

Aus der Klinik und Poliklinik für Neurologie  
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Charakterisierung des Phänotyps von B-Zellen, Monozyten,  
dendritischen Zellen und BAFF unter Ocrelizumab-Therapie  
bei Patienten mit Multipler Sklerose

Inauguraldissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin  
der Universitätsmedizin  
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Vorgelegt von

Johannes Baptist Himbert  
aus Saarbrücken

Mainz, 2023

Wissenschaftlicher Vorstand: Univ.-Prof. Dr. Ulrich Förstermann

Tag der Promotion: 14. Mai 2024

Für meine Familie.

# Inhaltsverzeichnis

|  |     |
|--|-----|
| Abkürzungsverzeichnis.....   | I   |
| Tabellen- und Abbildungsverzeichnis.....   | III |
| 1 Einleitung.....  | 1   |
| 2 Literaturdiskussion.....   | 3   |
| 2.1 Grundlagen der Multiple Sklerose .....   | 3   |
| 2.1.1 Epidemiologie und Ätiologie.....   | 3   |
| 2.1.2 Verlaufsformen.....  | 3   |
| 2.1.3 Diagnostik .....   | 4   |
| 2.1.4 Symptome.....  | 5   |
| 2.1.5 Pathophysiologie.....  | 6   |
| 2.1.6 Therapie.....  | 8   |
| 2.2 Immunpathogenese der Multiplen Sklerose .....  | 9   |
| 2.2.1 Rolle der T-Zellen in MS .....   | 9   |
| 2.2.2 Rolle der B-Zellen in MS .....   | 10  |
| 2.2.3 Inflammatorische und regulatorische B-Zellen in MS.....  | 11  |
| 2.2.4 Rolle der myeloischen Zellen in MS.....  | 13  |
| 2.2.5 Effekte B-Zell-modifizierender MS-Therapien .....  | 16  |
| 2.3 BAFF in Multipler Sklerose .....   | 17  |
| 2.4 Ziel der Arbeit .....  | 21  |
| 3 Material und Methoden .....  | 21  |
| 3.1 Materialliste .....  | 21  |
| 3.2 Gewinnung und Aufbereitung des humanen Bluts .....   | 24  |
| 3.3 Isolation von dendritischen Zellen und Monozyten aus PBMCs .....   | 25  |
| 3.4 Kultivierung von dendritischen Zellen und Monozyten.....   | 25  |
| 3.5 Analyse der Expression von Oberflächenmolekülen auf dendritischen Zellen<br>und Monozyten mittels FACS ..... | 26  |

|     |  |    |
|-----|--|----|
| 3.6 | Nachweis von Zytokinen und Chemokinen in Kulturüberständen mittels LEGENDplex™ Multiplex Bead Assay .....                | 26 |
| 3.7 | Oberflächen- und intrazelluläre Charakterisierung von B-Zellen .....   | 27 |
| 3.8 | ELISA zur Bestimmung von BAFF-Konzentrationen im Serum .....   | 30 |
| 3.9 | Statistische Analyse .....   | 30 |
| 4   | Ergebnisse.....  | 31 |
| 4.1 | Klinische Charakterisierung der Ocrelizumab-Kohorte.....   | 31 |
| 4.2 | B-Zell-Depletion im Verlauf der Ocrelizumab-Therapie .....   | 33 |
| 4.3 | Serum-BAFF-Konzentrationen im Verlauf der Ocrelizumab-Therapie.....  | 34 |
| 4.4 | Charakterisierung der B-Zellen unter Ocrelizumab-Therapie .....  | 36 |
| 4.5 | Zusammenhang zwischen Serum-BAFF-Konzentrationen und zirkulierender B-Zellen unter Ocrelizumab-Therapie.....             | 38 |
| 4.6 | Expression von Oberflächenmolekülen auf dendritischen Zellen und Monozyten im Verlauf der Ocrelizumab-Therapie .....     | 40 |
| 4.7 | Zytokine und Chemokine in Kulturüberständen dendritischer Zellen und Monozyten im Verlauf der Ocrelizumab-Therapie ..... | 42 |
| 5   | Diskussion .....   | 46 |
| 6   | Zusammenfassung .....  | 54 |
| 7   | Literaturverzeichnis.....  | 56 |
| 8   | Anhang .....   | 63 |
| 9   | Danksagung.....  | 66 |
| 10  | Tabellarischer Lebenslauf.....   | 67 |

## Abkürzungsverzeichnis

|        |   |
|--------|---|
| µl     | Microliter  |
| BAFF   | B cell activating factor                              |
| DC     | Dendritische Zelle                                    |
| DMSO   | Dimethylsulfoxid                                      |
| EAE    | Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis           |
| EDSS   | Expanded Disability Status Scale                      |
| ELISA  | Enzyme-linked Immunosorbent Assay                     |
| FACS   | Fluorescence Activated Cell Sorting                   |
| GM-CSF | Granulozyten-Monozyten-Kolonien-stimulierender Faktor |
| HD     | Healthy Donor   |
| HLA    | Human Leukocyte Antigen                               |
| i.v.   | intravenös  |
| ICS    | Intracellular Cytokine Staining                       |
| IL     | Interleukin   |
| KI     | Konfidenzintervall                                    |
| LPS    | Lipopolysaccharid                                     |
| LT     | Lymphotoxin   |
| MACS   | Magnetic Activated Cell Sorting                       |
| mg     | Milligramm  |
| MHC    | Major Histocompatibility Complex                      |
| ml     | Milliliter  |
| MS     | Multiple Sklerose                                     |
| ns     | nicht signifikant                                     |
| OKB    | Oligoklonale Banden                                   |

|               |  |
|---------------|--|
| PBMC          | Peripheral Blood Mononuclear Cell        |
| pg            | Pikogramm, entspricht $10^{-12}$ Gramm   |
| PPMS          | Primary Progressive Multiple Sclerosis   |
| RRMS          | Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis   |
| SPMS          | Secondary Progressive Multiple Sclerosis |
| TNF- $\alpha$ | Tumor-Nekrose-Faktor $\alpha$            |
| ZNS           | Zentrales Nervensystem                   |

# Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

## Tabellen

|  |    |
|--|----|
| Tabelle 1: Charakterisierung der Kohorte ..... | 32 |
|--|----|

## Abbildungen

|   |    |
|---|----|
| Abbildung 1: Prinzip des LEGENDplex™ Assays.....  | 27 |
| Abbildung 2: Gating Schema für die FACS-Analyse der B-Zell-Subgruppen .....   | 29 |
| Abbildung 3: B-Zellen in Prozent der lebenden Lymphozyten .....   | 33 |
| Abbildung 4: Serum-BAFF-Konzentrationen.....  | 35 |
| Abbildung 5: Absolute Zahlen (links) und Anteile der B-Zell-Untergruppen (rechts) vor und 6 Monate nach Behandlung mit Ocrelizumab .....                                    | 37 |
| Abbildung 6: Korrelationen zwischen BAFF und jeweiligem Anteil der B-Zellen.....  | 39 |
| Abbildung 7: Reinheit der MACS-sortierten DCs und Monozyten.....  | 40 |
| Abbildung 8: Expressionen von HLA-DR und CD86 auf isolierten dendritischen Zellen und Monozyten .....   | 41 |
| Abbildung 9: Konzentrationen von Zytokinen und Chemokinen in den Überständen 24 h kultivierter Monozyten und dendritischer Zellen ohne vs. mit LPS-Stimulation. ....        | 43 |
| Abbildung 10: Konzentrationen der Zytokine IL-10, IL-6, TNF- $\alpha$ und IL-1 $\beta$ nach LPS-Stimulation in den Überständen 24 h kultivierter Monozyten .....            | 44 |
| Abbildung 11: Konzentrationen der Zytokine IL-10, IL-6, TNF- $\alpha$ und IL-1 $\beta$ nach LPS-Stimulation in den Überständen 24 h kultivierter dendritischer Zellen ..... | 45 |

## **Supplementäre Abbildungen**

|   |    |
|---|----|
| Supplementäre Abbildung 1: Korrelationsanalyse der Immunglobuline IgG, IgM und IgA zur Therapiedauer und zu Serum-BAFF .....  | 63 |
| Supplementäre Abbildung 2: Expressionen von HLA-DR und CD86 auf CD14 <sup>+</sup> Monozyten im longitudinalen Vergleich .....   | 64 |
| Supplementäre Abbildung 3: Konzentrationen der Chemokine CCL2 (MCP-1), CCL3 (MIP-1 $\alpha$ ), CXCL9 (MIG) und CCL4 (MIP-1 $\beta$ ) nach LPS-Stimulation in den Überständen 24 h kultivierter Monozyten.....             | 64 |
| Supplementäre Abbildung 4: Konzentrationen der Chemokine CCL2 (MCP-1), CCL3 (MIP-1 $\alpha$ ), CXCL9 (MIG) und CCL4 (MIP-1 $\beta$ ) nach LPS-Stimulation in den Überständen 24 h kultivierter dendritischer Zellen ..... | 65 |

## 1 Einleitung

Die Multiple Sklerose (MS) ist eine chronisch-entzündliche Erkrankung des zentralen Nervensystems (ZNS). Sie zeichnet sich durch eine autoimmune Entzündung aus, die zu einer Demyelinisierung von Myelinscheiden und konsekutiver axonaler Schädigung von Nervenzellen führt. Während die Immunpathogenese über viele Jahre hinweg maßgeblich durch eine fehlgeleitete T-Zell-Aktivierung erklärt wurde [1], mehrte sich in den letzten Jahren die Evidenz, dass auch B-Zellen und myeloische Zellen einen wesentlichen Einfluss auf die Pathogenese der MS haben [2]. Dies wird auch durch den erfolgreichen Einsatz von B-Zell-depletierenden Therapien unterstrichen. Der humanisierte Anti-CD20-Antikörper Ocrelizumab steht seit 2018 für die Behandlung der schubförmig remittierenden MS (RRMS) und der primär progredienten MS (PPMS) zur Verfügung. Ocrelizumab reduziert nicht nur die Schubrate und das Auftreten neuer Läsionen in der Magnetresonanztomographie (MRT) bei Patient\*innen mit RRMS [3], sondern verlangsamt auch die Behinderungsprogression und den Hirnvolumenverlust bei Patient\*innen mit PPMS [4]. Nach intravenöser Applikation eliminiert Ocrelizumab selektiv die CD20-exprimierende B-Zellen verschiedener Differenzierungsstadien [5], was sich unmittelbar in einer nahezu vollständigen Depletion von Prä-B-Zellen, immaturren, transitionalen und maturen B-Zellen einschließlich naiver B-Zellen und Gedächtnis-B-Zellen zeigt. Gleichzeitig bleiben hämatopoetische Stammzellen und Plasmazellen aufgrund ihrer fehlenden CD20-Expression verschont [6]. Auch wenn die zu einem geringeren Anteil CD20-exprimierenden T-Zellen ebenfalls depletiert werden [7], sind die Gründe für die positiven klinischen Effekte, insbesondere für die Wirksamkeit bei PPMS, nicht hinreichend bekannt. Es wird diskutiert, dass die Depletion von CD20-positiven B-Zellen (und T-Zellen) die "schwelende" Entzündungsaktivität dämpfen [6] und die von B-Zellen produzierten neurotoxischen Faktoren reduzieren könnte [8]. Auch die verringerten proinflammatorischer Antworten myeloischer Zellen nach B-Zell-Depletion und die veränderte Zusammensetzung der funktionell verschiedenen Untergruppen wiederauftretender B-Zellen könnten den Krankheitsverlauf positiv beeinflussen [9]. Bislang ist nur wenig über die Zusammensetzung der B-Zellen nach Ocrelizumab-Therapie bekannt, die gar eine möglicherweise länger anhaltende Immunrestitution ermöglichen könnte. Eine kürzlich durchgeführte Studie mit PPMS-Patient\*innen, die mit Ocrelizumab behandelt wurden, zeigte eine Zunahme des Anteils der transitionalen B-Zellen und eine Verschiebung hin zu einem weniger entzündlichen Phänotyp der Zytokin-

## Einleitung

produzierenden B-Zellen [10]. Die Mechanismen, die solche positiven Immunrestitutionen begünstigen, sind bisher noch weitgehend unbekannt. Sie sind jedoch von großer Relevanz, um neue Therapiestrategien zu entwickeln, die ausreichende Therapieeffekte ermöglichen, ohne dabei wiederholt Zustände schwerer Immunsuppression zu erzeugen.

Eine zentrale Rolle bei diesen Mechanismen könnte der B-Zell-aktivierende Faktor (BAFF) spielen. Dieser hat wichtige physiologische Funktionen für das Überleben, die Entwicklung und Differenzierung von B-Zellen und moduliert deren Immunantworten [11]. BAFF wird von zahlreichen Immunzellen wie Monozyten, dendritischen Zellen, B- und T-Zellen sowie von nicht-hämatopoetischen Zellen produziert [11]. Das Zytokin bindet an drei verschiedene Rezeptoren: den BAFF-Rezeptor, den Transmembran-Aktivator und Calcium-modulierenden Cyclophilin-Ligand-Interaktor (TACI) und in geringerem Maße an das B-Zell-Reifungs-Antigen (BCMA) [11]. Während BAFF einerseits mit der Entstehung systemischer Autoimmunerkrankungen assoziiert ist [12], deuten andererseits der Anstieg von BAFF während MS-Therapien wie Interferon-beta [13] und die positiven Auswirkungen von BAFF auf das Überleben von Neuronen [14, 15] auf nützliche Eigenschaften von BAFF bei MS hin.

In dieser Arbeit wird anhand einer prospektiven Patientenkohorte, die vor und während einer immunmodulatorischen Therapie mittels Ocrelizumab begleitet wird, der immunologische Phänotyp von MS-Patient\*innen im peripheren Blut untersucht. Im Vordergrund stehen hierbei die Kinetik der Depletion der B-Zellen und die korrespondierenden Serum-BAFF-Konzentrationen im Therapieverlauf. Zudem findet eine Phänotypisierung der B-Zellen mittels Durchflusszytometrie vergleichend vor und 6 Monate nach Therapiebeginn statt. Zusätzlich erfolgt eine Charakterisierung der Oberflächenmoleküle sowie der Chemokin- und Zytokinproduktion dendritischer Zellen und Monozyten vergleichend vor und während der Ocrelizumab-Therapie. Übergeordnetes Ziel ist es, schrittweise ein genaueres Bild der immunologischen Veränderungen während MS-Therapien zu erlangen, Biomarker für Therapieauswahl und -ansprechen zu entwickeln, aktuelle Therapiekonzepte zu optimieren und Mechanismen für zukünftige Therapieansätze zu finden.

## 2 Literaturdiskussion

### 2.1 Grundlagen der Multiple Sklerose

#### 2.1.1 Epidemiologie und Ätiologie

Die Multiple Sklerose ist eine autoimmun-entzündliche Erkrankung des ZNS, die sich erstmalig vor allem bei jungen Erwachsenen im Alter zwischen 20 und 40 Jahren manifestiert. Schätzungsweise leben weltweit ca. 2,8 Millionen Menschen mit einer MS-Erkrankung (Atlas der MS, 2020), wobei insgesamt mehr Frauen als Männer betroffen sind und die Prävalenz in allen Regionen der Welt steigt [16]. Zudem nimmt die Häufigkeit der Erkrankung mit Entfernung zum Äquator hin zu [17].

Die Ätiologie der Erkrankung ist nach wie vor nicht vollständig geklärt. Eine gesicherte Rolle wird jedoch dem Zusammenspiel aus genetischen und umweltbedingten Faktoren zugeschrieben. Früh konnte beschrieben werden, dass MS-Patient\*innen Variationen in den Genen der humanen Leukozytenantigenen (HLA) aufweisen [18]. Genomweite Assoziationsstudien (GWAS) zeigten, dass auch außerhalb dieser HLA-Regionen Polymorphismen von Genen, die an immunologischen Prozessen beteiligt sind, mit der Suszeptibilität für MS in Verbindung stehen [19, 20]. Inzwischen erklären die vom International Multiple Sclerosis Genetics Consortium (IMSGC) gefundenen Suszeptibilitäts-Loci zusammengenommen schon etwa 48 % der geschätzten Erbllichkeit der MS und eine verstärkte Genexpression lässt sich insbesondere bei peripheren Immunzellen und Mikroglia verorten, welche zur Entstehung der Erkrankung beitragen könnten [21]. Epidemiologische Daten deuten außerdem daraufhin, dass eine verringerte Sonnenexposition und Vitamin-D-Mangel [22], sowie eine Infektion mit Epstein-Barr-Virus (EBV) mögliche Risikofaktoren für die Entwicklung einer MS darstellen [23, 24]. Schon früh bestätigte sich in Metaanalysen, dass regelmäßiges Rauchen das Erkrankungsrisiko auf das bis zu 1,5-Fache erhöht [25].

#### 2.1.2 Verlaufsformen

Nach der Lublin Klassifikation von 2013 können vier verschiedene Verlaufsformen der MS unterschieden werden [26]: die schubförmig remittierende MS (*relapsing-remitting MS*, RRMS), die sekundär progrediente MS (*secondary progressive MS*, SPMS) und die primär progrediente MS (*primary progressive MS*, PPMS). Das klinisch isolierte Syndrom wird in der letzten Revision als erste klinische Präsentation der Krankheit

beschrieben, bei der es sich um eine MS handeln könnte, jedoch noch nicht das Kriterium der zeitlichen Dissemination erfüllt ist. Die RRMS ist mit einem Vorkommen von ca. 85 % die häufigste MS-Verlaufsform und durch unvorhersehbar auftretende Krankheitsschübe charakterisiert, nach denen eine komplette oder inkomplette Krankheitsrückbildung (Remission) erfolgt. Die SPMS äußert sich im klinischen Kontext bei Patient\*innen, die ehemals die Diagnose einer RRMS erhalten haben, bei denen nun aber eine allmähliche Verschlechterung im Sinne eines progressiven Verlaufs mit oder ohne Phasen akuter Exazerbationen auftritt. Bei der PPMS fehlen die anfänglich schubförmigen Exazerbationen und sie zeichnet sich von Beginn an durch eine Behinderungsprogression ohne oder allenfalls mit geringgradigen Remissionen und Verbesserungen aus. Von einer aktiven MS spricht man, wenn bei der mindestens einmal jährlichen Beurteilung neue klinische Schubereignisse bzw. zunehmende neurologische Dysfunktion und/oder MRT-Aktivität (kontrastverstärkte Läsionen, neue oder sich eindeutig vergrößernde T2-gewichtete Läsionen) festgestellt werden.

### **2.1.3 Diagnostik**

Die Diagnosestellung der MS erfolgt nach gründlichem Ausschluss von Differentialdiagnosen unter Berücksichtigung der Klinik, einer zerebralen und spinalen MRT-Bildgebung sowie Blut- und Liquor-Analysen. Dabei kommen die McDonald-Kriterien von 2017 zur Anwendung [27]:

Notwendig für die Diagnose ist die Feststellung einer räumlichen und zeitlichen Dissemination von Läsionen des ZNS, für die sich keine bessere Erklärung durch andere Erkrankungen finden lassen.

Radiologisch lassen sich MR-tomographisch T2-gewichtete Läsionen der weißen Substanz im periventrikulären Marklager, in kortikalen/juxtakortikalen Bereichen des Großhirns, in der infratentoriellen Region (insbesondere Hirnstamm und Kleinhirn) sowie in der weißen Substanz des Rückenmarks finden. Kontrastmittel-aufnehmende Läsionen in der T1-Wichtung sprechen für Herde mit akuter Demyelinisierung.

Die routinemäßige Serum- und Liquordiagnostik dient einerseits dem Ausschluss anderer entzündlicher oder infektiöser ZNS-Erkrankungen, andererseits der Diagnosesicherung. Zum Zeitpunkt der Diagnosestellung findet sich eine normale bis leicht erhöhte Zellzahl mit oft aktivierten Lymphozyten und Plasmazellen (lymphozytäre Pleozytose). Charakteristisch ist eine intrathekale Synthese von IgG,

als Ausdruck Antikörper-produzierender Plasmazellen, die über die Blut-Liquor-Schranke ins Liquor-Kompartiment übergetreten sind [28]. Qualitativ erfolgt der Nachweis oligoklonaler Banden von IgG (OKB) im Liquor mittels isoelektrischer Fokussierung, die zwar in mehr als 95 % der Patient\*innen mit MS positiv sind, aber auch bei anderen inflammatorischen Bedingungen auftreten. Positive OKB finden sich so beispielsweise auch bei rheumatischen Erkrankungen wie dem systemischen Lupus Erythematoses, der Neurosarkoidose oder Infektionen wie der Meningitis, Neuroborreliose oder Neurosyphilis [29]. Als etwas weniger sensitiv aber spezifischer für die MS gilt der Nachweis erhöhter Antikörperindizes für Masern-, Röteln- und Varizella-Zoster-Virus (sog. MRZ-Reaktion), der Ausdruck der polyspezifischen Antikörpersynthese im ZNS ist [30]. In der aktuellen Version der McDonald-Kriterien von 2017 kann das Vorhandensein der OKB im Liquor den MRT-basierten Nachweis der zeitlichen Dissemination ersetzen, was eine frühere Diagnosestellung ermöglichen kann [27].

### **2.1.4 Symptome**

Die MS kann sich klinisch mit einem breiten Spektrum an neurologischen Symptomen präsentieren [17]: In etwa 30 % der Fälle stellt die Retrobulbärneuritis ein Erstsymptom einer Multiplen Sklerose dar. Es handelt sich dabei um eine Entzündung des Sehnervs (N. opticus) bzw. insbesondere der Sehnervenpapille, die aufgrund der Anschwellung zu Einschränkungen des zentralen Sehens führt. Diese können bei Defektheilung jedoch persistieren. Bis auf den Visusverlust besteht häufig ein normaler ophthalmoskopischer Befund. Elektrophysiologisch kann eine stattgehabte Optikus- bzw. retrobulbäre Neuritis durch eine Latenzverzögerung der visuell evozierten Potenziale (VEP) objektiviert werden. Im Bereich der Okulomotorik kann es durch Befall des N. abducens, etwas seltener des N. trochlearis und des N. oculomotorius, zu Augenmuskellähmungen kommen. Eine typische Konstellation einer kombinierten Okulomotorikstörung stellt die internukleäre Ophthalmoplegie dar. Auch andere Hirnnerven wie der N. Trigemini (Trigeminusneuralgie) und der N. facialis (Fazialisparese) können betroffen sein. Im motorischen Funktionssystem kann es zum Auftreten von zentralen Paresen mit unterschiedlich schwerer Ausprägung einer spastischen Lähmung kommen, die von Feinmotorikstörungen und Gangstörungen bis hin zu Hemi-, Para-, und Tetraparesen reichen können. Begleitend können (einseitige) Reflexsteigerungen mit spastischer Tonuserhöhung und ein Ausfall der Bauchhautreflexe als Zeichen einer pyramidal-motorischen Schädigung auftreten. Im

Bereich der Sensibilität zeigen sich typischerweise Missempfindungen (Parästhesien) wie zum Beispiel Kribbeln oder Taubheitsgefühle bei verringerter Berührungsempfindung (Hypästhesie). Das Nackenbeugezeichen nach Lhermitte kann sich positiv zeigen. Dabei löst eine Neigung des Kopfes nach vorne ein unangenehmes, oft als „elektrisierend“ beschriebenes Gefühl aus. Blasenentleerungsstörungen oder Dranginkontinenz stellen häufige Symptome im Verlauf der Erkrankung dar. Die Charcot-Trias mit Nystagmus, Intentionstremor und skandierendem Sprechen beschreibt eine Funktionsstörung des Kleinhirns, wobei nicht alle Symptome gleichzeitig auftreten müssen.

Zunehmend in den Fokus geraten auch kognitive und psychische Veränderungen, die bei einem großen Teil der MS-Patient\*innen auftreten. Ein Phänomen, das mehr und mehr unter dem Namen MS-Prodrom bekannt wird, äußert sich dadurch, dass Patient\*innen schon Jahre vor dem ersten demyelinisierenden Ereignis häufiger das Gesundheitswesen in Anspruch nehmen [31]. Wie eine große britische Fall-Kontroll-Studie aus dem Jahr 2018 zeigt, haben MS-Patient\*innen ein höheres Risiko, bis zu 10 Jahre vor der Erstdiagnose an Magen-, Darm-, Harn- und Anorektalstörungen, Angstzuständen, Depressionen, Schlaflosigkeit, Müdigkeit, Kopfschmerzen und verschiedenen Arten von Schmerzen zu leiden [32].

Das Uthoff-Phänomen beschreibt eine passagere Symptomverschlechterung, die insbesondere bei Wärmeexposition oder Fieberzuständen beobachtet werden kann. Bei einem Schub handelt es sich im Gegensatz dazu jedoch um neue Symptome, die mindestens 24 Stunden anhalten und in einem Abstand von mindestens 30 Tagen zu einem letzten Schubereignis stehen.

Zur klinischen Dokumentation und Verlaufsbeurteilung der Defizite in den verschiedenen Funktionssystemen hat sich insbesondere die Erhebung des *Expanded Disability Status Scale* (EDSS) etabliert, welcher mittels klinisch-neurologischer Untersuchung erhoben wird [33].

### **2.1.5 Pathophysiologie**

Die Neuropathologie der MS wurde ursprünglich als entzündlicher Prozess definiert, der mit fokalen Plaques in der weißen Substanz des Gehirns und Rückenmarks als Zeichen primärer Demyelinisierung einhergeht [34]. Diese selektive Demyelinisierung ist durch die Destruktion und den Verlust von Oligodendrozyten als Teil der Gliazellen des ZNS gekennzeichnet [35]. Inzwischen ist bekannt, dass diese perivenös

gelegenen und als konfluierend beschriebenen Demyelinisierungs-Herde auch in der grauen Substanz, daher auch im Kortex des Großhirns [36] und des Zerebellums auftreten [37]. Die Demyelinisierung geht außerdem mit einem unterschiedlichen Ausmaß an akuter axonaler Schädigung und axonalem Verlust einher [38].

In den Bereichen der fokalen Entzündung lassen sich führend CD8<sup>+</sup> T-Zellen, aber auch CD4<sup>+</sup> T-Zellen, aktivierte Mikroglia, B-Zellen und Plasmazellen nachweisen [39]. In weiter fortgeschrittenen Läsionen, in welchen Myelin schon zerstört wurde, finden sich Makrophagen mit phagozytiertem Myelin und Monozyten [39].

Das traditionelle Bild der MS-Immunpathogenese beschreibt ein gestörtes Gleichgewicht zwischen regulatorischen T-Zellen (T<sub>reg</sub>) und ZNS-reaktiven Effektor-T-Zellen (T<sub>eff</sub>) und wird mehr und mehr um den Beitrag der B-Zellen und myeloischen Zellen im Entzündungsgeschehen ergänzt [2], wie in Kapitel 2.2 näher ausgeführt wird.

In progressiven Formen der MS, also bei Patient\*innen mit SPMS und PPMS zeigen sich im pathologischen Bild aktive demyelinisierende Läsionen seltener [40]. Außerhalb der sich über die Zeit ausdehnenden Plaques mit moderat entzündlichen Infiltraten findet sich eine generalisierte Aktivierung der Mikrogliazellen im Bereich der sogenannten „normal-erscheinenden“ weißen Substanz, die mit einer diffusen axonalen Schädigung und Zerstörung, gefolgt von einer sekundären Demyelinisierung einhergeht [41]. In einem Anteil von Patient\*innen mit SPMS wird auch ein Vorkommen von *B cell follicle-like structures* berichtet (Aggregate von Plasmazellen, B-Zellen, T-Zellen und follikulären dendritischen Zellen), was mit einem Anstieg meningealer Entzündung bzw. mikroglialer Aktivierung sowie mit einer Pathologie in der grauen Substanz assoziiert ist [42]. Dabei stehen die meningeale Entzündung und Bildung von follikulärem lymphatischem Gewebe bei progressiver MS auch in Zusammenhang mit einer erheblichen kortikalen Neurodegeneration bzw. generalisiertem Zellverlust, was die Hypothese unterstützt, dass lösliche zytotoxische Faktoren, die aus dem meningealen Kompartiment diffundieren, zur Pathologie der grauen Substanz und der daraus resultierenden Zunahme der klinischen Behinderung beitragen [43].

Im Gegensatz zu den Schädigungsmechanismen, welche sich in Form von Demyelinisierung und konsekutivem axonalem/neuronalem Verlust präsentieren, lässt sich Remyelinisierung als endogener Reparaturmechanismus auffassen. Dabei sind die Proliferation, Migration und Differenzierung von oligodendroglialen Vorläuferzellen (OPCs) für eine erfolgreiche Remyelinisierung erforderlich [44]. OPCs produzieren

dazu neues Myelin in demyelinisierten Bereichen. Eine ausgedehnte Remyelinisierung wurde in histopathologischen Untersuchungen nicht nur bei einem Teil der Patient\*innen mit RRMS, sondern auch bei einer Untergruppe mit progredienter Verlaufsform gefunden [45].

### **2.1.6 Therapie**

Die Therapie der MS lässt sich in drei Säulen gliedern. Dabei kommt neben einer symptomatischen Therapie und einer kurzfristigen medikamentösen Schub-Therapie auch eine langfristige verlaufsmodifizierende Immuntherapie zum Einsatz. Die Standardtherapie bei akutem Schub besteht aus einer mehrtägigen Gabe von Glukokortikoiden, die um eine Plasmaseparation ergänzt werden kann. Die Wahl der verlaufsmodifizierenden Therapie ist maßgeblich von Faktoren wie der Verlaufsform, der Krankheitsaktivität und -schwere abhängig und wird regelmäßig von Leitlinien- und Konsensus-Gruppen überarbeitet. Die jeweiligen Empfehlungen werden von der deutschen Gesellschaft für Neurologie (DGN), der Multiple Sklerose Therapie Konsensus Gruppe (MSTKG) bzw. in Qualitätshandbüchern des Krankheitsbezogenen Kompetenznetz Multiple Sklerose (KKNMS) veröffentlicht.

Ocrelizumab ist ein fast vollständig humanisierter monoklonaler Antikörper gegen CD20 und wurde 2018 zur Behandlung der aktiven RRMS und der PPMS zugelassen. Ocrelizumab reduziert sowohl die Schubrate als auch das Auftreten neuer Läsionen in der MRT bei Patient\*innen mit RRMS [3] und war in der Zulassungsstudie mit PPMS-Patient\*innen in der Lage, die Behinderungsprogression und den Hirnvolumenverlust zu verlangsamen [4]. Ocrelizumab wird in einer Dosierung von 600 mg (zunächst aufgeteilt in zwei Einzeldosen von 300 mg im Abstand von 14 Tagen) und ab dem zweiten Zyklus in einer Dosierung von 600 mg alle sechs Monate intravenös verabreicht. Ähnlich wie bei dem zuvor „off-label“ in Deutschland eingesetzten Antikörper Rituximab depletiert Ocrelizumab selektiv die CD20-exprimierenden B-Zellen, während hämatopoetische Stammzellen und Plasmazellen aufgrund ihrer fehlenden CD20-Expression verschont bleiben [6]. Vor der Applikation müssen aufgrund der immunsuppressiven Effekte eine Vervollständigung des Impfstatus, ein gründlicher Infektionsausschluss und Maßnahmen zur Reduzierung von Infusionsreaktionen erfolgen. Bei der Umstellung von anderen Therapien sollten die Nebenwirkungen der Vortherapie abgeklungen sein und es muss unter Umständen ein therapiefreies Intervall eingehalten werden.

## 2.2 Immunpathogenese der Multiplen Sklerose

Li, Patterson und Bar-Or beleuchten in ihrer Übersichtsarbeit die „traditionelle“ auf T-Zellen fokussierte Sicht auf die Immunpathogenese der MS und erweitern sie anschließend um die in den letzten 10-15 Jahren besser verstandene Rolle der B-Zellen und myeloischen Zellen [2], wie hier in analoger Darstellung diskutiert.

### 2.2.1 Rolle der T-Zellen in MS

Ohne die Kenntnis eines vorherrschenden exogenen Risikofaktors ist nach wie vor nicht hinreichend geklärt, ob MS in der Peripherie oder im ZNS ausgelöst wird [1]: Man geht vornehmlich davon aus, dass autoreaktive T-Zellen peripher aktiviert werden und danach über die Bluthirnschranke oder die Blut-Liquor-Schranke ins ZNS gelangen. Dabei spielen Mechanismen wie molekulare Mimikry [46] eine Rolle, bei der fremde Antigene, die Ähnlichkeit zu Selbstantigenen aufweisen, gegenüber T-Zellen präsentiert werden, was in Folge eine Autoimmunreaktion auslöst. Durch das Einwandern weiterer Immunzellen entsteht eine ZNS-gerichtete Entzündungsreaktion. Die prominente Rolle der T-Zell-vermittelten ZNS-gerichteten Autoimmunität ist in etablierten Tiermodellen wie der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE) gut nachvollzogen. Bei der EAE entsteht das MS-ähnliche Krankheitsbild nach der Injektion von ZNS-Antigenen durch die Aktivierung peripherer CD4<sup>+</sup> T-Zellen (T-Helferzellen). Dabei sind neben den Typ-1-T-Helfer-Zellen (T<sub>H1</sub>), die Interleukin-2 und Interferon- $\gamma$  produzieren [47], auch Interleukin-17-produzierende T-Helferzellen (insbesondere T<sub>H17</sub>-Zellen) an der Ausbildung der EAE beteiligt [1, 48]. Die das ZNS infiltrierenden T-Helferzellen werden durch antigenpräsentierende Zellen, insbesondere dendritische Zellen, aktiviert, was zu einer Entzündungsreaktion führt, die weitere Immunzellen in das ZNS rekrutiert und die Krankheitsprogression durch weitere Aktivierung naiver T-Zellen gegenüber endogenen Myelin-Epitopen (*epitope spreading*) verstärkt [49]. Im Gegensatz dazu stellen Typ-2-T-Helfer-Zellen (T<sub>H2</sub>) eine entzündungshemmende Population von Lymphozyten dar, die große Mengen immunregulierender Zytokine wie beispielsweise Interleukin-4 produzieren [50]. Auch in Studien mit MS-Patient\*innen wird T-Zellen (insbesondere T<sub>H1</sub>-Zellen, aber auch CD8<sup>+</sup> T-Zellen) eine pathogene Funktion zugesprochen. Man konnte zeigen, dass Myelin-reaktive CD4<sup>+</sup> T-Zellen von Patient\*innen mit Multipler Sklerose Zytokine produzieren, die eher einer T<sub>H1</sub>-vermittelten Reaktion entsprechen [51]. Myelin-reaktive T-Zellen von gesunden Personen produzieren hingegen eher Zytokine, die eine T<sub>H2</sub>-vermittelte Reaktion charakterisieren, wobei sich auch ZNS-spezifische

CD8<sup>+</sup> T-Zell-Reaktionen funktionell von denen gesunder Personen unterschieden [51]. Neben den erwähnten proinflammatorischen T-Zellen, den sogenannten T-Effektorzellen (T<sub>eff</sub>), existieren auch regulatorische T-Zellen, wie forkhead box P3 (FOXP3)-exprimierende regulatorische T-Zellen (T<sub>reg</sub>), sowie Interleukin-10 produzierende T-regulatorische Typ-1-Zellen (T<sub>R1</sub>), welche bei MS-Patient\*innen möglicherweise dysfunktionale Eigenschaften besitzen [52, 53].

### 2.2.2 Rolle der B-Zellen in MS

In der Darstellung von Li, Patterson und Bar-Or prägten in der traditionellen Sichtweise insbesondere myeloische Zellen wie Monozyten und dendritische Zellen als wichtigste antigenpräsentierende Zellen die T-Zell-Antwort und umgekehrt, wobei B-Zellen historisch eher als eine relativ homogene und passive Population angesehen wurden, die auf die Hilfe von T-Zellen warten, um sich in Antikörper sezernierende Plasmablasten und Plasmazellen zu differenzieren [2]. Es wurde davon ausgegangen, dass der Beitrag der B-Zellen zur Pathophysiologie der MS im Wesentlichen auf ihr Potenzial zurückzuführen ist, autoreaktive ZNS-Antikörper zu produzieren [2].

Das Vorhandensein oligoklonaler Banden im Liquor als Ausdruck der intrathekalen Immunglobulinsynthese wird oftmals als das „Markenzeichen der MS“ bezeichnet und hat in der Erstdiagnostik durch die Ausweitung der Diagnosekriterien erst neuerlich wieder erhöhten Stellenwert erlangt. Trotzdem ist die krankmachende Relevanz der zirkulierenden ZNS-reaktiven Antikörper noch immer nicht eindeutig geklärt. Nach Li *et al.* könnten die OKB einerseits ein pathogenetisch relevantes, vielleicht sogar vereinigendes "enzephalitogenes" Autoantigen erkennen und somit zur Zerstörung von Hirngewebe beitragen [2]. Andererseits gibt es Hinweise darauf, dass OKBs teilweise erst als sekundäre Reaktion auf bereits zerstörtes Gewebe gebildet werden und somit gar nicht primärer Verursacher der ZNS-Schädigung sind [54].

Die Beschreibung von *B cell follicle-like structures* als Aggregate von B-Zellen, T-Zellen und Plasmazellen sowie follikulären dendritischen Zellen im Bereich der Meningen von Patient\*innen mit SPMS lässt auf das Vorhandensein kompartimentierter B-Zellen im ZNS schließen [55]. Die gefundenen B-Zell-Follikel weisen Nähe zu großen subpialen kortikalen Läsionen auf, was nach Magliozzi *et al.* darauf hindeutet, dass lösliche Faktoren, die aus diesen Strukturen diffundieren, eine pathogene Rolle zu spielen scheinen [56]. Überstände, die aus B-Zellen von Patient\*innen mit RRMS gewonnen wurden, verursachten im Vergleich zu den

Überständen gesunder Personen *in vitro* ein signifikant höheres Sterben von Oligodendrozyten und Neuronen, was ebenfalls auf bisher nicht identifizierte toxische Faktoren, die nicht von Immunglobulinen stammen, hinweisen könnte [57, 58].

Der erfolgreiche Einsatz B-Zell-depletierender CD20-Antikörper wie Rituximab oder Ocrelizumab bei der Behandlung der MS lässt ebenfalls eine zentralere Rolle der B-Zellen bei neuen MS-Schüben erkennen, die insbesondere nicht nur von Antikörpern abhängig zu sein scheint [3, 59]. Anti-CD20-Therapien wie Rituximab führen zwar zu einer kompletten Depletion der CD20-positiven B-Zellen, sparen jedoch die Plasmazellen als Hauptproduzenten von Antikörpern aus, weshalb sich unter Therapie im Blut auch keine verringerten Immunglobulin-Spiegel nachweisen lassen [59].

Die antikörperunabhängige Rolle der B-Zellen wird zum Teil durch die Bildung verschiedener Zytokine vermittelt und kann sich entweder in Form von proinflammatorischen Effektor-B-Zellen ( $B_{eff}$ ) oder in Form entzündungshemmender regulatorischer B-Zellen ( $B_{reg}$ ) manifestieren [2]. Diese Zellen können proinflammatorische Effekte sowohl von T-Zellen als auch von myeloischen Zellen aktivieren ( $B_{eff}$ ) oder herunterregulieren ( $B_{reg}$ ) [2].

### **2.2.3 Inflammatorische und regulatorische B-Zellen in MS**

Regulatorische B-Zellen ( $B_{reg}$ ) werden als eine Gruppe von B-Zellen beschrieben, die in der Lage sind, Immunantworten zu supprimieren.  $B_{regs}$  sind durch eine Vielzahl von Molekülen gekennzeichnet, die an diesen immunregulatorischen Funktionen beteiligt sind, allerdings wird die Fähigkeit zur Produktion des anti-inflammatorischen Zytokins Interleukin-10 (IL-10) als zentrales Charakteristikum dieser Zellen aufgefasst [60]. Humane  $B_{regs}$  sind durchflusszytometrisch in Form einer immaturren (unreifen) B-Zell-Population zu finden, die als sogenannte transitionale B-Zellen ( $CD19^+CD24^{high}CD38^{high}$ ) im peripheren Blut nachweisbar sind [61]. In der Co-Kultur mit  $T_H1$ -Zellen supprimierten transitionale B-Zellen gesunder Spender\*innen die Anzahl der  $CD4^+IFN-\gamma^+$  und  $CD4^+TNF-\alpha^+$  T-Zellen [62]. Des Weiteren unterdrückten transitionale B-Zellen die Differenzierung von  $T_H1$ -Zellen, teilweise durch die Bereitstellung von IL-10, wobei deren suppressive Wirkung durch Blockade der costimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 aufgehoben werden konnte [62]. Verglichen mit der verbleibenden maturaen B-Zell-Population ( $CD19^+CD24^{+/int}CD38^{-/int}$ ) war unter den transitionalen B-Zellen ein größerer Anteil IL-10<sup>+</sup> [62]. Transitionale B-Zellen, die aus dem peripheren Blut von Patient\*innen mit systemischem Lupus

erythematodes (SLE) isoliert wurden, waren refraktär gegenüber CD40-Stimulation, produzierten weniger IL-10 und verfügten über eine mangelnde suppressive Kapazität im Vergleich zu ihren gesunden Pendanten [62]. Ähnlich dazu wiesen isolierte B-Zellen von MS-Patient\*innen im Vergleich zu B-Zellen gesunder Kontrollen nach CD40-Stimulation in den jeweiligen Überständen eine signifikant niedrigere Konzentration von IL-10 auf [63].

Mature B-Zellen ( $CD19^+CD24^{+/int}CD38^{-/int}$ ) lassen sich anhand ihrer Oberflächenmarker in  $CD27^+IgD^+$  naive B-Zellen und  $CD27^+$  Memory B-Zellen (Gedächtnis-B-Zellen) unterteilen. Je nachdem, ob im Rahmen der Differenzierung der Memory B-Zellen bereits ein Klassenwechsel erfolgt ist, unterscheidet man dort weiter zwischen  $CD27^+IgD^+$  non-class-switched memory B-Zellen und  $CD27^+IgD^-$  class-switched memory B-Zellen. Insbesondere die  $CD27^+$  B-Zellen scheinen proinflammatorische Zytokin-Profile aufzuweisen, unter dualer CD40- und B-Zell-Rezeptor (BCR)-Stimulation produzieren diese mehr Lymphotoxin (LT) und  $TNF-\alpha$ , während sich die Produktion von IL-10 fast ausschließlich in der  $CD27^-$  B-Zell-Population nachweisen lässt [63]. Weitere proinflammatorische Eigenschaften solcher B-Effektorzellen zeigen sich in ihrer Fähigkeit zur Produktion von IL-6 und GM-CSF. B-Zellen von MS-Patient\*innen produzieren mehr IL-6 als B-Zellen von gesunden Kontrollpersonen, wobei sich diese Abnormalität bei den rekonstituierten B-Zellen nach Rituximab-Behandlung wieder normalisiert [64]. Patient\*innen mit MS weisen außerdem im Vergleich zu gesunden Kontrollen höhere Frequenzen von GM-CSF-produzierenden B-Zellen auf, welche in größerem Maße  $TNF-\alpha$  und IL-6 produzieren und dem  $CD27^+$  B-Zell-Pool angehören [9]. Auch in  $CD27^-$  B-Zellen kann nach dualer CD40- und BCR-Stimulation eine GM-CSF-Expression induziert werden [9]. Diese GM-CSF-produzierenden B-Zellen sind in der Lage proinflammatorische Antworten myeloischer Zellen auszulösen, die wiederum durch Sekretion von IL-12 und IL-6 die Differenzierung von  $T_H1$ - und  $T_H17$ -Zellen verstärkend beeinflussen können [9].

Zusammenfassend übernehmen B-Zellen neben Antikörperproduktion und Antigenpräsentation gegenüber T-Zellen und myeloischen Zellen wichtige, davon unabhängige, inflammatorische und regulatorische Funktionen, die bei MS in relevantem Maße beeinträchtigt sind.

## 2.2.4 Rolle der myeloischen Zellen in MS

Neben Zellen des adaptiven Immunsystems spielen bei der MS seitens des angeborenen Immunsystems auch myeloische Zellen wie dendritische Zellen (DCs), Monozyten, (Monozyten-abgeleitete) Makrophagen und Mikroglia eine pathogenetische Rolle. Dabei entfalten myeloische Zellen ihre Funktion einerseits durch die Präsentation von Antigenen gegenüber naiven T-Zellen. Andererseits fördern sie eine proinflammatorische Umgebung durch Sekretion von Chemokinen und Zytokinen wie beispielsweise IL-1 $\beta$ , IL-12, IL-23 und TNF- $\alpha$ , welche die Pathogenität der autoreaktiven T-Zellen begünstigen können [65, 66].

Im Menschen unterscheidet man hauptsächlich zwei DC-Untergruppen im Blut: myeloide oder konventionelle dendritische Zellen (cDCs) und plasmazytoide dendritische Zellen (pDCs). cDCs sind phänotypisch durch die Expression von CD11c, humanem Leukozyten-Antigen HLA-DR, *blood dendritic cell antigen* BDCA-1 (auch bekannt als CD1c) und durch das Fehlen der Expression von CD123 gekennzeichnet, während pDCs durchflusszytometrisch als CD11c<sup>-</sup>HLA-DR<sup>+</sup>CD123<sup>high</sup> charakterisiert werden [67]. Bei Gesunden übernehmen dendritische Zellen wichtige Funktionen bei der Ausbildung der zentralen und peripheren Toleranz via Präsentation von körpereigenen Antigenen. Sie befinden sich im peripheren Gewebe und in Lymphknoten und weisen mit zunehmender Reife höhere Expressionen der costimulatorischen Oberflächenmoleküle CD80 und CD86 auf, die neben MHC-II zur Präsentation von (Fremd-)Antigenen benötigt werden. In inflammatorischen Erkrankungen überwinden dendritische Zellen allerdings vermehrt die Bluthirnschranke und zeigen einen aktivierten Phänotyp: *In-vitro*-Studien mit Primärkulturen von mikrovaskulären Endothelzellen des Gehirns (BMEC) zeigten mechanistisch eine erhöhte DC-Transmigration bei Zugabe des Chemokins CCL3 (MIP-1 $\alpha$ ) und die Migration der DCs wurde durch von dendritischen Zellen sezernierte Matrix-Metalloproteinasen erleichtert [68]. In inflammatorischen ZNS-Erkrankungen wiesen dabei cDCs im Liquor höhere Konzentrationen von HLA-DR, CD86, CD80 und CD40 auf als cDCs in korrespondierenden Blutproben [69]. Bei MS-Patient\*innen wurden neben dem Nachweis von DCs in Liquor, Meningen und ZNS-Läsionen auch zahlreiche phänotypische und funktionelle Besonderheiten beobachtet, die von der DC-Untergruppe und dem MS-Subtyp abhängen [67]. Beispielsweise sekretierten dendritische Zellen von Patient\*innen mit MS im Vergleich zu Gesunden höhere Mengen proinflammatorischer Zytokine wie IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  und IL-6 [70]. Patient\*innen

mit SPMS wiesen im Vergleich zu Patient\*innen mit RRMS oder gesunden Kontrollen höhere Anteile von DCs mit CD80-Expression, geringere Anteile von DCs mit PD-L1-Expression und höheren Anteile von DCs mit IL-12- und TNF- $\alpha$ -Produktion auf, wobei der Anteil der DCs mit CD40-Expression unabhängig vom Krankheitsverlauf im Vergleich zu gesunden Kontrollen erhöht war [71]. Bezüglich ihrer Polarisationswirkung auf naive T-Zellen induzierten DCs bei RRMS im Vergleich zu Kontrollen höhere Mengen an T<sub>H</sub>1- (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ) und T<sub>H</sub>2-Zytokinen (IL-4, IL-13), lösten bei SPMS jedoch nur eine T<sub>H</sub>1-Reaktion aus [71].

Verlaufsmodifizierende MS-Therapeutika sind in der Lage, die Zytokin- und Chemokinproduktion von dendritischen Zellen zu beeinflussen. In den Überständen humaner Monozyten-abgeleiteter DC-Kulturen fanden sich nach ihrer Behandlung mit Laquinimod im Vergleich zu Kontroll-Kulturen geringere Konzentrationen der proinflammatorischen Zytokine TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$ , während die IL-6-Sekretion unbeeinflusst blieb [72]. Gleichzeitig wiesen die Laquinimod-behandelten Überständen auch geringere Mengen des immunregulatorischen Zytokins IL-10 auf, während die Chemokine CCL3 (MIP-1 $\alpha$ ), CCL4 (MIP-1 $\beta$ ) und CXCL9 (MIG) im Vergleich zu den unbehandelten Monozyten-abgeleiteten DC-Kulturen reduziert waren [72]. Ähnliche Ergebnisse erbrachten *In-vitro*-Experimente mit Cladribin-behandelten DCs [73].

Auch Monozyten, die durch den Oberflächenmarker CD14<sup>+</sup> gekennzeichnet sind, durch Wachstumsfaktoren wie GM-CSF stimuliert werden und im Gewebe zu Makrophagen sowie teilweise zu dendritischen Zellen differenzieren, sind in der Immunpathogenese der MS von Bedeutung. ZNS-infiltrierende Monozyten konnten unter den myeloischen Zellen als der pathogene GM-CSF-responsive Zelltyp identifiziert werden, der in der EAE zur Gewebe-Inflammation führt [74]. Eine Blockade der Monozyten-Infiltration führte umgekehrt zu einer Verhinderung des Fortschreitens der EAE [75]. Bei MS-Erkrankten zeigten sich immunhistochemisch antigenpräsentierende und costimulatorische Moleküle wie MHC-II (HLA-DR), CD163 und teilweise auch CD80 und CD86 auf perivaskulären Makrophagen im entzündeten ZNS-Gewebe hochreguliert [76]. Zur Zytokinproduktion und Expression von Oberflächenmolekülen bei peripheren Monozyten von MS-Patient\*innen existieren recht heterogene Erkenntnisse. Nach Kouwenhoven *et al.* sekretierten aus dem peripheren Blut von MS-Patient\*innen gewonnene Monozyten im Vergleich zu Kontrollen mehr IL-6 und IL-12, während sich keine Unterschiede bei der Sekretion von IL-10 und TNF- $\alpha$  zeigten [77]. Durchflusszytometrisch wiesen Monozyten

derselben Patient\*innen im Vergleich zu Gesunden höhere Expressionen des costimulatorischen Oberflächenmoleküls CD86 auf, wobei sich die Expression von HLA-DR – jeweils bezogen auf die *mean fluorescence intensity* (MFI) – nicht unterschied [77]. Imamura *et al.* bestimmten die Zytokine TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und IL-6 in den Überständen von Monozyten/Makrophagen, die mittels Dichtegradientenzentrifugation aus dem peripheren Blut isoliert wurden und über Adhärenz an der Petrischale aufgereinigt wurden. Während eines klinischen Schub-Ereignisses waren alle betrachteten Zytokine in den Überständen nach LPS-Stimulation im Vergleich zu Gesunden und Patient\*innen mit anderen neurologischen Erkrankungen erhöht und normalisierten sich zum Folgezeitpunkt bei Remission wieder auf das Niveau der Kontrollen. Allerdings zeigten sich ohne Stimulation bei den untersuchten Monozyten keine Veränderungen in der Zytokinproduktion [78]. Ransohoff *et al.* berichteten unerwarteter Weise sogar von einer Herunterregulierung von HLA-DR auf ähnlich gewonnenen Monozyten von MS-Patient\*innen mit aktiver MS, obwohl eine *In-vitro*-Stimulation mittels Interferon- $\gamma$  und LPS die Expression von HLA-DR verstärkte [79].

Die trotz vergleichbarer Methodik unterschiedlichen Ergebnisse bezüglich der Monozyten in MS bestärken die Forderung nach weiteren phänotypischen Untersuchungen, auch unter verlaufsmodifizierender Medikation. So verringerte Interferon-beta die Genexpression von *IL-1 $\beta$*  und sowohl Interferon-beta als auch Fingolimod verringerten die Genexpression von *IL-6*, womit wichtige proinflammatorische Signale des myeloischen Kompartiments abgeschwächt wurden [80]. Auch sezernierten LPS-stimulierte Monozyten von mit Laquinimod behandelten MS-Patient\*innen weniger IL-1 $\beta$ , was auf eine Herabregulierung der *IL-1 $\beta$* -Genexpression zurückzuführen war [81].

Aufgrund pathogener Eigenschaften dendritischer Zellen und Monozyten als wichtige Vertreter der antigenpräsentierenden Zellen erhoffte man sich in der Vergangenheit durch die gezielte Beeinflussung myeloid-spezifischer Zytokine auch Erfolge in der Erschließung neuer Therapien. Die Blockade von IL-12 mit einem Antikörper gegen die p40-Untereinheit von IL-12 und IL-23 (Ustekinumab) erzielte jedoch bei der Erprobung an MS-Patient\*innen keinen Therapieerfolg [82]. Ebenfalls scheiterte eine Placebo-kontrollierte Phase-II-Studie, bei der die mit Lenercept durchgeführte Anti-TNF- $\alpha$ -Therapie sogar zu vermehrten MS-Exazerbationen führte [83]. Das betont die Multidimensionalität der Funktionen myeloischer Zellen und ihrer assoziierten

Zytokine und Chemokine, die in ihrer Mediatorrolle womöglich umweltabhängig entzündungsfördernde und entzündungshemmende Wirkungen vermitteln.

### **2.2.5 Effekte B-Zell-modifizierender MS-Therapien**

Vor dem Hintergrund der Bedeutung der Immunzellen, die an der MS-Pathophysiologie beteiligt sind, stellt sich die Frage, welche Mechanismen zum Erfolg von B-Zell-depletierenden CD20-Antikörper wie Ocrelizumab in der Behandlung der RRMS und der PPMS beitragen. In den Zulassungsstudien reduzierte Ocrelizumab nicht nur die Schubrate und das Auftreten neuer MRT-Läsionen bei RRMS [3], sondern verlangsamte auch die Behinderungsprogression und den Hirnvolumenverlust bei PPMS [4]. Im Vergleich zu Rituximab ist der CD20-Antikörper vollständig humanisiert, was das Risiko unerwünschter Immunreaktionen senken soll. Ocrelizumab eliminiert dabei innerhalb der ersten zwei Wochen nach der ersten Infusion selektiv CD20-exprimierende B-Zellen, einschließlich Prä-B-Zellen, naive B-Zellen und Gedächtnis-B-Zellen [6]. Hämatopoetische Stammzellen und Plasmazellen bleiben unbeeinflusst, da sie entweder keine CD20-Expression aufweisen oder diese während der Differenzierung verlieren [6]. Auch die in geringer Zahl auftretenden CD20-exprimierenden T-Zellen werden effektiv depletiert [7]. Die Depletion der B-Zellen wird dabei über komplementabhängige Zytotoxizität (CDC) und antikörperabhängige zelluläre Zytotoxizität (ADCC) erreicht, wobei bei Ocrelizumab letztere überwiegt [84]. Ob sich dabei auch klinische Unterschiede zwischen Ocrelizumab und Rituximab bezüglich ihrer Effektivität und Nebenwirkungen ableiten, ist neben Beobachtungsstudien unter anderem Gegenstand einer noch laufenden randomisierten Nicht-Unterlegenheitsstudie [85]. Eine Möglichkeit, die Effekte von Ocrelizumab klinisch-experimentell zu untersuchen, besteht darin, die immunologische Situation der B-Zellen von MS-Patient\*innen vor der Therapie mit der im Therapieverlauf zu vergleichen, wie es in dieser Studie durchgeführt wird. So berichten zunehmend auch andere Forschungsgruppen über einen immunologischen „anti-inflammatorischen Shift“ durch Anti-CD20-Therapie. Dabei induzierte Ocrelizumab bei Patient\*innen mit PPMS einen Rückgang der naiven und Memory B-Zellen und führte zu einem deutlichen Anstieg des Anteils der Plasmablasten und der transitionalen B-Zellen [10]. Ocrelizumab bewirkte korrespondierend einen Rückgang des Anteils der TNF- $\alpha$ -produzierenden B-Zellen im Verhältnis zu den gesamten CD19<sup>+</sup> B-Zellen und einen Anstieg des Anteils der IL-10-produzierenden regulatorischen B-Zellen [10]. Rui Li *et al.* beobachteten bei MS-Patient\*innen nach B-Zell-depletierender

Therapie mit Rituximab verringerte proinflammatorische Antworten myeloischer Zellen auf GM-CSF-produzierende B-Zellen [9]. Die verringerte inflammatorische Aktivität, gekennzeichnet durch eine geringere GM-CSF-Produktion und eine erhöhte IL-10-Produktion, persistierte auch noch nach Rekonstitution der B-Zellen [9].

Auch eine Therapie mit dem Basistherapeutikum Interferon-beta führte zu einem Anstieg des Anteils der transitionalen B-Zellen, die sowohl bei Behandelten als auch bei gesunden Kontrollen als potente IL-10-Produzenten identifiziert werden konnten [86]. Ähnliche Effekte zeigten sich unter Therapie mit dem Sphingosin-1-phosphat-Analogen Fingolimod, welches die Auswanderung von Lymphozyten aus lymphatischen Organen ins Blut verhindert [87]. Es existieren also möglicherweise Gruppeneffekte von MS-Therapeutika, die sich über direkte oder indirekte Wirkung auf B-Zellen entfalten und die dysregulierte B-Zell-Immunologie positiv verändern.

Anhand einer klinischen Kohorte von MS-Patient\*innen sollen in dieser Arbeit die Effekte der Ocrelizumab-Behandlung auf den immunologischen Phänotyp im peripheren Blut mit besonderem Fokus auf die repopulierten B-Zellen aufgezeigt werden. Gleichzeitig wird die Produktion von Zytokinen und Chemokinen durch Monozyten und dendritische Zellen während des Therapieverlaufs untersucht, um Veränderungen im myeloischen Kompartiment aufzudecken.

### **2.3 BAFF in Multipler Sklerose**

Der B-Zell-aktivierende Faktor (BAFF) und APRIL (ein proliferationsinduzierender Ligand) sind entscheidende Überlebens- und Wachstumsfaktoren für periphere B-Zellen und Plasmazellen [11]. Deshalb könnten sie insbesondere auch in der MS eine Schlüsselrolle einnehmen. BAFF und APRIL sind strukturell ähnliche Typ-II-Transmembranproteine der Tumornekrosefaktor-Superfamilie und werden von zahlreichen Immunzellen wie Neutrophilen Granulozyten, Monozyten, Makrophagen, dendritischen Zellen, B- und T-Zellen sowie von nicht-hämatopoetischen Stromazellen produziert [11]. BAFF entfaltet seine Wirkung über den BAFF-Rezeptor, TACI und (abgeschwächt) über BCMA; APRIL interagiert dagegen im Vergleich zu BAFF nur über die Rezeptoren TACI und BCMA [11, 88, 89].

Humane Astrozyten (ZNS-residente Gliazellen) konnten *in vivo* ebenfalls als BAFF-Produzenten identifiziert werden und die Transkriptionslevel von BAFF in MS-Läsionen zeigten sich im Vergleich zu gesundem ZNS-Gewebe auf etwa das 10-fache erhöht, etwa ähnlich hoch wie jene in peripherem lymphatischem Gewebe [90]. So diskutierten

Krumbholz *et al.*, dass auch lokal im ZNS produziertes BAFF das Überleben von B-Zellen im ZNS fördern könnte [90], wobei die funktionelle Relevanz einer solchen BAFF-Produktion im ZNS unklar blieb. Die Wirkung von BAFF auf Neurone im ZNS ist in diesem Zusammenhang von Bedeutung, so zeigten spätere präklinische Daten positive Auswirkungen auf das Überleben von Neuronen über BAFF-Rezeptor-Signale [14, 15], was auf neuroprotektive Eigenschaften von BAFF hinweisen könnte.

APRIL scheint ebenfalls eine Rolle im Gehirn von MS-Erkrankten zu spielen, wie Thangarajh *et al.* darlegen. Die Expression von APRIL zeigte sich in ihrer immunhistochemischen Untersuchung bei MS-Patient\*innen und Kontrollpersonen zytoplasmatisch und körnig und war auf GFAP-positive Astrozyten beschränkt, wobei die Zahl der APRIL-positiven Zellen im Gehirn MS-Erkrankter erhöht war [91]. Baert *et al.* fanden APRIL auch in EAE-Läsionen, wobei sich die Krankheit in der Abwesenheit von APRIL im Knockout-Modell verschlimmerte [92]. Bei MS-Patient\*innen zeigten sie eine APRIL-Expression im Zusammenhang mit der Infiltration von Makrophagen, wobei die APRIL-Sekretion spezifisch auf Astrozyten zielte, worauf diese mit einer IL-10-Produktion reagierten [92]. Die Autor\*innen folgerten, dass APRIL (im Gegensatz zu BAFF) eine antiinflammatorische Antwort von Astrozyten in MS-Läsionen vermittelt [92].

BAFF-transgene Mäuse wiesen durch die Überexpression von BAFF eine stark erhöhte Anzahl reifer B-Zellen und Effektor-T-Zellen auf und entwickelten autoimmunähnliche Manifestationen wie das Vorhandensein hoher Konzentrationen von Rheumafaktoren, zirkulierenden Immunkomplexen, Anti-DNS-Autoantikörpern und Immunglobulin-Ablagerungen in den Nieren, weshalb sich die Frage stellte, ob eine Überexpression von BAFF in der Entstehung von Autoimmunerkrankungen eine Rolle spielen könnte [93]. Passend dazu zeigten sich in Patient\*innen mit SLE und rheumatoider Arthritis leicht erhöhte BAFF-Serum-Konzentrationen im Vergleich zu gesunden Kontrollen [94].

Mithilfe einer genomweiten Assoziationsstudie und unter Verwendung von Fall-Kontroll-Proben aus Sardinien wurde eine Variante im Gen *TNFSF13B*, welches für BAFF kodiert, ermittelt und war sowohl mit MS als auch mit SLE assoziiert [12]. Das Risiko-Allel konnte auch mit einer verstärkten humoralen Immunität durch erhöhte Konzentrationen von löslichem BAFF, B-Zellen und Immunglobulinen sowie mit einer erniedrigten Anzahl von Monozyten in Verbindung gebracht werden [12]. Die B-Zell-

Assoziation ließ sich nicht allein durch einen einzigen B-Zell-Subtyp erklären, es waren mehrerer Subtypen betroffen, allerdings zeigten sich CD24<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup> B-Zellen am stärksten assoziiert [12].

Zunehmende Erkenntnisse über das BAFF/APRIL-System und dessen Rolle in systemischen Autoimmunerkrankungen führte u.a. zur Entwicklung des monoklonalen Anti-BAFF-Antikörpers Belimumab, welcher nach erfolgreicher Phase-III-Studie bei der Behandlung des aktiven SLE eingesetzt werden kann [95]. Auch das Fusionsprotein Atacicept, ein löslicher TACI-Decoy-Rezeptor, der durch Bindung sowohl BAFF als auch APRIL neutralisiert, zeigte in einer abgeschlossenen Phase-II-Studie mit SLE-Patient\*innen vielversprechende Ergebnisse [96]. In einer weiteren, ebenfalls 2011 veröffentlichten Phase-II-Studie senkte Atacicept wie erwünscht die Serumkonzentration der Rheumafaktoren und Immunglobuline IgG, IgA und IgM sowie die Konzentration der zirkulierenden CD27<sup>-</sup> muren B-Zellen und Plasmazellen bei Patient\*innen mit rheumatoider Arthritis und zeigte ein akzeptables Sicherheitsprofil [97].

Trotz guter präklinischer Daten scheiterten jedoch zwei Phase-II-Studien zur Anwendung von Atacicept bei der Multiplen Sklerose. In der Studie „ATAcicept in MS“ (ATAMS) kam es zu einer erhöhten annualisierten Schubrate, wobei diese unerwartete Zunahme der Entzündungsaktivität zu einem vorzeitigen Abbruch der Studie führte [98]. Die gleichzeitig durchgeführte Studie „ATAcicept in Opticus Neuritis“ (ATON) wurde aufgrund der beobachteten Verschlimmerung der Krankheitsaktivität in ATAMS gestoppt, in ATON entwickelten Patient\*innen der Verumgruppe zu einem höheren Anteil eine definitive MS [99]. Eine erst kürzlich begonnene Studie zur Kombination von Belimumab und B-Zell-Depletion mittels Ocrelizumab bei Patient\*innen mit RRMS wurde aufgrund eingestellter Finanzierung beendet (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT04767698).

Doch warum scheitern Ansätze der gezielten Beeinflussung des BAFF/April-Systems trotz des inzwischen besseren Verständnisses für die B-Zell-Mechanismen in MS? Eine mögliche Theorie für das Scheitern der Studien zu Atacicept liegt darin begründet, dass Atacicept zwar naive B-Zellen, Plasmazellen und im Blut zirkulierende Immunglobuline reduziert, aber auch das Überleben IL-10 produzierender regulatorischer B-Zellen wie transitorischer B-Zellen verringert, gleichzeitig jedoch geringeren Einfluss auf die eher proinflammatorischen Memory B-Zellen nimmt [100].

In Atacicept-Studien wurde in allen Behandlungsgruppen ein vorübergehender Anstieg der absoluten Zahl der Memory B-Zellen beobachtet [97]. Auch wird nicht ausreichend deutlich, inwiefern Atacicept das Liquorkompartiment und ZNS erreicht, um möglicherweise erwünschte Wirkungen in kompartimentierten inflammatorischen Nischen zu entfalten oder aber neuroprotektive Effekte von BAFF unterdrückt, was unerwünschte Wirkungen im ZNS erklären könnte. Möglicherweise führt aber auch die kombinierte Blockade von BAFF und APRIL durch Atacicept zu einer Aufhebung potentiell protektiver Wirkungen von APRIL im ZNS [92]. Andererseits waren Mäuse, die BAFF überexprimierten (BAFF-Tg<sup>+/+</sup>), resistent gegenüber einer EAE-Induktion und Mäuse, denen TACI fehlte (*Tnfrsf13b*<sup>-/-</sup>), wiesen im Vergleich zu Wildtyp-Kontrollen eine exazerbierte EAE auf, was zusammengenommen eher für eine Aufhebung protektiver BAFF-Wirkungen durch Atacicept sprechen könnte [101].

Die Betrachtung von BAFF-Konzentrationen während MS-Therapien wirft ebenfalls ein etwas anderes Licht auf die Rolle von BAFF, die zunächst als eher pathologisch angesehen wurde. Es zeichnet sich ab, dass bestimmte Therapien mit einer Erhöhung der BAFF-Konzentration im Serum einhergehen [102]. Inwiefern die BAFF-Konzentrationen von behandlungs-naiven MS-Patient\*innen in Serum und Liquor gegenüber Gesunden verändert sind, wird in der Literatur allerdings kontrovers diskutiert. Während Kannel *et al.* erhöhte BAFF-Konzentrationen auch in unbehandelten MS-Patient\*innen gegenüber gesunder Kontrollen fanden [102], konnten Piazza *et al.* sowohl für die Serum- als auch für die Liquor-Konzentrationen von BAFF und APRIL keine Unterschiede zwischen unbehandelten MS-Patient\*innen und Gesundkontrollen berichten [103]. In der Studie von Krumbholz *et al.* zeigte sich BAFF bei behandlungs-naiven Patient\*innen ebenfalls unbeeinflusst, jedoch erhöhte auch hier die Behandlung mit Interferon-beta die BAFF-Konzentration im Serum von MS-Patient\*innen [13].

Anhand einer klinischen Kohorte von MS-Patient\*innen soll in dieser Arbeit die Kinetik von BAFF im Rahmen der B-Zell-Depletion im Therapieverlauf beschrieben und Zusammenhänge zur Zusammensetzung der B-Zellen im peripheren Blut hergestellt werden.

## 2.4 Ziel der Arbeit

Die Relevanz von Medikamenten zur B-Zell-Depletion in der Therapie der Multiplen Sklerose ist mit der Einführung von Ocrelizumab in den letzten Jahren weiter gestiegen. Die klinischen Wirkmechanismen von Ocrelizumab sind dabei weiterhin nicht hinreichend bekannt, wobei die veränderte Funktion der B-Zellen im Zusammenspiel mit dem myeloischen Kompartiment sowie dem B-Zell-aktivierenden Faktor BAFF hierbei eine wichtige Rolle spielen könnte.

Die vorliegende Arbeit widmet sich deshalb anhand einer klinischen Kohorte den folgenden Fragen:

- Wie stellt sich die Serum-Konzentration von BAFF im Therapieverlauf mit Ocrelizumab dar?
- Wie verändert sich die Zusammensetzung der B-Zell-Untergruppen im peripheren Blut nach Therapiebeginn?
- Unterscheiden sich im peripheren Blut zirkulierende Monozyten und dendritische Zellen phänotypisch im Verlauf der Ocrelizumab-Therapie bzw. im Vergleich zu Gesunden?

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Materialliste

#### Chemikalien, Puffer, Kulturmedien

| Medium  | Inhalt/Firma   |
|---|--|
| Albumin bovine, cell culture grade (BSA)                        | Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg (DE)          |
| Albumin human (AB)  | Sigma-Aldrich Corp., St. Louis (USA)                 |
| Ficoll® Paque Plus  | GE Healthcare, Chicago (USA)                         |
| HEPES   | Life Technologies Corp., Grand Island (USA)          |
| Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640                     | Gibco™, Thermo Fisher Scientific Inc., Schwerte (DE) |
| Phosphat-buffered saline (PBS) (mit und ohne zweiwertige Ionen) | Gibco™, Thermo Fisher Scientific Inc., Schwerte (DE) |

## Material und Methoden

|   |   |
|---|---|
| Dimethylsulfoxid (DMSO)   | Sigma-Aldrich Corp., St Louis (USA)                                 |
| EDTA Lösung (0,5 M)   | Sigma-Aldrich Corp., St Louis (USA)                                 |
| L-Glutamine (200 mM)  | Sigma-Aldrich Corp., St Louis (USA)                                 |
| Penicillin/Streptomycin (P/S) (10,000 Einheiten Penicillin und 10 mg Streptomycin pro ml) | Sigma-Aldrich Corp., St Louis (USA)                                 |
| X-VIVO 15 (serum-free hematopoietic cell medium)  | Lonza Group AG, Basel (Schweiz)                                     |
| Brefeldin A-Stocksolution (5mg/ml)  | Sigma-Aldrich Corp., St Louis (USA)                                 |
| Ionomycin-Stocksolution   | Sigma-Aldrich Corp., St Louis (USA)                                 |
| Paraformaldehyd (PFA) (2%ige Lösung)  | Carl Roth, Karlsruhe (DE)   |
| Saponin-Puffer  | Sigma-Aldrich Corp., St Louis (USA)                                 |
| Aqua, destilliert   | B. Braun, Melsungen (DE)  |
| Lipopolysaccharid (LPS)   | Enzo Life Sciences, Lausen (Schweiz)                                |
| FACS Buffer   | 0,5 % BSA<br>in PBS   |
| MACS Buffer   | 0,5 % BSA<br>0,5 M EDTA<br>in PBS                                   |
| AB-Kulturmedium   | 5% AB-Serum<br>1% L-Glutamin<br>1% P/S<br>in RPMI-Medium + 1% HEPES |
| Einfriermedium  | Einfriermedium (human) + 10%<br>Dimethylsulfoxid (DMSO)             |

## Kits

| Produkt  | Firma                                   |
|--|---|
| CD1c (BDCA-1) <sup>+</sup> Dendritic Cell Isolation Kit, human | Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach (DE) |
| CD14 MicroBeads, human   | Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach (DE) |

|   |                                |
|---|--------------------------------|
| LEGENDplex™ Custom Human 8-plex Panel (V-Bottom) [IL-1β, CCL2 (MCP-1), IL-10, IL-6, TNF-α, CCL3 (MIP-1α), CXCL9 (MIG), CCL4 (MIP-1β)] | BioLegend, San Diego (USA)     |
| Human BAFF/BLyS/TNFSF13B Quantikine ELISA Kit (DBLYS0B)   | R&D systems, Minneapolis (USA) |

### Antikörper

| Antikörper                            | Firma  |
|---------------------------------------|--|
| Propidium iodide (PI)                 | Sigma-Aldrich Corp., St Louis (USA)          |
| CD1c (BDCA-1)-FITC, anti-human        | Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach (DE)      |
| CD19-PE, anti-human                   | BioLegend, San Diego (USA)                   |
| CD14-APC, anti-human                  | BioLegend, San Diego (USA)                   |
| CD11c-APC, anti-human                 | BioLegend, San Diego (USA)                   |
| CD86-PE, anti-human                   | BioLegend, San Diego (USA)                   |
| HLA-DR-V450, anti-human               | BD Biosciences, Franklin Lakes (USA)         |
| CD19-FITC, anti-human                 | BioLegend, San Diego (USA)                   |
| CD3-AF700, anti-human                 | BioLegend, San Diego (USA)                   |
| IgD-PE, anti-human                    | BioLegend, San Diego (USA)                   |
| CD27-PE-Cy7, anti-human               | BioLegend, San Diego (USA)                   |
| CD38-APC, anti-human                  | BioLegend, San Diego (USA)                   |
| CD24-BV421, anti-human                | BioLegend, San Diego (USA)                   |
| IL-10 PE-Cy7, anti-human              | BioLegend, San Diego (USA)                   |
| GM-CSF PE, anti-human                 | BioLegend, San Diego (USA)                   |
| Fc-Block, human                       | BD Biosciences, Franklin Lakes (USA)         |
| Ultracomp eBeads™ Kompensations-Beads | Thermo Fisher Scientific Inc., Schwerte (DE) |

### Laborgeräte, Laborzubehör

|                                      |                                      |
|--------------------------------------|--------------------------------------|
| BD FACSCanto™ II                     | BD Biosciences, Franklin Lakes (USA) |
| Tecan Infinite® 200 PRO Platerreader | Tecan Trading AG (Schweiz)           |

|  |  |
|--|--|
| Plattenschüttler                                   | VWR International, LLC                                 |
| Zentrifugen  | Heraeus™, Thermo Fisher Scientific Inc., Schwerte (DE) |
| Greiner Bio-One 96-Well-Rundbodenplatte (U-Bottom) | Thermo Fisher Scientific Inc., Schwerte (DE)           |
| Greiner Bio-One 48-Well-Flachbodenplatte           | Thermo Fisher Scientific Inc., Schwerte (DE)           |
| Eppendorf Safe-Lock Tubes 1,5/2,0 ml               | Eppendorf SE, Hamburg (DE)                             |
| Pipetten 10-1000 µl                                | Eppendorf SE, Hamburg (DE)                             |
| Pipettenspitzen                                    | STARLAB TipOne®  |
| Falcon Röhrchen 15 & 50 ml                         | Greiner Bio-One™                                       |
| S-Monovette® braun (Serum-Gel) 7,5 ml              | SARSTEDT, Nümbrecht (DE)                               |
| S-Monovette® rot (EDTA) 9 ml                       | SARSTEDT, Nümbrecht (DE)                               |

### 3.2 Gewinnung und Aufbereitung des humanen Bluts

Venöses Blut wird nach schriftlicher informierter Einwilligung bei unbehandelten und mit Ocrelizumab behandelten Patient\*innen sowie gesunden Kontrollen unter Beachtung der Vorgaben des lokalen Ethikkomitees in vier bis sechs großen EDTA-Röhrchen und zwei Serumröhrchen entnommen. Die Ocrelizumab-Gabe erfolgte im Rahmen der geplanten Therapie gemäß Fachinformation [104] mit einer geteilten Initialdosis von 2 x 300 mg i.v. im Abstand von zwei Wochen (hier als Erst- und Zweitgabe bezeichnet), gefolgt von Einmalinfusionen zu 600 mg im Abstand von sechs Monaten. Die Studien-Blutentnahme findet zusammen mit den klinisch durchgeführten Routine-Blutentnahmen statt, insbesondere also unmittelbar vor, sowie zwei Wochen, drei Monate, und sechs Monate nach Erstgabe von Ocrelizumab. Die Serum-Röhrchen werden bei Raumtemperatur 10 Minuten bei 2500 rpm zentrifugiert und das gewonnene Serum bei -80 °C weggefroren. Das EDTA-Blut wird zur Gewinnung von peripheren mononukleären Zellen (PBMCs) auf Ficoll-Paque (GE Healthcare) aufgegossen und mittels Dichtegradientenzentrifugation aufgetrennt. Die PBMCs werden zum einen Teil zur Isolierung der DCs und Monozyten sofort weiterverarbeitet und zusätzlich zur späteren gleichzeitigen Charakterisierung der B-Zellen zu je 10 Millionen unter Verwendung von 10%iger DMSO-Lösung in humanem Einfriermedium in Polypropylen-Röhrchen überführt und bei -80 °C in Stickstofftanks gelagert.

### **3.3 Isolation von dendritischen Zellen und Monozyten aus PBMCs**

Die Isolation der myeloiden dendritischen Zellen und Monozyten erfolgt mithilfe von Magnetic Activated Cell Sorting (magnetische Zellsortierung, MACS), bei welchem Zelloberflächenmarker mittels sogenannter MicroBeads (antikörpergebundene Magnetpartikel) markiert werden. Die Auftrennung der Zellen erfolgt bei Durchfluss einer Säule, die von einem Magneten umgeben ist, sodass nach Entfernen des Magneten die Säule gespült werden kann. Beim sogenannten „Positiv-Sort“ interessiert man sich für die Antikörper-markierte und somit für die in der Säule befindliche Zellpopulation. Im Gegensatz dazu möchte man sich bei einem „Negativ-Sort“ die nicht durch Magnet-Antikörper markierten Zellen auffangen, die die Magnetsäule unmittelbar passieren. Zur Gewinnung der dendritischen Zellen kommt das humane BDCA-1<sup>+</sup> Dendritic Cell Isolation Kit (Miltenyi Biotec) zum Einsatz. Im ersten Sortierschritt erfolgt eine Inkubation mit CD19-Microbeads, BDCA-1-Biotin und einer FcR-Blocking Solution zur Negativ-Sortierung der CD19<sup>+</sup> Zellen (B-Zellen). Die verbleibende CD19-negative Zelllösung wird mit Anti-Biotin-Microbeads inkubiert und für den zweiten Sortierschritt auf die Magnetsäule gegeben. Im Sinne der nun erwünschten Positiv-Sortierung werden die in der Säule befindlichen BDCA-1<sup>+</sup> Zellen (dendritische Zellen) ohne Magneten ausgewaschen und aufbewahrt. Im dritten Sortierschritt erfolgt analog eine Inkubation der CD19-negativen Zelllösung mittels humaner CD14 MicroBeads (Miltenyi Biotec). In einer Positiv-Sortierung werden so die in der Magnetsäule befindlichen CD14<sup>+</sup> Zellen (Monozyten) gewonnen und aufbewahrt. Die so isolierten Monozyten und dendritischen Zellen werden jeweils beim Auswaschen aus der Säule in humanem AB-Kultur-Medium gelöst. Die Oberflächenexpression und die Reinheit der physisch getrennten Zellpopulationen wird unmittelbar durchflusszytometrisch erfasst (vgl. *Abschnitt 3.5*).

### **3.4 Kultivierung von dendritischen Zellen und Monozyten**

Die BDCA-1<sup>+</sup> dendritischen Zellen werden in 96-Wellrundbodenplatten zu je 200 µl (200.000 Zellen/ml) ausplattiert. Die CD14<sup>+</sup> Monozyten werden in 48-Wellplatten zu je 500 µl (2 Mio. Zellen/ml) ausplattiert. Die Hälfte der Wells wird jeweils mit Lipopolysaccharid (LPS, 1:1000) stimuliert. Die Zellen werden 24 Stunden bei 37 °C inkubiert und die Überstände bei -80 °C bis zur Durchführung der Zytokin- und Chemokin-Messung eingefroren (vgl. *Abschnitt 3.6*).

### 3.5 Analyse der Expression von Oberflächenmolekülen auf dendritischen Zellen und Monozyten mittels FACS

Zur durchflusszytometrischen Charakterisierung der zu kultivierenden Monozyten und dendritischen Zellen (DCs) erfolgt eine Oberflächenfärbung der isolierten PBMCs, der sortierten CD14<sup>+</sup> Monozyten und BDCA-1<sup>+</sup> dendritischen Zellen. Der Anteil der CD14<sup>+</sup> bzw. BDCA-1<sup>+</sup> Zellen an den durch MACS isolierten Zellen (= Reinheit) wird durchflusszytometrisch ermittelt (MACS-Check). Ebenso wird die Oberflächenexpression von HLA-DR (MHC-II) und CD86 der sortierten Monozyten und DCs quantifiziert. Dabei kommen neben PI zur Lebend-Tod-Färbung folgende Fluorochrom-konjugierten Antikörper zur Anwendung:

MACS-Check: BDCA-1-FITC, CD19-PE, CD14-APC

DC-Panel: BDCA-1-FITC, CD11c-APC, CD86-PE, HLA-DR-V450

Monozyten-Panel: CD14-APC, CD86-PE, HLA-DR-V450

Zusätzlich wird der Anteil der BDCA-1<sup>+</sup> DCs und CD14<sup>+</sup> Monozyten an den PBMCs mithilfe der jeweils gemessenen Reinheit über folgende Formeln approximiert:

$$\frac{\text{Monozyten}}{\text{PBMCs}} = \frac{\text{Anzahl Zellen nach CD14 Sort} \times \text{Reinheit CD14 (\%)}}{\text{Anzahl gewonnener PBMCs}}$$

$$\frac{\text{DCs}}{\text{PBMCs}} = \frac{\text{Anzahl Zellen nach BDCA1 Sort} \times \text{Reinheit BDCA1 (\%)}}{\text{Anzahl gewonnener PBMCs}}$$

### 3.6 Nachweis von Zytokinen und Chemokinen in Kulturüberständen mittels LEGENDplex™ Multiplex Bead Assay

Zur quantitativen Messung der produzierten Zytokine und Chemokine in den Kulturüberständen der isolierten Monozyten und dendritischen Zellen erfolgt die Durchführung eines LEGENDplex™ Assays (BioLegend), wie im folgenden Abschnitt und in *Abbildung 1* zusammengefasst [105]:

Beim eingesetzten LEGENDplex™ Multiplex Bead Assay handelt es sich um einen beadbasierten Immunoassay, bei dem ein löslicher Analyt zwischen zwei Antikörpern eingefangen wird. Die Bead-Populationen sind in zwei Größen und mit unterschiedlichen APC-Fluoreszenzwerten vorhanden, so dass sie anschließend durchflusszytometrisch klar voneinander zu unterscheiden sind. Jedes Bead-Set ist auf der Oberfläche mit einem spezifischen Antikörper konjugiert und dient als Capture-Bead für den jeweiligen Analyten (1). Die folgenden Analyten werden hierbei im Panel

eingesetzt und nach den Vorgaben des Herstellers mit den entsprechenden Überständen inkubiert: IL-1 $\beta$ , CCL2 (MCP-1), IL-10, IL-6, TNF- $\alpha$ , CCL3 (MIP-1  $\alpha$ ), CXCL9 (MIG), CCL4 (MIP-1 $\beta$ ). AB-Medium dient als Negativ-Kontrolle.

Nach dem Waschen werden biotinylierte Detektionsantikörper zugegeben. Jeder Detektionsantikörper bindet an den spezifischen Analyten, der an die Capture Beads gebunden ist, so dass Sandwiches aus Capture Beads, Analyten und Detektionsantikörpern entstehen. Anschließend wird Streptavidin-Phycoerythrin (SA-PE) zugegeben, das an die biotinylierten Detektionsantikörper bindet und ein Fluoreszenzsignal mit einer Intensität proportional zur Menge des gebundenen Analyten liefert (2). Mittels Durchflusszytometrie lässt sich für jede Bead-Population, die sich jeweils auf der APC-Achse abgrenzen lässt, die Fluoreszenzintensität des PE-Signals quantifizieren (3). Die Konzentration eines bestimmten Analyten wird auf der Grundlage einer aus der Standardreihe erstellten Standardkurve (5PL-Kurve) mit der LEGENDplex™-Datenanalysesoftware bestimmt (4).

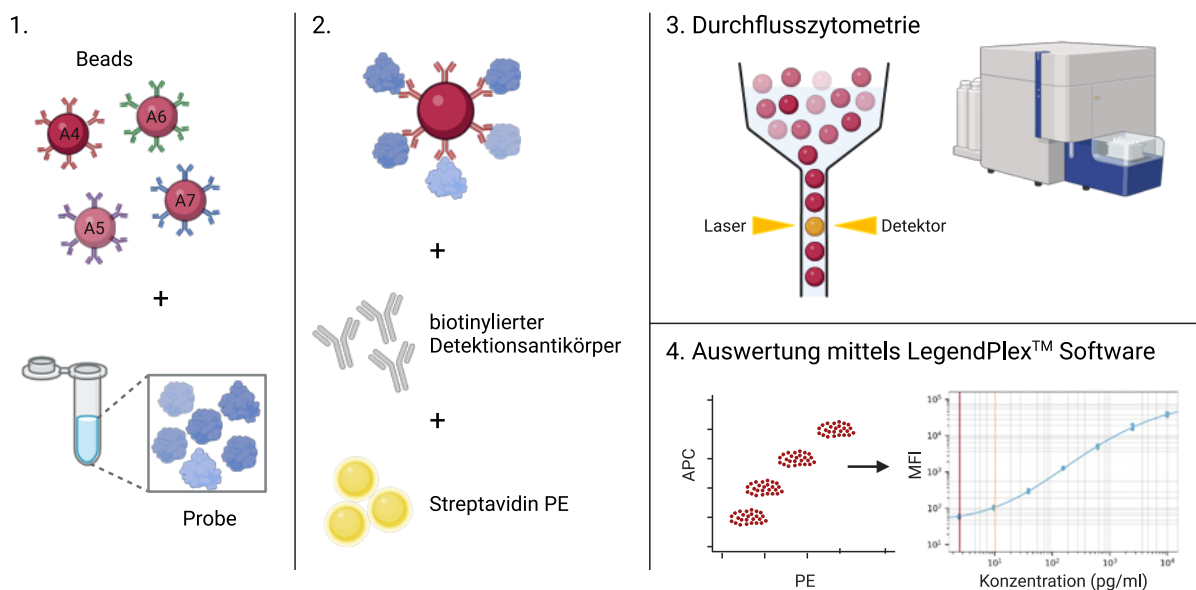


Abbildung 1: Prinzip des LEGENDplex™ Assays. Erstellt mit BioRender.com nach [105].

### 3.7 Oberflächen- und intrazelluläre Charakterisierung von B-Zellen

Zur durchflusszytometrischen Charakterisierung der B-Zellen werden PBMCs der Patient\*innen vor und sechs Monate nach Therapiestart gesammelt und bei -80 °C gelagert. Nach vorsichtigem Auftauen werden pro Patient\*in je 1 Mio. Zellen für eine sofortige Oberflächenfärbung der B-Zellen sowie ungefärbten Kontrollen verwendet.

## Material und Methoden

Folgende Fluorochrom-konjugierte Antikörper (BD Bioscience) kommen für das B-Zell Oberflächen-Panel zum Einsatz: CD19-FITC, CD3-AF700, IgD-PE, CD27-PE-Cy7, CD38-APC, CD24-BV421, Propidium-Iodid (PI) zur Lebend-Tot-Färbung.

Für die intrazelluläre Zytokin Färbung (ICS) werden die restlichen Zellen zu je 0,5 Mio. Zellen pro Well in einer 96-well U-bottom-plate ausplattiert. Zur stimulierten Kondition wird 100 µl eines Aktivierungs-Cocktails (1 ml X-vivo, 8 µl PMA-Stocksolution, 2 µl Ionomycin-Stocksolution, 5,2 µl Brefeldin A-Stocksolution (5mg/ml)) gegeben. Zur ungefärbten und unstimulierten Kondition werden ausschließlich 100 µl X-vivo hinzugefügt. Die Platte wird 4 h bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Anschließend erfolgt eine Lebend-Tot-Färbung in APC sowie eine Oberflächenfärbung mit CD3 AF700 und CD19 FITC. Nach 20-minütiger Fixation mit 2%iger PFA-Lösung und Permeabilisierung mittels Saponin-Puffer erfolgt eine FC-Blockierung und eine Intrazellulärfärbung mit GM-CSF PE und IL-10 PE-Cy7. Die gefärbten Proben werden in FACS-Röhrchen überführt und unmittelbar mittels Durchflusszytometrie vermessen (BD FACSCanto™ II). Eine Verwendung von Ultracomp eBeads™ dient der Kompensationskontrolle. Die Analyse der Zell Subsets erfolgt mit der Software FlowJo™. *Abbildung 2* illustriert das zur Auswertung verwendete Gating-Schema.

Neben der durchflusszytometrischen Erhebung der relativen B-Zell-Anteile erfolgt die Berechnung der absoluten Zellkonzentrationen im Blut mithilfe zeitgleich im Zentrallabor bestimmter Leukozyten- und Lymphozytenzahlen. Die absolute Zahl der B-Zellen pro µl Blut ergibt sich mithilfe folgender Rechnung:

$$\text{Lymphozyten } (/ \mu\text{l}) = \text{Leukozyten } (/ \mu\text{l}) \times \text{Anteil Lymphozyten } (\%)$$

$$\text{B-Zellen } (/ \mu\text{l}) = \text{Lymphozyten } (/ \mu\text{l}) \times \text{Anteil B-Zellen } (\%)$$

Analog können die absoluten Zahlen der B-Zell-Untergruppen bestimmt werden.

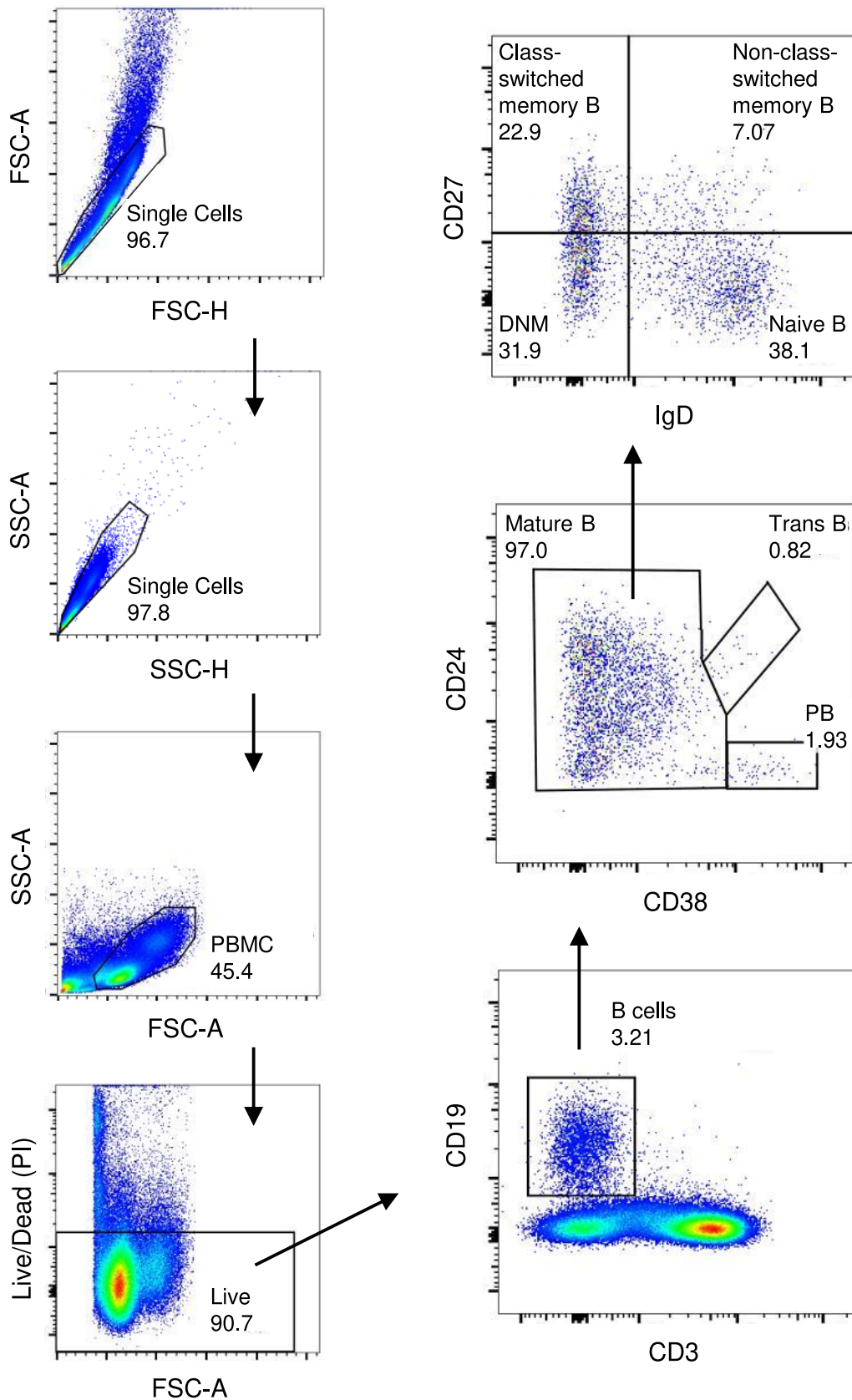


Abbildung 2: Gating Schema für die FACS-Analyse der B-Zell-Subgruppen nach Oberflächenfärbung. B-Zell-Untergruppen: Mature B-Zellen, Transitionale B-Zellen (Trans B), Plasmablasten (PB), Naive B-Zellen, Non-class-switched memory B-Zellen, Class-switched memory B-Zellen, Double-negative memory B-Zellen (DNM).

### 3.8 ELISA zur Bestimmung von BAFF-Konzentrationen im Serum

Serum-Proben von Patient\*innen vor und nach Ocrelizumab-Therapie werden zu den Zeitpunkten 0 Tage, 14 Tage, 3 Monate, 6 Monate gesammelt, bei 2500 rpm zentrifugiert und bei -80 °C weggefroren. Die Proben werden auf die Konzentration von BAFF mittels des Human BAFF Quantikine ELISA Kit (R&D systems, DBLYS0B) untersucht. Unter Beachtung der Herstellerangaben wird hierfür eine Verdünnungsreihe mit absteigenden BAFF-Konzentrationen zwischen 4000 pg/ml und 31,25 pg/ml erstellt. Die Standards werden dabei als Triplikate, die Proben in einer Verdünnung von 1:2 als Duplikate auf die vorbereitete Assay-Platte pipettiert und für 3 Stunden auf einem Plattenschüttler inkubiert. Es folgen vier Waschschrte und eine anschließende Zugabe des BAFF-Konjugats. Nach weiterer einstündiger Inkubation auf dem Plattenschüttler mit anschließendem Waschschrte erfolgt die Zugabe der Substrat-Lösung und einer Dunkel-Inkubation von 30 Minuten. Nach Zugabe der Stopp-Lösung wird die Platte bei 450 nm mithilfe eines Plattenlesers (Tecan Infinite® 200 PRO) ausgelesen. Die Konzentrationen der Proben werden rechnerisch nach Logarithmierung über eine Standardgerade ermittelt und um den Verdünnungsfaktor 2 korrigiert. Die minimal detektierbare BAFF-Konzentration im Serum wird herstellerseitig mit 6,5 pg/ml angegeben.

### 3.9 Statistische Analyse

Zur Messung der FACS-Proben kommt das von BD Biosciences bereitgestellte Durchflusszytometer-Setup bestehend aus dem FACSCanto™ II und der entsprechenden FACSDiva™ Software zum Einsatz. Zur Analyse der FACS-Daten wird FlowJo™ v10 verwendet. Die statistische und graphische Aufbereitung der Daten erfolgt in IBM® SPSS® Statistics 23, GraphPad PRISM 8 und JASP 0.11. Im Rahmen der deskriptiven Statistik erfolgt die Angabe von Mittelwert, Median, Minimum, Maximum und Standardabweichung. Schätzwerte werden durch Angabe des 95%-Konfidenzintervalls (95% KI) ergänzt. Signifikanztests werden zu einem Signifikanzniveau  $\alpha = 0,05$  durchgeführt. Die Angabe von  $p$ -Werten erfolgt auch unter Verwendung folgender Konvention: \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ ;  $p \geq 0,05$  nicht signifikant (ns). Bei Vergleichen zweier unverbundener Stichproben werden ungepaarte  $t$ -Tests, bei Vergleichen verbundener Stichproben gepaarte  $t$ -Tests verwendet. Als nicht-parametrische Alternative wird der Mann-Whitney- $U$ -Test (unverbundene Stichproben) und der Wilcoxon-Test (verbundene Stichproben) eingesetzt. Bei Vergleichen mehrerer unabhängiger Stichproben erfolgt

die Durchführung einer einfaktoriellen ANOVA bzw. des nicht-parametrischen Kruskal-Wallis-Tests mit anschließenden Mehrfachvergleichen. Die  $p$ -Werte werden wie an entsprechender Stelle angegeben nach Bonferroni korrigiert. Eine Analyse von Korrelationen zweier Messgrößen erfolgt unter Angabe des Pearson's  $r$  bei linearen Beziehungen bzw. bei Annahme beliebig monotoner Zusammenhänge unter Verwendung des Spearman's  $\rho$ .

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Klinische Charakterisierung der Ocrelizumab-Kohorte

Um die Veränderungen der B-Zell-Zusammensetzung und Serum-BAFF-Konzentrationen zu untersuchen, wurden Blutproben von Patient\*innen vor und während der Therapie gesammelt. Die 37 Patient\*innen (18 Frauen und 19 Männer) mit einer MS-Erkrankung (diagnostiziert nach den McDonald Kriterien 2017 [27]) wurden in der Klinik und Poliklinik für Neurologie Mainz im Zeitraum zwischen 2018 und 2019 prospektiv untersucht.

Alle wurden aufgrund einer aktiven MS im Rahmen einer Therapieeskalation wegen schlechter Verträglichkeit und/oder unzureichender Effektivität einer Vortherapie auf Ocrelizumab eingestellt. Mit einer Altersspanne von 20 bis 61 Jahren und einer durchschnittlichen Krankheitsdauer von 7 Jahren vor Therapiebeginn liegt ein breiter Querschnitt eines Behandlungskollektivs vor. Dabei wiesen 30 Patient\*innen eine RRMS und 7 Patient\*innen eine progressive Verlaufsform (PPMS) auf. Von den 37 Patient\*innen waren 5 behandlungs-naiv (ohne Vortherapie), 1 erhielt Glatirameracetat (subkutan), 15 erhielten Fingolimod, Dimethylfumarat oder Teriflunomid (oral), 16 erhielten Natalizumab, Alemtuzumab oder Mitoxantron (intravenös). Die mediane Therapiepause nach Vortherapie betrug 113 Tage (von 34 bis 689). Sowohl Leukozyten- als auch Lymphozytenzahl befanden sich nach dem therapiefreien Intervall laborchemisch im Normbereich. Der Anteil an B-Zellen lag vor der Depletion mit durchschnittlich etwa 13 % der Lymphozyten ebenfalls in einem normwertigen Bereich. *Tabelle 1* stellt die Baseline-Daten vor Behandlungsbeginn in der Übersicht dar.

## Ergebnisse

Tabelle 1: Charakterisierung der Kohorte.

| <b>Klinische Charakterisierung</b>  | <b>N=37</b>     |
|---|-----------------|
| <b>Geschlecht</b> , weiblich (%)  | 18 (48,6 %)     |
| <b>Alter [Jahre]</b> , Median (Min - Max)   | 38 (20 - 61)    |
| <b>EDSS</b> , Median (Min - Max)  | 4,0 (1,0 - 7,0) |
| <b>Zeit seit Erkrankungsbeginn [Jahre]</b> , Mittelwert $\pm$ SD <sup>1</sup>           | 7,1 $\pm$ 6,2   |
| <b>Schub innerhalb der letzten 60 Tage</b> , ja (%)                                     | 2 (5,4 %)       |
| <b>Kontrastmittel-aufnehmende Läsionen</b> , ja (%)                                     | 1 (2,7 %)       |
| <b>Kortikosteroide &lt; 60 Tage vor Probensammlung</b> , ja (%)                         | 4 (10,8 %)      |
| <b>Therapie-freies Intervall [Tage]</b> , Median (Min - Max)                            | 113 (34 - 689)  |
| <b>Gründe für den Wechsel der Vortherapie</b> , n (%)                                   |                 |
| unzureichende Wirksamkeit   | 20 (54,0 %)     |
| unzureichende Verträglichkeit   | 14 (37,8 %)     |
| nicht bekannt   | 5 (13,5 %)      |
| <b>MS-Verlaufsform</b> , n (%)  |                 |
| RRMS  | 30 (81,1 %)     |
| PPMS  | 7 (18,9 %)      |
| <b>Leukozytenzahl [/nl]</b> , Mittelwert $\pm$ SD <sup>1</sup>                          | 6,3 $\pm$ 1,9   |
| <b>Lymphozytenzahl [/nl]</b> , Mittelwert $\pm$ SD <sup>1</sup>                         | 1,6 $\pm$ 0,6   |
| <b>CD19<sup>+</sup> B-Zellen [% der Lymphozyten]</b> , Mittelwert $\pm$ SD <sup>1</sup> | 13,11 $\pm$ 6,5 |
| <b>Oligoklonale Banden im Liquor</b> , positiv %  | 78,9 %          |

<sup>1</sup>SD: Standardabweichung.

Die Untersuchungen zu Monozyten und dendritischen Zellen fanden bei einem Teilkollektiv der oben beschriebenen Patientenkohorte vor (n=4), 2 Wochen (n=6) und 24 Wochen (n=8) nach der ersten Ocrelizumab Gabe statt, wobei eine zufällige Rekrutierung bei Ambulanz-Aufenthalt durchgeführt worden ist. Zusätzlich wurden vier gesunde Spender\*innen (*healthy donors*, HD) als Kontrollen rekrutiert. Aus organisatorischen und personellen Gesichtspunkten fand eine Verblindung erst ab Zeitpunkt der Datenanalyse statt.

## 4.2 B-Zell-Depletion im Verlauf der Ocrelizumab-Therapie

Der Anteil an CD19<sup>+</sup> B-Zellen an den lebenden Lymphozyten wurde vor und zu verschiedenen Zeitpunkten innerhalb der ersten sechs Monate nach der Therapie bestimmt (Abbildung 3). Der B-Zell-Anteil betrug vor Therapiebeginn im Mittel 13,11 % (Min - Max: 3,90 - 25,20 %). Zwei Wochen nach erster Ocrelizumab-Infusion betrug der Anteil der B-Zellen im Mittel noch 0,025 % (Min - Max: 0,00 - 0,05 %), was einer signifikanten, fast vollständigen Depletion entspricht. 12 Wochen nach Therapiebeginn lagen B-Zell-Anteile von 0,055 % (Min - Max: 0,00 - 0,50 %) vor. Nach 24 Wochen stieg der Anteil CD19-positiver Zellen auf 2,09 % (Min - Max: 0,00 - 14,65 %), wobei für die beginnende Repopulation aufgrund größerer Varianz kein Signifikanzniveau erreicht wird. Bei vereinzelt länger nachverfolgten Patient\*innen wiederholte sich erneut die vollständige Depletion nach der nächsten Applikation von Ocrelizumab (nicht gezeigt).

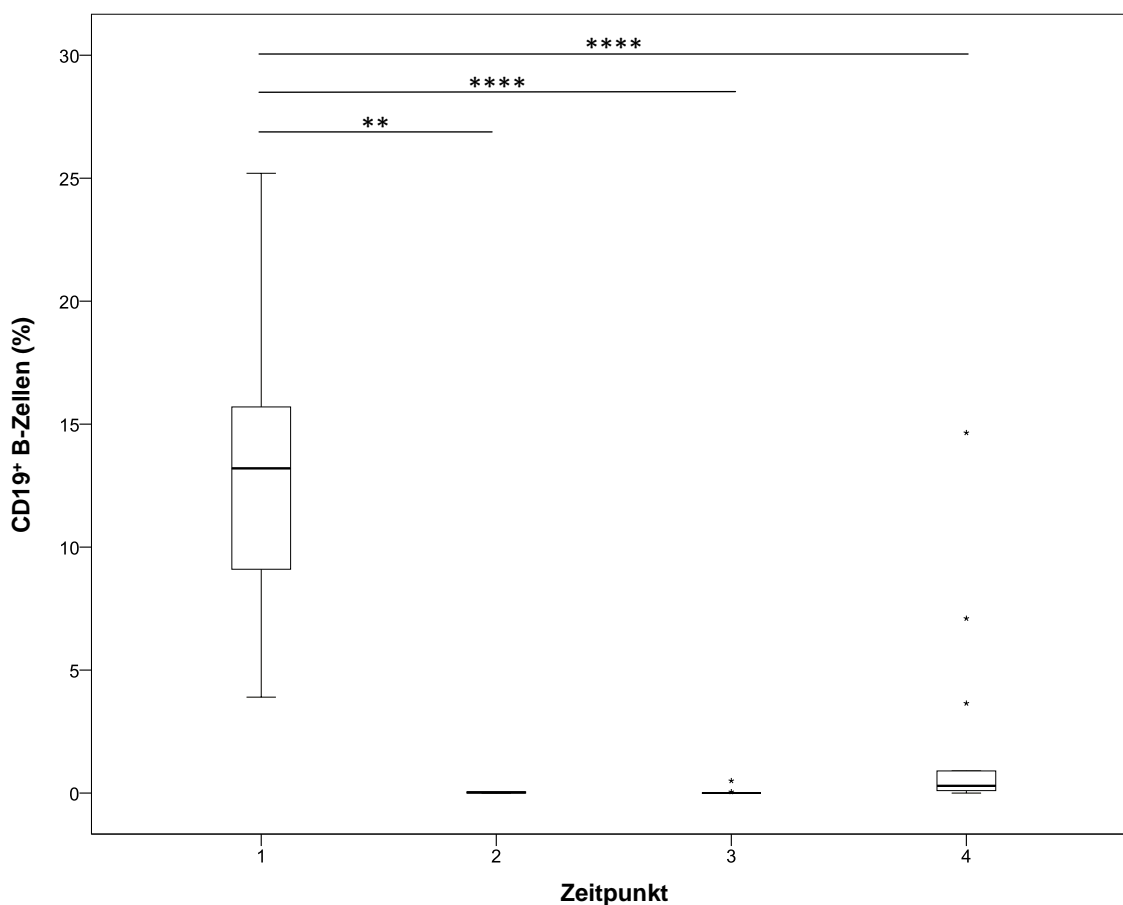


Abbildung 3: B-Zellen in Prozent der lebenden Lymphozyten. Zeitpunkte: 1 = vor erster Gabe (Baseline), 2 = nach 2 Wochen, 3 = nach 12 Wochen, 4 = nach 24 Wochen. One-way-ANOVA, p-Werte Bonferroni-korrigiert. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ .

Während bei manchen Patient\*innen auch nach einem halben Jahr noch keine B-Zellen nachweisbar waren, lag bei einer Patientin bereits ein B-Zell-Anteil von 14,65 % vor. Betrachtet man in diesem Fall den Verlauf, so stellt man auch hier eine vollständige Depletion nach erster Gabe fest, wobei die Patientin vor Therapiestart einen vergleichsweise hohen Anteil von 35 % B-Zellen aufwies.

### **4.3 Serum-BAFF-Konzentrationen im Verlauf der Ocrelizumab-Therapie**

Von 32 Patient\*innen liegen zum Zeitpunkt vor Therapiebeginn BAFF-Messungen im Serum vor. Der Mittelwert der BAFF-Konzentration betrug unmittelbar vor Therapiestart 919,6 pg/ml (95% KI: 800,1 - 1039,1 pg/ml). In der Messung zwei Wochen nach erster Ocrelizumab-Infusion zeigte sich eine Erhöhung der BAFF-Werte auf im Mittel 1971,6 pg/ml (95% KI: 1380,1 - 2562,5 pg/ml). Nach 12 Wochen lagen die BAFF-Werte im Durchschnitt bei 2283,9 pg/ml (95% KI: 1773,43 - 2794,4 pg/ml). Im Vergleich zum Zeitpunkt vor Therapie entspricht das einer signifikanten Zunahme der BAFF-Serum-Konzentration um den Faktor 2,1 nach zwei Wochen bzw. um den Faktor 2,5 nach 12 Wochen (je  $p < 0,001$ ). Nach 24 Wochen nahmen die BAFF-Konzentrationen im Vergleich zum 12-Wochen-Zeitpunkt wieder auf im Mittel 1632,7 pg/ml ab (95 % KI: 1319,3 - 1946,0 pg/ml;  $p = 0,036$ ) (*Abbildung 4*).

## Ergebnisse

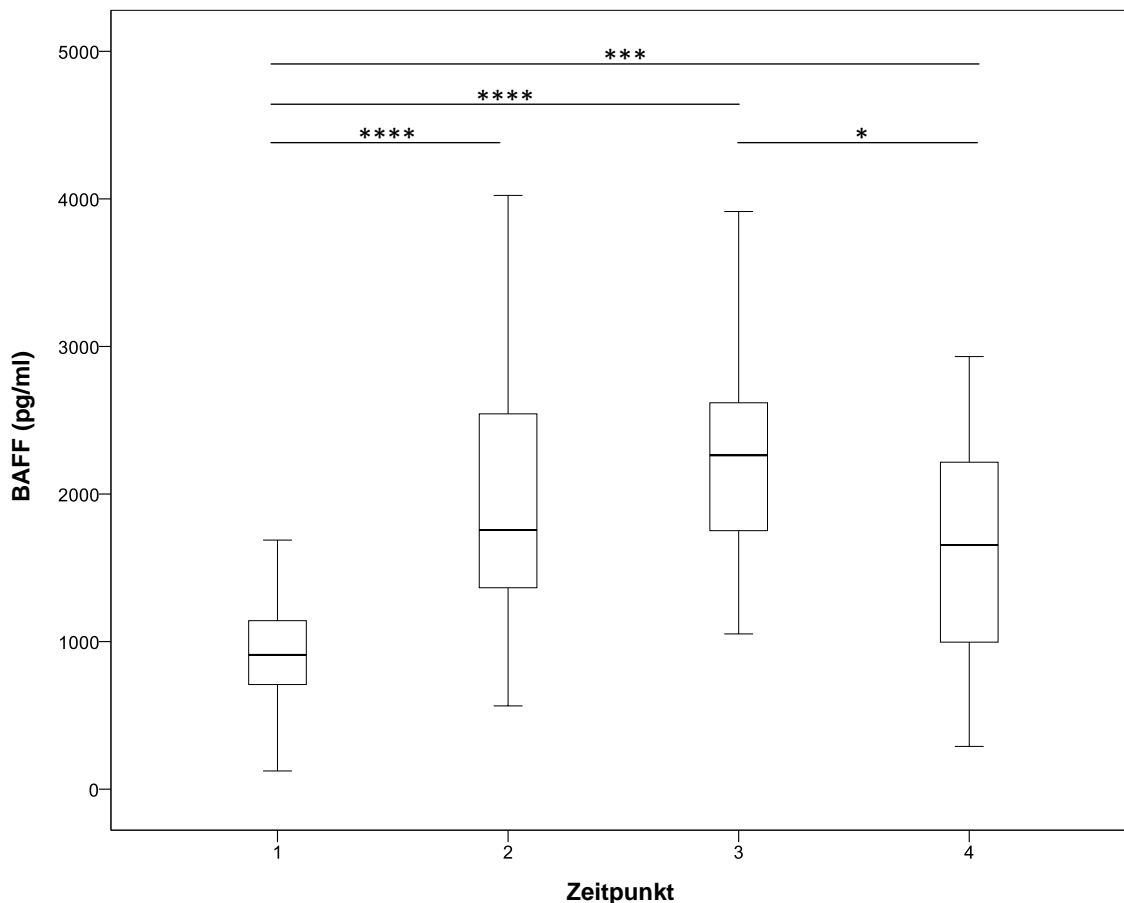


Abbildung 4: Serum-BAFF-Konzentrationen in pg/ml. Zeitpunkte: 1 = vor erster Gabe (Baseline), 2 = nach 2 Wochen, 3 = nach 12 Wochen, 4 = nach 24 Wochen. One-way-ANOVA, *p*-Werte Bonferroni-korrigiert. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ .

Die gepaarten Stichprobenvergleiche zwischen den Zeitpunkten weisen bezüglich des BAFF-Verlaufs ein übereinstimmendes Bild auf (nicht gezeigt).

Für den weiteren Zeitraum zwischen 6 und 12 Monaten (also nach dritter Ocrelizumab-Gabe) lagen für 5 Patient\*innen longitudinale Daten vor. Vergleicht man die Zeitpunkte 6 und 12 Monate stiegen die BAFF-Konzentrationen weiter an (Mittelwerte: 1209,9 pg/ml nach 6 Monaten und 2375,8 pg/ml nach 12 Monaten; gepaarter *t*-Test,  $p = 0,028$ ).

In Bezug auf die untersuchte Kohorte nahmen sowohl das Geschlecht (*t*-Test; ns) als auch das Alter der Patient\*innen keinen relevanten Einfluss auf die Konzentration von BAFF (Pearson Korrelation;  $r = 0,168$ ; ns).

#### 4.4 Charakterisierung der B-Zellen unter Ocrelizumab-Therapie

Die Zusammensetzung der zirkulierenden B-Zellen wurde in 13 Patient\*innen vergleichend vor und 6 Monate nach Ocrelizumab-Therapie durchflusszytometrisch untersucht. Neben den relativen Anteilen der B-Zell-Untergruppen an den CD19<sup>+</sup> B-Zellen wurden die absoluten Konzentrationen der B-Zellen und ihrer Untergruppen unter Berücksichtigung der jeweiligen Leukozyten- und Lymphozytenzahlen pro Mikroliter Blut ermittelt (*Abbildung 5, A-D*).

Während die Leukozytenzahlen unverändert blieben, nahm die Anzahl der Lymphozyten nach 6 Monaten leicht ab ( $p = 0,0006$ ). Die absolute Zahl der gesamten B-Zellen war nach 6 Monaten erniedrigt ( $p < 0,0001$ ). Damit einher gingen verminderte absolute Zahlen der maturen B-Zellen (CD19<sup>+</sup>CD24<sup>+/int</sup>CD38<sup>-/int</sup>) ( $p < 0,0001$ ), während die absoluten Konzentrationen der transitionalen B-Zellen (CD19<sup>+</sup>CD24<sup>high</sup>CD38<sup>high</sup>) und Plasmablasten (CD19<sup>+</sup>CD24<sup>-</sup>CD38<sup>+</sup>) nicht signifikant verringert waren.

Betrachtet man die relativen Anteile, so beobachtet man unter den repopulierten B-Zellen im Vergleich zum Baseline-Zeitpunkt eine Zunahme der transitionalen B-Zellen ( $p = 0,0142$ ). Der Anteil der maturen B-Zellen (CD19<sup>+</sup>CD24<sup>+/int</sup>CD38<sup>-/int</sup>) nahm korrespondierend nach 6 Monaten ab ( $p < 0,0001$ ). Innerhalb der maturen B-Zellen nahmen sowohl die Untergruppe der naiven B-Zellen (CD19<sup>+</sup>CD24<sup>+/int</sup>CD38<sup>-/int</sup>CD27-IgD<sup>+</sup>) ( $p < 0,0001$ ) als auch die non-class-switched memory B-Zellen (CD19<sup>+</sup>CD24<sup>+/int</sup>CD38<sup>-/int</sup>CD27<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup>) nach 6 Monaten signifikant ab ( $p = 0,0004$ ), wohingegen sich die Untergruppen der class-switched memory B-Zellen (CD19<sup>+</sup>CD24<sup>+/int</sup>CD38<sup>-/int</sup>CD27<sup>+</sup>IgD<sup>-</sup>) und der double negative memory B-Zellen (CD19<sup>+</sup>CD24<sup>+/int</sup>CD38<sup>-/int</sup>CD27-IgD<sup>-</sup>) zu diesem Zeitpunkt nicht signifikant verändert haben. Die Population der Plasmablasten als Anteil der CD19<sup>+</sup> B-Zellen stieg nach 6 Monaten signifikant an ( $p = 0,0013$ ).

Um zu beurteilen, wie Ocrelizumab die Zytokinproduktion von B-Zellen verändern könnte, wurden isolierte PBMC mit PMA und Ionomycin stimuliert und die Produktion von IL-10 und GM-CSF mittels Durchflusszytometrie analysiert (*Abbildung 5, E-F*). Korrespondierend zur absolut verringerten Konzentration der gesamten B-Zellen ( $p = 0,0036$ ) war auch die absolute Zahl der IL-10<sup>+</sup> und der GM-CSF<sup>+</sup> B-Zellen 6 Monate nach Therapiebeginn verringert ( $p = 0,0043$ ). Jedoch produzierte von den wieder auftretenden B-Zellen von MS-Patient\*innen, die mit Ocrelizumab behandelt wurden, ein signifikant höherer Anteil dieser B-Zellen IL-10, verglichen mit den

## Ergebnisse

entsprechenden Blutproben vor Beginn der Behandlung ( $p = 0,0064$ ). Der Anteil GM-CSF-produzierender B-Zellen blieb unbeeinflusst.

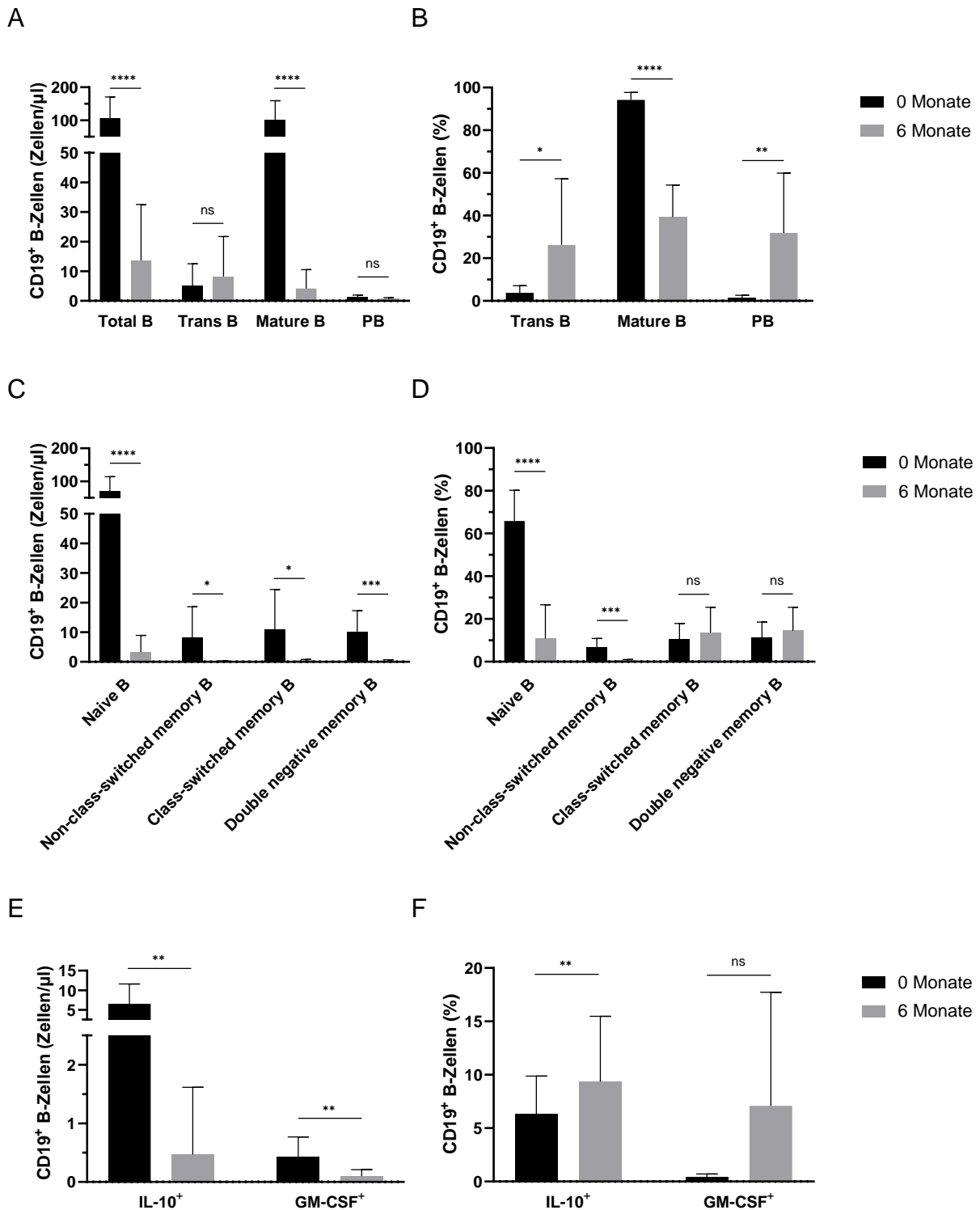


Abbildung 5: Absolute Zahlen (links) und Anteile der B-Zell-Untergruppen (rechts) vor und 6 Monate nach Behandlung mit Ocrelizumab. (A-B) Gesamte B-Zellen (Total B), Transitionale B-Zellen (Trans B), Mature B-Zellen (Mature B), Plasmablasten (PB), (C-D) Naive B-Zellen, Non-class-switched memory B-Zellen, Class-switched memory B-Zellen, Double negative memory B-Zellen, (E-F) IL-10-produzierende B-Zellen und GM-CSF-produzierende B-Zellen, durchflusszytometrisch ermittelt. Gepaarte t-Tests mit zugehörigen p-Werten angegeben. ns nicht signifikant; \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ .

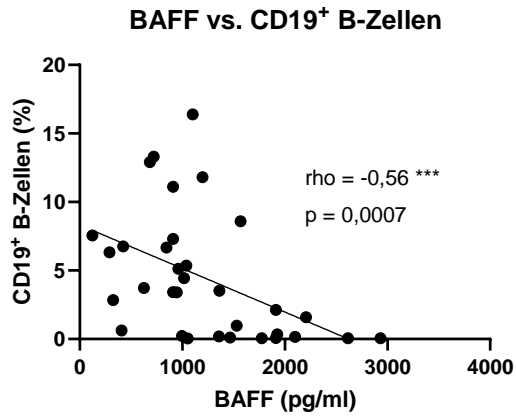
Um zu beantworten, ob die Therapie mit Ocrelizumab neben den B-Zell-Untergruppen auch die Serum-Konzentrationen zirkulierender Immunglobuline beeinflusst, wurde der zeitliche Verlauf der Konzentrationen von IgG, IgM und IgA durch Korrelation mit der Therapiedauer untersucht. Außerdem wurde exploriert, ob eine Korrelation zwischen Immunglobulinen und Serum-BAFF besteht. Die in der Routinediagnostik bestimmten Immunglobuline wiesen weder zur Therapiedauer noch zur Serum-Konzentration von BAFF signifikante Korrelationen auf (*Supplementäre Abbildung 1*).

### **4.5 Zusammenhang zwischen Serum-BAFF-Konzentrationen und zirkulierender B-Zellen unter Ocrelizumab-Therapie**

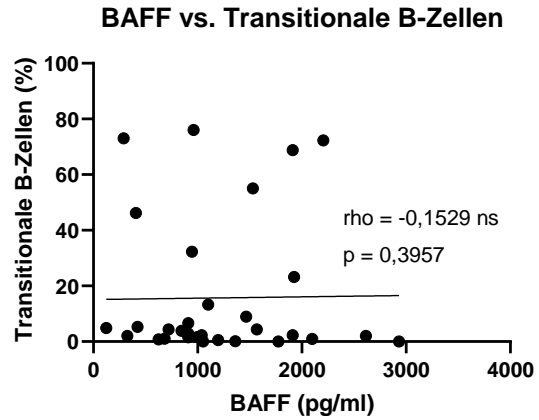
Die Beziehung zwischen den Serum-BAFF-Konzentrationen und den relativen Anteilen der zirkulierenden B-Zell-Untergruppen in der Patientenkohorte wurde mittels Korrelationsanalysen untersucht (*Abbildung 6*). Hierbei wurden sowohl die Datenpunkte zum Zeitpunkt vor als auch nach 6 Monaten Ocrelizumab-Therapie einbezogen.

Es zeigte sich eine signifikante negative Korrelation zwischen Serum-BAFF und dem Anteil der CD19<sup>+</sup> B-Zellen innerhalb der Lymphozyten ( $\rho = -0,56$ ). So waren erniedrigte B-Zellen, wie sie im Therapieverlauf auftreten, mit erhöhten Serum-BAFF-Konzentrationen assoziiert (A). Es zeigte sich keine Korrelation zwischen den Anteilen der transitionalen B-Zellen und BAFF (B). Allerdings ließ sich eine (schwache) negative Korrelation zwischen BAFF und dem Anteil der maturen B-Zellen beobachten ( $\rho = -0,42$ ). Hohe BAFF-Werte gingen regelhaft mit einer Erniedrigung der maturen B-Zellen einher, wobei sich in der untersuchten Kohorte bei wenigen Patient\*innen ebenfalls zeigte, dass auch niedrige BAFF-Werte mit niedrigen Anteilen der maturen B-Zellen auftreten (C). Erhöhte BAFF-Konzentrationen korrelierten mit einem erhöhten Anteil der Plasmablasten ( $\rho = 0,53$ ) (D). Eine positive Korrelation zeigte sich zwischen BAFF und dem Anteil der GM-CSF-produzierenden B-Zellen ( $\rho = 0,56$ ) (E). Zudem erreichte die positive Korrelation zwischen BAFF und dem Anteil der IL-10-produzierenden B-Zellen Signifikanzniveau ( $\rho = 0,40$ ) (F).

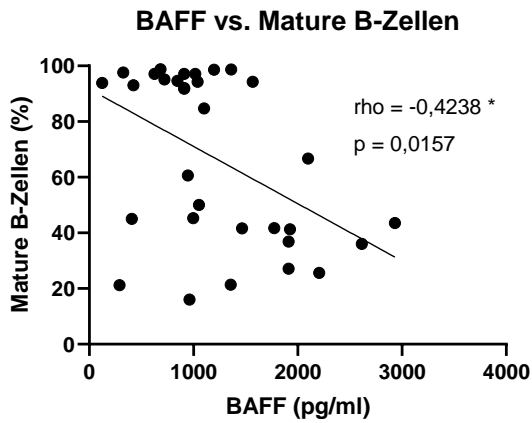
A



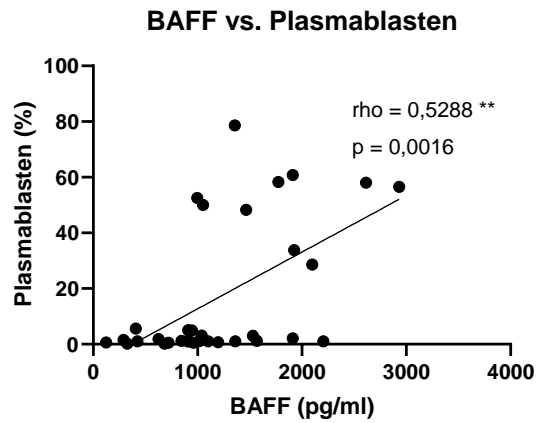
B



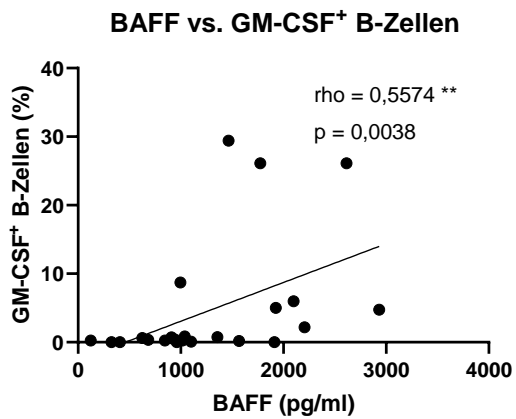
C



D



E



F

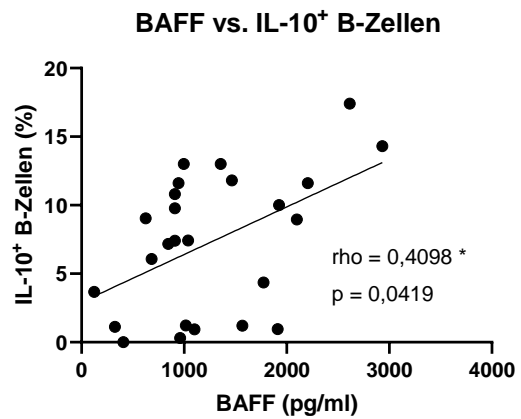


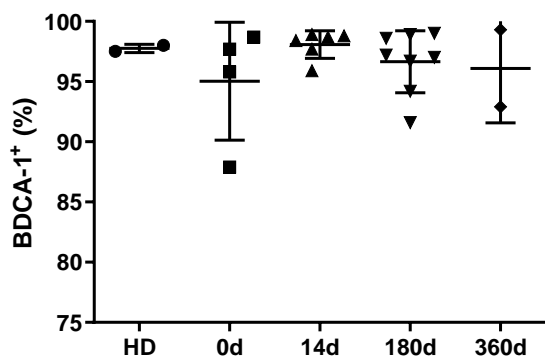
Abbildung 6: Korrelationen zwischen BAFF und jeweiligem Anteil der B-Zellen: (A) CD19<sup>+</sup> B-Zellen, (B) transitionalen B-Zellen, (C) maturen B-Zellen, (D) Plasmablasten, (E) GM-CSF-produzierenden B-Zellen und (F) IL-10-produzierenden B-Zellen, durchflusszytometrisch ermittelt. Spearman's rho mit zugehörigen p-Werten angegeben. ns nicht signifikant; \* p < 0,05; \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001.

#### 4.6 Expression von Oberflächenmolekülen auf dendritischen Zellen und Monozyten im Verlauf der Ocrelizumab-Therapie

Aus peripher gewonnenen PBMCs von gesunden Kontrollen und von Patient\*innen wurden zu verschiedenen Zeitpunkten der Therapie dendritische Zellen und Monozyten mittels sequenziellem MACS-Sorting isoliert. Anschließend wurde die Expression von Oberflächenmolekülen der so gewonnenen Zellen zu den Zeitpunkten vor (Baseline), nach 14, 180 und 360 Tagen Ocrelizumab-Therapie sowie von gesunden Kontrollen durchflusszytometrisch verglichen.

Die isolierten konventionellen dendritischen Zellen wiesen unter den lebenden Zellen zu durchschnittlich 96,9 % eine Oberflächenexpression von BDCA-1 auf (95% KI: 95,5 - 98,2 %). Die Oberflächenexpression von CD14<sup>+</sup> betrug nach dem Monozyten-Sort im Durchschnitt 85,0 % (95% KI: 80,2 - 89,7 %). Die Reinheit der gewonnenen Zellen unterschied sich signifikant zwischen den isolierten Monozyten und dendritischen Zellen ( $p < 0,0001$ ). Innerhalb der beiden Zelltypen gab es jedoch keine Unterschiede in der Qualität der MACS-Sorts, weder zwischen den Zeitpunkten noch im Vergleich zu gesunden Kontrollen (Abbildung 7).

**Dendritische Zellen (BDCA-1<sup>+</sup>)**



**Monozyten (CD14<sup>+</sup>)**

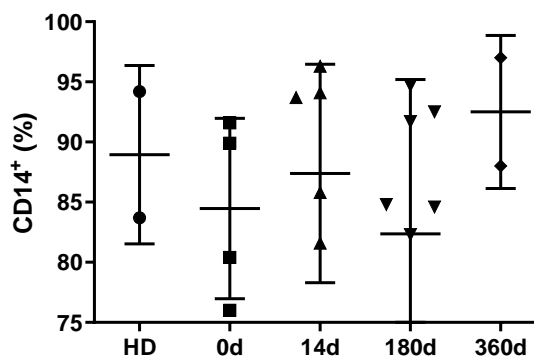


Abbildung 7: Reinheit der MACS-sortierten DCs und Monozyten vergleichend zwischen den Zeitpunkten vor der Therapie (0d), 14 Tagen (14d) und 180 Tagen (180d) und einem Jahr (360d) nach Therapiestart, sowie im Vergleich zu gesunden Kontrollen (HD). Kruskal-Wallis-Test, nicht signifikant ( $p > 0,05$ ).

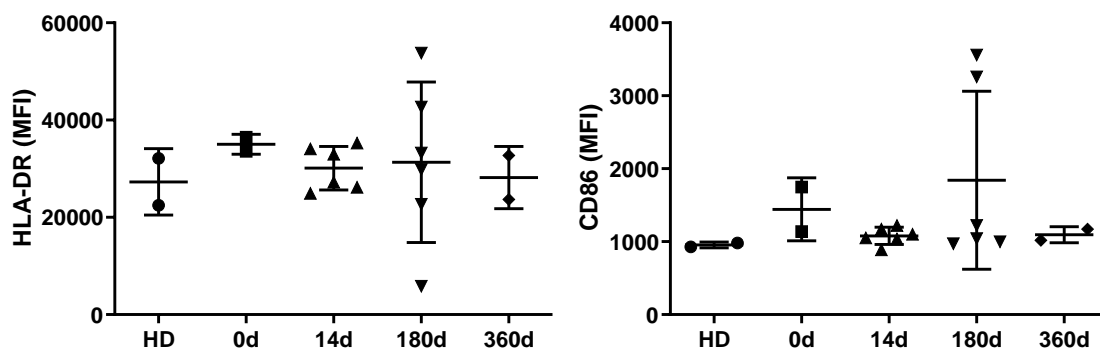
Die Anteile der durch die MACS-Sorts gewonnenen lebenden BDCA-1<sup>+</sup> dendritischen Zellen und CD14<sup>+</sup> Monozyten an den PBMCs wurden unter Berücksichtigung der jeweiligen Reinheit bestimmt. Aus den PBMCs gewonnene lebende BDCA-1<sup>+</sup> DCs machten einen errechneten mittleren Anteil von 0,28 % (95% KI: 0,22 - 0,33 %) aus.

## Ergebnisse

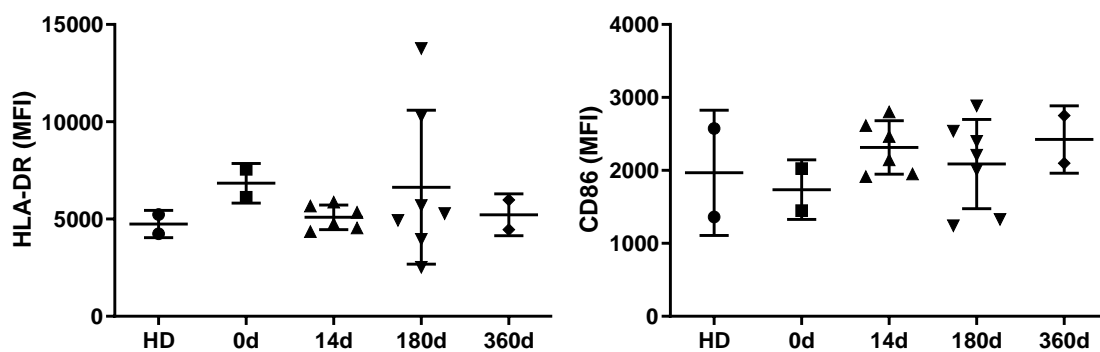
Der Anteil lebender CD14<sup>+</sup> Monozyten betrug im Durchschnitt 12,04 % (95% KI: 8,22 - 15,85 %). Die errechneten Anteile an den PBMCs unterschieden sich nicht zwischen den Therapiezeitpunkten und im Vergleich zu gesunden Kontrollen.

Die *Mean Fluorescence Intensity* (MFI) von HLA-DR und CD86 wurde nach einer Oberflächenfärbung der isolierten CD14<sup>+</sup> Monozyten und BDCA-1<sup>+</sup> DCs gemessen. Die Expression von HLA-DR und CD86 auf den beiden myeloischen Zelltypen veränderte sich nicht signifikant im Therapieverlauf und unterschied sich nicht im Vergleich zu gesunden Kontrollen (*Abbildung 8*).

### Dendritische Zellen (BDCA-1<sup>+</sup>)



### Monozyten (CD14<sup>+</sup>)



*Abbildung 8: Expressionen von HLA-DR und CD86 auf isolierten dendritischen Zellen und Monozyten vergleichend zwischen den Zeitpunkten vor der Therapie (0d), 14 Tagen (14d), 180 Tagen (180d) und einem Jahr (360d) nach Therapiestart, sowie im Vergleich zu gesunden Kontrollen (HD). Kruskal-Wallis-Test, nicht signifikant ( $p > 0,05$ ).*

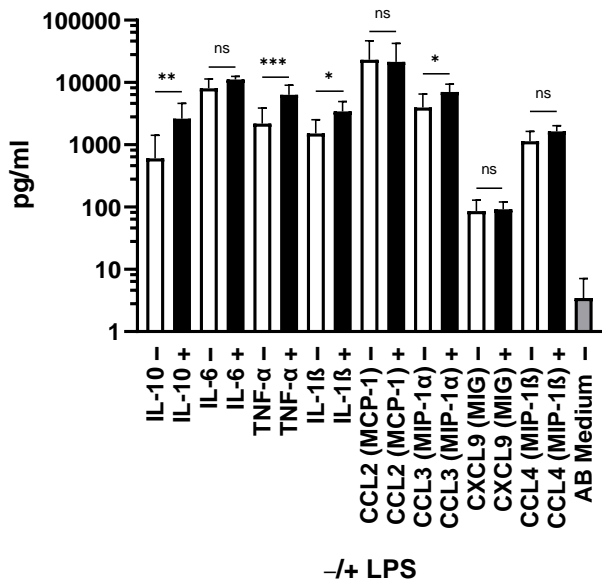
Die Beobachtung der unveränderten Expression der Oberflächenmoleküle auf CD14<sup>+</sup> Monozyten konnte in der Durchflusszytometrie mittels einer Oberflächenfärbung bei aufgetauten PBMCs von 12 Patient\*innen vor und nach B-Zell-depletierender Therapie verifiziert werden. Der Anteil der CD14<sup>+</sup> Monozyten an den PBMCs veränderte sich durch die Therapie nicht signifikant (Mittelwerte: 0 Monate: 4,8 %; 6 Monate: 5,3 %). Die MFI von HLA-DR auf den Monozyten betrug vor der Therapie durchschnittlich 7462 (95% KI: 6027 - 8898) und 6 Monate nach der Therapie durchschnittlich 7372 (95% KI: 6202 - 8541). Die Expression von CD86 auf den Monozyten betrug vor der Therapie, gemessen an der MFI, im Mittel 2146 (95% KI: 1912 - 2379) und 6 Monate nach der Therapie im Mittel 2196 (95% KI: 1940 - 2452). Im longitudinalen Vergleich zeigten gepaarte Stichprobenvergleiche sowohl bzgl. der Expression von HLA-DR als auch bei der Expression von CD86 auf Monozyten keine signifikanten Unterschiede vor und 6 Monate nach CD20-Depletion (*Supplementäre Abbildung 2*).

### **4.7 Zytokine und Chemokine in Kulturüberständen dendritischer Zellen und Monozyten im Verlauf der Ocrelizumab-Therapie**

Mittels eines LEGENDplex™ Assays wurde die Produktion der Zytokine IL-10, IL-6, TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  und der Chemokine CCL2 (MCP-1), CCL3 (MIP-1 $\alpha$ ), CXCL9 (MIG) und CCL4 (MIP-1 $\beta$ ) in den Überständen 24-stündiger Kulturen von isolierten Monozyten und dendritischen Zellen quantifiziert. Dabei wurden die Zeitpunkte vor (Baseline), nach 14 und 180 Tagen Ocrelizumab-Therapie sowie gesunde Kontrollen verglichen.

Während die 24-stündige Stimulation der Monozyten mit LPS in den Überständen zu erhöhten Konzentrationen von IL-10, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und CCL3 (MIP-1 $\alpha$ ) im Vergleich zu den unstimulierten Kulturen führte, beeinflusste LPS die gemessene Zytokin- und Chemokinproduktion in Kulturüberständen von dendritischen Zellen nicht relevant (*Abbildung 9*).

**CD14<sup>+</sup> Monozyten (24h)**



**BDCA-1<sup>+</sup> DCs (24h)**

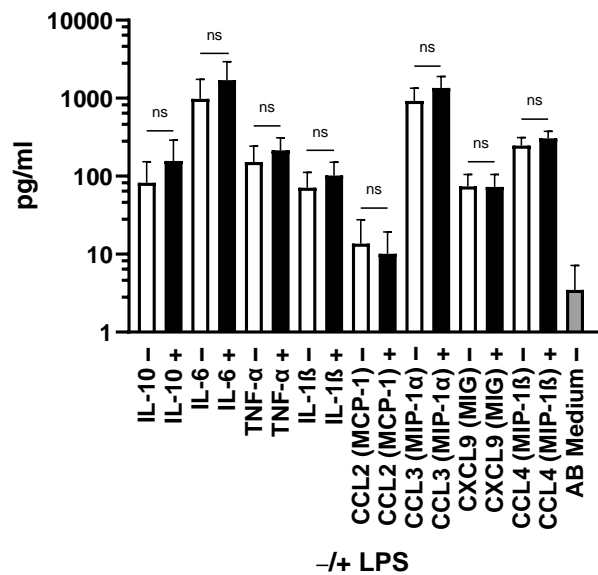


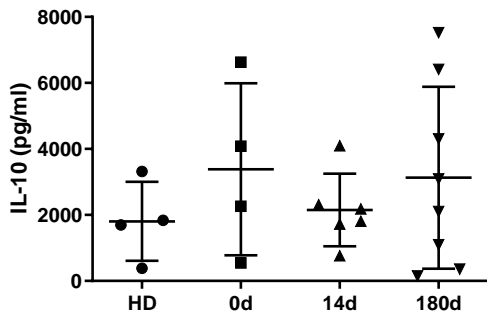
Abbildung 9: Konzentrationen von Zytokinen und Chemokinen in den Überständen 24 h kultivierter Monozyten und dendritischer Zellen ohne vs. mit LPS-Stimulation (-/+ LPS). AB-Medium als Negativ-Kontrolle. Logarithmische Skalierung der jeweiligen Konzentrationen in pg/ml. Kruskal-Wallis-Test und anschließende Mehrfachvergleiche mittels Dunn-Test. ns nicht signifikant; \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

Im Vergleich zu gesunden Kontrollen und im Verlauf der Ocrelizumab-Therapie ließen sich keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Produktion von Zytokinen in den Überständen der LPS-stimulierten Monozyten (Abbildung 10) und dendritischen Zellen (Abbildung 11) vor und während der Ocrelizumab-Behandlung und im Vergleich zu gesunden Kontrollen feststellen. Die Produktion der untersuchten Chemokine veränderte sich ebenfalls nicht signifikant (Supplementäre Abbildung 3+4). Auch in den unstimulierten Kulturüberständen von Monozyten und dendritischen Zellen zeigten sich keine Unterschiede in der Zytokin- und Chemokinproduktion im Therapieverlauf bzw. im Vergleich zu gesunden Kontrollen (nicht gezeigt).

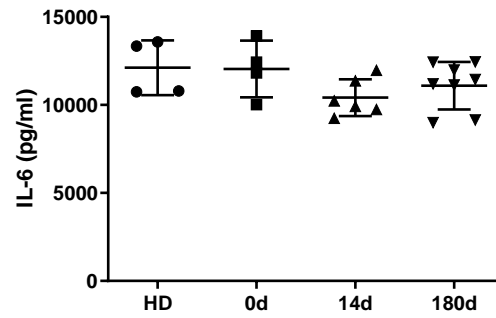
## Ergebnisse

### CD14<sup>+</sup> Monozyten (24h, + LPS)

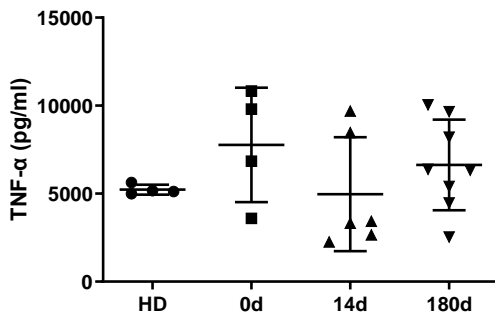
#### IL-10



#### IL-6



#### TNF- $\alpha$



#### IL-1 $\beta$

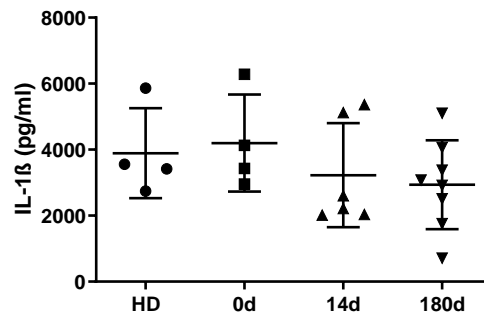
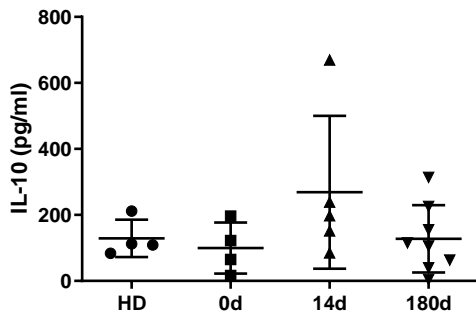


Abbildung 10: Konzentrationen der Zytokine IL-10, IL-6, TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  nach LPS-Stimulation in den Überständen 24 h kultivierter Monozyten vergleichend zwischen den Zeitpunkten vor der Therapie (0d), 2 Wochen (14d) und 6 Monate (180d) nach Therapiestart, sowie im Vergleich zu gesunden Kontrollen (HD). Kruskal-Wallis-Test, nicht signifikant ( $p > 0,05$ ).

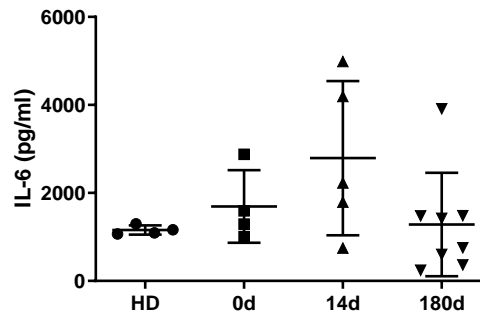
# Ergebnisse

## BDCA-1<sup>+</sup> DCs (24h, + LPS)

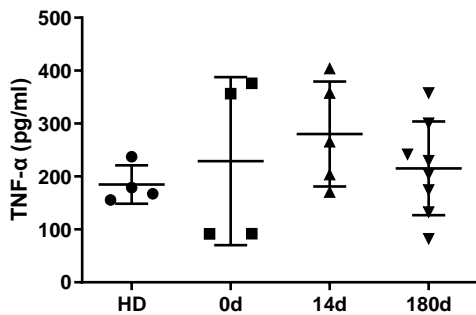
### IL-10



### IL-6



### TNF- $\alpha$



### IL-1 $\beta$

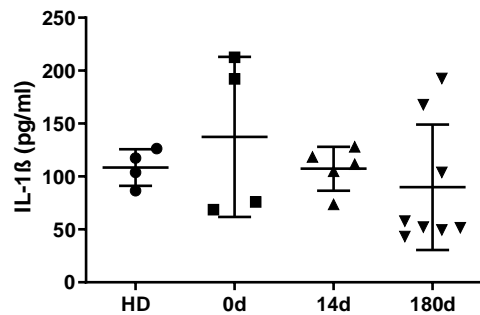


Abbildung 11: Konzentrationen der Zytokine IL-10, IL-6, TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  nach LPS-Stimulation in den Überständen 24 h kultivierter dendritischer Zellen vergleichend zwischen den Zeitpunkten vor der Therapie (0d), 2 Wochen (14d) und 6 Monate (180d) nach Therapiestart, sowie im Vergleich zu gesunden Kontrollen (HD). Kruskal-Wallis-Test, nicht signifikant ( $p > 0,05$ ).

## 5 Diskussion

Die Rolle von B-Zellen bei der MS ist spätestens seit der erfolgreichen Anwendung B-Zell-depletierender Medikamente in der Erforschung von Mechanismen und Therapieoptionen von großem Interesse. Dabei werden in der Untersuchung der immunologischen Eigenschaften dieser Autoimmunkrankheit auch bei B-Zellen sowohl krankmachende als auch protektive Effekte beobachtet, welche durch immunmodulatorische Therapien beeinflusst werden können. In diesem Zusammenhang wird immer wieder der Einfluss des B-Zell-aktivierenden Faktors BAFF auf die MS-Pathogenese und -Therapie kontrovers diskutiert.

Diese Studie beschreibt die Kinetik der B-Zellen und BAFF im Blut von MS-Patient\*innen im Verlauf der Therapie mit Ocrelizumab und identifiziert Veränderungen im peripheren Immunkompartiment der B-Zellen und ihre Auswirkungen auf Monozyten und dendritischen Zellen. Sie nähert sich durch Betrachtung der B-Zell-Untergruppen der Klärung der Frage nach nützlichen Effekten der Anti-CD20-Therapie und exploriert Beziehungen zum Einfluss von BAFF während der Therapie.

### Erhöhte BAFF-Konzentration im Serum nach der Therapie mit Ocrelizumab

Die vorliegende Untersuchung zeigte eine Erhöhung der BAFF-Konzentration im Serum von Patient\*innen, die mit Ocrelizumab behandelt wurden. Möglicherweise ist die beobachtete Erhöhung als sekundäre Folge der Depletion der peripheren B-Zellen durch die Anti-CD20-Therapie zu interpretieren. Dabei wurde eine BAFF-Erhöhung in sehr ähnlicher Form in Patient\*innen mit SLE [106], rheumatoider Arthritis [107] oder Neuromyelitis Optica [108] beobachtet, die mit B-Zell-depletierenden Medikamenten behandelt wurden. Im Einklang damit weisen B-Zell-defiziente Mäuse ebenfalls deutlich erhöhte zirkulierende BAFF-Spiegel auf [109].

In Bezug auf die Therapiezyklen konnte man beobachten, dass die BAFF-Erhöhung zwar mehrere Monate anhält, es jedoch mit der Repopulation der B-Zellen tendenziell wieder zu einem Abfall der BAFF-Konzentrationen im Serum kommt. Hier weist die erneute Gabe von Ocrelizumab aufgrund der erneut steigenden BAFF-Konzentrationen auf eine Wiederholung dieser charakteristischen zyklischen Kinetik hin, wie sie korrespondierend in einer kleinen Kohorte von Patient\*innen mit

rheumatoider Arthritis für die Therapie mit Rituximab bereits früh beschrieben werden konnte [110].

Für MS lässt sich anhand unserer Daten für die Therapie mit Ocrelizumab eine deutliche inverse Korrelation zwischen dem Anteil der B-Zellen und der Höhe der BAFF-Spiegel herstellen, was eine Gegenregulation durch BAFF als Antwort auf den B-Zell-Mangel unterstreicht. Diese Assoziation zwischen B-Zellen und BAFF konnte auch in anderen Krankheitsbildern wie Autoimmunerkrankungen, malignen B-Zell-Erkrankungen und primären Antikörper-Mangelzuständen bestätigt werden. So schlussfolgern auch Kreuzaler *et al.*, dass die BAFF-Serumspiegel insbesondere von der Anzahl der zirkulierenden B-Zellen sowie von der Expression BAFF-bindender Rezeptoren abhängt [111]. Eine wichtige Limitation dieser Arbeit stellt jedoch genau diese inverse Korrelation zwischen BAFF und B-Zellen dar, die es mit der vorgestellten Methodik nicht ermöglicht, klare kausale Effekte von BAFF zu beschreiben, da eine Änderung der BAFF-Konzentration untrennbar mit einer Änderung der B-Zell-Anzahl einhergeht. Die Betrachtung des BAFF-Rezeptors, TACI und BCMA, sowie die Bestimmung von APRIL in Serum und Liquor von MS-Erkrankten könnten weitere, über diese Arbeit hinausgehende funktionelle Einblicke liefern.

### Erhöhung des Anteils der transitionalen B-Zellen und Plasmablasten an den wiederauftretenden B-Zellen bei verringerter Zahl maturer B-Zellen

Im Vergleich zum Baseline-Zeitpunkt zeigte sich in der Folgeuntersuchung 6 Monate nach der Erstgabe von Ocrelizumab eine Erhöhung des Anteils der transitionalen B-Zellen an den wiederauftretenden B-Zellen, während der Anteil und die absolute Zahl der muren B-Zellen abnahm. Diese Beobachtungen sind vereinbar mit Ergebnissen von Roll *et al.* aus Analysen von Patient\*innen mit rheumatoider Arthritis, die zur Therapie eine selektive CD20-Depletion mittels Rituximab erfahren haben. Bei den dort repopulierten B-Zellen handelte es sich ebenfalls um die immaturren (transitionalen) B-Zellen (dort als CD38<sup>high</sup>IgD<sup>+</sup>CD10<sup>+</sup>CD24<sup>high</sup> bezeichnet) [112].

Gleichzeitig zeigte sich in unserer Kohorte zum 6-Monats-Zeitpunkt ein relativ erhöhter Anteil von Plasmablasten. Auch Roll *et al.* konnten nach Rituximab-Therapie eine Rezirkulation von Plasmablasten/-zellen (CD38<sup>+++</sup>IgD<sup>-</sup>) beobachten [112]. Die Erklärung für das Auftreten von Plasmazellen und Plasmablasten (ihren Vorläuferzellen) liefert die Tatsache, dass bei CD20-Depletion die CD20-negativen

Plasmazellen ausgespart werden und deshalb nach Depletion anteilig erhöht sind. Dies bestätigt sich auch im peripheren Blut der untersuchten Patient\*innen, die während des beobachteten Therapiezeitraums unveränderte Immunglobulin-Spiegel bzgl. IgG, IgA und IgM aufwiesen. Die klinische Wirksamkeit von Ocrelizumab muss daher primär über Immunglobulin-unabhängige Effekte erklärt werden, wobei auch die Depletionseffekte auf CD20<sup>+</sup> T-Zellen [7] mitbedacht werden sollten.

Fernández-Velasco *et al.* untersuchten in einer neueren Beobachtungsstudie die Effekte von Ocrelizumab bei PPMS. Auch hier zeigten sich anteilig an den repopulierten B-Zellen relative Erhöhungen der transitionalen B-Zellen und Plasmablasten, während die absoluten Zellzahlen dieser Subgruppen unverändert blieben [10]. Dies stützt die gleichen Beobachtungen in unserer Kohorte, die sowohl RRMS- als auch PPMS-Patient\*innen einschließt.

Die beschriebenen Alterationen im B-Zell-Kompartiment sind sowohl bei MS als auch bei anderen Erkrankungen zu beobachten, bei denen eine selektive B-Zell-Depletion erfolgt. Gleichzeitig können bei der MS auch weniger selektive, nicht einzig auf B-Zellen ausgerichtete Immuntherapeutika zu einem Anstieg von transitionalen B-Zellen führen, wie am Beispiel der Therapie mit IFN- $\beta$  [86] und Fingolimod [87] dargelegt wurde. Ocrelizumab scheint sich in diese Gruppe von MS-Therapeutika einzureihen, in der wiederauftretende regulatorische B-Zellen (im speziellen transitionale B-Zellen) ein erfolgreiches Therapieansprechen unterstreichen, während spätere Reifestadien verringert sind. Für die Entwicklung neuer MS-Therapeutika ist somit eine genauere Betrachtung der Veränderungen im B-Zell-Kompartiment lohnenswert und kann neben der Bestimmung von BAFF möglicherweise einen hilfreichen Indikator für positive Therapieeffekte darstellen.

### Abnahme des Anteils der naiven B-Zellen und Memory B-Zellen an den wiederauftretenden B-Zellen

Bei den nach 6 Monaten wiederauftretenden B-Zellen zeigte sich eine absolute und relative Abnahme der maturen B-Zellen, wobei sowohl naive B-Zellen als auch non-class-switched memory B-Zellen in dieser reifen B-Zell-Untergruppe erniedrigt waren. Dies passt ebenfalls zur Beobachtung von Roll *et al.*, wo CD27<sup>+</sup> Gedächtnis-B-Zellen nach der Behandlung mit Rituximab eine langsame und verzögerte Repopulation aufwiesen, und die Zahl dieser Zellen im Vergleich zu den

Ausgangswerten auch noch mehr als zwei Jahre lang deutlich reduziert blieb [112]. Die Ergebnisse lassen die Schlussfolgerung einer durch die Therapie erzeugten und erwünschten attenuierten Antwort des inflammatorischen B-Zell-Kompartiments zu. Aufgrund der möglicherweise noch länger anhaltenden Therapieeffekte sollte diskutiert werden, inwiefern auch die Gabe von Ocrelizumab – wie bei Rituximab in MS und bei vielen anderen Erkrankungen praktiziert – auch außerhalb des festen 6-Monats-Schemas B-Zell-adaptiert, also individuell in Abhängigkeit der B-Zell-Zahl erfolgen könnte. Auch BAFF-Serum-Spiegel könnten sich diesbezüglich als Biomarker anbieten, wobei sich die Messung klinisch im Vergleich zur Bestimmung der B-Zellen als weniger praktikabel erweisen könnte. Im Hinblick auf die Kosteneffektivität sollten Aspekte wie Zeitpunkte der Therapiegabe oder Art der CD20-Therapie in Zukunft durchaus weiter kritisch evaluiert werden, da Multiple Sklerose auch in Ländern mit schlechterer finanzieller Situation therapiebedürftig bleibt. So beurteilt eine erste kolumbianische Studie Ocrelizumab im Vergleich zu Rituximab aus dem Standpunkt des dortigen Gesundheitssystems als unzureichend kosteneffektiv [113]. Andererseits konnte eine Nicht-Unterlegenheit von Rituximab im Vergleich zu Ocrelizumab in einer aktuellen internationalen Kohortenstudie für die RRMS nicht gezeigt werden, so war die Gabe von Rituximab mit einem höheren Relapse-Risiko assoziiert [114]. Im peripheren Blut ergeben sich jedoch bei Ocrelizumab im Vergleich zu Rituximab – bis auf die erhöhte antikörperabhängige zelluläre Zytotoxizität bei der B-Zell-Depletion – in Bezug auf das B-Zellkompartiment ähnliche Therapieeffekte.

### Modulation der anti-inflammatorischen B-Zell-Antwort durch Ocrelizumab

Unter den nach sechs Monaten wieder auftretenden B-Zellen von MS-Patient\*innen, die mit Ocrelizumab behandelt wurden, produzierten höhere Anteile IL-10, verglichen mit dem Zeitpunkt vor Beginn der Behandlung. Des Weiteren ergab sich in der vorliegenden Arbeit eine positive Korrelation zwischen der Erhöhung von BAFF und den Anteilen der IL-10<sup>+</sup> B-Zellen im beobachteten Therapiezeitraum. IL-10 ist beim Menschen charakteristisch als entzündungshemmendes Zytokin der regulatorischen B-Zellen bekannt, wobei B-Zellen von MS-Patient\*innen nur unzureichend in der Lage sind, IL-10 zu produzieren [63]. Auch murine Daten zeigen, dass erhöhte BAFF-Spiegel die Bildung von IL-10-produzierenden B-Zellen *in vivo* fördern [115]. In ihrer PPMS-Kohorte fanden Fernández-Velasco *et al.* nach B-Zell-Depletion eine Abnahme

des Anteils der TNF- $\alpha$ -produzierenden B-Zellen und analog zu unserer Kohorte einen Anstieg des Anteils der IL-10-produzierenden B-Zellen [10]. Die in dieser Kohorte nach Ocrelizumab-Applikation gefundene erhöhte Fähigkeit der B-Zellen zur Produktion von IL-10 unterstützt somit die These eines weniger entzündlichen Phänotyps der repopulierten B-Zellen.

Eine methodische Schwäche unserer Studie ist, dass die IL-10 Produktion in der Intrazellulärfärbung nur auf die gesamte Population der CD19<sup>+</sup> B-Zellen bestimmt werden konnte. Es konnte nicht eindeutig geklärt werden, ob der höhere Anteil der transitionalen B-Zellen auch den Anstieg der Produktion von IL-10 verursacht. Jedoch zeigten andere Autor\*innen bereits, dass IL-10-produzierende B-Zellen zum größten Anteil in der Untergruppe der transitionalen B-Zellen zu verorten sind [62] bzw. dass eine IL-10-Produktion nahezu exklusiv im Nicht-Memory-Kompartiment auftritt [63]. Ob dieser Zusammenhang jedoch auch nach B-Zell-depletierender Therapie für rekonstituierte B-Zellen gilt, sollte in der Zukunft weiter verifiziert werden. Dennoch war in unserer Kohorte die Zahl der maturen B-Zellen inklusive der Memory B-Zellen unter den rekonstituierten B-Zellen verringert, während transitionale B-Zellen zuerst rekonstituierten, womit diese als IL-10-Produzenten am ehesten in Frage kommen.

Die vorliegende longitudinale Beobachtung der B-Zell-Untergruppen zeigte zwar eine absolute Verringerung der GM-CSF<sup>+</sup> B-Zellen, jedoch keine Verringerung des Anteils der GM-CSF-produzierenden B-Zellen an den repopulierten B-Zellen. Dies ist unerwartet, da Rui Li *et al.* trotz kleinerer Anzahl untersuchter Fälle (N=5) neben der absoluten Abnahme der zirkulierenden GM-CSF-positiven B-Zellen auch relativ gesehen eine verringerte Konzentration des von den B-Zellen sezernierten GM-CSF in der rekonstituierten B-Zellpopulation im Vergleich zu den Vorwerten derselben Patient\*innen beobachteten [9]. Fernández-Velasco *et al.* fanden ebenfalls absolute Reduktionen der GM-CSF-produzierenden B-Zellen, berichteten aber sogar eine signifikant erhöhte relative GM-CSF-Produktion bezogen auf die rekonstituierten CD19<sup>+</sup> B-Zellen; ein ähnlich diskrepantes Muster stellt sich für die IL-6-Produzenten dar [10].

Es ließe sich aufgrund der hier gefundenen gleichbleibenden Anteilen GM-CSF-produzierender B-Zellen für den beobachteten Therapiezeitraum folgern, dass bereits durch die absolute Reduktion der B-Zellen das bei MS-Patient\*innen im Vergleich zu Gesunden abnormal gesteigerte Vorkommen GM-CSF-produzierender B-Zellen

verringert wird. Dadurch könnte unter depletierender Therapie insgesamt das Potential sinken, über diese Interaktions-Achse proinflammatorische myeloische Zellen zu aktivieren. Die Daten von Fernández-Velasco *et al.* stützen diese Interpretation, jedoch zeigte sich in ihrer Kohorte neben der absoluten Reduktion der TNF- $\alpha$ , IL-6-, und GM-CSF-produzierenden B-Zell-Untergruppen ebenfalls die Gesamtzahl der IL-10-produzierender B-Zellen reduziert [10]. Auch ihnen gelingt es daher nur teilweise, die gegensätzlichen Wirkungen der veränderten absoluten und relativen Zahlen der Zytokin-definierten B-Zell-Untergruppen zu gewichten. Sie geben deshalb zu bedenken, dass auf die B-Zell-Depletion nicht zwangsläufig eine vollumfängliche Rekonstitution eines gesunden Immunsystems inklusive einer reetablierten Immuntoleranz folgt [10].

Der relative IL-10-Anstieg 6 Monate nach erfolgter Ocrelizumab-Therapie deutet hier an, dass die Behandlung mit Ocrelizumab die gestörte IL-10 Produktion von B-Zellen bei MS-Patient\*innen positiv beeinflussen könnte. Der höhere Anteil von IL-10<sup>+</sup> B-Zellen unter den rekonstituierten B-Zellen steht somit im Einklang mit dem eingangs beschriebenen Modell, nach dem die B-Zell-Depletion im Rahmen der Therapie ein im immunologischen Sinne protektives Milieu erzeugen kann. Der Anteil der GM-CSF<sup>+</sup> B-Zellen blieb in der vorliegenden Analyse unverändert, sodass nach B-Zell-Depletion insgesamt von einer absoluten Abnahme dieses Wachstumssignals auf myeloische Zellen auszugehen ist.

Eine wichtige offene Frage, die erst durch längere Beobachtungszeiträume geklärt werden könnte, ist, wie anhaltend die beobachteten Immuneffekte in Bezug auf BAFF, IL-10 und die Zusammensetzung der B-Zell-Untergruppen ist. Es deutet sich an, dass nach 6 Monaten bereits ein Abfall von BAFF stattfindet, obwohl die repopulierten B-Zell-Untergruppen gerade dort deutliche Unterschiede zum Vortherapiezeitpunkt aufweisen. Wie schnell die weitere Heranreifung der transitionalen B-Zellen und die Repopulation im Memory-Kompartiment erfolgt, scheint jedoch zentral für die Beantwortung der Frage, ob auch längere Therapiezyklen gewählt werden könnten, um eine ausreichend wirksame, aber nicht überflüssige Immunmodulation sicherzustellen. Dies konnte jedoch in dieser Kohorte bei strengen Applikationsintervallen von 6 Monaten nicht weiter untersucht werden.

### Implikationen von Ocrelizumab auf den Phänotyp von Monozyten und dendritischen Zellen

In den Überständen konventioneller dendritischer Zellen und Monozyten, die aus PBMCs von MS-Patient\*innen zu verschiedenen Therapiezeitpunkten der Ocrelizumab-Therapie isoliert und sowohl mit als auch ohne stimulierendes LPS inkubiert wurden, wurden die Konzentrationen einer Reihe von Zytokinen und Chemokinen bestimmt. Im Gegensatz zu Rui Li *et al.*, die bei Patient\*innen nach B-Zell-Depletion verringerte Konzentrationen von IL-6 und IL-12 in den Überständen von aus Monozyten erzeugten Makrophagen beobachteten [9], konnte in unserer Kohorte eine solche Verringerung der proinflammatorischen Zytokin-Antwort in den Überständen dendritischer Zellen und Monozyten nach ähnlicher Isolation und Stimulation nicht nachgewiesen werden. Engel *et al.* zeigten beispielsweise, dass bei Patient\*innen, die mit Laquinimod behandelt wurden, die mit der gleichen Methode gewonnenen und stimulierten Monozyten weniger IL-1 $\beta$  sekretierten [81]. Analoge Effekte wären auch nach Depletion der B-Zellen und der dadurch zumindest unmittelbar nach Therapiebeginn absolut verringerten Anzahl an GM-CSF-Produzenten erwartbar gewesen. Gleichzeitig misslang der Nachweis einer anti-inflammatorischen Reaktion myeloischer Zellen als nachhaltige Antwort auf die B-Zell-Depletion, etwa in Form erhöhter Konzentrationen von IL-10. Bezüglich der Aktivierungsmarker HLA-DR und CD86 zeigten sich ebenfalls keine Veränderungen durch die Therapie. Hier könnten möglicherweise Liquor-Proben mehr Aufschluss über Veränderungen der Oberflächenexpression unter Anti-CD20-Therapie erbringen, da die Berichte über die bei MS erhöhten Expressionen auf myeloischen Zellen im ZNS in der Literatur einheitlicher erscheinen [69, 76] als die eher heterogene Datenlage zu Veränderungen in der Peripherie [77, 79].

Die Stärke der verwendeten Aufbereitungsmethode mittels MACS liegt darin, dass der Immunphänotyp unmittelbar an Zellen bestimmt wird, die auch unverändert im Patientenblut existieren, denn bis auf die LPS-Stimulation findet keine *In-vitro*-Modifikation statt. Besonders die isolierten dendritischen Zellen werden nicht wie in früheren Publikationen aus Monozyten abgeleitet [72, 73], sondern direkt aus dem Blut gewonnen. Die Expression von Aktivierungs- und Oberflächenmarkern kann jedoch unter Umständen durch die längere Verarbeitung der Zellen während der sequenziellen Sortierschritte verändert werden, und so die anschließende durchflusszytometrische Messung beeinflussen, wenn auch ein identischer

Aufbereitungsprozess zwischen den Proben angestrebt wurde. Es besteht die Möglichkeit, dass die zu erwartenden Effekte mit den verwendeten Aufbereitungs- und Messmethoden bei der vorliegenden Anzahl von Proben nicht ausreichend sicher erfasst wurden. Fehlerquellen können Abweichungen bei manueller Zellzählung und Ausplattierung darstellen, die während eines längeren Versuchszeitraums zu vermeiden waren. Während die isolierten dendritischen Zellen durchflusszytometrisch nahezu alle BDCA-1<sup>+</sup> waren, schwankten die Anteile der CD14<sup>+</sup> Zellen nach Isolation der Monozyten deutlich mehr und wiesen größere Anteile CD14<sup>-</sup> Zellen auf. Diese Zellen könnten selbst Zytokine und Chemokine produzieren, womit die in den Überständen gemessenen Konzentrationen nur fehlerbehaftet den Monozyten zuzuordnen wären. Die Veränderungen im Therapieverlauf könnten sich darüber hinaus viel stärker im longitudinalen intraindividuellen Vergleich als in der Querschnittsbeobachtung an verschiedenen Therapiezeitpunkten zeigen. In Zukunft könnte es deshalb lohnenswert sein, das Verfahren so zu modifizieren, dass Proben mehrerer (sowie auch derselben) Patient\*innen gleichzeitig („*in batch*“) verarbeitet werden, um die Varianz zu verringern. Darüber hinaus ist es aufgrund der Größe dieser Kohorte nicht möglich, Unterschiede zwischen den Verlaufsformen RRMS und PPMS in der Beeinflussung des Immunrepertoires der myeloischen Zellen unter Ocrelizumab darzustellen. Gerade in Bezug auf die explizite Zulassung als Therapiemöglichkeit bei der PPMS fehlt weiterhin ein geschärftes immunologisches Erklärungsmodell für die klinische Wirksamkeit des Medikaments. Die Beeinflussung myeloischer Zelllinien sollte deshalb auch in zukünftigen Arbeiten mitberücksichtigt werden.

## 6 Zusammenfassung

Die Multiple Sklerose (MS) ist eine entzündliche demyelinisierende Erkrankung des zentralen Nervensystems. Bei der Pathogenese spielen autoreaktive T-Zellen und ihre bidirektionalen Beziehungen zu B-Zellen und myeloischen Zellen wie Monozyten und dendritischen Zellen wichtige Rollen. Die fehlgeleiteten Immunprozesse führen zu einer fortschreitenden Schädigung der Myelinscheiden von Nervenzellen und äußern sich klinisch in Schubereignissen bzw. in zunehmender Behinderungsprogression. Ocrelizumab ist ein humanisierter monoklonaler Antikörper gegen CD20, der zur vollständigen Depletion von B-Zellen führt und wirksam zur verlaufsmodifizierenden Therapie eingesetzt wird. Bei der Rekonstitution von B-Zellen nimmt der B-Zell-aktivierende Faktor (BAFF) Einfluss, welcher unter anderem für die Proliferation und Differenzierung dieser Zellen verantwortlich ist.

Die vorliegende Arbeit untersucht die Effekte der Ocrelizumab-Therapie auf die Serum-Konzentration von BAFF und den Phänotyp der repopulierenden B-Zellen sowie im peripheren Blut zirkulierenden Monozyten und dendritischen Zellen bei Patient\*innen mit MS. Es erfolgt eine durchflusszytometrische Charakterisierung der B-Zell-Untergruppen durch Bestimmung von Oberflächenmolekülen und intrazellulärer Zytokine vergleichend vor und 6 Monate nach Ocrelizumab-Therapie. Monozyten und konventionelle dendritische Zellen werden mittels *Magnetic Activated Cell Sorting* aus dem Blut von Gesunden und MS-Patient\*innen zu verschiedenen Zeitpunkten der Therapie isoliert. Neben der durchflusszytometrischen Erfassung der Oberflächenexpression von Aktivierungsmarkern werden die gewonnenen Zellen in 24-stündigen Kulturen mit Lipopolysaccharid stimuliert und die Konzentrationen produzierter Zytokine und Chemokine in ihren Überständen quantifiziert.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Therapie mit Ocrelizumab nach der vollständigen B-Zell-Depletion zu einer Repopulation von B-Zellen führt, die sich durch geringere Anteile von maturen B-Zellen und höhere Anteile von transitionalen B-Zellen auszeichnen. Letztere entsprechen früheren Reife-Stadien und sind für ihre regulatorischen Eigenschaften bekannt. Unter den maturen B-Zellen fanden sich 6 Monate nach Therapiestart geringere Anteile naiver B-Zellen und non-class-switched memory B-Zellen. Der Anteil der anti-inflammatorischen IL-10<sup>+</sup> B-Zellen zeigte sich unter den rekonstituierten B-Zellen erhöht. Korrespondierend wiesen Patient\*innen bereits unmittelbar nach Beginn der Therapie erhöhte Serum-BAFF-Konzentrationen

## Zusammenfassung

auf, die über mindestens 6 Monate persistierten. Die BAFF-Erhöhung im Serum korrelierte mit verringerten Anteilen im Blut zirkulierender (maturer) B-Zellen. Trotz Berichten anderer Autor\*innen über verringerte proinflammatorische Einflüsse auf myeloische Zellen konnten in dieser Studie nach B-Zell-Depletion keine Veränderungen der untersuchten Aktivierungsmarker und der von Monozyten und konventionellen dendritischen Zellen produzierten Zytokine und Chemokine festgestellt werden.

Insgesamt bekräftigt diese Arbeit die Beobachtungen eines anti-inflammatorischen Immunphänotyps nach B-Zell-depletierender Therapie mit Ocrelizumab. Dessen Charakteristik könnte als hilfreicher Indikator für die Entwicklung neuer wirksamer MS-Therapien herangezogen werden.

## 7 Literaturverzeichnis

1. Dendrou, C.A., L. Fugger, and M.A. Friese, *Immunopathology of multiple sclerosis*. Nature Reviews Immunology, 2015. **15**(9): p. 545-558.
2. Li, R., K.R. Patterson, and A. Bar-Or, *Reassessing B cell contributions in multiple sclerosis*. Nat Immunol, 2018. **19**(7): p. 696-707.
3. Hauser, S.L., et al., *Ocrelizumab versus Interferon Beta-1a in Relapsing Multiple Sclerosis*. N Engl J Med, 2017. **376**(3): p. 221-234.
4. Montalban, X., et al., *Ocrelizumab versus Placebo in Primary Progressive Multiple Sclerosis*. N Engl J Med, 2017. **376**(3): p. 209-220.
5. Sabatino, J.J., A.-K. Pröbstel, and S.S. Zamvil, *B cells in autoimmune and neurodegenerative central nervous system diseases*. Nature Reviews Neuroscience, 2019. **20**(12): p. 728-745.
6. Cencioni, M.T., et al., *B cells in multiple sclerosis — from targeted depletion to immune reconstitution therapies*. Nature Reviews Neurology, 2021. **17**(7): p. 399-414.
7. Gingele, S., et al., *Ocrelizumab Depletes CD20<sup>+</sup> T Cells in Multiple Sclerosis Patients*. Cells, 2018. **8**(1).
8. Lisak, R.P., et al., *B cells from patients with multiple sclerosis induce cell death via apoptosis in neurons in vitro*. J Neuroimmunol, 2017. **309**: p. 88-99.
9. Li, R., et al., *Proinflammatory GM-CSF-producing B cells in multiple sclerosis and B cell depletion therapy*. Sci Transl Med, 2015. **7**(310): p. 310ra166.
10. Fernández-Velasco, J.I., et al., *Effect of Ocrelizumab in Blood Leukocytes of Patients With Primary Progressive MS*. Neurology - Neuroimmunology Neuroinflammation, 2021. **8**(2): p. e940.
11. Mackay, F. and P. Schneider, *Cracking the BAFF code*. Nature Reviews Immunology, 2009. **9**(7): p. 491-502.
12. Steri, M., et al., *Overexpression of the Cytokine BAFF and Autoimmunity Risk*. New England Journal of Medicine, 2017. **376**(17): p. 1615-1626.
13. Krumbholz, M., et al., *Interferon- $\beta$  increases BAFF levels in multiple sclerosis: implications for B cell autoimmunity*. Brain, 2008. **131**(6): p. 1455-1463.
14. Tada, S., et al., *BAFF controls neural cell survival through BAFF receptor*. PLoS One, 2013. **8**(7): p. e70924.
15. Li, K., et al., *Microglia-mediated BAFF-BAFFR ligation promotes neuronal survival in brain ischemia injury*. Neuroscience, 2017. **363**: p. 87-96.
16. Walton, C., et al., *Rising prevalence of multiple sclerosis worldwide: Insights from the Atlas of MS, third edition*. Multiple Sclerosis Journal, 2020. **26**(14): p. 1816-1821.
17. Wildemann, B. and R. Diem, *Multiple Sklerose und andere immunvermittelte Enzephalopathien*, in *Neurologie*, W. Hacke, Editor. 2016, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg. p. 559-585.
18. Jersild, C., A. Svejgaard, and T. Fog, *HL-A ANTIGENS AND MULTIPLE SCLEROSIS*. The Lancet, 1972. **299**(7762): p. 1240-1241.
19. Sawcer, S., et al., *Genetic risk and a primary role for cell-mediated immune mechanisms in multiple sclerosis*. Nature, 2011. **476**(7359): p. 214-219.
20. Beecham, A.H., et al., *Analysis of immune-related loci identifies 48 new susceptibility variants for multiple sclerosis*. Nature Genetics, 2013. **45**(11): p. 1353-1360.

21. Patsopoulos, N.A., et al., *Multiple sclerosis genomic map implicates peripheral immune cells and microglia in susceptibility*. *Science*, 2019. **365**(6460): p. eaav7188.
22. Munger, K.L. and A. Ascherio, *Prevention and treatment of MS: studying the effects of vitamin D*. *Multiple Sclerosis Journal*, 2011. **17**(12): p. 1405-1411.
23. Almohmeed, Y.H., et al., *Systematic review and meta-analysis of the sero-epidemiological association between Epstein Barr virus and multiple sclerosis*. *PLoS One*, 2013. **8**(4): p. e61110.
24. Bjornevik, K., et al., *Longitudinal analysis reveals high prevalence of Epstein-Barr virus associated with multiple sclerosis*. *Science*, 2022. **375**(6578): p. 296-301.
25. Hawkes, C.H., *Smoking is a risk factor for multiple sclerosis: a metanalysis*. *Mult Scler*, 2007. **13**(5): p. 610-5.
26. Lublin, F.D., et al., *Defining the clinical course of multiple sclerosis: The 2013 revisions*. *Neurology*, 2014. **83**(3): p. 278-286.
27. Thompson, A.J., et al., *Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria*. *The Lancet Neurology*, 2018. **17**(2): p. 162-173.
28. Ruprecht, K. and H. Tumani, *Liquordiagnostik bei Multipler Sklerose*. *Der Nervenarzt*, 2016. **87**(12): p. 1282-1287.
29. Link, H. and Y.-M. Huang, *Oligoclonal bands in multiple sclerosis cerebrospinal fluid: An update on methodology and clinical usefulness*. *Journal of Neuroimmunology*, 2006. **180**(1): p. 17-28.
30. Reiber, H., *Cerebrospinal fluid--physiology, analysis and interpretation of protein patterns for diagnosis of neurological diseases*. *Mult Scler*, 1998. **4**(3): p. 99-107.
31. Wijnands, J.M.A., et al., *Health-care use before a first demyelinating event suggestive of a multiple sclerosis prodrome: a matched cohort study*. *Lancet Neurol*, 2017. **16**(6): p. 445-451.
32. Disanto, G., et al., *Prodromal symptoms of multiple sclerosis in primary care*. *Ann Neurol*, 2018. **83**(6): p. 1162-1173.
33. Kurtzke, J.F., *Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS)*. *Neurology*, 1983. **33**(11): p. 1444-52.
34. Charcot, J.M., *Leçons sur les maladies du système nerveux, faites à la Salpêtrière*. Vol. 2. 1880: Delahaye et Lecrosnier.
35. Babinski, J., *Recherches sur l'anatomie pathologique de la sclérose en plaque et étude comparative des diverses variétés de la sclérose de la moelle*. *Arch Physiol (Paris)*, 1885. **5**(6): p. 186-207.
36. Kidd, D., et al., *Cortical lesions in multiple sclerosis*. *Brain*, 1999. **122**(1): p. 17-26.
37. Kutzelnigg, A., et al., *Widespread Demyelination in the Cerebellar Cortex in Multiple Sclerosis*. *Brain Pathology*, 2007. **17**(1): p. 38-44.
38. Ferguson, B., et al., *Axonal damage in acute multiple sclerosis lesions*. *Brain*, 1997. **120**(3): p. 393-399.
39. Lassmann, H., *Multiple Sclerosis Pathology*. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2018. **8**(3).
40. Lassmann, H., W. Brück, and C.F. Lucchinetti, *The Immunopathology of Multiple Sclerosis: An Overview*. *Brain Pathology*, 2007. **17**(2): p. 210-218.
41. Kutzelnigg, A., et al., *Cortical demyelination and diffuse white matter injury in multiple sclerosis*. *Brain*, 2005. **128**(Pt 11): p. 2705-12.
42. Howell, O.W., et al., *Meningeal inflammation is widespread and linked to cortical pathology in multiple sclerosis*. *Brain*, 2011. **134**(9): p. 2755-2771.

43. Magliozzi, R., et al., *A Gradient of neuronal loss and meningeal inflammation in multiple sclerosis*. *Annals of Neurology*, 2010. **68**(4): p. 477-493.
44. Hagemeyer, K., W. Brück, and T. Kuhlmann, *Multiple sclerosis - remyelination failure as a cause of disease progression*. *Histol Histopathol*, 2012. **27**(3): p. 277-87.
45. Patrikios, P., et al., *Remyelination is extensive in a subset of multiple sclerosis patients*. *Brain*, 2006. **129**(12): p. 3165-3172.
46. Harkiolaki, M., et al., *T cell-mediated autoimmune disease due to low-affinity crossreactivity to common microbial peptides*. *Immunity*, 2009. **30**(3): p. 348-57.
47. Ando, D.G., et al., *Encephalitogenic T cells in the B10.PL model of experimental allergic encephalomyelitis (EAE) are of the Th-1 lymphokine subtype*. *Cellular Immunology*, 1989. **124**(1): p. 132-143.
48. Fletcher, J.M., et al., *T cells in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis*. *Clin Exp Immunol*, 2010. **162**(1): p. 1-11.
49. McMahon, E.J., et al., *Epitope spreading initiates in the CNS in two mouse models of multiple sclerosis*. *Nat Med*, 2005. **11**(3): p. 335-9.
50. Romagnani, S., *Human TH1 and TH2 subsets: doubt no more*. *Immunology Today*, 1991. **12**(8): p. 256-257.
51. Crawford, M.P., et al., *High prevalence of autoreactive, neuroantigen-specific CD8+ T cells in multiple sclerosis revealed by novel flow cytometric assay*. *Blood*, 2004. **103**(11): p. 4222-31.
52. Venken, K., et al., *Natural naive CD4+CD25+CD127low regulatory T cell (Treg) development and function are disturbed in multiple sclerosis patients: recovery of memory Treg homeostasis during disease progression*. *J Immunol*, 2008. **180**(9): p. 6411-20.
53. Martinez-Forero, I., et al., *IL-10 suppressor activity and ex vivo Tr1 cell function are impaired in multiple sclerosis*. *Eur J Immunol*, 2008. **38**(2): p. 576-86.
54. Brändle, S.M., et al., *Distinct oligoclonal band antibodies in multiple sclerosis recognize ubiquitous self-proteins*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2016. **113**(28): p. 7864-9.
55. Serafini, B., et al., *Detection of Ectopic B-cell Follicles with Germinal Centers in the Meninges of Patients with Secondary Progressive Multiple Sclerosis*. *Brain Pathology*, 2004. **14**(2): p. 164-174.
56. Magliozzi, R., et al., *Meningeal B-cell follicles in secondary progressive multiple sclerosis associate with early onset of disease and severe cortical pathology*. *Brain*, 2007. **130**(Pt 4): p. 1089-104.
57. Lisak, R.P., et al., *Secretory products of multiple sclerosis B cells are cytotoxic to oligodendroglia in vitro*. *Journal of Neuroimmunology*, 2012. **246**(1): p. 85-95.
58. Lisak, R.P., et al., *B cells from patients with multiple sclerosis induce cell death via apoptosis in neurons in vitro*. *Journal of Neuroimmunology*, 2017. **309**: p. 88-99.
59. Hauser, S.L., et al., *B-Cell Depletion with Rituximab in Relapsing–Remitting Multiple Sclerosis*. *New England Journal of Medicine*, 2008. **358**(7): p. 676-688.
60. Catalán, D., et al., *Immunosuppressive Mechanisms of Regulatory B Cells*. *Frontiers in Immunology*, 2021. **12**.
61. Carsetti, R., M.M. Rosado, and H. Wardmann, *Peripheral development of B cells in mouse and man*. *Immunological Reviews*, 2004. **197**(1): p. 179-191.
62. Blair, P.A., et al., *CD19(+)/CD24(hi)/CD38(hi) B cells exhibit regulatory capacity in healthy individuals but are functionally impaired in systemic Lupus Erythematosus patients*. *Immunity*, 2010. **32**(1): p. 129-40.

63. Duddy, M., et al., *Distinct Effector Cytokine Profiles of Memory and Naive Human B Cell Subsets and Implication in Multiple Sclerosis*. The Journal of Immunology, 2007. **178**(10): p. 6092-6099.
64. Barr, T.A., et al., *B cell depletion therapy ameliorates autoimmune disease through ablation of IL-6-producing B cells*. J Exp Med, 2012. **209**(5): p. 1001-10.
65. Lin, C.-C. and B.T. Edelson, *New Insights into the Role of IL-1 $\beta$  in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis and Multiple Sclerosis*. The Journal of Immunology, 2017. **198**(12): p. 4553-4560.
66. Wheeler, R.D., et al., *Elevated interferon gamma expression in the central nervous system of tumour necrosis factor receptor 1-deficient mice with experimental autoimmune encephalomyelitis*. Immunology, 2006. **118**(4): p. 527-38.
67. Nuyts, A., et al., *Dendritic cells in multiple sclerosis: key players in the immunopathogenesis, key players for new cellular immunotherapies?* Multiple Sclerosis Journal, 2013. **19**(8): p. 995-1002.
68. Zozulya, A.L., et al., *Dendritic Cell Transmigration through Brain Microvessel Endothelium Is Regulated by MIP-1 $\alpha$  Chemokine and Matrix Metalloproteinases1*. The Journal of Immunology, 2007. **178**(1): p. 520-529.
69. Pashenkov, M., et al., *Two subsets of dendritic cells are present in human cerebrospinal fluid*. Brain, 2001. **124**(3): p. 480-492.
70. Huang, Y.M., et al., *Multiple sclerosis is associated with high levels of circulating dendritic cells secreting pro-inflammatory cytokines*. J Neuroimmunol, 1999. **99**(1): p. 82-90.
71. Karni, A., et al., *Innate Immunity in Multiple Sclerosis: Myeloid Dendritic Cells in Secondary Progressive Multiple Sclerosis Are Activated and Drive a Proinflammatory Immune Response1*. The Journal of Immunology, 2006. **177**(6): p. 4196-4202.
72. Jolivel, V., et al., *Modulation of dendritic cell properties by laquinimod as a mechanism for modulating multiple sclerosis*. Brain, 2013. **136**(Pt 4): p. 1048-66.
73. Kraus, S.H., et al., *Cladribine exerts an immunomodulatory effect on human and murine dendritic cells*. Int Immunopharmacol, 2014. **18**(2): p. 347-57.
74. Croxford, A.L., et al., *The Cytokine GM-CSF Drives the Inflammatory Signature of CCR2+ Monocytes and Licenses Autoimmunity*. Immunity, 2015. **43**(3): p. 502-14.
75. Ajami, B., et al., *Infiltrating monocytes trigger EAE progression, but do not contribute to the resident microglia pool*. Nature Neuroscience, 2011. **14**(9): p. 1142-1149.
76. Fabriek, B.O., et al., *CD163-positive perivascular macrophages in the human CNS express molecules for antigen recognition and presentation*. Glia, 2005. **51**(4): p. 297-305.
77. Kouwenhoven, M., et al., *Monocytes in multiple sclerosis: phenotype and cytokine profile*. Journal of Neuroimmunology, 2001. **112**(1): p. 197-205.
78. Imamura, K., et al., *Cytokine production by peripheral blood monocytes/macrophages in multiple sclerosis patients*. Acta Neurologica Scandinavica, 1993. **87**(4): p. 281-285.
79. Ransohoff, R.M., et al., *Monocytes in active multiple sclerosis: intact regulation of HLA-DR density in vitro despite decreased HLA-DR density in vivo*. Journal of Neuroimmunology, 1992. **37**(3): p. 169-176.

80. Dalla Costa, G., et al., *Disease-modifying treatments modulate myeloid cells in multiple sclerosis patients*. Neurological Sciences, 2018. **39**(2): p. 373-376.
81. Engel, S., et al., *Laquinimod dampens IL-1 $\beta$  signaling and Th17-polarizing capacity of monocytes in patients with MS*. Neurology - Neuroimmunology Neuroinflammation, 2021. **8**(1): p. e908.
82. Segal, B.M., et al., *Repeated subcutaneous injections of IL12/23 p40 neutralising antibody, ustekinumab, in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis: a phase II, double-blind, placebo-controlled, randomised, dose-ranging study*. Lancet Neurol, 2008. **7**(9): p. 796-804.
83. Group, T.L.M.S.S. and T.U.o.B.C.M.M.A. Group, *TNF neutralization in MS. Results of a randomized, placebo-controlled multicenter study*, 1999. **53**(3): p. 457-457.
84. Morschhauser, F., et al., *Results of a phase I/II study of ocrelizumab, a fully humanized anti-CD20 mAb, in patients with relapsed/refractory follicular lymphoma*. Annals of Oncology, 2010. **21**(9): p. 1870-1876.
85. Torkildsen, Ø.M., Kjell-Morten, *Ocrelizumab VErSUS Rituximab Off-Label at the Onset of Relapsing MS Disease (OVERLORD-MS)*. Haukeland University Hospital. ClinicalTrials.gov Identifier: NCT04578639.
86. Schubert, R.D., et al., *IFN- $\beta$  treatment requires B cells for efficacy in neuroautoimmunity*. J Immunol, 2015. **194**(5): p. 2110-6.
87. Grützke, B., et al., *Fingolimod treatment promotes regulatory phenotype and function of B cells*. Ann Clin Transl Neurol, 2015. **2**(2): p. 119-30.
88. Naradikian, M.S., A.R. Perate, and M.P. Cancro, *BAFF receptors and ligands create independent homeostatic niches for B cell subsets*. Curr Opin Immunol, 2015. **34**: p. 126-9.
89. Magliozzi, R., D. Marastoni, and M. Calabrese, *The BAFF / APRIL system as therapeutic target in multiple sclerosis*. Expert Opin Ther Targets, 2020. **24**(11): p. 1135-1145.
90. Krumbholz, M., et al., *BAFF is produced by astrocytes and up-regulated in multiple sclerosis lesions and primary central nervous system lymphoma*. J Exp Med, 2005. **201**(2): p. 195-200.
91. Thangarajh, M., et al., *A Proliferation-inducing Ligand (APRIL) is Expressed by Astrocytes and is Increased in Multiple Sclerosis*. Scandinavian Journal of Immunology, 2007. **65**(1): p. 92-98.
92. Baert, L., et al., *A proliferation-inducing ligand-mediated anti-inflammatory response of astrocytes in multiple sclerosis*. Annals of Neurology, 2019. **85**(3): p. 406-420.
93. Mackay, F., et al., *Mice Transgenic for Baff Develop Lymphocytic Disorders along with Autoimmune Manifestations*. Journal of Experimental Medicine, 1999. **190**(11): p. 1697-1710.
94. Cheema, G.S., et al., *Elevated serum B lymphocyte stimulator levels in patients with systemic immune-based rheumatic diseases*. Arthritis & Rheumatism, 2001. **44**(6): p. 1313-1319.
95. Navarra, S.V., et al., *Efficacy and safety of belimumab in patients with active systemic lupus erythematosus: a randomised, placebo-controlled, phase 3 trial*. The Lancet, 2011. **377**(9767): p. 721-731.
96. Merrill, J.T., et al., *Efficacy and Safety of Atacicept in Patients With Systemic Lupus Erythematosus: Results of a Twenty-Four-Week, Multicenter, Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Parallel-Arm, Phase IIb Study*. Arthritis Rheumatol, 2018. **70**(2): p. 266-276.

97. van Vollenhoven, R.F., et al., *Atacicept in patients with rheumatoid arthritis and an inadequate response to methotrexate: results of a phase II, randomized, placebo-controlled trial*. *Arthritis Rheum*, 2011. **63**(7): p. 1782-92.
98. Kappos, L., et al., *Atacicept in multiple sclerosis (ATAMS): a randomised, placebo-controlled, double-blind, phase 2 trial*. *Lancet Neurol*, 2014. **13**(4): p. 353-63.
99. Sergott, R.C., et al., *ATON: results from a Phase II randomized trial of the B-cell-targeting agent atacicept in patients with optic neuritis*. *J Neurol Sci*, 2015. **351**(1-2): p. 174-178.
100. Baker, D., et al., *Memory B Cells are Major Targets for Effective Immunotherapy in Relapsing Multiple Sclerosis*. *EBioMedicine*, 2017. **16**: p. 41-50.
101. Rojas, O.L., et al., *Recirculating Intestinal IgA-Producing Cells Regulate Neuroinflammation via IL-10*. *Cell*, 2019. **176**(3): p. 610-624.e18.
102. Kannel, K., et al., *Changes in Blood B Cell-Activating Factor (BAFF) Levels in Multiple Sclerosis: A Sign of Treatment Outcome*. *PLoS One*, 2015. **10**(11): p. e0143393.
103. Piazza, F., et al., *Cerebrospinal fluid levels of BAFF and APRIL in untreated multiple sclerosis*. *J Neuroimmunol*, 2010. **220**(1-2): p. 104-7.
104. Roche. *Fachinformation Ocrevus®*. 2018 29.09.2019]; Available from: <https://www.roche.de/dok/Ocrevus-reg-Infusionsloesung-fachinfo-0-na-attach.pdf>.
105. BioLegend. *LEGENDplex™ Multiplex Assays*. 23.10.2022; Available from: <https://www.biologend.com/en-us/legendplex>.
106. Cambridge, G., et al., *B cell depletion therapy in systemic lupus erythematosus: relationships among serum B lymphocyte stimulator levels, autoantibody profile and clinical response*. *Ann Rheum Dis*, 2008. **67**(7): p. 1011-6.
107. Cambridge, G., et al., *Circulating levels of B lymphocyte stimulator in patients with rheumatoid arthritis following rituximab treatment: relationships with B cell depletion, circulating antibodies, and clinical relapse*. *Arthritis Rheum*, 2006. **54**(3): p. 723-32.
108. Nakashima, I., et al., *Transient increases in anti-aquaporin-4 antibody titers following rituximab treatment in neuromyelitis optica, in association with elevated serum BAFF levels*. *J Clin Neurosci*, 2011. **18**(7): p. 997-8.
109. Jackson, S.W., et al., *Cutting Edge: BAFF Overexpression Reduces Atherosclerosis via TACI-Dependent B Cell Activation*. *J Immunol*, 2016. **197**(12): p. 4529-4534.
110. Cambridge, G., et al., *Circulating levels of B lymphocyte stimulator in patients with rheumatoid arthritis following rituximab treatment: Relationships with B cell depletion, circulating antibodies, and clinical relapse*. *Arthritis & Rheumatism*, 2006. **54**(3): p. 723-732.
111. Kreuzaler, M., et al., *Soluble BAFF levels inversely correlate with peripheral B cell numbers and the expression of BAFF receptors*. *J Immunol*, 2012. **188**(1): p. 497-503.
112. Roll, P., et al., *Regeneration of B cell subsets after transient B cell depletion using anti-CD20 antibodies in rheumatoid arthritis*. *Arthritis Rheum*, 2006. **54**(8): p. 2377-86.
113. Navarro, C.E. and J.E. Betancur, *Cost-Utility Analysis Comparing Ocrelizumab vs Rituximab in the Treatment of Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis: The Colombian Perspective*. *Value Health Reg Issues*, 2023. **36**: p. 83-91.
114. Roos, I., et al., *Rituximab vs Ocrelizumab in Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis*. *JAMA Neurology*, 2023. **80**(8): p. 789-797.

115. Yang, M., et al., *Cutting Edge: Novel Function of B Cell-Activating Factor in the Induction of IL-10–Producing Regulatory B Cells*. *The Journal of Immunology*, 2010. **184**(7): p. 3321-3325.

### **Im Rahmen der Dissertation entstandene Kongressbeiträge und Publikationen**

#### Poster ECTRIMS (2019):

Luessi F, Engel S, Himbert J, et al., *Impact of Ocrelizumab-induced BAFF on reappearing B cells in multiple sclerosis*. Presented at ECTRIMS, 2019.

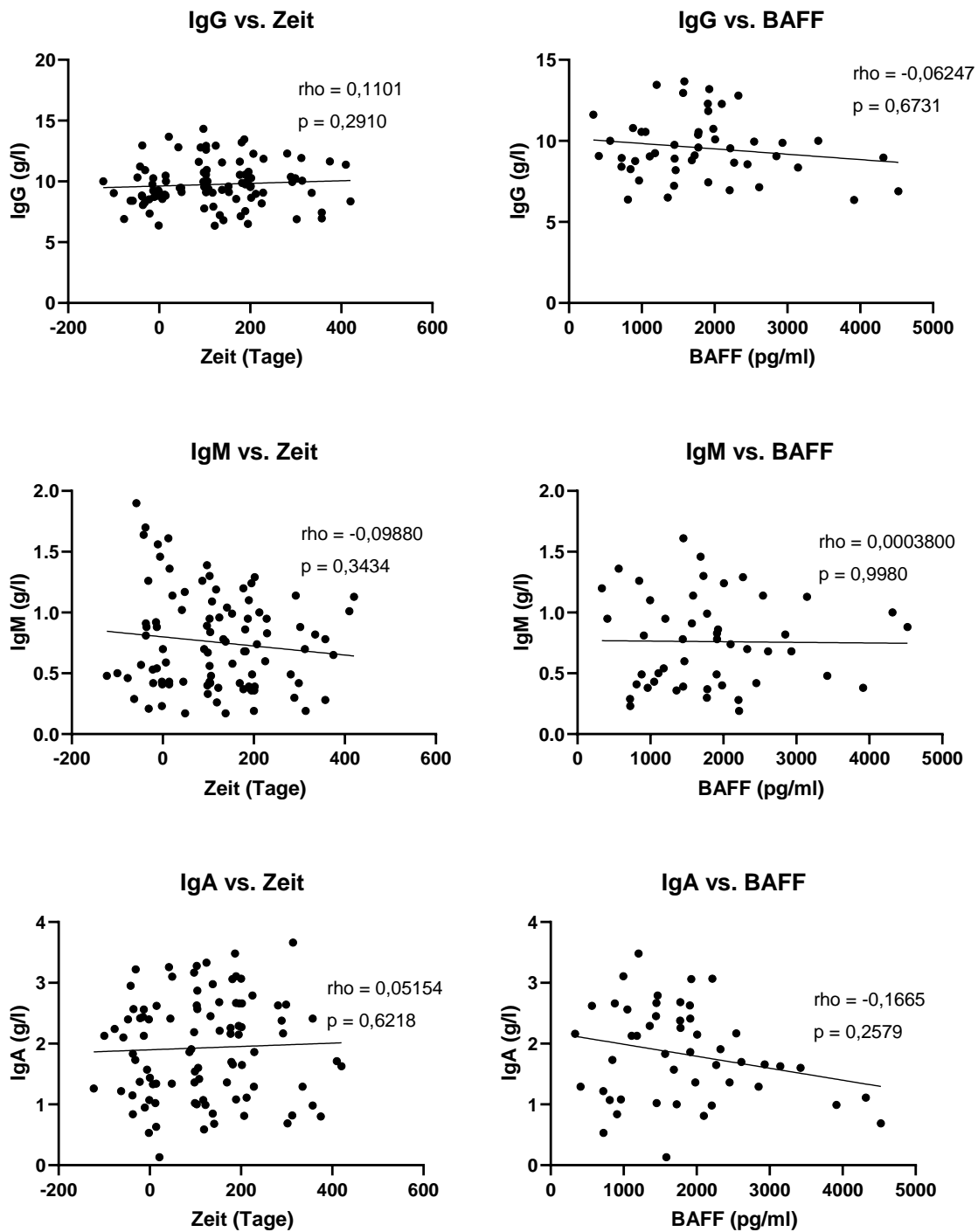
#### Publikation (2024):

Wang, A. A., Luessi, F., Neziraj, T., Pössnecker, E., Zuo, M., Engel, S., Hanuscheck, N., Florescu, A., Bugbee, E., Ma, X., Rana, F., Lee, D., Ward, L. A., Kuhle, J., Himbert, J., Schraad, M., van Puijenbroek, E., Klein, C., Urich, E., Ramaglia, V., Pröbstel, A.-K., Zipp, F., Gommerman, J. L., *B cell depletion with anti-CD20 promotes neuroprotection in a BAFF-dependent manner in mice and humans*. *Science Translational Medicine*, 2024. **16**(737): p. eadi0295.

# 8 Anhang

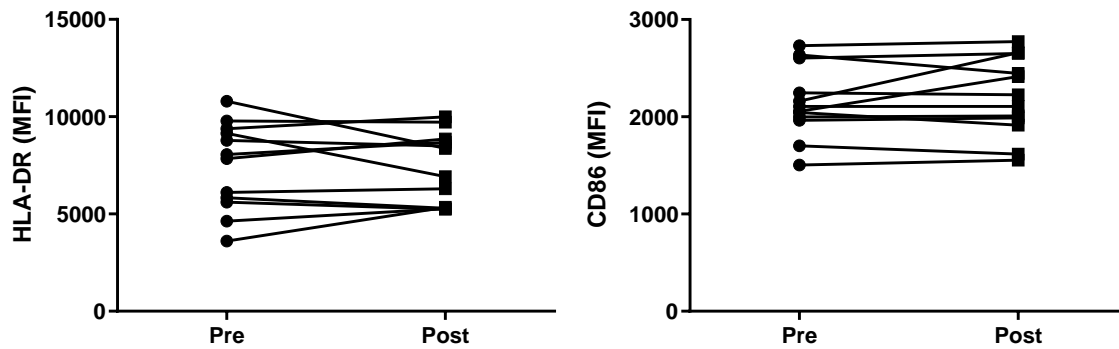
## Supplementäre Abbildungen

S1



Supplementäre Abbildung 1: Korrelationsanalyse der Immunglobuline IgG, IgM und IgA zur Therapiedauer und zu Serum-BAFF. Tag 0 kennzeichnet den Tag ersten Ocrelizumab-Gabe. Spearman's rho mit zugehörigen p-Werten angegeben.

## S2

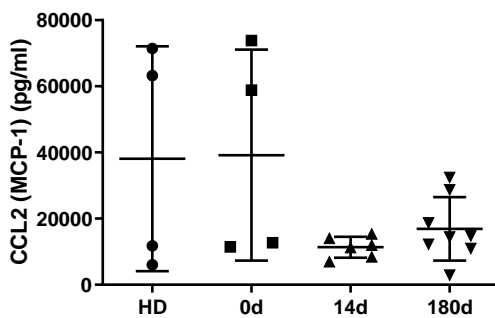


Supplementäre Abbildung 2: Expressionen von HLA-DR und CD86 auf CD14<sup>+</sup> Monozyten im longitudinalen Vergleich zwischen den Zeitpunkten vor der Therapie (Pre) und 6 Monate nach Therapiestart (Post). N=12, aufgetaute PBMCs. Wilcoxon-Test, nicht signifikant ( $p > 0,05$ ).

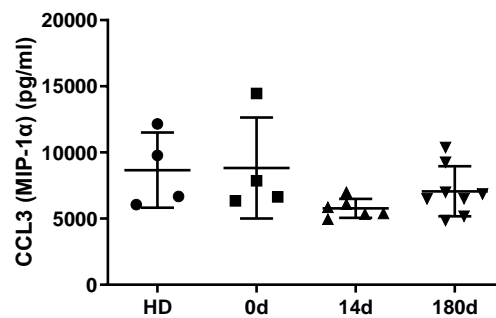
## S3

### CD14<sup>+</sup> Monozyten (24h, + LPS)

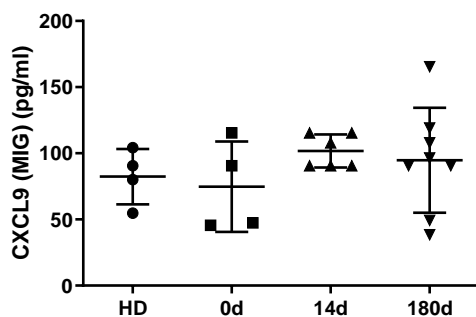
#### CCL2 (MCP-1)



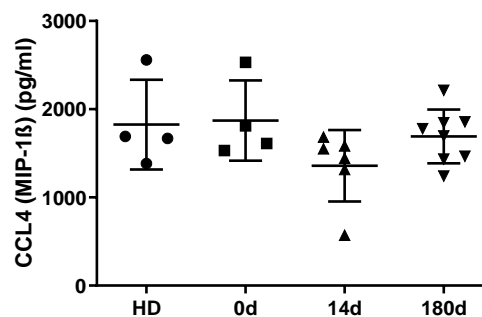
#### CCL3 (MIP-1 $\alpha$ ),



#### CXCL9 (MIG)



#### CCL4 (MIP-1 $\beta$ )

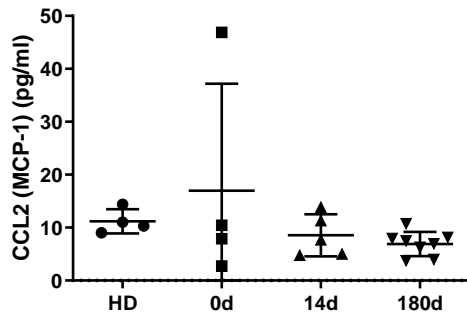


Supplementäre Abbildung 3: Konzentrationen der Chemokine CCL2 (MCP-1), CCL3 (MIP-1 $\alpha$ ), CXCL9 (MIG) und CCL4 (MIP-1 $\beta$ ) nach LPS-Stimulation in den Überständen 24 h kultivierter Monozyten vergleichend zwischen den Zeitpunkten vor der Therapie (0d), 2 Wochen (14d) und 6 Monate (180d) nach Therapiestart, sowie im Vergleich zu gesunden Kontrollen (HD). Kruskal-Wallis-Test, nicht signifikant ( $p > 0,05$ ).

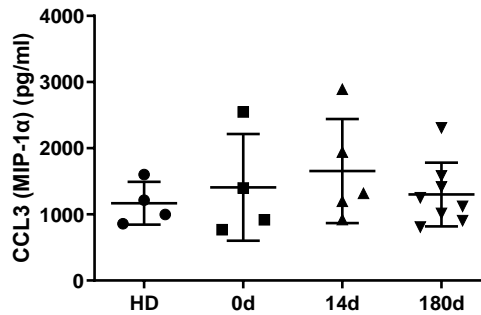
## S4

### BDCA-1<sup>+</sup> DCs (24h, + LPS)

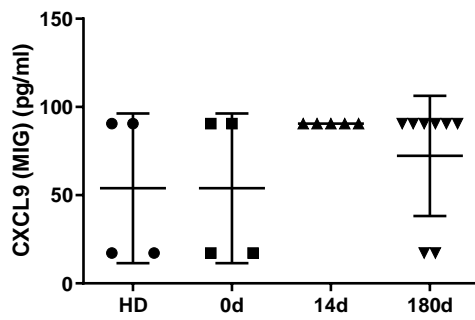
#### CCL2 (MCP-1)



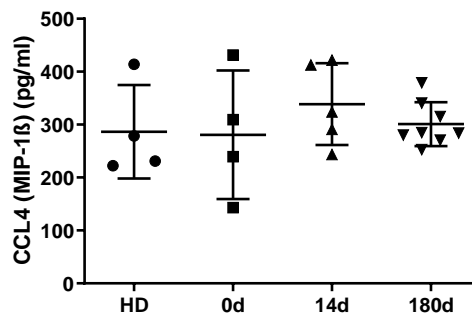
#### CCL3 (MIP-1 $\alpha$ ),



#### CXCL9 (MIG)



#### CCL4 (MIP-1 $\beta$ )



Supplementäre Abbildung 4: Konzentrationen der Chemokine CCL2 (MCP-1), CCL3 (MIP-1 $\alpha$ ), CXCL9 (MIG) und CCL4 (MIP-1 $\beta$ ) nach LPS-Stimulation in den Überständen 24 h kultivierter dendritischer Zellen vergleichend zwischen den Zeitpunkten vor der Therapie (0d), 2 Wochen (14d) und 6 Monate (180d) nach Therapiestart, sowie im Vergleich zu gesunden Kontrollen (HD). Kruskal-Wallis-Test, nicht signifikant ( $p > 0,05$ ).

## **9 Danksagung**

Für die Unterstützung bei der Anfertigung dieser Dissertation möchte ich allen beteiligten Personen danken. Großen Dank möchte ich natürlich meinem Doktorvater Prof. Dr. Felix Lüssi aussprechen, der auch noch zu später Stunde seinen Optimismus nicht verliert und mit der Forschung sehr viel Freude bereitet. Außerdem möchte ich mich bei den Spender\*innen und Patient\*innen bedanken, die nicht müde werden, sich für den Fortschritt in der Medizin zu engagieren und ohne die es die vorliegende Arbeit nicht geben könnte. Schließlich und nicht zuletzt danke ich meinen Freunden und meiner Familie, die mich immer und kompromisslos unterstützen.

# 10 Tabellarischer Lebenslauf

## Persönliche Daten

|            |                          |
|------------|--------------------------|
| Name       | Johannes Baptist Himbert |
| Geburtstag | 29.07.1996               |
| Geburtsort | Saarbrücken              |

## Schulbildung

|             |   |
|-------------|---|
| 2003 - 2007 | Grundschule Pestalozzischule Elversberg                         |
| 2007 - 2015 | Gymnasium am Krebsberg Neunkirchen<br>Allgemeine Hochschulreife |

## Hochschulbildung

|                   |  |
|-------------------|--|
| 10/2015 - 05/2022 | Studium der Humanmedizin<br>Johannes Gutenberg-Universität Mainz   |
| 08/2017           | Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  |
| 04/2021           | Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung   |
| 05/2021 - 04/2022 | Praktisches Jahr<br>Neurologie & Innere (Universitätsmedizin Mainz),<br>Chirurgie (Hegau-Bodensee-Klinikum Singen) |
| 05/2022           | Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung   |
| 07/2022           | Approbation als Arzt   |
| Seit 10/2019      | Studium der Informatik<br>Johannes Gutenberg-Universität Mainz   |