

Effekte einer Anti-CD52-Antikörpertherapie auf Immunzellinfiltration und neurodegenerative Aspekte in einem Mausmodell der Multiplen Sklerose

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
Bonn

Micha Theophil Simon

aus Fritzlar

2023

Angefertigt mit der Genehmigung
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachterin: Prof. Dr. med. Stefanie Kürten
2. Gutachter: Prof. Dr. med. Marcus Müller

Tag der Mündlichen Prüfung: 18.04.2023

Aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie
der Julius-Maximilians-Universität Würzburg
Direktor: Prof. Dr. med. Süleyman Ergün

Für meine Familie

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	7
1. Einleitung	11
1.1 Multiple Sklerose	11
1.1.1 Symptomatik und klinischer Verlauf.....	11
1.1.2 Ätiologie und Epidemiologie	13
1.2 Die Immunpathologie der Multiplen Sklerose.....	15
1.2.1 Die Rolle der B-Zellen.....	18
1.2.2 Tertiär-lymphatische Organe	20
1.3 Tiermodelle der Multiplen Sklerose.....	22
1.3.1 Die experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis.....	23
1.3.2 Das MP4 - EAE-Modell.....	25
1.4 Pharmakologische Therapien der Multiplen Sklerose	26
1.4.1 Monoklonale Antikörper als Therapieoption.....	28
1.4.2 Alemtuzumab.....	30
1.5 Zielsetzung und Fragestellung der Studie.....	34
2. Material und Methoden	36
2.1 Materialien, Geräte und Software	36
2.2 Lösungen	44
2.3 Versuchstiere	45
2.4 Methoden.....	46
2.4.1 EAE-Induktion, Behandlung und Krankheitsaktivität.....	46
2.4.2 Durchflusszytometrie	47
2.4.3 <i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>	51
2.4.4 <i>B-Zell Enzyme-linked Immunospot Assay</i>	53

2.4.5	Histologie des zentralen Nervensystems	56
2.5	Statistische Auswertung.....	66
3.	Ergebnisse.....	67
3.1	Reduktion der Symptomlast in der akuten, nicht jedoch in der chronischen EAE-Kohorte	67
3.2	Depletion von zirkulierenden CD4 ⁺ T und CD19 ⁺ B-Lymphozyten im Blut	70
3.3	Keine Effekte auf die MP4-spezifische B-Zell-Reaktion	72
3.4	Reduktion der lymphozytären Infiltration in den <i>Cerebella</i>	75
3.5	Kein Einfluss auf Neurodegeneration und Remyelinisierung	78
3.6	Zusammenfassung der Ergebnisse	81
4.	Diskussion.....	82
4.1	Klinischer Verlauf	82
4.2	Periphere Lymphozytenpopulation und B-Zell-Antwort.....	85
4.3	Lymphozyteninfiltrate im zentralen Nervensystem.....	87
4.4	Neurodegeneration und Remyelinisierung.....	91
4.4	Ausblick	95
5.	Zusammenfassung	97
6.	Abbildungsverzeichnis.....	100
7.	Tabellenverzeichnis	101
8.	Literaturverzeichnis	102
9.	Danksagung	124

Abkürzungsverzeichnis

A = *Area*

ABC-Komplex = Avidin-Biotin-Peroxidase Komplex

ADCC = *Antibody-Dependent Cell-mediated Cytotoxicity*

AK = Antikörper

AP = Alkalische Phosphatase

APC = *Adenomatous polyposis coli*

APZ = Antigenpräsentierende Zelle

B6 = C57BL/6-Inzuchtstamm

BHS = Blut-Hirn-Schranke

CD = *Cluster of Differentiation*

CDC = *Complement-Dependent Cytotoxicity*

CFA = Komplettes Freundesches Adjuvans

CIS = *Clinically Isolated Syndrome*

DAB = Diaminobenzidin

DMT = *Disease Modifying Therapy*

EAE = Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis

EBNA-1 = Epstein-Barr-Virus nukleäres Antigen 1

EBV = Epstein-Barr-Virus

EDTA = Ethylendiamintetraessigsäure

ELISA = *Enzyme-linked Immunosorbent Assay*

ELISPOT = *Enzym-linked Immunospot Assay*

FACS = *Fluorescence-Activated Cell Sorting*

FBS = *Fetal Bovine Serum*

FDZ = Follikulär-dendritischen Zellen

FSC = *Forward Scatter*

FVS = *Fixable Viability Stain*

GA = Glatirameracetat

H = *Height*

HEV = Hochendothelialen Venolen

HRP = *Horseradish Peroxidase*

HS = Hinterstrang

huCD52 = humanes CD52

i.m. = intramuskulär

i.v. = intravenös

IF = Immunfluoreszenz

Ig = Immunglobulin

IHC = Immunhistochemie

IL = Interleukin

INF = Interferon

JC-Virus = John-Cunningham Virus

LK = Lymphknoten

MBP = Myelin-basisches Protein

mCD52 = murines CD52

MHC = *Major Histocompatibility Complex*

MOG = Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein

MOM = *Mouse-on-Mouse*

MP4 = MBP-PLP- Fusionsprotein

m-PAP = *Mouse Peroxidase-anti-Peroxidase*

MRT = Magnetresonanztomographie

MS = Multiple Sklerose

MW = Mittelwert

NEDA = *No Evidence of Disease Activity*

NGS = *Natural Goat Serum*

NKC = *Natural Killer Cells*

OD = Optische Dichte

OKB = Oligoklonale Banden

OLIG2 = *Oligodendrocyte transcription factor 2*

OPC = *Oligodendrocyte Progenitor Cells*

OR = *Odds Ratio*

PB = *Phosphate Buffer*

PBS = *Phosphat Buffered Saline*

PerCP/Cy-5.5 = Peridinin-Chlorophyll-Protein gekoppelt mit Cyanin - 5.5

PFA = Paraformaldehyd

PLP = Proteolipid-Protein

PP-MS = Primär-progrediente Multiple Sklerose

rb-PAP = *Rabbit Peroxidase-anti-Peroxidase*

RM = Rückenmark

rMOG = *humanes rekombinantes MOG1-120*

RR-MS = *Relapsing Remitting* Multiple Sklerose

RT = Raumtemperatur

s.c. = subkutan

SLO = Sekundär-lymphatisches Organ

SP-MS = Sekundär-Progrediente Multiple Sklerose

TLO = Tertiär-lymphatische Organe

TMB = Tetramethylbenzidin

TNF- α = Tumornekrosefaktor-alpha

UAW = Unerwünschte Arzneimittelwirkung

VSS = Vorderseitenstränge

W = *Width*

WM = *White Matter*

ZNS = Zentrales Nervensystem

1. Einleitung

1.1 Multiple Sklerose

Die Multiple Sklerose (MS) ist eine autoimmunvermittelte neurodegenerative Erkrankung des zentralen Nervensystems (ZNS) (Thompson et al., 2018b), welche erstmals detailliert durch den französischen Arzt und Begründer der modernen Neurologie Jean-Martin Charcot sowie seinen deutschen Schüler Leopold Odenstein im Jahre 1868 als „*la sclérose en plaques généralisée*“ beschrieben wurde (Lehmann et al., 2018).

Diese erste Beschreibung spiegelte bereits pathognomonische histologische Veränderungen im Krankheitsverlauf der MS wider. Dieser ist geprägt durch ein Nebeneinander von Inflammation, Demyelinisierung sowie Axonverlust in verschiedenen Kompartimenten des ZNS. Es folgt ein progredienter Neuronenverlust mit generalisierter Hirnatrophie sowie die Ausbildung von reaktiven Gliosenarben im Bereich der Läsionen (Popescu und Lucchinetti, 2012; Reich et al., 2018).

Eine weitere Bezeichnung für die MS ist die *Enzephalomyelitis disseminata*, worin sich jene für die Diagnose der Erkrankung nach den McDonalds-Kriterien geforderte räumliche und zeitliche Dissemination der Erkrankungsherde mit charakteristischen Befunden in der Magnetresonanztomographie (MRT) und dem Liquor bzw. der klinischen Symptomatik abbildet (Thompson et al., 2018a).

Mit einer Prävalenz von ca. 175 - 289/100.000 Einwohner in Deutschland und einer typischen Erstmanifestation zwischen dem 20-40. Lebensjahr, gilt die MS als häufigste atraumatische Ursache für Behinderung im jungen Erwachsenenalter (Filippi et al., 2018; Kip, 2016). Hierdurch ergibt sich neben der individuellen-medizinischen eine hohe sozioökonomische Relevanz der Erkrankung, mit geschätzten jährlichen Kosten von 14,6 Milliarden Euro in Europa (Olesen et al., 2012).

1.1.1 Symptomatik und klinischer Verlauf

Die Symptomatik der Erkrankung ist äußerst heterogen und somit wenig krankheitsspezifisch, bedingt durch multiple disseminierte Läsionsherde innerhalb verschiedener ZNS-Kompartimente. Typische Lokalisationen der Erstmanifestation durch demyelinisierende Läsionen sind *Nervus opticus*, Hirnstamm, Rückenmark (RM) und *Cerebellum*. (Filippi et al., 2018). Während somit die primäre klinische Manifestation eine

Neuritis nervi optici, Doppelbilder, Nystagmus, Sensibilitätsstörungen, Paresen und Ataxie umfasst, kommt es insbesondere im Verlauf zu Einschränkungen der kognitiven Leistungsfähigkeit, komplexen neuropsychologischen Veränderungen sowie Fatigue (Brownlee et al., 2017; Compston und Coles, 2008; Filippi et al., 2018). Charakteristisch, wenn auch nicht spezifisch, sind das Lhermitte-Zeichen, eine unter Nackenflexion über den Rücken hinabziehende elektrisierend-kribbelnde Missempfindung, sowie das Uhthoff-Phänomen, eine passagere Aggravation der klinisch-neurologischen Symptomatik aufgrund einer Erhöhung der Körpertemperatur (Compston und Coles, 2008).

Der Krankheitsverlauf und die klinische Progredienz der Symptomatik ist interindividuell verschieden und schwer prognostizierbar. Es erlaubt sich jedoch die Differenzierung anhand der initialen Manifestation in zwei Hauptmanifestationsformen: der schubförmigen sowie der progredienten MS (Brownlee et al., 2017; Lublin et al., 2014).

Bei ca. 85 % der Betroffenen kommt es zunächst zum Auftreten eines oder mehrerer klinischer Schubereignisse mit vollständiger oder teilweiser Remission der Symptomatik, ohne nachweisbare klinische Progredienz im Intervall (Lassmann, 2018). Als ein Schub wird ein akut bis subakut aufgetretenes neurologisches Defizit bezeichnet, welches über > 24 h besteht und unabhängig von Fieber oder eines Infektes auftritt. Dies entspricht pathologisch einer fokal bzw. multifokal auftretenden Inflammation und Demyelinisierung (Brownlee et al., 2017; Thompson et al., 2018a). Ein erstmaliges klinisches Schubereignis, welches auch nach Berücksichtigung von MRT- und Liquorparametern nicht hinreichend die für die Diagnose vorausgesetzte räumliche und zeitliche Dissemination erfüllt, wird als klinisch-isoliertes Syndrom (*Clinically Isolated Syndrome* = CIS) bezeichnet, stellt jedoch in der Mehrzahl der Fälle lediglich das initiale Ereignis einer schubförmigen MS, auch als *Relapsing Remitting-MS* (RR-MS) bezeichnet, dar (Thompson et al., 2018b). Nach einer Erkrankungsdauer von ca. 5 - 25 Jahren kommt es häufig zu einer graduellen Abnahme der Schubrate der RR-MS und einer schubunabhängigen Akkumulation von Symptomen, was als sekundär-progrediente MS (SP-MS) bezeichnet wird (Lublin et al., 2014; Ransohoff et al., 2015).

In ca. 10 - 15 % der Fälle kommt es bereits bei Erstmanifestation der Erkrankung zu einem schubunabhängigen klinischen Progress ohne vorherigen schubförmigen Verlauf, was als primär-progrediente MS (PP-MS) bezeichnet wird (Brownlee et al., 2017; Lublin et al., 2014).

Nach Revision der Phänotypisierung der MS-Verläufe im Jahr 2013 werden die RR-MS sowie die progredienten Verläufe unter Einbeziehung von Krankheitsschüben bzw. Kontrastmittelverhalten und T₂-gewichteter Darstellung im MRT, in aktive und inaktive Formen unterteilt, unabhängig von der primären Manifestation. Weiter wird empfohlen SP-MS und PP-MS-Patient*innen anhand ihres Krankheitsprogresses zu beurteilen (Lublin et al., 2014). Diese zunehmend differenzierte Kategorisierung ermöglicht der ausgeprägten Heterogenität von MS-Verläufen besser gerecht zu werden und entsprechende Therapieansätze zu etablieren.

1.1.2 Ätiologie und Epidemiologie

Bisher ist es nicht gelungen einen einzelnen oder multiple ätiologische Faktoren als Auslöser der MS zu definieren (Reich et al., 2018). Eine etablierte Theorie beschreibt eine komplexe Interaktion von Umweltfaktoren, die bei gegebener genetischer Prädisposition und Exposition mit individuellen Risikofaktoren zur Manifestation der Erkrankung führt (Olsson et al., 2017; Thompson et al., 2018b). Individuelle Risikofaktoren, für die ein Zusammenhang mit der MS festgestellt wurden, sind unter anderem Tabakrauch, Exposition mit organischen Lösungsmitteln, Nachtschichtarbeit sowie Übergewicht im Jugendalter (Olsson et al., 2017).

Die weltweiten Prävalenzzahlen weisen im Allgemeinen ein erhöhtes Krankheitsrisiko mit zunehmender Distanz zum Äquator auf, mit hohen Fallzahlen in Mittel- und Nordeuropa, Kanada und dem Norden der USA (Browne et al., 2014; Simpson et al., 2011). Zudem konnte gezeigt werden, dass sich bei Migration im jungen Lebensalter die individuelle Erkrankungswahrscheinlichkeit an die des Empfängerlandes angleicht (Berg-Hansen et al., 2015; Gale und Martyn, 1995). Eine mögliche Erklärung hierfür stellen veränderte Umweltfaktoren, wie eine geringere Exposition mit ultraviolettem Licht und eine konsekutiv verminderte Vitamin-D-Synthese, dar. Dies zeigte sich assoziiert mit einem erhöhten Erkrankungsrisiko, schwereren Verläufen und einem rascheren Krankheitsprogress der MS (Lucas et al., 2015).

Hinweise auf eine genetische Determinante der MS ergeben sich aus Betrachtung des Erkrankungsrisikos von Angehörigen von MS-Patient*innen, welches mit einer Häufigkeit von ca. 30 - 50 % für monozygote Zwillinge sowie 2 - 4 % für Verwandte ersten Grades deutlich über der Prävalenz in der Normalbevölkerung liegt (Reich et al., 2018). Im

Rahmen von vergleichenden Analysen des genetischen Materials zeigt sich unter anderem ein erhöhtes Erkrankungsrisiko durch die HLA-DRB1*15:01 Allel-Variante (*Odds Ratio* = OR ~ 3), welche für das Haupthistokompatibilitätskomplex- (*Major Histocompatibility Complex* = MHC) II-Molekül kodiert. Zudem fand sich ein protektiver Einfluss des für MHC-I-kodierenden HLA-A*02:01 Allels (OR ~ 0.7) (Olsson et al., 2017; Sawcer et al., 2011). In beiden Fällen sind die Genprodukte somit unmittelbar an der Antigenpräsentation und somit Aktivierung der adaptiven Immunantwort beteiligt, MHC-II für *Cluster of Differentiation* (CD 4⁺ und MHC-I für CD8⁺ T-Lymphozyten (Olsson et al., 2017). Insgesamt konnten in genomweiten Assoziationsstudien mittlerweile über 200 autosomale Genvarianten außerhalb des MHC-Komplexes, eine X-chromosomale Variante sowie 32 Varianten der MHC-kodierenden Genabschnitte identifiziert werden, die über verschiedene Mechanismen an der Regulation der adaptiven oder angeborenen Immunantwort beteiligt sind und die Suszeptibilität beeinflussen, was den Status der MS als primär autoimmun-vermittelte Erkrankung festigt (Consortium, 2019; Olsson et al., 2017).

Mit einer Relation von 2 - 3 : 1 in RR-MS-Patient*innen überwiegen Frauen, wie für Autoimmunerkrankungen typisch, deutlich (Filippi et al., 2018; Reich et al., 2018). Die Theorie eines hormonellen Einflusses auf die Krankheitsaktivität wird weiter gestützt durch die verminderte Schubrate sowie Veränderungen der Zytokinspiegel während Schwangerschaften (Al-Shammri et al., 2004; Nguyen et al., 2019).

Auch der Einfluss der Darmflora (Berer et al., 2017; Berer et al., 2011) sowie diverse Infektionserkrankungen auf das Erkrankungsrisiko und die Pathogenese der MS wurden diskutiert (Filippi et al., 2018).

Einen besonderen Stellenwert unter den infektiologischen Einflussfaktoren nimmt das Epstein-Barr-Virus (EBV) ein, welches sich insbesondere bei Infektion im Jugend- bzw. Erwachsenenalter als infektiöse Mononukleose manifestieren kann (Ascherio et al., 2012; Dunmire et al., 2018). EBV ist ein ubiquitär auftretendes Herpesvirus, welches B-Lymphozyten infiziert und lebenslang in B-Gedächtniszellen persistiert (Ascherio, 2013). Diese latente Infektion führt zur B-Zell-Proliferation und -Aktivierung sowie zu einer konsekutiven Resistenz gegenüber regulatorischen Einflüssen (Ascherio et al., 2012). Insbesondere der Zeitpunkt der Infektion ist hierbei relevant. So wurde in einer Fall-Kontroll-Studie unter Beteiligung von 10 Millionen Angehörigen des Militärs der

Vereinigten Staaten von Amerika ein 32fach erhöhtes MS- Erkrankungsrisiko nach EBV-Serokonversion festgestellt. Im Vergleich konnte eine Ähnliche Korrelation bei Infektion mit dem Cytomegalievirus, ein ebenfalls in Lymphozyten persistierendes Herpesvirus, kein erhöhtes MS-Erkrankungsrisiko nachgewiesen werden (Bjornevik et al., 2022). Durch die Arbeit von Lanz et al. (2022) konnte zudem molekulares Mimikry als lange vermuteter Pathomechanismus zwischen EBV und MS nachgewiesen werden. So fanden sich in 20-25 % der untersuchten MS-Patient*innen AK, die mit hoher Affinität EBV-nukleäres Antigen 1 (EBNA-1) sowie ein auf Gliazellen exprimiertes Adhäsionsmolekül (GliaCAM = *gliacell adhesion molecule*) binden konnten. Im Tiermodell konnten die Autoren zudem einen aggravierten klinischen Verlauf nach Immunisierung mittels eines EBNA-1-Fragmentes zeigen. Es erscheint somit möglich, dass das individuelle MS-Erkrankungsrisiko in Zukunft mittels einer Impfung gegen EBV signifikant reduziert werden könnte (Bjornevik et al., 2022; Maple et al., 2022).

1.2 Die Immunpathologie der Multiplen Sklerose

Für die Entwicklung und Etablierung von Therapieansätzen der MS, ist neben der Analyse ätiologischer Zusammenhänge insbesondere das Verständnis von Pathohistologie und -physiologie essenziell.

Als pathognomonisch gelten inflammatorische Läsionen, die primär zur Demyelinisierung der weißen und grauen Substanz sowie diffusen Schäden und generalisierter Neurodegeneration im gesamten ZNS führen (Lassmann, 2018; Lassmann et al., 2007). Diese Orte der fokalen Demyelinisierung, auch als Plaques bezeichnet, sind gekennzeichnet durch variable Gliosierung und Inflammation bei im Verhältnis geringer ausgeprägten axonalen Schäden (Popescu und Lucchinetti, 2012). Typische Prädilektionsstellen im ZNS sind periventrikuläre Bereiche, *Corpus callosum*, Hirnstamm, *Cerebellum*, RM und *Nervus opticus* (Popescu und Lucchinetti, 2012; Reich et al., 2018). Als chronisch-autoimmune Erkrankung zeichnet sich die MS unter anderem durch perivaskuläre Infiltration und parenchymale Distribution von T- und B-Lymphozyten im ZNS aus, welche in der Frühphase der Erkrankung am stärksten ausgeprägt sind und im Verlauf mit Erkrankungsdauer und zunehmendem Alter der Patient*innen abnehmen (Lassmann, 2018). Jedoch zeigen auch Patient*innen mit progredienten Verläufen ausgeprägte Entzündungsaktivität, die das Niveau primär metabolischer oder

neurodegenerativer ZNS-Erkrankungen übersteigen (Frischer et al., 2009; Lassmann, 2018). Ausgeprägte Inflamationsprozesse sind in progredienten Verläufen zudem assoziiert mit klinischer bzw. radiologischer Krankheitsaktivität, während in Patient*innen mit Krankheitsstabilität bzw. in der Spätphase der Erkrankung die leukozytäre ZNS-Infiltration bis auf das altersentsprechende Normalniveau abfallen kann (Frischer et al., 2009; Lassmann, 2018). Diese adaptive Immunaktivität führt im Weiteren zur Demyelinisierung durch Infiltration des Gewebes mit Makrophagen sowie zur Aktivierung ZNS-ständiger Mikroglia (Lassmann, 2018). Anhand der Aktivität von Makrophagen/Mikroglia innerhalb der weißen Substanz (*white matter* = WM) können Läsionstypen definiert werden. Akut-aktive Läsionen, welche insbesondere in RR-MS-Patient*innen auftreten, sind geprägt durch Infiltration von Lymphozyten und Makrophagen und assoziiert mit einer insuffizienten Blut-Hirn-Schranke (BHS). Chronisch-aktive, oder langsam-expandierende Läsionen zeichnen sich durch eine fortschreitende Demyelinisierung mit Makrophagenaktivität an den Plaquerändern aus und zeigen sich vor allem im Rahmen progredienter Verläufe. Mit fortschreitendem Alter der Betroffenen und Erkrankungsdauer kommt es im Verlauf zur Prädominanz inaktiver bzw. remyelinisierter Plaques ohne ausgeprägte Mikroglia- oder Makrophagenaktivität (Frischer et al., 2015; Kuhlmann et al., 2017; Luchetti et al., 2018).

Die frühen aktiven demyelinisierenden Plaques der WM sind gekennzeichnet durch vier Subtypen, die sich über Monate entwickeln und über heterogene pathophysiologische Mechanismen zur Demyelinisierung führen (Lucchinetti et al., 2000). Dies ist insbesondere relevant, da in jeder Patient*in jeweils ein Effektormechanismus mit hoher Konstanz dominiert und somit ein individuelles therapeutisches Ziel darstellt (Lucchinetti et al., 2000; Metz et al., 2014; Popescu et al., 2013). Subtyp I (15 % der Patient*innen) ist assoziiert mit T-Zell-vermittelter Inflammation sowie Mikroglia- und Makrophagenaktivität, während der häufigste Subtyp II (56 % der Patient*innen) zusätzlich Immunglobulin (Ig)-Ablagerungen und Komplementaktivität aufweist. Subtyp III (26 % der Patient*innen) zeichnet sich durch apoptotischen Untergang von Oligodendrozyten bei gleichzeitiger T-zellulärer Inflammation und Mikroglia- und Makrophagenaktivität aus. Der seltene Subtyp IV (< 1 % der Patient*innen) tritt lediglich im Rahmen von PP-MS-Patient*innen auf und zeichnet sich durch einen nicht-apoptotischen Untergang von Oligodendrozyten aus (Lucchinetti et al., 2000; Popescu et al., 2013).

Die Demyelinisierung ist im Rahmen der Pathogenese der MS jedoch nicht auf die WM begrenzt, sondern findet sich auch im Bereich der grauen Substanz des Kortex (Kutzelnigg et al., 2005; Lucchinetti et al., 2011). Ca. 50 % der kortikalen Läsionen treten ebenfalls perivaskulär auf, sind jedoch mit einer geringeren Inflammationsaktivität und einer weniger permeablen BHS assoziiert als Läsionen der WM (Peterson et al., 2001; Reich et al., 2018). Die übrigen Läsionen des Kortex gehen nicht von einzelnen kortikalen Gefäßen aus, sondern sind im Bereich der pialen Hirnoberfläche lokalisiert (Reich et al., 2018). Das Ausmaß an Demyelinisierung, Mikrogliaaktivierung und Neurodegeneration in diesen subpialen Läsionen korreliert mit dem Grad der meningealen Immuninfiltration (Howell et al., 2011; Magliozzi et al., 2007). Bereits in der Frühphase der MS lässt sich eine meningeale Immuninfiltration detektieren, welche jedoch insbesondere mit progredienten Verlaufsformen assoziiert ist (Kutzelnigg et al., 2005; Lucchinetti et al., 2011; Magliozzi et al., 2007). Insbesondere in SP-MS-Patient*innen zeigen zudem eine kompartimentalisierte Organisation dieser Immuninfiltrate aus eng-gepackten B- und Plasmazellen sowie T-Zellen, welche aufgrund der ablaufenden lymphozytären Reifungsprozesse auch als tertiär-lymphatische Organe bezeichnet werden (Magliozzi et al., 2007; Serafini et al., 2004; Serafini et al., 2016). Diese Strukturen sind in Abschnitt 1.2.2 näher beschrieben.

Während in den klassischen aktiven demyelinisierenden Läsionen Axone zunächst weniger stark betroffen sind, akkumulieren im Verlauf der Erkrankung zunehmend axonale und neuronale Schäden und führen zum irreversiblen Verlust der neuronalen Konnektivität (Mahad et al., 2015; Popescu und Lucchinetti, 2012). Die kortikale Degeneration erscheint insbesondere auf zwei Mechanismen zu beruhen. Einerseits kommt es durch die meningealen Immuninfiltrate zur Sekretion von toxischen Metaboliten und pro-inflammatorischen Zytokinen, die im Bereich der kortikalen Grauen Substanz zur Neurodegeneration führen (Haider et al., 2016; Magliozzi et al., 2019; Magliozzi et al., 2018). Andererseits kommt es durch Verlust der Myelinscheide zu einem erhöhten Energiebedarf der Axone, was nach Erschöpfung von mitochondrialen Kompensationsmechanismen, fehlender trophischer Unterstützung durch Oligodendrozyten und oxidativen Stress im Verlauf ebenso wie primäre Unterbrechungen von Axonen in aktiv demyelinisierenden Plaques in eine retrograde Neurodegeneration mündet (Friese et al., 2014; Haider et al., 2016; Mahad et al., 2015; Trapp et al., 1998).

Jedoch können im Krankheitsverlauf remyelinisierende Prozesse die Myelinscheiden wiederherstellen und durch Verbesserung der neuronalen Übertragung und der trophischen Situation der Axone neuroprotektiv wirken (Lubetzki et al., 2020; Nave, 2010). Eine fortgeschrittene Remyelinisierung führt zur Ausbildung sogenannter „Shadow-Plaques“, klar-begrenzte Bereiche gekennzeichnet durch eine geringere Myelindichte, disproportional dünne Myelinscheiden und verkürzte internodale Abstände (Popescu und Lucchinetti, 2012). Insgesamt zeigen Patient*innen mit progredienten MS-Verläufen im Vergleich zu RR-MS-Patient*innen ein geringeres Ausmaß an Remyelinisierung, was entweder auf eine weniger effiziente Remyelinisierung oder auf erneute inflammatorische Demyelinisierung im Rahmen einer chronisch-aktiven Plaqueprogression zurückzuführen ist (Bramow et al., 2010; Goldschmidt et al., 2009). Ein Mechanismus der Remyelinisierung ist die Differenzierung von Oligodendrozytenvorläuferzellen (*Oligodendrocyte Progenitor Cells* = OPCs) zu reifen Oligodendrozyten, welche für die Neusynthese der Myelinscheide verantwortlich sind (Zawadzka et al., 2010). Interessanterweise scheint das Ausmaß der Differenzierung von OPCs und der Remyelinisierung unter anderem abhängig von der infiltrierenden Lymphozytenpopulation zu sein. So zeigten Tiermodellstudien, dass regulatorische T-Zellen die Differenzierung von OPCs zu reifen Oligodendrozyten und die anschließende Remyelinisierung verstärken können, während T_H17-Zellen das Ausmaß an Remyelinisierung reduzieren (Baxi et al., 2015; Dombrowski et al., 2017). Die Remyelinisierung stellt somit ein attraktives Therapieziel zur Prävention von Neurodegeneration und klinischer Progression da, welche auch durch Immunmodulation beeinflussbar sein kann (Harlow et al., 2015; Lubetzki et al., 2020).

1.2.1 Die Rolle der B-Zellen

Während die MS lange, insbesondere aufgrund von Ergebnissen aus Tiermodellstudien, als vornehmlich T-Zell-vermittelte Erkrankung angesehen wurde, ist zunehmend die essenzielle Rolle von B-Lymphozyten für Inflammation und Neurodegeneration anerkannt (Comi et al., 2021; Li, R. et al., 2018).

Ein lange etablierter Hinweis auf eine Rolle von B-Zellen in der Pathogenese der MS stellen oligoklonale Banden (OKBs) aus Ig im Liquor dar (Greenfield und Hauser, 2018). Bereits im Rahmen der ersten klinischen Symptomatik sind OKBs bei 90 % der

Patient*innen detektierbar und zeichnen sich durch ein individuell spezifisches Muster aus (Krumbholz et al., 2012; Yu et al., 2011). Mittlerweile wurden OKBs in die Diagnosekriterien nach McDonald zum Nachweis einer zeitlichen Dissemination aufgenommen (Thompson et al., 2018a). Durch Assoziation mit spezifischen autoreaktiven (AK) im Serum wurden in den vergangenen Jahren zwei ebenfalls demyelinisierende Erkrankungen von der MS abgegrenzt: die Aquaporin-4-AK positive *Neuromyelitis-optica*-Spektrum-Erkrankung und die Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein-AK (MOG) positive MOG-assoziierte Erkrankung (Jarius und Wildemann, 2010; Oertel et al., 2021; Weber et al., 2018).

Auch nach intensiver Forschung ist die Suche nach einem oder mehreren MS-spezifischen Antigenen fortlaufend (Comi et al., 2021). Neurofascin, Contactin-2 oder KIR 4.1 wurden als mögliche Auto-Antigene postuliert (Derfuss et al., 2009; Mathey et al., 2007; Schirmer et al., 2014; Srivastava et al., 2012), ihr Stellenwert in der Pathologie der MS bleibt jedoch umstritten, insbesondere da beispielsweise die Bindung von Liquor-AK an unspezifischen Zelldetritus die Schlussfolgerung zulässt, dass es sich bei der Auto-AK-Produktion lediglich um ein unspezifisches Epiphänomen der ablaufenden Inflammation handeln könnte (Brandle et al., 2016; Greenfield und Hauser, 2018). Andererseits besitzen AK, produziert von Plasmazellklonen aus dem Liquor von MS-Patient*innen, die Fähigkeit in humanem und murinem ZNS-Gewebe zu binden und eine Demyelinisierung auszulösen (Blauth et al., 2015).

Weitere pathologische und klinische Argumente sprechen ebenso für einen Auto-AK vermittelten Effekt. So ist der häufigste Läsionstyp in Autopsiestudien nach Lucchinetti et al. (2000) (Typ-II; siehe Abschnitt 1.2) gekennzeichnet durch Ig-Bindung und Komplementaktivierung (Metz et al., 2014). Patient*innen, die diesen Läsionstyp aufweisen, profitieren zudem stärker durch eine Plasmapheresebehandlung als Patient*innen, die einen anderen pathologischen Subtyp aufweisen (Keegan et al., 2005). Neben der AK-Produktion durch B-Zellen ist insbesondere deren Funktion als antigenpräsentierende Zelle (APZ) relevant. Antigene, die an den B-Zell-Rezeptor an der Oberfläche von Gedächtnis-B-Zellen binden, werden zunächst internalisiert, prozessiert und im Verlauf über MHC-II-Rezeptoren T-Lymphozyten präsentiert. Diese Präsentation in Zusammenhang mit pro-inflammatorischen Zytokinen führt zur Aktivierung von T-Lymphozyten (Greenfield und Hauser, 2018; Harp et al., 2010; Harp et al., 2008). In einem

B-Zell-abhängigen Mausmodell wurde zudem gezeigt, dass durch spezifisches MHC-II-Gen-*Knock-out* auf B-Zellen, nicht jedoch auf anderen APZs, die Krankheitsentstehung verhindert wird, unabhängig von der Myelin-spezifischen AK-Produktion (Molnarfi et al., 2013).

Ein weiterer AK-unabhängiger Mechanismus ist der lokale Einfluss von B-Zellen durch deren pro- bzw. antiinflammatorische Zytokinsekretion. B-Zellen unbehandelter MS-Patient*innen weisen eine übermäßige Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine wie Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), Lymphotoxin- α , Interleukin (IL)-6 sowie Granulozyten-Monozyten-Kolonien-stimulierender-Faktor im Verhältnis zu antiinflammatorischem IL-10 und IL-35 auf (Li, R. et al., 2018).

Betrachtungen von B-Zell-Populationen im ZNS sowie drainierenden Lymphknoten (LK) und Blut weisen auf einen bidirektionalen Austausch mit lymphozytären Reifungsprozessen auf beiden Seiten der BHS hin (Palanichamy et al., 2014; Stern et al., 2014). Somit ist die Drainage von B-Zellen aus dem ZNS in die Peripherie und die dortige subsequente T-Zell-Aktivierung ein potenzieller Mechanismus zur Auslösung von Schubereignissen in RR-MS-Patient*innen (Michel et al., 2015). Der Einfluss von peripheren B-Zellen auf die Schubrate wird weiter gestützt durch eine *Enzym-linked Immunospot Assay* (ELISPOT)-Studie durch Hohmann et al. (2014), die ZNS-reaktive B-Zellen im peripheren Blut als Risikofaktor für das Auftreten eines Schubes in einer Subpopulation von RR-MS-Patient*innen innerhalb eines Zeitraums von 10 Monaten identifizierte. Der Einfluss von B-Zell-depletierenden Therapeutika auf Krankheitsprogress und Schubrate ist ausführlich in Abschnitt 1.4 beschrieben.

1.2.2 Tertiär-lymphatische Organe

Lymphatische Organe sind hoch-spezialisierte Gewebe, die über komplexe Regulationsmechanismen die Reifung und Differenzierung von Lymphozyten und somit die adaptive Immunantwort an sich koordinieren. Während Knochenmark und Thymus als primär-lymphatische Organe Orte der Selektion und Reifung von naiven B- und T-Lymphozyten aus hämatopoetischen Stammzellen darstellen, sind sekundär-lymphatische Organe (SLOs), bestehend aus LK, Milz und Mukosa-assoziiertem lymphatischem Gewebe, Orte der B- und T-zellulären Aktivierung und Reifung (Aloisi und Pujol-Borrell, 2006; Nerviani und Pitzalis, 2018). Neben diesen physiologisch

auftretenden Organen kommt es im Rahmen von Autoimmunerkrankungen wie bspw. der rheumatoiden Arthritis, der Myasthenia gravis und der MS sowie im Rahmen von Transplantatabstoßungen, Neoplasien und Infektionserkrankungen in räumlicher Nähe zu den betroffenen Organen zur Entstehung sogenannter tertiär-lymphatischer Organe (TLOs) (Aloisi und Pujol-Borrell, 2006; Nerviani und Pitzalis, 2018).

TLOs ähneln in ihrem strukturellen Aufbau mit Ausbildung einer T-Zell-Zone, einer zentralen B-Zell-Zone, einem Netzwerk aus follikulär-dendritischen Zellen (FDZ) und hochendothelialen Venolen (HEV) stark SLOs und sind wie auch diese verantwortlich für die Aktivierung von B- und T-Lymphozyten und die Keimzentrumsreaktion zur Ausdifferenzierung von Gedächtnis-B-Zellen und Plasmazellen aus naiven B-Zellen sowie zu AK-Reifung und Ig-Klassenwechsel (Aloisi und Pujol-Borrell, 2006; Nerviani und Pitzalis, 2018). Während die Organogenese von SLOs abhängig von der Interaktion von Lymphoid-Gewebs-induzierenden- sowie von mesenchymalen Lymphoid-Gewebs-organisierenden-Zellen sind (Nerviani und Pitzalis, 2018), scheint die Entwicklung von TLOs im Rahmen chronischer Inflammation insbesondere abhängig von T_H17 -Lymphozyten und der Zytokinproduktion über IL-17 und IL-22 zu sein (Grogan und Ouyang, 2012; Peters et al., 2011; van de Pavert und Mebius, 2010). Es kommt in der Folge der initialen Reaktion über die Zytokine CXCL-12 und -13 zur Migration und Aggregation naiver B-Zellen und zur Ausbildung von Keimzentren (Nerviani und Pitzalis, 2018).

Den ersten Nachweis von TLOs in der Pathogenese der MS erbrachten Serafini et al. (2004) durch den Nachweis von B-Zell-Follikeln in Autopsiepräparaten von MS-Patient*innen. Diese wiesen mit einer kompartmentalisierten B- und T-Zell-Zone, FDZs, HEV sowie CXCL-13 deutliche Hinweise für die typischen Mechanismen der lymphozytären Reifung in TLOs auf (Serafini et al., 2004). Die Aggregate ließen sich in ca. 40 % der untersuchten SP-MS-Patient*innen nachweisen und waren zudem assoziiert mit einem früheren Erkrankungsbeginn, einem früheren Übergang zur SP-MS, einer früheren Akkumulation irreversibler Behinderung sowie einem früheren Todeszeitpunkt (Howell et al., 2011; Magliozzi et al., 2007; Serafini et al., 2004). Histologisch zeigte sich eine Assoziation der B-Zell-Follikel zu einer ausgeprägteren kortikalen Pathologie mit Demyelinisierung, Mikrogliaaktivierung und Neuronenverlust. Zudem ließen sich die in den meningealen B-Zell-Follikeln detektierten B-Zell-Klone auch in den parenchymalen

Immuninfiltraten nachweisen (Howell et al., 2011; Lovato et al., 2011; Magliozzi et al., 2007). Da Demyelinisierung und Neurodegeneration ohne Nachweis von Lymphozyten im Kortex detektiert wurden, ging man von löslichen Faktoren aus, welche durch die Immuninfiltrate sekretiert werden und entweder direkt neurotoxisch und/oder indirekt über eine Aktivierung der Mikroglia wirken (Kutzelnigg et al., 2005; Magliozzi et al., 2010). Insbesondere sekretierte Faktoren aus B-Zell-Kulturen von RR-MS-Patient*innen wiesen die Produktion von Apoptose-auslösenden neurotoxischen Substanzen auf (Lisak et al., 2012; Lisak et al., 2017). Zudem fand sich in einer Analyse von Liquorproteinprofilen von MS-Patient*innen eine Korrelation zwischen progressiven MS-Verlaufsformen und ausgeprägter kortikaler Pathologie mit Proteinen, die mit der TLO-Formation assoziiert waren (Magliozzi et al., 2018). Die pathophysiologische Relevanz von TLOs für die MS bleibt jedoch weiter umstritten, da Kooi et al. (2009) kortikale Demyelinisierung auch in Abwesenheit meningealer Inflammation und B-Zell-Aggregation nachwiesen.

Ebenso umstritten bleibt der zunächst von Serafini et al. (2010) postulierte Einfluss einer bereits in Abschnitt 1.1.2 beschriebenen EBV-Infektion auf die zerebrale B-Zell-Aggregation. Ein möglicher Pathomechanismus der latenten B-Zell-Infektion für die MS ist eine überschießende Proliferation und Reifung von B-Zellen mit subsequenter Aggregation sowie eine durch die in-situ Reaktivierung der Infektion ausgelöste zytotoxische Immunantwort auf umliegendes Gewebe (Magliozzi et al., 2013; Serafini et al., 2014; Veroni et al., 2018). In anderen Studien konnten diese Ergebnisse nicht repliziert werden (Peferoen et al., 2010; Willis et al., 2009), möglicherweise aufgrund methodisch-technischer Differenzen der Nachweisverfahren (Aloisi et al., 2010).

1.3 Tiermodelle der Multiplen Sklerose

Tiermodelle sind ein essentieller Bestandteil in der Analyse der Krankheitsentstehung und Pathogenese der MS sowie in der Entwicklung neuer Therapieoptionen für Betroffene (Robinson et al., 2014). Jedoch können lediglich einzelne pathophysiologische Aspekte der MS, nicht jedoch die Erkrankung in Gänze in Tiermodellen abgebildet werden (Lassmann und Bradl, 2017).

Das am meisten untersuchte Tiermodell der MS stellt die experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis (EAE) dar, welche durch aktive Immunisierung mittels ZNS-Antigenen ausgelöst wird. Dieses Modell ist näher in Abschnitt 1.3.1 beschrieben. Zudem kann die

EAE auch durch passiven T-Zell-Transfer bzw. Co-Transfer von T-Zellen und autoreaktiven AK sowie spontan durch transgene Etablierung von beispielsweise autoreaktiven T-Zell-Rezeptoren ausgelöst werden (Lassmann und Bradl, 2017).

Weitere Tiermodelle erzielen durch Exposition mit einem Toxin eine primäre Demyelinisierung, die weitestgehend unabhängig von Prozessen des adaptiven Immunsystems stattfindet. Die systemische Exposition mit dem Kupfer-Chelator Cuprizone führt in den Versuchstieren durch metabolischen Stress zur Apoptose von Oligodendrozyten und Myelindegeneration, während es durch Aussetzen der Exposition im Verlauf zur spontanen Remyelinisierung kommt (Praet et al., 2014).

Zudem kann mittels Infizierung mit bestimmten Virusstämmen, bspw. dem Theilerschen Enzephalomyelitis-Virus oder dem Maus-Hepatitis- (Corona-) Virus in empfänglichen Versuchstieren eine Inflammation, Demyelinisierung und Neurodegeneration ausgelöst werden. Diese Modelle eignen sich daher zur Analyse möglicher Einflüsse viraler Infektionen auf die Etablierung von autoimmunen Prozessen im ZNS (Denic et al., 2011; Lassmann und Bradl, 2017).

Zwar zeigen Erfolge wie die Einführung von MS-Therapien wie Glatirameracetat (GA) oder Natalizumab auf Basis von EAE-Studien das wissenschaftliche Potenzial von Tiermodellen (Lassmann und Bradl, 2017; Robinson et al., 2014; Teitelbaum et al., 1971; Yednock et al., 1992), jedoch konnte bisher keines dieser Modelle die Gesamtheit der pathophysiologischen Merkmale der MS adäquat abbilden. Daher müssen die vorhandenen Tiermodelle für spezifische Fragestellungen verwendet werden und die Aussagekraft von Studienergebnisse für die MS an sich muss vor diesem Hintergrund kritisch hinterfragt werden (Lassmann und Bradl, 2017).

1.3.1 Die experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis

Die EAE eignet sich insbesondere aufgrund der immunologischen und histopathologischen Parallelen zur MS, sowie der autoimmunen Genese zur Untersuchung pathophysiologischer Mechanismen sowie möglicher therapeutischer Angriffspunkte der MS (Batoulis et al., 2011; Kipp et al., 2017).

Die Entdeckung der EAE als Modell einer autoimmunen ZNS-Erkrankung beruht auf der Feststellung, dass eine unzureichend von ZNS-Antigenen gereinigte Rabies-

Schutzimpfung bei einigen Menschen zur Ausbildung einer akuten neuronalen Autoimmunreaktion mit klinischen Parallelen zur MS führte (Lassmann und Bradl, 2017). Dieses Konzept wurde zur Etablierung der EAE auf verschiedene Tierspezies, unter anderem Primaten, Meerschweinchen und Ratten, durch Applikation von gelöstem Hirngewebe übertragen, was jedoch nur in einem Bruchteil der Tiere zur Ausbildung einer ähnlichen ZNS-Pathologie wie im Menschen führte (Batoulis et al., 2011; Lassmann und Bradl, 2017). Um die Reproduzierbarkeit der Erkrankungsinduktion in Versuchstieren zu erhöhen, wurden Adjuvantien etabliert. Komplettes Freundesches Adjuvans (CFA) gewährleistet eine kontinuierliche Freisetzung des Antigens sowie eine ausgeprägte Stimulation der Immunantwort aufgrund inaktivierter *Mycobacterium tuberculosis*-Erreger (Kabat et al., 1951; Lassmann und Bradl, 2017). In Nagetieren ist zur Krankheitsinduktion häufig zusätzlich die Gabe von Pertussis-Toxin notwendig (Lassmann und Bradl, 2017). Diese führt einerseits zu einer erhöhten Permeabilität der BHS (Kugler et al., 2007; Lu et al., 2008) sowie zu einer erhöhten klonalen Expansion Neuroantigen-spezifischer T-Zellen (Hofstetter et al., 2002). Durch CFA kommt es zu einer ausgeprägten Phagozytose und MHC-II-abhängigen Antigenpräsentation sowie nachfolgender Aktivierung von CD4⁺-T-Lymphozyten. Dies führte zu der Annahme, dass sowohl die Pathogenese der EAE als auch der MS hauptsächlich T-lymphozytär vermittelt sei (Batoulis et al., 2010; Billiau und Matthys, 2001; Lassmann und Bradl, 2017).

Besonderes wissenschaftliches Interesse gilt der EAE-Induktion in Mäusen, insbesondere des C57BL/6-Inzuchtstamms (B6). Aufgrund der großen Verfügbarkeit transgener Tiere sind mechanistische Analysen durch *knock-in* bzw. *knock-out* spezifischer Gene in diesen Mausstämmen deutlich erleichtert (Kipp et al., 2017; Robinson et al., 2014).

Wurde zunächst unspezifisches gelöstes ZNS-Gewebe zur Krankheitsinduktion verwendet, kamen im Verlauf vor allem synthetisierte Proteine bzw. Peptidsequenzen von Myelinscheidenproteinen wie MOG, Myelin-basisches Protein (MBP), sowie Proteolipid-Protein (PLP) bzw. Fusionsproteine aus einer Kombination derer zur Anwendung (Batoulis et al., 2011; Denic et al., 2011; Robinson et al., 2014). Abhängig von dem genetischen Hintergrund der Versuchstiere, dem zur Immunisierung verwendeten Antigen, sowie dem Immunisierungsprotokoll ergeben sich verschiedene klinische Verlaufsformen der EAE (Batoulis et al., 2011). So zeigt bspw. die häufig verwendete MOG₃₅₋₅₅-induzierte EAE in B6-Mäusen einen chronischen Verlauf ohne Schübe. Sie gilt

zudem als rein T-lymphozytär-vermittelt, da der Krankheitsverlauf in B-Zell-defizienten *Knock-out*-Tieren und Wildtyp-Kontrollen vergleichbar ist. Im Gegensatz hierzu ist die Pathogenese durch humanes rekombinantes MOG₁₋₁₂₀ (rMOG) in B6-Versuchstieren B-Zell-abhängig (Hjelmstrom et al., 1998; Kipp et al., 2017; Lyons et al., 1999). Die Immunisierung durch PLP führt in Mäusen des SJL/J-Inzuchtstammes zu einer schubförmigen Verlaufsform (McRae et al., 1992; Pollinger et al., 2009).

1.3.2 Das MP4 - EAE-Modell

Ein weiteres B-Zell-abhängiges Tiermodell stellt die MBP-PLP-Fusionsprotein (MP4) - induzierte EAE dar. In diesem Modell erfolgt die Immunisierung durch ein Fusionsprotein der 21 kD Isoform von MBP, sowie der drei hydrophilen Domänen von PLP in B6-Mäusen (Kuerten et al., 2006).

Das MP4-Protein galt zunächst als potenzielle Therapieoption für die MS, da nach systemischer Applikation des Fusionsproteins einer MBP- bzw. PLP-induzierten EAE in SJL/J-Versuchstieren vorgebeugt bzw. eine bestehende EAE abgemildert werden konnte. SJL/J- und B6-Mäuse sowie Seidenaffen ließ sich jedoch durch Applikation von MP4 in CFA zudem eine EAE auslösen (Elliott et al., 1996; Jordan et al., 1999; Kuerten et al., 2006; Lichtenegger et al., 2007). Der Krankheitsverlauf der MP4-EAE in B6-Mäusen ist chronisch ohne klinische Remissionen oder Schubereignisse (Kuerten et al., 2006). Es zeigt sich zudem eine dynamische Topographie im Krankheitsverlauf der EAE. Während im Verlauf der initialen Inflammationsausbildung vor allem das Großhirn betroffen ist, entwickeln sich im Verlauf Läsionen im RM und zuletzt im *Cerebellum* (Kuerten et al., 2007). Im RM zeigte sich eine über den Krankheitsverlauf zunehmende chronische Demyelinisierung und ein Axonverlust bereits zu Symptombeginn (Kuerten et al., 2011a; Prinz et al., 2015; Recks et al., 2013).

Interessanterweise besteht im MP4-EAE-Modell, im Gegensatz zu EAE-Modellen wie der MOG₃₅₋₅₅-EAE, eine Korrelation zwischen der Anzahl und Größe von ZNS-Läsionen sowie deren lymphozytären Zusammensetzung und den klinischen EAE-Scores. Dies ermöglicht die Quantifizierung der Krankheitsaktivität und des Effekts einer therapeutischen Intervention nicht nur anhand der Symptomausprägung, sondern zudem auch anhand der Läsionslast und Infiltratzusammensetzung (Kuerten et al., 2008; Kuerten et al., 2007).

Zudem zeigt sich eine Korrelation zwischen der Morphologie der Immuninfiltrate und der Erkrankungsphase der MP4-EAE. In der akuten Phase ist das histologische Bild geprägt von einer MHC-II-abhängigen Antigenpräsentation mit subsequenter Stimulation CD4⁺ T-Zellen und Aktivierung von Makrophagen und Granulozyten, vergleichbar mit der MOG₃₅₋₅₅ induzierten EAE. In der chronischen Phase, ca. 60 Tage nach Immunisierung, dominieren B-Zellen das histologische Bild mit einer zudem erhöhten Zahl CD8⁺ T-Zellen und dendritischer Zellen (Kuerten et al., 2008). Dieses lymphozytäre Muster ist hochrelevant für die MP4-EAE-Pathogenese. So entwickeln immunisierte B-Zell-defiziente μ MT- und J_HT-Mausstämme weder klinische noch histopathologische Erkrankungszeichen. In immunisierten B6-Wildtyp-Mäusen entsteht eine MP4-spezifische und Myelin-reaktive IgG1 und IgG2a Serum-AK-Reaktion. Jedoch führt ein Transfer dieser Auto-AK in ebenfalls immunisierten B-Zell-defizienten Maus-Stämmen zur Ausprägung einer klinischen EAE. Dies zeigt die Notwendigkeit einer suffizienten B-Zell-Reaktion zur Etablierung der MP4-EAE. Zudem zeigten CD8-defiziente B6-Stämme einen verzögerten Krankheitsbeginn (Kuerten et al., 2008; Kuerten et al., 2006; Kuerten et al., 2011b).

Ein weiteres Merkmal der MP4-EAE ist die Ausbildung von ektooper lymphatischer Organisation in der chronischen Erkrankungsphase. Insbesondere im *Cerebellum* lassen sich parenchymale perivaskuläre B-Zell-Aggregate in Anwesenheit von CXCL-13 nachweisen, welche mit HEV, FDC sowie Plasmazellen und einer lymphozytären Kompartimentalisierung die typischen histopathologischen Merkmale für TLOs erfüllen (Batoulis et al., 2015; Kuerten et al., 2008; Kuerten et al., 2012). Diese stellen nicht nur ein pathologisches Epiphänomen dar, sondern zeigen lymphozytäre Proliferation und somatische Hypermutation sowie eine Ausweitung der B- und T-zellulären Reaktion auf weitere Epitope der Myelinscheide (Batoulis et al., 2015; Kuerten et al., 2012).

Die Entstehung von TLOs in den *Cerebella* von MP4-EAE-Versuchstieren scheint insbesondere abhängig von T_H-17-Lymphozyten, zudem kommt es innerhalb der Aggregate zur verstärkten Genexpression von *Il17f* und zu einem T_H17-abhängigen AK-Klassenwechsel (Batoulis et al., 2015; Kuerten et al., 2012; Schropp et al., 2019).

1.4 Pharmakologische Therapien der Multiplen Sklerose

Seit 1993 das erste Medikament zur Behandlung der MS zugelassen wurde, kam es zu einem immensen Zuwachs an pharmakologischen Therapieoptionen. Die aktuellen MS-

Therapeutika modulieren über verschiedene Mechanismen die Immunantwort und reduzieren so die Schubrate und zum Teil auch den schubunabhängigen Krankheitsprogress. Eine dauerhafte Heilung der Erkrankung ist bisher jedoch nicht möglich (Hauser und Cree, 2020; Ransohoff et al., 2015; Tintore et al., 2019).

Im Rahmen von akuten Exazerbationen im Verlauf der RR-MS werden Glukokortikoide als primäre Schubbehandlung eingesetzt. Glukokortikoide supprimieren die zelluläre Immunreaktion durch Apoptoseinduktion, reduzieren die Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine wie IL-2, Interferon- (INF) γ sowie TNF- α und reduzieren die lymphozytäre Migration durch Stabilisierung der BHS (Leussink et al., 2001; Myhr und Mellgren, 2009; Winkelmann et al., 2014). Bei unzureichender Reduktion der Schubsymptomatik durch Glukokortikoide ist eine Eskalation der Therapie durch Plasmapherese oder Immunadsorption möglich (Faissner et al., 2016).

Zur dauerhaften Reduktion der Schubfrequenz und Krankheitsaktivität in der RR-MS kommen krankheitsmodifizierende Therapien (*Disease Modifying Therapy* = DMT) mit unterschiedlich ausgeprägter Effektivität zum Einsatz (Hauser und Cree, 2020). Als RR-MS-Therapieoptionen mit geringer Effektivität gelten INF- β -Präparate und GA, welche entweder subkutan (s.c.) oder intramuskulär (i.m.) injiziert werden sowie das oral verfügbare Teriflunomid. Moderate Effektivität weisen die ebenfalls oral verfügbaren Substanzen Fingolimod, Siponimod und Ozanimod auf, welche über den Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptor wirken, sowie die ebenfalls oral verfügbaren Substanzen Cladribin und Dimethylfumarat. Die höchste Effektivität wird durch intravenöse (i.v.) Applikation der monoklonalen AK Natalizumab, Ocrelizumab und Alemtuzumab sowie s.c.-Gabe von Ofatumumab erreicht (Hauser und Cree, 2020).

Die Fülle an verfügbaren DMTs hat zwar einerseits die therapeutischen Optionen für RR-MS-Patient*innen deutlich verbessert, führt jedoch andererseits zu einem zunehmend komplexeren Therapiemanagement (Ransohoff et al., 2015; Thompson et al., 2018b). Man unterscheidet diesbezüglich zwei Optionen des klinischen Managements: Eskalations- und Induktionsstrategie (Thompson et al., 2018b). In ersterer beginnt man mit einer niedrig-effektiven Therapieoption mit hoher Sicherheit, wie INF- β und GA, welche in diesem Zusammenhang auch als Basistherapeutika bezeichnet werden. Bei unzureichender Suppression der Krankheitsaktivität erfolgt eine Eskalation der Therapie mit Substanzen höherer Effektivität (Hauser und Cree, 2020; Thompson et al., 2018b;

Winkelmann et al., 2014). Insbesondere bei hoher Krankheitsaktivität zum Diagnosezeitpunkt wird jedoch zunehmend die Induktionsstrategie praktiziert. In dieser beginnt man mit einem hoch-effektiven Therapeutikum mit dem Ziel einer Krankheitsremission und deeskaliert ggf. hin zu einem Therapeutikum mit geringerer Effektivität und ggf. besserer Verträglichkeit zur weiteren Krankheitskontrolle (Hauser und Cree, 2020; Thompson et al., 2018b).

Während die Reduktion der Schubrate über viele Jahre als primärer Surrogatmarker für die Effektivität von MS-Therapeutika verwendet wurde, hat sich in den letzten Jahren die Abwesenheit nachweisbarer Krankheitsaktivität (*No Evidence of Disease Activity* = NEDA), definiert durch Krankheitsschübe, neue oder vergrößerte MRT-Läsionen sowie einen schubunabhängigen Behinderungsprogress, als Therapie- und Studienziel etabliert, obgleich die Studienlage bzgl. der langfristigen prognostischen Relevanz uneinheitlich ist (Cree et al., 2016; Giovannoni et al., 2018; Tsantes et al., 2020).

Nachdem lange Zeit keine den Krankheitsverlauf modifizierende Therapieoption für progrediente Verläufe verfügbar war, konnte auch dieser Meilenstein der MS-Therapie durch Zulassung des monoklonalen AK Ocrelizumab für PP-MS- (siehe Abschnitt 1.4.1) sowie Siponimod für SP-MS-Patient*innen erreicht werden (Dumitrescu et al., 2019; Montalban et al., 2017).

1.4.1 Monoklonale Antikörper als Therapieoption

Die Therapeutika mit der höchsten therapeutischen Effektivität in der Behandlung der RR-MS stellen aktuell monoklonale AK verschiedener Spezifität dar (Akaishi und Nakashima, 2017; Hauser und Cree, 2020). Der erste zur Behandlung der RR-MS zugelassene AK war Natalizumab, welcher i.v. appliziert wird (Ransohoff et al., 2015). Dieser monoklonale humanisierte IgG₄-AK bindet an α -4-Integrin, einem Bestandteil des *Very Late Antigen 4*, welcher auf Lymphozyten exprimiert ist und durch Interaktion mit *Vascular Cell Adhesion Molecule* auf dem Gefäßendothel interagiert (Yednock et al., 1992). Natalizumab bindet an das Molekül und verhindert somit effektiv den Übertritt von Leukozyten über die BHS (Tintore et al., 2019). Mit einer Reduktion der jährlichen Schubrate um > 65 % sowie eine Reduktion von > 90 % neuer inflammatorischer Läsionen ist Natalizumab eine hocheffiziente Therapieoption für RR-MS-Patient*innen (Polman et al., 2006; Rudick et al., 2006). In seltenen Fällen führt Natalizumab jedoch über eine Reaktivierung des John-

Cunningham-Virus (JC-Virus) im ZNS zur potenziell tödlich verlaufenden progressiven-multifokalen-Leukenzephalopathie, weshalb eine individuelle Risikoabwägung vor Therapiebeginn und Monitoring von Anti-JC-Virus-AK unter Therapie notwendig ist (Ho et al., 2017).

Ein weiteres hocheffektives Therapiekonzept zur Krankheitskontrolle der RR-MS ist die Depletion CD20⁺ B-Zellen durch monoklonale AK wie Rituximab, Ocrelizumab und Ofatumumab (Hauser und Cree, 2020; Sabatino et al., 2019). Obgleich der murin-humane-chimäre IgG1-AK Rituximab in Phase-II-Studien eine Reduktion der jährlichen Schubrate > 50 % sowie eine Reduktion neuer KM-aufnehmender Läsionen in MRT-Studien um 90 % erzielte (Hauser et al., 2008; Sabatino et al., 2019), wurde u.a. aufgrund ökonomischer Erwägungen keine Zulassung für die MS angestrebt (Sabatino et al., 2019). Dies erfolgte erst mit Ocrelizumab, einem humanisierten IgG1-AK, der im Vergleich zu IFN- β eine Reduktion der jährlichen Schubrate um 46 - 47 % sowie eine um 40 % geringere Akkumulation von Behinderung bewirkt. NEDA-Status konnte in 48 % der mit Ocrelizumab behandelten RR-MS-Patient*innen erreicht werden, mehr als unter jeder andere DMT (Hauser et al., 2017; Sabatino et al., 2019). Zudem zeigte Ocrelizumab in einem Kollektiv aus PP-MS-Patient*innen eine signifikante Senkung des klinischen Progresses sowie eine geringere MRT-Läsionslast (Montalban et al., 2017), während Rituximab in einer ähnlichen Studie keinen signifikanten Effekt in der Behandlung von PP-MS-Patient*innen im Vergleich zu Placebo erzielen konnte (Hawker et al., 2009). Der letzte zugelassene Anti-CD20-AK ist der humane IgG1-AK Ofatumumab, welcher zugleich den ersten s.c. applizierbaren monoklonalen AK in der MS-Therapie darstellt und eine ähnliche Effektivität in der Behandlung von RR-MS-Patient*innen aufweist wie Ocrelizumab, bei gutem Nebenwirkungsprofil (Hauser et al., 2020; Hauser und Cree, 2020).

Die hohe Effektivität von B-Zell-depletierenden AK in RR-MS- sowie der krankheitsmodulierende Effekt von Ocrelizumab in PP-MS-Patient*innen unterstreicht weiter die hohe pathophysiologische Relevanz der B-Zellen in der MS (Greenfield und Hauser, 2018).

1.4.2 Alemtuzumab

Eine weitere hocheffektive Therapieoption für die Behandlung der RR-MS ist Alemtuzumab, ein rekombinanter monoklonaler humanisierter IgG1 κ -AK auf Grundlage eines monoklonalen IgG2a-AK der Ratte, der an das Zelloberflächenmolekül CD52 bindet und zur Depletion der Zielzelle führt (Hauser und Cree, 2020; Li, Z. et al., 2018). Zunächst unter dem Namen Campath-1H entwickelt, war Alemtuzumab der erste humanisierte monoklonale AK und zur Behandlung der chronisch-lymphatischen B-Zell-Leukämie zugelassen, bevor im Jahr 2013 unter dem Handelsnamen Lemtrada® die Zulassung zur Behandlung der RR-MS in der Europäischen Union erfolgte (Europäische Arzneimittelagentur, 2021; Li, Z. et al., 2018; Waldmann und Hale, 2005). Das empfohlene Therapieschema sieht aktuell zwei Behandlungszyklen vor; eine initiale Behandlung über 5 Tage sowie ein erhaltender Zyklus über 3 Tage nach 12 Monaten mit jeweils 12 mg/d i.v., welcher ggf. bei erneuter oder fortbestehender Erkrankungsaktivität nach mindestens 12 Monaten wiederholt werden kann (Berger et al., 2017; Li, Z. et al., 2018).

Das Zielantigen CD52 ist ein aus 12 Aminosäuren bestehendes Glycosylphosphatidylinositol-verankertes Glykoprotein (Xia et al., 1993). Es wird im Menschen in hohem Maße auf B- und T-Lymphozyten sowie in geringerem Maße auf natürlichen Killer-Zellen (*Natural Killer Cells* = NKC), Monozyten und Makrophagen exprimiert. Neutrophile Granulozyten, dendritische Zellen, lymphatische Stammzellen im Knochenmark sowie Plasmazellen weisen sehr geringe bis keine CD52-Expression auf (Ginaldi et al., 1998; Hu et al., 2009; Kumar et al., 2003; Rao et al., 2012; Rawstron et al., 2006).

Zwar ist die physiologische Rolle des CD52-Moleküls nicht ausreichend verstanden, es scheint jedoch u.a. eine regulatorische Funktion in der T-Zell-Aktivierung zu übernehmen (Toh et al., 2013). So können CD4⁺CD25⁺CD52^{high} T-Lymphozyten autoreaktive T-Zellen supprimieren. Dies erfolgt im Unterschied zu klassischen CD4⁺CD25^{high}FoxP3⁺ regulatorischen T-Zellen durch Freisetzung von löslichem CD52. Dies bindet an den inhibitorisch wirkenden Rezeptor Siglec-10, was zu einer verminderten T-Zell-Rezeptorexpression und konsekutiv zur verminderten T-Zell-Aktivierung führt (Bandala-Sanchez et al., 2013). Zudem führt eine CD52-Quervernetzung durch einen unbekanntem bivalenten Liganden zur Induktion regulatorischer T-Zellen und Hemmung der

Proliferation von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen (Toh et al., 2013; Watanabe et al., 2006). Weiter scheint das CD52-Molekül einen Einfluss auf die transendotheliale Migration von T-Zellen sowie deren Aktivierung zu haben (Masuyama et al., 1999; Rowan et al., 1995).

Der primäre therapeutische Effekt von Alemtuzumab in der MS-Behandlung beruht jedoch auf der raschen und effektiven Depletion CD52-exprimierender Lymphozyten und deren spezifischen Repopulationskinetik (Ruck et al., 2015). Die Depletion erfolgt durch AK-abhängige zellvermittelte Zytotoxizität (*Antibody-Dependent Cell-mediated Cytotoxicity* = ADCC) sowie Komplement-abhängige Zytotoxizität (*Complement-Dependent Cytotoxicity* = CDC) (Rao et al., 2012), wobei in einem transgenen Mausmodell, in denen die Versuchstiere humanes CD52 (huCD52) exprimieren, die Depletion nach Alemtuzumabgabe primär durch NKC und neutrophile Granulozyten und somit ADCC-vermittelt verläuft (Hu et al., 2009). Während B- und T-Lymphozyten aufgrund ihrer hohen CD52-Expression im peripheren Blut nahezu vollständig depletiert werden, sind Leukozyten mit geringerer Expression, insbesondere reife NKC und neutrophile Granulozyten, weniger stark oder gar nicht betroffen (Hu et al., 2009; Rao et al., 2012).

Die Repopulation der B- und T-Lymphozyten und deren Subpopulationen erfolgt nach einem spezifischen zeitlichen Muster (Cox et al., 2005; Hill-Cawthorne et al., 2012). So erreichen B-Zellen bereits nach 3 Monaten ihren Ausgangswert und überschreiten diesen nach 12 Monaten mit 124 - 165 %. Zunächst bildet sich der B-Zell-Pool aus unreifen CD19⁺CD23⁻CD27⁻ transitorischen sowie später aus CD19⁺CD23⁺CD27⁻ maturiert-naiven B-Zellen. Reife CD19⁺CD23⁺CD27⁺ Gedächtnis-B-Zellen folgen erst deutlich verzögert (Heidt et al., 2012; Thompson et al., 2010). T-Lymphozyten hingegen expandieren deutlich langsamer und erreichen nach 12 Monaten lediglich 80 % ihres Ausgangswertes. Im ersten Monat sind CD4⁺CD25⁺CD127^{low} regulatorische T-Zellen (T_{reg}) der dominierende Phänotyp. Anschließend folgen TGF-β1, IL-4 und IL-10 sezernierende T_H2-Lymphozyten bei langsamer Repopulation des T_H1- und T_H17-Phänotyps (Cox et al., 2005; De Mercanti et al., 2016; Haas et al., 2019; Zhang et al., 2013). Die Kinetik der Lymphozytenrepopulation, insbesondere die Expansion regulatorischer T-Lymphozyten und unreifer B-Lymphozyten, gilt als möglicher Mechanismus des langanhaltenden Therapieeffektes durch Alemtuzumab (Cox et al., 2005; Zhang et al., 2013).

In einer Phase-II-Studie (CAMS223), sowie zwei Phase-III-Studien (CARE-MS I und II) zeigte sich die therapeutische Überlegenheit von Alemtuzumab gegenüber IFN- β . In CAMS223 und CARE-MS I bestand die Population aus vormals unbehandelten RR-MS-Patient*innen, während RR-MS-Patient*innen in CARE-MS II Krankheitsaktivität unter vorheriger DMT gezeigt hatten. Alemtuzumab reduzierte in allen Studien die Schubrate effektiver als INF- β 1a. In CAMS223 und CARE-MS II zeigte sich zudem ein reduziertes Ausmaß der Akkumulation dauerhafter Behinderung (Cohen et al., 2012; Coles et al., 2008; Coles et al., 2012). Im 5-Jahres-*Follow-up* beider Phase-III-Studien erfüllten > 50 % der mit Alemtuzumab behandelten Patient*innen die NEDA-Kriterien. Interessanterweise kam es im Vergleich zu INF- β 1a sogar zu einer signifikanten Besserung vorherbestehender Behinderung und einer verminderten jährlichen Hirnatrophierate (Coles et al., 2017; Havrdova et al., 2017). Es zeigte sich weiter eine stabile oder verbesserte krankheitsassoziierten Lebensqualität (Arroyo et al., 2019). Eine vergleichbare Krankheitskontrolle konnte auch in nachfolgenden *open-label*-Studien repliziert werden, inklusive Patient*innen, die bereits unter mehreren DMTs weiter Krankheitsaktivität gezeigt hatten und daher nicht für randomisierte Studien in Betracht gekommen waren (Brecl Jakob et al., 2021; Guarnera et al., 2017; Prosperini et al., 2018). Weiter senkte eine Erstlinientherapie sowie eine frühzeitige Eskalation auf Alemtuzumab das Risiko für den Übergang zur SP-MS im Vergleich zu GA oder INF- β 1a (Brown et al., 2019).

Im Gegensatz zu der Effektivität in der RR-MS-Behandlung zeigte sich in SP-MS-Patient*innen zwar ebenfalls eine signifikante Abnahme der jährlichen Schubrate sowie eine geringere Läsionsformation im MRT, die Therapie hatte jedoch keinen signifikanten Einfluss auf die Akkumulation von Behinderung oder Hirnatrophie (Coles et al., 1999; Moreau et al., 1994). Dieser Unterschied zwischen Behandlungserfolgen in RR-MS- und SP-MS-Patient*innen in Bezug auf neurodegenerative Mechanismen wurde von Coles et al. (2006) als Hinweis auf ein Zeitfenster gewertet, in dem Alemtuzumab aufgrund seiner immunsuppressiven und immunmodulatorischen Effekte prognoseverbessernd wirksam ist und war somit eine wichtige Erkenntnis hin zu einer frühzeitigen effektiven Therapieeinleitung (Coles et al., 1999; Katsavos und Coles, 2018).

Die häufigsten in Studien beobachteten unerwünschten Arzneimittelwirkungen (UAW) umfassen unter anderem infusionsassoziierte Sofortreaktionen, Infektionen sowie

sekundäre Autoimmunerkrankungen und Malignome (Cohen et al., 2012; Coles et al., 2012; Evan et al., 2018).

Im Rahmen der infusionsassoziierten Sofortreaktion kommt es aufgrund der raschen und ausgeprägten Lymphozytendepletion zum Anstieg von zirkulierendem TNF- α , IL-6 und IFN- γ , was zu einer passageren Aggravation der MS-Symptomatik führt, jedoch meist durch Prämedikation mit i.v.-applizierten Glukokortikoiden kontrollierbar ist (Moreau et al., 1996; Willis und Robertson, 2016). Zwar kommt es in > 90 % der Patient*innen zu einer infusionsassoziierten Sofortreaktion mit Symptomen wie Kopfschmerzen, Fieber und Hautausschlag, welche jedoch nur in 1 - 3 % der Fälle als schwer einzustufen sind (Cohen et al., 2012; Coles et al., 2012; Havrdova et al., 2015). Beschrieben wurden zudem milde bis moderate Infektionen hauptsächlich des Respirationstrakts und der Harnwege, sowie Infektionen durch Herpesviren. Schwere Infektionen treten selten auf (2-4 % bei Alemtuzumab vs. 1 % bei IFN- β 1a) (Cohen et al., 2012; Coles et al., 2012; Havrdova et al., 2015). Klinisch hoch-relevante UAWs stellen sekundär nach Alemtuzumabgabe auftretende Autoimmunerkrankungen dar, welche noch bis zu 5 Jahre nach Therapie auftreten können. Ca. ein Drittel der Patient*innen entwickelt autoimmune Schilddrüsenerkrankungen, deutlich seltener treten idiopathische thrombozytopenische Purpura oder autoimmune Nephropathien auf (Katsavos und Coles, 2018).

Nach Auftreten mehrerer schwerer zum Teil tödlich verlaufender kardiovaskulärer Reaktionen sowie Fällen von hämophagozytischer Lymphohistiozytose und autoimmuner Hepatitiden, wurde das Sicherheitsprofil der Therapieüberwachung und Kontraindikationen durch die Europäische Arzneimittelagentur erweitert und wird nun lediglich als Eskalationstherapie oder bei rasch-progredienten RR-MS-Verläufen empfohlen (Pharmacovigilance Risk Assessment Committee - Europäische Arzneimittelagentur, 2020).

Alemtuzumab ist somit eine klinisch hocheffektive Therapieoption in der Behandlung der RR-MS, die jedoch aufgrund der vielfältigen zum Teil schwerwiegenden UAWs eine sorgfältige Auswahl von Patient*innen und Überwachung während und nach der Therapie erfordert (Katsavos und Coles, 2018).

1.5 Zielsetzung und Fragestellung der Studie

Wie in Abschnitt 1.2.1 beschrieben wurde die Rolle der B-Zellen in der Pathogenese der MS lange nicht adäquat berücksichtigt. Die meningeale Inflammation mit Ausbildung von TLOs und der hiervon ausgehenden Neurodegeneration und Progredienz der klinischen Symptomatik stellt ein relevantes, wenn auch nicht unumstrittenes Korrelat für die B-Zell-Beteiligung, insbesondere für progrediente Verläufe, dar (siehe Abschnitt 1.2.2). Eine Beeinflussung der B-Zell-Aggregation und B-Zell-spezifischen Immunantwort bildet somit ein hoch-relevantes Therapieziel in der MS. Da bestimmte Gewebeproben in MS-Patient*innen nur schwer zugänglich sind und insbesondere histologische Analysen von ZNS-Gewebe häufig erst durch Autopsiestudien möglich ist, sind bestimmte mechanistische und histologische Analysen lediglich in Tiermodellen umsetzbar. Die MP4-EAE stellt durch die B-Zell-abhängige Pathogenese, den chronischen Verlauf mit Aggravation der Demyelinisierung und axonalen Pathologie sowie die Ausbildung von TLOs im Verlauf der Erkrankung ein geeignetes Modell zur Analyse therapeutischer Interventionen auf Immuninfiltration und Neurodegeneration dar (siehe Abschnitt 1.3.2). Da sich das murine und humane CD52-Molekül voneinander unterscheiden, wurde zunächst durch Hu et al. (2009) ein transgenes hCD52-exprimierendes Mausmodell zur Analyse des depletierenden Mechanismus von Alemtuzumab etabliert. Dies war Grundlage der Etablierung eines monoklonalen IgG2a-AKs gegen das murine CD52 (mCD52) mit vergleichbarer depletierender Aktivität durch Turner et al. (2015). Dieser so entstandene Anti-mCD52-AK wurde in den ersten Studien durch MOG₃₅₋₅₅- und rMOG-induzierter EAE in B6-Mäusen sowie PLP₁₃₉₋₁₅₁-induzierter-EAE in SJL/J-Mäusen in der Frühphase der Erkrankung, nicht jedoch in einer chronischen Erkrankungsphase eingesetzt (siehe Abschnitt 4.1).

Die Studie diene daher zur Beantwortung folgender Fragen:

- a) Welchen Einfluss hat eine Anti-mCD52-AK-Therapie auf den klinischen Verlauf der MP4-EAE bei Applikation im Maximum der Symptomausprägung bzw. ca. 60 Tage nach Symptombeginn?
- b) Führt eine Anti-mCD52-AK-Therapie im MP4-EAE-Modell zu einer vergleichbaren Depletion von peripheren Lymphozyten wie Alemtuzumab und welchen Einfluss hat dies auf die MP4-spezifische B-Zell-Antwort?

- c) Kann durch die Applikation von Anti-mCD52-AK die Entstehung von lymphozytären ZNS-Infiltraten im MP4-EAE-Modell verhindert werden, bzw. können bestehende Infiltrate, insbesondere TLOs, durch die Therapie reduziert werden?
- d) Welchen Einfluss hat die Anti-mCD52-AK-Therapie auf neurodegenerative Aspekte der MP4-EAE?

Ein weiteres Ziel der Studie war zudem die Etablierung des Behandlungsschemas als Grundlage für weitere Versuche zur Analyse des Einflusses der Anti-mCD52-AK-Behandlung auf Neurodegeneration mittels Elektronenmikroskopie, Biomarker und MRT im Rahmen der Erstpublikation (Simon et al., 2018).

2. Material und Methoden

2.1 Materialien, Geräte und Software

Im Folgenden sind alle verwendeten Chemikalien, Reagenzien, Verbrauchsartikel, Gerätschaften und Software tabellarisch in alphabetischer Reifolge aufgelistet.

Die therapeutisch verwendeten AKs sowie Primär- und/oder Sekundär-AK der Färbungen finden sich in den jeweiligen Kapiteln.

Tab. 1: Verwendete Reagenzien und Chemikalien

Reagenz/Chemikalie und Katalognummer	Hersteller (Ort)
Aluminiumsulfat 18-Hydrat ($\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 \times \text{H}_2\text{O}$) CAS: 7784-31-8; #15672250	Honeywell Specialty (Seelze, Deutschland)
Ammoniumchlorid (NH_4Cl) CAS: 12125-02-9 #6303845	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Chloralhydrat CAS: 302-17-0 #141975.1211	AppliChem (Darmstadt, Deutschland)
Citronensäure CAS: 77-92-9 #4855.2	AppliChem (Darmstadt, Deutschland)
DABCO® (Triethylendiamin) CAS: 280-57-9 #0718.1	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol) CAS: 28718-90-3 #10236276001	Roche Basel, Schweiz
Diaminobenzidin (DAB; 22,5 mg/ml) CAS: 91-95-2 #D5637	Sigma-Aldrich (Merck) (St. Louis, USA)
Dinatriumhydrogenphosphat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$) CAS: 10028-24-7 #4984.1	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Eosin Yellowish CAS: 17372-87-1 #1312991606	AppliChem (Darmstadt, Deutschland)
Essigsäure (100 %) CAS: 64-19-7; # 6755.1	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)

Ethanol (96 %) vergällt mit Methylethylketon CAS: 64-17-5 #641	Nordbrand (Nordhausen, Deutschland)
Ethanol (99,8 %) vergällt mit Methylethylketon CAS: 64-17-5 #642	Nordbrand (Nordhausen, Deutschland)
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) CAS: 60-00-4 #A5097,0250	AppliChem (Darmstadt, Deutschland)
Glucose CAS: 50-99-7 #A1422,0500	AppliChem (Darmstadt, Deutschland)
Glucose-Oxidase CAS:9001-37-0 #G2133	Sigma-Aldrich (Merck) (St. Louis, USA)
Hämatoxylin CAS: 517-28-2 #3816.2	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Heirler Bio Magermilchpulver #3030	Heirler-Cenovis (Radolfzell, Deutschland)
Histosec® Pastillen (Paraffin) #1.11609.2504	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Kaliumaluminiumsulfat ($KAl(SO_4)_2$) CAS: 7784-24-9 #131103	AppliChem (Darmstadt, Deutschland)
Kaliumchlorid (KCl) CAS: 7447-40-7 #A3852,1000	AppliChem (Darmstadt, Deutschland)
Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4) CAS: 7778-77-0 #4873	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Kaliumiodat (KIO_3) CAS: 7758-05-6; # 5301	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Lithiumcarbonat ($LiCO_3$) CAS: 554-13-2 #7324.1	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Mannide-Monooleate CAS: 9049-98-3 #M8819	Sigma-Aldrich (Merck) (St. Louis, USA)
Mowiol® 4-88 (Polyvinylalkohol) CAS: 9002-89-5 #0713.1	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)

Natriumchlorid (NaCl) CAS: 7647-14-5 #1316591210	AppliChem (Darmstadt, Deutschland)
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃) CAS: 144-55-8 #8551.1	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Natriumjodat (NaJO ₃) CAS: 7681-55-2 #1065251000	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Nickelsulfat (NiSO ₄) CAS: 7786-81-4 #106727	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Paraffinöl CAS: 8042-47-5 #9190.1	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Paraformaldehyd (PFA) CAS:30525-89-4 #335,4	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Pertussistoxin (salzfrei) 1 CAS 70323-44-3 #1516562-50UG	Calbiochem (La Jolla, USA)
Pertussistoxin (salzfrei) 2 CAS: 70323-44-3 #181	List Biological Laboratories (Hornby, Canada)
Salzsäure (37%; HCl) CAS: 7647-01-0 #4625.1	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Schwefelsäure (96 %; H ₂ SO ₄) CAS: 7664-93-9 #9789.1	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Solvent Blue 38 CAS: 1328-51-4 #S3382-100G	Sigma-Aldrich (Merck) (St. Louis, USA)
Trinatriumcitrat CAS: 68-04-3 #4088.1	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
TRIS Pufferan® Trishydroxymethylaminomethan CAS: 77-86-1 #4855.2	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Triton™ X-100 (Alkylphenylpolyethylenglykol) CAS: 9002-93-1; #T9284	Sigma-Aldrich (Merck) (St. Louis, USA)
Trypanblau (Benzaminblau) CAS: 72-57-1; # CN76.2	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)

Tween® 20 (Polysorbat) CAS: 9005-64-5 #A4974	AppliChem (Darmstadt, Deutschland)
Wasserstoffperoxid (35 %; H ₂ O ₂) CAS: 7722-84-1 #9683.3	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Xylol (redestilliert) CAS: 1330-20-7	Julius-Maximilians-Universität (Würzburg, Deutschland)

Tab. 2: Verwendete Lösungen

Lösung/Reagenz und Katalognummer	Hersteller (Ort)
Advanced RPMI1640 Medium #12633012	Gibco, Life Technologies (Carlsbad, USA)
Aqua-Poly/Mount Eindeckmedium #18606-20	Polysciences (Warrington, USA)
BD FACS™ Clean Solution #340345	BD Bioscience (Franklin Lakes, USA)
BD FACFlow™ Sheath Fluid #342003	BD Bioscience (Franklin Lakes, USA)
DePeX (Xylol haltiges Eindeckmedium) #18243.02	SERVA Electrophoresis (Heidelberg, Deutschland)
Dulbecco's Phosphatgepufferte Salzlösung (<i>Phosphat Buffered Saline</i> = PBS; steril filtriert) #D8537	Sigma-Aldrich (Merck) (St. Louis, USA)
Fetales Kälberserum (<i>Fetal Bovine Serum</i> = FBS; inaktiviert) #10082147	Gibco life Technologies (Carlsbad, USA)
Fixable Viability Stain 450 #562247	BD Bioscience (Franklin Lakes, USA)
Heparin (25.000 IE) Liquemin® N25000	Roche (Basel, Schweiz)

HL-1™ Medium #77201	Lonza (Basel, Schweiz)
Kaninchen Peroxidase-anti-Peroxidase (<i>Rabbit Peroxidase-anti-Peroxidase</i> = rb-PAP) #323-005-024	Jackson ImmunoResearch Laboratories (West Grove, USA)
Maus Peroxidase-anti-Peroxidase (<i>Mouse Peroxidase-anti-Peroxidase</i> = m-PAP) #223-005-024	Jackson ImmunoResearch Laboratories (West Grove, USA)
MBP-PLP-Fusionsprotein (MP4) Lot E	Alexion Pharmaceuticals Inc. (Cheshire, USA)
MOM® (<i>Mouse on Mouse</i>) Immunodetection Kit Basic #BMK-2202	Vector Laboratories (Burlingame, USA)
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> -Stamm H37Ra (inaktiviert) #231141	BD Biosciences (Franklin Lakes, USA)
Nickelsulfat (Ni(II)SO ₄) CAS: 10101-97-0 # 7322.1	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Ziegen Serum (<i>Natural Goat Serum</i> = NGS) #G9023	Sigma-Aldrich (Merck) (St. Louis, USA)
Penicillin-Streptomycin #P4333	Sigma-Aldrich (Merck) (St. Louis, USA)
Avidin-Meerrettich-Peroxidase (<i>Horseradish Peroxidase</i> = HRP) #554058	BD Biosciences (Franklin Lakes, USA)
Alkalische-Phosphatase (AP)-Streptavidin, #SA-5100	Vector Laboratories (Burlingame, USA)
Tetramethylbenzidin (TMB)-Solution #00-4201-56	eBioscience (Waltham, USA)
VECTASTAIN® ABC HRP Kit #PK-4000	Vector Laboratories (Burlingame, USA)
VECTOR® <i>Blue Substrate Kit</i> AP #SK-5300	Vector Laboratories (Burlingame, USA)

Tab. 3: Verwendete Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial und Katalognummer	Hersteller (Ort)
CELLSTAR® Zellkultur-Microplatte, 96 Well <i>Round Bottom</i> #650180	Greiner Bio-One (Kremsmünster, Österreich)
CELLSTAR® Zellkultur-Schale 100/20 mm #664160	Greiner Bio-One (Kremsmünster, Österreich)
Falcon® Zellsieb, 70 µm #352350	Falcon (Corning, USA)
Falcon® Reaktionsgefäß 15 ml / 50 ml #352095 / #352070	Falcon (Corning, USA)
Inject® Solo Einmalspritzen, Luer-Ansatz, 2 ml #4606027V	B. Braun (Melsungen, Deutschland)
MultiScreen® _{HTS} -IP 0,45 µm ELISPOT-Platte #MSIPS4W10	Merck-Milipore (Darmstadt, Deutschland)
Nunclon Delta Surface, 96 <i>Micro Well</i> #143761	Nalge Nunc International (Rochester, USA)
Futterpallets (Kontrolldiät für Ratte & Maus) #C1000	Altromin Spezialfutter (Lage, Deutschland)
Reagiergefäß, <i>SafeSeal</i> 2 ml #72.695.500	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Reagiergefäß, <i>SafeSeal</i> 0,5 ml #72.704	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Superfrost® Plus Objektträger #42409110	Karl Hecht Glaswarenfabrik (Sondheim, Deutschland)
Venenpunktionskanülen Venofix Safety # K4056501-01	B. Braun (Melsungen, Deutschland)

Tab. 4: Verwendete Gerätschaften

Gerätschaft (ggf. Modellnummer)	Hersteller (Ort)
Allegra X-30R Tischzentrifuge	Beckmann Coulter (Brea, USA)
Bavimed 2080/K Gießstation	Bavimed (Birkenau, Deutschland)
BD FACSCanto™ II Durchflusszytometer (V33896001875)	BD Bioscience (Franklin Lakes, USA)
Biofuge 28RS Tischzentrifuge	Heraeus, (Hanau, Deutschland)
Centrifuge 5415C Tischzentrifuge	eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Centrifuge 5418 Tischzentrifuge	eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Centrifuge 5430R Tischzentrifuge	eppendorf (Hamburg, Deutschland)
CTL ImmunoSpot Series 6 UV-Analysers (SNUNIV01-7030)	Cellular Technology Limited (Shaker Heights, USA)
Diavert Forschungsmikroskop	Leica (Wetzlar, Deutschland)
Einbettautomat TP 1020	Leica (Wetzlar, Deutschland)
HeraCell240 CO ₂ -Inkubator	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Keyence BZ-9000 (BIOREVO)	Keyence (Osaka, Japan)
Leica MC170 HD Mikroskopkamera	Leica (Wetzlar, Deutschland)
Leica DM2000 LED-Mikroskop	Leica (Wetzlar, Deutschland)

Mikrotom SM2000R	Leica (Wetzlar, Deutschland)
Paraffin-Streckbad WB24	Medax (Neumünster, Deutschland)
Perkin Elmer Precisly Victor 3 1420 Multilabel Counter	Perkin Elmer (Waltham, USA)
Sterilbank mit laminarem Luftfluss	Prettl (Pfullingen, Deutschland)

Tab. 5: Verwendete Software

Software	Entwickler (Ort)
BD FACSDiva-Software (Version 6.1.3)	BD Bioscience (Franklin Lakes, USA)
BioSpot/ImmunoSpot (Version 5.1.36)	Cellular Technology Limited (Shaker Heights, USA)
FlowJo® (Version 10.0.6)	Tree Star Inc. (Ashland, USA)
Graphpad Prism 6 (Version 6.01)	Graphpad Software, (La Jolla, USA)
ImageJ (Version 2.0.0.-rc-54/1.51b)	National Institutes of Health (Washington, USA)
Leica Application Suite (Version 4.40 Build 454)	Leica (Wetzlar, Deutschland)
Microsoft® 365 Office Paket (Word und Excel) (Version 16.43)	Microsoft (Redmond, USA)
Wallace 1420 Manager (Version 3.0 revision 5)	Perkin Elmer (Waltham, USA)
Keyence BZ-II Viewer (Version 1.41.00a0)	Keyence (Osaka, Japan)

2.2 Lösungen

Die Angaben der Lösungen für alle Experimente inklusive der entsprechenden gelösten Reagenzien und Konzentrationen sind im Folgenden alphabetisch gelistet. Die verwendeten Reagenzien inklusive Hersteller, ggf. CAS - und Katalognummer sind Tab. 1 zu entnehmen. Weitere Zugaben zu den hier aufgeführten Lösungen sind mit der Entsprechenden Verdünnung und dem verwendeten Verdünnungsmedium unter der jeweiligen Methode zu finden.

Entwicklungslösung für Chromogen Diaminobenzidin (DAB):

1350 μ l Ni(II)SO₄ (0,18 g/l), 1350 μ l β -D(+) Glucose (0,1 g/l), 150 μ l NH₄Cl (0,18 g/l), 1500 μ l DAB (22,5 g/l), 225 μ l Glucose-Oxidase (1,2 g/l);
gelöst in 67,5 ml PB-Puffer

Erythrozyten-Lyse-Puffer:

NH₄Cl 8,02 g/l, NaHCO₃ 0,84 g/l, EDTA (0,073 g/l);
gelöst in *Aqua destillata*; pH: 7,4

Hämalaun-Lösung nach Mayer

1 g Hämatoxylin, 0,2 g KIO₃, 50 g, KAl(SO₄)₂, 50 g Chloralhydrat, 1 g Citronensäure;
gelöst in 1 l *Aqua destillata*; für Oxidation kurz erwärmt

Kernechtrotlösung (0,1 %)

1 g/l Kernechtrot und 50 g/l Al₂(SO₄)₃·18 H₂O;
gelöst in *Aqua destillata*

Komplettes RPMI 1640

1 % L-Glutamin +1 % Penicillin Streptomycin;
gelöst in Advanced RPMI1640 Medium (Gibco)

Natrium-Citrat Puffer (0,01 M):

Citronensäure 0,38 g/l, Tri-Natriumcitrat 2,41 g/l;
gelöst in *Aqua destillata*; pH: 6,0

Phosphatgepufferte Salzlösung (0,01 M; *Phosphat Buffered Saline* = *PBS*)

NaCl 8,006 g/l, KCl 0,2 g/l, Na₂HPO₄ x 2H₂O, 1,7 g/l, KH₂PO₄ 0,2 g/l;
gelöst in *Aqua destillata*; pH: 7,4

Phosphatpuffer (0,1 M; *Phosphate Buffer* = *PB*):

KH₂PO₄ 2,45 g/l, Na₂HPO₄ x 2H₂O 14,6 g/l;
gelöst in *Aqua destillata*; pH: 7,4

TrisHCl-Puffer (0,1 oder 0,2 M)

TRIS Pufferan[®] 12,1 bzw. 24,2 g/l, pH Einstellung mit 5 N HCl;
gelöst in *Aqua destillata*; pH: 8,2 bzw. 8,5

2.3 Versuchstiere

Die durchgeführten Tierversuche entsprachen jederzeit dem deutschen Tierschutzgesetz. Die Genehmigung der Tierversuche erfolgte durch die Tierschutzbehörde der Regierung von Unterfranken unter der Genehmigungsnummer 55.2-2531.01-91/14.

Als Versuchstiere wurden 6 Wochen alte weibliche B6-Mäuse verwendet (Envigo, Niederlande), die unter spezifisch pathogenfreien Bedingungen in individuell belüfteten Käfigen in den Tierställen der Klinik für Mund-, Kiefer- und plastische Gesichtschirurgie des Universitätsklinikum Würzburg gehalten wurden. Ein künstlicher Tag-Nacht-Rhythmus wurde durch 12-stündige Hell-Dunkel-Phasen erzeugt. Die Raumtemperatur (RT) wurde bei 20-22 °C und die Luftfeuchtigkeit bei 65 % konstant gehalten. Die Tiere hatten jederzeit freien Zugang zu autoklaviertem Wasser und pathogenfreien Futterpallets (C1000, Altromin). Um die Nahrungsaufnahme auch nach Ausbildung von paralytischen Symptomen (EAE-Score $\geq 2,5$) zu gewährleisten, wurden für die betroffenen Tiere in Wasser erweichte Futterpallets auf Bodenhöhe platziert.

2.4 Methoden

2.4.1 EAE-Induktion, Behandlung und Krankheitsaktivität

Im Anschluss an eine ca. 14 Tage dauernde Akklimationsphase wurden die Versuchstiere nach dem Protokoll von Kuerten et al. (2006) aktiv immunisiert. Hierzu wurde zunächst inkomplettes Freundsches Adjuvans durch Emulsion von Paraffinöl (Roth) und Mannide Monooleate (Sigma) in einem Verhältnis von 9:1 präpariert. Komplettes Freundsches Adjuvans (CFA) entstand durch Hinzugabe von inaktiviertem *Mycobacterium tuberculosis*-Stamm H37Ra (BD Bioscience) in einer Konzentration von 5 mg/ml. In 200 µl CFA wurden 200 µg MP4-Fusionsprotein (Alexion Pharmaceuticals Inc.) gelöst und den Versuchstieren s.c. in beide Flanken injiziert.

Zur Verstärkung der Immunreaktion wurde am Tag der Immunisierung sowie 48 h später 200 ng Pertussistoxin (Calbiochem und List Biological Laboratories) gelöst in 500 µl Dulbecco's PBS steril (Sigma-Aldrich) intraperitoneal appliziert.

Die klinischen Verläufe der Versuchstiere wurden täglich beurteilt und die Symptomausprägung nach den gängigen Kriterien der EAE einem Wert zwischen 1 und 5 zugeordnet: (0) keine Symptome erkennbar, (1) Schwanzparese, (2) Schwäche der Hinterläufe, (3) Parese der Hinterläufe, (4) Tetraplegie und (5) Tod (Batoulis et al., 2011). Durch Abstufungen von 0,25 Punkten wurden graduelle Abweichungen von den Kriterien berücksichtigt.

Nach Erreichen einer maximalen Symptomausprägung von einem EAE-Score ≥ 2 wurden die Tiere entweder unmittelbar ($n = 9$; akute EAE) oder nach einem Beobachtungszeitraum von 60 - 68 Tage ($n = 20$; chronische EAE) anhand ihrer Symptomatik in eine Verumgruppe und eine Kontrollgruppe aufgeteilt, sodass sich die EAE-Scores zum Therapiebeginn nicht signifikant zwischen den Gruppen unterschieden (siehe **Error! Reference source not found.**). Der Therapiezeitpunkt der akuten EAE entspricht dem Zeitraum vor Erstmanifestation von Immuninfiltraten im *Cerebellum*, ca. 15 Tage nach Symptombeginn (Kuerten et al., 2007). Zum Zeitpunkt der chronischen EAE sind diese etabliert und zum Teil zu TLOs differenziert (Batoulis et al., 2015; Kuerten et al., 2012). Die Therapie erfolgte auf 5 aufeinanderfolgenden Tagen, was dem Therapieregime von Alemtuzumab entspricht (Evan et al., 2018) und mit vergleichbarer Wirksamkeit bzgl. der Lymphozytendepletion in murinen Modellen etabliert wurde.

(Hartung et al., 2015; Hu et al., 2009; Turner et al., 2015). Die Tiere erhielten jeweils 200 µg eines spezifischen murinen IgG2a-Isotyp-AK gegen das murine CD52-Antigen (Anti-mCD52-AK; Sanofi Genzyme, Cambridge, USA) oder eines unspezifischen murinen IgG2a-Isotyp-AK (InVivo BioTech; Lot: AK2656/01, Henningsdorf, Deutschland). Die Tiere wurden nach Therapieende für weitere 11 - 12 Tage klinisch beurteilt und im Anschluss mittels CO₂ geopfert.

2.4.2 Durchflusszytometrie

Einen Tag vor Tötung der Tiere wurde die peripher-zirkulierenden CD19⁺ B- und CD4⁺ T-Lymphozyten durchflusszytometrisch mittels *Fluorescence-Activated Cell Sorting* (FACS) nach Anti-mCD52-AK bzw. Isotypbehandlung bestimmt.

Zu diesem Zweck wurden die Versuchstiere in einem *Retainer* (Eigenanfertigung des Instituts für Anatomie und Zellbiologie, Universität Würzburg) fixiert und die Schwanzvene für ca. 3 min mittels Infrarotlampe erwärmt. Anschließend wurde die Schwanzvene mittels einer Rasierklinge eröffnet und 5 Tropfen (ca. 150 µl) des venösen Blutes in mit 40 µl Heparin (Roche) befülltes 2 ml Reagiergefäß (Sarstedt) aufgefangen und umgehend in 900 µl 0,01 M gekühlter PBS resuspendiert. Um den Zellverlust zu minimieren wurden alle anschließenden Reaktionsschritte soweit möglich unter Kühlung im Eisbad und lichtgeschützt durchgeführt. Ebenso wurden alle verwendeten Lösungen vor der Anwendung im Eisbad gekühlt.

Wir zentrifugierten die Proben (5 min, 4 °C, 500 x g; Centrifuge 5415C) und entnahmen den Überstand. Anschließend füllten wir die Proben mit PBS auf 1 ml auf, resuspendierten das Zellsediment und transferierten die Lösung in 15 ml Reaktionsgefäße (Falcon). Wir versetzten die Zellsuspension mit 3 ml Erythrozyten-Lyse-Puffer für 10 min. Hierdurch reduzierten wir die Erythrozytenkonzentration mittels hypotoner Lyse und verbesserten die Beurteilbarkeit der Proben. Die Reaktion wurde durch Hinzugabe von 10 ml PBS unterbrochen. Nach Zentrifugation (5 min, 4 °C, 500 x g; Allegra X-30R Centrifuge) saugten wir den Überstand ab, füllten die Probe mit PBS auf 0,4 ml auf und resuspendierten das Zellsediment. Zwei *Wells* pro Versuchstier einer Zellkulturplatte (CELLSTAR® Zellkultur- Microplatte, 96 *Well*, *Round Bottom*; Greiner Bio-One) wurden mit jeweils 200 µl der Zellsuspension befüllt.

Ein *Well* pro Versuchstier diente als Negativkontrolle zur Beurteilung der Eigenfluoreszenz und wurde in den folgenden Färbungsschritten lediglich mit Trägermedium (BD FACSTFlow™; BD Bioscience) behandelt. Eine Übersicht der verwendeten Fluorochrome und AK findet sich in

Tab. 6. Zur Diskriminierung zwischen lebenden und toten Lymphozyten inkubierten die Proben zunächst mit je 0,20 µl *Fixable Viability Stain* (FVS) 450 (BD Bioscience) für 30 min. Wir unterbrachen die Färbung durch Zentrifugation (10 min, 4 °C 500 x g, Biofuge 28RS) und pipettierten den Überstand ab.

Die spezifische Färbung der Lymphozyten erfolgte mittels Peridinin-Chlorophyll-Protein gekoppelt mit Cyanin - 5.5 (PerCP/Cy-5.5)-gekoppelten Anti-CD4-AK (BD Bioscience) für T-Zellen und Allophycocyanin-gekoppeltem Anti-CD19-AK (Bio Legend) für B-Zellen, die verwendeten AK sind mit Spezifität und gekoppelten Fluorochromen in

Tab. 6 aufgeführt. Die verwendete AK-Menge wurde anhand einer in Vorversuchen ermittelten Zellzahl von < 500k je Probe nach den Herstellervorgaben festgelegt. Hierzu wurden pro Versuchstier jeweils 0,125 µg des Anti-CD4- sowie des Anti-CD19-AK gemeinsam in 50 µl Trägermedium gelöst. In diesem *Mastermix* wurde das Zellsediment resuspendiert und für 30 min inkubiert. Anschließend unterbrachen wir die Färbung durch Zugabe von 200 µl Trägermedium und Zentrifugation (10 min, 4 °C 500 x g, Biofuge 28RS). Wir pipettierten den Überstand ab und resuspendierten die Zellen in 200 µl Trägermedium.

Die abschließende Probenanalyse erfolgte an einem BD FACSCanto™ II Durchflusszytometer (BD Bioscience) unter Verwendung der Betriebssoftware BD FACSDiva™ (Version 6.1.3; BD Biosciences). Die morphologische Zytometrie erfolgt per Messung des Vorwärtsstreulichts (*Forward Scatter* = FSC) als Maß des Teilchenvolumens sowie der Seitwärtsstreulichts (*Sideward Scatter* = SSC) als Maß der Granularität. Als Parameter dienten jeweils die Fläche (*Area* = A), Höhe (*Height* = H) und Breite (*Width* = W). Die verwendeten Voreinstellungen sind in Tab. 7 zusammengefasst. Durch Laser im violetten, blauen und rotem Farbspektrum wurden die Fluorochrome angeregt und entsprechend ihrer Emissionswellenlänge detektiert (siehe

Tab. 6). Zur weiteren Analyse der Primärdaten verwendeten wir FlowJo® (Version 10.0.6; Tree Star Inc.).

Zunächst wurden lebende Zellen anhand FSV 450 Emission und einzelne Zellen anhand ihres Verhältnisses FSC-H zu FSC-A morphologisch festgelegt. Anschließend wurde ebenfalls morphologisch durch SSC-A und FSC-A die Lymphozytenpopulation abgegrenzt. Innerhalb der Lymphozyten wurden nun CD19⁺CD4⁻ B-Zellen und CD4⁺CD19⁻ T-Zellen unterschieden. Die beschriebenen Schritte zum *Gating* sind in Abb. 1 dargestellt.

Tab. 6: Verwendete Antikörper und Fluorochrome der Durchflusszytometrie

Bezeichnung	Hersteller Katalog#	Wirt	Fluorochrom (Laser)	Emissions- maximum
Fixable Viability Stain 450 (FVS 450)	BD Bioscience (Franklin Lakes, USA) #562247		Pacific Blue (Violett: 405 nm)	448 nm
Anti-Maus-CD4	BD Bioscience (Franklin Lakes, USA) #550954	Ratte	PerCP-Cy 5.5 (Blau: 488 nm)	678 nm
Anti-Maus-CD19	Bio Legend (San Diego, USA) #115511	Ratte	APC (Rot: 633 nm)	680 nm

APC = Allophycocyanin; CD = *Cluster of Differentiation*, PerCP/Cy = Peridinin-Chlorophyll-Protein gekoppelt mit Cyanin;

Tab. 7: Voreinstellung der Durchflusszytometriemessungen

Messwert/Fluorochrom	Spannung
FSC A/H/W = Teilchenvolumen Schwellenwert (<i>threshold</i>) > 30.000	280 V
SSC A/H/W = Granularität	430 V
APC (Rot) = CD19	535 V
PerCP-Cy 5.5 (Blau) = CD4	594 V
FSV 450 (<i>Pacific Blue</i> = Violett) = tot/lebend	410 V

A = Area; APC = Allophycocyanin; CD = Cluster of Differentiation; FSC = Forward Scatter, FVS = Fixable Viability Stain; H = Height; PerCP/Cy = Peridinin-Chlorophyll-Protein gekoppelt mit Cyanin; SSC = Side Scatter, W = Width

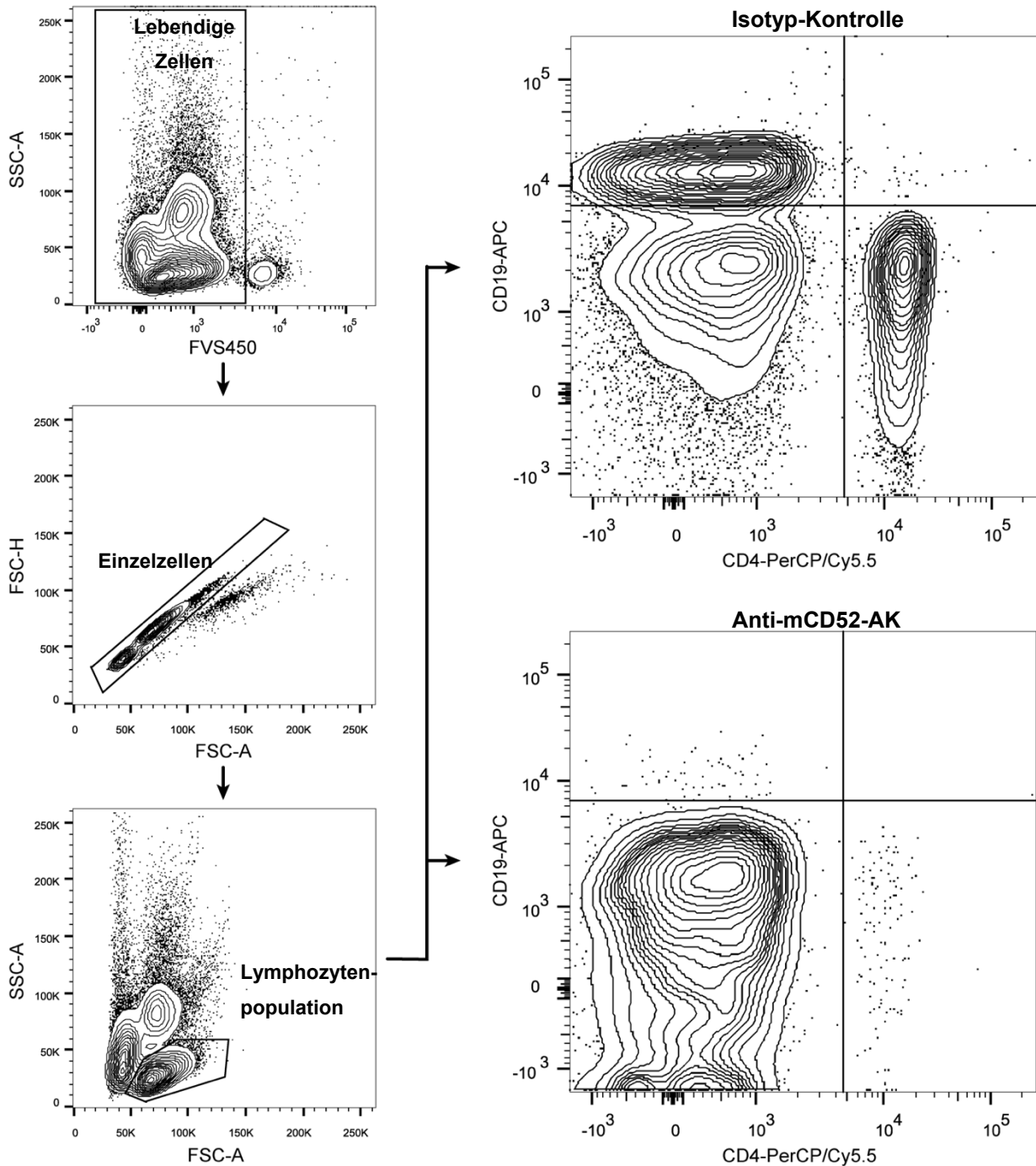


Abb. 1: Gating-Strategie der Durchflusszytometrie

Bestimmung der Anzahl lebendiger CD4⁺ T- und CD19⁺ B-Zellen im Blut von MP4-EAE Versuchstieren nach Behandlung mit Anti-mCD52-AK bzw. Isotyp-Kontroll-AK. A = Area; AK = Antikörper; APC = Allophycocyanin; CD = Cluster of Differentiation;

EAE = experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis FSC = *Forward Scatter*; FVS = *Fixable Viability Stain*; H = *Height*; PerCP/Cy = Peridinin-Chlorophyll-Protein gekoppelt mit Cyanin; SSC = *Side Scatter*. Aus dem Englischen übersetzt aus Simon et al. (2018); (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>)

2.4.3 *Enzyme-linked Immunosorbent Assay*

Zur Bestimmung des Einflusses einer Anti-mCD52-AK Therapie auf die Konzentration der im Blut zirkulierenden MP4-spezifischen AK führten wir einen indirekten *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA) durch.

Nach Opferung der Versuchstiere fixierten wir diese in Rückenlage, eröffneten den Thorax paramedian entlang des Sternums und legten das *Mediastinum* frei. Die *Vena cava inferior* wurde am rechten *Atrium* durchtrennt, das Vollblut mittels 2 ml Einmalspritze (B. Braun) aufgenommen und in 2 ml Reagiergefäße (Sarstedt) überführt.

Zur Abtrennung des Serums von korpuskulären Blutbestandteilen lagerten wir die Proben 48 h bei 4 °C lichtgeschützt bis zur vollständigen Koagulation. Anschließend zentrifugierten wir die Proben (5 min, 500 x g; Centrifuge 5418, eppendorf) und pipettierten das Serum in 0,5 ml Reagiergefäße (Sarstedt). Die Lagerung bis zur Versuchsdurchführung erfolgte bei - 80 °C.

Für den anschließenden indirekten ELISA wurden alle Inkubationsschritte mit 100 µl-, alle Waschschrte mit 200 µl-Volumen durchgeführt. Die Reaktion ist schematisch in Abb. 2 dargestellt.

Zunächst belegten wir pro Versuchstier 4 *Wells* der ELISA-Platte (Nunc Delta Surface, 96 *Micro Well*; Nalge Nunc. International) mit 3 µg/ml MP4 (Alexion Pharmaceuticals) in PBS und ließen diese bei 4 °C lichtgeschützt über Nacht inkubieren. Die nun mit MP4-beschichteten *Wells* wurden dreimal in 0,05 % Tween (Tween® 20; AppliChem) gelöst in PBS (PBS-Tween) gewaschen. Freie Proteinbindungsstellen der ELISA-Platte wurden mittels 1 % Milchpulver (Heirler-Cenovis) in 0,05 % PBS-Tween über 2 h, lichtgeschützt unter RT geblockt. Die aufgetauten Seren wurden in einer Konzentration von 1:1000 in 1 % Milchpulver in 0,05 % PBS-Tween gelöst. Pro Versuchstier belegten wir 2 *Wells* mit den verdünnten Seren und 2 *Wells* als Negativkontrollen mit Verdünnungsmedium. Die Inkubation erfolgte lichtgeschützt über Nacht bei 4 °C.

Am nächsten Tag brachten wir den des Sekundär-AK auf. Hierzu wuschen wir die Platte dreimal in 1 % Milchpulver in 0,05 % PBS-Tween. Ein biotinylierter polyklonaler Ratte-

anti-Maus-IgG-AK (eBioscience, Waltham, USA; #13401385) wurde 1:800 in 0,1 % Milchpulver in 0,05 % PBS-Tween gelöst. Diese Lösung wurde sowohl in die mit Serum inkubierten *Wells* als auch in die *Wells* zur Negativkontrolle aufgebracht. Wir ließen die Lösung erneut lichtgeschützt über Nacht bei 4 °C inkubieren.

Am Folgetag kam es zur abschließenden Färbungsreaktion. Hierzu wuschen wir die Platte zunächst dreimal in 0,05 % PBS-Tween. Zur Herstellung der Entwicklungslösungen verdünnten wir Avidin-Meerrettich-Peroxidase (*Horseradish Peroxidase* = HRP) (BD Bioscience) 1:1000 in 0,1 % Milchpulver in 0,05 % PBS-Tween. Diese wurde in alle *Wells* aufgebracht und inkubierte für 2 h lichtgeschützt bei RT. Die Platte wurde anschließend dreimal in 0,05 % PBS-Tween sowie dreimal in PBS gewaschen. Wir initiierten die Färbung durch Hinzugabe des kolorimetrischen Substrates Tetramethylbenzidin (eBioscience) und beobachteten den Färbungsprogress. Bei beginnender Anfärbung der Negativkontrollen wurde die Reaktion durch Hinzufügen von 50 µl 25 % Schwefelsäure gestoppt.

Die optische Dichte (OD) wurde unverzüglich am kolorimetrischen Mikrotiterplatten-Lesegerät (Victor 3 1420 Multilabel Counter; Perkin Elmer) mit Wallace 1420 Manager Software (Version 3.0 Revision 5; Perkin Elmer) bei einer Wellenlänge von 450 nm für jedes *Well* bestimmt. Ein korrigierter Wert der OD der Serumproben wurde für jedes Versuchstier ermittelt. Hierzu wurde der Mittelwert (MW) der Negativkontrollen vom MW der Serumproben subtrahiert.

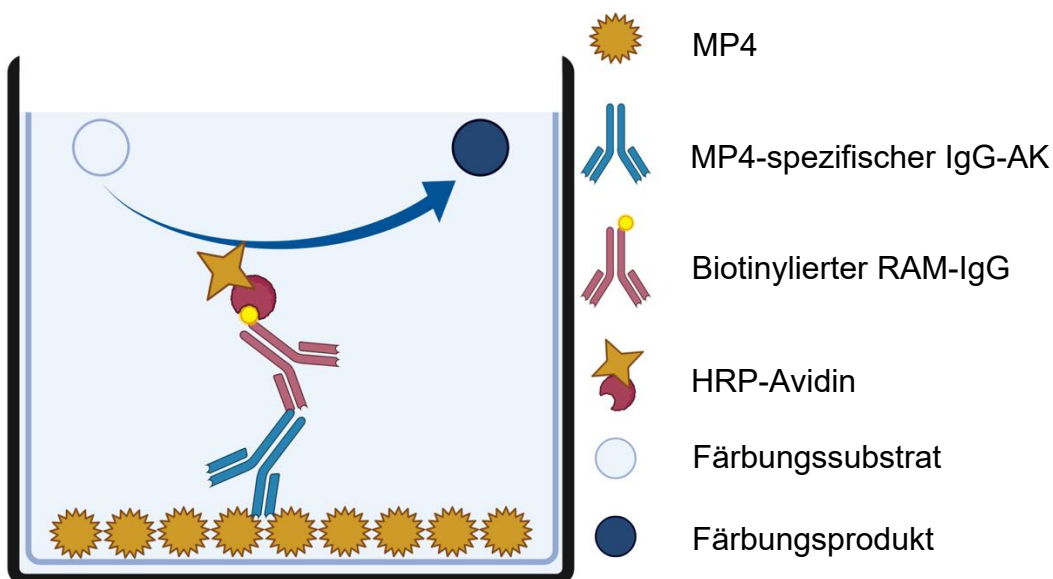


Abb. 2: *Enzyme-linked Immunoabsorbent Assay*

Seitenansicht eines *Wells*, Färbungsreaktion zur Bestimmung der MP4-spezifischen AK-Konzentration im Serum durch biotinylierten Sekundär-AK im Komplex mit HRP-Avidin.

AK = Antikörper; HRP = *horseradish peroxidase*; RAM = *rat-anti-mouse*, IgG = Immunglobulin G; (Erstellt mit BioRender.com)

2.4.4 B-Zell *Enzyme-linked Immunospot Assay*

Anschließend untersuchten wir den Einfluss einer Anti-mCD52-AK-Therapie auf die MP4-spezifische B-Zell-Antwort in SLOs mittels ELISPOT. Eine schematische Übersicht des Versuchsaufbaus findet sich in Abb. 3.

Die Versuchsschritte bis zur Aufbringung des Sekundär-AK, mit Ausnahme der Gewebspräparation, wurden unter möglichst sterilen Bedingungen (Sterilbank, Prettl, Pfullingen), durchgeführt.

Am Vortag der Tötung der Versuchstiere belegten wir jeweils 2 *Wells* pro Versuchstier der ELISPOT-Platte (MultiScreen[®]_{HTS}-IP 0,45 µm, Merck-Milipore) mit MP4 zur Bestimmung der spezifischen IgG-Sekretion (10 µg/ml; Alexion Pharmaceuticals) sowie mit Anti-Maus IgG (15 µg/ml; Mabtech, Nacka Strand, Schweden; #3876-3-250) zur Bestimmung der Gesamtzahl IgG-produzierender Zellen. Dulbecco's PBS steril (Sigma-Aldrich) diente als Verdünnungsmedium und zur Belegung von zwei *Wells* pro Tier zur Negativkontrolle. Es wurden jeweils 100 µl pro *Well* aufgetragen. Die Inkubation erfolgte bei 4 °C lichtgeschützt über Nacht.

Am Folgetag wuschen wir die Platte zunächst dreimal in Dulbecco's PBS steril je 100 µl pro *Well*. Unspezifische Bindungen wurde durch Auftragung von 200 µl 10 % FBS (Gibco life Technologies) in Dulbecco's PBS steril über 2 h bei RT abgeblockt.

Nach Opferung der Tiere und Fixation in Rückenlage wurde ein nicht perfundierter Inguinal-LK freipräpariert, möglichst unversehrt entnommen und in eine mit 5 ml komplettes RPMI-1640 befüllte Petrischale (Cellstar[®] *Cell Culture Dish*, Greiner Bio-One) überführt. Die Freisetzung der Lymphozyten erfolgte durch Zerstoßen der LK mit Hilfe der flachen Unterseite eines Spritzenkolbens im vorgelegten Medium bis eine ausgeprägte Trübung des Mediums sichtbar wurde. Durch Filtrierung der Lymphozytenlösung (Falcon[®] 70 µm *Cell Strainer*; Falcon) in ein 50 ml Reaktionsgefäß (Falcon) wurden Bindegewebsreste aus der Lösung entfernt. Zur Bestimmung der Lymphozytenzellzahl zentrifugierten wir die Lösung (Allegra X-30R; 1200 rpm, 10 min, *Accel 9, Deccel 9*, RT), saugten den Überstand ab, füllten mit komplettem RPMI-1640 Medium auf ein Gesamtvolumen von 5 ml auf und resuspendierten das Zellsediment. Zur Zellzählung wurden 10 µl der Lösung entnommen und mit 90 µl 0,1 % Trypanblau (Roth) gelöst in PBS vermischt. Hiervon wurden 10 µl in eine Zählkammer überführt und mikroskopisch

Analysiert (Diavert, Leica). Zur Bestimmung der Lymphozytenkonzentration wurde der MW aus 2 Zählkammern mit jeweils 16 Feldern gebildet. Es wurden lediglich gefärbte und somit lebendige Lymphozyten gezählt.

Anschließend erfolgte die Auftragung von 10^6 Lymphozyten pro *Well*. Zunächst zentrifugierten (Allegra X-30R ;1200 rpm; 10 min; *Accel* 9; *Deccel* 9; RT) wir hierzu die Lösung, saugten den Überstand ab und füllten mit HL-1™ Medium (Lonza) auf, sodass die Lymphozytenkonzentration $10^6/200 \mu\text{l}$ entsprach. Es wurde jeweils abhängig von der Lymphozytenzahl mindestens ein *Well* für MP4, Anti-Maus-IgG und Negativkontrolle mit $200 \mu\text{l}$ der Lösung belegt. Durch leichtes Antippen wurde eine gleichmäßige Verteilung der Zellen innerhalb der *Wells* sichergestellt. Die Platten wurde anschließend für bei 37°C und 7 % CO_2 für 24 h bebrütet (HeraCell240 Inkubator; Thermo Fisher Scientific).

Mit Aufbringen des Sekundär-AK begann nun die Färbungsreaktion. Die Waschritte wurden im Folgenden analog zur ELISA-Methodik mit $200 \mu\text{l}$, alle Färbungsschritte mit $100 \mu\text{l}$ pro *Well* durchgeführt. Die Platte wurde zunächst je dreimal in PBS und 0,05 % PBS-Tween gewaschen. Anschließend wurde ein biotinylierte Ziege-anti-Maus-IgG-AK (Mabtech; #3825-6-250) mit einer Verdünnung von 1:2000 in 0,5 % FBS in PBS aufgebracht. Die Platte inkubierte über Nacht lichtgeschützt bei 4°C .

Am Folgetag wurden die Platten viermal in 0,025 % PBS-Tween gewaschen. Wir trugen nun das für die Färbungsreaktion benötigte Enzym alkalische Phosphatase (AP)-Streptavidin (Vector Laboratories) mit einer Verdünnung von 1:800 in 0,5 % FBS in PBS auf und ließen die Platten für 2 h bei RT inkubieren. Vor der Entwicklung wurde die Platten je dreimal in PBS-Tween 0,025 % und *Aqua destillata* gewaschen. Die Entwicklungslösung wurde nach Protokoll des Substrat-Kit für AP (Vector® Blue AP Substrate Kit, Vector Laboratories) gemäß den Herstellerangaben in TrisHCl-Puffer angesetzt und in alle *Wells* aufgebracht. Der Färbungsprogress wurde beobachtet und bei beginnender Färbung der Negativkontrollen durch dreimaliges Spülen der *Wells* in *Aqua destillata* abgestoppt. Die Platte wurde über Nacht lichtgeschützt bei RT getrocknet. Die Auswertung der Platten geschah im Lesegerät für ELISPOT-Platten (CTL ImmunoSpot Series 6 UV Analyser; Cellular Technology Limited) mittels BioSpot/Immunospot Software (Version 5.1.36; Cellular Technology Limited). Die primäre Zählung der *Spots* geschah automatisiert entsprechende der etablierten Voreinstellungen. Im Rahmen der anschließenden *Quality Control* konnten die Anzahl der

gemessenen Spots bei nicht-plausiblen Ergebnissen manuell korrigiert werden. Es wurde lediglich die Anzahl an Spots unabhängig von der Größe und Morphologie bestimmt. Bei einer zu hohen Dichte an positiv gefärbten *Spots* (*too numerous to count*) wurde der Wert auf 500 *Spots/Well* festgelegt, entsprechend dem etablierten laborinternen Versuchsprotokoll. Für jedes Versuchstier wurde der MW der *Wells* zur Negativkontrolle vom MW der MP4- bzw. Gesamt-IgG *Wells* subtrahiert, um einen korrigierten MW zu erhalten. Um das Verhältnis von Myelin-reaktiven MP4-IgG- zur Gesamtzahl der IgG-produzierenden Zellen zu ermitteln, wurde abschließend für jedes Versuchstier der Quotient aus den korrigierten MW für MP4 *Spots* und Gesamt-IgG *Spots* bestimmt.

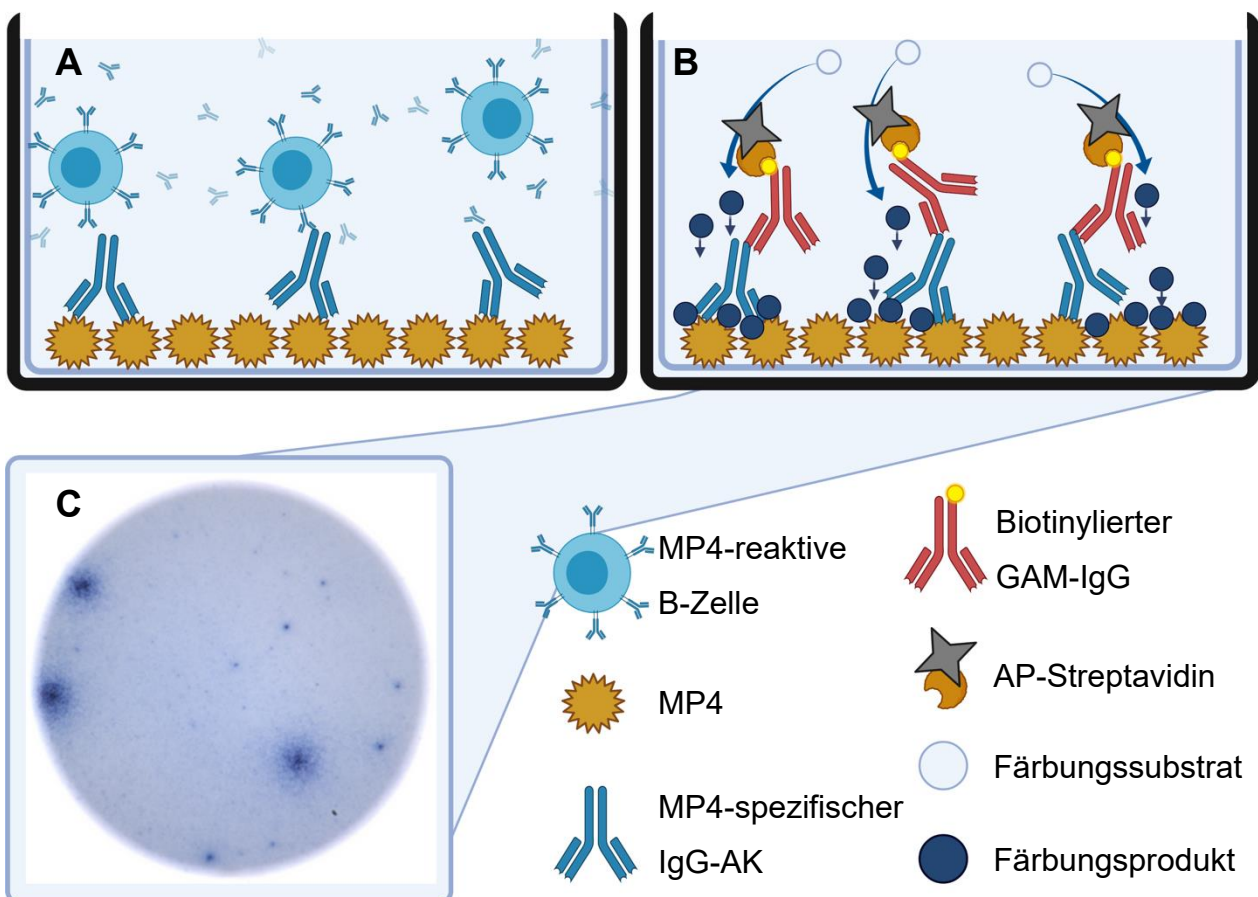


Abb. 3: B-Zell *Enzyme-linked Immunospot Assay*

A und B: Seitenansicht eines *Wells*, jeweils schematische Darstellung **A:** B-Zellen mit Sekretion MP4-spezifischer AK; **B:** Färbungsreaktion mit biotinyliertem Sekundär-AK im Komplex mit AP-Streptavidin; **C:** Aufsicht auf *Well* nach Abschluss der Färbungsreaktion. AK = Antikörper; AP = alkalische Phosphatase, GAM = *goat-anti-mouse*, IgG = Immunglobulin G. (Erstellt mit BioRender.com)

2.4.5 Histologie des zentralen Nervensystems

Zur Darstellung des Einflusses einer Anti-mCD52-AK-Therapie auf das ZNS im MP4-EAE-Mausmodell analysierten wir das *Cerebellum* der Versuchstiere der akuten und chronischen EAE Kohorte bzgl. lymphozytärer Infiltration, sowie das lumbale RM der chronischen EAE Kohorte bzgl. Demyelinisierung, axonalen Schäden sowie Remyelinisierung mittels histologischer Beurteilung.

2.4.5.1 Gewebepreparation und Systematik der Histologie

Zur Vorbereitung der nachfolgenden Standardfärbungen sowie mittels Färbungen mittels Immunhistochemie (IHC) sowie Immunfluoreszenz (IF) wurde das Gewebe in Formaldehyd fixiert.

Nach Tötung der Tiere mittels CO₂, Fixierung in Rückenlage, Entnahme des Blutes mittels Durchtrennung der *Vena cava inferior*, sowie Entnahme eines nicht perfundierten Inguinal-LK wurde ein intrakardialer Zugang über das rechte *Atrium* über eine Venenpunktionskanüle (B. Braun) hergestellt. Zur Reduktion von Blutrückständen aus der Zirkulation wurden die Tiere über ein Infusionsbesteck für ca. 2 min mit PBS gespült. Anschließend erfolgte die Perfusionsfixierung mittels 4 % PFA (Roth) in PBS für ca. 20 min, ebenfalls über ein Infusionsbesteck.

Unter vorsichtiger Präparation wurden allen Versuchstieren die *Cerebella*, sowie den Tieren der chronischen EAE-Kohorte das lumbale RM entnommen. Die Gewebeproben wurden umgehend in ein 15 ml Reaktionsgefäß (Falcon) gefüllt mit 4 % PFA in PBS überführt und bei 4 °C über Nacht immersionsfixiert. Die Paraffineinbettung der Gewebeproben erfolgte am Einbettautomat TP 1020 (Leica) durch Dehydrierung in einer aufsteigenden Ethanolreihe (Nordbrand) sowie Xylol (redestilliert; Universität Würzburg) und in Paraffin (Histosec[®] Pastillen, Merck) an der Gießstation (Bavimed 2080/K, Bavimed) eingebettet. Die Einbettung erfolgte, sodass die nachfolgenden Gewebsschnitte am Mikrotom (SM2000R; Leica) für die *Cerebella* in Frontalebene und das RM in Transversalebene vorgenommen werden konnten. Die Gewebsschnitte wurden nach Entfaltung im Wasserbad auf Objektträger (Superfrost[®] Plus; Karl Hecht Glaswarenfabrik) aufgezoogen, sorgfältig von Wasser befreit und anschließend über Nacht bei 37 °C getrocknet.

Gewebsschnitte der *Cerebella* wurden verwendet, wenn zwei vollständige Ebenen von Kleinhirnparenchym mikroskopisch abgrenzbar waren (siehe Abb. 4). Von jedem Kleinhirn wurden 108 Gewebsschnitte á 4 µm hergestellt und jeder neunte durch Hämoxylin/Eosin (HE; siehe Abschnitt 2.4.5.2) gefärbt. Die folgenden Gewebsschnitte wurden jeweils zur Detektion von Immuninfiltration mittels IHC-Färbungen für CD3⁺ T- und B220⁺ B-Zellen, sodass 12 vollständige Paare aus HE- und CD3/B220-IHC-Färbung.

Von jeder RM-Probe wurden 48 Gewebsschnitte á 4 µm vorgenommen und jeder fünfte Schnitt zur Übersicht HE, die darauffolgenden Schnitte wurden jeweils durch Luxol-Fast-Blue (LFB) gefärbt. Es entstanden somit $n = 12$ Sets aus HE und LFB. Weiter wurden $n = 4$ mittels SMI-32 und $n = 4$ pro Versuchstier mit spezifischen AK gegen *Oligodendrocyte transcription factor 2* (OLIG2) und *Adenomatous polyposis coli* (APC) gefärbt.

2.4.5.2 Hämoxylin-Eosin-Färbung

Die HE-Färbungen diente als Übersichtsfärbung für das RM und zur Flächenbestimmung des Kleinhirnparenchyms als Ort der lymphozytären Infiltration (siehe Abb. 4).

Die Gewebsschnitte wurden zunächst zweimal für 10 min in Xylol (redestilliert; Universität Würzburg) entparaffiniert. Anschließend wurden die Gewebsschnitte in einer absteigender Alkoholreihe mit zweimal 99,8 % Ethanol (Nordbrand), 96 % Ethanol (Nordbrand), 80 % und 70 % Ethanol (jeweils verdünnt aus 96 % Ethanol mit *Aqua destillata*) für jeweils 5 min rehydriert und abschließend für 5 min in *Aqua destillata* gespült.

Zur Färbung inkubierten die Gewebsschnitte anschließend 10 min in einer Hämalaunlösung nach Mayer. Es erfolgte ein erneutes Spülen in *Aqua destillata* für 5 min bevor die Färbung für 10 min unter fließendem Leitungswasser gebläut wurde. Zur Gegenfärbung verwendeten wir eine Lösung aus 0,1 % Eosin Yellowish (AppliChem) in *Aqua destillata*, welche durch Zugabe eines Tropfens Essigsäure (100 %; Carl Roth) aktiviert wurde. Nach Entfernung von Farbüberresten in *Aqua destillata* für 5 min wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe in 70 %, 80 %, 96 % für jeweils 1 min sowie zweimal für 3 min in 99,8 % Ethanol und abschließend zweimal für 5 min in Xylol dehydriert und abschließend mittels DePeX (SERVA Electrophoresis) eingedeckt.

Die Dokumentation der Färberesultate erfolgte an einem Leica-Mikroskop DM2000 LED (Leica) mit MC170HD Mikroskopkamera (Leica) und der entsprechenden Software (Application Suite 4.40 Build 454; Leica).

Das Kleinhirnparenchym wurde über die gesamte Fläche in 5facher Vergrößerung dokumentiert. Die Parenchymfläche der *Cerebella* ermittelten wir mittels ImageJ (Version2.0.0.-rc-54/1.51b; siehe Abb. 4).

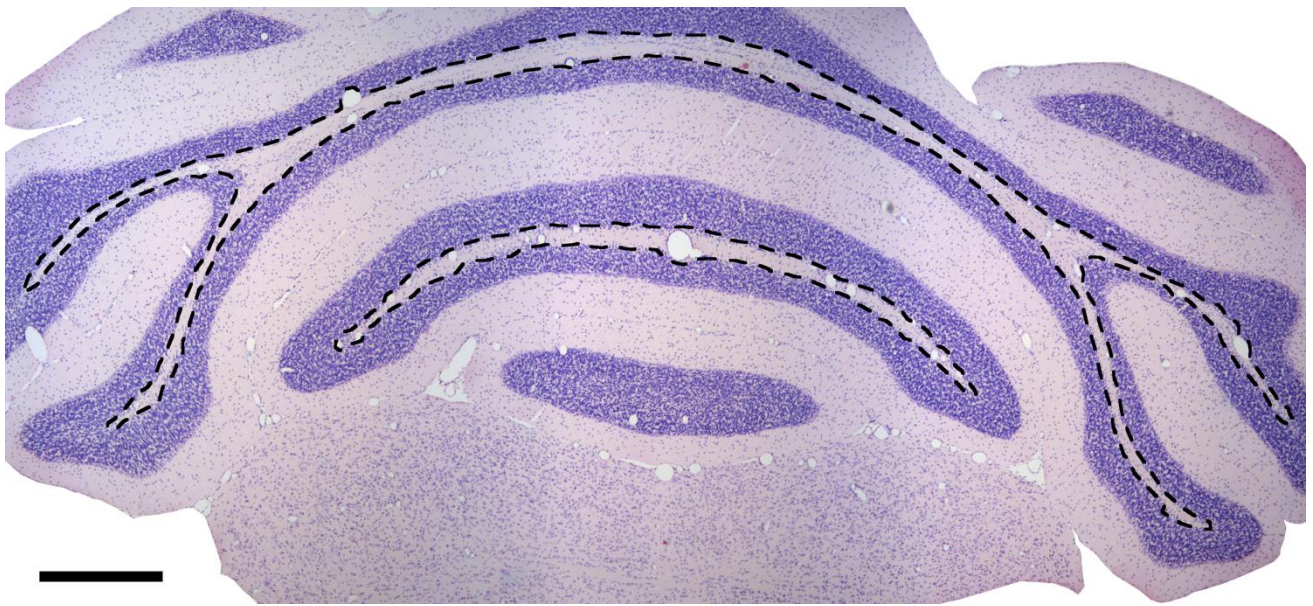


Abb. 4: Hämoxylin-Eosin Übersichtsfärbung Kleinhirn

Übersichtsfärbung zur Bestimmung der Kleinhirnparenchymfläche in Frontalebene; Kleinhirnparenchym in schwarz-gestrichelter Linie eingeschlossen. Maßstabsbalken entspricht 500 μm

2.4.5.4 Immunhistochemische Doppelfärbung für CD3 und B220

Zur Darstellung von lymphozytären Infiltraten der frontalen Gewebsschnitten der *Cerebella* wurde eine IHC-Doppelfärbung für CD3⁺ T-Zellen (Chromogen: DAB) sowie B220/CD45R⁺ B-Zellen (Chromogen: Vector® *Blue AP Substrate Kit*) vorgenommen. Eine Übersicht über die verwendeten Primär- und entsprechenden Sekundär-AK mit entsprechenden Verdünnungen sind in Tab. 8 aufgeführt.

Die Entparaffinierung und Rehydrierung der Gewebsschnitte führten wir wie in Abschnitt 2.4.5.2 beschrieben durch. Anschließend wurden die im Gewebe vorhandenen endogenen Peroxidasen durch 3 % H₂O₂ (Carl Roth) in *Aqua destillata* für 10 min

lichtgeschützt geblockt und die Gewebsschnitte zweimal 5 min in *Aqua destillata* gespült. Wir führten anschließend eine saure Demaskierung der Gewebsantigene durch. Hierzu wurden die Gewebsschnitte in Natrium-Citratpuffer (0,01 M) überführt und für 10 s in der Mikrowelle ausgekocht. Dies wurde siebenmal mit einem Abstand von je 1 min wiederholt. Nach einer Abkühlzeit von ca. 30 min bei RT wurden die Pufferlösung durch *Aqua destillata* bei kontinuierlichem Fluss ersetzt. Alle im folgenden beschriebenen Versuchsschritte führten wir, wenn nicht anders erwähnt, durch Aufbringen von 30 µl Lösungsvolumen auf die Gewebsschnitte durch. Zwischen den einzelnen Versuchsschritten spülten wir die Objektträger je dreimal 5 min in PBS, wenn nicht anders beschrieben.

Zur Reduktion unspezifischer Bindungen brachten wir 5 % NGS (Sigma-Aldrich) gelöst in PBS für 1 h auf. Die Objektträger wurden vorsichtig auf Zellstoff abgeklopft, um die Lösung zu entfernen und nicht in PBS gespült. Anschließend wurde der Anti-CD3 Primär-AK (Spezies: Kaninchen) gelöst in 1 % NGS in PBS aufgetragen und inkubiert bei 4 °C über Nacht in einer Feuchtkammer.

Am folgenden Tag wurde der mit Biotin gekoppelter Ziege-anti-Kaninchen Sekundär-AK gelöst in PBS für eine Stunde aufgebracht. Die Färbungsreaktion wurde durch Aufbringen eines Kaninchen Peroxidase-anti-Peroxidase (*Rabbit Peroxidase-anti-Peroxidase* = rb-PAP)-Komplex (Jackson ImmunoResearch Laboratories; 1:250 gelöst in PBS) für 30 min verstärkt.

Die Färbungsreaktion wurde durch einen Komplex aus Avidin-HRP (VECTASTAIN® *ABC HRP Kit*; Vector) in Verbindung mit dem biotinylierten Sekundär-AK im Avidin-Biotin-Peroxidase Komplex (ABC-Komplex) umgesetzt. Beide Komponenten der Lösung des Kits wurden entsprechend der Herstellerangaben 30 min vor der Verwendung gemeinsam je 1:250 in PBS verdünnt und anschließend für 30 min auf die Gewebsschnitte aufgebracht. Die Schnitte wurden je zweimal 5 min in PBS und PB gespült. Die Färbung erfolgte durch Oxidierung des Chromogens Diaminobenzidin (DAB; Sigma-Aldrich) durch den ABC-Komplex. Die DAB-Entwicklungslösung wurde entsprechend Abschnitt 2.2 in PB angesetzt. Die Objektträger wurden in die Substratlösung überführt und der Färbungsprogress lichtmikroskopisch kontrolliert. Die Färbungsreaktion wurde anschließend durch dreimal 5 min Spülen in PBS abgestoppt.

Nach der ersten IHC-Färbung für CD3⁺ T-Zellen erfolgte im Anschluss die zweite IHC-Färbung auf B220⁺ B-Zellen. Hierfür wurden erneut unspezifische Bindungen durch Aufbringen von 5 % NGS in PBS für 1 h geblockt. Die Objektträger wurden anschließend erneut auf Zellstoff abgeklopft jedoch nicht in PBS gespült. Anschließend wurde Anti-B220 Primär-AK (Spezies: Ratte) gelöst in 1 % NGS in PBS aufgebracht und zur Inkubation bei 4 °C lichtgeschützt über Nacht in einer Feuchtkammer gelagert.

Am Folgetag wurde ein biotinylierter Ziege-anti-Ratte Sekundär-AK in PBS verdünnt und inkubiert für 1 h. Die Entwicklung der zweiten IHC-Färbung erfolgte mittels AP-Streptavidin 1:500 verdünnt in PBS, welche für 30 min auf den Gewebsschnitten inkubiert. Als Chromogen fungierte das Vector[®] Blue AP-Substrat-Kit (Vector Laboratories). Die Substratlösung wurde entsprechend der Herstellerangaben in TrisHCl-Puffer (0,1 M) angesetzt und auf die Gewebsschnitte aufgetragen. Der Färbungsprozess wurde erneut lichtmikroskopisch kontrolliert und anschließend nach ausreichender Färbung durch Spülen der Objektträger dreimal für 5 min in PBS abgestoppt. Abschließend wurden das Gewebe für 8 min in 0,1 % Kernechtrotlösung gegengefärbt. Farbüberreste wurden in *Aqua destillata* für wenige Sekunden abgespült und die Objektträger mittels Aqua-Poly/Mount Eindeckmedium (Polysciences) eingedeckt.

Die IHC gefärbten Gewebsschnitte wurden am wie in Abschnitt 2.4.5.2 beschrieben dokumentiert. Die Immuninfiltrate wurden einzeln in 20facher Vergrößerung fotografiert. Die Definition der Immuninfiltrate in Kategorien ist in Abschnitt 3.5 aufgeführt. Die Anzahl der Immuninfiltrate wurden in Relation zur Gesamtfläche des analysierten Kleinhirnparenchyms gesetzt, welche wie in Abschnitt 2.4.5.2 beschrieben aus den angrenzenden HE-gefärbten Gewebeschnitten bestimmt wurden.

Tab. 8: Verwendete Antikörper Immunhistochemie/ -fluoreszenz

Primär-AK (Klon) [Spezifität]	Wirt	Hersteller Katalog-#	Verdünnung	Sekundär AK	Wirt	Hersteller Katalog-#	Verdünnung
Anti-CD3 (SP7) [T-Zellen]	Kaninchen	abcam (Cambridge, UK) #ab16669	1:100	Anti-Kaninchen-IgG biotinyliert	Ziege	Vector (Burlingame, USA) #BA-1000	1:250
Anti-B220/CD 45R (RA3-6B2) [B-Zellen]	Ratte	eBioscience (Waltham, USA) #14-0452	1:500	Anti-Ratte- IgG biotinyliert	Ziege	Vector (Burlingame, USA) #BA-9400	1:250
Anti-SMI32R (SMI-32) [Axolytische Axone]	Maus	Covance (Princeton, USA) #SMI-32R	1:500	Anti-Maus- IgG biotinyliert	Ziege	Vector (Burlingame, USA) #BA-9200	1:250
Anti-Olig2 (polyklonal) [Oligodendrozyten]	Kaninchen	Merck Milipore (Darmstadt, GER) #AB9610	1:500	Anti-Kaninchen-IgG biotinyliert	Ziege	Vector (Burlingame, USA) #BA-1000	1:250
Anti-APC AB-7 (CC-1) [Remyelinisierung]	Maus	Calbiochem (La Jolla, USA) #OP80 AB-7	1:100	Anti-Maus- IgG-Cy5	Ziege	Jackson ImmunoResearch (West Grove, USA) #115-175-071	1:250

AK = Antikörper, APC = *adenomatous polyposis coli*, CD = *Cluster of Differentiation*, Cy = Cyanin, EAE = Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis, IgG = Immunglobulin G

2.4.5.5 Luxol-Fast-Blue Markscheidenfärbung

Zur Bestimmung des Grades der Demyelinisierung färbten wir paraffinierte Transversalschnitte des lumbalen RMs mittels Solvent Blue 38 (Sigma-Aldrich). Anschließend wurden die Färbung mittels einer Lithiumcarbonatlösung differenziert, so dass sich myelinisierte Abschnitte der WM dunkelblau und nicht- bzw. demyelinisierte Bereiche entfärbt darstellten.

Hierzu wurden zunächst die Gewebsschnitte zweimal 10 min in Xylol entparaffiniert und in 99,8 % und 96 % Ethanol für jeweils 5 min rehydriert. Für die primäre Färbung wurden die Objektträger in einer Lösung aus 0,2 % Solvent Blue 38 gelöst in 96 % Ethanol überführt und inkubierten bei 60 °C lichtgeschützt über Nacht. Am folgenden Tag stoppten wir den Färbungsprozess durch Spülen der Gewebsschnitte für jeweils 1 min in 96 % und 50 % Ethanol (verdünnt aus 96 % Ethanol in *Aqua destillata*) sowie in *Aqua destillata*. Zur Differenzierung der Färbung wurde die Pigmente für je 10 - 30 s durch 0,05 % Lithiumcarbonat in *Aqua destillata* im Gewebe gelöst und in 96 % Ethanol gespült. Die Differenzierung wurde durch Spülen in *Aqua destillata* für 5 min unterbrochen. Das Ergebnis der Differenzierung wurde anschließend lichtmikroskopisch kontrolliert und gegebenenfalls wiederholt bis graue Substanz und WM deutlich voneinander abgrenzbar waren. Die Schnitte wurden in einer Kernechtrotlösung für 3 min gegengefärbt. Die Dehydrierung und Eindeckung erfolgten analog zu Abschnitt 2.4.5.2.

Die Dokumentation der Färberesultate erfolgte wie in Abschnitt 2.4.5.2 beschrieben. Das gesamte RM wurde im Querschnitt in 5facher Vergrößerung fotografiert. Die Gesamtfläche der WM von $n = 12$ Gewebeschnitten pro Versuchstier wurde mittels ImageJ (Version 2.0.0.-rc-54/1.51b) bestimmt und ergab sich je Gewebeschnitt aus den Flächen der Vorderseitenstränge (VSS) und Hinterstränge (HS) bds. (siehe Abb. 5). Weiter wurden demyelinisierte Flächen im Bereich der VSS und HS vermessen. Abschließend wurde der Quotient aus demyelinisierter Fläche zur Gesamtfläche der WM für die einzelnen Versuchstiere gebildet.

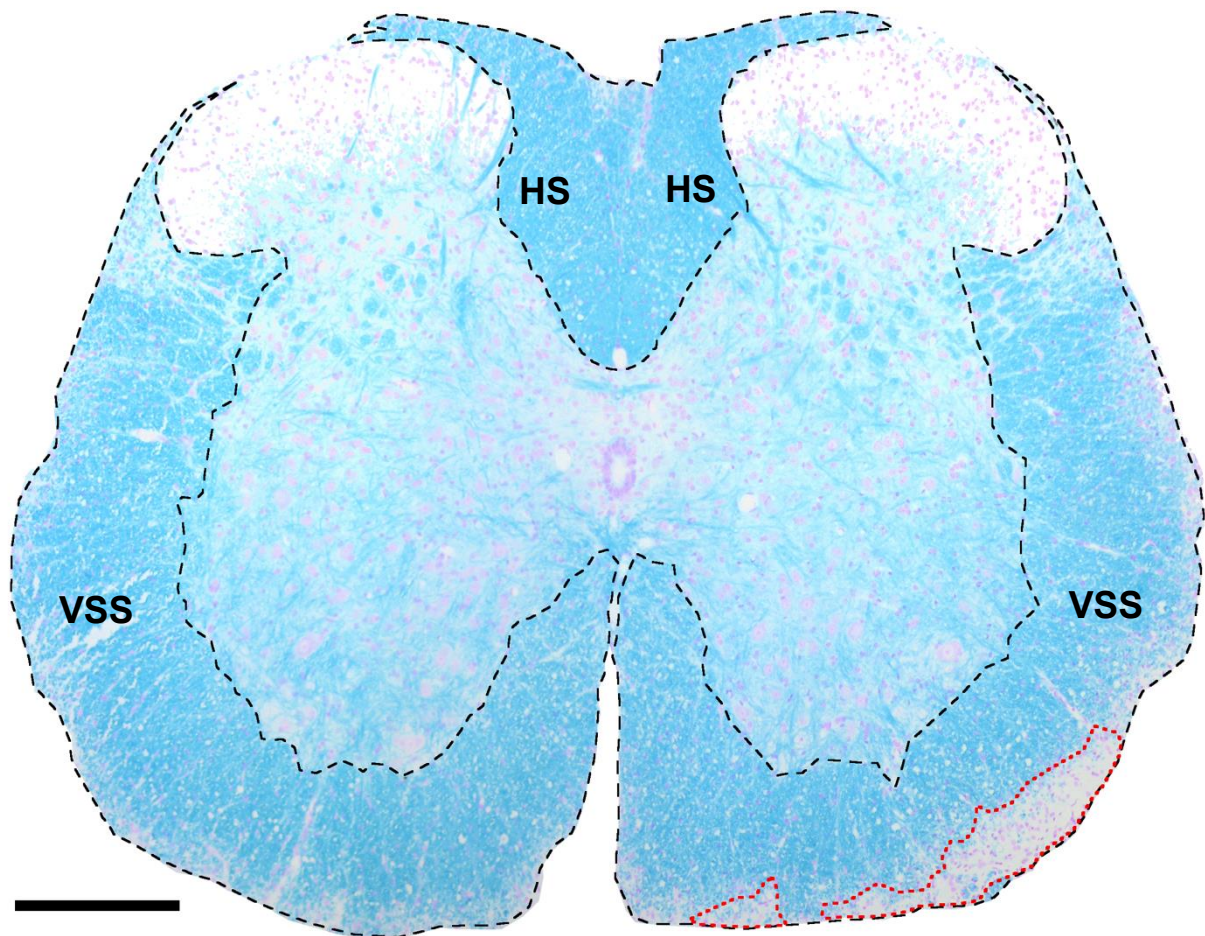


Abb. 5: Luxol-Fast-Blue Markscheidenfärbung Rückenmark

Färbung zur Bestimmung der Gesamtfläche der Weißen Substanz in Transversalebene des Rückenmarks bestehend aus VSS und HS sowie zur Bestimmung demyelinisierter Abschnitte. Fläche der weißen Substanz in schwarz-gestrichelter Linie eingeschlossen, demyelinisierte Areale in rot-gepunkteter Linie eingeschlossen. Maßstabsbalken entspricht 200 μm . HS = Hinterstrang; VSS = Vorderseitenstrang.

2.4.5.6 SMI-32 immunhistochemische Färbung

Zur Darstellung von SMI-32⁺ axonaler Pathologie führten wir eine IHC-Färbung der lumbalen RM-Querschnitte der Versuchstiere der chronischen EAE-Kohorte durch. Während in gesunden, myelinisierten Axonen die vorhandenen Neurofilamente stark-phosphoryliert sind, gelten beschädigte nicht-phosphorylierten Neurofilamenten Parameter axonaler Pathologie und können mittels des spezifischen murinen Antikörper SMI-32 markiert werden. SMI-32 gilt daher als ein Marker für axonale Pathologie insbesondere auch im Bereich normal-myelinisierten Regionen (Trapp et al., 1998; Turner et al., 2015).

Alle Schritte der Entparaffinierung und Rehydrierung der Gewebsschnitte erfolgten analog zu Abschnitt 2.4.5.2. Das Abblocken der endogenen Peroxidasen sowie die saure Demaskierung der Antigene wurden wie in Abschnitt 2.4.5.3 beschrieben durchgeführt. Die Färbungsschritte erfolgten, wenn nicht anders erwähnt, durch Aufbringen von 30 µl Volumen auf die Gewebsschnitt. Eine Übersicht über die verwendeten AK findet sich in Tab. 8.

Da der Primär-AK ebenso wie das zu färbende Gewebe der Spezies Maus entstammte, wurde ein *Mouse-on-Mouse-* (MOM) Kit (Vector Laboratories) gemäß der Herstellerangaben verwendet, um den Grad an unspezifischer Hintergrundfärbung zu minimieren. Die im folgenden angegebenen Lösungen entstammen diesem MOM-Kit. Zunächst inkubierten wir die Gewebsschnitte in der Proteinblocklösung (*MOM Blocking Reagent*) für 1 h bei RT. Anschließend wurde das Verdünnungsmedium (*MOM Diluent*), für 5 min aufgetragen. Zwischen der Inkubation der Proteinblocklösung, des Verdünnungsmediums und des Primär-AK wurden die Objektträger jeweils auf Zellstoff abgeklopft. Als Primär-AK fungierte ein Anti-SMI-32-AK der Spezies Maus gelöst im Verdünnungsmedium, welcher für 30 min auf den Gewebsschnitten inkubierte. Anschließend wurden die Objektträger für zweimal 2 min in PBS gespült.

Ein biotinylierter Ziege-Anti-Maus-AK (Vector), welcher ebenfalls im Verdünnungsmedium gelöst wurde, diente als Sekundär-AK und inkubierte für 10 min auf den Gewebsschnitten. Diese wurden anschließend zweimal 5 min in PBS gespült. Zur Verstärkung der enzymatischen Reaktion wurde ein Maus Peroxidase-anti-Peroxidase (m-PAP) -Komplex (Jackson ImmunoResearch Laboratories), 1:250 verdünnt in PBS, eingesetzt. Alle danach folgenden Schritte von Aufbringen des ABC-Komplexes bis zur Färbung mittels DAB-Substratlösung ist in 2.4.5.4 beschrieben. Die Gegenfärbung erfolgte mittels Kernechtrot für 3 min. Die Abschließende Dehydrierung der Gewebsschnitte und Eindeckung der Objektträger erfolgte analog zu Abschnitt 2.4.5.2.

Die Dokumentation der Färberesultate ist Abschnitt 2.4.5.2 zu entnehmen. Der gesamte RM-Querschnitt wurde in 10facher Vergrößerung fotografiert. Die SMI-32⁺ gefärbten axonalen Läsionen im Bereich der VSS und HS bds. wurden mittels Image J (Version 2.0.0.-rc-54/1.51b) gezählt. Die Anzahl der axonalen Läsionen wurde abschließend in Relation zur Gesamtfläche der WM gesetzt, bestimmt aus der angrenzenden LFB RM-Färbung.

2.4.5.7 Olig2 und APC Immunfluoreszenz-Doppelfärbung

Zur Quantifizierung der Remyelinisierung der Versuchstiere der chronischen EAE-Kohorte führten wir eine Olig2/APC IF-Doppelfärbung durch.

Die Schritte der Entparaffinierung und Rehydrierung erfolgten wie in Abschnitt 2.4.5.2 beschrieben. Anschließend wurden die Gewebstantigene wie in Abschnitt 2.4.5.3 beschrieben, sauer demaskiert. Wenn nicht anders beschrieben wurden für die einzelnen Färbungsschritte 30 µl Lösungsvolumen auf die Gewebsschnitte aufgebracht. Die Objektträger wurden anschließend jeweils dreimal für 5 min in PBS gespült. Eine Übersicht über die verwendeten AK findet sich in Tab. 8

Die Gewebsschnitte wurden nun mittels 0,25 % Triton™ X-100 (Sigma-Aldrich) gelöst in PBS für 10 min permeabilisiert. Unspezifische Bindungen wurden mittels 5 % NGS in PBS für 1 h bei RT geblockt. Die Blocklösung wurde anschließend durch sanftes Abklopfen von den Objektträgern entfernt, ohne diese anschließend in PBS zu spülen. Der Primär-AK Anti-Olig2 der Spezies Kaninchen wurde in 1 % NGS in PBS verdünnt auf die Gewebsschnitte aufgetragen und, inkubierte für 1 h.

Als Sekundär-AK verwendeten wir einen biotinylierten Ziege-anti-Kaninchen AK verdünnt in 1 % NGS in PBS, welcher für 30 min inkubierte. Als Fluoreszenzfarbstoff verwendeten wir DyLight® 550 konjugiert mit NeutrAvidin (ThermoFisher Scientific) welcher spezifisch an Biotin band. Dies wurde 1:500 in PBS verdünnt und für 30 min auf die Gewebsschnitte aufgetragen.

Für die Doppelfärbung wurden die Gewebsschnitte anschließend erneut in 5 % NGS in PBS für 1 h geblockt. Nach erneutem Abklopfen der Objektträger auf Zellstoff ohne Spülung mit PBS wurde der zweite Primär-AK Anti-APC der Spezies Maus in 1 % NGS in PBS verdünnt, auf die Gewebsschnitte aufgetragen und inkubierte über Nacht bei 4 °C.

Als Sekundär-AK fungierte der Cy5-Fluorochrom-gekoppelte Ziege-anti-Maus-AK gelöst in 0,02 % DAPI (Roche) in PBS, welcher bei RT für 30min inkubierte. Die Eindeckung der Objektträger erfolgte mittels Mowiol® 4-88 (Carl Roth).

Zur Auswertung wurden je 6-8 Abschnitte eines RM-Querschnitt mittels Keyence BZ-9000 (Keyence) unter Verwendung der Software Keyence BZ-II Viewer (Version 1.41.00a0; Keyence) fotografiert, sodass die VSS und HS bds. vollständig abgebildet waren.

Wir nutzten ImageJ (Version 2.0.0.-rc-54/1.51b) zur Zählung der Olig2⁺ und Olig2⁺APC⁺ Zellen. Diese wurden jeweils in Relation zur Gesamtfläche der WM gesetzt, welche wir anhand der angrenzenden LFB-gefärbten RM-Querschnitte ermittelten.

2.5 Statistische Auswertung

Zur statistischen Auswertung der Daten sowie die Erstellung der Graphen erfolgte mit Graphpad Prism 6 (Version 6.01; Graphpad Software). Aufgrund der zu geringen Kohortengrößen (akute EAE: $n = 9$; chronische EAE: $n = 20$) sowie der fehlenden Normalverteilung der Daten zeigten sich die Bedingungen zur Durchführung des t-Tests für unabhängige Stichproben nicht erfüllt. Es diente daher der ungepaarte nicht-parametrische Mann-Whitney-U-Test mit exaktem zweiseitigem p -Wert zum Vergleich zwischen Anti-mCD52-AK- und Isotypkontrollgruppe. Das Signifikanzniveau wurde mit $\alpha = 5\%$ definiert. In den Graphen sind jeweils MW sowie die Standardfehler des MW (*Standard Error of Mean* = SEM) dargestellt. Die Signifikanzniveaus wurden mit Sternen entsprechend $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) und $p < 0,001$ (***) markiert.

3. Ergebnisse

3.1 Reduktion der Symptomlast in der akuten, nicht jedoch in der chronischen EAE-Kohorte

Zur Evaluation des Einflusses einer Anti-mCD52-AK Therapie auf den klinischen Verlauf der MP4-EAE, bewerteten wir zunächst die Versuchstiere ab dem Tag der Immunisierung bis zum Tag der Opferung nach den gängigen klinischen EAE-Kriterien, wie in Abschnitt 2.4.1 beschrieben. Eine Übersicht der klinischen Parameter der Kohorten findet sich in **Error! Reference source not found.** Eine Übersicht der klinischen Ergebnisse der akuten und chronischen EAE-Kohorte sind in Abb. 6 dargestellt.

In der Betrachtung der akuten EAE Kohorte stellten wir signifikante Unterschiede zwischen Anti-mCD52-AK- ($n = 4$) sowie IgG2a-Isotyp-Gruppe ($n = 5$) bzgl. der Zeit von Immunisierung bis zur erster Krankheitsmanifestation ($p = 0,02$), sowie in Bezug auf den Beobachtungszeitraum nach Therapieende ($p = 0,048$) fest. Im Hinblick auf klinische EAE-Werte zu Beginn der Erkrankung ($p = 0,83$) sowie Erkrankungsdauer vor Behandlungsbeginn ($p = 0,37$) ergaben sich jedoch keine signifikanten Differenzen, weshalb wir eine Vergleichbarkeit der Gruppen bezüglich des Therapieeffekts annehmen konnten. In Betrachtung der finalen klinischen Scores 11-12 Tage nach Behandlungsende zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen Anti-mCD52-AK- und IgG2a-Isotypgruppe ($p = 0,32$). Wir konnten jedoch einen signifikanten Effekt in Betrachtung der Differenz der klinischen Scores vor und nach Behandlung zwischen den beiden Gruppen feststellen ($p = 0,02$).

Die klinische Analyse der chronischen EAE-Kohorte ergab keine signifikanten Unterschiede im Hinblick auf Symptombeginn ($p = 0,68$), Erkrankungsdauer vor Behandlungsbeginn ($p = 0,42$) und Beobachtung nach Behandlungsende ($p = 0,29$). Weder im Vergleich der finalen klinischen Werte 11-12 d nach Therapieende ($p = 0,85$) noch im Vergleich der Differenz der klinischen Werte vor und nach Therapie ($p = 0,61$) stellten wir signifikante Effekte einer Anti-mCD52- gegenüber der IgG2a-Isotyp-AK Behandlung fest.

Tab. 9: Klinische Parameter der akuten und chronischen Kohorte

Akute EAE-Kohorte	<i>n</i>	Symptombeginn (d)	Score bei Behandlungsbeginn	Krankheitsdauer vor Behandlung (d)	Beobachtungzeit nach Behandlung (d)	Finaler Score	Score Differenz
Isotyp-AK	5	15,40 ± 1,40	2,75 ± 0,08	5,20 ± 1,83	11,20 ± 0,20	2,15 ± 0,22	0,6 ± 0,15
Anti-mCD52-AK	4	20,25 ± 1,11	2,94 ± 0,36	2,75 ± 1,11	12,00 ± 0,00	1,50 ± 0,54	1,44 ± 0,21
<i>p</i> -Wert		*0,02	0,833	0,37	*0,048	0,32	*0,02
Chronische EAE-Kohorte	<i>n</i>	Symptom-Beginn (d)	Score bei Behandlungsbeginn	Krankheitsdauer vor Behandlung (d)	Beobachtung nach Behandlung (d)	Finaler Score	Score Differenz
Isotyp-AK	10	16,50 ± 1,02	2,55 ± 0,13	63,70 ± 1,06	11,20 ± 0,13	2,43 ± 0,21	0,13 ± 0,12
Anti-mCD52-AK	10	16,00 ± 1,10	2,50 ± 0,19	65,00 ± 1,06	11,40 ± 0,31	2,50 ± 0,21	0,00 ± 0,06
<i>p</i> -Wert		0,68	0,85	0,42	0,29	0,85	0,61

Aufgeführt sind Mittelwerte ± Standardfehler des Mittelwerts. **p* < 0.05 in Mann-Whitney-U-Test; AK = Antikörper, CD = *Cluster of Differentiation*, d = *days*, EAE = Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis

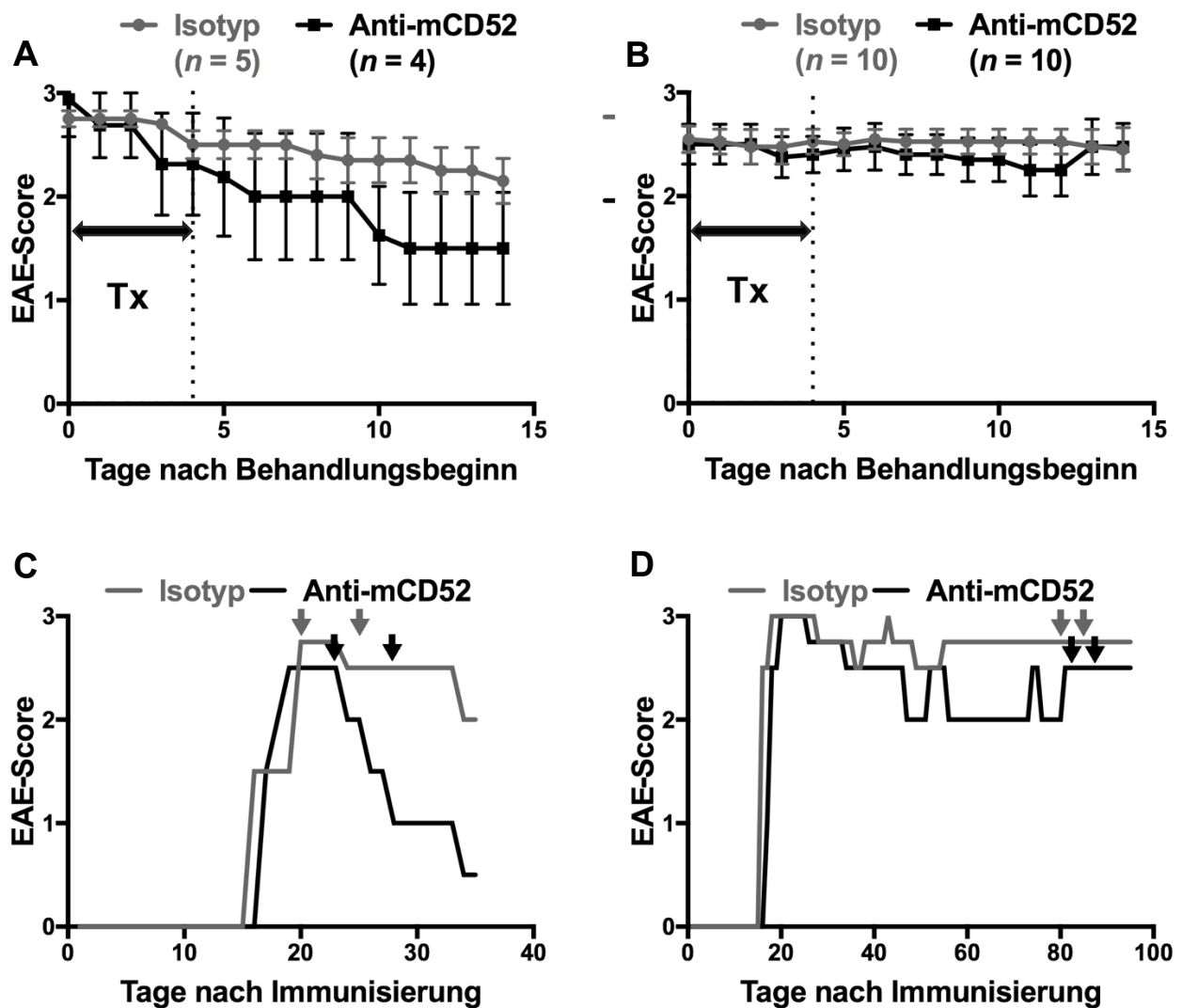


Abb. 6: Klinischer Verlauf

A und B: Darstellung des Krankheitsverlaufs von MP4-immunisierten Mäusen ab Behandlungsbeginn mit 200 µg Anti-mCD52-AK oder Isotypkontroll-AK an 5 aufeinanderfolgenden Tagen (Tx) entweder **A:** im Höhepunkt Symptomschwere oder **B:** ca. 60 Tage nach Symptomausprägung. Darstellung jeweils Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwerts; **C und D:** Darstellung der Erkrankungsverläufe individueller Versuchstiere ab Immunisierung der **C:** akuten oder **D:** chronischer EAE-Kohorte. Die Pfeile repräsentieren Beginn und Ende des Behandlungszeitraums. AK = Antikörper; EAE = experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis. In Teilen aus dem Englischen übersetzt und angepasst aus Simon et al. (2018); (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>)

3.2 Depletion von zirkulierenden CD4⁺ T und CD19⁺ B-Lymphozyten im Blut

Zur Bewertung der Anti-mCD52-AK vermittelten Depletion der peripheren Lymphozytenpopulation bestimmten wir durchflusszytometrisch den Anteil von CD4⁺ T- und CD19⁺ B-Zellen auf die Gesamtheit der morphologisch definierten Lymphozytenpopulation. Die Ergebnisse sind in Abb. 7 dargestellt.

In der akuten EAE-Kohorte beobachteten wir im Vergleich der Isotyp- ($n = 5$) zur Anti-mCD52-AK-Gruppe ($n = 4$) eine signifikante Differenz der morphologisch definierten Lymphozytenpopulation in Relation zur Gesamtheit der Ereignisse von $23,49 \pm 4,71$ % zu $2,73 \pm 0,39$ % ($p = 0,02$). Einen ähnlichen Effekt beobachteten wir ebenfalls in der chronischen EAE-Kohorte bei einem Lymphozytenanteil $45,85 \pm 11,15$ % in der Isotypkontroll- ($n = 6$) zu $8,69 \pm 2,1$ % in der Anti-mCD52-AK-Gruppe ($n = 8$; $p = 0,02$).

Da es sich hierbei jedoch um eine morphologische Analyse der aufgezeichneten Ereignisse handelte, analysierten wir mittels spezifischer IF-AK-Markierung den prozentualen Anteil von CD4⁺CD19⁻ T-Zellen, sowie CD4⁻CD19⁺ B-Zellen an der Lymphozytenpopulation. Die *Gating*-Strategie ist in Abb. 1 dargestellt, die Ergebnisse hierzu sind in Abb. 7 zusammengefasst.

Es zeigte sich eine signifikante Reduktion der CD4⁺CD19⁻ T-Zellen durch Anti-mCD52-AK-Therapie im Vergleich zur Isotypkontrollgruppe in der akuten EAE-Kohorte von $33,82 \pm 3,68$ % auf $0,92 \pm 0,19$ % ($p = 0,02$) sowie in der chronischen EAE-Kohorte von $24,75 \pm 2,34$ % auf $3,53 \pm 2,87$ % ($p < 0,001$).

Ein ähnlicher Effekt ließ sich auch für den Anteil von CD19⁺CD4⁻ B-Zellen an der Gesamtheit der Lymphozytenpopulation feststellen. Im Vergleich von Isotypkontrollgruppe zu Anti-mCD52-AK-Gruppe zeigte sich eine Reduktion von $21,51 \pm 4,41$ % auf $3,22 \pm 1,34$ % ($p = 0,02$) in der akuten, sowie $39,05 \pm 3,71$ % auf $9,70 \pm 2,15$ % ($p < 0,001$) in der chronischen EAE-Kohorte.

Zusammenfassend ließ sich durchflusszytometrisch der primäre Mechanismus einer peripheren Lymphozytendepletion durch Anti-mCD52-AK-Therapie im Vergleich zur Isotypkontrollgruppe im Blut von MP4-immunisierten Mäusen nachweisen.

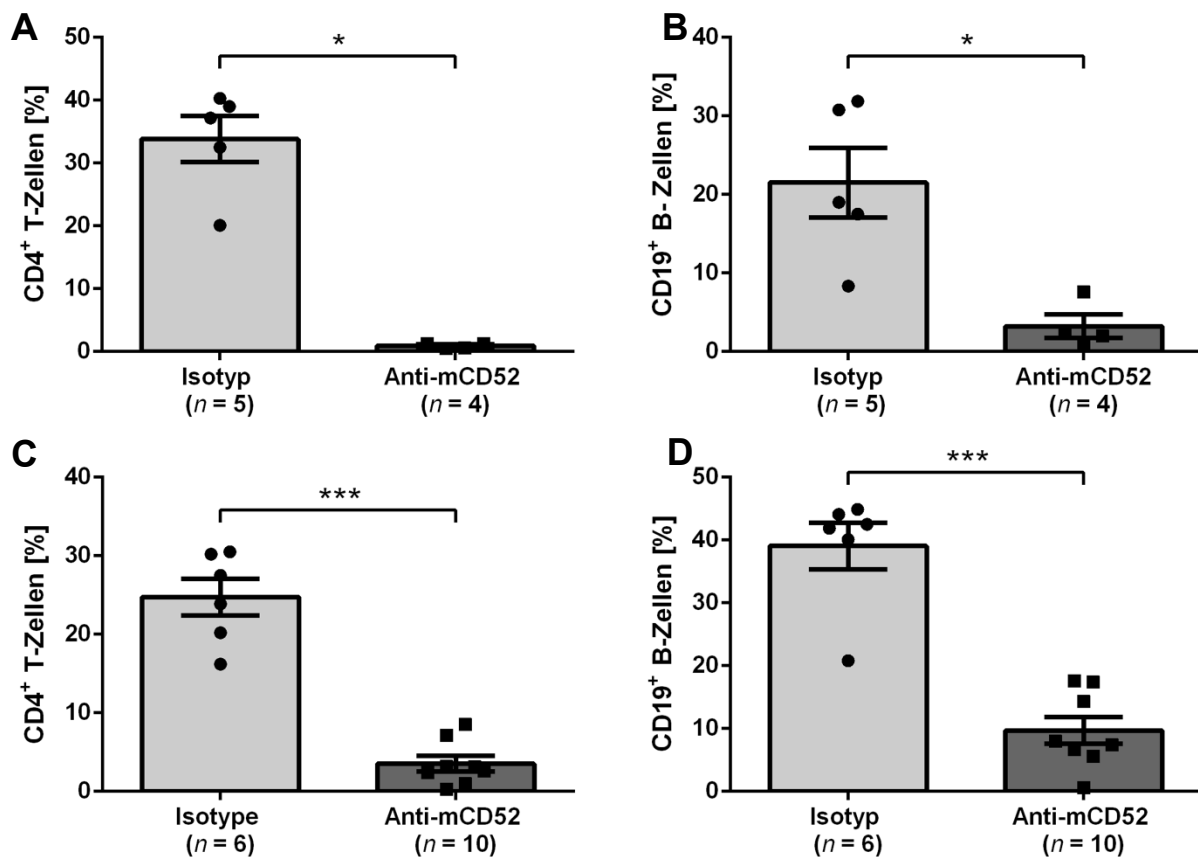


Abb. 7: Durchflusszytometrisch bestimmte Lymphozytenpopulationen

Durchflusszytometrische Bestimmung des Anteils von **A und C:** CD4⁺ T- sowie **B und D:** B-Lymphozyten an der morphologisch definierten Lymphozytenpopulation im Blut von MP4-immunisierten EAE-Versuchstieren nach Behandlung mit 200 µg Anti-mCD52-AK oder Isotypkontroll-AK an 5 aufeinanderfolgenden Tagen, entweder **A und B:** auf dem Höhepunkt der Symptomschwere (akute EAE) oder **B und C** ca. 60 Tage nach Symptomausprägung (chronische EAE). Darstellung von Mittelwert ± Standardfehler des Mittelwerts. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ in Mann-Whitney-U-Test. AK = Antikörper; CD = *Cluster of Differentiation*; EAE = experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis.

3.3 Keine Effekte auf die MP4-spezifische B-Zell-Reaktion

Da neben dem primären Wirkmechanismus der peripheren Lymphozytendepletion durch Alemtuzumab auch eine Toleranzinduktion durch die verhältnismäßig erhöhte Rate regulatorischer T-Lymphozyten im Menschen und Mausmodell postuliert wurde (Cox et al., 2005; Hu et al., 2009; Zhang et al., 2013), untersuchten wir die MP4-spezifische B-Zell-Antwort zur Evaluation eines spezifisch-immunmodulatorischen Effektes.

Hierzu bestimmten wir zunächst die Anzahl an spezifisch Anti-MP4-IgG-produzierenden an der Gesamtheit der IgG-produzierenden Lymphozyten in den drainierenden Inguinal-LK von $n = 27$ MP4-immunisierten Mäusen 11,33 ± 0,11 d nach einem fünftägigen Behandlungszyklus mit Anti-mCD52-AK oder IgG2a-Isotyp-AK mittels B-Zell-ELISPOT. Die Ergebnisse sind in Abb. 8 A und B zusammengefasst.

Wir ermittelten keine signifikanten Unterschiede der Gesamtzahl IgG-produzierender Zellen zwischen den Isotypkontroll- und Anti-mCD52-AK-behandelten Gruppen, weder in der akuten EAE-Kohorte mit $499 \pm 0,35$ ($n = 5$) zu $309,75 \pm 109,13$ *Spots/Well* ($n = 4$; $p = 0,21$), noch in der chronischen EAE mit $499,2 \pm 0,22$ ($n = 9$) zu $413,22 \pm 57,48$ *Spots/Well* ($n = 9$; $p = 0,72$). Auch zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zu MP4-IgG-Produzierenden B-Zellen in der akuten EAE mit $127 \pm 95,68$ zu $10,50 \pm 8,86$ *Spots/Well* ($p = 0,37$) noch in der chronischen EAE mit $6,28 \pm 2,48$ zu $3,89 \pm 1,22$ *Spots/Well* ($p = 0,59$). Aufgrund der hohen Varianz der Ergebnisse bestimmten wir abschließend das Verhältnis von MP4-spezifischen- zur Gesamtzahl IgG-produzierender Zellen, um eine unspezifische Reduktion IgG-produzierender Lymphozyten von einer MP4-spezifischen Reduktion differenzieren zu können. Auch hier konnten weder in der akuten EAE- mit $25,59 \pm 19,19$ zu $2,48 \pm 1,70$ % ($p = 0,51$) noch in der chronischen EAE-Kohorte mit $1,26 \pm 0,50$ zu $1,17 \pm 0,32$ % ($p = 0,81$) eine signifikante Reduktion der MP4-spezifischen B-Zell-Antwort im Verhältnis zur Gesamtzahl IgG-produzierender Zellen durch Anti-mCD52-AK-Behandlung ermittelt werden.

Weiter analysierten wir mögliche Effekte der peripheren Lymphozytendepletion auf die MP4-spezifische IgG-Konzentration im Serum mittels ELISA als Merkmal der Gesamtlast an MP4-spezifischer Auto-AK-Produktion an $n = 28$ MP4-EAE-Versuchstieren 11,36 ± 0,11 d nach Ende der fünftägigen Behandlungsphase. Die mittels Extinktion

ermittelte OD wurde als Korrelat zur Konzentration der MP4-spezifischen AK bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abb. 8 C+D zusammengefasst.

In der akuten EAE Kohorte lag die Extinktion bei $3,31 \pm 0,03$ in der Isotypkontrollgruppe ($n = 5$) zu $3,31 \pm 0,01$ in der Anti-mCD52-AK-Kontrollgruppe ($n = 4$; $p = 0,73$). Auch in der chronischen EAE Kohorte konnte zwischen Isotypkontrollgruppe ($n = 9$) und Anti-mCD52-AK-Gruppe ($n = 10$) bei einer Extinktion von $3,36 \pm 0,04$ zu $3,35 \pm 0,08$ ($p > 0,99$) kein signifikanter Effekt gemessen werden.

Es ließen sich somit keine relevanten Effekte einer Anti-mCD52-AK-Therapie auf die MP4-spezifische B-Zell-Antwort in den Inguinal-LK noch auf die MP4-spezifischen IgG-Spiegel im Serum der Versuchstiere nachweisen.

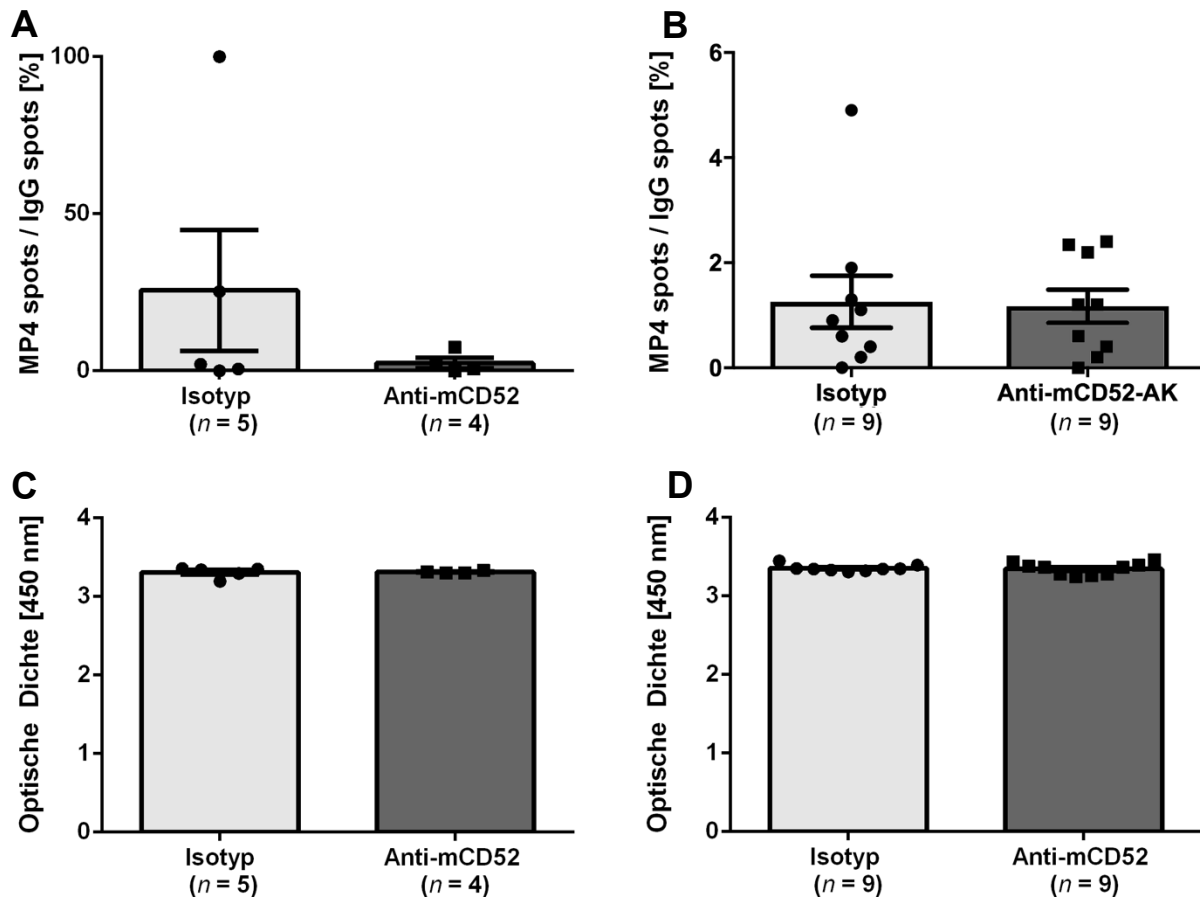


Abb. 8: MP4-spezifische B-Zell-Antwort und Antikörperproduktion

A und B: B-Zell-ELISPOT wurde an den drainierenden Inguinallymphknoten der MP4-immunisierten EAE-Versuchstiere durchgeführt. Bestimmt wurde die Anzahl der MP4-spezifischen B-Zell *Spots* in Relation zur Gesamtzahl der IgG *Spots*. **C und D:** Die MP4-spezifischen AK- Spiegel im Serum wurden mittels ELISA bestimmt. Die Untersuchungen erfolgten nach Behandlung mit 200 µg Anti-mCD52-AK oder Isotypkontroll-AK an 5 aufeinanderfolgenden Tagen entweder **A und C:** im Höhepunkt der Symptomausprägung (akute EAE) bzw. **B und D:** ca. 60 Tage nach Symptombeginn (chronische EAE); Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardfehler des Mittelwerts. AK = Antikörper, EAE = experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis, ELISA = *Enzyme-linked Immunoabsorbent Assay*, ELISPOT = *Enzyme-linked Immunospot Assay*. In Teilen aus dem Englischen übersetzt und angepasst aus Simon et al. (2018); (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>)

3.4 Reduktion der lymphozytären Infiltration in den *Cerebella*

Wir analysierten weiter, ob neben der Reduktion der zirkulierenden B- und T-Lymphozyten im Blut von MP4-immunisierten Mäusen durch eine Anti-mCD52-AK-Therapie, auch eine Depletion von CD52⁺ Lymphozyten im ZNS und somit am Ort der klinisch relevanten Inflamationsreaktion festzustellen war.

Hierfür untersuchten wir die *Cerebella* von $n = 29$ MP4-immunisierten Mäuse auf lymphozytäre Infiltrationen mittels einer IHC-Doppelfärbung auf CD3⁺ T- sowie B220⁺ B-Zellen. Die perivaskulären Lymphozyteninfiltrate wurden anhand ihrer Morphologie in drei Kategorien unterteilt, welche Abb. 9 A-C exemplarisch dargestellt sind. Als Nicht-B-Zell-Infiltrate bezeichneten wir Infiltrate, die eine mehrschichtige locker-strukturierte perivaskuläre Infiltration von CD3⁺ T-Zellen ohne Beteiligung von B220⁺ B-Zellen aufwiesen. Lymphozytäre Infiltrate, die ebenfalls mehrschichtig locker-strukturiert sowie perivaskulär lokalisiert waren, jedoch zusätzlich Beteiligung von B220⁺ B-Zellen aufwiesen, bezeichneten wir als diffuse B-Zell-Infiltrate. B-Zell-Aggregate definierten wir hingegen als mehrschichtig eng-gepackt, perivaskuläre Infiltrate mit einem B-Zell-Anteil von $> 1/3$ sowie einer Fläche $> 3000 \mu\text{m}^2$. Zur Auswertung wurden nur Infiltrate gewertet mit direktem Bezug zum Kleinhirnparenchym. Hierzu wurden in der akuten EAE-Kohorte je Versuchstier $11,83 \pm 1,37 \text{ mm}^2$ Kleinhirnparenchym der Isotyp-AK- sowie $17,61 \pm 1,37 \text{ mm}^2$ der Anti-mCD52-AK-behandelten Versuchstiere ausgewertet ($p = 0,06$). Respektive $14,03 \pm 1,13 \text{ mm}^2$ zu $16,13 \pm 2,37 \text{ mm}^2$ ($p = 0,67$) in der chronischen EAE Kohorte, die Bestimmung der Kleinhirnparenchymfläche ist in Abb. 4 dargestellt.

Die Gesamtmenge aller lymphozytären Infiltrate war in der akuten EAE-Kohorte mit $3,96 \pm 0,99 \text{ mm}^2$ in der Isotypgruppe zu $1,08 \pm 0,49 \text{ mm}^2$ in der Anti-mCD52-AK-Gruppe ($p = 0,03$), ebenso wie in der chronischen EAE-Kohorte mit $9,71 \pm 2,50$ zu $1,73 \pm 0,38 \text{ mm}^2$ ($p = 0,002$) signifikant reduziert. Eine Gegenüberstellung der einzelnen definierten Infiltratkategorien der akuten und chronischen EAE-Kohorte findet sich in Tab. 10. Auffällig war die vollständige Abwesenheit von B-Zell-Aggregaten in allen $n = 14$ Anti-mCD52-AK behandelten MP4-EAE Versuchstieren, wohingegen wir in 11 von $n = 15$ Isotypkontroll-AK behandelten Tieren diese Infiltratkategorie nachweisen konnten. Aufgrund dieses absoluten Mangels an B-Zell-Aggregaten, als morphologische Korrelate

der TLOs, in den Anti-mCD52-behandelten EAE-Versuchstieren, verzichteten wir im Folgenden auf Färbungen zur näheren Spezifizierung der TLO-Architektur.

Durch die CD3-B220-IHC-Doppelfärbung zeigten wir, dass neben der peripher-zirkulierenden Lymphozytenpopulation auch die lymphozytäre ZNS-Infiltration in den *Cerebella* im MP4-EAE-Modell durch Applikation eines Anti-mCD52-im Vergleich zur Behandlung durch einen Isotypkontroll-AK signifikant reduziert werden konnte, sowohl bei Behandlung auf dem Höhepunkt der Erkrankungsschwere (akute EAE) als auch ca. 60 Tage nach Symptombeginn (chronische EAE). Die Ergebnisse sind in Abb. 9 zusammengefasst.

Tab. 10: Immuninfiltration nach Kategorien

Akute EAE-Kohorte	<i>n</i>	Nicht B-Zell-Infiltrate [mm ⁻²]	Diffuse B-Zell-Infiltrate [mm ⁻²]	B-Zell-Aggregate [mm ⁻²]	Infiltrate gesamt [mm ⁻²]
Isotyp-AK	5	2,68 ± 0,73	1,54 ± 0,42	0,10 ± 0,04	3,96 ± 0,99
Anti-mCD52-AK	4	0,82 ± 0,33	0,24 ± 0,18	0,00 ± 0,00	1,08 ± 0,49
<i>p</i> -Wert		*0,03	*0,03	0,17	*0,03
Chronische EAE-Kohorte	<i>n</i>	Nicht B-Zell-Infiltrate [mm ⁻²]	Diffuse B-Zell-Infiltrate [mm ⁻²]	B-Zell-Aggregate [mm ⁻²]	Infiltrate gesamt [mm ⁻²]
Isotyp-AK	10	6,22 ± 1,91	5,33 ± 2,24	0,54 ± 0,20	9,71 ± 2,50
Anti-mCD52-AK	10	1,20 ± 0,26	0,53 ± 0,17	0,00 ± 0,00	1,73 ± 0,38
<i>p</i> -Wert		**0,002	***< 0,001	***< 0,001	**0,002

Die Kategorien der Immuninfiltrate sind jeweils in Relation zur analysierten Fläche des Kleinhirnparenchyms. Aufgeführt sind Mittelwerte ± Standardfehler des Mittelwerts. **p* < 0.05, ***p* < 0.01, ***<0,001 in Mann-Whitney-U-Test; AK = Antikörper, CD = *Cluster of Differentiation*, EAE = experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis,

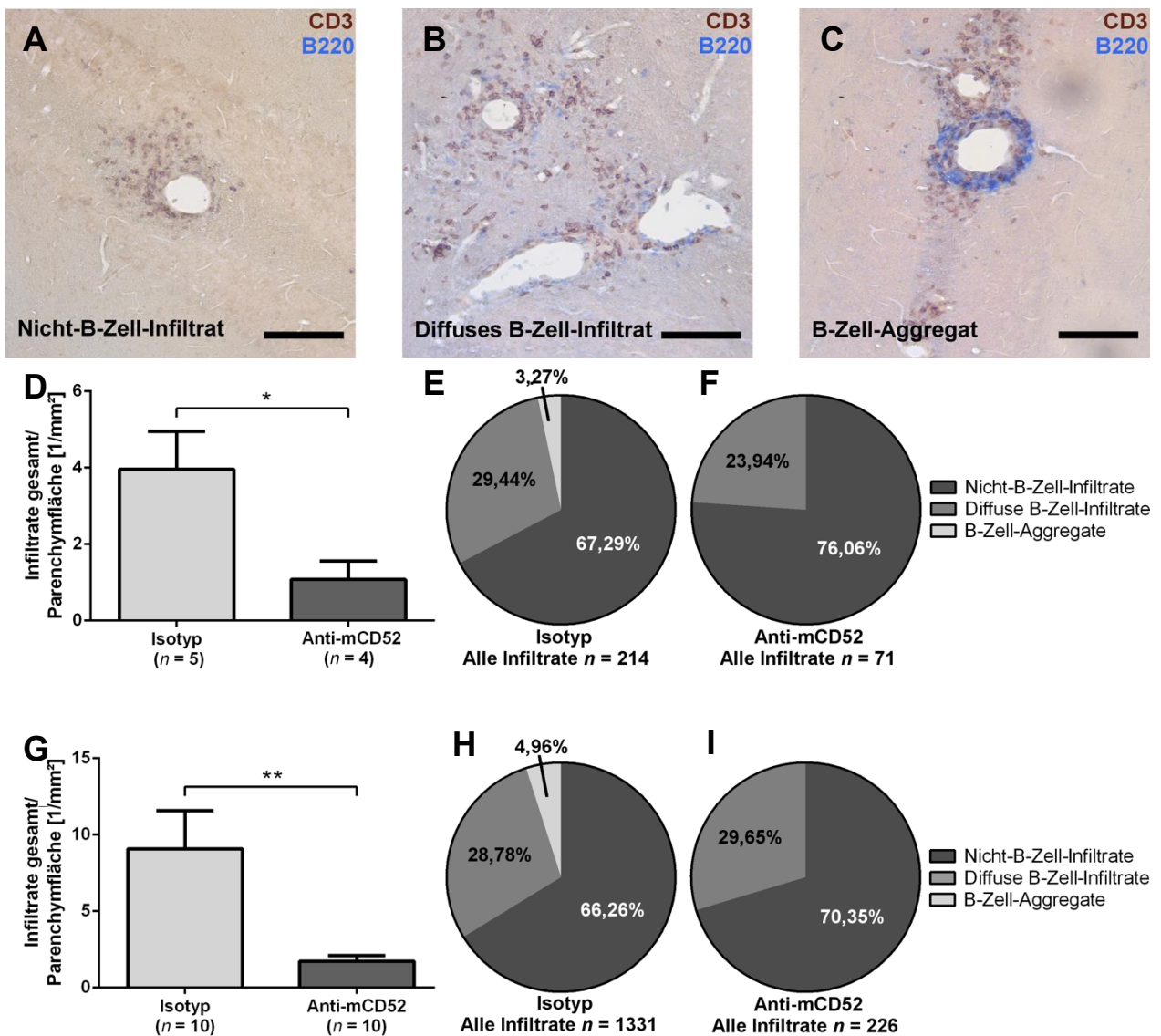


Abb. 9: Lymphozytäre Infiltration im *Cerebellum*

Histologische Auswertung der lymphozytären Infiltration in den *Cerebella* von MP4-immunisierten EAE-Versuchstieren. **A-C:** CD3/B220-Doppelfärbung zur Demonstration der Infiltratkategorien. Maßstabsbalken entsprechen jeweils 100 μ m. **D und G:** Quantifizierung der Anzahl der lymphozytären Infiltrate pro Kleinhirnparenchymfläche. **E, F, H und I:** Prozentuales Verhältnis der Infiltratkategorien von Mäusen behandelt mit 200 μ g Anti-mCD52-AK oder Isotypkontroll-AK an 5 aufeinanderfolgenden Tagen, entweder **D-F:** zum Zeitpunkt der maximalen Symptomausprägung (akute EAE) bzw. **G-I:** ca. 60 Tage nach Symptombeginn (chronische EAE). Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwerts. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ in Mann-Whitney-U-Test. AK = Antikörper, CD = *Cluster of Differentiation*, EAE = experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis. Aus dem Englischen übersetzt aus Simon et al. (2018); (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>)

3.5 Kein Einfluss auf Neurodegeneration und Remyelinisierung

Die beschriebene effektiver Depletion peripher-zirkulierender Lymphozyten im Blut sowie Reduktion von Immuninfiltraten im Kleinhirnparenchym durch Anti-mCD52-AK-Therapie spiegelten sich nicht in einer Reduktion der Klinik in der chronischen MP4-EAE-Kohorte wider. Wir analysierten daher den Einfluss der Therapie auf Demyelinisierung, axonale Läsionen sowie Remyelinisierung im lumbalen RM auf lichtmikroskopischer Ebene als Parameter für De- und Regeneration des ZNS.

Als primäre histopathologische Vergleichsgröße bestimmten wir den Grad der Demyelinisierung in $n = 20$ MP4-EAE-erkrankten Mäuse behandelt mit Anti-mCD52 bzw. Isotypkontroll-AK ca. 60 Tage nach initialer Symptomausprägung (chronischen EAE-Kohorte) mittels LFB-Myelinfärbung. Wir verglichen den Anteil demyelinisierter Areale zur Gesamtfläche der WM. Die Ergebnisse sind in Abb. 10 A zusammengefasst. Wir analysierten eine Gesamtfläche der WM von $8,58 \pm 0,49 \text{ mm}^2$ der Isotypkontroll- sowie $8,90 \pm 0,48 \text{ mm}^2$ in der Anti-mCD52-AK-Gruppe ($p = 0,74$). Bei einer demyelinisierten Fläche von $0,81 \pm 0,16 \text{ mm}^2$ in der Kontrollgruppe und $0,90 \pm 0,26 \text{ mm}^2$ in der Anti-mCD52-AK-Gruppe ($p = 0,91$) ergab sich somit ein prozentualer Anteil von $10,07 \pm 2,47\%$ und $10,73 \pm 3,47 \%$ zur Gesamtfläche der WM ($p = 0,74$).

Weiter betrachteten wir den Einfluss der Anti-mCD52-Therapie auf die axonale Pathologie im lumbalen RM. Hierzu wurden $n = 20$ der chronischen MP4-EAE-erkrankten Versuchstiere die SMI-32⁺ Segmente im lumbalen RM im Verhältnis zur Fläche der analysierten WM bestimmt, welche wir den Ergebnissen der angrenzenden LFB-gefärbten RM-Abschnitten entnahmen. Bei $87,51 \pm 10,07$ in der Isotypkontrollgruppe und $86,40 \pm 4,73 \text{ mm}^2$ WM in der Anti-mCD52-AK-Gruppe ergaben sich keine signifikanten Differenzen ($p = 0,97$), siehe Abb. 10 B.

Abschließend analysierten wir einen möglichen Effekt der Anti-mCD52-AK-Therapie auf die Remyelinisierung als Hinweis auf neuroregenerative Mechanismen. Hierzu analysierten wir das lumbale RM von $n = 20$ MP4-EAE Versuchstieren der chronischen EAE-Kohorte. Wir bestimmten zunächst die Anzahl Olig2⁺ Oligodendrozyten, im Verhältnis zur analysierten Fläche der WM, entsprechend der angrenzenden LFB-Färbungen. Es ergaben sich mit $488,88 \pm 75,82$ in der Isotyp-AK-Gruppe zu $500,24 \pm 61,30 \text{ pro mm}^{-2}$ Olig2⁺ Zellen ($p > 0,99$) keine signifikanten Differenzen. Da Oligodendrozyten im Rahmen von Myelinisierungs- bzw. Remyelinisierungsprozessen

passager APC exprimieren (Lang et al., 2013; Schampel et al., 2017), bestimmten wir mittels Olig2-APC-Doppelt-IF-Färbung die Anzahl APC-exprimierender Oligodendrozyten pro Fläche der analysierten WM, bestimmt aus der angrenzenden LFB-Färbung. Auch diesbezüglich zeigten sich bei $25,84 \pm 3,89$ in der Isotyp-AK- zu $26,60 \pm 10,67$ pro mm^{-2} WM ($p = 0,15$) keine signifikanten Effekte, siehe Abb. 10 C.

Auf lichtmikroskopischer Ebene ließen sich daher keine signifikanten Effekte der Anti-mCD52-AK-Therapie auf Neurodegeneration und Remyelinisierung in der chronischen MP4-EAE abgrenzen.

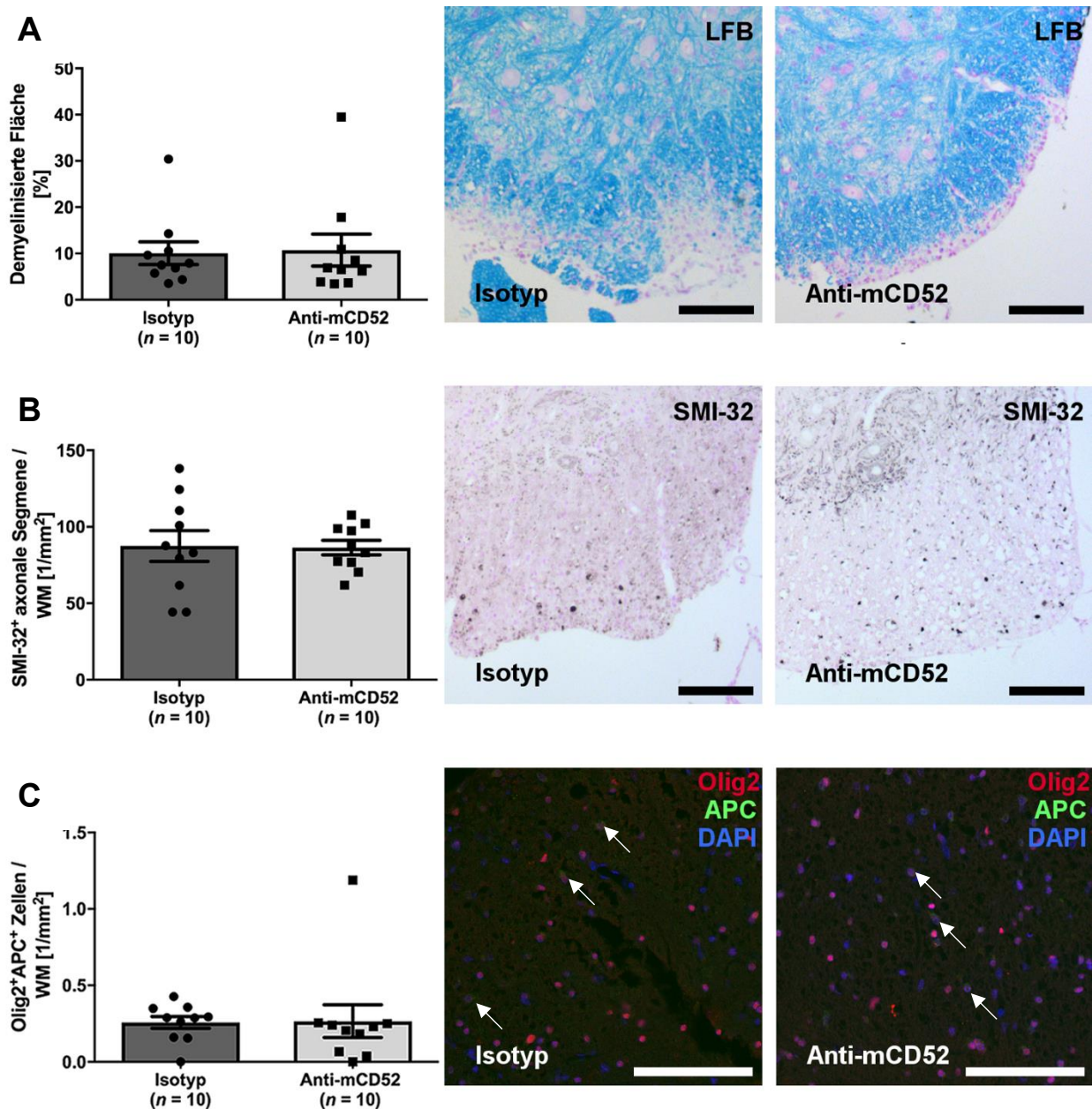


Abb. 10: Neurodegeneration und Remyelinisierung im Rückenmark

Färbungen an Rückenmarksquerschnitten von MP4-immunisierten EAE-Versuchstieren behandelt mit 200 µg Anti-mCD52-AK oder Isotypkontroll-AK an 5 aufeinanderfolgenden Tagen ca. 60 Tage nach Symptomausprägung **A:** LFB-Färbung zur Darstellung demyelinisierter Areale pro Gesamtfläche der WM; **B:** Anzahl SMI-32⁺ axonaler Segmente pro Gesamtfläche der WM; **C:** Anzahl Olig2⁺APC⁺ doppelpositiver Zellen pro Gesamtfläche der WM. Die Graphen zeigen jeweils Mittelwerte ± Standardfehler des Mittelwerts; Maßstabsbalken entsprechen jeweils 100 µm; AK = Antikörper; APC = *adenomatous polyposis coli*; EAE = Experimentelle Autoimmun-Enzephalomyelitis; LFB = Luxol-Fast-Blue, Olig2 = *Oligodendrocyte transcription factor 2*, DAPI = 4',6-Diamidin-2-phenylindol, WM = *White Matter*. Aus dem Englischen übersetzt aus Simon et al. (2018); (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>)

3.6 Zusammenfassung der Ergebnisse

Zusammenfassend zeigte sich eine diskrete Reduktion der Symptomlast durch Behandlung mit Anti-mCD52-AK im Höhepunkt der Krankheitsschwere (akute EAE), jedoch nicht ca. 60 Tage nach Symptombeginn (chronische EAE). Sowohl in der akuten als auch in der chronischen EAE ließ sich der primäre Mechanismus der Depletion zirkulierender T- und B-Lymphozyten im Blut durch Anti-mCD52-AK durchflusszytometrisch nachvollziehen, ohne jedoch die MP4-spezifische B-Zell-Antwort, bestimmt durch ELISPOT, oder der MP4-spezifischen AK-Spiegel, bestimmt durch ELISA, im Serum zu modulieren. Neben der effektiven Depletion der zirkulierenden Lymphozyten im Blut fand sich weiter eine Reduktion der lymphozytären Infiltration im *Cerebellum*, sowohl in der akuten als auch in der chronischen MP4-EAE. Insbesondere fanden sich in beiden Anti-mCD52-AK-behandelten Gruppen keine B-Zell-Aggregate. Diese Reduktion der ZNS-Entzündung ging jedoch weder einher mit einer Reduktion der Demyelinisierung oder der axonalen Pathologie noch mit einer verstärkten Remyelinisierung auf lichtmikroskopischer Ebene in der chronischen MP4-EAE-Kohorte.

4. Diskussion

4.1 Klinischer Verlauf

Im Rahmen unserer Studie unterschieden wir zwei Behandlungsstrategien. Tiere wurden nach Erkrankungsbeginn bei Erreichen der maximalen Symptomausprägung (akute EAE), oder ca. 60 Tage nach Symptombeginn und Erreichen eines stabilen klinischen Plateaus (chronische EAE) an 5 aufeinanderfolgenden Tagen mit Anti-mCD52-AK oder IgG2a-Isotypkontroll-AK behandelt, um klinische Effekte der Therapie in der frühen und späten EAE-Erkrankungsphase vergleichen zu können.

Innerhalb der akuten-EAE-Kohorte konnte ein signifikanter Unterschied der Differenzen der klinischen Scores vor und nach Behandlung mit Anti-mCD52-AK im Vergleich zur Isotypkontrolle festgestellt werden (siehe Abschnitt 3.1). Die Betrachtung der Mittelwerte nach Behandlung ergaben jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. Im Rahmen der Etablierung des Anti-mCD52-AKs hatten Turner et al. (2015) eine deutlichere Reduktion klinischer Symptomatik in MOG₃₅₋₅₅-, rMOG- und PLP₁₃₉₋₁₅₁-induzierten EAE-Modellen festgestellt. Die Tiere waren in diesem Versuchsaufbau jeweils unmittelbar nach Entwicklung klinischer Symptomatik behandelt worden. Nach Behandlung mit Anti-mCD52-AK zeigten die Versuchstiere im Verlauf einen durchschnittlichen EAE-Score < 1 , welcher auch nach Ende des Therapiezyklus persistierte. Vergleichbare klinische Ergebnisse ließen sich in nachfolgenden EAE-Studien bei frühem Therapiebeginn mit Anti-mCD52-AK replizieren (Bogie et al., 2020; Demir et al., 2019; Ellwardt et al., 2020; Pant et al., 2017). Die Differenz zwischen der deutlichen klinischen Besserung der früh behandelten Kohorten in den oben genannten Studien zu den geringgradigen Effekten in unserer akuten EAE-Kohorte ist einerseits auf eine relativ kleine Kohortengröße ($n_{\text{Anti-mCD52}} = 4$; $n_{\text{Isotyp}} = 5$), andererseits auf den verhältnismäßig späteren Behandlungszeitpunkt in unserem Studiendesign zurückzuführen, als bereits eine deutlich ausgeprägtere klinische Symptomatik etabliert war (siehe **Error! Reference source not found.**). Wir wählten diesen Zeitpunkt unter anderem in Hinblick auf den aktuellen therapeutischen Stellenwert von Alemtuzumab, welches als Eskalationstherapie bei hoch-aktiven RR-MS-Verläufen und nach Versagen anderer DMTs zugelassen ist (Europäische Arzneimittelagentur, 2021).

Turner et al. (2015) behandelten eine weitere Kohorte ab einem EAE-Score ≥ 2 . Zwar konnte auch hier eine deutliche Reduktion der Symptomatik nach Anti-mCD52-AK-Therapie erzielt werden, in der Isotypkontrollgruppe kam es jedoch zu einer weiteren klinischen Verschlechterung, was zeigt, dass auch hier ein Therapiebeginn vor Erreichen einer maximalen Symptomlast gewählt wurde. Eine Studie von Ellwardt et al. (2020), bei der ein Therapiebeginn im MOG₃₅₋₅₅ EAE-Modell ebenfalls bei einem klinischen Score ≥ 2 gewählt wurde, es jedoch nicht zu einer weiteren Symptomzunahme in der Isotypkontrollgruppe kam, zeigte eine deutlich geringere, nicht signifikante Symptomreduktion, als bei Therapiebeginn unmittelbar nach Symptomausprägung. Auch eine intrathekale Anti-mCD-52-AK-Applikation 20 Tage nach Immunisierung, und somit zu einem mit unserem Versuchsaufbau vergleichbaren Zeitpunkt, konnte keine signifikante klinische Symptomreduktion erzielen (Bogie et al., 2020).

Ein weiteres Alleinstellungsmerkmal unseres Versuchsaufbaus ist der Einsatz von unspezifischem IgG2a in der Vergleichsgruppe, während in vergleichenden Studien lediglich der Vektor PBS appliziert wurde. Wir versuchten mögliche unspezifische potenzielle immunmodulatorische Effekte der applizierten Ig für den klinischen Krankheitsverlauf zu berücksichtigen. Im Vergleich des klinischen Verlaufs unserer IgG2a-Kontrollgruppe zu vorherigen MP4-EAE-Verläufen (Bail et al., 2017; Kuerten et al., 2007; Kuerten et al., 2011b), konnten wir keine wesentlichen Unterschiede feststellen. Als wesentlich relevanter ist zu werten, dass bis auf eine rMOG-EAE-Kohorte bei Turner et al. (2015), keine der weiteren Anti-mCD52-AK-Studien klinische Effekte in einem B-Zell-abhängigem EAE-Modell bewerteten (Demir et al., 2019; Ellwardt et al., 2020; Pant et al., 2017). Dies ist insbesondere im Hinblick der hohen therapeutischen Relevanz von Ocrelizumab als B-Zell-depletierenden CD20-AK für RR-MS als auch für PP-MS (Hauser et al., 2017; Montalban et al., 2017) und die Relevanz von B-Zellen in der Pathogenese der MS überraschend (Comi et al., 2021). Wir waren unseres Wissens nach somit die erste Arbeitsgruppe, die einen therapeutischen Effekt der Anti-mCD52-Therapie bei fortgeschrittener Klinik in einem B-Zell-abhängigen EAE-Modell zeigen konnte.

Bei Therapiebeginn ca. 60 Tage nach Symptomausbildung konnten wir keinen statistisch signifikanten Effekt auf die Symptomlast feststellen. Dies gelang auch nicht nach Vergrößerung der Kohorte auf $n_{\text{Anti-mCD52}} = 18$; $n_{\text{Isotyp}} = 14$ im Rahmen weiterer Experimente der Arbeitsgruppe (Simon et al., 2018). Vergleichbare Ergebnisse zeigten

sich ebenso in der Behandlung MP4-EAE-erkrankter Versuchstiere mit FTY720 (Fingolimod). Auch hier fand sich eine signifikante Reduktion der klinischen Symptomlast in der akuten EAE, nicht jedoch bei Behandlungsbeginn in der chronischen Erkrankungsphase (Bail et al., 2017).

Interessanterweise wurden bereits in einer frühen Studie des CAMPATH-1H-AK SP-MS-Patient*innen eingeschlossen, mit der zugrundeliegenden Annahme, dass SP-MS eine aggressivere Inflammation zugrunde liege als RR-MS und die Betroffenen somit von einer aggressiven immunmodulatorischen Therapie profitieren sollten (Katsavos und Coles, 2018). Sowohl in RR-MS-, als auch in SP-MS-Patient*innen zeigte sich eine deutliche Reduktion der jährlichen Schubrate ohne Nachweis neuer Läsionen im MRT nach Therapiebeginn (Coles et al., 2008; Coles et al., 1999). Dies hatte jedoch keinen Effekt auf die klinische Progression oder die Zunahme der Hirnatrophie im Krankheitsverlauf, sodass von Coles et al. (2006) der Begriff des „*Window of therapeutic opportunity*“ eingeführt wurde, einem Zeitfenster also, in dem durch Immunmodulation der toxische Effekt der Inflammation reduziert werden kann, während dies bei etabliertem Schaden nicht mehr adäquat möglich ist. Dies ist insbesondere relevant, da das Paradigma, dass eine immunmodulatorische DMT zwar zur Reduktion der Schublast führe, ohne jedoch den Krankheitsverlauf signifikant zu verlangsamen (Dendrou et al., 2015; Feinstein et al., 2015), in den letzten Jahren teilweise revidiert werden musste. So konnte gezeigt werden, dass eine frühzeitige Therapie, insbesondere mittels hochaktiver immunmodulatorischer Substanzen wie Alemtuzumab, sowohl einen positiven Einfluss auf die Akkumulation von Behinderung (He et al., 2020; Kalincik et al., 2021) als auch auf den Übergang zur SP-MS (Brown et al., 2019) haben. Im MP4-EAE-Modell konnte diesbezüglich gezeigt werden, dass hier früh ein irreversibler axonaler Schaden auftritt, der bereits in der Akutphase sein Maximum erreicht, während in der chronischen Phase der Untergang der geschädigten Axone folgt (Recks et al., 2013). Eine klinische Besserung durch eine therapeutische Intervention in einer späten EAE-Erkrankungsphase wäre somit notwendigerweise auf eine Reparatur geschädigter Axone zurückzuführen, wofür sich für den Anti-mCD52-AK keine Hinweise ergaben (siehe auch Abschnitt 4.3).

Die klinischen Ergebnisse unserer Studie zeigen somit, dass ein klinischer Therapieerfolg mittels Anti-mCD52-Therapie in einem B-Zell-abhängigen EAE-Modell auch bei ausgeprägterer Symptomatik möglich ist, dies jedoch stark von einem frühzeitigen

Therapiebeginn vor Etablierung irreversibler neurodegenerativer Schäden abhängig ist. Diese Ergebnisse unterstützen die Forderung einer frühzeitigen effektiven immunmodulatorischen Therapie in der RR-MS (Hauser und Cree, 2020).

4.2 Periphere Lymphozytenpopulation und B-Zell-Antwort

Für die weitere Beurteilung der pathophysiologischen Effekte einer Anti-mCD52-Therapie galt es nun die postulierte Lymphozytendepletion sowie mögliche immunmodulatorische Prozesse zu analysieren.

Wie in Abschnitt 3.2 beschrieben, zeigte sich eine ausgeprägte Reduktion von CD4⁺CD19⁻ T-Zellen sowie CD19⁺CD4⁻ B-Zellen im Blut von Anti-mCD-52-AK behandelten Versuchstieren, vergleichbar mit Beobachtungen beim Menschen sowie human-CD52-transgenen Mäusen nach Alemtuzumab-Gabe (Cox et al., 2005; Hu et al., 2009; Rao et al., 2012).

Neben der globalen Reduktion der Lymphozytenzahl gilt die Repopulation durch einen verändert zusammengesetzten Lymphozytenpool als relevant, insbesondere für die anhaltenden Therapieeffekte nach Beendigung der Medikamentengabe (Ruck et al., 2015). So wurde gezeigt, dass regulatorische CD4⁺CD25⁺127^{low}- in MS-Patient*innen respektive CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ T-Zellen im Mausmodell prädominant in der lymphozytären Repopulation waren und verhältnismäßig geringere Depletionsraten aufwiesen (Hu et al., 2009; Zhang et al., 2013). Dies war zudem einhergehend mit tendenziell anti-inflammatorischen Zytokinprofilen mit u.a. erhöhter Produktion von TGF- β 1, IL-10 und IL-4 sowie supprimiertem IFN- γ und IL-17 (Pant et al., 2017; Turner et al., 2015; Zhang et al., 2013). Eine spezifische Unterdrückung der autoreaktiven B-Zell-Antwort gegen MP4 im Verhältnis zur Gesamtzahl IgG-produzierender Zellen nach Anti-mCD52-AK ließ sich weder in der akuten noch in der chronischen MP4-EAE-Kohorte feststellen (siehe Abschnitt 3.3). Zwar hatten Turner et al. (2015) eine Reduktion autoreaktiver CD4⁺ T-Zellen in der Milz von MOG₃₅₋₅₅-EAE-Mäusen zeigen können, ohne Relation zur Gesamtzahl der T-Lymphozyten lassen sich hieraus jedoch keine spezifischen immunmodulatorischen Effekte ableiten und könnte lediglich auf der generell reduzierten Lymphozytenpopulation beruhen.

Auch die mittels ELISA ermittelte Serumkonzentration von MP4-spezifischem IgG zeigte keine Unterschiede zwischen Anti-mCD52-AK- und Isotyp-Gruppe, weder in der akuten noch in der chronischen EAE-Kohorte. Dies ist einerseits gut vereinbar mit einer zur Depletion unzureichenden CD52-Expression auf Plasmazellen (Kumar et al., 2003; Rawstron et al., 2006), unveränderten humoralen IgG-Spiegeln gegen häufige Viren sowie eine unbeeinträchtigte Impfantwort (McCarthy et al., 2013). Eine klinische Studie an RR-MS-Patient*innen zeigte jedoch, dass insbesondere nach multiplen Therapiezyklen mit Alemtuzumab eine Reduktion der Blut- und Liquor-Gesamt-Ig-Konzentration bestand (Mohn et al., 2020). Dies wurde zum Teil auf die differenzierte Repopulation von Lymphozyten nach Applikation von Alemtuzumab zurückgeführt. Nach initialer umfangreicher Depletion aller Zellreihen kommt es im Verlauf zu einer frühen Repopulation des B-Zell-Pools aus den nicht-depletierten Knochenmarks-Vorläuferzellen und zeitlich verzögertem Anstieg der T-Zell-Zahl durch klonale Expansion (Cox et al., 2005; Thompson et al., 2010). Im Rahmen dieser Repopulation scheint es zu einer Verschiebung mit erhöhter Anzahl an CD19⁺CD24^{high}CD38^{high} und CD19⁺PD-L1^{high} B-Zellen zu kommen, welche zum Erhalt der bestehenden regulatorischen T-Zell-Population sowie zur Hemmung der Differenzierung von T_H1- und T_H17-Lymphozyten beitragen und so zu verminderten IgG-Spiegeln beitragen könnten (Flores-Borja et al., 2013; Mohn et al., 2020). Hier besteht eine Diskrepanz zu den Ergebnissen in B6 EAE-Modellen, in denen sich keine zeitlichen Differenzen zwischen B- und T-Zellen im Rahmen der Repopulation nach Anti-mCD52-AK-Therapie quantifizieren ließen (Turner et al., 2015). Welchen Einfluss dies auf eine spezifische pro- bzw. antiinflammatorische B-Zell-Antwort und hiermit verbundene Ig-Synthese hat, bleibt weiter zu eruieren. Da wir im Gegensatz zu Mohn et al. (2020) die MP4-spezifische IgG-Sekretion und nicht die Gesamt-Ig-Spiegel verglichen, sind diese Ergebnisse nur bedingt vergleichbar, geben jedoch einen Hinweis darauf, dass hier evtl. eine Diskrepanz zwischen EAE-Modell und humanen Wirkmechanismen vorliegen könnte.

Wir konnten somit durchflusszytometrisch zeigen, dass eine effektive Depletion von CD4⁺ T- und CD19⁺ B-Zellen erreicht werden konnte. Spezifische Effekte auf die autoreaktive B-Zell-Antwort auf das MP4-Antigen ließen sich jedoch nicht feststellen. Eine weitere Betrachtung hinsichtlich möglicher Subpopulationen innerhalb des B-Zell-Pools während der Repopulation, insbesondere in Hinblick auf eine mögliche Prädominanz von

regulatorischen B-Zellen nach Anti-mCD52-AK-Behandlung im MP4-EAE-Modell, wäre erstrebenswert, war jedoch in unserem Studiendesign limitiert durch die zu geringe Zahl peripherer B-Lymphozyten zum Zeitpunkt der Opferung der Versuchstiere.

4.3 Lymphozyteninfiltrate im zentralen Nervensystem

Neben der klinischen Beurteilung und der Analyse der B-Zell-Antwort nach Anti-mCD52-AK-Therapie stellt der Einfluss der Therapie auf die lymphozytäre Infiltration im ZNS der MP4-EAE, mit besonderer Berücksichtigung von B-Zell-Aggregaten, einen besonderen Schwerpunkt dieser Arbeit dar. Wie in Abschnitt 1.3.2 beschrieben, sind die zu verschiedenen Zeitpunkten im Verlauf der Erkrankung entstehenden lymphozytären Infiltrate in verschiedenen ZNS-Kompartimenten sowie die B-Zell-abhängige Pathologie Alleinstellungsmerkmale der MP4-EAE (Kuerten et al., 2008; Kuerten et al., 2007; Kuerten et al., 2006; Kuerten et al., 2011b). Dies ermöglicht den Rückschluss von Ort und Morphologie der Immuninfiltrate auf das Krankheitsstadium der Versuchstiere. Von besonderer Relevanz ist hier die Aggregation von B-Zellen in den *Cerebella*, welche sich im Verlauf zu TLOs differenzieren (Batoulis et al., 2015; Kuerten et al., 2008; Kuerten et al., 2012). Diese sind gekennzeichnet durch lymphozytäre Reifungsprozesse und Expansion der T- und B-zellulären Immunantwort und sind somit funktionell relevante Korrelate der ZNS-Inflammation (Batoulis et al., 2015; Kuerten et al., 2012). In Autopsiestudien an MS-Patient*innen wurden TLOs insbesondere in den Meningen von SP-MS-Patient*innen detektiert und standen in Assoziation zu einem früheren Krankheitsbeginn und schwereren Krankheitsverläufen (Magliozzi et al., 2007; Serafini et al., 2004). Zudem zeigte sich eine meningeale Inflammation assoziiert mit ausgeprägter kortikaler Demyelinisierung und Neurodegeneration (Howell et al., 2011; Magliozzi et al., 2007; Magliozzi et al., 2010). Daher stellt die Reduktion lymphozytärer Infiltrate im ZNS, insbesondere von B-Zell-Aggregaten, ein erstrebenswertes Therapieziel dar.

Bereits in der akuten EAE-Kohorte zeigten wir eine signifikante Reduktion von Nicht-B-Zell- sowie diffusen-B- und T-Zell-Infiltraten durch Applikation von Anti-mCD52-AK. Zwar konnte zudem eine Ausbildung von B-Zell-Aggregaten vollständig verhindert werden, dies erreichte jedoch keine statistische Signifikanz, da diese auch in der Isotypkontrolle nur in sehr geringer Anzahl vorlagen. Dies ist gut durch den natürlichen MP4-EAE Verlauf zu erklären. Hier sind lymphozytäre Infiltrate im *Cerebellum* ca. 15 d nach EAE-

Symptomausbildung erstmalig feststellbar (Kuerten et al., 2007; Kuerten et al., 2012), erst im Verlauf der chronischen EAE kommt es jedoch zur Zunahme von B-Zell-Aggregaten und Differenzierung zu funktionellen TLOs mit entsprechenden histologischen Attributen (Batoulis et al., 2015; Kuerten et al., 2012). Wir konnten also zeigen, dass die Anti-mCD52-AK-Behandlung die Entstehung von lymphozytären Infiltraten im *Cerebellum* effektiv verhindert. Dies ist zunächst primär durch die Reduktion der potentiell zur Migration ins ZNS zur Verfügung stehende zirkulierende Lymphozytenpopulation erklärt. Ähnliche Ergebnisse waren innerhalb der Arbeitsgruppe bereits durch Applikation von FTY720 (Fingolimod) in der akuten MP4-EAE durch Bail et al. (2017) erzielt worden. Auch hier hatte die Reduktion der peripher zirkulierenden Lymphozyten innerhalb der akuten EAE die Entstehung von B-Zell-Aggregaten vollständig verhindern können. Dies ist insbesondere interessant, da Bail et al. (2017) lediglich eine Reduktion der peripheren CD4⁺ T- nicht jedoch CD19⁺ B-Zellen nachweisen konnten. In diesem Zusammenhang war die Reduktion von T_H17-Zellen als entscheidender Mechanismus für die fehlende Etablierung von B-Zell-Aggregaten diskutiert worden. Ob sich der Effekt der Anti-mCD52-AK-Therapie auf die B-Zell-Aggregation eher auf eine Reduktion der T_H17-Zellen, oder direkt von zirkulierenden B-Zellen zurückführen lässt, ist in diesem Modell nicht zu klären, da beide durch Anti-mCD52-AK effektiv depletiert werden (Hu et al., 2009; Turner et al., 2015; Zhang et al., 2013). Serafini et al. (2016) fanden zudem in Assoziation zu TLOs in den Meningen von MS-Patient*innen CD3-ROR γ t⁺ Zellen, welche wahrscheinlich Lymphozyten-Gewebs-induzierenden Zellen entsprechen und ebenfalls in die tertiäre Lymphogenese involviert seien könnten, während diese nicht in den *Cerebella* von MP4-EAE-Versuchstieren nachweisbar waren (Schropp et al., 2019). Inwieweit diese für die Entwicklung von TLOs in MS-Patient*innen relevante Zellpopulation darstellen und ob diese im relevanten Ausmaß CD52 exprimieren und somit depletiert werden können, ist aktuell nicht geklärt.

Wir konnten jedoch nicht nur eine Reduktion von Immuninfiltraten im *Cerebellum* durch Anti-mCD52-AK während der Etablierung in der akuten EAE-Kohorte nachweisen, auch die chronische EAE-Kohorte zeigte eine ausgeprägte Reduktion von Immuninfiltraten nach Gabe von Anti-mCD52-AK. Zum Zeitpunkt der Behandlung, ca. 60 Tage nach initialer Symptomausprägung, sind Immuninfiltrate, insbesondere B-Zell-Aggregate, im

natürlichen Verlauf der MP4-EAE bereits etabliert (Batoulis et al., 2015; Kuerten et al., 2008; Kuerten et al., 2012). Wir können also postulieren, dass die Anti-mCD52-Therapie in der chronischen EAE zu einer Reduktion bereits bestehender Lymphozyteninfiltrate führt. Insbesondere konnten wir, wie bereits in der akuten EAE-Kohorte, nach Applikation von Anti-mCD52-AK keinerlei B-Zell-Aggregate nachweisen. Die Therapie mit FTY720 (Fingolimod) in der chronischen EAE-Kohorte hatte interessanterweise zu keiner Reduktion von B-Zell-Aggregaten geführt (Bail et al., 2017).

In diesem Zusammenhang ist relevant, ob die Reduktion der lymphozytären Infiltrate im ZNS durch Penetration des AK und Depletion der bereits ins ZNS migrierten Lymphozyten erfolgt, oder ob allein die periphere Reduktion der zum Erhalt der Infiltrate benötigten Lymphozyten ausreichend ist. Damit eine Depletion von ZNS-ständigen Lymphozyten durch den Anti-mCD52-AK erreicht werden kann, müssen zwei Voraussetzungen erfüllt sein. (1) Der monoklonale AK muss das ZNS und insbesondere die zu depletierenden lymphozytären Infiltrate erreichen und in suffizienten Konzentrationen binden. (2) Die zur Depletion führenden Prozesse, nämlich CDC und/oder ADCC, müssen suffizient ablaufen.

Es ist allgemein akzeptiert, dass es zunächst im Rahmen der Etablierung neuer Läsionen zu einer Störung der BHS mit ausgeprägter entzündlicher Aktivität und Migration von Lymphozyten kommt, welche durch Kontrastmittel aufnehmende Läsionen im MRT dargestellt werden können (Cramer et al., 2014; Gaitan et al., 2011; Minagar und Alexander, 2003). Bereits zu diesem Zeitpunkt kommt es jedoch durch i.v.-Applikation von monoklonalen AKs lediglich zu einem geringgradigen Eindringen von AKs über die BHS in das ZNS (Helliwell und Coles, 2009). Im Verlauf der MS, insbesondere im Rahmen progredienter Verläufe, kommt es zur Abnahme der BHS-Durchgängigkeit, während Inflammationsprozesse zum Teil kompartimentalisiert fortlaufen (Lassmann, 2018; Lassmann et al., 2012). Für das MP4-EAE-Modell konnte jedoch sowohl in der akuten als auch in der chronischen EAE eine anhaltend permeable BHS nachgewiesen werden, interessanterweise insbesondere im Bereich von B-Zell-Aggregaten (Bell et al., 2019). Es bliebe daher zu klären, ob die beschriebene permeable BHS im MP4-EAE-Modell zu suffizienten Anti-mCD52-AK-Spiegeln im ZNS führen kann, oder ob die Reduktion der Immuninfiltration nach Anti-mCD52-AK-Gabe lediglich auf die Reduktion der fortlaufenden Migration von zirkulierenden Lymphozyten ins ZNS ist. Ersteres erscheint äußerst fraglich,

insbesondere da in RR-MS-Patient*innen, und somit bei ebenfalls kompromittierter BHS, Campath-1H nach intravenöser Applikation nicht im Liquor nachzuweisen war (Helliwell und Coles, 2009).

Auch eine suffiziente AK-Konzentration im Liquor führt jedoch nicht zwangsläufig zu den gewünschten therapeutischen Effekten. So wurde die RIVITALISE-Studie zur intrathekalen Applikation von Rituximab bei SP-MS-Patient*innen einer ausbleibenden klinischen Besserung und fehlenden Effekten auf Biomarker für intrathekale Inflammationsprozesse in der Zwischenauswertung abgebrochen (Komori et al., 2015; Komori et al., 2016). Auch nachfolgende Studien mit veränderten Studiendesigns erbrachten vergleichbare Resultate (Bergman et al., 2018; Bhargava et al., 2019; Bonnan et al., 2021). Dies wurde auf eine eingeschränkte Diffusion von AKs innerhalb des ZNS-Parenchyms sowie eine Ineffektivität von CDC und ADCC als Depletionsmechanismen und den raschen Reflux des AK zurückgeführt (Komori et al., 2016). Auch für Alemtuzumab sind sowohl CDC als auch ADCC als Depletionsmechanismen im Menschen beschrieben (Rao et al., 2012; Ruck et al., 2015), während im Mausmodell ADCC als dominierender Mechanismus ausgemacht wurde (Hu et al., 2009). Eine höhere Depletionsaktivität innerhalb des ZNS durch Alemtuzumab bzw. Anti-mCD52-AK ist daher aufgrund der für Rituximab diskutierten ineffektiven Effektormechanismen ebenso unwahrscheinlich. Interessanterweise zeigte eine intrathekale Applikation von Anti-mCD52-AK im MOG₃₅₋₅₅-EAE-Modell zwar einen moderaten klinischen Effekt sowie eine Reduktion der Lymphozytenzahl innerhalb des ZNS, jedoch bei gleichzeitiger Reduktion der peripheren Lymphozytenpopulation (Bogie et al., 2020), was durch den oben genannten raschen Reflux des Therapeutikums aus dem ZNS und somit seiner Wirksamkeit in der Peripherie erklärt sein könnte (Komori et al., 2016). Es erscheint somit wahrscheinlich, dass auch bei intrathekaler Applikation ähnlich wie in unserer chronischen EAE-Kohorte, eher die periphere Lymphozytenreduktion von Relevanz ist und keine Lymphozytendepletion im ZNS selbst stattfindet.

Eine Umgehung der insuffizienten Effektormechanismen im ZNS könnte die Etablierung von Typ-II-AKs darstellen, welche einerseits ebenfalls über ADCC wirken, andererseits jedoch einen programmierten Zelltod einleiten können (Ivanov et al., 2009; Meyer et al., 2018). Zwar zeigte auch Alemtuzumab eine geringgradige Apoptoseinduktion (Stanglmaier et al., 2004), aufgrund der fehlenden Anreicherung im ZNS erscheint dies

als Wirkmechanismus innerhalb des ZNS bei i.v.-Applikation jedoch ebenfalls unwahrscheinlich (Helliwell und Coles, 2009). Wie relevant eine mögliche Apoptoseinduktion für die Behandlung mit Anti-mCD52-AK ist, bleibt weiter zu klären. Zusammenfassend erscheint es daher wahrscheinlich, dass die beschriebene Reduktion von lymphozytären Infiltraten durch Anti-mCD52-AK-Behandlung in der chronischen EAE-Kohorte auf die Reduktion des lymphozytären Nachschubs zur Aufrechterhaltung der bestehenden Infiltrate zurückzuführen ist und nicht auf einer Depletion innerhalb des ZNS beruht. Dass ein solcher Nachschub notwendig zu sein scheint beruht weiter auf der Beobachtung, dass eine Reduktion der Migration von Lymphozyten über die BHS durch Natalizumab in einer Subpopulation von RR-MS-Patient*innen zu einer Reduktion von OKBs führt (Harrer et al., 2013; von Glehn et al., 2012). Weiter führt die periphere Applikation von Alemtuzumab nicht nur zu einer Reduktion der Ig-Spiegel im Blut sondern auch im Liquor (Mohn et al., 2020). Es erscheint daher für die akute und chronische MP4-EAE am wahrscheinlichsten, dass die Durchlässigkeit der BHS in räumlicher Korrelation zu B-Zell-Aggregaten (Bell et al., 2019) sowie deren effektive Reduktion durch Anti-mCD52-AK auf eine fortlaufende Migration zwischen ZNS und Peripherie hindeutet.

4.4 Neurodegeneration und Remyelinisierung

Aufgrund der Vielzahl an neu-entwickelten, insbesondere hochaktiver immunmodulatorischer Substanzen, konnte die Behandlungssituation von RR-MS-Patient*innen deutlich verbessert werden (Hauser und Cree, 2020; Ransohoff et al., 2015; Tintore et al., 2019). Neuere Studien zeigen zudem, dass eine frühzeitige und effektive DMT die Akkumulation von Behinderung und den Übergang zur SP-MS verzögern, jedoch nicht vollständig aufhalten kann (Brown et al., 2019; He et al., 2020; Kalincik et al., 2021). Auch die Zulassung von Siponimod für SP-MS- sowie Ocrelizumab für PP-MS-Patient*innen mit aktiven Verläufen zeigen, dass immunmodulatorische Therapien auch in den progredienten Verlaufsformen wirksam sein können (Kappos et al., 2018a; Montalban et al., 2017). Die Tatsache, dass zunehmend eine suffiziente Schubkontrolle erreicht werden kann, führte jedoch dazu, dass in prospektiven Studien mit RR-MS-Patient*innen eine schubunabhängige Verschlechterung der klinischen und radiologischen Befunde festgestellt wurde, ohne etablierte Kriterien einer SP-MS zu erfüllen (Cree et al., 2019; Kappos et al., 2018b). Diese als „stille Progression“

bezeichnete leichtgradige klinische Verschlechterung im Verlauf von RR-MS-Patient*innen (Cree et al., 2019) sowie die eingeschränkte Wirksamkeit aktueller Therapien in progredienten MS-Verläufen, unterstreicht die Notwendigkeit zur Untersuchung neuroprotektiver therapeutischer Optionen für die MS (Hauser und Cree, 2020).

Bereits in ersten Studien bezüglich Alemtuzumab (Campath-1H) als mögliche Therapieoption für die MS konnte eine suffiziente Reduktion der Schubrate und radiologischen Krankheitsaktivität sowohl in RR-MS als auch in SP-MS erreicht werden, ohne jedoch signifikanten Einfluss auf die schubunabhängige progrediente Akkumulation von klinischer Symptomatik in SP-MS-Patient*innen zu nehmen (Coles et al., 2006; Coles et al., 1999). Jones et al. (2010) fanden jedoch in einer *post hoc* Subgruppenanalyse der CAMMS223 Phase-II-Studie an RR-MS-Patient*innen heraus, dass Teilnehmer*innen ohne klinische Hinweise in den Monaten vor und ohne klinische und radiologische Hinweise auf Krankheitsaktivität während der Studie, eine Reduktion der klinischen Symptomlast nach Therapie mit Alemtuzumab zeigten. Auch in nachfolgenden Studien wurde eine Reduktion vorbestehender Symptomatik beobachtet (Fox et al., 2016; Giovannoni et al., 2016). Es wurde daraufhin postuliert, dass Alemtuzumab neben der Supprimierung der inflammatorischen Aktivität durch Depletion von Lymphozyten zudem durch „neuroprotektive Autoimmunität“ Effekte aufwiese (Jones et al., 2010). So zeigte sich, dass Lymphozyten aus dem Blut von mit Alemtuzumab behandelten Patient*innen nach Stimulation mit Myelinantigenen *in vitro* eine gesteigerte Sekretion neuro- sowie oligotropher Faktoren aufwiesen (Jones et al., 2010).

Turner et al. (2015) zeigten weiter, dass die Applikation von Anti-mCD52-AK unmittelbar nach Symptombeginn im MOG₃₅₋₅₅-EAE-Modell zu einer Reduktion von demyelinisierter weißer Substanz sowie SMI-32⁺-Axonschäden führt. Weiter zeigte sich auch der Erhalt der axonalen Übertragung durch Anti-mCD-52-AK-Therapie zu einem späteren Zeitpunkt. Wir untersuchten daher, ob durch eine Applikation von Anti-mCD52-AK in der chronischen EAE-Kohorte ebenfalls neuroprotektive bzw. -regenerative Effekte erzielbar sein könnten. Auf lichtmikroskopischer Ebene zeigte sich weder eine signifikante Reduktion der demyelinisierten Areale in der LFB-Färbung noch der SMI-32⁺-axolytischen Axone. Dies ist gut vereinbar mit den fehlenden klinischen Effekten der Anti-mCD52-AK-Therapie in der chronischen EAE-Kohorte, wie in Abschnitt 3.1 beschrieben. Unsere Arbeitsgruppe

ergänzte im Rahmen der Erstpublikation zudem die Serumspiegel der phosphorylierten schweren Kette des Neurofilaments (pNF-H) mittels ELISA als Biomarker für axonale Schäden, unter anderem in *Neuritis optica* und MS (Gresle et al., 2014; Petzold et al., 2004; Shaw et al., 2005). Zwar zeigten sich die pNF-H-Serumspiegel in den chronischen MP4-EAE- gegenüber nicht-immunisierten Versuchstieren erhöht, ein signifikanter Unterschied zwischen Anti-mCD52-AK- und Isotyp-behandelten Tiere fand sich jedoch nicht (Simon et al., 2018).

Die lichtmikroskopische LFB- und SMI-32-Färbung ermöglicht einen Überblick über das Ausmaß von Demyelinisierung und axonaler Pathologie, jedoch erlaubt erst die ultrastrukturelle Analyse mittels Elektronenmikroskopie die exakte Analyse einzelner Nervenfasern und deren Myelinscheide (Simon et al., 2018). So zeigten sich in ergänzenden Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe sowohl auf RM-Ebene als auch im *Cerebellum* eine signifikante Reduktion des axonalen Schadens (Simon et al., 2018). Ein wahrscheinlicher Mechanismus, der auf ultrastruktureller Ebene nachweisbaren Neuroprotektion nach Anti-mCD52-AK-Therapie, ist die in Abschnitt 3.5 beschriebene Depletion von Immuninfiltraten, insbesondere B-Zell-Aggregaten, da diese durch Sekretion neurotoxischer Substanzen Neurodegeneration in angrenzendem Gewebe auslösen bzw. verstärken können (Lisak et al., 2012; Lisak et al., 2017; Magliozzi et al., 2007). Die Reduktion der lymphozytären ZNS-Infiltration in mit Anti-mCD52-AK behandelten Versuchstieren kann somit durch einen Rückgang neurotoxischer Substanzen zu einer Verringerung des axonalen Schadens führen. Auch die von Turner et al. (2015) beschriebene Neuroprotektion in der Frühphase der MOG₃₅₋₅₅-EAE ist wahrscheinlich durch die Suppression der Inflammation zurückzuführen. So zeigte eine ultrastrukturelle Analyse des MOG₃₅₋₅₅-EAE-Modells, dass zu Beginn der Symptomausprägung die Läsionen innerhalb der WM im lumbalen RM durch ausgeprägte Infiltration von Immunzellen und Gewebsödem charakterisiert waren (Recks et al., 2013). Allein die Lymphozytendepletion kann somit die beschriebene Reduktion der Demyelinisierung und SMI-32⁺-Segmente gut erklären (Turner et al., 2015). Ob weiter die Sekretion neuro- sowie oligotropher Faktoren durch Lymphozyten nach Anti-mCD52-AK in eine Rolle spielt, ist aktuell ungeklärt.

Im Gegensatz zur axonalen Pathologie wurde der fehlende Einfluss der Anti-mCD52-AK-Therapie auf das Ausmaß an Demyelinisierung in der lichtmikroskopischen LFB-Färbung

im lumbalen RM elektronenmikroskopisch bestätigt (Simon et al., 2018). Auch in dieser Methode zeigten sich weder auf RM-Ebene noch im *Cerebellum* eine reduzierte Demyelinisierung in Anti-mCD52-AK-behandelten Versuchstieren (Simon et al., 2018). Während in der Frühphase der MOG₃₅₋₅₅-EAE die Demyelinisierung Läsionen des Typs I nach Lucchinetti et al. (2000) entspricht und somit geprägt ist von T-Zellen und Makrophagen, entsprechen jene des MP4-EAE Modells Läsionen des Typs II, da hier die Pathologie klar AK-abhängig ist (Kuerten et al., 2011a; Prinz et al., 2015; Recks et al., 2013). Da sich die MP4-spezifische AK-Produktion durch Anti-mCD-52-AK nicht beeinflussen ließ (siehe Abschnitt 3.3) und sich auch kein Effekt der Behandlung auf die Mikrogliafunktion feststellen ließ, (Ellwardt et al., 2020) ist somit nachvollziehbar, dass keine Effekte auf die Demyelinisierung in diesem Stadium der EAE detektierbar waren (Simon et al., 2018).

Auch Remyelinisierung kann über die Wiederherstellung der axonalen Myelinscheide, der Verbesserung der Nervenleitung und trophische Unterstützung der Nervenzelle ein Hinweis auf Neuroprotektion und -regeneration darstellen (Lubetzki et al., 2020). Mögliche Effektorzellen stellen Olig2⁺ Oligodendrozyten dar, welche sich aus Oligodendrozytenvorläuferzellen (OPCs) differenzieren können (Lubetzki et al., 2020; Zawadzka et al., 2010). im Rahmen der Differenzierung zu Oligodendrozyten und Remyelinisierung kommt es passager zur Expression von APC, sodass Olig2⁺APC⁺ Zellen ein Korrelat für Regeneration darstellen können (Lang et al., 2013). Es zeigte sich kein signifikanter Effekt von Anti-mCD-52-AK auf die Zahl Olig2⁺ oder Olig2⁺APC⁺ und somit auf die Oligodendrozytenregeneration bzw. Remyelinisierung im RM der chronischen MP4-EAE. Auch ultrastrukturell, mittels elektronenmikroskopischer Darstellung, konnte in dieser Kohorte keine Steigerung der Zahl remyelinisierender Axone, weder im RM noch im *Cerebellum*, festgestellt werden (Simon et al., 2018). Dies ist insbesondere relevant, da generell im Krankheitsverlauf der chronischen MP4-EAE in der ultrastrukturellen Analyse keine gesteigerte Remyelinisierung feststellbar war, die über das Maß in gesunden B6-Versuchstieren hinausging (Prinz et al., 2015). Eine signifikant gesteigerte Remyelinisierung wäre somit direkt auf die therapeutische Intervention mittels Anti-mCD52-AK zurückführbar.

Interessanterweise ist ein solcher neuroregenerativer Mechanismus für Obinutuzumab, einem Typ-II Anti-CD20-AK, in der MP4-EAE festgestellt worden (Breakell et al., 2020).

Hierbei kam es nach Applikation in der elektronenmikroskopischen Analyse sowohl zur verminderten Demyelinisierung als auch zur Steigerung der Remyelinisierung um 779,8 % (Breakell et al., 2020). Auf welchen neuroregenerativen Mechanismen dies beruht und ob dies ebenfalls für MS-Patient*innen einen klinisch relevanten Mechanismus von Obinutuzumab darstellen könnte, bleibt jedoch zu klären. Es bestätigt jedoch, dass eine therapeutische Intervention in die B-Zell-vermittelte Immunreaktion durchaus einen neuroprotektiven Effekt vermitteln kann.

Insgesamt konnten wir keinen ausgeprägten neuroprotektiven oder neuroregenerativen Effekt von Anti-mCD52-AK feststellen, der nicht durch den primären Mechanismus der peripheren Lymphozytendepletion erklärbar wäre (Simon et al., 2018). Auch nachfolgende EAE-Studien zeigten keine Neuroprotektion durch von Immunzellen freigesetzten *Brain-Derived Neurotrophic Factor* (Demir et al., 2019) oder durch Veränderung der neuronalen Mikrogliafunktion nach Anti-mCD52-AK (Ellwardt et al., 2020). Da jedoch EAE-Studien nie die MS in ihrer Komplexität abbilden können, sind neuroprotektive Mechanismen durch Alemtuzumab, die im Tiermodell nicht detektierbar sind, nicht auszuschließen. Hierüber könnte die aktuell noch andauernde ALAIN01-Studie (*Alemtuzumab in Autoimmune Inflammatory Neurodegeneration: Mechanisms of Action and Neuroprotective Potential*; Clinicaltrials.gov: NCT02419378) Aufschluss geben, die erstmals detailliert und longitudinal Schlüsselmechanismen der Wirkung von Alemtuzumab in MS-Patient*innen beschreiben soll (Ruck et al., 2016).

4.4 Ausblick

Die Behandlungssituation von RR-MS-Patient*innen hat sich in den letzten Jahren durch die zunehmende Anzahl hochwirksamer DMTs zunehmend verbessert (Hauser und Cree, 2020; Ransohoff et al., 2015). Obgleich bereits Lucchinetti et al. (2000) die Heterogenität der demyelinisierenden Läsionen in MS-Patient*innen beschrieben, gibt es bis heute keine routinemäßig verfügbaren Biomarker, die eine Auswahl der Therapeutika anhand von individuellen immunpathologischen Charakteristika ermöglichen, sondern beruht aktuell auf einem *Trial-and-Error-Ansatz* und der klinischen Aktivität (Grossman et al., 2017). Da jedoch insbesondere eine frühe effektive Therapie Einfluss auf den langfristigen klinischen Verlauf hat, sind evidenzbasierte Biomarker für eine adäquate

Erstlinientherapie dringend erforderlich (Brown et al., 2019; Grossman et al., 2017; He et al., 2020).

Wir konnten im MP4-EAE-Modell zeigen, dass durch die Depletion von CD52⁺ Lymphozyten eine Reduktion von lymphozytären ZNS-Infiltraten in der akuten und chronischen EAE zu erreichen war, was in weiteren Versuchen der Arbeitsgruppe in einen diskreten Rückgang von axonalen Schäden auf ultrastruktureller Ebene resultierte (Simon et al., 2018). Dies könnte einen möglichen individuellen Angriffspunkt für den Einsatz von Alemtuzumab in MS-Patient*innen darstellen. So wäre die Beurteilung des Einflusses einer Alemtuzumabtherapie auf leptomeningeale Signalanhebungen in kontrastmittelverstärkten hochauflösenden T2-FLAIR MRT-Sequenzen möglich. Diese gelten als potenzielles Korrelat für meningeale Immuninfiltrate und somit indirekt auch für B-Zell-Aggregate (Absinta et al., 2015; Bhargava et al., 2019) und könnten somit einerseits als Parameter für die Therapieeffektivität, als auch zur spezifischeren Selektion von Patient*innen für eine Therapie mit Alemtuzumab herangezogen werden.

Eine andere Möglichkeit ist der Nachweis einer B-Zell-dominanten Immunpathogenese mittels ELISPOT als möglicher prädiktiver Parameter für die Wirksamkeit von DMTs (Kuersten et al., 2014). Unsere Arbeitsgruppe konnte diesbezüglich bereits zeigen, dass der B-Zell-ELISPOT die Wirksamkeit von GA im Vergleich zu IFN- β als Erstlinientherapie voraussagen kann (Rovituso et al., 2015; Tacke et al., 2021). Aktuell wird auch der B-Zell-ELISPOT als prädiktiver Marker für die Wirksamkeit von Anti-CD20- und Anti-CD52-AK untersucht.

Wir hoffen durch die Kombination der Ergebnisse des Anti-mCD52-AK in der MP4-EAE in Kombination mit den aktuellen ELISPOT-Studien einen Beitrag zur zukünftigen Auswahl eines Patient*innenkollektivs beitragen zu können, für das Alemtuzumab trotz der ausgeprägten UAWs eine wertvolle Eskalations- bzw. Erstlinientherapie sein kann.

5. Zusammenfassung

Die Multiple Sklerose (MS) ist eine autoimmunvermittelte Erkrankung des zentralen Nervensystems (ZNS) und die häufigste Ursache für atraumatische Behinderung im jungen Erwachsenenalter. Die Pathologie ist gekennzeichnet durch Inflammation, Demyelinisierung und axonale Schäden, die zeitlich und räumlich disseminiert im ZNS auftreten und zu einer Vielzahl neurologischer Symptome führen. Galt die MS lange als primär T-lymphozytär vermittelte Erkrankung, sorgte u.a. die Etablierung von B-Zell-depletierenden monoklonalen Antikörpern (AK) für eine zunehmende Aufmerksamkeit für die Relevanz der B-Zell-vermittelten Immunpathogenese. Weiter zeigten sich vor allem in den Meningen von sekundär-progredienten MS-Patient*innen B-Zell-Aggregate, welche Hinweise auf lymphozytäre Reifungsprozesse aufwiesen und mit rascherer klinischer Progredienz und ausgeprägter Neurodegeneration einhergingen.

Die durch ein MBP-PLP-Fusionsprotein (MP4) in C57BL/6-Mäusen induzierte experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis (EAE) ist ein Tiermodell der MS und weist ebenfalls eine B-Zell-vermittelte Pathologie und die Entstehung von B-Zell-Aggregaten auf. Alemtuzumab ist ein monoklonaler Anti-CD52-AK, der insbesondere T- und B-Lymphozyten depletiert und für die schubförmige MS zugelassen ist. Ziel dieser Studie war es den Einfluss eines murinen Anti-CD52-AK auf das MP4-EAE-Modell insbesondere auf die B-Zell-Aggregate zu untersuchen. Hierfür wurden die Tiere entweder zum Maximum der klinischen Symptomatik (akute EAE) oder ca. 60 Tage nach Symptomausprägung (chronische EAE) behandelt.

Es zeigte sich eine effektive Depletion von T- und B-Lymphozyten im Blut, ohne jedoch einen Effekt auf die MP4-spezifischen AK-Spiegel im Blut oder die MP4-spezifische B-Zell-Antwort in Lymphknoten zu erzielen. Die Reduktion peripherer Lymphozyten war assoziiert mit einem diskreten klinischen Effekt in der akuten, nicht jedoch in der chronischen EAE. Weiter zeigten sich auch die Immuninfiltrate im ZNS deutlich reduziert, insbesondere waren weder in der akuten noch in der chronischen EAE B-Zell-Aggregate nachweisbar. Diese Reduktion der ZNS-Inflammation hatte bei Behandlung in der chronischen EAE jedoch keinen Einfluss auf Demyelinisierung, axonale Pathologie oder Remyelinisierung in der lichtmikroskopischen Analyse. Jedoch zeigte sich in

nachfolgenden elektronenmikroskopischen Versuchen eine diskrete Reduktion der axonalen Pathologie.

Insgesamt konnten wir zeigen, dass ein muriner Anti-CD52-AK effektiv lymphozytäre Infiltrate des ZNS und insbesondere B-Zell-Aggregate sowohl in der akuten als auch in der chronischen EAE reduziert. Ein klinischer Effekt ist jedoch nur in der Frühphase der Erkrankung zu erzielen, da wir keinen Einfluss der Lymphozytendepletion auf bereits vorhandene neuronale Schäden oder auf neuroregenerative Mechanismen feststellen konnten. Unsere Studie verdeutlicht somit einerseits die Notwendigkeit einer frühzeitigen effektiven immunmodulatorischen Therapie vor der Entstehung irreversibler neuronaler Pathologie, zum anderen könnten Patient*innen mit ausgeprägter meningealer Inflammation und somit evtl. B-Zell-Aggregation besonders von einer frühzeitigen Therapie mittels Alemtuzumab profitieren. Weitere Studien sind notwendig, um einen Biomarker zu implementieren, der die klinische Effektivität vorhersagen kann, um somit eine geeignetes Patient*innenkollektiv zu definieren, das deutlich von einer Behandlung mit Alemtuzumab profitiert.

Summary

Multiple sclerosis (MS) is an autoimmune disease of the central nervous system and the most frequent cause of atraumatic disability in young adults. The immunopathology of MS is characterized by inflammation, demyelination and axonal damage which are disseminated in space and time and lead to a variety of neurological symptoms. For a long time, MS has been regarded as a primarily T-cell mediated disease, which was questioned by the implementation of B cell-depleting monoclonal antibodies (mAB), which triggered a growing interest in the B cell-dependent immunopathology. Furthermore, B cell aggregates were detected in the meninges of MS patients with secondary progressive disease course, which showed signs of lymphocyte maturation and were associated with a faster clinical progress and more pronounced neurodegeneration. MBP-PLP fusion-protein (MP4)- induced experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) is an animal model of MS which also shows a B cell-dependent pathology including the development of B cell aggregates during the disease course. Alemtuzumab is an anti-CD52 mAB that

depletes primarily T and B lymphocytes and is an approved therapy for MS patients with a relapsing-remitting disease course.

The objective of this study was to investigate the effects of a murine anti-CD52 mAB on the MP4-induced EAE model with focus on B cell aggregation. To this end, mice were either at the peak of clinical disease severity (acute EAE) or 60 days after development of symptoms (chronic EAE).

We detected a significant depletion of T and B lymphocytes in the blood without significant impact on MP4-specific antibody levels in the blood or the MP4-specific B cell response in the lymph nodes. The reduction of peripheral lymphocyte counts was further accompanied by a mild attenuation of clinical disease severity in the acute but not chronic EAE animals. In addition, there was a profound reduction in the number of immune cell infiltrates in the CNS and a complete absence of B cell aggregates in both acute and chronic EAE. The reduced number of CNS infiltrates had no impact on demyelination, axonal pathology or remyelination in light microscopic analysis of chronic EAE animals. However, there was a slight reduction of axonal pathology on the ultrastructural level as shown in in later studies by electron microscopy.

While anti-CD52-mAB effectively depletes lymphocytes peripherally and reduced CNS immune infiltrates both in the acute as well as in the chronic EAE, attenuation of disease severity was achieved only in the acute EAE with no effects on established neuronal damage or neuroregenerative mechanisms. This underlines the importance of an early effective immunomodulatory therapy before irreversible neuronal pathology is implemented. Furthermore, patients with a pronounced meningeal inflammation might especially benefit from a timely alemtuzumab treatment. Further studies are needed to establish a biomarker to predict clinical effectiveness and hence select a suited group of patients benefitting from alemtuzumab.

6. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: <i>Gating</i> -Strategie der Durchflusszytometrie	50
Abb. 2: <i>Enzyme-linked Immunoabsorbent Assay</i>	52
Abb. 3: B-Zell <i>Enzyme-linked Immunospot Assay</i>	55
Abb. 4: Hämoxilin-Eosin Übersichtsfärbung Kleinhirn	58
Abb. 5: Luxol-Fast-Blue Markscheidenfärbung Rückenmark	63
Abb. 6: Klinischer Verlauf	69
Abb. 7: Durchflusszytometrisch bestimmte Lymphozytenpopulationen	71
Abb. 8: MP4-spezifische B-Zell-Antwort und Antikörperproduktion	74
Abb. 9: Lymphozytäre Infiltration im <i>Cerebellum</i>	77
Abb. 10: Neurodegeneration und Remyelinisierung im Rückenmark	80

7. Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Verwendete Reagenzien und Chemikalien.....	36
Tab. 2: Verwendete Lösungen.....	39
Tab. 3: Verwendete Verbrauchsmaterialien.....	41
Tab. 4: Verwendete Gerätschaften	42
Tab. 5: Verwendete Software	43
Tab. 6: Verwendete Antikörper und Fluorochrome der Durchflusszytometrie.....	49
Tab. 7: Voreinstellung der Durchflusszytometriemessungen.....	49
Tab. 8: Verwendete Antikörper Immunhistochemie/ -fluoreszenz.....	61
Tab. 9: Klinische Parameter der akuten und chronischen Kohorte	68
Tab. 10: Immuninfiltration nach Kategorien	76

8. Literaturverzeichnis

Absinta M, Vuolo L, Rao A, Nair G, Sati P, Cortese IC, Ohayon J, Fenton K, Reyes-Mantilla MI, Maric D, Calabresi PA, Butman JA, Pardo CA, Reich DS. Gadolinium-based MRI characterization of leptomeningeal inflammation in multiple sclerosis. *Neurology* 2015; 85: 18-28

Akaishi T, Nakashima I. Efficiency of antibody therapy in demyelinating diseases. *Int Immunol* 2017; 29: 327-335

Al-Shammri S, Rawoot P, Azizieh F, AbuQoor A, Hanna M, Saminathan TR, Raghupathy R. Th1/Th2 cytokine patterns and clinical profiles during and after pregnancy in women with multiple sclerosis. *J Neurol Sci* 2004; 222: 21-27

Aloisi F, Pujol-Borrell R. Lymphoid neogenesis in chronic inflammatory diseases. *Nat Rev Immunol* 2006; 6: 205-217

Aloisi F, Serafini B, Magliozzi R, Howell OW, Reynolds R. Detection of Epstein-Barr virus and B-cell follicles in the multiple sclerosis brain: what you find depends on how and where you look. *Brain* 2010; 133: e157

Arroyo R, Bury DP, Guo JD, Margolin DH, Melanson M, Daizadeh N, Cella D. Impact of alemtuzumab on health-related quality of life over 6 years in CARE-MS II trial extension patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. *Mult Scler* 2019; 26: 955-963

Ascherio A. Environmental factors in multiple sclerosis. *Expert Rev Neurother* 2013; 13: 3-9

Ascherio A, Munger KL, Lunemann JD. The initiation and prevention of multiple sclerosis. *Nat Rev Neurol* 2012; 8: 602-612

Bail K, Notz Q, Rovituso DM, Schampel A, Wunsch M, Koeniger T, Schropp V, Bharti R, Scholz CJ, Foerstner KU, Kleinschnitz C, Kuerten S. Differential effects of FTY720 on the B cell compartment in a mouse model of multiple sclerosis. *J Neuroinflammation* 2017; 14: 148

Bandala-Sanchez E, Zhang Y, Reinwald S, Dromey JA, Lee BH, Qian J, Bohmer RM, Harrison LC. T cell regulation mediated by interaction of soluble CD52 with the inhibitory receptor Siglec-10. *Nat Immunol* 2013; 14: 741-748

Batoulis H, Addicks K, Kuerten S. Emerging concepts in autoimmune encephalomyelitis beyond the CD4/T(H)1 paradigm. *Ann Anat* 2010; 192: 179-193

Batoulis H, Recks MS, Addicks K, Kuerten S. Experimental autoimmune encephalomyelitis--achievements and prospective advances. *APMIS* 2011; 119: 819-830

Batoulis H, Wunsch M, Birkenheier J, Rottlaender A, Gorboulev V, Kuerten S. Central nervous system infiltrates are characterized by features of ongoing B cell-related immune activity in MP4-induced experimental autoimmune encephalomyelitis. *Clin Immunol* 2015; 158: 47-58

Baxi EG, DeBruin J, Tosi DM, Grishkan IV, Smith MD, Kirby LA, Strasburger HJ, Fairchild AN, Calabresi PA, Gocke AR. Transfer of myelin-reactive th17 cells impairs endogenous remyelination in the central nervous system of cuprizone-fed mice. *J Neurosci* 2015; 35: 8626-8639

Bell L, Koeniger T, Tacke S, Kuerten S. Characterization of blood-brain barrier integrity in a B-cell-dependent mouse model of multiple sclerosis. *Histochem Cell Biol* 2019; 151: 489-499

Berer K, Gerdes LA, Cekanaviciute E, Jia X, Xiao L, Xia Z, Liu C, Klotz L, Stauffer U, Baranzini SE, Kumpfel T, Hohlfeld R, Krishnamoorthy G, Wekerle H. Gut microbiota from multiple sclerosis patients enables spontaneous autoimmune encephalomyelitis in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2017; 114: 10719-10724

Berer K, Mues M, Koutrolos M, Rasbi ZA, Boziki M, Johner C, Wekerle H, Krishnamoorthy G. Commensal microbiota and myelin autoantigen cooperate to trigger autoimmune demyelination. *Nature* 2011; 479: 538-541

Berg-Hansen P, Moen SM, Sandvik L, Harbo HF, Bakken IJ, Stoltenberg C, Celius EG. Prevalence of multiple sclerosis among immigrants in Norway. *Mult Scler* 2015; 21: 695-702

Berger T, Elovaara I, Fredrikson S, McGuigan C, Moiola L, Myhr KM, Oreja-Guevara C, Stolarov I, Zettl UK. Alemtuzumab Use in Clinical Practice: Recommendations from European Multiple Sclerosis Experts. *CNS Drugs* 2017; 31: 33-50

Bergman J, Burman J, Gilthorpe JD, Zetterberg H, Jiltsova E, Bergenheim T, Svenningsson A. Intrathecal treatment trial of rituximab in progressive MS: An open-label phase 1b study. *Neurology* 2018; 91: e1893-e1901

Bhargava P, Wicken C, Smith MD, Strowd RE, Cortese I, Reich DS, Calabresi PA, Mowry EM. Trial of intrathecal rituximab in progressive multiple sclerosis patients with evidence of leptomeningeal contrast enhancement. *Mult Scler Relat Disord* 2019; 30: 136-140

Billiau A, Matthys P. Modes of action of Freund's adjuvants in experimental models of autoimmune diseases. *J Leukoc Biol* 2001; 70: 849-860

Bjornevik K, Cortese M, Healy BC, Kuhle J, Mina MJ, Leng Y, Elledge SJ, Niebuhr DW, Scher AI, Munger KL, Ascherio A. Longitudinal analysis reveals high prevalence of Epstein-Barr virus associated with multiple sclerosis. *Science* 2022; 375: 296-301

Blauth K, Soltys J, Matschulat A, Reiter CR, Ritchie A, Baird NL, Bennett JL, Owens GP. Antibodies produced by clonally expanded plasma cells in multiple sclerosis cerebrospinal fluid cause demyelination of spinal cord explants. *Acta Neuropathol* 2015; 130: 765-781

Bogie JF, Grajchen E, Wouters E, Broux B, Stinissen P, Van Wijmeersch B, Hendriks JJ. CNS delivery of anti-CD52 antibodies modestly reduces disease severity in an animal model for multiple sclerosis. *Ther Adv Chronic Dis* 2020; 11: 2040622320947378

Bonnan M, Ferrari S, Courtade H, Money P, Desblache P, Barroso B, Debeugny S. No Early Effect of Intrathecal Rituximab in Progressive Multiple Sclerosis (EFFRITE Clinical Trial). *Mult Scler Int* 2021; 2021: 8813498

Bramow S, Frischer JM, Lassmann H, Koch-Henriksen N, Lucchinetti CF, Sorensen PS, Laursen H. Demyelination versus remyelination in progressive multiple sclerosis. *Brain* 2010; 133: 2983-2998

Brandle SM, Obermeier B, Senel M, Bruder J, Mentele R, Khademi M, Olsson T, Tumani H, Kristoferitsch W, Lottspeich F, Wekerle H, Hohlfeld R, Dornmair K. Distinct oligoclonal band antibodies in multiple sclerosis recognize ubiquitous self-proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2016; 113: 7864-7869

Breakell T, Tacke S, Schropp V, Zetterberg H, Blennow K, Urich E, Kuerten S. Obinutuzumab-Induced B Cell Depletion Reduces Spinal Cord Pathology in a CD20 Double Transgenic Mouse Model of Multiple Sclerosis. *Int J Mol Sci* 2020; 21: 6864

Brecl Jakob G, Barun B, Gomezelj S, Gabelic T, Segajazbec S, Adamec I, Horvat Ledinek A, Rot U, Krbot Skoric M, Habek M. Effectiveness and safety of alemtuzumab in the treatment of active relapsing-remitting multiple sclerosis: a multicenter, observational study. *Neurol Sci* 2021;

Brown JW, Coles A, Horakova D, Havrdova E, Izquierdo G, Prat A, Girard M, Duquette P, Trojano M, Lugaresi A, Bergamaschi R, Grammond P, Alroughani R, Hupperts R, McCombe P, Van Pesch V, Sola P, Ferraro D, Grand'Maison F, Terzi M, Lechner-Scott J, Flechter S, Slee M, Shaygannejad V, Pucci E, Granella F, Jokubaitis V, Willis M, Rice C, Scolding N, Wilkins A, Pearson OR, Ziemssen T, Hutchinson M, Harding K, Jones J, McGuigan C, Butzkueven H, Kalincik T, Robertson N, Group MSS. Association of Initial Disease-Modifying Therapy With Later Conversion to Secondary Progressive Multiple Sclerosis. *JAMA* 2019; 321: 175-187

Browne P, Chandraratna D, Angood C, Tremlett H, Baker C, Taylor BV, Thompson AJ. Atlas of Multiple Sclerosis 2013: A growing global problem with widespread inequity. *Neurology* 2014; 83: 1022-1024

Brownlee WJ, Hardy TA, Fazekas F, Miller DH. Diagnosis of multiple sclerosis: progress and challenges. *Lancet* 2017; 389: 1336-1346

Cohen JA, Coles AJ, Arnold DL, Confavreux C, Fox EJ, Hartung HP, Havrdova E, Selmaj KW, Weiner HL, Fisher E, Brinar VV, Giovannoni G, Stojanovic M, Ertik BI, Lake SL, Margolin DH, Panzara MA, Compston DA, investigators C-MI. Alemtuzumab versus interferon beta 1a as first-line treatment for patients with relapsing-remitting multiple sclerosis: a randomised controlled phase 3 trial. *Lancet* 2012; 380: 1819-1828

Coles AJ, Cohen JA, Fox EJ, Giovannoni G, Hartung HP, Havrdova E, Schippling S, Selmaj KW, Traboulsee A, Compston DAS, Margolin DH, Thangavelu K, Chiriac MC, Jody D, Xenopoulos P, Hogan RJ, Panzara MA, Arnold DL, Care MS, II, Investigators C. Alemtuzumab CARE-MS II 5-year follow-up: Efficacy and safety findings. *Neurology* 2017; 89: 1117-1126

Coles AJ, Compston DA, Selmaj KW, Lake SL, Moran S, Margolin DH, Norris K, Tandon PK. Alemtuzumab vs. interferon beta-1a in early multiple sclerosis. *N Engl J Med* 2008; 359: 1786-1801

Coles AJ, Cox A, Le Page E, Jones J, Trip SA, Deans J, Seaman S, Miller DH, Hale G, Waldmann H, Compston DA. The window of therapeutic opportunity in multiple sclerosis: evidence from monoclonal antibody therapy. *J Neurol* 2006; 253: 98-108

Coles AJ, Twyman CL, Arnold DL, Cohen JA, Confavreux C, Fox EJ, Hartung HP, Havrdova E, Selmaj KW, Weiner HL, Miller T, Fisher E, Sandbrink R, Lake SL, Margolin DH, Oyuela P, Panzara MA, Compston DA, investigators C-MI. Alemtuzumab for patients with relapsing multiple sclerosis after disease-modifying therapy: a randomised controlled phase 3 trial. *Lancet* 2012; 380: 1829-1839

Coles AJ, Wing MG, Molyneux P, Paolillo A, Davie CM, Hale G, Miller D, Waldmann H, Compston A. Monoclonal antibody treatment exposes three mechanisms underlying the clinical course of multiple sclerosis. *Ann Neurol* 1999; 46: 296-304

Comi G, Bar-Or A, Lassmann H, Uccelli A, Hartung HP, Montalban X, Sorensen PS, Hohlfeld R, Hauser SL, Expert Panel of the 27th Annual Meeting of the European Charcot F. Role of B Cells in Multiple Sclerosis and Related Disorders. *Ann Neurol* 2021; 89: 13-23

Compston A, Coles A. Multiple sclerosis. *Lancet* 2008; 372: 1502-1517

Consortium IMSG. Multiple sclerosis genomic map implicates peripheral immune cells and microglia in susceptibility. *Science* 2019; 365:

Cox AL, Thompson SA, Jones JL, Robertson VH, Hale G, Waldmann H, Compston DA, Coles AJ. Lymphocyte homeostasis following therapeutic lymphocyte depletion in multiple sclerosis. *Eur J Immunol* 2005; 35: 3332-3342

Cramer SP, Simonsen H, Frederiksen JL, Rostrup E, Larsson HB. Abnormal blood-brain barrier permeability in normal appearing white matter in multiple sclerosis investigated by MRI. *Neuroimage Clin* 2014; 4: 182-189

Cree BA, Gourraud PA, Oksenberg JR, Bevan C, Crabtree-Hartman E, Gelfand JM, Goodin DS, Graves J, Green AJ, Mowry E, Okuda DT, Pelletier D, von Budingen HC, Zamvil SS, Agrawal A, Caillier S, Ciocca C, Gomez R, Kanner R, Lincoln R, Lizee A, Qualley P, Santaniello A, Suleiman L, Bucci M, Panara V, Papinutto N, Stern WA, Zhu AH, Cutter GR, Baranzini S, Henry RG, Hauser SL. Long-term evolution of multiple sclerosis disability in the treatment era. *Ann Neurol* 2016; 80: 499-510

Cree BAC, Hollenbach JA, Bove R, Kirkish G, Sacco S, Caverzasi E, Bischof A, Gundel T, Zhu AH, Papinutto N, Stern WA, Bevan C, Romeo A, Goodin DS, Gelfand JM, Graves J, Green AJ, Wilson MR, Zamvil SS, Zhao C, Gomez R, Ragan NR, Rush GQ, Barba P, Santaniello A, Baranzini SE, Oksenberg JR, Henry RG, Hauser SL. Silent progression in disease activity-free relapsing multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2019; 85: 653-666

De Mercanti S, Rolla S, Cucci A, Bardina V, Cocco E, Vladic A, Soldo-Butkovic S, Habek M, Adamec I, Horakova D, Annovazzi P, Novelli F, Durelli L, Clerico M. Alemtuzumab long-term immunologic effect: Treg suppressor function increases up to 24 months. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm* 2016; 3: e194

Demir S, Pitarokoili K, Linker R, Gold R. Immune cell derived BDNF does not mediate neuroprotection of the murine anti-CD52 antibody in a chronic autoimmune mouse model. *J Neuroimmunol* 2019; 328: 78-85

Dendrou CA, Fugger L, Friese MA. Immunopathology of multiple sclerosis. *Nat Rev Immunol* 2015; 15: 545-558

Denic A, Johnson AJ, Bieber AJ, Warrington AE, Rodriguez M, Pirko I. The relevance of animal models in multiple sclerosis research. *Pathophysiology* 2011; 18: 21-29

Derfuss T, Parikh K, Velhin S, Braun M, Mathey E, Krumbholz M, Kumpfel T, Moldenhauer A, Rader C, Sonderegger P, Pollmann W, Tiefenthaller C, Bauer J, Lassmann H, Wekerle H, Karagogeos D, Hohlfeld R, Linington C, Meinl E. Contactin-2/TAG-1-directed autoimmunity is identified in multiple sclerosis patients and mediates gray matter pathology in animals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106: 8302-8307

Dombrowski Y, O'Hagan T, Dittmer M, Penalva R, Mayoral SR, Bankhead P, Fleville S, Eleftheriadis G, Zhao C, Naughton M, Hassan R, Moffat J, Falconer J, Boyd A, Hamilton P, Allen IV, Kissenpfennig A, Moynagh PN, Evergren E, Perbal B, Williams AC, Ingram RJ, Chan JR, Franklin RJM, Fitzgerald DC. Regulatory T cells promote myelin regeneration in the central nervous system. *Nat Neurosci* 2017; 20: 674-680

Dumitrescu L, Constantinescu CS, Tanasescu R. Siponimod for the treatment of secondary progressive multiple sclerosis. *Expert Opin Pharmacother* 2019; 20: 143-150

Dunmire SK, Verghese PS, Balfour HH, Jr. Primary Epstein-Barr virus infection. *J Clin Virol* 2018; 102: 84-92

Elliott EA, McFarland HI, Nye SH, Cofield R, Wilson TM, Wilkins JA, Squinto SP, Matis LA, Mueller JP. Treatment of experimental encephalomyelitis with a novel chimeric fusion protein of myelin basic protein and proteolipid protein. *J Clin Invest* 1996; 98: 1602-1612

Ellwardt E, Vogelaar CF, Maldet C, Schmaul S, Bittner S, Luchtman D. Targeting CD52 does not affect murine neuron and microglia function. *Eur J Pharmacol* 2020; 871: 172923

Europäische Arzneimittelagentur, 2021: Lemtrada - EMEA/H/C/003718 - IA/0034
Product information

https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/lemtrada-epar-product-information_en.pdf (Zugriffsdatum: 31.05.2021)

Evan JR, Bozkurt SB, Thomas NC, Bagnato F. Alemtuzumab for the treatment of multiple sclerosis. *Expert Opin Biol Ther* 2018; 18: 323-334

Faissner S, Nikolayczik J, Chan A, Hellwig K, Gold R, Yoon MS, Haghikia A. Plasmapheresis and immunoabsorption in patients with steroid refractory multiple sclerosis relapses. *J Neurol* 2016; 263: 1092-1098

Feinstein A, Freeman J, Lo AC. Treatment of progressive multiple sclerosis: what works, what does not, and what is needed. *Lancet Neurol* 2015; 14: 194-207

Filippi M, Bar-Or A, Piehl F, Preziosa P, Solari A, Vukusic S, Rocca MA. Multiple sclerosis. *Nat Rev Dis Primers* 2018; 4: 43

Flores-Borja F, Bosma A, Ng D, Reddy V, Ehrenstein MR, Isenberg DA, Mauri C. CD19+CD24hiCD38hi B cells maintain regulatory T cells while limiting TH1 and TH17 differentiation. *Sci Transl Med* 2013; 5: 173ra123

Fox EJ, Wynn D, Coles AJ, Palmer J, Margolin DH, Investigators C. Alemtuzumab improves neurological functional systems in treatment-naive relapsing-remitting multiple sclerosis patients. *J Neurol Sci* 2016; 363: 188-194

Friese MA, Schattling B, Fugger L. Mechanisms of neurodegeneration and axonal dysfunction in multiple sclerosis. *Nat Rev Neurol* 2014; 10: 225-238

Frischer JM, Bramow S, Dal-Bianco A, Lucchinetti CF, Rauschka H, Schmidbauer M, Laursen H, Sorensen PS, Lassmann H. The relation between inflammation and neurodegeneration in multiple sclerosis brains. *Brain* 2009; 132: 1175-1189

Frischer JM, Weigand SD, Guo Y, Kale N, Parisi JE, Pirko I, Mandrekar J, Bramow S, Metz I, Bruck W, Lassmann H, Lucchinetti CF. Clinical and pathological insights into the dynamic nature of the white matter multiple sclerosis plaque. *Ann Neurol* 2015; 78: 710-721

Gaitan MI, Shea CD, Evangelou IE, Stone RD, Fenton KM, Bielekova B, Massacesi L, Reich DS. Evolution of the blood-brain barrier in newly forming multiple sclerosis lesions. *Ann Neurol* 2011; 70: 22-29

Gale CR, Martyn CN. Migrant studies in multiple sclerosis. *Prog Neurobiol* 1995; 47: 425-448

Ginaldi L, De Martinis M, Matutes E, Farahat N, Morilla R, Dyer MJ, Catovsky D. Levels of expression of CD52 in normal and leukemic B and T cells: correlation with in vivo therapeutic responses to Campath-1H. *Leuk Res* 1998; 22: 185-191

Giovannoni G, Bermel R, Phillips T, Rudick R. A brief history of NEDA. *Mult Scler Relat Disord* 2018; 20: 228-230

Giovannoni G, Cohen JA, Coles AJ, Hartung HP, Havrdova E, Selmaj KW, Margolin DH, Lake SL, Kaup SM, Panzara MA, Compston DA, Investigators C-MI. Alemtuzumab improves preexisting disability in active relapsing-remitting MS patients. *Neurology* 2016; 87: 1985-1992

Goldschmidt T, Antel J, Konig FB, Bruck W, Kuhlmann T. Remyelination capacity of the MS brain decreases with disease chronicity. *Neurology* 2009; 72: 1914-1921

Greenfield AL, Hauser SL. B-cell Therapy for Multiple Sclerosis: Entering an era. *Ann Neurol* 2018; 83: 13-26

Gresle MM, Liu Y, Dagley LF, Haartsen J, Pearson F, Purcell AW, Laverick L, Petzold A, Lucas RM, Van der Walt A, Prime H, Morris DR, Taylor BV, Ausimmune C, Shaw G, Butzkueven H. Serum phosphorylated neurofilament-heavy chain levels in multiple sclerosis patients. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2014; 85: 1209-1213

Grogan JL, Ouyang W. A role for Th17 cells in the regulation of tertiary lymphoid follicles. *Eur J Immunol* 2012; 42: 2255-2262

Grossman I, Knappertz V, Laifenfeld D, Ross C, Zeskind B, Kolitz S, Ladkani D, Hayardeny L, Loupe P, Laufer R, Hayden M. Pharmacogenomics strategies to optimize treatments for multiple sclerosis: Insights from clinical research. *Prog Neurobiol* 2017; 152: 114-130

Guarnera C, Bramanti P, Mazzon E. Alemtuzumab: a review of efficacy and risks in the treatment of relapsing remitting multiple sclerosis. *Ther Clin Risk Manag* 2017; 13: 871-879

Haas J, Wurthwein C, Korporal-Kuhnke M, Viehoveer A, Jarius S, Ruck T, Pfeuffer S, Meuth SG, Wildemann B. Alemtuzumab in Multiple Sclerosis: Short- and Long-Term Effects of Immunodepletion on the Peripheral Treg Compartment. *Front Immunol* 2019; 10: 1204

Haider L, Zrzavy T, Hametner S, Hoftberger R, Bagnato F, Grabner G, Trattinig S, Pfeifenbring S, Bruck W, Lassmann H. The topography of demyelination and neurodegeneration in the multiple sclerosis brain. *Brain* 2016; 139: 807-815

Harlow DE, Honce JM, Miravalle AA. Remyelination Therapy in Multiple Sclerosis. *Front Neurol* 2015; 6: 257

Harp CT, Ireland S, Davis LS, Remington G, Cassidy B, Cravens PD, Stuve O, Lovett-Racke AE, Eagar TN, Greenberg BM, Racke MK, Cowell LG, Karandikar NJ, Frohman EM, Monson NL. Memory B cells from a subset of treatment-naive relapsing-remitting multiple sclerosis patients elicit CD4(+) T-cell proliferation and IFN-gamma production in response to myelin basic protein and myelin oligodendrocyte glycoprotein. *Eur J Immunol* 2010; 40: 2942-2956

Harp CT, Lovett-Racke AE, Racke MK, Frohman EM, Monson NL. Impact of myelin-specific antigen presenting B cells on T cell activation in multiple sclerosis. *Clin Immunol* 2008; 128: 382-391

Harrer A, Tumani H, Niendorf S, Lauda F, Geis C, Weishaupt A, Kleinschnitz C, Rauer S, Kuhle J, Stangel M, Weber F, Uhr M, Linnebank M, Wildemann B, Jarius S, Guger M, Ayzenberg I, Chan A, Zettl U, Wiendl H, Pilz G, Hitzl W, Weber JR, Kraus J. Cerebrospinal fluid parameters of B cell-related activity in patients with active disease during natalizumab therapy. *Mult Scler* 2013; 19: 1209-1212

Hartung HP, Aktas O, Boyko AN. Alemtuzumab: a new therapy for active relapsing-remitting multiple sclerosis. *Mult Scler* 2015; 21: 22-34

Hauser SL, Bar-Or A, Cohen JA, Comi G, Correale J, Coyle PK, Cross AH, de Seze J, Leppert D, Montalban X, Selmaj K, Wiendl H, Kerloeguen C, Willi R, Li B, Kakarieka A, Tomic D, Goodyear A, Pingili R, Haring DA, Ramanathan K, Merschhemke M, Kappos L, Asclepios I, Groups AIT. Ofatumumab versus Teriflunomide in Multiple Sclerosis. *N Engl J Med* 2020; 383: 546-557

Hauser SL, Bar-Or A, Comi G, Giovannoni G, Hartung HP, Hemmer B, Lublin F, Montalban X, Rammohan KW, Selmaj K, Traboulsee A, Wolinsky JS, Arnold DL, Klingelschmitt G, Masterman D, Fontoura P, Belachew S, Chin P, Mairon N, Garren H, Kappos L, Opera I, Investigators OIC. Ocrelizumab versus Interferon Beta-1a in Relapsing Multiple Sclerosis. *N Engl J Med* 2017; 376: 221-234

Hauser SL, Cree BAC. Treatment of Multiple Sclerosis: A Review. *Am J Med* 2020; 133: 1380-1390 e1382

Hauser SL, Waubant E, Arnold DL, Vollmer T, Antel J, Fox RJ, Bar-Or A, Panzara M, Sarkar N, Agarwal S, Langer-Gould A, Smith CH, Group HT. B-cell depletion with rituximab in relapsing-remitting multiple sclerosis. *N Engl J Med* 2008; 358: 676-688

Havrdova E, Arnold DL, Cohen JA, Hartung HP, Fox EJ, Giovannoni G, Schippling S, Selmaj KW, Traboulsee A, Compston DAS, Margolin DH, Thangavelu K, Rodriguez CE, Jody D, Hogan RJ, Xenopoulos P, Panzara MA, Coles AJ, Care-Ms I, Investigators C. Alemtuzumab CARE-MS I 5-year follow-up: Durable efficacy in the absence of continuous MS therapy. *Neurology* 2017; 89: 1107-1116

Havrdova E, Horakova D, Kovarova I. Alemtuzumab in the treatment of multiple sclerosis: key clinical trial results and considerations for use. *Ther Adv Neurol Disord* 2015; 8: 31-45

Hawker K, O'Connor P, Freedman MS, Calabresi PA, Antel J, Simon J, Hauser S, Waubant E, Vollmer T, Panitch H, Zhang J, Chin P, Smith CH, group Ot. Rituximab in patients with primary progressive multiple sclerosis: results of a randomized double-blind placebo-controlled multicenter trial. *Ann Neurol* 2009; 66: 460-471

He A, Merkel B, Brown JW, Zhovits Ryerson L, Kister I, Malpas CB, Sharmin S, Horakova D, Kubala Havrdova E, Spelman T, Izquierdo G, Eichau S, Trojano M, Lugaresi A,

Hupperts R, Sola P, Ferraro D, Lycke J, Grand'Maison F, Prat A, Girard M, Duquette P, Laroche C, Svenningsson A, Petersen T, Grammond P, Granella F, Van Pesch V, Bergamaschi R, McGuigan C, Coles A, Hillert J, Piehl F, Butzkueven H, Kalincik T, group MSs. Timing of high-efficacy therapy for multiple sclerosis: a retrospective observational cohort study. *Lancet Neurol* 2020; 19: 307-316

Heidt S, Hester J, Shankar S, Friend PJ, Wood KJ. B cell repopulation after alemtuzumab induction-transient increase in transitional B cells and long-term dominance of naive B cells. *Am J Transplant* 2012; 12: 1784-1792

Hellierwell CL, Coles AJ. Monoclonal antibodies in multiple sclerosis treatment: current and future steps. *Ther Adv Neurol Disord* 2009; 2: 195-203

Hill-Cawthorne GA, Button T, Tuohy O, Jones JL, May K, Somerfield J, Green A, Giovannoni G, Compston DA, Fahey MT, Coles AJ. Long term lymphocyte reconstitution after alemtuzumab treatment of multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2012; 83: 298-304

Hjelmstrom P, Juedes AE, Fjell J, Ruddle NH. B-cell-deficient mice develop experimental allergic encephalomyelitis with demyelination after myelin oligodendrocyte glycoprotein sensitization. *J Immunol* 1998; 161: 4480-4483

Ho PR, Koendgen H, Campbell N, Haddock B, Richman S, Chang I. Risk of natalizumab-associated progressive multifocal leukoencephalopathy in patients with multiple sclerosis: a retrospective analysis of data from four clinical studies. *Lancet Neurol* 2017; 16: 925-933

Hofstetter HH, Shive CL, Forsthuber TG. Pertussis toxin modulates the immune response to neuroantigens injected in incomplete Freund's adjuvant: induction of Th1 cells and experimental autoimmune encephalomyelitis in the presence of high frequencies of Th2 cells. *J Immunol* 2002; 169: 117-125

Hohmann C, Milles B, Schinke M, Schroeter M, Ulzheimer J, Kraft P, Kleinschnitz C, Lehmann PV, Kuerten S. Categorization of multiple sclerosis relapse subtypes by B cell profiling in the blood. *Acta Neuropathol Commun* 2014; 2: 138

Howell OW, Reeves CA, Nicholas R, Carassiti D, Radotra B, Gentleman SM, Serafini B, Aloisi F, Roncaroli F, Magliozzi R, Reynolds R. Meningeal inflammation is widespread and linked to cortical pathology in multiple sclerosis. *Brain* 2011; 134: 2755-2771

Hu Y, Turner MJ, Shields J, Gale MS, Hutto E, Roberts BL, Siders WM, Kaplan JM. Investigation of the mechanism of action of alemtuzumab in a human CD52 transgenic mouse model. *Immunology* 2009; 128: 260-270

Ivanov A, Beers SA, Walshe CA, Honeychurch J, Alduaij W, Cox KL, Potter KN, Murray S, Chan CH, Klymenko T, Erenpreisa J, Glennie MJ, Illidge TM, Cragg MS. Monoclonal antibodies directed to CD20 and HLA-DR can elicit homotypic adhesion followed by lysosome-mediated cell death in human lymphoma and leukemia cells. *J Clin Invest* 2009; 119: 2143-2159

Jarius S, Wildemann B. AQP4 antibodies in neuromyelitis optica: diagnostic and pathogenetic relevance. *Nat Rev Neurol* 2010; 6: 383-392

Jones JL, Anderson JM, Phuah CL, Fox EJ, Selmaj K, Margolin D, Lake SL, Palmer J, Thompson SJ, Wilkins A, Webber DJ, Compston DA, Coles AJ. Improvement in disability after alemtuzumab treatment of multiple sclerosis is associated with neuroprotective autoimmunity. *Brain* 2010; 133: 2232-2247

Jordan EK, McFarland HI, Lewis BK, Tresser N, Gates MA, Johnson M, Lenardo M, Matis LA, McFarland HF, Frank JA. Serial MR imaging of experimental autoimmune encephalomyelitis induced by human white matter or by chimeric myelin-basic and proteolipid protein in the common marmoset. *AJNR Am J Neuroradiol* 1999; 20: 965-976

Kabat EA, Wolf A, Bezer AE, Murray JP. Studies on acute disseminated encephalomyelitis produced experimentally in rhesus monkeys. *J Exp Med* 1951; 93: 615-633

Kalincik T, Diouf I, Sharmin S, Malpas C, Spelman T, Horakova D, Havrdova EK, Trojano M, Izquierdo G, Lugaresi A, Prat A, Girard M, Duquette P, Grammond P, Jokubaitis V, van der Walt A, Grand'Maison F, Sola P, Ferraro D, Shaygannejad V, Alroughani R, Hupperts R, Terzi M, Boz C, Lechner-Scott J, Pucci E, Van Pesch V, Granella F, Bergamaschi R, Spitaleri D, Slee M, Vucic S, Ampapa R, McCombe P, Ramo-Tello C, Prevost J, Olascoaga J, Cristiano E, Barnett M, Saladino ML, Sanchez-Menoyo JL, Hodgkinson S, Rozsa C, Hughes S, Moore F, Shaw C, Butler E, Skibina O, Gray O, Kermode A, Csepány T, Singhal B, Shuey N, Piroška I, Taylor B, Simo M, Sirbu CA, Sas A, Butzkueven H, Group MSS. Effect of Disease-Modifying Therapy on Disability in Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis Over 15 Years. *Neurology* 2021; 96: e783-e797

Kappos L, Bar-Or A, Cree BAC, Fox RJ, Giovannoni G, Gold R, Vermersch P, Arnold DL, Arnould S, Scherz T, Wolf C, Wallstrom E, Dahlke F, Investigators EC. Siponimod versus placebo in secondary progressive multiple sclerosis (EXPAND): a double-blind, randomised, phase 3 study. *Lancet* 2018a; 391: 1263-1273

Kappos L, Butzkueven H, Wiendl H, Spelman T, Pellegrini F, Chen Y, Dong Q, Koendgen H, Belachew S, Trojano M, Tysabri Observational Program I. Greater sensitivity to multiple sclerosis disability worsening and progression events using a roving versus a fixed reference value in a prospective cohort study. *Mult Scler* 2018b; 24: 963-973

Katsavos S, Coles A. Alemtuzumab as Treatment for Multiple Sclerosis. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2018; 8:

Keegan M, König F, McClelland R, Bruck W, Morales Y, Bitsch A, Panitch H, Lassmann H, Weinshenker B, Rodriguez M, Parisi J, Lucchinetti CF. Relation between humoral pathological changes in multiple sclerosis and response to therapeutic plasma exchange. *Lancet* 2005; 366: 579-582

Kip MZ, A; Bleß, H.-H. (2016). *Weißbuch Multiple Sklerose, Versorgungssituation in Deutschland - Epidemiologie der Multiplen Sklerose*. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag

Kipp M, Nyamoya S, Hochstrasser T, Amor S. Multiple sclerosis animal models: a clinical and histopathological perspective. *Brain Pathol* 2017; 27: 123-137

Komori M, Blake A, Greenwood M, Lin YC, Kosa P, Ghazali D, Winokur P, Natrajan M, Wuest SC, Romm E, Panackal AA, Williamson PR, Wu T, Bielekova B. Cerebrospinal fluid markers reveal intrathecal inflammation in progressive multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2015; 78: 3-20

Komori M, Lin YC, Cortese I, Blake A, Ohayon J, Cherup J, Maric D, Kosa P, Wu T, Bielekova B. Insufficient disease inhibition by intrathecal rituximab in progressive multiple sclerosis. *Ann Clin Transl Neurol* 2016; 3: 166-179

Kooi EJ, Geurts JJ, van Horssen J, Bo L, van der Valk P. Meningeal inflammation is not associated with cortical demyelination in chronic multiple sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol* 2009; 68: 1021-1028

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

Kuerten S, Gruppe TL, Laurentius LM, Kirch C, Tary-Lehmann M, Lehmann PV, Addicks K. Differential patterns of spinal cord pathology induced by MP4, MOG peptide 35-55, and PLP peptide 178-191 in C57BL/6 mice. *APMIS* 2011a; 119: 336-346

Kuerten S, Javeri S, Tary-Lehmann M, Lehmann PV, Angelov DN. Fundamental differences in the dynamics of CNS lesion development and composition in MP4- and MOG peptide 35-55-induced experimental autoimmune encephalomyelitis. *Clin Immunol* 2008; 129: 256-267

Kuerten S, Kostova-Bales DA, Frenzel LP, Tigno JT, Tary-Lehmann M, Angelov DN, Lehmann PV. MP4- and MOG:35-55-induced EAE in C57BL/6 mice differentially targets brain, spinal cord and cerebellum. *J Neuroimmunol* 2007; 189: 31-40

Kuerten S, Lichtenegger FS, Faas S, Angelov DN, Tary-Lehmann M, Lehmann PV. MBP-PLP fusion protein-induced EAE in C57BL/6 mice. *J Neuroimmunol* 2006; 177: 99-111

Kuerten S, Pauly R, Rottlaender A, Rodi M, Gruppe TL, Addicks K, Tary-Lehmann M, Lehmann PV. Myelin-reactive antibodies mediate the pathology of MBP-PLP fusion protein MP4-induced EAE. *Clin Immunol* 2011b; 140: 54-62

Kuerten S, Pommerschein G, Barth SK, Hohmann C, Milles B, Sammer FW, Duffy CE, Wunsch M, Rovituro DM, Schroeter M, Addicks K, Kaiser CC, Lehmann PV. Identification of a B cell-dependent subpopulation of multiple sclerosis by measurements of brain-reactive B cells in the blood. *Clin Immunol* 2014; 152: 20-24

Kuerten S, Schickel A, Kerkloh C, Recks MS, Addicks K, Ruddle NH, Lehmann PV. Tertiary lymphoid organ development coincides with determinant spreading of the myelin-specific T cell response. *Acta Neuropathol* 2012; 124: 861-873

- Kugler S, Bocker K, Heusipp G, Greune L, Kim KS, Schmidt MA. Pertussis toxin transiently affects barrier integrity, organelle organization and transmigration of monocytes in a human brain microvascular endothelial cell barrier model. *Cell Microbiol* 2007; 9: 619-632
- Kuhlmann T, Ludwin S, Prat A, Antel J, Bruck W, Lassmann H. An updated histological classification system for multiple sclerosis lesions. *Acta Neuropathol* 2017; 133: 13-24
- Kumar S, Kimlinger TK, Lust JA, Donovan K, Witzig TE. Expression of CD52 on plasma cells in plasma cell proliferative disorders. *Blood* 2003; 102: 1075-1077
- Kutzelnigg A, Lucchinetti CF, Stadelmann C, Bruck W, Rauschka H, Bergmann M, Schmidbauer M, Parisi JE, Lassmann H. Cortical demyelination and diffuse white matter injury in multiple sclerosis. *Brain* 2005; 128: 2705-2712
- Lang J, Maeda Y, Bannerman P, Xu J, Horiuchi M, Pleasure D, Guo F. Adenomatous polyposis coli regulates oligodendroglial development. *J Neurosci* 2013; 33: 3113-3130
- Lanz TV, Brewer RC, Ho PP, Moon JS, Jude KM, Fernandez D, Fernandes RA, Gomez AM, Nadj GS, Bartley CM, Schubert RD, Hawes IA, Vazquez SE, Iyer M, Zuchero JB, Teegen B, Dunn JE, Lock CB, Kipp LB, Cotham VC, Ueberheide BM, Aftab BT, Anderson MS, DeRisi JL, Wilson MR, Bashford-Rogers RJM, Platten M, Garcia KC, Steinman L, Robinson WH. Clonally expanded B cells in multiple sclerosis bind EBV EBNA1 and GlialCAM. *Nature* 2022; 603: 321-327
- Lassmann H. Pathogenic Mechanisms Associated With Different Clinical Courses of Multiple Sclerosis. *Front Immunol* 2018; 9: 3116
- Lassmann H, Bradl M. Multiple sclerosis: experimental models and reality. *Acta Neuropathol* 2017; 133: 223-244
- Lassmann H, Bruck W, Lucchinetti CF. The immunopathology of multiple sclerosis: an overview. *Brain Pathol* 2007; 17: 210-218
- Lassmann H, van Horssen J, Mahad D. Progressive multiple sclerosis: pathology and pathogenesis. *Nat Rev Neurol* 2012; 8: 647-656
- Lehmann HC, Compston A, Hartung HP. 150th anniversary of clinical description of multiple sclerosis: Leopold Ordenstein's legacy. *Neurology* 2018; 90: 1011-1016
- Leussink VI, Jung S, Mershdorf U, Toyka KV, Gold R. High-dose methylprednisolone therapy in multiple sclerosis induces apoptosis in peripheral blood leukocytes. *Arch Neurol* 2001; 58: 91-97
- Li R, Patterson KR, Bar-Or A. Reassessing B cell contributions in multiple sclerosis. *Nat Immunol* 2018; 19: 696-707
- Li Z, Richards S, Surks HK, Jacobs A, Panzara MA. Clinical pharmacology of alemtuzumab, an anti-CD52 immunomodulator, in multiple sclerosis. *Clin Exp Immunol* 2018; 194: 295-314

Lichtenegger FS, Kuerten S, Faas S, Boehm BO, Tary-Lehmann M, Lehmann PV. Dissociation of experimental allergic encephalomyelitis protective effect and allergic side reactions in tolerization with neuroantigen. *J Immunol* 2007; 178: 4749-4756

Lisak RP, Benjamins JA, Nedelkoska L, Barger JL, Ragheb S, Fan B, Ouamara N, Johnson TA, Rajasekharan S, Bar-Or A. Secretory products of multiple sclerosis B cells are cytotoxic to oligodendroglia in vitro. *J Neuroimmunol* 2012; 246: 85-95

Lisak RP, Nedelkoska L, Benjamins JA, Schalk D, Bealmear B, Touil H, Li R, Muirhead G, Bar-Or A. B cells from patients with multiple sclerosis induce cell death via apoptosis in neurons in vitro. *J Neuroimmunol* 2017; 309: 88-99

Lovato L, Willis SN, Rodig SJ, Caron T, Almendinger SE, Howell OW, Reynolds R, O'Connor KC, Hafler DA. Related B cell clones populate the meninges and parenchyma of patients with multiple sclerosis. *Brain* 2011; 134: 534-541

Lu C, Pelech S, Zhang H, Bond J, Spach K, Noubade R, Blankenhorn EP, Teuscher C. Pertussis toxin induces angiogenesis in brain microvascular endothelial cells. *J Neurosci Res* 2008; 86: 2624-2640

Lubetzki C, Zalc B, Williams A, Stadelmann C, Stankoff B. Remyelination in multiple sclerosis: from basic science to clinical translation. *Lancet Neurol* 2020; 19: 678-688

Lublin FD, Reingold SC, Cohen JA, Cutter GR, Sorensen PS, Thompson AJ, Wolinsky JS, Balcer LJ, Banwell B, Barkhof F, Bebo B, Jr., Calabresi PA, Clanet M, Comi G, Fox RJ, Freedman MS, Goodman AD, Inglese M, Kappos L, Kieseier BC, Lincoln JA, Lubetzki C, Miller AE, Montalban X, O'Connor PW, Petkau J, Pozzilli C, Rudick RA, Sormani MP, Stuve O, Waubant E, Polman CH. Defining the clinical course of multiple sclerosis: the 2013 revisions. *Neurology* 2014; 83: 278-286

Lucas RM, Byrne SN, Correale J, Ilschner S, Hart PH. Ultraviolet radiation, vitamin D and multiple sclerosis. *Neurodegener Dis Manag* 2015; 5: 413-424

Lucchinetti C, Bruck W, Parisi J, Scheithauer B, Rodriguez M, Lassmann H. Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination. *Ann Neurol* 2000; 47: 707-717

Lucchinetti CF, Popescu BF, Bunyan RF, Moll NM, Roemer SF, Lassmann H, Bruck W, Parisi JE, Scheithauer BW, Giannini C, Weigand SD, Mandrekar J, Ransohoff RM. Inflammatory cortical demyelination in early multiple sclerosis. *N Engl J Med* 2011; 365: 2188-2197

Luchetti S, Fransen NL, van Eden CG, Ramaglia V, Mason M, Huitinga I. Progressive multiple sclerosis patients show substantial lesion activity that correlates with clinical disease severity and sex: a retrospective autopsy cohort analysis. *Acta Neuropathol* 2018; 135: 511-528

Lyons JA, San M, Happ MP, Cross AH. B cells are critical to induction of experimental allergic encephalomyelitis by protein but not by a short encephalitogenic peptide. *Eur J Immunol* 1999; 29: 3432-3439

Magliozzi R, Hametner S, Facchiano F, Marastoni D, Rossi S, Castellaro M, Poli A, Lattanzi F, Visconti A, Nicholas R, Reynolds R, Monaco S, Lassmann H, Calabrese M. Iron homeostasis, complement, and coagulation cascade as CSF signature of cortical lesions in early multiple sclerosis. *Ann Clin Transl Neurol* 2019; 6: 2150-2163

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* 2007; 130: 1089-1104

Magliozzi R, Howell OW, Nicholas R, Cruciani C, Castellaro M, Romualdi C, Rossi S, Pitteri M, Benedetti MD, Gajofatto A, Pizzini FB, Montemezzi S, Rasia S, Capra R, Bertoldo A, Facchiano F, Monaco S, Reynolds R, Calabrese M. Inflammatory intrathecal profiles and cortical damage in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2018; 83: 739-755

Magliozzi R, Howell OW, Reeves C, Roncaroli F, Nicholas R, Serafini B, Aloisi F, Reynolds R. A Gradient of neuronal loss and meningeal inflammation in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2010; 68: 477-493

Magliozzi R, Serafini B, Rosicarelli B, Chiappetta G, Veroni C, Reynolds R, Aloisi F. B-cell enrichment and Epstein-Barr virus infection in inflammatory cortical lesions in secondary progressive multiple sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol* 2013; 72: 29-41

Mahad DH, Trapp BD, Lassmann H. Pathological mechanisms in progressive multiple sclerosis. *Lancet Neurol* 2015; 14: 183-193

Maple PA, Ascherio A, Cohen JI, Cutter G, Giovannoni G, Shannon-Lowe C, Tanasescu R, Gran B. The Potential for EBV Vaccines to Prevent Multiple Sclerosis. *Front Neurol* 2022; 13: 887794

Masuyama J, Yoshio T, Suzuki K, Kitagawa S, Iwamoto M, Kamimura T, Hirata D, Takeda A, Kano S, Minota S. Characterization of the 4C8 antigen involved in transendothelial migration of CD26(hi) T cells after tight adhesion to human umbilical vein endothelial cell monolayers. *J Exp Med* 1999; 189: 979-990

Mathey EK, Derfuss T, Storch MK, Williams KR, Hales K, Woolley DR, Al-Hayani A, Davies SN, Rasband MN, Olsson T, Moldenhauer A, Velhin S, Hohlfeld R, Meinl E, Linington C. Neurofascin as a novel target for autoantibody-mediated axonal injury. *J Exp Med* 2007; 204: 2363-2372

McCarthy CL, Tuohy O, Compston DA, Kumararatne DS, Coles AJ, Jones JL. Immune competence after alemtuzumab treatment of multiple sclerosis. *Neurology* 2013; 81: 872-876

McRae BL, Kennedy MK, Tan LJ, Dal Canto MC, Picha KS, Miller SD. Induction of active and adoptive relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) using an encephalitogenic epitope of proteolipid protein. *J Neuroimmunol* 1992; 38: 229-240

Metz I, Weigand SD, Popescu BF, Frischer JM, Parisi JE, Guo Y, Lassmann H, Bruck W, Lucchinetti CF. Pathologic heterogeneity persists in early active multiple sclerosis lesions. *Ann Neurol* 2014; 75: 728-738

Meyer S, Evers M, Jansen JHM, Buijs J, Broek B, Reitsma SE, Moerer P, Amini M, Kretschmer A, Ten Broeke T, den Hartog MT, Rijke M, Klein C, Valerius T, Boross P, Leusen JHW. New insights in Type I and II CD20 antibody mechanisms-of-action with a panel of novel CD20 antibodies. *Br J Haematol* 2018; 180: 808-820

Michel L, Touil H, Pikor NB, Gommerman JL, Prat A, Bar-Or A. B Cells in the Multiple Sclerosis Central Nervous System: Trafficking and Contribution to CNS-Compartmentalized Inflammation. *Front Immunol* 2015; 6: 636

Minagar A, Alexander JS. Blood-brain barrier disruption in multiple sclerosis. *Mult Scler* 2003; 9: 540-549

Mohn N, Pfeuffer S, Ruck T, Gross CC, Skripuletz T, Klotz L, Wiendl H, Stangel M, Meuth SG. Alemtuzumab therapy changes immunoglobulin levels in peripheral blood and CSF. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm* 2020; 7: e654

Molnarfi N, Schulze-Topphoff U, Weber MS, Patarroyo JC, Prod'homme T, Varrin-Doyer M, Shetty A, Linington C, Slavina AJ, Hidalgo J, Jenne DE, Wekerle H, Sobel RA, Bernard CC, Shlomchik MJ, Zamvil SS. MHC class II-dependent B cell APC function is required for induction of CNS autoimmunity independent of myelin-specific antibodies. *J Exp Med* 2013; 210: 2921-2937

Montalban X, Hauser SL, Kappos L, Arnold DL, Bar-Or A, Comi G, de Seze J, Giovannoni G, Hartung HP, Hemmer B, Lublin F, Rammohan KW, Selmaj K, Traboulsee A, Sauter A, Masterman D, Fontoura P, Belachew S, Garren H, Mairon N, Chin P, Wolinsky JS, Investigators OC. Ocrelizumab versus Placebo in Primary Progressive Multiple Sclerosis. *N Engl J Med* 2017; 376: 209-220

Moreau T, Coles A, Wing M, Isaacs J, Hale G, Waldmann H, Compston A. Transient increase in symptoms associated with cytokine release in patients with multiple sclerosis. *Brain* 1996; 119 (Pt 1): 225-237

Moreau T, Thorpe J, Miller D, Moseley I, Hale G, Waldmann H, Clayton D, Wing M, Scolding N, Compston A. Preliminary evidence from magnetic resonance imaging for reduction in disease activity after lymphocyte depletion in multiple sclerosis. *Lancet* 1994; 344: 298-301

Myhr KM, Mellgren SI. Corticosteroids in the treatment of multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand Suppl* 2009; 189: 73-80

Nave KA. Myelination and the trophic support of long axons. *Nat Rev Neurosci* 2010; 11: 275-283

Nerviani A, Pitzalis C. Role of chemokines in ectopic lymphoid structures formation in autoimmunity and cancer. *J Leukoc Biol* 2018; 104: 333-341

Nguyen AL, Eastaugh A, van der Walt A, Jokubaitis VG. Pregnancy and multiple sclerosis: Clinical effects across the lifespan. *Autoimmun Rev* 2019; 18: 102360

Oertel FC, Scheel M, Chien C, Bischof A, Finke C, Paul F. Differenzialdiagnostik autoimmun-entzündlicher Rückenmarkserkrankungen. *Nervenarzt* 2021; 92: 293-306

Olesen J, Gustavsson A, Svensson M, Wittchen HU, Jonsson B. The economic cost of brain disorders in Europe. *Eur J Neurol* 2012; 19: 155-162

Olsson T, Barcellos LF, Alfredsson L. Interactions between genetic, lifestyle and environmental risk factors for multiple sclerosis. *Nat Rev Neurol* 2017; 13: 25-36

Palanichamy A, Apeltsin L, Kuo TC, Sirota M, Wang S, Pitts SJ, Sundar PD, Telman D, Zhao LZ, Derstine M, Abounasr A, Hauser SL, von Budingen HC. Immunoglobulin class-switched B cells form an active immune axis between CNS and periphery in multiple sclerosis. *Sci Transl Med* 2014; 6: 248

Pant AB, Wang Y, Mielcarz DW, Kasper EJ, Telesford KM, Mishra M, Haque A, Channon JY, Kasper LH, Begum-Haque S. Alteration of CD39+Foxp3+ CD4 T cell and cytokine levels in EAE/MS following anti-CD52 treatment. *J Neuroimmunol* 2017; 303: 22-30

Peferoen LA, Lamers F, Lodder LN, Gerritsen WH, Huitinga I, Melief J, Giovannoni G, Meier U, Hintzen RQ, Verjans GM, van Nierop GP, Vos W, Peferoen-Baert RM, Middeldorp JM, van der Valk P, Amor S. Epstein Barr virus is not a characteristic feature in the central nervous system in established multiple sclerosis. *Brain* 2010; 133: e137

Peters A, Pitcher LA, Sullivan JM, Mitsdoerffer M, Acton SE, Franz B, Wucherpfennig K, Turley S, Carroll MC, Sobel RA, Bettelli E, Kuchroo VK. Th17 cells induce ectopic lymphoid follicles in central nervous system tissue inflammation. *Immunity* 2011; 35: 986-996

Peterson JW, Bo L, Mork S, Chang A, Trapp BD. Transected neurites, apoptotic neurons, and reduced inflammation in cortical multiple sclerosis lesions. *Ann Neurol* 2001; 50: 389-400

Petzold A, Rejdak K, Plant GT. Axonal degeneration and inflammation in acute optic neuritis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2004; 75: 1178-1180

Pharmacovigilance Risk Assessment Committee - Europäische Arzneimittelagentur, 2020: Lemtrada article 20 referral - scientific conclusions
https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-conclusion/lemtrada-article-20-referral-scientific-conclusions_en.pdf (Zugriffsdatum: 31.05.2021)

Pollinger B, Krishnamoorthy G, Berer K, Lassmann H, Bosl MR, Dunn R, Domingues HS, Holz A, Kurschus FC, Wekerle H. Spontaneous relapsing-remitting EAE in the SJL/J mouse: MOG-reactive transgenic T cells recruit endogenous MOG-specific B cells. *J Exp Med* 2009; 206: 1303-1316

Polman CH, O'Connor PW, Havrdova E, Hutchinson M, Kappos L, Miller DH, Phillips JT, Lublin FD, Giovannoni G, Wajgt A, Toal M, Lynn F, Panzara MA, Sandrock AW, Investigators A. A randomized, placebo-controlled trial of natalizumab for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med* 2006; 354: 899-910

Popescu BF, Lucchinetti CF. Pathology of demyelinating diseases. *Annu Rev Pathol* 2012; 7: 185-217

Popescu BF, Pirko I, Lucchinetti CF. Pathology of multiple sclerosis: where do we stand? *Continuum (Minneap Minn)* 2013; 19: 901-921

Praet J, Guglielmetti C, Berneman Z, Van der Linden A, Ponsaerts P. Cellular and molecular neuropathology of the cuprizone mouse model: clinical relevance for multiple sclerosis. *Neurosci Biobehav Rev* 2014; 47: 485-505

Prinz J, Karacivi A, Stormanns ER, Recks MS, Kuerten S. Time-Dependent Progression of Demyelination and Axonal Pathology in MP4-Induced Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *PLoS One* 2015; 10: e0144847

Prosperini L, Annovazzi P, Boffa L, Buscarinu MC, Gallo A, Matta M, Moiola L, Musu L, Perini P, Avolio C, Barcella V, Bianco A, Farina D, Ferraro E, Pontecorvo S, Granella F, Grimaldi LME, Laroni A, Lus G, Patti F, Pucci E, Pasca M, Sarchielli P, Italian Alemtuzumab Study G. No evidence of disease activity (NEDA-3) and disability improvement after alemtuzumab treatment for multiple sclerosis: a 36-month real-world study. *J Neurol* 2018; 265: 2851-2860

Ransohoff RM, Hafler DA, Lucchinetti CF. Multiple sclerosis-a quiet revolution. *Nat Rev Neurol* 2015; 11: 134-142

Rao SP, Sancho J, Campos-Rivera J, Boutin PM, Severy PB, Weeden T, Shankara S, Roberts BL, Kaplan JM. Human peripheral blood mononuclear cells exhibit heterogeneous CD52 expression levels and show differential sensitivity to alemtuzumab mediated cytotoxicity. *PLoS One* 2012; 7: e39416

Rawstron AC, Laycock-Brown G, Hale G, Davies FE, Morgan GJ, Child JA, Hillmen P, Owen RG. CD52 expression patterns in myeloma and the applicability of alemtuzumab therapy. *Haematologica* 2006; 91: 1577-1578

Recks MS, Stormanns ER, Bader J, Arnhold S, Addicks K, Kuerten S. Early axonal damage and progressive myelin pathology define the kinetics of CNS histopathology in a mouse model of multiple sclerosis. *Clin Immunol* 2013; 149: 32-45

Reich DS, Lucchinetti CF, Calabresi PA. Multiple Sclerosis. *N Engl J Med* 2018; 378: 169-180

Robinson AP, Harp CT, Noronha A, Miller SD. The experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) model of MS: utility for understanding disease pathophysiology and treatment. *Handb Clin Neurol* 2014; 122: 173-189

Rovituso DM, Duffy CE, Schroeter M, Kaiser CC, Kleinschnitz C, Bayas A, Elsner R, Kuerten S. The brain antigen-specific B cell response correlates with glatiramer acetate responsiveness in relapsing-remitting multiple sclerosis patients. *Sci Rep* 2015; 5: 14265

Rowan WC, Hale G, Tite JP, Brett SJ. Cross-linking of the CAMPATH-1 antigen (CD52) triggers activation of normal human T lymphocytes. *Int Immunol* 1995; 7: 69-77

Ruck T, Afzali AM, Lukat KF, Eveslage M, Gross CC, Pfeuffer S, Bittner S, Klotz L, Melzer N, Wiendl H, Meuth SG. ALAIN01--Alemtuzumab in autoimmune inflammatory neurodegeneration: mechanisms of action and neuroprotective potential. *BMC Neurol* 2016; 16: 34

Ruck T, Bittner S, Wiendl H, Meuth SG. Alemtuzumab in Multiple Sclerosis: Mechanism of Action and Beyond. *Int J Mol Sci* 2015; 16: 16414-16439

Rudick RA, Stuart WH, Calabresi PA, Confavreux C, Galetta SL, Radue EW, Lublin FD, Weinstock-Guttman B, Wynn DR, Lynn F, Panzara MA, Sandrock AW, Investigators S. Natalizumab plus interferon beta-1a for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med* 2006; 354: 911-923

Sabatino JJ, Jr., Zamvil SS, Hauser SL. B-Cell Therapies in Multiple Sclerosis. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2019; 9:

Sawcer S, Hellenthal G, Pirinen M, Spencer CC, Patsopoulos NA, Moutsianas L, Dilthey A, Su Z, Freeman C, Hunt SE, Edkins S, Gray E, Booth DR, Potter SC, Goris A, Band G, Oturai AB, Strange A, Saarela J, Bellenguez C, Fontaine B, Gillman M, Hemmer B, Gwilliam R, Zipp F, Jayakumar A, Martin R, Leslie S, Hawkins S, Giannoulatou E, D'Alfonso S, Blackburn H, Martinelli Boneschi F, Liddle J, Harbo HF, Perez ML, Spurkland A, Waller MJ, Mycko MP, Ricketts M, Comabella M, Hammond N, Kockum I, McCann OT, Ban M, Whittaker P, Kempainen A, Weston P, Hawkins C, Widaa S, Zajicek J, Dronov S, Robertson N, Bumpstead SJ, Barcellos LF, Ravindrarajah R, Abraham R, Alfredsson L, Ardlie K, Aubin C, Baker A, Baker K, Baranzini SE, Bergamaschi L, Bergamaschi R, Bernstein A, Berthele A, Boggild M, Bradfield JP, Brassat D, Broadley SA, Buck D, Butzkueven H, Capra R, Carroll WM, Cavalla P, Celius EG, Cepok S, Chiavacci R, Clerget-Darpoux F, Clysters K, Comi G, Cossburn M, Cournu-Rebeix I, Cox MB, Cozen W, Cree BA, Cross AH, Cusi D, Daly MJ, Davis E, de Bakker PI, Debouverie M, D'Hooghe M B, Dixon K, Dobosi R, Dubois B, Ellinghaus D, Elovaara I, Esposito F, Fontenille C, Foote S, Franke A, Galimberti D, Ghezzi A, Glessner J, Gomez R, Gout O, Graham C, Grant SF, Guerini FR, Hakonarson H, Hall P, Hamsten A, Hartung HP, Heard RN, Heath S, Hobart J, Hoshi M, Infante-Duarte C, Ingram G, Ingram W, Islam T, Jagodic M, Kabesch M, Kermodé AG, Kilpatrick TJ, Kim C, Klopp N, Koivisto K, Larsson M, Lathrop M, Lechner-Scott JS, Leone MA, Leppa V, Liljedahl U, Bomfim IL, Lincoln RR, Link J, Liu J, Lorentzen AR, Lupoli S, Macchiardi F, Mack T, Marriott M, Martinelli V, Mason D, McCauley JL, Mentch F, Mero IL, Mihalova T, Montalban X, Mottershead J, Myhr KM, Naldi P, Ollier W, Page A, Palotie A, Pelletier J, Piccio L, Pickersgill T, Piehl F, Pobywajlo S, Quach HL,

Ramsay PP, Reunanen M, Reynolds R, Rioux JD, Rodegher M, Roesner S, Rubio JP, Ruckert IM, Salvetti M, Salvi E, Santaniello A, Schaefer CA, Schreiber S, Schulze C, Scott RJ, Sellebjerg F, Selmaj KW, Sexton D, Shen L, Simms-Acuna B, Skidmore S, Sleiman PM, Smestad C, Sorensen PS, Sondergaard HB, Stankovich J, Strange RC, Sulonen AM, Sundqvist E, Syvanen AC, Taddeo F, Taylor B, Blackwell JM, Tienari P, Bramon E, Tourbah A, Brown MA, Tronczynska E, Casas JP, Tubridy N, Corvin A, Vickery J, Jankowski J, Villoslada P, Markus HS, Wang K, Mathew CG, Wason J, Palmer CN, Wichmann HE, Plomin R, Willoughby E, Rautanen A, Winkelmann J, Wittig M, Trembath RC, Yaouanq J, Viswanathan AC, Zhang H, Wood NW, Zuvich R, Deloukas P, Langford C, Duncanson A, Oksenberg JR, Pericak-Vance MA, Haines JL, Olsson T, Hillert J, Ivinson AJ, De Jager PL, Peltonen L, Stewart GJ, Hafler DA, Hauser SL, McVean G, Donnelly P, Compston A. Genetic risk and a primary role for cell-mediated immune mechanisms in multiple sclerosis. *Nature* 2011; 476: 214-219

Schampel A, Volovitch O, Koeniger T, Scholz CJ, Jorg S, Linker RA, Wischmeyer E, Wunsch M, Hell JW, Ergun S, Kuerten S. Nimodipine fosters remyelination in a mouse model of multiple sclerosis and induces microglia-specific apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2017; 114: E3295-E3304

Schirmer L, Srivastava R, Kalluri SR, Bottinger S, Herwerth M, Carassiti D, Srivastava B, Gempt J, Schlegel J, Kuhlmann T, Korn T, Reynolds R, Hemmer B. Differential loss of KIR4.1 immunoreactivity in multiple sclerosis lesions. *Ann Neurol* 2014; 75: 810-828

Schropp V, Rohde J, Rovituso DM, Jabari S, Bharti R, Kuerten S. Contribution of LT α i and TH17 cells to B cell aggregate formation in the central nervous system in a mouse model of multiple sclerosis. *J Neuroinflammation* 2019; 16: 111

Serafini B, Rosicarelli B, Aloisi F, Stigliano E. Epstein-barr virus in the central nervous system and cervical lymph node of a patient with primary progressive multiple sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol* 2014; 73: 729-731

Serafini B, Rosicarelli B, Magliozzi R, Stigliano E, Aloisi F. Detection of ectopic B-cell follicles with germinal centers in the meninges of patients with secondary progressive multiple sclerosis. *Brain Pathol* 2004; 14: 164-174

Serafini B, Rosicarelli B, Veroni C, Zhou L, Reali C, Aloisi F. ROR γ Expression and Lymphoid Neogenesis in the Brain of Patients with Secondary Progressive Multiple Sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol* 2016; 75: 877-888

Serafini B, Severa M, Columba-Cabezas S, Rosicarelli B, Veroni C, Chiappetta G, Magliozzi R, Reynolds R, Coccia EM, Aloisi F. Epstein-Barr virus latent infection and BAFF expression in B cells in the multiple sclerosis brain: implications for viral persistence and intrathecal B-cell activation. *J Neuropathol Exp Neurol* 2010; 69: 677-693

Shaw G, Yang C, Ellis R, Anderson K, Parker Mickle J, Scheff S, Pike B, Anderson DK, Howland DR. Hyperphosphorylated neurofilament NF-H is a serum biomarker of axonal injury. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 336: 1268-1277

Simon M, Ipek R, Homola GA, Rovituso DM, Schampel A, Kleinschnitz C, Kuerten S. Anti-CD52 antibody treatment depletes B cell aggregates in the central nervous system in a mouse model of multiple sclerosis. *J Neuroinflammation* 2018; 15: 225

Simpson S, Jr., Blizzard L, Otahal P, Van der Mei I, Taylor B. Latitude is significantly associated with the prevalence of multiple sclerosis: a meta-analysis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2011; 82: 1132-1141

Srivastava R, Aslam M, Kalluri SR, Schirmer L, Buck D, Tackenberg B, Rothhammer V, Chan A, Gold R, Berthele A, Bennett JL, Korn T, Hemmer B. Potassium channel KIR4.1 as an immune target in multiple sclerosis. *N Engl J Med* 2012; 367: 115-123

Stanglmaier M, Reis S, Hallek M. Rituximab and alemtuzumab induce a nonclassic, caspase-independent apoptotic pathway in B-lymphoid cell lines and in chronic lymphocytic leukemia cells. *Ann Hematol* 2004; 83: 634-645

Stern JN, Yaari G, Vander Heiden JA, Church G, Donahue WF, Hintzen RQ, Huttner AJ, Laman JD, Nagra RM, Nylander A, Pitt D, Ramanan S, Siddiqui BA, Vigneault F, Kleinstein SH, Hafler DA, O'Connor KC. B cells populating the multiple sclerosis brain mature in the draining cervical lymph nodes. *Sci Transl Med* 2014; 6: 248

Tacke S, Braune S, Rovituso DM, Ziemssen T, Lehmann PV, Dikow H, Bergmann A, Kuerten S. B-Cell Activity Predicts Response to Glatiramer Acetate and Interferon in Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm* 2021; 8: e980

Teitelbaum D, Meshorer A, Hirshfeld T, Arnon R, Sela M. Suppression of experimental allergic encephalomyelitis by a synthetic polypeptide. *Eur J Immunol* 1971; 1: 242-248

Thompson AJ, Banwell BL, Barkhof F, Carroll WM, Coetzee T, Comi G, Correale J, Fazekas F, Filippi M, Freedman MS, Fujihara K, Galetta SL, Hartung HP, Kappos L, Lublin FD, Marrie RA, Miller AE, Miller DH, Montalban X, Mowry EM, Sorensen PS, Tintore M, Traboulsee AL, Trojano M, Uitdehaag BMJ, Vukusic S, Waubant E, Weinshenker BG, Reingold SC, Cohen JA. Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria. *Lancet Neurol* 2018a; 17: 162-173

Thompson AJ, Baranzini SE, Geurts J, Hemmer B, Ciccarelli O. Multiple sclerosis. *Lancet* 2018b; 391: 1622-1636

Thompson SA, Jones JL, Cox AL, Compston DA, Coles AJ. B-cell reconstitution and BAFF after alemtuzumab (Campath-1H) treatment of multiple sclerosis. *J Clin Immunol* 2010; 30: 99-105

Tintore M, Vidal-Jordana A, Sastre-Garriga J. Treatment of multiple sclerosis - success from bench to bedside. *Nat Rev Neurol* 2019; 15: 53-58

Toh BH, Kyaw T, Tipping P, Bobik A. Immune regulation by CD52-expressing CD4 T cells. *Cell Mol Immunol* 2013; 10: 379-382

Trapp BD, Peterson J, Ransohoff RM, Rudick R, Mork S, Bo L. Axonal transection in the lesions of multiple sclerosis. *N Engl J Med* 1998; 338: 278-285

Tsantes E, Curti E, Collura F, Bazzurri V, Fiore A, Granella F. Five- and seven-year prognostic value of new effectiveness measures (NEDA, MEDA and six-month delayed NEDA) in relapsing-remitting multiple sclerosis. *J Neurol Sci* 2020; 414: 116827

Turner MJ, Pang PT, Chretien N, Havari E, LaMorte MJ, Oliver J, Pande N, Masterjohn E, Carter K, Reczek D, Brondyk W, Roberts BL, Kaplan JM, Siders WM. Reduction of inflammation and preservation of neurological function by anti-CD52 therapy in murine experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* 2015; 285: 4-12

van de Pavert SA, Mebius RE. New insights into the development of lymphoid tissues. *Nat Rev Immunol* 2010; 10: 664-674

Veroni C, Serafini B, Rosicarelli B, Fagnani C, Aloisi F. Transcriptional profile and Epstein-Barr virus infection status of laser-cut immune infiltrates from the brain of patients with progressive multiple sclerosis. *J Neuroinflammation* 2018; 15: 18

von Glehn F, Farias AS, de Oliveira AC, Damasceno A, Longhini AL, Oliveira EC, Damasceno BP, Santos LM, Brandao CO. Disappearance of cerebrospinal fluid oligoclonal bands after natalizumab treatment of multiple sclerosis patients. *Mult Scler* 2012; 18: 1038-1041

Waldmann H, Hale G. CAMPATH: from concept to clinic. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2005; 360: 1707-1711

Watanabe T, Masuyama J, Sohma Y, Inazawa H, Horie K, Kojima K, Uemura Y, Aoki Y, Kaga S, Minota S, Tanaka T, Yamaguchi Y, Kobayashi T, Serizawa I. CD52 is a novel costimulatory molecule for induction of CD4⁺ regulatory T cells. *Clin Immunol* 2006; 120: 247-259

Weber MS, Derfuss T, Metz I, Bruck W. Defining distinct features of anti-MOG antibody associated central nervous system demyelination. *Ther Adv Neurol Disord* 2018; 11: 1756286418762083

Willis MD, Robertson NP. Alemtuzumab for Multiple Sclerosis. *Curr Neurol Neurosci Rep* 2016; 16: 84

Willis SN, Stadelmann C, Rodig SJ, Caron T, Gattenloehner S, Mallozzi SS, Roughan JE, Almendinger SE, Blewett MM, Bruck W, Hafler DA, O'Connor KC. Epstein-Barr virus infection is not a characteristic feature of multiple sclerosis brain. *Brain* 2009; 132: 3318-3328

Winkelmann A, Loebermann M, Reisinger EC, Zettl UK. Multiple sclerosis treatment and infectious issues: update 2013. *Clin Exp Immunol* 2014; 175: 425-438

Xia MQ, Hale G, Lively MR, Ferguson MA, Campbell D, Packman L, Waldmann H. Structure of the CAMPATH-1 antigen, a glycosylphosphatidylinositol-anchored

glycoprotein which is an exceptionally good target for complement lysis. *Biochem J* 1993; 293: 633-640

Yednock TA, Cannon C, Fritz LC, Sanchez-Madrid F, Steinman L, Karin N. Prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis by antibodies against alpha 4 beta 1 integrin. *Nature* 1992; 356: 63-66

Yu X, Burgoon M, Green M, Barmina O, Dennison K, Pointon T, Davis M, Gildea D. Intrathecally synthesized IgG in multiple sclerosis cerebrospinal fluid recognizes identical epitopes over time. *J Neuroimmunol* 2011; 240-241: 129-136

Zawadzka M, Rivers LE, Fancy SP, Zhao C, Tripathi R, Jansen F, Young K, Goncharenko A, Pohl H, Rizzi M, Rowitch DH, Kessaris N, Suter U, Richardson WD, Franklin RJ. CNS-resident glial progenitor/stem cells produce Schwann cells as well as oligodendrocytes during repair of CNS demyelination. *Cell Stem Cell* 2010; 6: 578-590

Zhang X, Tao Y, Chopra M, Ahn M, Marcus KL, Choudhary N, Zhu H, Markovic-Plese S. Differential reconstitution of T cell subsets following immunodepleting treatment with alemtuzumab (anti-CD52 monoclonal antibody) in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. *J Immunol* 2013; 191: 5867-5874

9. Danksagung

Allen Menschen zu danken, die mir in der Zeit meiner Promotion zur Seite standen, würde den Rahmen sprengen. Ich bitte daher alle nicht persönlich erwähnten Personen um Entschuldigung.

Zunächst möchte ich meiner Doktormutter und Betreuerin Professor Stefanie Kürten von ganzem Herzen danken, dass sie mich immer motiviert hat, immer erreichbar war und mich auch aus Erlangen und Bonn unermüdlich unterstützt hat.

Weiter möchte ich den Menschen danken, die mir geholfen haben, das Projekt voranzutreiben und Ideen in experimentelle Studienergebnisse zu überführen: Damiano Rovituso, Marie Wunsch, Tobias König und Andrea Schampel möchte ich für all die konstruktive Kritik, ihre Geduld und tatkräftige Unterstützung in der Etablierung und Umsetzung der Experimente ebenso danken, wie für die aufbauenden Worte in schwieriger Zeit. Ein herzlicher Dank geht auch an Kathrin Bail, mit der ich zusammen gelernt habe, mich in der uns neuen Welt der wissenschaftlichen Arbeit zurechtzufinden. Genauso möchte ich mich bei Rojda Ipek bedanken, deren weiterführende experimentelle Arbeit unsere gemeinsame Veröffentlichung ermöglicht hat. Für die Unterstützung in der Umsetzung der Experimente möchte ich mich zudem bei Erna Kleinschroth, Brigitte Treffny und Alla Ganscher aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie der Universität Würzburg bedanken.

Mindestens genauso wichtig waren jedoch jene Menschen, die mich in den vergangenen Jahren unabhängig von der direkten wissenschaftlichen Arbeit auf meinem Weg begleitet haben: Zunächst möchte ich hier meinen Eltern danken, die immer ein offenes Ohr für Probleme jeglicher Art hatten und immer Rat wussten. Wichtig waren für mich in all den Jahren auch meine Freundinnen und Freunde sowie meine Brüder, die zum Teil mein Leid geteilt oder mir geholfen haben Prioritäten neu zu setzen.

Der größte Dank wird jedoch immer meiner Frau Laura gelten, die mir so viel mehr Liebe, Halt und Zuversicht geschenkt hat, als ich es jemals zu hoffen gewagt hätte. Ich freue mich auf die vielen gemeinsamen Projekte, die größer, komplizierter und gewichtiger sein werden als diese Arbeit.