4

Im Gruppenvergleich zwischen Patienten mit hämatonkologischer B-Zellerkrankung unter Rituximabtherapie (Gruppe 1) und der Kontrollgruppe 2 konnte bei keiner LPS-Konzentration eine signifikante Abweichung des Median festgestellt werden. Das Punktediagramm veranschaulicht die Ergebnisse (Abbildung 17). Auch die Varianzen innerhalb einer LPS-Konzentrationsstufe und deren Variabilität unterschieden sich im Gruppenvergleich 1 mit 2 nicht signifikant. Bei Patienten mit B-Zelllymphom kann davon ausgegangen werden, dass sich die Aktivität der Monozyten (im Sinne einer CD150-Exprimierung) durch eine Behandlung mit Rituximab nicht verändert.

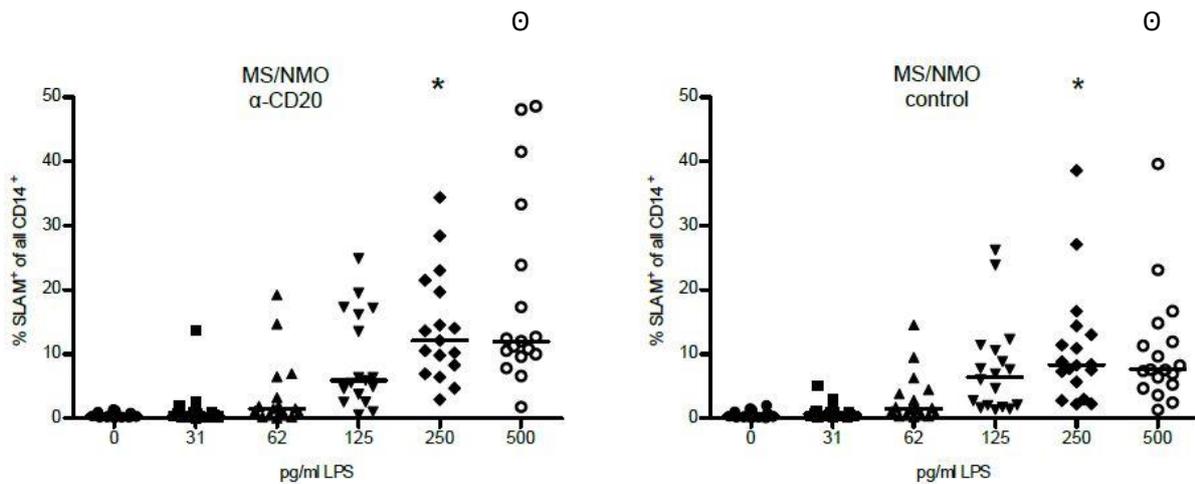


**Abbildung 17: SLAM-Exprimierung nach LPS-Stimulation der Gruppen 1 und 2**

Die horizontalen Linien stellen den Median dar.  
Der p-Wert des Median im Gruppenvergleichs lag bei jeder LPS-Konzentration  $> 0,05$ .

Die vergleichbaren SLAM-Medianwerte von hämatonkologischen Patienten und immunologisch gesunden Patienten bei 0 pg/ml LPS legen nahe, dass das grundlegende Aktivitätsniveau der Monozyten nicht durch hämatonkologische B-Zell-Erkrankungen beeinflusst wird.

Im Vergleich der Rituximab erhaltenden Gruppe 3 mit der unbehandelten MS/NMO-Kontrollgruppe 4 wichen die Mediane der SLAM-Exprimierung in den LPS-Konzentrationen 0, 31, 62, 125 und 250 pg/ml nicht signifikant voneinander ab. Bei einer Konzentration von 500 pg/ml LPS lag der Median der CD150 exprimierenden Monozyten bei MS-/NMO-Patienten unter Rituximabtherapie bei 12 % (25/75 % Perzentil: 9,97-33,3 %). In Gruppe 4 wurde bei 500 pg/ml LPS ein niedrigerer Median der Monozytenaktivierung von 7,56 % (25/75 % Perzentil; 5,53-11,75 %) ermittelt. Dieser Unterschied war mit einem p-Wert von 0,023 signifikant. Das Punktediagramm veranschaulicht die Ergebnisse aller LPS-Konzentrationen für die Gruppen 3 und 4 (Abbildung 18).



**Abbildung 18: SLAM-Expression nach LPS-Stimulation der Gruppen 3 und 4**

Die horizontalen Linien stellen den Median dar.

\* Variabilität der Varianz: p-Wert: 0,034;

O Abweichung des Median: p-Wert: 0,023 .

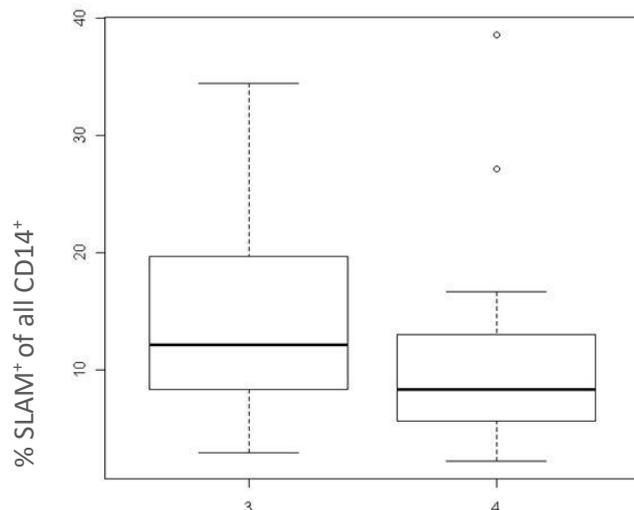
Rituximab scheint bei Patienten mit MS/NMO das Aktivitätsniveau aller Monozyten ab einer Stimulation mit 500 LPS pg/ml zu steigern. Es wurde weitergehend überprüft, ob sich das Aktivitätsniveau einzelner Monozyten unter Therapie erhöht hat, ohne den Median zu beeinflussen. Dazu wurde die Variabilität der Varianzen der CD150-Expression von Monozyten innerhalb der LPS-Konzentrationsstufen auch zwischen Gruppe 3 und 4 verglichen. Die Varianzen der CD150-Expression unterschieden sich bei den Konzentrationen 0, 31, 62, 125 und 500 pg/ml LPS jeweils nicht signifikant. Bei 250 pg/ml LPS wurde eine signifikante Variabilität der Varianzen der SLAM-Expression festgestellt (p-Wert: 0,034). Der Varianzvergleich bei 250 pg/ml LPS bei MS-/NMO-Patienten mit und ohne Rituximabtherapie ist in unten stehendem Boxplot-Diagramm veranschaulicht (Abbildung 19).

**Abbildung 19: Boxplot SLAM-Expression bei 250 pg LPS/ml im Gruppenvergleich 3 und 4**

Die horizontalen Linien stellen den Median dar.

Variabilität der Varianzen: p-Wert 0,034

° stellt ausreißenden Wert dar

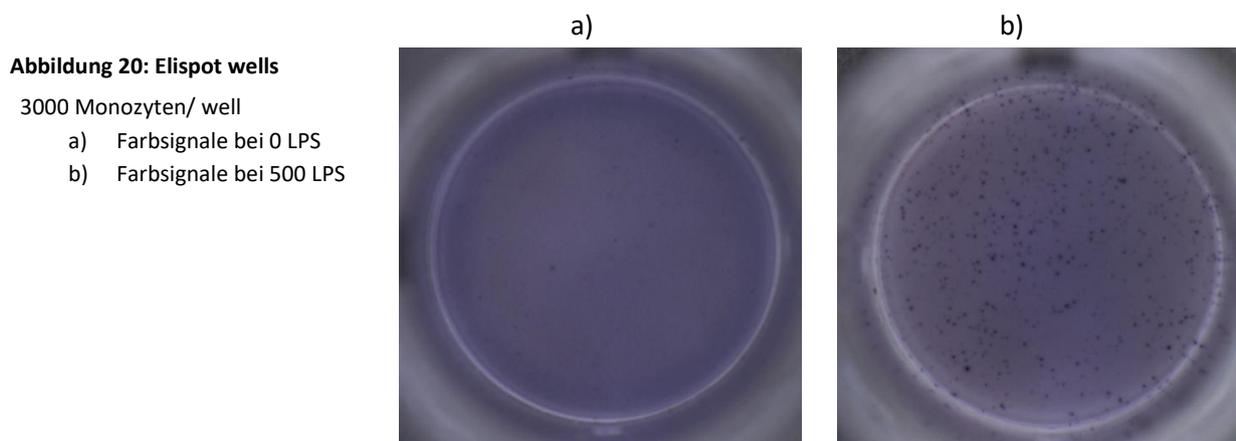


Eine Rituximabtherapie wirkt sich demnach bei einer LPS-Konzentration von 250 pg/ml bei den einzelnen MS/NMO-Probanden in unterschiedlichem Ausmaß auf die Aktivität der Monozyten aus. Nur bei einigen Probanden der Gruppe 3 kommt es zur Erhöhung der Monozytenaktivität, sodass sich der Median bei 250 pg/ml nicht signifikant ändert. Bei einigen MS/NMO-Probanden besaßen Monozyten scheinbar eine höhere Aktivierungsschwelle und exprimierten erst unter Stimulation mit 500 pg/ml LPS vermehrt CD150. Zusammen mit den schon bei 250 pg /ml LPS aktivierten Monozyten könnte dies bei 500 pg/ml LPS zur signifikanten Medianerhöhung führen, während sich die Varianzen wieder annähern.

Die zweifaktorielle Varianzanalyse über alle LPS-Konzentrationen hinweg ergab keinen signifikanten Unterschied der Varianzen innerhalb und zwischen den Gruppen. Die Monozytenaktivität schien nicht durch Gruppenmerkmale, wie Alter oder Geschlecht beeinflusst zu sein.

### 3.2.2 Elispot-Analyse der TNF $\alpha$ -Produktion von Monozyten nach LPS-Stimulation

Die proinflammatorische Reaktion der Monozyten durch LPS-Stimulation wurde in der Quantität der TNF  $\alpha$ -Produktion nachgewiesen. Zur Auswertung wurden die wells der Elispot-Platten im Elispot-Reader ausgelesen. Die TNF  $\alpha$ -Produktion der Monozyten nahm in allen Gruppen in Abhängigkeit steigender LPS-Konzentrationen zu. In allen Gruppen konnte daher eine Vermehrung der Farbsignale pro LPS-Konzentrationsstufe beobachtet werden (Abbildung 20).



Die einzelnen Farbsignale wurden mit der zugehörigen Software ausgezählt. Für jeden Patienten wurde ein Mittelwert aus drei ausgezählten wells der gleichen LPS-Konzentration gebildet. Das Ergebnis gibt für jede LPS-Konzentration (0, 31, 62, 125, 250, 500 pg/ml) an, wie viele von 3000 Monozyten dieses Patienten im Mittel TNF  $\alpha$  produziert haben. Für jede LPS-Konzentration wurde der Mittelwert, Median sowie die Varianz innerhalb der Gruppe ermittelt. Im Gruppenvergleich wurde der Median der TNF  $\alpha$ -Produktion als Maß für die zentrale Tendenz des mittleren Aktivitätsniveaus benutzt. Die Ergebnisse für jede Gruppe sind in Tabelle 5 zusammengefasst.

TNF $\alpha$ produzierende Zellen /3000 Zellen im Elispot							
LPS Konzentration		LPS 0	LPS 31	LPS 62	LPS 125	LPS 250	LPS 500
<b>Gruppe 1</b>	<b>Median</b>	21,3	43,00	76,00	114,00	157,3	205,00
	<b>25/75 % Perzentil</b>	14,0 - 35,7	31,7 - 75,3	58,3 - 112,7	90,8 - 186,5	139,3 - 243,3	165,8 - 349,0
<b>Gruppe 2</b>	<b>Median</b>	21,00	58,00	92,00	145,7	195,7	219,00
	<b>25/75 % Perzentil</b>	13,8 - 33,8	41,2 - 85,0	48,0 - 146,5	72,3 - 248,0	136,7 - 293,3	140,8 - 346,8
<b>Gruppe 3</b>	<b>Median</b>	37,3	75,00	117,7	196,3	235,30	284,30
	<b>25/75 % Perzentil</b>	27,2 - 44,5	45,7 - 120,2	80,3 - 183,5	138,3 - 313,5	160,7 - 428,2	211,7 - 485,8
<b>Gruppe 4</b>	<b>Median</b>	29,00	73,00	143,00	205,00	250,3	283,8
	<b>25/75 % Perzentil</b>	22,0 - 40,3	48,0 - 94,7	89,7 - 150,7	125,0 - 232,3	174,7 - 279,0	175,4 - 332,3

Tabelle 5: TNF  $\alpha$  produzierende Zellen/3.000 Zellen im Elispot Gruppe 1 - 4

Es wurde verglichen, ob der Median der TNF  $\alpha$ -Produktion der MS-/NMO-Patienten unter Rituximabtherapie (Gruppe 3) bei einer der LPS-Konzentrationen vom Median der unbehandelten neuroinflammatorischen Gruppe 4 abweicht. Analog wurde der Median der TNF  $\alpha$ -Produktion von Gruppe 1 und Gruppe 2 verglichen. Beide Gruppenvergleiche ergaben in allen LPS-Konzentrationen (0, 31, 62, 125, 250, 500 pg/ml) keine signifikante Änderung des Median der TNF  $\alpha$ -Produktion. Die Ergebnisse des Gruppenvergleichs bezüglich der TNF  $\alpha$ -Produktion mit und ohne Rituximabtherapie sind in Abbildung 21 und Abbildung 22 für jede LPS-Konzentration dargestellt.

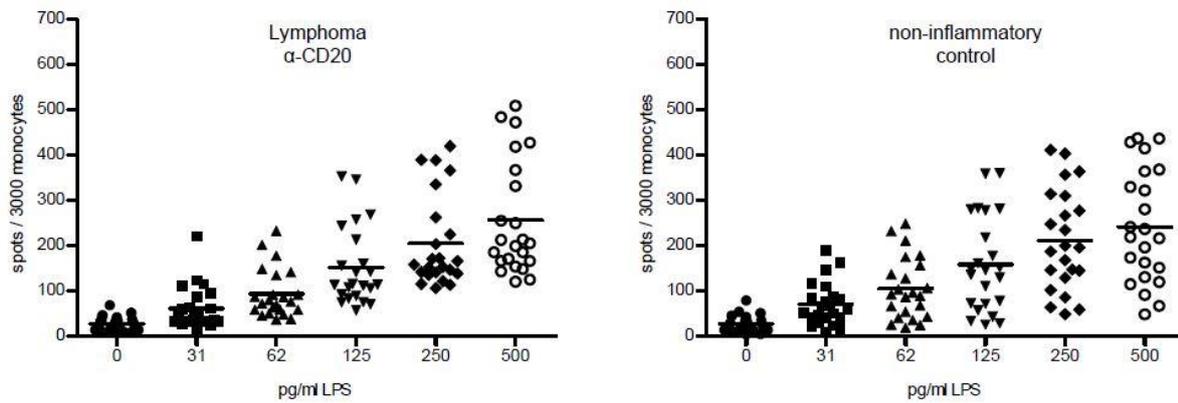


Abbildung 21: TNF  $\alpha$ -Produktion nach LPS-Stimulation der Gruppen 1 und 2

Die horizontalen Linien stellen den Median dar.

Der p-Wert des Median im Gruppenvergleich lag bei jeder LPS-Konzentration  $> 0,05$ .

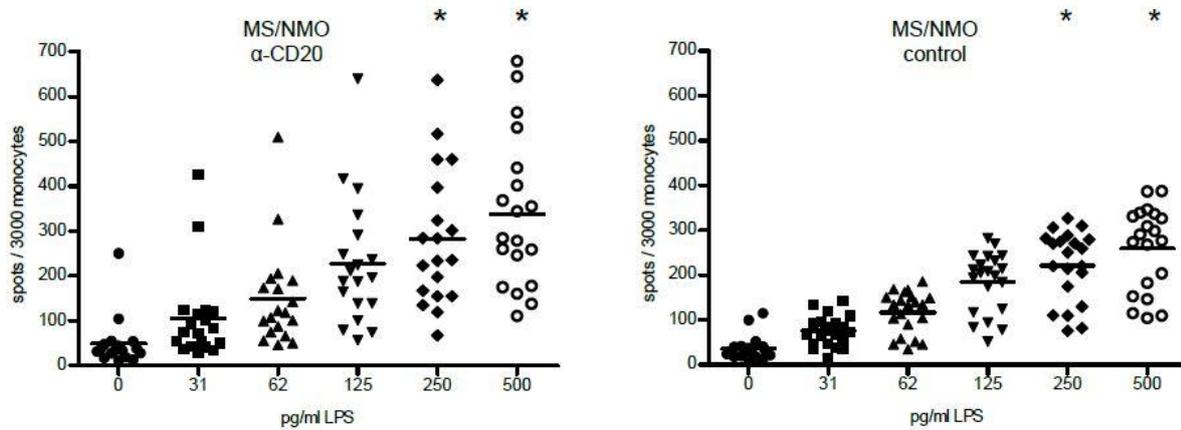


Abbildung 22: TNF  $\alpha$ -Produktion nach LPS-Stimulation der Gruppen 3 und 4

Die horizontalen Linien stellen den Median dar.

\* Variabilität der Varianz bei 250 pg/ml LPS: p-Wert 0,006;

\* Variabilität der Varianz bei 500 pg/ml LPS: p-Wert 0,014 .

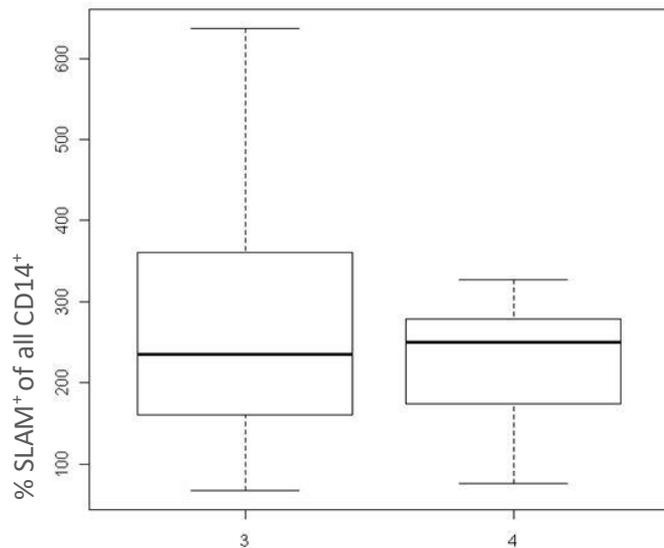
Das Ausgangsniveau der TNF  $\alpha$ -Produktion ohne Stimulation (0 pg/ml LPS) in den Gruppen unter Rituximabtherapie (Gruppe 1 und 3) war vergleichbar mit dem ihrer jeweiligen der Referenzgruppe (Gruppe 2 und 4). Monozyten von unbehandelten MS-/NMO-Patienten scheinen eine ähnliche TNF  $\alpha$ -Produktion aufzuweisen wie Probanden der neuroimmunologisch gesunden Gruppe 2. Die unterschiedlichen immunologischen Grundkonstellationen der einzelnen Gruppen scheinen das Grundniveau der Monozytenaktivität demnach nicht zu beeinflussen.

Das mittlere Niveau der TNF  $\alpha$ -Produktion von Monozyten wurde nicht von einer Rituximabtherapie beeinflusst. Es wurde weiter untersucht, ob sich eine Behandlung mit Rituximab bei einzelnen Individuen auf die monozytäre TNF  $\alpha$ -Ausschüttung auswirkt. Dies könnte eine Änderung der Varianz bewirken, ohne den Median signifikant zu verschieben. Die Varianzvariabilität der TNF  $\alpha$ -Produktion von Monozyten der hämatologischen Patienten (Gruppe 1) und der Referenzgruppe 2 wurde in jeder LPS-Konzentration verglichen. Es zeigte sich bei 0, 31, 62, 125, 250 und 500 pg/ml LPS kein signifikanter Unterschied in der Variabilität der TNF  $\alpha$ -Produktion. Eine Rituximabtherapie scheint dementsprechend auch nicht bei einzelnen Patienten mit hämatologischer B-Zellerkrankung zu einer Erhöhung der TNF  $\alpha$ -Produktion von Monozyten zu führen. Die Aktivität von Monozyten wird bei B-Zelllymphom/-Leukämie Patienten diesen Ergebnissen zufolge nicht durch Rituximab beeinflusst.

Bei Patienten mit MS/NMO unter Rituximabtherapie (Gruppe 3) konnten bei niedrigen LPS-Konzentrationen (0, 31, 62, 125 pg/ml) keine signifikante Änderungen in der Variabilität der Varianzen der monozytären TNF  $\alpha$ -Produktion im Vergleich zur unbehandelten Referenzgruppe 4 festgestellt werden. Bei 250 pg/ml LPS wurde eine hoch signifikante Variabilität der Varianzen von Gruppe 3 und 4 nachgewiesen (p-Wert: 0,006). Der Varianzenvergleich bei 250 pg/ml LPS bei MS-/NMO-Patienten mit und ohne Rituximabtherapie ist im Boxplot-Diagramm, Abbildung 23, veranschaulicht. Auch bei einer LPS-Konzentration von 500 pg/ml war der Unterschied in den Varianzen der TNF  $\alpha$ -Produktion mit einem p-Wert von 0,014 signifikant. Monozyten einzelner Probanden aus Gruppe 3 reagieren folglich bei LPS-Konzentrationen von 250 und 500 pg/ml auf eine Rituximabtherapie mit einer größeren TNF  $\alpha$ -Produktionssteigerung als die der restlichen Gruppenmitglieder. Die Behandlung mit Rituximab führt scheinbar nicht bei jedem Probanden aus Gruppe 3 ab 250 pg/ml LPS zu einer überdurchschnittlichen Erhöhung des proinflammatorischen Potentials der Monozyten. Dies erklärt, warum sich der Median bei 250 pg/ml LPS nicht signifikant ändert.

**Abbildung 23: Boxplot TNF  $\alpha$ -Produktion bei 250 pg LPS/ml im Gruppenvergleich 3 und 4**

Die horizontalen Linien stellen den Median dar.  
Variabilität der Varianzen: p-Wert 0,006



Die zweifaktorielle Varianzanalyse ergab keinen signifikanten Unterschied der Varianzen innerhalb und zwischen den Gruppen. Die proinflammatorische Monozytenaktivität scheint nicht durch Gruppenmerkmale, wie Alter oder Geschlecht beeinflusst worden zu sein.

Die Ergebnisse der Elispot-Analyse unterstützen die Erkenntnisse aus der Auswertung der SLAM-Exprimierung nach LPS-Stimulation. In beiden Versuchen wurde bei einzelnen MS-/NMO-Patienten unter Rituximabtherapie eine Steigerung der proinflammatorischen Monozytenaktivität ab 250 pg/ml LPS nachgewiesen.

In Auszügen wurden die Ergebnisse dieser Studie bereits im „Journal of Neuroinflammation 2011, 8:146“ veröffentlicht:

„Anti-CD20 B-cell depletion enhances monocyte reactivity in neuroimmunological disorders“. Autoren: Klaus Lehmann-Horn, Eva Schleich, Deetje Hertenberg, Alexander Hapfelmeier, Tania Kümpfel, Nikolas von Bubnoff, Reinhard Hohlfeld, Achim Berthele, Bernhard Hemmer und Martin S Weber.

PMID: 22027448

## 4. Diskussion

Die Annahme, Multiple Sklerose wäre eine ausschließlich durch T-Zellen vermittelte Autoimmunerkrankung, kann als veraltet angesehen werden. B-Zellen spielen nicht nur auf Grund der Antikörpersynthese, sondern auch durch ihre Fähigkeit der Antigenpräsentation eine essentielle Rolle in der Pathogenese der Multiplen Sklerose. Die Erkenntnisse neuerer wissenschaftlicher Studien legen nahe, dass B-Zellen bei MS auf beiden Seiten der Blut-Hirnschranke Entzündungen auslösen und aufrechterhalten [von Budingen, H.C. et al., 2011]. Auch bei NMO sind B-Zellen in ihrer Funktion als antigenpräsentierende Zellen (APCs) und vor allem als Induktoren der humoralen Immunabwehr an der Krankheitsgenese ursächlich beteiligt.

Ein Grundverständnis der T- & B-Zellinteraktion ist für die Ergebnisdiskussion essentiell. Im weiteren Verlauf wird daher kurz der aktuelle Forschungsstand zu grundlegenden immunphysiologischen Aspekten der T- und B-Zellaktivierung und deren Bedeutung für die immunpathologische Genese von MS und NMO beschrieben. Danach wird auf Ergebnisse der Studie und Limitationen derselben eingegangen.

### 4.1 Grundlagen der B- und T-Zellinteraktion

#### T-Zellen

T-Lymphozyten lassen sich in CD4 und CD8 positive T-Zellen einteilen. Vor Aktivierung jeder T-Zelle ist eine Verbindung zwischen T-Zellrezeptor (TCR) und MHC-Komplex einer APC nötig [Delves, P.J., 2011]. T-Zellen, deren TCR körpereigene Antigene erkennt, werden durch negative Selektion aussortiert. Beim Gesunden wird dadurch eine autoimmune Aktivierung verhindert [Yamane, H. et al., 2012].

CD8<sup>+</sup> zytotoxische T-Zellen erkennen Antigene auf MHC I Molekülen [Kroner-Milsch, A. et al., 2012]. Nach Aktivierung können sie bei infizierten Zellen durch Perforine einen programmierten Zelltod auslösen [Hersperger, A.R. et al., 2008]. Zytotoxische CD8<sup>+</sup> T-Zellen sind besonders auf die zelluläre Abwehr von intrazellulären Erregern spezialisiert, können bei einer Fehlregulation des Immunsystems aber auch autoreaktiv wirken.

Naive CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten können ausschließlich Antigene erkennen, welche auf einem MHC II Molekül einer APC dargeboten werden. Damit es zur Aktivierung gegen körperfremde Antigene und zur klonalen Expansion der naiven T-Zelle kommt, müssen sich zusätzlich costimulierende Oberflächenmarker von APCs mit denen der T-Zelle verbinden [Delves, P.J., 2011]. Mitunter die

wichtigsten costimulierenden Oberflächenmoleküle CD80 und CD86 gehören zur B7 Familie und interagieren mit CD28 und CTLA4 auf T-Zellen [Bugeon, L. et al., 2000]. Das Oberflächenmolekül B7-H1 bewirkt bei CD4<sup>+</sup> T-Zellen eine Inhibition der autologen Aktivierung. In Abwesenheit von B7-H1 überwiegen hingegen proinflammatorische Mediatoren [Schreiner, B. et al., 2004]. CD4<sup>+</sup> T-Zellen können hauptsächlich in TH1-, TH2-, TH17- und regulatorische T-Zellen unterteilt werden.

Unter Einfluss von INF  $\gamma$  und IL-12 entwickeln sich proinflammatorische TH1-Zellen, bei IL-4, IL-2 und IL-10 hingegen antiinflammatorische TH2-Zellen [Yamane, H. et al., 2012].

TGF  $\beta$  kann unterschiedliche Differenzierungen hervorrufen: Alleine oder mit IL-2 stimuliert es die Entwicklung von CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup>/Foxp3<sup>+</sup> regulatorischen T-Zellen [Korn, T. et al., 2009]. In Kombination mit IL-6 bewirkt es im Gegensatz dazu eine Ausdifferenzierung zu proinflammatorischen TH17-Zellen, die durch IL-21 zur weiteren Vermehrung angeregt werden [Yamane, H. et al., 2012].

Unter Einfluss von TGF  $\beta$  wird der Transkriptionsfaktor ROR $\gamma$ t durch Foxp3 inhibiert [Yang, X.O. et al., 2008]. Es folgt eine Ausdifferenzierung zu angeregten/induzierten CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> regulatorischen T-Zellen. IL-6 hemmt wiederum den Transkriptionsfaktor Foxp3, was zu einer Differenzierung in TH17-Zellen führt [Yang, X.O. et al., 2008]. IL-17 produzierende TH17-Zellen spielen eine Rolle bei der Abwehr spezifischer Bakterien, Viren und Pilze [Crome, S.Q. et al., 2010]. Die starke Immunreaktion durch IL17 birgt jedoch das Risiko einer autoimmunen Erkrankung [Korn, T. et al., 2009].

Folglich bestimmt sowohl die Art der costimulatorischen Verbindungen, als auch die Anwesenheit von immunmodulatorischen Botenstoffen, in welche Richtung sich die naive CD4<sup>+</sup> T-Zelle entwickelt.

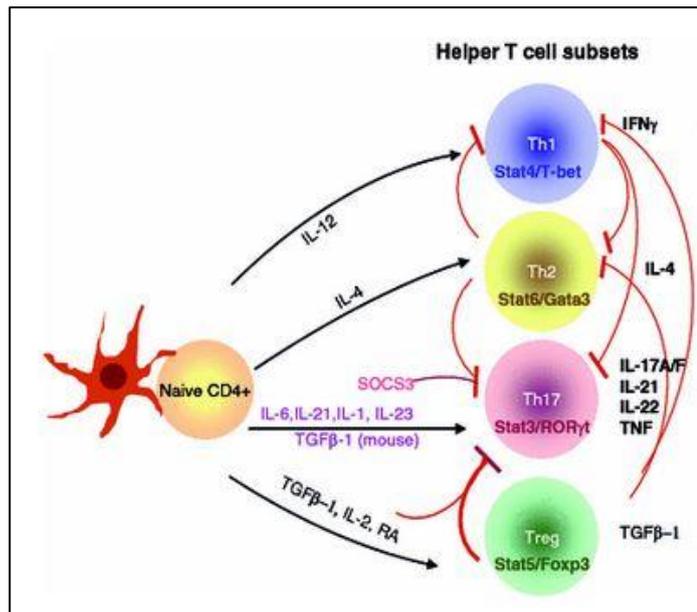
Abbildung 24 zeigt einen Überblick über die Differenzierungswege der naiven CD4<sup>+</sup> Zelle.

Sowohl die proinflammatorische TH17-Zelle, als auch die antiinflammatorische regulatorische T-Zelle (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>) wurden erst vor kurzer Zeit identifiziert. Innerhalb der T-Lymphozyten stellen diese beiden Subtypen direkte Gegenspieler dar [Korn, T. et al., 2009]. Neben den induzierten T<sub>regs</sub>, welche erst im peripheren Blut aus naiven CD4<sup>+</sup> T-Zellen entstehen, gibt es natürliche T<sub>regs</sub>, die dem Thymus entstammen. Letztere zeichnen sich im Vergleich durch eine höhere Expressierung von Neuropilin 1 aus [Weiss, J.M. et al., 2012].

**Abbildung 24: Differenzierung CD4<sup>+</sup> T-Zellen durch Zytokine**

Die Abbildung stellt das Einwirken von Zytokinen auf die weitere Ausdifferenzierung von CD4<sup>+</sup> T-Zellen in TH1-, TH2-, TH17-, oder regulatorische T-Zellen dar.

Abbildungsausschnitt aus: [Chen, Z. et al., 2008]



## B-Zellen

Unreife B-Lymphozyten exprimieren als B-Zellrezeptor (BCR) antigenspezifische IgD und IgM AK auf ihrer Zelloberfläche [Tobon, G.J. et al., 2013]. Sie differenzieren sich ohne Antigenkontakt, unter anderem je nach Stärke der BCR Signale, zu folliculären oder marginalzonen B-Zellen [Pillai, S. et al., 2009]. Letztere besitzen eine unbegrenzte Lebensdauer und können sich bei Antigenbindung an ihren BCR in der Milz schnell zu kurzlebigen AK produzierenden Plasmazellen weiterentwickeln [Tobon, G.J. et al., 2013]. Diese kurzlebigen Plasmazellen ermöglichen eine schnelle, antikörpervermittelte Immunabwehr, die Tage bis Wochen anhält [Shlomchik, M.J. et al., 2012]. Auch folliculäre B-Zellen werden über eine Antigenbindung an ihren BCR aktiviert [Pieper, K. et al., 2013]. Die aktivierten folliculären B-Zellen müssen bei ihrer Reifung im Keimzentrum von CD4<sup>+</sup> T-Zellen mittels CD40/CD40L Kontakt und durch Zytokine unterstützt werden [Tobon, G.J. et al., 2013]. Während des Reifungsprozesses von B-Zellen kommt es zu somatischen Hypermutationen und zum Immunglobulin Isotypen Switch, wodurch noch spezifischere AK gegen das Antigen entstehen. Dabei werden folliculäre B-Zellen mit selbstreaktiven oder zu unspezifischen Antikörpern eliminiert [Shlomchik, M.J. et al., 2012]. Wenn autoreaktive B-Zellen der negativen Selektion im Knochenmark entgehen und auch Kontrollmechanismen in der Peripherie versagen, kommt es zur antikörpervermittelten Autoimmunerkrankung [Wang, P. et al., 2013]. Aus den gereiften folliculären B-Zellen entwickeln sich einerseits AK produzierende langlebige Plasmazellen, andererseits langlebige B-Gedächtniszellen [Tobon, G.J. et al., 2013].

Langlebige Plasmazellen proliferieren in Klonen und können über Jahre hinweg den Serumspiegel ihrer spezifischen Antikörper aufrechterhalten [Yanaba, K. et al., 2008].

B-Gedächtniszellen proliferieren und verweilen danach in der Ruhephase [Shlomchik, M.J. et al., 2012]. Sie weisen eine hohe Affinität zum Antigen auf, sind langlebig und können sich in IgG produzierende Zellen wandeln [Heltemes-Harris, L. et al., 2004]. Dadurch kann im Falle einer zweiten oder persistierenden Infektion mit dem Antigen eine schnellere und effektivere AK-Antwort ablaufen [Shlomchik, M.J. et al., 2012].

Das antigenspezifische erworbene Immunsystem bekämpft somit Pathogene akut und hält langfristig eine Immunbarriere gegen Infektionen aufrecht [Yanaba, K. et al., 2008].

Eine weitere essentielle Funktion von reifen B-Zellen ist die Antigenpräsentation: Über BCR können sie spezifische Antigen-Epitope erkennen und den kompletten zugehörigen Proteinkomplex aufnehmen und verarbeiten. Dadurch können, neben dem erkannten Epitop, auch weitere Epitope des Proteinkomplexes über MHC II Moleküle präsentiert werden [Tobon, G.J. et al., 2013]. Auf diese Weise tragen B-Zellen direkt zur Aktivierung verschiedener CD4<sup>+</sup> T-Zellen bei. B-Zellen sind hoch effektive APCs für die Präsentation von Proteinen [Constant, S. et al., 1995]. Je nach Antigenart spielen unterschiedliche APCs eine vorrangige Rolle. Wenn T-Zellen bereits durch andere APCs (z.B. Monozyten) antigenspezifisch aktiviert wurden, können B-Zellen die Proliferation dieser T-Zellen noch verstärken [Ronchese, F. et al., 1993].

Folglich haben B-Zellen als antigenpräsentierende und als regulatorische B-Zellen antiinflammatorische Wirkung. Konträr dazu triggern sie durch Antikörper und als APCs eine proinflammatorische Immunlage.

B-Zellen interagieren nicht nur eng mit T-Zellen, sondern auch mit Zellen der angeborenen Immunantwort, wie beispielsweise Monozyten:

Aktivierte B-Zellen können beispielsweise Zytokine, wie IL-4, IL-6, IL-10, IL-21, IL-23 und TNF  $\alpha$  produzieren und nehmen damit Einfluss auf das angeborene und erworbene Immunsystem [Wang, P. et al., 2013]. Über „toll like Rezeptoren“ (TLR) auf der B-Zelloberfläche kann eine Aktivierung von B-Zellen auch unabhängig von T-Zellen stattfinden [Wang, P. et al., 2013]. Durch TLR werden Krankheitserreger direkt über deren pathogen-assoziierte molekulare Muster, beispielsweise bakterielles Lipopolysaccharid (LPS), erkannt. TLRs spielen eine Rolle in der proinflammatorischen Aktivierung von B-Zellen und vor allem TLR9 steht im Verdacht dabei autoreaktive B-Zellantworten zu unterstützen [Peng, S.L., 2005]. TLR finden sich neben B-Zellen hauptsächlich bei Monozyten und Makrophagen und gehören zum angeborenen Immunsystem [Sriram, S., 2011].

## 4.2 Rituximab und das zelluläre Immunsystem

Der Wegfall der B-Zellen unter Rituximabtherapie könnte, auf Grund der vorangehend beschriebenen engen Interaktionen im Immunsystem, Auswirkungen auf die Frequenz und Aktivität anderer Zellen der Immunabwehr haben. Cross et. al. zeigte bereits, dass eine Rituximabtherapie überraschenderweise nicht nur B-Zellen, sondern auch T-Zellen im Liquor von MS-Patienten reduziert [Cross, A.H. et al., 2006]. In dieser Arbeit wurde der Einfluss einer B-Zelldepletion bei MS- und NMO-Patienten auf die Frequenz von Leukozytensubpopulationen im peripheren Blut untersucht. Patienten mit B-Zelllymphom/-Leukämie und neuroimmunologisch gesunde Patienten wurden als Referenzgruppe herangezogen, um zudem Unterschiede im Therapieansprechen in Abhängigkeit der immunologischen Grundkonstellation festzustellen.

Bei den Patienten unter Rituximabtherapie (Gruppe 1 und 3) ließ sich eine komplette B-Zelldepletion bestätigen. Bei MS-/NMO-Patienten ohne Therapie und gesunden Probanden wiesen die Frequenzen der B-Zellen aus PBMCs vergleichbare Mittelwerte ohne signifikanten Unterschied auf (im Mittel Gruppe 2: 12,5% (SEM +/- 4,2) vs Gruppe 4: 7,9% (SEM +/- 1,1)). Es kann also davon ausgegangen werden, dass der relative B-Zellanteil im peripheren Blut bei Patienten mit MS/NMO-Erkrankung vergleichbar mit dem gesunder Probanden ist.

In der Studie konnte gezeigt werden, dass sich eine B-Zelldepletion durch Rituximab bei Patienten mit MS oder NMO nicht signifikant auf die Frequenz von CD8 positiven T-Lymphozyten im peripheren Blut auswirkt.

Die Frequenzen der CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus PBMCs der Gruppen mit MS-/NMO-Patienten und gesunden Probanden ohne Therapie wiesen zudem vergleichbare Mittelwerte ohne signifikanten Unterschied auf. Im peripheren Blut scheint es durch das Vorhandensein einer MS/NMO-Erkrankung folglich nicht zu einer Erhöhung der relativen Zellzahl von CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten zu kommen.

Interessanterweise scheinen aktive und chronische ZNS-Läsionen von MS-Patienten hingegen verhältnismäßig viele aktivierte, zytotoxische CD8<sup>+</sup> T-Zellen aufzuweisen [Johnson, T.A. et al., 2010]. Zytotoxische CD8<sup>+</sup> T-Zellen verstärken, wie auch TH1-Zellen, die inflammatorische Immunantwort durch INF  $\gamma$  Sekretion [Kroner-Milsch, A. et al., 2012]. Ihnen wird eine tragende Rolle in der Zerstörung von Myelinscheiden zugeschrieben [Buc, M., 2013].

Auch der relative Anteil aller CD4<sup>+</sup> T-Zellen im peripheren Blut von MS-/NMO-Patienten wurde nicht durch die Therapie mit Rituximab beeinflusst. Essentiell ist jedoch auch die relative Verteilung der CD4<sup>+</sup> T-Zellsubpopulationen, da diese konträre Funktionen im Immunsystem wahrnehmen:

TH1-Zellen zeichnen sich durch Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen, wie IL-2, IL-12, INF  $\gamma$  und TNF  $\alpha$ , aus. Dies führt zu einer Rekrutierung von Makrophagen und zytotoxischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen [Johnson, T.A. et al., 2010].

TH17-Zellen bewirken besonders unter IL-23-Einfluss eine starke inflammatorische Immunreaktion. Sie schütten dabei hauptsächlich IL-17 aus, welches neben einer breiten Entzündungsreaktion eine Rekrutierung neutrophiler Granulozyten induziert [Korn, T. et al., 2009]. Diese tragen zu einer weiteren Entzündung des Gewebes bei. Neutrophile Granulozyten können bei NMO in großer Zahl in den Läsionen nachgewiesen werden [Levy, M. et al., 2014].

TH2-Zellen tragen stattdessen über die Sekretion von IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13 und TGF  $\beta$  zu einer antiinflammatorischen Immunkonstellation bei [Ziemssen, T. et al., 2002]. Zusätzlich können TH2-Zellen über IL-4 B-Zellen aktivieren und somit eine humorale Immunantwort induzieren [Moschovakis, G.L. et al., 2012]. Sie sind dementsprechend ein wichtiger Faktor bei der Immunreaktion gegen extrazelluläre Pathogene.

Regulatorische T-Lymphozyten interagieren beim Gesunden mittels IL-10 mit APCs und CD4<sup>+</sup> oder CD8<sup>+</sup> T-Zellen, um eine antiinflammatorische Immunkonstellation zu unterstützen. Sie können B-Zellaktivierung und AK-Produktion unterdrücken [Crome, S.Q. et al., 2010]. Des Weiteren erkennen und inhibieren T<sub>regs</sub> autoreaktive B- und T-Zellen, welche der negativen Selektion entgangen sind [Wang, P. et al., 2013; Zhou, X. et al., 2011].

Bei MS werden naive T-Zellen bereits im peripheren Blut von APCs (z.B. Monozyten, B-Zellen) mit körperfremden, myelinähnlichen Antigenen aktiviert und emigrieren danach in das ZNS. Auch Monozyten werden aus der Peripherie angelockt und senden als aktivierte Monozyten wiederum „homing signals“ an T-Zellen [Sriram, S., 2011]. Im ZNS erfolgt eine erneute Reaktivierung der T-Zellen durch Mikroglia [Lock, C.B. et al., 2003]. Eine Alteration in der Frequenz der TH1, TH17, TH2 und T<sub>reg</sub>-Zellen im peripheren Blut könnte somit Einfluss auf die Ausprägung der MS/NMO nehmen, je nachdem welche T-Zellsubgruppe vermehrt in das ZNS emigrieren kann.

In den Plaques von MS-Patienten wurde eine überwiegend proinflammatorische Differenzierung der CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten zu TH1-Zellen nachgewiesen [Frohman, E.M. et al., 2006]. Auch die TH17-Zellzahl im ZNS ist erhöht [Segal, B.M., 2010]. TH17-Zellen spielen durch die IL17-Sekretion eine tragende Rolle. Neben den oben beschriebenen Effekten, lässt das Zytokin die Blut Hirn Schranke für Lymphozyten durchlässiger werden [Crome, S.Q. et al., 2010]. Eine gesteigerte IL-23-Frequenz scheint zu einem schweren EAE-Verlauf beizutragen [Chang, A. et al., 2002]. Eine anti-CD20 vermittelte B-Zelldepletion hatte bei Mäusen mit rMOG Protein EAE ein Absinken der proinflammatorischen TH1- und TH17-Zellen in peripheren Immunorganen und im ZNS zur Folge [Weber, M.S. et al., 2010].

In der Studie von Weber et al. 2010 zeigte sich zudem eine Abnahme der relativen Häufigkeiten von regulatorischen T-Zellen bei Mäusen unter  $\alpha$  CD20-Therapie.

Die Ergebnisse, der hier zugrundeliegenden Studie mit humanen Blutproben, deckten sich überraschenderweise nicht mit denen der vorangehend genannten Maus-EAE-Studie. Es zeigte sich stattdessen ein positiver Nebeneffekt der  $\alpha$  CD20 vermittelten B-Zelldepletion mit Rituximab:

Bei MS-/NMO-Patienten unter Therapie mit Rituximab stiegen die Frequenzen der regulatorischen T-Zellen im peripheren Blut im Vergleich zur nicht therapierten Gruppe 4 signifikant an. Auch bei hämatoonkologischen Patienten unter Rituximabtherapie lag der relative Anteil regulatorischer T-Zellen innerhalb der CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten höchst signifikant über dem der Kontrollgruppe 2.

Die Frequenzen antiinflammatorischer regulatorischer T-Zellen im peripheren Blut werden durch die Erkrankung an MS nicht beeinflusst [Feger, U. et al., 2007; Haas, J. et al., 2005]. Auch in dieser Studie scheint die relative Häufigkeit regulatorischer T-Zellen bei gesunden Probanden und Patienten mit neuroinflammatorischen Erkrankungen ohne Therapie vergleichbar zu sein.

Dies lässt schließen, dass der Wegfall der B-Lymphozyten ursächlich für einen Anstieg der relativen T<sub>reg</sub>-Frequenz bei Patienten mit MS/NMO und bei Patienten mit B-Zell-Lymphom/-Leukämie ist. Folglich könnten proinflammatorische APCs und autoaggressive T-Zellreaktionen bei Patienten unter Rituximabtherapie von einer größeren Anzahl an regulatorischen T-Lymphozyten eingedämmt werden. Die selbstregulatorischen Fähigkeiten des Immunsystems scheinen also durch einen relativen Anstieg der regulatorischen T-Zellen im peripheren Blut unterstützt zu werden. Bei Patienten mit MS und NMO könnte dies eine Abschwächung oder gar Vermeidung eines erneuten Schubes bewirken.

Einige Studien deuten jedoch darauf hin, dass regulatorische T-Zellen bei MS-Patienten in ihren immunsuppressiven Kompetenzen eingeschränkt sind und zudem schlechter in das ZNS emigrieren können [Buc, M., 2013]. Ihre Fähigkeit autoimmune T-Lymphozytenreaktionen zu unterdrücken, ist dementsprechend geschwächt [Haas, J. et al., 2005]. Andererseits wurde in verschiedenen Mausmodellen der MS unter Depletion von regulatorischen T-Zellen eine Krankheitsexazerbation beobachtet [Koutrolos, M. et al., 2014; Lowther, D.E. et al., 2013]. Dies verdeutlicht, dass T<sub>regs</sub> eine essentielle regulatorische Rolle bei MS spielen.

Zusammenfassend ergeben diese Ergebnisse, dass es unter Rituximabtherapie zu einer Verschiebung des relativen Verteilungsmusters innerhalb der T-Zellsubtypen zugunsten der regulatorischen T-Zellen kam. Da regulatorische T-Zellen sowohl autoimmune T-Zellreaktionen als auch antikörperproduzierende B-Zellen unterdrücken, kann dies ein entscheidender Faktor für die den Therapieerfolg einer Rituximabgabe sein. Ob regulatorische T-Zellen autoreaktive B-Zellen direkt

oder indirekt über T-Zellregulation beeinflussen ist bisher nicht abschließend geklärt [Wang, P. et al., 2013].

B-Zellen spielen, wie vorangehend beschrieben, sowohl als AK und Zytokin produzierende Zellen als auch als APCs und regulatorische B-Zellen eine tragende Rolle in der Pathogenese von MS und NMO. Rituximab bindet an das Oberflächenmolekül CD20. Dieses verlieren B-Zellen, welche zu antikörperproduzierenden Plasmazellen werden. Rituximab verändert die Titer von MS-spezifischen Autoantikörpern höchstwahrscheinlich nicht. Hauser et al. wies beispielsweise in einer Studie mit RR-MS-Patienten nach, dass sich die AK-Level bei MS-Patienten durch eine Rituximabtherapie nicht signifikant ändern [Hauser, S.L. et al., 2008]. Rituximab führt zudem innerhalb von vier Wochen nach der ersten Gabe zu einer Reduktion der entzündlichen Herde im ZNS [Bar-Or, A. et al., 2008; Hauser, S.L. et al., 2008]. Der Wegfall der Zytokin produzierenden B-Zellen kann hierfür mit verantwortlich sein. Vor allem aber die Elimination der proinflammatorischen APC-Funktion der B-Zellen kann als hauptsächlicher Wirkmechanismus der Rituximabtherapie angesehen werden [Weber, M.S. et al., 2010]. Als Nebeneffekt lässt sich eine Depletion der regulatorischen B-Zellen nicht vermeiden.

Regulatorische B-Zellen haben die Fähigkeit, andere APCs zu regulieren und bei aktivierten T-Zellen eine Apoptose einzuleiten. Über direkten Kontakt und mit antiinflammatorischen Zytokinen, wie IL-10 und TGF  $\beta$ , werden inflammatorische und auch autoreaktive Immunzellen unterdrückt [Buc, M., 2013]. IL-10 produzierende regulatorische B-Zellen können EAE bessern. Dies verdeutlicht, dass regulatorische B-Zellen essentiell für die Kontrolle von autoimmunen Krankheiten sind [Fillatreau, S. et al., 2002]. Regulatorische B-Zellen kommen im peripheren Blut von gesunden Menschen in gleichem Ausmaß wie bei Patienten mit Multipler Sklerose vor [Iwata, Y. et al., 2011].

Rituximab eliminiert sowohl pro-, als auch antiinflammatorische CD20<sup>+</sup> B-Zellen. Daher stellt sich die Frage, inwieweit der Wegfall regulatorischer B-Zellen und der APC-Funktionen Einfluss auf die Ausprägung der MS oder NMO nimmt.

Bei Patienten mit Colitis Ulcerosa verschlechterte Rituximab beispielsweise die Symptomatik. Neben einer B-Zelldepletion konnte ein Rückgang der IL-10-Konzentrationen im Darm festgestellt werden. Durch die Rituximabtherapie schienen auch IL-10 produzierende regulatorische B-Zellen eliminiert zu werden, die einen protektiven Effekt bei Colitis Ulcerosa ausüben [Goetz, M. et al., 2007].

Die hier zugrundeliegende Studie zeigt einen abweichenden Effekt bei der Therapie von MS-/NMO-Patienten mit Rituximab. Der anti-CD20 bedingte Wegfall der schützenden regulatorischen B-Zell-Funktion scheint im Immunsystem einem kompensatorischen Frequenzanstieg der regulatorischen T-Zellen zu bedingen.

Denkbar ist, dass auch bei einzelnen MS-/NMO-Patienten die proinflammatorische Aktivität des Immunsystems durch eine ausgeprägte Funktion der regulatorischen B-Zellen eingedämmt wird. Fraglich ist, ob der oben beschriebene kompensatorische Anstieg der ebenfalls IL-10 produzierenden regulatorischen T-Zellen den Verlust der regulatorischen B-Zellen kompensiert. Falls dies nicht der Fall ist, könnte eine CD20 vermittelte B-Zelldepletion bei diesen Patienten ein steigendes Risiko für das Auftreten von Nebenwirkungen der Rituximabtherapie bedeuten. Die Erkenntnisse dieser Studie stammen aus Proben aus dem peripheren Blut von MS-/NMO-Patienten. Wenn sich die Immunkonstellation im ZNS unter Rituximabtherapie ebenso ändert, könnte der Wegfall der regulatorischen B-Zellen bei einzelnen Patienten der Grund für eine Verschlechterung des Krankheitsverlaufs unter Therapie sein. Um die antiinflammatorischen Fähigkeiten der regulatorischen B-Zellen zu erhalten, wäre daher die Entwicklung eines gezielteren Therapiekonzeptes ausschließlich gegen proinflammatorische APC-Funktionen wünschenswert.

Bei MS scheint die proinflammatorische Aktivierung von CD4<sup>+</sup> T-Zellen durch antigenpräsentierende B-Zellen und Makrophagen eine wichtige Rolle zu spielen. Im Liquor von MS-Patienten wurden zudem proliferierende B-Zellen nachgewiesen, welche nach somatischer Hypermutation hochspezifische Antikörper gegen Antigene innerhalb des ZNS herstellen [Frohman, E.M. et al., 2006]. Auch die Stimulation dieser Antikörper exprimierenden B-Zellen scheint komplett im ZNS abzulaufen [Bankoti, J. et al., 2013]. Es wird kontrovers diskutiert, ob ektope Lymphfollikel in den Meningen von MS-Patienten mit der B-Zellreaktion im ZNS zusammenhängen [Buc, M., 2013]. Die intrathekalen oligoklonalen IgG-Antikörper führen durch Opsonierung und Aktivierung des Komplementsystems zu einer Zerstörung der Myelinscheiden [Buc, M., 2013]. Auch bei NMO ist nicht sicher geklärt, wie die AQP4 AK die Blut-Hirnschranke überwinden können oder ob sie erst im ZNS entstehen. In letzterem Fall könnten Mikroglia und B-Zellen als APCs fungieren und auf ihren MHC Molekülen AQP4-Anteile präsentieren, welche T-Zellen aktivieren. Aktivierte T-Zellen initiieren wiederum antigenspezifische B-Zellen, welche sich zu Gedächtniszellen und AQP4-AK produzierenden Plasmazellen differenzieren [Levy, M. et al., 2014].

Dies zeigt, dass antigenpräsentierende B-Zellen gerade zu Beginn der MS-/NMO-Erkrankung eine tragende Rolle spielen, indem sie T-Zellen aktivieren und die Bildung von autoreaktiven langlebigen Plasma-Zellen initiieren. Eine Rituximabtherapie zu Beginn der neuroimmunologischen Erkrankung wäre daher nach Wang P. et al. zu favorisieren [Wang, P. et al., 2013]. Im Liquor von Patienten mit RR-MS wurde unter Rituximabtherapie eine Reduktion der B- und T-Zellzahl gefunden [Cross, A.H. et al., 2006; Piccio, L. et al., 2010]. B-Zellen scheinen also auch im späteren Krankheitsverlauf weiterhin die Zahl von T-Zellen im ZNS zu beeinflussen.

Im EAE-Mausmodell konnte gezeigt werden, dass Mäuse mit B-Zellen ohne MHC II Funktion resistent gegen eine mit humanem rekombinanten MOG Peptid ausgelöste EAE waren. Dies verdeutlicht, dass

B-Zellen unabhängig von ihrer Antikörperproduktion bei MS eine Schlüsselfunktion einnehmen [Molnarfi, N. et al., 2013].

Auch Monozyten scheinen als proinflammatorische APCs eine wesentliche Rolle in der Pathogenese von MS und NMO einzunehmen. Monozyten, Makrophagen und Dendritische Zellen gehören zu den phagozytierenden Zellen und stammen aus einer gemeinsamen „Progenitor Zelle“ ab [Hettinger, J. et al., 2013]. Fetale Monozyten und andere phagozytierende Zellen u.a. Mikroglia wandern bereits in der Embryogenese in das Gewebe aus [Ginhoux, F. et al., 2010; Rawji, K.S. et al., 2013]. Adulte Monozyten entstehen hingegen im Knochenmark aus hämatopoetischen Stammzellen und zirkulieren im peripheren Blut [Shemer, A. et al., 2015]. Im Falle einer entzündlichen Gewebereaktion oder Verletzung können diese adulten Monozyten schnell aus dem peripheren Blut rekrutiert werden. Nach der Extravasation können sie monozytäre Makrophagen oder dendritische Zellen bilden. Diese unterstützen die ansässigen Gewebs-Makrophagen und fördern ein proinflammatorisches Milieu [Mildner, A. et al., 2013]. Im EAE-Mausmodell wurden durch Mishra et al. nach Immunisierung proinflammatorisch geprägte Monozyten im peripheren Blut nachgewiesen. Im späteren Krankheitsverlauf sank die Zahl im peripheren Blut wieder ab. Die Zahl der proinflammatorischen Monozyten korrelierte im peripheren Blut invers und im Hirnstamm positiv mit den klinischen Symptomen [Mishra, M.K. et al., 2012]. Dies verdeutlicht die wichtige Rolle der Monozyten bei der Ausprägung von MS.

In dieser Studie wurden die relativen Häufigkeiten von Monozyten von MS-Patienten ohne und mit Rituximabtherapie verglichen. Durch die B-Zelldepletion wurde der relative Anteil von Monozyten innerhalb der Leukozyten bei MS-Patienten nicht signifikant verändert. Auch bei hämatoonkologischen Patienten unter Rituximabtherapie gibt es in der Monozytenfrequenz keinen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe. Rituximab scheint dementsprechend keinen Einfluss auf die Frequenz von Monozyten auszuüben.

Von Interesse ist, ob Monozyten bei Patienten mit neuroinflammatorischen Erkrankungen in ihrer relativen Häufigkeit auf Grund der immunologischen Grundkonstellation schon verändert sind. Die relative Häufigkeit der Monozyten innerhalb der PBMCs scheint in Gruppe 2 höher als in Gruppe 4 zu liegen. Es ist dementsprechend denkbar, dass die immunologische Grundkonstellation bei MS/NMO die Monozytenfrequenz erniedrigt. Zur weiterführenden Analyse dieser These, ist ein Vergleich von Monozytenfrequenzen bei MS-/NMO-Patienten vor und nach Krankheitsausbruch von Nöten.

Monozyten von MS-Patienten scheinen im Vergleich zu Monozyten von gesunden Probanden nach Stimulation mit LPS vermehrt Interleukine zu produzieren [Chuluundorj, D. et al., 2014]. Ob eine Rituximabtherapie zusätzlich Einfluss auf die Aktivierbarkeit von Monozyten nimmt, wurde in dieser Studie untersucht. Dazu wurde die Expressierung des Aktivitätsmarkers SLAM (CD150) nach Stimulation mit verschiedenen LPS-Konzentrationen (0, 31, 62, 125, 250, 500 pg/ml) gemessen. Hierbei zeigte sich bei allen Probanden der Gruppen 1-4 ein Anstieg der CD150-Expressierung in Abhängigkeit der LPS-Konzentration. Das grundlegende Aktivitätsniveau, gemessen durch die SLAM-Expressierung ohne LPS-Stimulation, war bei den Monozyten der MS-/NMO-Patienten und denen der neuroimmunologisch gesunden Gruppen 1 und 2 vergleichbar.

Der prozentuale Anstieg der SLAM-Expressierung auf Monozyten von hämatoonkologischen Patienten war bei allen LPS-Konzentrationen mit dem der Kontrollgruppe 2 vergleichbar. Auch bei MS-/NMO-Patienten mit und ohne Rituximabtherapie zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen dem prozentualen Anstieg der CD150-Expressierung auf Monozyten bei Stimulation mit LPS-Konzentrationen von 0-250 pg/ml. Allerdings zeigten Monozyten von MS-/NMO-Patienten unter Rituximabtherapie im Vergleich zur MS-/NMO-Gruppe ohne Therapie einen signifikanten Anstieg der Aktivität, im Sinne einer vermehrten LPS-Expressierung bei einer Stimulation mit 500 LPS pg/ml. In der Varianzanalyse konnte zudem gezeigt werden, dass Monozyten von einzelnen MS-/NMO-Patienten mit Rituximabtherapie bereits ab einer LPS-Konzentration von 250 pg/ml vermehrt das SLAM-Oberflächenmolekül aufweisen.

Dementsprechend scheint Rituximab bei Patienten mit MS/NMO das Aktivitätsniveau von Monozyten zu beeinflussen. In dieser Studie konnte bei den niedrigeren LPS-Konzentrationen kein Unterschied in der Monozytenaktivität nachgewiesen werden. Die Ergebnisse legen dennoch nahe, dass das Aktivitätslevel von Monozyten bei MS-/NMO-Patienten durch eine Rituximabtherapie steigt.

Diese gesteigerte Aktivierung von Monozyten unter Rituximabtherapie wurde in der zugrundeliegenden Studie zudem mittels Messung der TNF  $\alpha$ -Ausschüttung nachgewiesen. Hierzu wurde die TNF  $\alpha$ -Produktion unter Simulation mit den gleichen LPS-Konzentrationen (0, 31, 62, 125, 250, 500 pg/ml) gemessen.

Die Ausgangswerte von TNF  $\alpha$  ohne Stimulation mit LPS waren zwischen den Gruppen vergleichbar. Auch hier konnte in allen Gruppen ein Anstieg der TNF  $\alpha$ -Ausschüttung mit steigender LPS-Konzentration beobachtet werden. Zwischen Gruppe 1 und 2 sowie zwischen Gruppe 3 und 4 war das mittlere Niveau der TNF  $\alpha$ -Produktion zudem in jeder LPS-Konzentration vergleichbar. Das heißt unter LPS-Stimulation zeigte sich im Gruppenvergleich kein signifikanter Unterschied in der TNF  $\alpha$ -Produktion der Monozyten. Demnach scheint eine Rituximabtherapie das mittlere Niveau der TNF  $\alpha$ -Produktion von Monozyten bei MS-/NMO-Patienten nicht zu beeinflussen, obwohl ab einer LPS-

Konzentration von 500 pg/ml ein Anstieg des Aktivitätsmarkers SLAM nachgewiesen wurde. In der Varianzanalyse zeigt sich bei LPS-Konzentrationen von 250 und 500 pg/ml jedoch ein signifikanter Unterschied zwischen der Verteilung der TNF  $\alpha$ -Werte von Monozyten der MS-/NMO-Patienten in Abhängigkeit einer Rituximabtherapie. In der Gruppe der MS-/NMO-Patienten unter Rituximabtherapie wurden bei einzelnen Proben ab einer LPS-Konzentration von 250 pg/ml deutlich erhöhte TNF  $\alpha$ -Werte gemessen. Interessanterweise sind die Monozyten, welche unter Rituximabtherapie eine erhöhte TNF  $\alpha$ -Produktion aufweisen und die, welche eine übermäßige SLAM-Exprimierung bei 250 pg/ml LPS aufzeigen, teilweise von verschiedenen MS-/NMO-Patienten.

Dies lässt schließen, dass Rituximab bei einzelnen MS-/NMO-Patienten Einfluss auf das monozytäre Aktivitätsniveau und auf die proinflammatorische Aktivität der Monozyten nimmt. Von welchem Faktor diese beiden Beobachtungen abhängen, ist in diesem Versuchsaufbau nicht abschließend zu klären.

Bei einzelnen MS-/NMO-Patienten muss bei einer Therapie mit Rituximab, den Ergebnissen dieser Studie entsprechend, mit einer Zunahme der proinflammatorisch geprägten Monozyten im peripheren Blut gerechnet werden. Unter normalen Bedingungen emigrieren Monozyten nicht in das ZNS. Gerade bei Autoimmunerkrankungen wie MS oder NMO können sie jedoch vermehrt im ZNS nachgewiesen werden [Shechter, R. et al., 2013]. Unklar bleibt, ob eine erhöhte Anzahl an potentiell proinflammatorischen Monozyten im peripheren Blut Auswirkungen auf die folgend beschriebenen Vorgänge in MS-Plaques hat.

Im EAE-Maus-Modell der MS geht einer Monozyteninfiltration und Demyelinisation eine Phase mit aktivierten Mikroglia voran [Marik, C. et al., 2007].

Sowohl Mikroglia als auch Monozyten können über TLR, unter INF  $\gamma$ - oder TNF  $\alpha$ -Einfluss zu proinflammatorischen (M1) Zellen werden [Gordon, S., 2003; Mosser, D.M. et al., 2008]. Unter IL-4-Einfluss entstehen antiinflammatorische (M2) Zellen [Gordon, S., 2003]. Letztere exprimieren CD206, bilden das Enzym Arginase 1 und zeichnen sich unter anderem durch die Sekretion des antiinflammatorischen IL-10 aus. Sie können Axonwachstum unterstützen [Kigerl, K.A. et al., 2009]. Zudem binden sie über CD206 apoptotische und nekrotische Zellen und ermöglichen so eine Entfernung sterbender Zellen ohne inflammatorischen Umgebungsschaden [Nauta, A.J. et al., 2003]. M1-Makrophagen führen hingegen über Sekretion von proinflammatorischem IL-1 $\beta$  und TNF  $\alpha$  oder oxidativen Metaboliten, wie z.B. iNOS, zu einer toxischen, entzündlichen Immunreaktion [Kigerl, K.A. et al., 2009].

Unter physiologischen Bedingungen herrscht bei Mikroglia oder Makrophagen im ZNS der M2-Phänotyp vor [Ponomarev, E.D. et al., 2007]. In Läsionen bei MS-/NMO-Patienten wurden dagegen vor allem proinflammatorische M1-Phänotypen nachgewiesen [Kigerl, K.A. et al., 2009]. Der

Phänotyp der Makrophagen wird durch Faktoren des umgebenden Milieus, wie z.B. Zytokine und Chemokine beeinflusst und kann dadurch auch geändert werden [Liu, H. et al., 2015; Stout, R.D. et al., 2005]. Im proinflammatorischen Milieu der ZNS-Läsionen bei MS-/NMO-Patienten sinkt daher die Zahl der M2-Phänotypen in Abhängigkeit der Zeit [Kigerl, K.A. et al., 2009].

Rituximab begünstigt scheinbar bei einzelnen MS-/NMO-Patienten durch die gesteigerte TNF  $\alpha$ -Ausschüttung von Monozyten ein proinflammatorisches Milieu im peripheren Blut. Denkbar wäre bei diesen Patienten eine vermehrte Emigration von proinflammatorisch geprägten Monozyten zu den ZNS-Läsionen. Dies könnte ein schnelleres Absinken des M1/M2-Phänotyp-Verhältnisses und so ein schnelleres Fortschreiten der Symptomatik zur Folge haben. Eine Identifikation der Faktoren, welche zu einer gesteigerten proinflammatorischen Aktivität der Monozyten unter Rituximabtherapie führen, ist daher essentiell.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass zytotoxische CD8<sup>+</sup> T-Zellen zur Zerstörung der Myelinscheiden bei MS führen. Zudem nehmen TH1- und TH17-Zellen eine essentielle Rolle bei den entzündlichen Immunreaktionen im ZNS ein. Auch B-Zellen sind durch ihre APC-Funktion, Zytokin- und Antikörperproduktion umfassend an der Ausprägung von MS beteiligt. Durch eine periphere B-Zelldepletion wird bei MS ein schneller Rückgang der aktiven Herde im ZNS hervorgerufen. Dies zeigt, dass B-Zellen aus dem peripheren Blut durch ihre sekretorischen und Antigen präsentierenden Funktionen im ZNS ein entzündliches demyelinisierendes Milieu unterstützen können [von Budingen, H.C. et al., 2011].

Diese proinflammatorischen B-Zellwirkungen könnten sowohl bei MS als auch bei NMO durch regulatorische B- und T-Zellfunktionen eingedämmt oder sogar unterdrückt werden. In dieser Studie konnte bei MS-/NMO-Patienten unter Rituximabtherapie ein Anstieg der regulatorischen T-Zellen nachgewiesen werden. Zudem zeigte sich eine erhöhte Aktivierbarkeit von Monozyten bei einzelnen Patienten mit MS/NMO durch eine Rituximabtherapie.

Die Aktivität von Monozyten wird bei B-Zelllymphom/-Leukämie Patienten den Ergebnissen dieser Studie zufolge durch Rituximab nicht beeinflusst. Zudem konnte auch bei hämatoonkologischen Patienten ein höchst signifikant erhöhter relativer Anteil der regulatorischen T-Zellen unter Rituximabtherapie nachgewiesen werden. Diverse hämatoonkologische Studien legen jedoch nahe, dass bei Patienten mit Non Hodgkin Lymphom und bei akuten Leukämien per se ein erhöhter Anteil regulatorischer T-Zellen nachweisbar ist [D'Arena, G. et al., 2011; Fozza, C. et al., 2015; Idris, S.Z. et al., 2015]. Es wird vermutet, dass der Anteil regulatorischer T-Zellen zudem mit dem Fortschreiten der chronischen Leukämie korreliert [D'Arena, G. et al., 2011]. Andererseits wurde bei NHL-Patienten ein positiver Zusammenhang zwischen dem relativen T<sub>reg</sub>-Anteil und dem Auftreten einer kompletten Remission sowie dem Überleben festgestellt [Dehghani, M. et al., 2012].

### 4.3 Einblicke in die MS-Therapie

Rituximab wird auf Grund der spezifischen Wirkweise und guten Verträglichkeit mit großem Erfolg in der Therapie von B-Zelllymphomen und chronischer B-Lymphozytenleukämie (BCLL) eingesetzt [Hagemester, F., 2010]. Das CHOP-Schema (Cyclophosphamid, Doxorubicin, Vincristin und Prednisolon) weist eine bessere 2-Jahres-Prognose und Gesamtüberlebensrate auf, wenn es mit Rituximab kombiniert wird [Plosker, G.L. et al., 2003]. Die Therapie mit Rituximab wird bei hämatoonkologischen Patienten als sehr gut verträglich und sicher angesehen [Plosker, G.L. et al., 2003].

Bei B-Lymphom/-Leukämie Probanden unter Rituximabtherapie konnten im Vergleich zur gesunden Referenzgruppe jedoch veränderte T-Zellsubtyp Frequenzen zugunsten der proinflammatorischen CD8<sup>+</sup> Zellen nachgewiesen werden. Dies spiegelte sich im leicht verringerten CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> Quotient wider. Der in dieser Studie beobachtete Therapieeffekt könnte auf eine proinflammatorische Reaktion dieser Patienten auf die Rituximabtherapie zurückzuführen sein. In anderen Studien wurde jedoch unabhängig von einer B-Zellsuppression, ein CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>-Verhältnis < 1 bei Patienten mit B-NHL festgestellt [Dehghani, M. et al., 2012; Ismail, F. et al., 2012; Liu, L. et al., 2006; Shi, Y.X. et al., 2004]. Die Frequenzveränderung der CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> Zellen in Gruppe 1 scheint daher wahrscheinlicher durch die immunologische Grundkonstellation als durch die Rituximabtherapie hervorgerufen zu werden.

Im klinischen Alltag ist Rituximab nicht nur zur Reduktion von malignen B-Zellen zugelassen, sondern auch zur Behandlung therapieresistenter rheumatoider Arthritis [Mok, C.C., 2013]. Bislang liegt für Rituximab keine klinische Zulassung für einen Einsatz bei weiteren Autoimmunerkrankungen vor (Stand: Juni 2014)[EMA, 2014]. In Studien konnte mit Rituximab bei vielen autoimmun vermittelten Erkrankungen ein sehr gutes Therapieergebnis erzielt werden [Braun-Moscovici, Y. et al., 2013; Gottenberg, J.E. et al., 2013; Ono, K. et al., 2013; Pullerits, R. et al., 2012]. Wenn andere Therapiemöglichkeiten versagen, wird es daher bei diversen Autoimmunerkrankungen in der klinischen Praxis mit großem Erfolg eingesetzt [Tony, H.P. et al., 2011]. Rituximab konnte bei RRMS- und SPMS-Patienten die Zahl aktiver Läsionen und die Schubrate senken [Hauser, S.L. et al., 2008; Rommer, P.S. et al., 2011]. Eine Rituximabtherapie hat bei RRMS neben der Verringerung der Schubrate auch eine Verringerung der radiologisch nachweisbaren cerebralen Herde zufolge [Castillo-Trivino, T. et al., 2013; Hauser, S.L. et al., 2008]. Bei PPMS-Patienten unter 50 Jahren scheint Rituximab den Krankheitszustand zu stabilisieren [Hawker, K. et al., 2009]. Auch Ocrelizumab erzielte in einer Phase II Studie sehr gute Ergebnisse [Kappos, L. et al., 2011]. Rituximab scheint demnach bei MS-Patienten eine effektive Therapiemöglichkeit darzustellen [Rommer, P. et al., 2013]. Auch bei

NMO wird Rituximab mit Erfolg als Rescuetherapie eingesetzt. Zudem scheint es als Erstlinientherapie hoch effizient die Rückfallrate zu senken [Zephir, H. et al., 2015].

Die Therapie mit CD20 AK ist im Allgemeinen gut verträglich. Es kommt nur selten zu schweren opportunistischen Infektionen oder allergischen Reaktionen [Tony, H.P. et al., 2011]. Es sollte jedoch nicht außer Acht gelassen werden, dass eine Rituximabbehandlung bei rheumatoider Arthritis das Risiko einer progressiven multifokalen Leukenzephalopathie erhöht [Palazzo, E. et al., 2012]. Rituximab scheint zudem in Einzelfällen auch den Krankheitsverlauf anderer Autoimmunerkrankungen zu verschlechtern [Goetz, M. et al., 2007; Mauermann, M.L. et al., 2007; Olivieri, I. et al., 2010; Stork, A.C. et al., 2013]. Bei Patienten mit blasenbildenden autoimmunen Hauterkrankungen traten in Einzelfällen unter Rituximabtherapie starke Nebenwirkungen auf Grund der B-Zelldepletion auf. Eine engmaschige Überwachung von Patienten mit autoimmunen Krankheiten ist bei einer Rituximabtherapie daher neben einer Elimination von Infektionsquellen empfehlenswert [Shetty, S. et al., 2013].

Rituximab kann mittlerweile als sichere Behandlungsalternative bei MS-/NMO-Patienten angesehen werden, wenn andere Therapieregimen versagen. Trotz allem fehlen verlässliche Studien zum Outcome von MS-/NMO-Patienten bei Langzeittherapien mit Rituximab. Die Studien zu Rituximab wurden zudem meist mit Proben von Patienten durchgeführt, welche zuvor bereits andere etablierte immunmodulatorische oder -suppressive Therapien erhalten hatten. Eine Beeinflussung der Ergebnisse durch vorangehende immunmodulatorische „firstline“ Therapien ist demnach nicht immer auszuschließen.

Zu den „firstline“ Therapien bei RRMS mit mildem Verlauf gehören nach aktuellem Expertenconsens IFN  $\beta$ , Dimethylfumarat, Glatirameracetat und Teriflunomid. Es wird empfohlen, Natalizumab, Alemtuzumab, Fingolimod oder als zweite Wahl Mitoxantron bei aktiven Verlaufsformen einzusetzen. Bei SPMS wird INF  $\beta$  oder Mitoxantron eingesetzt [Kolber, P. et al., 2015]. All diese Therapien greifen an unterschiedlichen Stellen in das Immunsystem ein. Gemeinsam ist jedoch meist eine Beeinflussung sowohl von Lymphozyten als auch von Makrophagen bzw. Monozyten [Rawji, K.S. et al., 2013].

Glatirameracetat bewirkt beispielsweise zum einen eine vorherrschende Differenzierung der T-Zellen zum antiinflammatorischen TH2- Subtyp, zum anderen senkt es die TNF  $\alpha$ -Produktion von Monozyten [Weber, M.S. et al., 2004].

Auch INF  $\beta$  greift in die proinflammatorische T-Zellantwort ein [Rawji, K.S. et al., 2013]. Es unterdrückt die Proliferation zu TH1-Zellen, verringert die Antigenpräsentation und hat zudem einen modulatorischen Effekt auf costimulatorische Moleküle dendritischer Zellen: Bei peripheren

Makrophagen hemmt INF  $\beta$  die Proliferation. Außerdem unterdrückt es eine Hochregulierung der MHC II Expression auf peripheren Makrophagen und Mikroglia. Dadurch wird eine autoaggressive Prägung und ein Aufrechterhalten der Entzündungsreaktion durch CD4<sup>+</sup> T-Zellen verringert [Hall, G.L. et al., 1997]. INF  $\beta$  stimuliert die Expression des costimulatorischen Oberflächenmarkers B7-H1 auf Monozyten und dendritischen Zellen und reguliert so die autoimmune T-Zellreaktion herunter [Schreiner, B. et al., 2004]. Es scheint zudem durch eine Veränderung im IL-6 Signalübertragungsweg die Immunregulation von autoaggressiven T-Zellen zu stärken und sie empfänglicher für eine Regulation durch T<sub>regs</sub> zu machen [Trinschek, B. et al., 2015]. Durch eine gesteigerte Ausschüttung des antiinflammatorischen Zytokins IL-10 trägt INF  $\beta$  zusätzlich zu einer antiinflammatorischen Immunlage bei [Minagar, A., 2013].

Neben den gerade genannten etablierten Substanzen gibt es weitere therapeutische Ansätze:

Vitamin D könnte protektiv wirken, da es die Produktion von IL-4 und TGF  $\beta$  reguliert und somit scheinbar eine proinflammatorische T-Zell- und Makrophagenaktivität unterdrückt [Deluca, H.F. et al., 2001]. Wenn diese Ergebnisse bestätigt werden, könnte eine supplementäre Vitamin D Einnahme als MS-Prävention eingesetzt werden [Ascherio, A., 2013].

Studien mit EAE-Mäusen zeigen, dass der Krankheitsverlauf durch Statine abgeschwächt werden kann [Greenwood, J. et al., 2003; Stanislaus, R. et al., 2002; Weber, M.S. et al., 2006]. Ursächlich hierfür scheint bei Atorvastatingabe eine reduzierte TH1-Zellproliferation sowie eine Verringerung der MHC II Oberflächenmoleküle auf Antigen präsentierenden Zellen zu sein [Youssef, S. et al., 2002]. Der klinische Erfolg der Atorvastatingabe scheint dabei unabhängig von einer TH2-Zellproliferation und regulatorischen T-Zellen zu sein. Der antiproliferative Effekt auf proinflammatorische T-Zellen ist demnach der im Vordergrund stehende Wirkmechanismus von Atorvastatin bei EAE [Weber, M.S. et al., 2014]. Auch in klinischen Studien konnte eine Wirksamkeit von Atorvastatin bei MS bestätigt werden: Bei Patienten mit RRMS sinkt die Schubrate bei einer kombinierten Therapie aus Atorvastatin und INF  $\beta$  im Vergleich zu einer alleinigen INF  $\beta$ -Therapie [Lanzillo, R. et al., 2010; Togha, M. et al., 2010].

Ein anderer interessanter Therapieansatz ist die intrathekale Applikation von CD20 AK. Gerade bei MS-Patienten mit SPMS wird vermutet, dass ein Aufrechterhalten der Entzündungsreaktion von ektopen B-Zellfollikel ähnlichen lymphatischen Geweben in den Meningen unterstützt wird [Magliozzi, R. et al., 2007]. Bei einer systemischen anti-CD20-Therapie wird jedoch nur 0,1 % der Wirkstoffmenge im Liquor gefunden [Rubenstein, J.L. et al., 2003]. Es stellt sich daher die Frage, ob eine systemische Therapie mit Rituximab oder den Nachfolgern Ocrelizumab bzw. Ofatumumab ausreichend auf B-Zellen im ZNS wirkt. Eine intrathekale anti-CD20-Therapie könnte eine verbesserte

Darreichungsform mit weniger systemischen Nebenwirkungen darstellen. Fest steht bisher, dass eine intrathekale Darreichung in den klinischen Studien gut toleriert wurde [Weber, M.S., 2015]. Allerdings scheinen sich die anti-CD20-AK schnell in das periphere Blut auszubreiten. Es waren zudem nur geringe intrathekale Rituximab-Dosen nötig, um eine komplette periphere B-Zelldepletion zu erreichen [Svenningsson, A. et al., 2015]. Bei Mäusen mit EAE konnte eine intrathekale anti-CD20-Applikation meningeale B-Zellen aus ZNS-Läsionen eliminieren. Bei SPMS-Patienten könnte eine zusätzliche intrathekale anti-CD20-Gabe demnach sinnvoll sein [Lehmann-Horn, K. et al., 2014]. Die bisherigen Studien zu intrathekaler anti-CD20-Anwendung zeigen, dass durch eine intrathekale Verabreichung keine systemischen Nebenwirkungen umgangen werden können. Zudem sind für eine systemische B-Zelldepletion wahrscheinlich geringere anti-CD20-Dosen ausreichend als bisher üblich [Weber, M.S., 2015]. Weitere Studien müssen zeigen, ob eine zusätzliche oder alleinige intrathekale anti-CD20-Gabe die Klinik von MS-Patienten dauerhaft verbessert.

#### 4.4 Limitationen der Studie

Bei der hier zugrundeliegenden Studie wurden Patienten unter anderen immunmodulatorischen/-suppressiven Therapien ausgeschlossen. Auch vorangehende Therapien lagen mindestens 3-6 Monate zurück. Um jedwede Beeinflussung des Immunsystems durch vorangehende Therapien auszuschließen, wäre jedoch ein Studiendesign mit MS-/NMO-Patienten, welche noch keiner anderen Therapie unterzogen wurden, von Nöten. Solch ein Studienansatz ist auf Grund des Vorhandenseins von etablierten, zugelassenen Erstlinientherapien jedoch gegenwärtig nicht durchführbar.

Bei MS-/NMO-Patienten kam es zu keinen Alterationen der CD8<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup> T-Zellfrequenzen durch eine Rituximab-Therapie. Innerhalb der CD4<sup>+</sup> T-Zellen stieg jedoch der T<sub>reg</sub>-Anteil unter Einfluss von Rituximab. Interessant wäre daher, zu Lasten welches CD4<sup>+</sup> T-Zell-Subtyps der relative T<sub>reg</sub>-Anteil steigt. Dies ist nur durch weiterführende Analysen der CD4<sup>+</sup> T-Zellen zu überprüfen.

Ob der relative Anstieg der regulatorischen T-Zellen im peripheren Blut auch mit deren Verbesserung der physiologischen Funktion einhergeht, kann mit diesem Studienansatz nicht beurteilt werden. Die immunregulatorische Kompetenz regulatorischer T-Zellen von MS-/NMO-Patienten und Möglichkeiten diese zu beeinflussen sind dementsprechend wichtige Aspekte zukünftiger Forschungsarbeiten.

Die Monozytenaktivität wurde mittels SLAM-Expriemierung nach Stimulation mit LPS nachgewiesen. Die Aktivierung von Immunzellen über TLR durch LPS ist der klassische Weg bei bakteriellen Infektionen. Bei LPS als Stimulus wird bei Monozyten eine TNF  $\alpha$ -Produktion initiiert, um Pathogene

zu zerstören. Bei dieser Studie konnte eine gesteigerte Aktivierung der Monozyten unter Rituximabtherapie nachgewiesen werden. Aufgrund der gesteigerten TNF  $\alpha$ -Produktion nach LPS-Stimulation wird von einer proinflammatorischen Vorprägung ausgegangen. Es wäre jedoch auch möglich, dass Monozyten unter Rituximabeinfluss auch unter Stimulation mit antiinflammatorischen Zytokinen eine erhöhte Aktivierbarkeit aufzeigen. Es bedarf daher weiterer laborchemischer Untersuchungen um zu differenzieren, ob die vermehrte Aktivierbarkeit der Monozyten pro- oder antiinflammatorischer Natur ist.

In dieser Studie wird auf Grund des Studiendesigns eine Momentaufnahme gezeigt. Es ist daher unklar, ob der Aktivitätsanstieg der Monozyten auch zu klinischen Nebenwirkungen oder einer Krankheitsprogression beiträgt. Gerade bei den einzelnen Patienten mit gesteigerter Monozytenaktivierung wäre ein longitudinaler Studienansatz interessant. Mit diesem könnten genauere Vergleiche zwischen Klinik, individuellen Faktoren der Probanden und Veränderungen im Immunsystem unter Rituximabtherapie gezogen werden.

Die meisten Erkenntnisse über Modulationen des Immunsystems bei MS oder NMO wurden durch Studien am Tiermodell gewonnen. Ob die postulierten Zellinteraktionen auch in vivo beim Menschen dementsprechend ablaufen, bleibt teilweise ungewiss. In dieser Studie wurden daher humane Blutproben verwendet. Dies ermöglichte einen Einblick in die Verteilung der Leukozytensubpopulationen bei MS und NMO und in deren Veränderungen durch eine B-Zelldepletion. Auf Grund der Barrierefunktion der Blut-Hirnschranke können Erkenntnisse über Immunzellen im peripheren Blut jedoch nicht eins zu eins auf Vorgänge im ZNS von MS-/NMO Patienten übertragen werden.

Umso wichtiger ist es, weitere wissenschaftliche Erkenntnisse über die Pathogenese von neuroimmunologischen Krankheiten wie MS oder NMO zu erlangen. Der aktuelle Stand der Forschung impliziert beispielsweise zu Beginn der MS-Erkrankung eine periphere Immunantwort, welche sich gegen das ZNS richtet. Die spätere progressive Phase scheint hingegen durch Immunreaktionen im ZNS geprägt zu sein [Hemmer, B. et al., 2015]. Diese unterschiedlichen immunopathologischen Vorgänge bewirken wahrscheinlich ein unterschiedliches Ansprechen auf neuroimmunologische Therapien in Abhängigkeit des Krankheitsstadiums. Diese verschiedenen immunopathologischen Konstellationen erschweren die Erforschung und Entwicklung von neuen Therapiekonzepten. Eine genaue Kenntnis der immunopathologischen und -regulatorischen Vorgänge ist daher essentiell, um neue nebenwirkungsärmere und effektivere Therapien bei MS und auch NMO zu entwickeln.

## 5. Zusammenfassung

Hintergrund: MS und NMO zählen zu den autoimmun vermittelten chronisch neuroinflammatorischen Erkrankungen. Durch demyelinisierte Herde kommt es zu einem breiten Spektrum an Symptomen. Neben T-Zellen scheinen B-Zellen, als Antikörper produzierende Zellen und als APCs, eine essentielle Rolle in der Pathogenese der MS und NMO zu spielen. Der CD20 positive B-Zellen depletierende Antikörper Rituximab wurde zum Zeitpunkt der Studie als „off-label-use“ Therapie bei MS- und NMO-Patienten eingesetzt. Ziel dieser Arbeit war es, die Auswirkungen einer Rituximabtherapie bei Patienten mit neuroinflammatorischen Erkrankungen (MS/NMO) auf das zelluläre Immunsystem, insbesondere auf regulatorische T-Zellen und Monozyten, darzustellen.

Methoden: Es wurden PBMC aus vier Gruppen analysiert (MS-/NMO-Patienten mit und ohne Rituximabtherapie, hämatonkologische Patienten mit Rituximabtherapie und immunologisch gesunde Patienten ohne Therapie). Mittels FACS-Analyse wurden die Leukozytensubpopulationen anhand ihrer Oberflächenmoleküle CD4, 8, 14, 19, 25 und 127 quantifiziert. Die Aktivität der CD14<sup>+</sup> Monozyten wurde nach Stimulation mit verschiedenen LPS Konzentrationen analysiert. Hierzu erfolgte der Nachweis einer CD150 (SLAM)-Expriemierung in der FACS-Analyse und die Darstellung der TNF  $\alpha$ -Produktion nach MACS-Separation im Elispot.

Ergebnisse: In dieser Studie konnte bei MS-/NMO-Patienten und bei Patienten mit hämatonkologischen B-Zellerkrankungen ein signifikanter, respektive höchst signifikanter Anstieg der regulatorischen T-Zellen durch Rituximab nachgewiesen werden. Bei MS-/NMO-Patienten unter Rituximabtherapie zeigten Monozyten bei einer LPS-Konzentration von 500 pg/ml eine signifikant erhöhte CD150-Expriemierung. Zudem zeigten Monozyten einzelner Patienten mit MS oder NMO unter Rituximabtherapie eine signifikant erhöhte TNF  $\alpha$ -Produktion ab 250 LPS pg/ml.

Schlussfolgerung: Fest steht, dass der Antigenpräsentation mittels MHC II Molekülen in neuroimmunologischen Krankheiten wie MS und NMO eine tragende Rolle zukommt. Proinflammatorische B-Zellwirkungen könnten zudem sowohl bei MS als auch bei NMO, durch regulatorische B- und T-Zellfunktionen eingedämmt oder sogar unterdrückt werden. Rituximab erhöht den Ergebnissen dieser Studie zufolge die relative Anzahl regulatorischer T-Zellen. Dies könnte die selbstregulatorischen Fähigkeiten des Immunsystems unterstützen. Diese Tatsache und auch inwieweit der Wegfall der regulatorischen B-Zellen unter Rituximabtherapie ein potentielles Risiko für das Auftreten von Nebenwirkungen darstellt, muss in weiteren Studien evaluiert werden. Ob der Aktivitätsanstieg der Monozyten bei einzelnen MS-/NMO-Patienten unter Rituximabtherapie zu verstärkten Nebenwirkungen oder einer Krankheitsprogression beiträgt, bleibt ungeklärt. Ein longitudinaler Studienansatz könnte in diesem Zusammenhang weitere Erkenntnisse erbringen.

## 6. Summary

Background: MS and NMO are autoimmune diseases with a chronic inflammation of the central nervous system. Areas with demyelination cause a broad variety of symptoms. T-cells and B-cells play a major role in the pathogenesis of MS and NMO. B-cells are involved as antibody producing cells and as antibody presenting cells. The antibody Rituximab depletes CD20 positive B-cells. At the time this study was conducted, Rituximab was used off-label for MS and NMO therapy. The aim of this study was to show the influence of Rituximab on the cellular immune system of patients with neuroinflammatory diseases, such as MS or NMO. Special attention was paid to regulatory T-cells and monocytes.

Method: PBMCs from four groups were analyzed (with Rituximab therapy: MS/NMO patients and hemato-oncological patients; without Rituximab therapy: MS/NMO patients and patients lacking neuro-inflammatory diseases). Quantification of leukocyte subgroups was attained by FACS analysis of their surface molecules CD4, 8, 14, 19, 25 and 127. Activity of CD14<sup>+</sup> monocytes was measured after stimulation with varying concentrations of LPS. For that purpose, CD150 (SLAM) expression was analyzed with FACS. In addition, TNF  $\alpha$  production was shown through elispot after MACS separation.

Results: Rituximab causes a significant, respectively highly significant rise of regulatory T-cells in patients with MS/NMO and hemato-oncological B-cell diseases. Monocytes of MS/NMO patients undergoing Rituximab therapy showed a significantly higher CD150 expression at 500pg LPS/ml. In addition, monocytes from individual MS/NMO patients with Rituximab produced significantly more TNF  $\alpha$  from 250 pg/ml LPS on.

Conclusion: There is no doubt that antigen presentation through MHC II molecules plays a key role in neuro-immunological diseases like MS or NMO. In MS an NMO proinflammatory B-cell activity could be curbed or even suppressed by regulatory B- or T-cell actions. According to this study Rituximab is raising the relative amount of regulatory T-cells. This could support self-regulating abilities in the immune system and needs to be further evaluated. However, the loss of the regulatory B-cells during Rituximab therapy could cause a potential risk of side-effects. Additional studies are necessary to evaluate this potential risk. It is still uncertain, if the increase in activity of monocytes from individual MS/NMO patients with Rituximab therapy results in stronger side effects or a progression of the disease. In this matter, a further longitudinal study approach could bring more detailed results.

**Literaturverzeichnis**

- Amadori, A., Zamarchi, R., De Silvestro, G., Forza, G., Cavatton, G., Danieli, G.A., Clementi, M., Chiecobianchi, L. Genetic control of the CD4/CD8 T-cell ratio in humans. *Nat Med.* 1 (1995) S.1279-1283
- Amiry-Moghaddam, M., Ottersen, O.P. The molecular basis of water transport in the brain. *Nat Rev Neurosci.* 4 (2003) S.991-1001
- Andersson, M., Alvarez-Cermenio, J., Bernardi, G., Cogato, I., Fredman, P., Frederiksen, J., Fredrikson, S., Gallo, P., Grimaldi, L.M., Gronning, M., et al. Cerebrospinal fluid in the diagnosis of multiple sclerosis: a consensus report. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 57 (1994) S.897-902
- Anonymous - <http://www.fluorophores.tugraz.at>) Stand: 20.09.2012 14:25 Uhr
- Ascherio, A. Environmental factors in multiple sclerosis. *Expert Rev Neurother.* 13 (2013) S.3-9
- Asgari, N. Epidemiological, clinical and immunological aspects of neuromyelitis optica (NMO). *Dan Med J.* 60 (2013) S.B4730
- Asgari, N., Nielsen, C., Stenager, E., Kyvik, K.O., Lillevang, S.T. HLA, PTPN22 and PD-1 associations as markers of autoimmunity in neuromyelitis optica. *Mult Scler.* 18 (2012) S.23-30
- Asgari, N., Owens, T., Frokiaer, J., Stenager, E., Lillevang, S.T., Kyvik, K.O. Neuromyelitis optica (NMO)-an autoimmune disease of the central nervous system (CNS). *Acta Neurol Scand.* 123 (2011) S.369-384
- Bagert, B.A. Epstein-Barr virus in multiple sclerosis. *Curr Neurol Neurosci Rep.* 9 (2009) S.405-410
- Bakken, A.M. Cryopreserving human peripheral blood progenitor cells. *Curr Stem Cell Res Ther.* 1 (2006) S.47-54
- Bankoti, J., Apelstin, L., Hauser, S.L., Allen, S., Albertolle, M.E., Witkowska, H.E., von Budingen, H.C. In multiple sclerosis oligoclonal bands connect to peripheral B cell responses. *Ann Neurol.* (2013) S.
- Bar-Or, A., Calabresi, P.A., Arnold, D., Markowitz, C., Shafer, S., Kasper, L.H., Waubant, E., Gazda, S., Fox, R.J., Panzara, M., Sarkar, N., Agarwal, S., Smith, C.H. Rituximab in relapsing-remitting multiple sclerosis: a 72-week, open-label, phase I trial. *Ann Neurol.* 63 (2008) S.395-400
- Berg, F.v.d. "Angewandte Physiologie," Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 3. Auflage S.26
- Berkovich, R. Treatment of acute relapses in multiple sclerosis. *Neurotherapeutics.* 10 (2013) S.97-105
- Bove, R., Chitnis, T. Sexual disparities in the incidence and course of MS. *Clin Immunol.* 149 (2013) S.201-210
- Braun-Moscovici, Y., Butbul-Aviel, Y., Guralnik, L., Toledano, K., Markovits, D., Rozin, A., Nahir, M.A., Balbir-Gurman, A. Rituximab: rescue therapy in life-threatening complications or refractory autoimmune diseases: a single center experience. *Rheumatol Int.* 33 (2013) S.1495-1504
- Buc, M. Role of regulatory T cells in pathogenesis and biological therapy of multiple sclerosis. *Mediators Inflamm.* 2013 (2013) S.963748
- Bugeon, L., Dallman, M.J. Costimulation of T cells. *Am J Respir Crit Care Med.* 162 (2000) S.S164-168
- Castillo-Trivino, T., Braithwaite, D., Bacchetti, P., Waubant, E. Rituximab in relapsing and progressive forms of multiple sclerosis: a systematic review. *PLoS One.* 8 (2013) S.e66308
- Chang, A., Tourtellotte, W.W., Rudick, R., Trapp, B.D. Premyelinating oligodendrocytes in chronic lesions of multiple sclerosis. *N Engl J Med.* 346 (2002) S.165-173
- Chen, L., Gordon, L.K. Ocular manifestations of multiple sclerosis. *Curr Opin Ophthalmol.* 16 (2005) S.315-320
- Chen, Z., O'Shea, J.J. Th17 cells: a new fate for differentiating helper T cells. *Immunol Res.* 41 (2008) S.87-102
- Chuluundorj, D., Harding, S.A., Abernethy, D., La Flamme, A.C. Expansion and preferential activation of the CD14(+)CD16(+) monocyte subset during multiple sclerosis. *Immunol Cell Biol.* 92 (2014) S.509-517

- Collongues, N., Marignier, R., Jacob, A., Leite, M., Siva, A., Paul, F., Zephir, H., Akman-Demir, G., Elson, L., Jarius, S., Papeix, C., Mutch, K., Saip, S., Wildemann, B., Kitley, J., Karabudak, R., Aktas, O., Kuscu, D., Altintas, A., Palace, J., Confavreux, C., De Seze, J. Characterization of neuromyelitis optica and neuromyelitis optica spectrum disorder patients with a late onset. *Mult Scler.* (2013) S.
- Confavreux, C., Vukusic, S. Natural history of multiple sclerosis: a unifying concept. *Brain.* 129 (2006) S.606-616
- Constant, S., Schweitzer, N., West, J., Ranney, P., Bottomly, K. B lymphocytes can be competent antigen-presenting cells for priming CD4+ T cells to protein antigens in vivo. *J Immunol.* 155 (1995) S.3734-3741
- Constantinescu, C.S., Farooqi, N., O'Brien, K., Gran, B. Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) as a model for multiple sclerosis (MS). *Br J Pharmacol.* 164 (2011) S.1079-1106
- Cook, K.F., Bamer, A.M., Roddey, T.S., Kraft, G.H., Kim, J., Amtmann, D. Multiple Sclerosis and Fatigue: Understanding the Patient's Needs. *Phys Med Rehabil Clin N Am.* 24 (2013) S.653-661
- Cramer, S.P., Simonsen, H., Frederiksen, J.L., Rostrup, E., Larsson, H.B. Abnormal blood-brain barrier permeability in normal appearing white matter in multiple sclerosis investigated by MRI. *Neuroimage Clin.* 4 (2013) S.182-189
- Crome, S.Q., Wang, A.Y., Levings, M.K. Translational mini-review series on Th17 cells: function and regulation of human T helper 17 cells in health and disease. *Clin Exp Immunol.* 159 (2010) S.109-119
- Cross, A.H., Stark, J.L., Lauber, J., Ramsbottom, M.J., Lyons, J.A. Rituximab reduces B cells and T cells in cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients. *J Neuroimmunol.* 180 (2006) S.63-70
- D'Arena, G., Laurenti, L., Minervini, M.M., Deaglio, S., Bonello, L., De Martino, L., De Padua, L., Savino, L., Tarnani, M., De Feo, V., Cascavilla, N. Regulatory T-cell number is increased in chronic lymphocytic leukemia patients and correlates with progressive disease. *Leuk Res.* 35 (2011) S.363-368
- Dehghani, M., Sharifpour, S., Amirghofran, Z., Zare, H.R. Prognostic significance of T cell subsets in peripheral blood of B cell non-Hodgkin's lymphoma patients. *Med Oncol.* 29 (2012) S.2364-2371
- Deluca, H.F., Cantorna, M.T. Vitamin D: its role and uses in immunology. *FASEB J.* 15 (2001) S.2579-2585
- Delves, P.J. Part 1: Fundamentals of Immunology. In: "Roitt's Essential Immunology", Roitt, I.M., Delves, P.J., Blackwell publishing Ltd, 2011, Vol, 12th edition, S.3-312
- Devic, C. Myelite subaigue compliquee de neurite optique. *Bull Med.* 35 (1894) S.18-30
- Disanto, G., Morahan, J.M., Barnett, M.H., Giovannoni, G., Ramagopalan, S.V. The evidence for a role of B cells in multiple sclerosis. *Neurology.* 78 (2012) S.823-832
- Duddy, M., Bar-Or, A. B-cells in multiple sclerosis. *Int MS J.* 13 (2006) S.84-90
- Duller, D.C. "Zweistichprobenprobleme für unabhängige Stichproben", Physica-Verlag HD, Heidelberg, 2008
- EMA, MabThera -  
([http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/000165/human\\_med\\_000897.jsp&mid=WC0b01ac058001d124](http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/000165/human_med_000897.jsp&mid=WC0b01ac058001d124)) Stand: 16.01.2014 13:45 Uhr
- Farina, C., Theil, D., Semlinger, B., Hohlfeld, R., Meinl, E. Distinct responses of monocytes to Toll-like receptor ligands and inflammatory cytokines. *Int Immunol.* 16 (2004) S.799-809
- Feger, U., Luther, C., Poeschel, S., Melms, A., Tolosa, E., Wiendl, H. Increased frequency of CD4+ CD25+ regulatory T cells in the cerebrospinal fluid but not in the blood of multiple sclerosis patients. *Clin Exp Immunol.* 147 (2007) S.412-418
- Fillatreau, S., Sweenie, C.H., McGeachy, M.J., Gray, D., Anderton, S.M. B cells regulate autoimmunity by provision of IL-10. *Nat Immunol.* 3 (2002) S.944-950

- Fletcher, S.G., Castro-Borrero, W., Remington, G., Treadaway, K., Lemack, G.E., Frohman, E.M. Sexual dysfunction in patients with multiple sclerosis: a multidisciplinary approach to evaluation and management. *Nat Clin Pract Urol.* 6 (2009) S.96-107
- Fozza, C., Corda, G., Viridis, P., Contini, S., Barraqueddu, F., Galleu, A., Isoni, A., Cossu, A., Dore, F., Careddu, M.G., Bonfigli, S., Giannico, B., Longinotti, M. Derangement of the T-cell repertoire in patients with B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *Eur J Haematol.* 94 (2015) S.298-309
- Franciotta, D., Salvetti, M., Lolli, F., Serafini, B., Aloisi, F. B cells and multiple sclerosis. *Lancet Neurol.* 7 (2008) S.852-858
- Francis, C.E. Visual issues in multiple sclerosis. *Phys Med Rehabil Clin N Am.* 24 (2013) S.687-702
- Frohman, E.M., Racke, M.K., Raine, C.S. Multiple sclerosis--the plaque and its pathogenesis. *N Engl J Med.* 354 (2006) S.942-955
- Fuss, I.J., Kanof, M.E., Smith, P.D., Zola, H. Isolation of whole mononuclear cells from peripheral blood and cord blood. *Curr Protoc Immunol.* Chapter 7 (2009) S.Unit7 1
- Ginhoux, F., Greter, M., Leboeuf, M., Nandi, S., See, P., Gokhan, S., Mehler, M.F., Conway, S.J., Ng, L.G., Stanley, E.R., Samokhvalov, I.M., Merad, M. Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. *Science.* 330 (2010) S.841-845
- Goetz, M., Atreya, R., Ghalibafian, M., Galle, P.R., Neurath, M.F. Exacerbation of ulcerative colitis after rituximab salvage therapy. *Inflamm Bowel Dis.* 13 (2007) S.1365-1368
- Gordon, S. Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol.* 3 (2003) S.23-35
- Gottenberg, J.E., Cinquetti, G., Larroche, C., Combe, B., Hachulla, E., Meyer, O., Pertuiset, E., Kaplanski, G., Chiche, L., Berthelot, J.M., Gombert, B., Goupille, P., Marcelli, C., Feuillet, S., Leone, J., Sibilia, J., Zarnitsky, C., Carli, P., Rist, S., Gaudin, P., Salliot, C., Piperno, M., Deplas, A., Breban, M., Lequerre, T., Richette, P., Ghiringhelli, C., Hamidou, M., Ravaud, P., Mariette, X. Efficacy of rituximab in systemic manifestations of primary Sjogren's syndrome: results in 78 patients of the AutoImmune and Rituximab registry. *Ann Rheum Dis.* 72 (2013) S.1026-1031
- Graber, D.J., Levy, M., Kerr, D., Wade, W.F. Neuromyelitis optica pathogenesis and aquaporin 4. *J Neuroinflammation.* 5 (2008) S.22
- Greenwood, J., Walters, C.E., Pryce, G., Kanuga, N., Beraud, E., Baker, D., Adamson, P. Lovastatin inhibits brain endothelial cell Rho-mediated lymphocyte migration and attenuates experimental autoimmune encephalomyelitis. *FASEB J.* 17 (2003) S.905-907
- Gross, A., Schoendube, J., Zimmermann, S., Steeb, M., Zengerle, R., Koltay, P. Technologies for Single-Cell Isolation. *Int J Mol Sci.* 16 (2015) S.16897-16919
- Haas, J., Hug, A., Viehover, A., Fritzsching, B., Falk, C.S., Filser, A., Vetter, T., Milkova, L., Korporeal, M., Fritz, B., Storch-Hagenlocher, B., Krammer, P.H., Suri-Payer, E., Wildemann, B. 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.* 35 (2005) S.3343-3352
- Hagemester, F. Rituximab for the treatment of non-Hodgkin's lymphoma and chronic lymphocytic leukaemia. *Drugs.* 70 (2010) S.261-272
- Hall, G.L., Wing, M.G., Compston, D.A., Scolding, N.J. beta-Interferon regulates the immunomodulatory activity of neonatal rodent microglia. *J Neuroimmunol.* 72 (1997) S.11-19
- Hauser, S.L., Waubant, E., Arnold, D.L., Vollmer, T., Antel, J., Fox, R.J., Bar-Or, A., Panzara, M., Sarkar, N., Agarwal, S., Langer-Gould, A., Smith, C.H. B-cell depletion with rituximab in relapsing-remitting multiple sclerosis. *N Engl J Med.* 358 (2008) S.676-688
- Hawker, K., O'Connor, P., Freedman, M.S., Calabresi, P.A., Antel, J., Simon, J., Hauser, S., Waubant, E., Vollmer, T., Panitch, H., Zhang, J., Chin, P., Smith, C.H. Rituximab in patients with primary progressive multiple sclerosis: results of a randomized double-blind placebo-controlled multicenter trial. *Ann Neurol.* 66 (2009) S.460-471
- He, D., Guo, R., Zhang, F., Zhang, C., Dong, S., Zhou, H. Rituximab for relapsing-remitting multiple sclerosis. *Cochrane Database Syst Rev.* 12 (2013) S.CD009130

- Heine, H., Uschkureit, T. Software-gesteuerte Beschleunigungs- und Bremsrampe zur optimierten Isolierung von mononukleären Zellen - Applications Cetrifuge 5702,12/03 S. (<http://www.google.de/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&ved=0CDQQFjAA&url=http%3A%2F%2Fwww.eppendorf.com%2Fscript%2Fcms-newspic.php%3Fid%3D5603%26inline%3D1%26col%3DDOWNLOADFILE&ei=LBmrUvzxl4aHtaBezYGoBg&usg=AFQjCNHwry7agYv98oIY6yqnr6D6go0-6A&sig2=6L41TKjGAm99yTb4bX2huw&bvm=bv.57967247,d.Yms>) Stand: 13.12.13 15:30
- Hellings, N., Raus, J., Stinissen, P. Insights into the immunopathogenesis of multiple sclerosis. *Immunol Res.* 25 (2002) S.27-51
- Heltemes-Harris, L., Liu, X., Manser, T. Progressive surface B cell antigen receptor down-regulation accompanies efficient development of antinuclear antigen B cells to mature, follicular phenotype. *J Immunol.* 172 (2004) S.823-833
- Hemmer, B., Kerschensteiner, M., Korn, T. Role of the innate and adaptive immune responses in the course of multiple sclerosis. *Lancet Neurol.* 14 (2015) S.406-419
- Hernandez-Pedro, N.Y., Espinosa-Ramirez, G., de la Cruz, V.P., Pineda, B., Sotelo, J. Initial immunopathogenesis of multiple sclerosis: innate immune response. *Clin Dev Immunol.* 2013 (2013) S.413465
- Hersperger, A.R., Makedonas, G., Betts, M.R. Flow cytometric detection of perforin upregulation in human CD8 T cells. *Cytometry A.* 73 (2008) S.1050-1057
- Hettinger, J., Richards, D.M., Hansson, J., Barra, M.M., Joschko, A.C., Krijgsveld, J., Feuerer, M. Origin of monocytes and macrophages in a committed progenitor. *Nat Immunol.* 14 (2013) S.821-830
- Hinson, S.R., Roemer, S.F., Lucchinetti, C.F., Fryer, J.P., Kryzer, T.J., Chamberlain, J.L., Howe, C.L., Pittock, S.J., Lennon, V.A. Aquaporin-4-binding autoantibodies in patients with neuromyelitis optica impair glutamate transport by down-regulating EAAT2. *J Exp Med.* 205 (2008) S.2473-2481
- Idris, S.Z., Hassan, N., Lee, L.J., Md Noor, S., Osman, R., Abdul-Jalil, M., Nordin, A.J., Abdullah, M. Increased regulatory T cells in acute lymphoblastic leukemia patients. *Hematology.* (2015) S.
- Irvine, K.A., Blakemore, W.F. Remyelination protects axons from demyelination-associated axon degeneration. *Brain.* 131 (2008) S.1464-1477
- Ismail, F., Mahmoud, A., Abdelhaleem, H., Mamdoh, A., Geneidy, M., Kamal, E. Primary Sjogren's syndrome and B-non-Hodgkin lymphoma: role of CD4+ T lymphocytopenia. *Rheumatol Int.* (2012) S.
- Iwata, Y., Matsushita, T., Horikawa, M., Dilillo, D.J., Yanaba, K., Venturi, G.M., Szabolcs, P.M., Bernstein, S.H., Magro, C.M., Williams, A.D., Hall, R.P., St Clair, E.W., Tedder, T.F. Characterization of a rare IL-10-competent B-cell subset in humans that parallels mouse regulatory B10 cells. *Blood.* 117 (2011) S.530-541
- Jan C. Behrends, M.H., E. Wischmeyer "Duale Reihe Physiologie, Kap.6 Blut", Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 2010S. 175, Tab. 6.4
- Johnson, T.A., Jirik, F.R., Fournier, S. Exploring the roles of CD8(+) T lymphocytes in the pathogenesis of autoimmune demyelination. *Semin Immunopathol.* 32 (2010) S.197-209
- Jongen, P.J., Ter Horst, A.T., Brands, A.M. Cognitive impairment in multiple sclerosis. *Minerva Med.* 103 (2012) S.73-96
- Kantarci, O.H., Weinshenker, B.G. Natural history of multiple sclerosis. *Neurol Clin.* 23 (2005) S.17-38, v
- Kappos, L., Li, D., Calabresi, P.A., O'Connor, P., Bar-Or, A., Barkhof, F., Yin, M., Leppert, D., Glanzman, R., Tinbergen, J., Hauser, S.L. Ocrelizumab in relapsing-remitting multiple sclerosis: a phase 2, randomised, placebo-controlled, multicentre trial. *Lancet.* 378 (2011) S.1779-1787
- Keegan, B.M., Noseworthy, J.H. Multiple sclerosis. *Annu Rev Med.* 53 (2002) S.285-302
- Kigerl, K.A., Gensel, J.C., Ankeny, D.P., Alexander, J.K., Donnelly, D.J., Popovich, P.G. Identification of two distinct macrophage subsets with divergent effects causing either neurotoxicity or regeneration in the injured mouse spinal cord. *J Neurosci.* 29 (2009) S.13435-13444

- Kim, S.M., Park, J., Kim, S.H., Park, S.Y., Kim, J.Y., Sung, J.J., Park, K.S., Lee, K.W. Factors associated with the time to next attack in neuromyelitis optica: accelerated failure time models with random effects. *PLoS One*. 8 (2013) S.e82325
- Kim, W., Kim, S.H., Kim, H.J. New insights into neuromyelitis optica. *J Clin Neurol*. 7 (2011) S.115-127
- Kinoshita, M., Nakatsuji, Y., Moriya, M., Okuno, T., Kumanogoh, A., Nakano, M., Takahashi, T., Fujihara, K., Tanaka, K., Sakoda, S. Astrocytic necrosis is induced by anti-aquaporin-4 antibody-positive serum. *Neuroreport*. 20 (2009) S.508-512
- Kira, J. Multiple sclerosis in the Japanese population. *Lancet Neurol*. 2 (2003) S.117-127
- Kleinschnitz, C., Meuth, S.G., Kieseier, B.C., Wiendl, H. [Update on pathophysiologic and immunotherapeutic approaches for the treatment of multiple sclerosis]. *Nervenarzt*. 78 (2007) S.883-911
- Kolber, P., Luessi, F., Meuth, S.G., Klotz, L., Korn, T., Trebst, C., Tackenberg, B., Kieseier, B., Kumpfel, T., Fleischer, V., Tumani, H., Wildemann, B., Lang, M., Flachenecker, P., Meier, U., Bruck, W., Limmroth, V., Haghikia, A., Hartung, H.P., Stangel, M., Hohlfeld, R., Hemmer, B., Gold, R., Wiendl, H., Zipp, F. [Current aspects of therapy conversion for multiple sclerosis]. *Nervenarzt*. (2015) S.
- Korn, T., Bettelli, E., Oukka, M., Kuchroo, V.K. IL-17 and Th17 Cells. *Annu Rev Immunol*. 27 (2009) S.485-517
- Koutouros, M., Berer, K., Kawakami, N., Wekerle, H., Krishnamoorthy, G. Treg cells mediate recovery from EAE by controlling effector T cell proliferation and motility in the CNS. *Acta Neuropathol Commun*. 2 (2014) S.163
- Kroner-Milsch, A., Kleinschnitz, C., Stadelmann-Nessler, C., Raab, P., Stangel, M., Trebst, C., Voß, E., Cordes, A.-L. Multiple Sklerose und andere autoimmune ZNS-Erkrankungen. In: "Autoimmunerkrankungen in der Neurologie", Prof. Prof. Dr. med. Martin Stangel, Mäurer, P.D.M., Springer Berlin Heidelberg, 2012, Vol
- Krumbholz, M., Derfuss, T., Hohlfeld, R., Meinl, E. B cells and antibodies in multiple sclerosis pathogenesis and therapy. *Nat Rev Neurol*. 8 (2012) S.613-623
- Kurtzke, J.F. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). *Neurology*. 33 (1983) S.1444-1452
- Lana-Peixoto, M.A. Devic's neuromyelitis optica: a critical review. *Arq Neuropsiquiatr*. 66 (2008) S.120-138
- Landtblom, A.M., Fazio, P., Fredrikson, S., Granieri, E. The first case history of multiple sclerosis: Augustus d'Este (1794-1848). *Neurol Sci*. 31 (2010) S.29-33
- Lanzillo, R., Orefice, G., Quarantelli, M., Rinaldi, C., Prinster, A., Ventrella, G., Spitaleri, D., Lus, G., Vacca, G., Carotenuto, B., Salvatore, E., Brunetti, A., Tedeschi, G., Brescia Morra, V. Atorvastatin combined to interferon to verify the efficacy (ACTIVE) in relapsing-remitting active multiple sclerosis patients: a longitudinal controlled trial of combination therapy. *Mult Scler*. 16 (2010) S.450-454
- Lassmann, H., Wekerle, H. The pathology of multiple sclerosis. In: "McAlpine's Multiple Sclerosis", Alistair Compston, M., Noseworthy, Lassmann, Miller, Smith, Wekerle, Confavreux Churchill Livingstone, 2005, Vol 4th Edition, S.557-582
- Lehmann-Horn, K., Kinzel, S., Feldmann, L., Radelfahr, F., Hemmer, B., Traffehn, S., Bernard, C.C., Stadelmann, C., Bruck, W., Weber, M.S. Intrathecal anti-CD20 efficiently depletes meningeal B cells in CNS autoimmunity. *Ann Clin Transl Neurol*. 1 (2014) S.490-496
- Lehmann, P.V. "Image Analysis and Data Management of Elispot, In: Handbook of Elispot - Methods and Protocols", Humana Press Inc, Totowa, 2005117
- Lennon, V.A., Kryzer, T.J., Pittock, S.J., Verkman, A.S., Hinson, S.R. IgG marker of optic-spinal multiple sclerosis binds to the aquaporin-4 water channel. *J Exp Med*. 202 (2005) S.473-477
- Lennon, V.A., Wingerchuk, D.M., Kryzer, T.J., Pittock, S.J., Lucchinetti, C.F., Fujihara, K., Nakashima, I., Weinschenker, B.G. A serum autoantibody marker of neuromyelitis optica: distinction from multiple sclerosis. *Lancet*. 364 (2004) S.2106-2112

- Levin, M.H., Bennett, J.L., Verkman, A.S. Optic neuritis in neuromyelitis optica. *Prog Retin Eye Res.* 36 (2013) S.159-171
- Levy, M., Wildemann, B., Jarius, S., Orellano, B., Sasidharan, S., Weber, M.S., Stuve, O. Immunopathogenesis of neuromyelitis optica. *Adv Immunol.* 121 (2014) S.213-242
- Link, H., Huang, Y.M. Oligoclonal bands in multiple sclerosis cerebrospinal fluid: an update on methodology and clinical usefulness. *J Neuroimmunol.* 180 (2006) S.17-28
- Liu, H., Wu, X., Gang, N., Wang, S., Deng, W., Zan, L., Yu, S. Macrophage functional phenotype can be consecutively and reversibly shifted to adapt to microenvironmental changes. *Int J Clin Exp Med.* 8 (2015) S.3044-3053
- Liu, L., Yao, J.X., Ding, Q., Huang, S.A. [CD4+ CD25high regulatory T cells in peripheral blood of patients with B cell non-Hodgkin's lymphoma]. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi.* 14 (2006) S.119-122
- Lock, C.B., Heller, R.A. Gene microarray analysis of multiple sclerosis lesions. *Trends Mol Med.* 9 (2003) S.535-541
- Lowther, D.E., Chong, D.L., Ascough, S., Ettore, A., Ingram, R.J., Boyton, R.J., Altmann, D.M. Th1 not Th17 cells drive spontaneous MS-like disease despite a functional regulatory T cell response. *Acta Neuropathol.* 126 (2013) S.501-515
- Lu, Y.C., Yeh, W.C., Ohashi, P.S. LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine.* 42 (2008) S.145-151
- Lublin, F.D., Reingold, S.C. Defining the clinical course of multiple sclerosis: results of an international survey. National Multiple Sclerosis Society (USA) Advisory Committee on Clinical Trials of New Agents in Multiple Sclerosis. *Neurology.* 46 (1996) S.907-911
- Magliozzi, R., Howell, O., Vora, A., Serafini, B., Nicholas, R., Puopolo, M., Reynolds, R., Aloisi, F. Meningeal B-cell follicles in secondary progressive multiple sclerosis associate with early onset of disease and severe cortical pathology. *Brain.* 130 (2007) S.1089-1104
- Maloney, D.G. Anti-CD20 antibody therapy for B-cell lymphomas. *N Engl J Med.* 366 (2012) S.2008-2016
- Marignier, R., Nicolle, A., Watrin, C., Touret, M., Cavagna, S., Varrin-Doyer, M., Cavillon, G., Rogemond, V., Confavreux, C., Honnorat, J., Giraudon, P. Oligodendrocytes are damaged by neuromyelitis optica immunoglobulin G via astrocyte injury. *Brain.* 133 (2010) S.2578-2591
- Marik, C., Felts, P.A., Bauer, J., Lassmann, H., Smith, K.J. Lesion genesis in a subset of patients with multiple sclerosis: a role for innate immunity? *Brain.* 130 (2007) S.2800-2815
- Masuhr, K.F., Masuhr, F., Neumann, M. "Duale Reihe Neurologie, 1.5. Multiple Sklerose", Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 2013, 7296-299
- Mauermann, M.L., Ryan, M.L., Moon, J.S., Klein, C.J. Case of mononeuritis multiplex onset with rituximab therapy for Waldenström's macroglobulinemia. *J Neurol Sci.* 260 (2007) S.240-243
- McDonald, W.I., Compston, A., Edan, G., Goodkin, D., Hartung, H.P., Lublin, F.D., McFarland, H.F., Paty, D.W., Polman, C.H., Reingold, S.C., Sandberg-Wollheim, M., Sibley, W., Thompson, A., van den Noort, S., Weinshenker, B.Y., Wolinsky, J.S. Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the diagnosis of multiple sclerosis. *Ann Neurol.* 50 (2001) S.121-127
- Mildner, A., Yona, S., Jung, S. A close encounter of the third kind: monocyte-derived cells. *Adv Immunol.* 120 (2013) S.69-103
- Miller, A., Souroujon, M.C., Aloisi, F. Translational neuroimmunology: a joint meeting of the Israel Society of Neuroimmunology and the Italian Neuroimmunology Association. Conference review. *J Neuroimmunol.* 216 (2009) S.4-7
- Miltenyi Miltenyi Customer support -  
([http://www.miltenyibiotec.com/en/Forum\\_replies.aspx?threadId=436](http://www.miltenyibiotec.com/en/Forum_replies.aspx?threadId=436)) Stand: 21.09.12  
16:25 Uhr
- Miltenyi, S., Muller, W., Weichel, W., Radbruch, A. High gradient magnetic cell separation with MACS. *Cytometry.* 11 (1990) S.231-238
- Minagar, A. Current and future therapies for multiple sclerosis. *Scientifica (Cairo).* 2013 (2013) S.249101

- Miron, V.E., Kuhlmann, T., Antel, J.P. Cells of the oligodendroglial lineage, myelination, and remyelination. *Biochim Biophys Acta.* 1812 (2011) S.184-193
- Mishra, M.K., Wang, J., Silva, C., Mack, M., Yong, V.W. Kinetics of proinflammatory monocytes in a model of multiple sclerosis and its perturbation by laquinimod. *Am J Pathol.* 181 (2012) S.642-651
- Mitsonis, C.I., Potagas, C., Zervas, I., Sfagos, K. The effects of stressful life events on the course of multiple sclerosis: a review. *Int J Neurosci.* 119 (2009) S.315-335
- Mok, C.C. Rituximab for the treatment of rheumatoid arthritis: an update. *Drug Des Devel Ther.* 8 (2013) S.87-100
- Molnarfi, N., Schulze-Topphoff, U., Weber, M.S., Patarroyo, J.C., Prod'homme, T., Varrin-Doyer, M., Shetty, A., Linington, C., Slavin, A.J., Hidalgo, J., Jenne, D.E., Wekerle, H., Sobel, R.A., Bernard, C.C., Shlomchik, M.J., Zamvil, S.S. MHC class II-dependent B cell APC function is required for induction of CNS autoimmunity independent of myelin-specific antibodies. *J Exp Med.* 210 (2013) S.2921-2937
- Moore, G.R. Current concepts in the neuropathology and pathogenesis of multiple sclerosis. *Can J Neurol Sci.* 37 Suppl 2 (2010) S.S5-15
- Morgan, S.M., Zantek, N.D., Carpenter, A.F. Therapeutic plasma exchange in neuromyelitis optica: A case series. *J Clin Apher.* (2013) S.
- Moschovakis, G.L., Bubke, A., Dittrich-Breiholz, O., Braun, A., Prinz, I., Kremmer, E., Forster, R. Deficient CCR7 signaling promotes TH2 polarization and B-cell activation in vivo. *Eur J Immunol.* 42 (2012) S.48-57
- Mosser, D.M., Edwards, J.P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol.* 8 (2008) S.958-969
- Murray, T.J. Diagnosis and treatment of multiple sclerosis. *BMJ.* 332 (2006) S.525-527
- Nauta, A.J., Raaschou-Jensen, N., Roos, A., Daha, M.R., Madsen, H.O., Borrias-Essers, M.C., Ryder, L.P., Koch, C., Garred, P. Mannose-binding lectin engagement with late apoptotic and necrotic cells. *Eur J Immunol.* 33 (2003) S.2853-2863
- Nicchia, G.P., Mastrototaro, M., Rossi, A., Pisani, F., Tortorella, C., Ruggieri, M., Lia, A., Trojano, M., Frigeri, A., Svelto, M. Aquaporin-4 orthogonal arrays of particles are the target for neuromyelitis optica autoantibodies. *Glia.* 57 (2009) S.1363-1373
- Nomura, K. [Treatment of neuromyelitis optica]. *Nihon Rinsho.* 71 (2013) S.829-838
- Noseworthy, J.H., Lucchinetti, C., Rodriguez, M., Weinshenker, B.G. Multiple sclerosis. *N Engl J Med.* 343 (2000) S.938-952
- Oksenberg, J.R. Decoding multiple sclerosis: an update on genomics and future directions. *Expert Rev Neurother.* 13 (2013) S.11-19
- Olivieri, I., D'Angelo, S., Leccese, P., Vertone, D., Olivieri, A. Worsening of psoriasis with rituximab therapy. *Clin Exp Rheumatol.* 28 (2010) S.926
- Ono, K., Sato, T., Iyama, S., Tatekoshi, A., Hashimoto, A., Kamihara, Y., Horiguchi, H., Kikuchi, S., Takada, K., Hayashi, T., Miyanishi, K., Sato, Y., Takimoto, R., Kobune, M., Kato, J. [Successful treatment with rituximab in a patient with refractory mixed-type autoimmune hemolytic anemia]. *Rinsho Ketsueki.* 54 (2013) S.2053-2055
- Palazzo, E., Yahia, S.A. Progressive multifocal leukoencephalopathy in autoimmune diseases. *Joint Bone Spine.* 79 (2012) S.351-355
- Peng, S.L. Signaling in B cells via Toll-like receptors. *Curr Opin Immunol.* 17 (2005) S.230-236
- Piccio, L., Naismith, R.T., Trinkaus, K., Klein, R.S., Parks, B.J., Lyons, J.A., Cross, A.H. Changes in B- and T-lymphocyte and chemokine levels with rituximab treatment in multiple sclerosis. *Arch Neurol.* 67 (2010) S.707-714
- Pieper, K., Grimbacher, B., Eibel, H. B-cell biology and development. *J Allergy Clin Immunol.* 131 (2013) S.959-971
- Pillai, S., Cariappa, A. The follicular versus marginal zone B lymphocyte cell fate decision. *Nat Rev Immunol.* 9 (2009) S.767-777

- Pittock, S.J., Weinshenker, B.G., Lucchinetti, C.F., Wingerchuk, D.M., Corboy, J.R., Lennon, V.A. Neuromyelitis optica brain lesions localized at sites of high aquaporin 4 expression. *Arch Neurol.* 63 (2006) S.964-968
- Plosker, G.L., Figgitt, D.P. Rituximab: a review of its use in non-Hodgkin's lymphoma and chronic lymphocytic leukaemia. *Drugs.* 63 (2003) S.803-843
- Polman, C.H., Reingold, S.C., Banwell, B., Clanet, M., Cohen, J.A., Filippi, M., Fujihara, K., Havrdova, E., Hutchinson, M., Kappos, L., Lublin, F.D., Montalban, X., O'Connor, P., Sandberg-Wollheim, M., Thompson, A.J., Waubant, E., Weinshenker, B., Wolinsky, J.S. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the McDonald criteria. *Ann Neurol.* 69 (2011) S.292-302
- Ponomarev, E.D., Maresz, K., Tan, Y., Dittel, B.N. CNS-derived interleukin-4 is essential for the regulation of autoimmune inflammation and induces a state of alternative activation in microglial cells. *J Neurosci.* 27 (2007) S.10714-10721
- Pugliatti, M., Rosati, G., Carton, H., Riise, T., Drulovic, J., Vecsei, L., Milanov, I. The epidemiology of multiple sclerosis in Europe. *Eur J Neurol.* 13 (2006) S.700-722
- Pullerits, R., Ljevak, M., Vikgren, J., Bokarewa, M. Off-trial evaluation of the B cell-targeting treatment in the refractory cases of antineutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA)-associated vasculitis: long-term follow-up from a single centre. *Scand J Immunol.* 76 (2012) S.411-420
- Rawji, K.S., Yong, V.W. The benefits and detriments of macrophages/microglia in models of multiple sclerosis. *Clin Dev Immunol.* 2013 (2013) S.948976
- Reiche, W., Merkelbach, S., Reith, W. [Neuroradiological aspects of encephalitis disseminata]. *Radiologe.* 40 (2000) S.1045-1056
- Rommer, P., Dudesek, A., Stuve, O., Zettl, U. Monoclonal Antibodies in Treatment of Multiple Sclerosis. *Clin Exp Immunol.* (2013) S.
- Rommer, P.S., Patejdl, R., Winkelmann, A., Benecke, R., Zettl, U.K. Rituximab for secondary progressive multiple sclerosis: a case series. *CNS Drugs.* 25 (2011) S.607-613
- Ronchese, F., Hausmann, B. B lymphocytes in vivo fail to prime naive T cells but can stimulate antigen-experienced T lymphocytes. *J Exp Med.* 177 (1993) S.679-690
- Rossol, M., Heine, H., Meusch, U., Quandt, D., Klein, C., Sweet, M.J., Hauschildt, S. LPS-induced cytokine production in human monocytes and macrophages. *Crit Rev Immunol.* 31 (2011) S.379-446
- Rothwell, P.M., Charlton, D. High incidence and prevalence of multiple sclerosis in south east Scotland: evidence of a genetic predisposition. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 64 (1998) S.730-735
- Rovira, A., Leon, A. MR in the diagnosis and monitoring of multiple sclerosis: an overview. *Eur J Radiol.* 67 (2008) S.409-414
- Rubenstein, J.L., Combs, D., Rosenberg, J., Levy, A., McDermott, M., Damon, L., Ignoffo, R., Aldape, K., Shen, A., Lee, D., Grillo-Lopez, A., Shuman, M.A. Rituximab therapy for CNS lymphomas: targeting the leptomeningeal compartment. *Blood.* 101 (2003) S.466-468
- Sa, M.J. Physiopathology of symptoms and signs in multiple sclerosis. *Arq Neuropsiquiatr.* 70 (2012) S.733-740
- Sato, D., Callegaro, D., Lana-Peixoto, M.A., Fujihara, K. Treatment of neuromyelitis optica: an evidence based review. *Arq Neuropsiquiatr.* 70 (2012) S.59-66
- Scalfari, A., Neuhaus, A., Daumer, M., Deluca, G.C., Muraro, P.A., Ebers, G.C. Early relapses, onset of progression, and late outcome in multiple sclerosis. *JAMA Neurol.* 70 (2013) S.214-222
- Schreiner, B., Mitsdoerffer, M., Kieseier, B.C., Chen, L., Hartung, H.P., Weller, M., Wiendl, H. Interferon-beta enhances monocyte and dendritic cell expression of B7-H1 (PD-L1), a strong inhibitor of autologous T-cell activation: relevance for the immune modulatory effect in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* 155 (2004) S.172-182
- Segal, B.M. Th17 cells in autoimmune demyelinating disease. *Semin Immunopathol.* 32 (2010) S.71-77
- Shapiro, v.H.M. "Practical Flow Cytometry, 1.4 Flow Cytometry - Problems, Parameters, Probes and Principles ", John Wiley and Sons Inc, Hoboken, 2003, 4th, S.26-33

- Shechter, R., Schwartz, M. Harnessing monocyte-derived macrophages to control central nervous system pathologies: no longer 'if' but 'how'. *J Pathol.* 229 (2013) S.332-346
- Shemer, A., Jung, S. Differential roles of resident microglia and infiltrating monocytes in murine CNS autoimmunity. *Semin Immunopathol.* (2015) S.
- Shetty, S., Ahmed, A.R. Preliminary analysis of mortality associated with rituximab use in autoimmune diseases. *Autoimmunity.* 46 (2013) S.487-496
- Shi, Y.X., Zhang, X.S., Liu, D.G., Li, Y.Q., Guan, Z.Z., Jiang, W.Q. [CD4+CD25+T regulatory cells in peripheral blood of B-NHL patients with or without chemotherapy]. *Ai Zheng.* 23 (2004) S.597-601
- Shimizu, Y. [Clinical features of NMO according to brain MRI findings]. *Brain Nerve.* 62 (2010) S.933-943
- Shlomchik, M.J., Weisel, F. Germinal center selection and the development of memory B and plasma cells. *Immunol Rev.* 247 (2012) S.52-63
- Sriram, S. Role of glial cells in innate immunity and their role in CNS demyelination. *J Neuroimmunol.* 239 (2011) S.13-20
- Stanislaus, R., Gilg, A.G., Singh, A.K., Singh, I. Immunomodulation of experimental autoimmune encephalomyelitis in the Lewis rats by Lovastatin. *Neurosci Lett.* 333 (2002) S.167-170
- Stinissen, P., Raus, J. Autoreactive T lymphocytes in multiple sclerosis: pathogenic role and therapeutic targeting. *Acta Neurol Belg.* 99 (1999) S.65-69
- Stinissen, P., Raus, J., Zhang, J. Autoimmune pathogenesis of multiple sclerosis: role of autoreactive T lymphocytes and new immunotherapeutic strategies. *Crit Rev Immunol.* 17 (1997) S.33-75
- Stork, A.C., Notermans, N.C., Vrancken, A.F., Cornblath, D.R., van der Pol, W.L. Rapid worsening of IgM anti-MAG demyelinating polyneuropathy during rituximab treatment. *J Peripher Nerv Syst.* 18 (2013) S.189-191
- Stout, R.D., Jiang, C., Matta, B., Tietzel, I., Watkins, S.K., Suttles, J. Macrophages sequentially change their functional phenotype in response to changes in microenvironmental influences. *J Immunol.* 175 (2005) S.342-349
- Strober, W. Trypan blue exclusion test of cell viability. *Curr Protoc Immunol.* Appendix 3 (2001) S.Appendix 3B
- Su, H., Longhi, M.S., Wang, P., Vergani, D., Ma, Y. Human CD4+CD25(high)CD127 (low/neg) regulatory T cells. *Methods Mol Biol.* 806 (2012) S.287-299
- Svenningsson, A., Bergman, J., Dring, A., Vagberg, M., Birgander, R., Lindqvist, T., Gilthorpe, J., Bergenheim, T. Rapid depletion of B lymphocytes by ultra-low-dose rituximab delivered intrathecally. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm.* 2 (2015) S.e79
- Szczepiorkowski, Z.M., Winters, J.L., Bandarenko, N., Kim, H.C., Linenberger, M.L., Marques, M.B., Sarode, R., Schwartz, J., Weinstein, R., Shaz, B.H. Guidelines on the use of therapeutic apheresis in clinical practice--evidence-based approach from the Apheresis Applications Committee of the American Society for Apheresis. *J Clin Apher.* 25 (2010) S.83-177
- Tanaka, K. [Anti-aquaporin 4 antibody in Japanese multiple sclerosis with long spinal cord lesions]. *Rinsho Shinkeigaku.* 47 (2007) S.852-854
- Tedder, T.F., Engel, P. CD20: a regulator of cell-cycle progression of B lymphocytes. *Immunol Today.* 15 (1994) S.450-454
- Tobon, G.J., Izquierdo, J.H., Canas, C.A. B Lymphocytes: Development, Tolerance, and Their Role in Autoimmunity-Focus on Systemic Lupus Erythematosus. *Autoimmune Dis.* 2013 (2013) S.827254
- Togha, M., Karvigh, S.A., Nabavi, M., Moghadam, N.B., Harirchian, M.H., Sahraian, M.A., Enzevaei, A., Nourian, A., Ghanaati, H., Firouznia, K., Jannati, A., Shekiba, M. Simvastatin treatment in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis receiving interferon beta 1a: a double-blind randomized controlled trial. *Mult Scler.* 16 (2010) S.848-854
- Tony, H.P., Burmester, G., Schulze-Koops, H., Grunke, M., Henes, J., Kotter, I., Haas, J., Unger, L., Lovric, S., Haubitz, M., Fischer-Betz, R., Chehab, G., Rubbert-Roth, A., Specker, C., Weinerth, J., Holle, J., Muller-Ladner, U., Konig, R., Fiehn, C., Burgwinkel, P., Budde, K., Sorensen, H.,

- Meurer, M., Aringer, M., Kieseier, B., Erfurt-Berge, C., Sticherling, M., Veelken, R., Ziemann, U., Strutz, F., von Wussow, P., Meier, F.M., Hunzelmann, N., Schmidt, E., Bergner, R., Schwarting, A., Eming, R., Hertl, M., Stadler, R., Schwarz-Eywill, M., Wassenberg, S., Fleck, M., Metzler, C., Zettl, U., Westphal, J., Heitmann, S., Herzog, A.L., Wiendl, H., Jakob, W., Freivogel, K., Dorner, T. Safety and clinical outcomes of rituximab therapy in patients with different autoimmune diseases: experience from a national registry (GRAID). *Arthritis Res Ther.* 13 (2011) S.R75
- Traboulsee, A.L., Li, D.K. The role of MRI in the diagnosis of multiple sclerosis. *Adv Neurol.* 98 (2006) S.125-146
- Trinschek, B., Luessi, F., Gross, C.C., Wiendl, H., Jonuleit, H. Interferon-Beta Therapy of Multiple Sclerosis Patients Improves the Responsiveness of T Cells for Immune Suppression by Regulatory T Cells. *Int J Mol Sci.* 16 (2015) S.16330-16346
- Tullman, M.J. A review of current and emerging therapeutic strategies in multiple sclerosis. *Am J Manag Care.* 19 (2013) S.S21-27
- Tutuncu, M., Tang, J., Zeid, N.A., Kale, N., Crusan, D.J., Atkinson, E.J., Siva, A., Pittock, S.J., Pirko, I., Keegan, B.M., Lucchinetti, C.F., Noseworthy, J.H., Rodriguez, M., Weinschenker, B.G., Kantarci, O.H. Onset of progressive phase is an age-dependent clinical milestone in multiple sclerosis. *Mult Scler.* 19 (2013) S.188-198
- Van der Walt, A., Stankovich, J., Bahlo, M., Taylor, B.V., Van der Mei, I.A., Foote, S.J., Rubio, J.P., Kilpatrick, T.J., Butzkueven, H. Heterogeneity at the HLA-DRB1 allelic variation locus does not influence multiple sclerosis disease severity, brain atrophy or cognition. *Mult Scler.* 17 (2011) S.344-352
- Vollmer, T. The natural history of relapses in multiple sclerosis. *J Neurol Sci.* 256 Suppl 1 (2007) S.S5-13
- von Budingen, H.C., Bar-Or, A., Zamvil, S.S. B cells in multiple sclerosis: connecting the dots. *Curr Opin Immunol.* 23 (2011) S.713-720
- Wang, H., Dai, Y., Qiu, W., Zhong, X., Wu, A., Wang, Y., Lu, Z., Bao, J., Hu, X. HLA-DPB1 0501 is associated with susceptibility to anti-aquaporin-4 antibodies positive neuromyelitis optica in southern Han Chinese. *J Neuroimmunol.* 233 (2011) S.181-184
- Wang, P., Zheng, S.G. Regulatory T cells and B cells: implication on autoimmune diseases. *Int J Clin Exp Pathol.* 6 (2013) S.2668-2674
- Warabi, Y., Matsumoto, Y., Hayashi, H. Interferon beta-1b exacerbates multiple sclerosis with severe optic nerve and spinal cord demyelination. *J Neurol Sci.* 252 (2007) S.57-61
- Weber, M.S. Is intrathecal anti-CD20 an option to target compartmentalized CNS inflammation in progressive MS? *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm.* 2 (2015) S.e84
- Weber, M.S., Prod'homme, T., Patarroyo, J.C., Molnarfi, N., Karnezis, T., Lehmann-Horn, K., Danilenko, D.M., Eastham-Anderson, J., Slavin, A.J., Lington, C., Bernard, C.C., Martin, F., Zamvil, S.S. B-cell activation influences T-cell polarization and outcome of anti-CD20 B-cell depletion in central nervous system autoimmunity. *Ann Neurol.* 68 (2010) S.369-383
- Weber, M.S., Prod'homme, T., Youssef, S., Dunn, S.E., Steinman, L., Zamvil, S.S. Neither T-helper type 2 nor Foxp3+ regulatory T cells are necessary for therapeutic benefit of atorvastatin in treatment of central nervous system autoimmunity. *J Neuroinflammation.* 11 (2014) S.29
- Weber, M.S., Starck, M., Wagenpfeil, S., Meinl, E., Hohlfeld, R., Farina, C. Multiple sclerosis: glatiramer acetate inhibits monocyte reactivity in vitro and in vivo. *Brain.* 127 (2004) S.1370-1378
- Weber, M.S., Youssef, S., Dunn, S.E., Prod'homme, T., Neuhaus, O., Stuve, O., Greenwood, J., Steinman, L., Zamvil, S.S. Statins in the treatment of central nervous system autoimmune disease. *J Neuroimmunol.* 178 (2006) S.140-148
- Wegner, C. Recent insights into the pathology of multiple sclerosis and neuromyelitis optica. *Clin Neurol Neurosurg.* 115 Suppl 1 (2013) S.S38-41
- Weinschenker, B.G. Natural history of multiple sclerosis. *Ann Neurol.* 36 Suppl (1994) S.S6-11

- Weinshenker, B.G. Neuromyelitis optica: what it is and what it might be. *Lancet*. 361 (2003) S.889-890
- Weinshenker, B.G., Rice, G.P., Noseworthy, J.H., Carriere, W., Baskerville, J., Ebers, G.C. The natural history of multiple sclerosis: a geographically based study. 3. Multivariate analysis of predictive factors and models of outcome. *Brain*. 114 ( Pt 2) (1991) S.1045-1056
- Weinshenker, B.G., Wingerchuk, D.M., Pittock, S.J., Lucchinetti, C.F., Lennon, V.A. NMO-IgG: a specific biomarker for neuromyelitis optica. *Dis Markers*. 22 (2006) S.197-206
- Weiß, D.C. "Basiswissen Medizinische Statistik", Springer Verlag, Heidelberg, 2010, 5. Auflage, 183-210
- Weiss, J.M., Bilate, A.M., Gobert, M., Ding, Y., Curotto de Lafaille, M.A., Parkhurst, C.N., Xiong, H., Dolpady, J., Frey, A.B., Ruocco, M.G., Yang, Y., Floess, S., Huehn, J., Oh, S., Li, M.O., Niec, R.E., Rudensky, A.Y., Dustin, M.L., Littman, D.R., Lafaille, J.J. Neuropilin 1 is expressed on thymus-derived natural regulatory T cells, but not mucosa-generated induced Foxp3+ T reg cells. *J Exp Med*. 209 (2012) S.1723-1742, S1721
- WHO Atlas multiple sclerosis resources in the world 2008 - ([http://www.google.de/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&ved=0CDcQFjAA&url=http%3A%2F%2Fwww.who.int%2Fmental\\_health%2Fneurology%2FAtlas\\_MS\\_WEB.pdf&ei=JxKrUrDOOdGKswbepoHoCw&usg=AFQjCNEIgwHn9WOnYWZLQ2csMR-ifc22RA&sig2=RH\\_wRNArL0sITQLBS6JRPQ&bvm=bv.57967247,d.Yms](http://www.google.de/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&ved=0CDcQFjAA&url=http%3A%2F%2Fwww.who.int%2Fmental_health%2Fneurology%2FAtlas_MS_WEB.pdf&ei=JxKrUrDOOdGKswbepoHoCw&usg=AFQjCNEIgwHn9WOnYWZLQ2csMR-ifc22RA&sig2=RH_wRNArL0sITQLBS6JRPQ&bvm=bv.57967247,d.Yms)) Stand: 10.12.13 23:15
- Wingerchuk, D.M. Diagnosis and treatment of neuromyelitis optica. *Neurologist*. 13 (2007) S.2-11
- Wingerchuk, D.M., Lennon, V.A., Lucchinetti, C.F., Pittock, S.J., Weinshenker, B.G. The spectrum of neuromyelitis optica. *Lancet Neurol*. 6 (2007) S.805-815
- Wingerchuk, D.M., Lennon, V.A., Pittock, S.J., Lucchinetti, C.F., Weinshenker, B.G. Revised diagnostic criteria for neuromyelitis optica. *Neurology*. 66 (2006) S.1485-1489
- Yamane, H., Paul, W.E. Cytokines of the gamma(c) family control CD4+ T cell differentiation and function. *Nat Immunol*. 13 (2012) S.1037-1044
- Yamasaki, K., Horiuchi, I., Minohara, M., Kawano, Y., Ohyagi, Y., Yamada, T., Mihara, F., Ito, H., Nishimura, Y., Kira, J. HLA-DPB1\*0501-associated optico-spinal multiple sclerosis: clinical, neuroimaging and immunogenetic studies. *Brain*. 122 ( Pt 9) (1999) S.1689-1696
- Yanaba, K., Bouaziz, J.D., Matsushita, T., Magro, C.M., St Clair, E.W., Tedder, T.F. B-lymphocyte contributions to human autoimmune disease. *Immunol Rev*. 223 (2008) S.284-299
- Yang, C.C. Bladder management in multiple sclerosis. *Phys Med Rehabil Clin N Am*. 24 (2013) S.673-686
- Yang, X.O., Nurieva, R., Martinez, G.J., Kang, H.S., Chung, Y., Pappu, B.P., Shah, B., Chang, S.H., Schluns, K.S., Watowich, S.S., Feng, X.H., Jetten, A.M., Dong, C. Molecular antagonism and plasticity of regulatory and inflammatory T cell programs. *Immunity*. 29 (2008) S.44-56
- Yoshida, M. [AQP4 immunohistochemistry in neuromyelitis optica and multiple sclerosis: a neuropathological review]. *Brain Nerve*. 62 (2010) S.961-974
- Yoshimura, S., Isobe, N., Matsushita, T., Yonekawa, T., Masaki, K., Sato, S., Kawano, Y., Kira, J. Distinct genetic and infectious profiles in Japanese neuromyelitis optica patients according to anti-aquaporin 4 antibody status. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 84 (2013) S.29-34
- Youssef, S., Stuve, O., Patarroyo, J.C., Ruiz, P.J., Radosевич, J.L., Hur, E.M., Bravo, M., Mitchell, D.J., Sobel, R.A., Steinman, L., Zamvil, S.S. The HMG-CoA reductase inhibitor, atorvastatin, promotes a Th2 bias and reverses paralysis in central nervous system autoimmune disease. *Nature*. 420 (2002) S.78-84
- Zephir, H., Bernard-Valnet, R., Lebrun, C., Outteryck, O., Audoin, B., Bourre, B., Pittion, S., Wiertlewski, S., Ouallet, J.C., Neau, J.P., Ciron, J., Clavelou, P., Marignier, R., Brassat, D. Rituximab as first-line therapy in neuromyelitis optica: efficiency and tolerability. *J Neurol*. (2015) S.
- Zhou, X., Kong, N., Zou, H., Brand, D., Li, X., Liu, Z., Zheng, S.G. Therapeutic potential of TGF-beta-induced CD4(+) Foxp3(+) regulatory T cells in autoimmune diseases. *Autoimmunity*. 44 (2011) S.43-50

- Ziemssen, T., Kumpfel, T., Klinkert, W.E., Neuhaus, O., Hohlfeld, R. Glatiramer acetate-specific T-helper 1- and 2-type cell lines produce BDNF: implications for multiple sclerosis therapy. Brain-derived neurotrophic factor. *Brain*. 125 (2002) S.2381-2391
- Zivadinov, R., Sestic, J. [Use of magnetic resonance imaging in the diagnosis and prognosis of multiple sclerosis]. *Lijec Vjesn*. 128 (2006) S.295-308

## **Danksagung**

Zunächst möchte ich Herrn Prof. Dr. med. B. Hemmer, Leiter der Neurologischen Klinik und Poliklinik am Klinikum rechts der Isar, für die Möglichkeit die Arbeit mit den zugehörigen experimentellen Versuchen in seiner Abteilung durchführen zu können, sehr herzlich danken.

Herrn PD Dr. Martin Weber, meinem Doktorvater, danke ich in höchstem Maße für die freundliche Überlassung des Themas der Dissertation, die kompetente Teamleitung und die sehr gute Betreuung dieser Arbeit. Zudem gebührt Herrn Klaus Lehmann-Horn größter Dank für die jederzeit hervorragende Betreuung und fachlich exzellente Beratung. Beiden danke ich für die stets inspirierenden fachlichen Gespräche und konstruktiven Anregungen, die zusammen mit der freundschaftlichen Arbeitsatmosphäre sehr zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben.

Besonderer Dank gilt dem gesamten Laborteam der Neurologischen Klinik unter der Leitung von Frau Verena Grummel, in dem mir alle Mitarbeiter stets kollegial mit Rat und Tat zur Seite standen. Insbesondere Frau Deetje Hetzenberg und Frau Veronika Husterer gebührt großer Dank für die Beratung in labortechnischen Fragen und die tatkräftige Unterstützung bei der Durchführung der Versuche.

Herrn PD Dr. med. N. Bubnoff danke ich für die Ermöglichung der Kooperation mit der Hämatookologischen Klinik des Klinikum rechts der Isar, sowie die freundliche Unterstützung in der Probandenakquise. Mein Dank gilt auch den Mitarbeitern der Hämatologischen Tagesklinik des Klinikums rechts der Isar für die Hilfe bei der Organisation der Blutabnahmen und die stets freundliche Unterstützung bei der Datenakquise.

Frau PD Dr. med. T. Kümpfel danke ich für die Ermöglichung der Kooperation mit der MS-Ambulanz der neurologischen Klinik des Klinikums Großhadern, sowie die freundliche Unterstützung in der Probanden- und Datenakquise. Großer Dank gebührt allen Mitarbeitern der MS Ambulanz im Klinikum Großhadern, sowie der MS Ambulanz im Klinikum rechts der Isar für die Organisation der Blutabnahmetermine.

Besonderer Dank gilt Herrn Dr. med. Uwe Thiel für die stets freundliche, tatkräftige Hilfe und fachliche Unterstützung bei der Datenauswertung.

Weiterhin danke ich allen Probanden, die bei der Studie mitgewirkt haben.

Abschließend danke ich meinen Freunden und meiner Familie für die Unterstützung während der Anfertigung dieser Arbeit.