

Aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie
der Universität Würzburg

Direktor: Prof. Dr. Süleyman Ergün

**Der Einfluss von Fingolimod auf die autoreaktive
B-Zell-Antwort in einem B-Zell-abhängigen Mausmodell der
Multiplen Sklerose**

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von
Quirin Julius Notz
aus Schongau

Würzburg, Oktober 2018

Referentin: Prof. Dr. med. Stefanie Kürten

Korreferent: Prof. Dr. med. Claudia Sommer

Dekan: Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 16.10.2019

Der Promovend ist Arzt

Karl-Heinz Leitner, † 19.06.2017

Walter Notz, † 28.12.2012

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
1.1	Multiple Sklerose.....	1
1.1.1	Epidemiologie und Ätiologie	1
1.1.2	Klinik, Stadien und Verlaufsformen.....	3
1.1.3	Diagnose und Therapie	4
1.1.4	Pathogenese und Immunologie	6
1.1.4.1	Die Rolle der B-Zellen.....	7
1.2	Fingolimod.....	9
1.2.1	Meilensteine der Entwicklung	9
1.2.2	S1P und S1PR.....	9
1.2.3	Wirkmechanismen und Pharmakologie	10
1.2.4	Zulassungsstudien und therapeutischer Stellenwert.....	13
1.3	Experimentelle autoimmune Encephalomyelitis	14
1.3.1	Entwicklungsgeschichte.....	14
1.3.2	Klassische Modelle	15
1.3.3	B-Zell-abhängige EAE	16
1.4	Lymphoide Neogenese im ZNS.....	17
1.5	Zielsetzung und Fragestellung der Arbeit.....	19
2	MATERIAL UND METHODEN	21
2.1	Allgemeine Labormaterialien	21
2.1.1	Puffer, Medien, Chemikalien.....	21
2.1.2	Antigene, Antikörper, Blocklösungen, Kits	24
2.1.3	Verbrauchsmaterialien.....	26
2.1.4	Geräte.....	27

2.1.5	Software	28
2.2	Experimentdesign und Versuchsvorbereitung.....	28
2.3	Versuchstiere und Behandlung	30
2.3.1	B6-Maus	30
2.3.2	Induktion der EAE	31
2.3.3	Scoring	31
2.3.4	Fingolimod-Dosierung und Applikation	32
2.3.5	Behandlung und Präparation	33
2.4	Immunhistochemie.....	35
2.4.1	Paraffineinbettung und Mikrotomie	35
2.4.2	Grundlagen der immunhistochemischen Färbung	35
2.4.3	Marker für lymphoide Neogenese und Etablierung.....	37
2.4.4	Färbeprotokolle.....	43
2.4.5	Mikroskopie	45
2.4.6	IHC-Auswertung	46
2.4.6.1	Vermessung der Parenchymfläche	46
2.4.6.2	Einteilung der Infiltrate	47
2.5	Quantitative Immunoassays.....	48
2.5.1	B-Zell-ELISPOT.....	48
2.5.1.1	ELISPOT-Grundlagen	48
2.5.1.2	ELISPOT-Protokoll.....	51
2.5.1.3	ELISPOT-Auswertung.....	52
2.5.2	ELISA	53
2.5.2.1	ELISA-Grundlagen	53
2.5.2.2	ELISA-Protokoll.....	54
2.5.2.3	ELISA-Auswertung.....	55

2.6	Durchflusszytometrie.....	55
2.6.1	Blutproben und Etablierung	55
2.6.2	Grundlagen der durchflusszytometrischen Messung	56
2.6.3	Durchflusszytometrische Marker.....	58
2.6.4	DFZ-Protokoll.....	59
2.6.5	Gatingstrategie und Auswertung.....	60
2.7	Statistische Auswertung	61
3	ERGEBNISSE.....	63
3.1	Immunisierungsstatistik und Krankheitsbeginn	63
3.2	Gebesserter klinischer Verlauf bei Fingolimod-Behandlung	63
3.3	Periphere Wirkung von Fingolimod.....	64
3.3.1	Keine morphologischen Veränderungen am Lymphknoten	64
3.3.2	Verminderung der CD4 ⁺ T-Zellen im peripheren Blut	65
3.3.3	Keine Beeinträchtigung der MP4-spezifischen B-Zell-Antwort.....	68
3.4	Zentrale Wirkung von Fingolimod	69
3.4.1	Übersicht über die Versuchstiere.....	69
3.4.2	Attenuierte Kleinhirn-Infiltration unter Fingolimod-Behandlung.....	72
3.4.3	Keine B-Zell-Aggregat-Bildung bei Fingolimod-Behandlung.....	74
3.4.4	Zusammenhang Kleinhirn-Infiltration und klinischer Score	74
3.5	Analyse der B-Zell-Aggregate	75
3.5.1	Lymphoide Neogenese als überwiegendes Charakteristikum	75
3.5.2	Fehlen von hochgradig differenzierten B-Zell-Aggregaten.....	77
3.6	Zusammenfassung der Ergebnisse.....	78
4	DISKUSSION.....	79
4.1	Vergleich, Einflüsse und Aussagekraft des EAE-Verlaufes	79
4.2	Differenzierte Wirkung von Fingolimod auf B-Zellen.....	82

4.3	Von der B-Zelle über das B-Zell-Aggregat bis hin zum TLO	84
4.4	Prävention der lymphoiden Neogenese durch frühe Therapie	89
5	SCHLUSSFOLGERUNG UND AUSBLICK	93
6	ZUSAMMENFASSUNG DER STUDIE, ABSTRACT	94
7	VORABVERÖFFENTLICHUNG DER DATEN	95
8	LITERATURVERZEICHNIS	96
9	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	103

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Allgemein bekannte Abkürzungen (z.B. Maßeinheiten) wurden wie im deutschen Sprachraum üblich verwendet und hier, ebenso wie chemische Formeln, nicht aufgeführt. Abkürzungen in Abbildungen und Tabellen wurden, um eine vom Text unabhängige Betrachtung zu ermöglichen, in der Unterschrift des jeweiligen Elements erneut erklärt. Personenbezogene Formulierungen in der männlichen Form (z.B. Patient) schließen ausdrücklich beide Geschlechter ein.

A	Fläche unter der Kurve (Area)
A. dest.	Aqua destillata
ABC	Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex (Avidin-Biotin-Peroxidase Complex)
AEC	Aminoethylcarbazol
AP	Alkalische Phosphatase
APC	Allophycocyanin
APZ	Antigenpräsentierende Zelle
B6	C57BL/6
BHS	Blut-Hirn-Schranke
CA	Kalifornien (California)
CD	Cluster of Differentiation
CFA	Komplettes Freund-Adjuvans (Complete Freund's Adjuvant)
CT	Connecticut
Cy	Cyanin
DAB	Diaminobenzidin
DAPI	Diamidinphenylindol
DFZ	Durchflusszytometrie
DGN	Deutsche Gesellschaft für Neurologie
EAE	Experimentelle autoimmune Encephalomyelitis
EBV	Epstein-Barr-Virus
EDSS	Expanded Disability Status Scale
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ELISPOT	Enzyme-linked Immuno Spot Assay
ENS	Enterisches Nervensystem
FACS	Fluorescence-activated Cell Sorter
FCS	Fetales Kälberserum (Fetal Calf Serum)
FDC	Follikulär dendritische Zelle (Follicular Dendritic Cell)
FSC	Vorwärtsstreuung (Forwardscatter)
FTY720P	FTY720-Phosphat
GOD	Glucoseoxidase
H	Höhe des Impulses (Height)
HE	Hämatoxylin-Eosin
HEV	Hochendotheliale Venole
HLA	Humanes Leukozytenantigen-System
HRP	Meerrettichperoxidase (Horseradish Peroxidase)
IF	Immunfluoreszenz
IFA	Inkomplettes Freund-Adjuvans (Incomplete Freund's Adjuvant)
IFN- β	Interferon- β
Ig	Immunglobulin
IHC	Immunhistochemie

IL	Interleukin, Illinois
IN	Indiana
KI	Konfidenzintervall
KIS	Klinisch isoliertes Syndrom
KO	Knock-out
LTI	Lymphoid Tissue Inducer Cells
MA	Massachusetts
MAdCAM-1	Mucosal Addressin Cell Adhesion Molecule-1
MBP	Myelin-Basisches-Protein
MD	Maryland
MN	Minnesota
MO	Missouri
MOG	Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein
MRT	Magnetresonanztomographie
MRZ	Masern-, Röteln-, Varizella-Zoster-Virus
MS	Multiple Sklerose
MW	Mittelwert
NGS	Normales Ziegenserum (Normal Goat Serum)
NJ	New Jersey
NrbS	Normales Kaninchenserum (Normal Rabbit Serum)
NY	New York
OD	Optische Dichte
OH	Ohio
OKB	Oligoklonale Banden
OR	Oregon
p	Signifikanzwert (Probability Value)
PA	Pennsylvania
PAP	Peroxidase-anti-Peroxidase-Komplex
PB	Phosphatpuffer (Phosphate Buffer)
PBMC	Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (Peripheral Blood Mononuclear Cells)
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (Phosphate-buffered Saline)
PerCP	Peridinin Chlorophyll Protein
PFA	Paraformaldehyd
PLP	Proteolipidprotein
PML	Progressive multifokale Leukenzephalopathie
PNAd	Peripheral Lymph Node Addressin
PPMS	Primär progrediente MS (Primary progressive MS)
PTX	Pertussis-Toxin
RBC	Erythrozyten-Lyse (Red Blood Cell Lysis)
RRMS	Schubförmig remittierende MS (Relapsing-remitting MS)
r_s	Spearman's Rangkorrelationskoeffizient
RT	Raumtemperatur
S1P	Sphingosin-1-Phosphat
S1PR	Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptor(en)
SD	Standardabweichung (Standard Deviation)
SLO	Sekundär lymphatisches Organ
SPK	Sphingosin-Kinase
SPMS	Sekundär progrediente MS (Secondary progressive MS)
SSC	Seitwärtsstreulicht (Sidescatter)
T_H	T-Helfer
TLO	Tertiär lymphatisches Organ
TMB	Tetramethylbenzidin
TNTC	Too numerous to count
VCI	Vena cava inferior
VLA	Very Late Antigen
W	Breite des Impulses (Width)
WA	Washington
ZNS	Zentrales Nervensystem

1 EINLEITUNG

1.1 Multiple Sklerose

1.1.1 Epidemiologie und Ätiologie

Als Multiple Sklerose (MS, *Encephalomyelitis disseminata*) wird eine chronisch-entzündliche und nicht kurativ behandelbare Autoimmunerkrankung des zentralen Nervensystems (ZNS) bezeichnet. Durch Demyelinisierung, Zerstörung von Neuronen und Bildung von sklerotischen Plaques kommt es im Verlauf zu neurologischen Ausfällen und bleibender Behinderung. In Deutschland sind etwa 200.000 Menschen von einer MS betroffen, 70 % davon sind weiblich [1]. Mit einem Durchschnittsalter von ca. 31 Jahren bei Krankheitsbeginn trifft die Erkrankung hauptsächlich junge Erwachsene und stellt die häufigste Ursache für chronische Behinderung in dieser Bevölkerungsgruppe dar [2, 3]. Da nach 13 Krankheitsjahren nur noch 28 % der Patienten in Vollzeit berufstätig sind, zeigt sich neben den persönlichen Schicksalen auch eine immense sozioökonomische Dimension der MS [2].

Die Ursachen der Erkrankung sind bisher weitgehend ungeklärt. Diskutiert werden sowohl genetische als auch Umweltfaktoren: Auf der einen Seite weisen erstgradig Verwandte von MS-Patienten ein 25-fach, monozygote weibliche Zwillinge sogar ein 170-fach höheres Erkrankungsrisiko auf als die Normalbevölkerung [4]. In einer kanadischen Adoptionsstudie entwickelte sich bei n = 1.201 nicht-natürlichen Verwandten ersten Grades (Eltern, Geschwister, Kinder) von Index-Patienten nur ein einziger Fall von MS. Dies war vergleichbar mit der Prävalenz in der Normalbevölkerung und deutlich unter dem erwartbaren Risiko für biologische Verwandte, was die Autoren zu dem Schluss führte, dass weder eine infektiöse Ursache noch das häusliche Umfeld für die familiäre Häufung der MS verantwortlich sein könne [5]. Eine Assoziation mehrerer Allele des humanen Leukozytenantigen-Systems (HLA) mit einem erhöhten MS-Risiko wurde überdies in der Literatur mehrfach beschrieben [6]. Andererseits besteht ein deutliches und nicht durch Populationsgenetik allein erklärbares Gefälle auf der nördlichen Hemisphäre mit hoher MS-Prävalenz in Nordeuropa und Nordamerika und kaum auftretender Erkrankung in Äquatornähe, was zu der

Hypothese führte, Sonnenlicht und damit Vitamin D könne positive bzw. protektive Effekte auf die Erkrankung haben [6, 7]. Deseilligny und Souberbielle fanden zum Beispiel in der Literatur mehrfach die Beobachtung niedriger Vitamin D-Spiegel im Blut von MS-Patienten [8]. Migranten unter 15 Jahren übernahmen das geringere Risiko der neuen Heimat, wenn sie von einer Region mit hoher MS-Prävalenz in eine mit niedriger auswanderten. Bei einem Alter über 15 Jahren änderte die Migration dagegen nichts am Erkrankungsrisiko [9]. Eine geringere Exposition gegenüber Krankheitserregern in der Kindheit in Industriegesellschaften und einhergehend ein höheres Risiko für spätere Autoimmunerkrankungen wurde ebenso wie Ernährungsgewohnheiten oder hormonelle Einflüsse (höhere Prävalenz bei Frauen, weniger MS-Schübe während einer Schwangerschaft) im Zusammenhang mit MS diskutiert [6]. Interessanterweise gibt es auch in Deutschland ein bisher unerklärtes West-Ost-Gefälle mit niedrigerer MS-Prävalenz in den neuen Bundesländern [1]. Bei der Diskussion um infektiöse Trigger der MS spielt das Epstein-Barr-Virus (EBV) eine zentrale Rolle. Nicht nur waren in einer Studie 100 % der untersuchten MS-Patienten seropositiv gegenüber EBV (im Vergleich dazu nur 90 % der gesunden Kontroll-Probanden), eine EBV-Reaktivierung war außerdem mit der Krankheitsaktivität der MS assoziiert [10]. Ergänzend wurde eine Korrelation EBV-spezifischer und Hirn-reaktiver B-Zellen im Blut von MS-Patienten beschrieben. Dieser Zusammenhang war allerdings nur in Remission nachweisbar, vermutlich weil die Immunzellen während eines akuten Schubes im ZNS akkumulierten [11]. Die Fähigkeit des Virus infizierte B-Zellen zur Proliferation anzuregen, wurde als Erklärung für B-Zell-Ansammlungen (Kapitel 1.4) im ZNS von MS-Patienten diskutiert [12].

Die Zusammenschau dieser durchaus kontroversen Studienergebnisse deutet am ehesten darauf hin, dass im Sinne einer multifaktoriellen Genese genetisch anfällige Individuen bei Exposition gegenüber entsprechenden Umweltfaktoren das höchste Risiko aufweisen eine MS zu entwickeln.

1.1.2 Klinik, Stadien und Verlaufsformen

Da alle Bereiche des ZNS betroffen sein können, manifestiert sich eine MS von Patient zu Patient mitunter sehr verschieden [13]. Würde man trotzdem versuchen den „klassischen“ Lehrbuchpatienten zu beschreiben, bestünde als typisches Erstsymptom im Rahmen einer Optikusneuritis eine Visusminderung mit schmerzhafter Augenbewegung. Weitere Frühsymptome können u.a. eine Störung der Okulomotorik (z.B. Abduzensparese), Sensibilitätsstörungen (z.B. positives Lhermitte-Zeichen bei spinaler Läsion: Kribbelparästhesien bei Nackenbeugung) oder Fatigue sein [13]. Im Verlauf ist eine motorische Schwäche der Extremitäten häufig, die bis zur spastischen Paraparese und zum Funktionsverlust führen kann. Bei Befall des Kleinhirns (Zerebellum) kann es u.a. zu einer Ataxie und zum Aktionstremor kommen. Des Weiteren sind Sexual-, Blasen- oder Mastdarmentleerungsstörungen möglich und psychopathologische Veränderungen bei der Mehrzahl der Patienten vorhanden (z.B. Gedächtnisdefizite) [13]. In einer multizentrischen, deutschen Querschnittstudie waren 6 % der MS-Patienten permanent an den Rollstuhl gebunden [2]. Die Einschränkung in den verschiedenen Funktionssystemen (Pyramidenbahn, Visus, Sensibilität, Kleinhirn etc.) wird mit besonderer Gewichtung der Gehfähigkeit zur klinisch weit verbreiteten *Expanded Disability Status Scale* (EDSS) zusammengefasst, die versucht die Stadien bzw. den Schweregrad der Erkrankung von 0 (normale Neurologie) bis 10 (Tod durch MS) widerzuspiegeln. Ab einem EDSS von 4, der im Mittel nach 6 Krankheitsjahren erreicht wird, machen sich Einschränkungen in der Mobilität bemerkbar, ab einem EDSS von 7 (durchschnittlich nach 30 Krankheitsjahren) sind die Patienten weitestgehend an den Rollstuhl gebunden [13].

Klassischerweise werden drei Verlaufsformen der MS aufgeführt: Bei 85 % der Patienten beginnt die Krankheit schubförmig (RRMS), wobei ein Schub durch eine Symptomverschlechterung über mindestens 24 Stunden definiert wird, die nicht durch eine erhöhte Körpertemperatur (Uhthoff-Phänomen, z.B. im Rahmen eines Infektes oder heißen Bades) bedingt ist und sich teilweise oder vollständig zurückbildet. Zwischen zwei Schüben, die *per definitionem* einen Abstand von mindestens 30 Tagen zueinander haben müssen, darf sich der klinische Zustand

überdies nicht verschlechtern [3, 13]. Bei etwa der Hälfte dieser RRMS-Patienten treten die Schübe nach mehreren Jahren zugunsten eines sekundär progredienten Krankheitsverlaufes mit kontinuierlich zunehmender Symptomverschlechterung in den Hintergrund (SPMS) [13]. Die restlichen 15 % der Betroffenen weisen bereits zu Beginn ihrer Erkrankung einen primär progredienten Verlauf ohne Schübe mit zunehmender Behinderung über Monate auf (PPMS) [13, 14]. Epidemiologisch unterscheidet sich die PPMS außerdem von der RRMS: Es zeigt sich kein Häufigkeitsunterschied zwischen den Geschlechtern und die Patienten erkranken i.d.R. später (etwa 40. Lebensjahr) [14].

1.1.3 Diagnose und Therapie

Neben der neurologischen Untersuchung und einer elektrophysiologischen Latenzverzögerung bei verschiedenen evozierten Potenzialen, spielt die kraniale Magnetresonanztomographie (MRT) eine wichtige diagnostische Rolle. Periventrikuläre Entmarkungsherde, (sub-) kortikale, infratentorielle, zerebelläre oder spinale Läsionen charakterisieren dabei typische Befunde [13, 15]. In der Liquordiagnostik finden sich neben einer lymphozytären Pleozytose ein erhöhter Liquor/Serum-Immunglobulin (Ig) G-Index und bei 95 % der MS-Patienten oligoklonale Banden (OKB) bei der Elektrophorese, wobei es sich um intrathekal produziertes IgG handelt [13, 15]. Bei 90 % der Patienten gelingt überdies der Nachweis einer IgG-Produktion gegen das Masern-, Röteln- und Varizella-Zoster-Virus im ZNS (MRZ-Reaktion) [15]. Für die Diagnosestellung haben sich die McDonald-Kriterien bewährt. Diese wurden zuletzt 2017 revidiert und vereinfacht [16]. Wie in den vorherigen Versionen wird eine räumliche und zeitliche Dissemination gefordert: Die klinische Beobachtung mindestens zweier Schübe und unterschiedlicher Manifestationsorte qualifiziert dabei ebenso zur Diagnose MS wie beispielsweise ein Schub mit mehreren klinisch objektivierbaren Läsionen und dem gleichzeitigen Nachweis von Gadolinium-anreichernden und nicht-anreichernden Läsionen in der MRT [16]. Bei Erstmanifestation charakteristischer Symptome konnte eine MS nach den alten Kriterien u.U. noch nicht diagnostiziert werden (Fehlen der zeitlichen Dissemination). Bei diesem sogenannten klinisch isolierten Syndrom (KIS) ist es

allerdings im Sinne des frühen Therapiebeginns mittlerweile möglich eine Diagnose zu forcieren: Dazu bedarf es einer typischen Symptomatik, der örtlichen Dissemination in Klinik oder Bildgebung und liquorspezifischen OKB [16]. Bei ca. 50 % der KIS-Patienten entwickelt sich im Verlauf eine manifeste MS [15], wobei ein positiver Liquorbefund einen Prädiktor darstellt [16].

Die an dieser Stelle vereinfacht wiedergegebene, medikamentöse Stufentherapie der MS bezieht sich auf die Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Neurologie (DGN) aus dem Jahr 2014 [14]. Um unter anderem der aktuellen Revision der McDonald-Kriterien in der Leitlinie Rechnung zu tragen, ist wohl noch in diesem Jahr mit einer überarbeiteten Fassung zu rechnen [17]. Die medikamentöse Therapie ist als Baustein eines multimodalen Therapiekonzeptes (z.B. ergänzt durch Physiotherapie, psychologische Unterstützung, Ergotherapie, Antispastika) zu verstehen [14]. Leitliniengerecht sind als akute Schubtherapie hauptsächlich hochdosierte Glukokortikoide vorgesehen [14]. Moderate Verläufe einer RRMS werden im Wesentlichen verlaufsmodifizierend mit Immunmodulatoren wie Interferon- β (IFN- β), Glatirameracetat, Dimethylfumarat oder Teriflunomid therapiert. Bei hoch-aktiven Verläufen einer RRMS wird bevorzugt der gegen das *Cluster of Differentiation* (CD) 52 gerichtete Antikörper Alemtuzumab, der gegen das *Very Late Antigen* (VLA) 4 gerichtete Antikörper Natalizumab oder das in dieser Arbeit untersuchte Fingolimod (FTY720) verwendet (Kapitel 1.2) [14]. Seit Anfang 2018 ist auch der anti-CD20 Antikörper Ocrelizumab für die Therapie der RRMS in der Europäischen Union zugelassen. Dieser Antikörper kann sogar zur Behandlung der PPMS, für die zuvor keine medikamentösen Optionen verfügbar waren, eingesetzt werden (Kapitel 1.1.4.1) [18]. Fingolimod zeigte dagegen bei der PPMS in einer randomisierten und doppelblinden Phase III-Studie (INFORMS) mit n = 823 Patienten keinen Vorteil verglichen mit Placebo [19].

Das therapeutische Konzept der SPMS basiert in der Leitlinie v.a. auf IFN- β und dem Immunsuppressivum Mitoxantron [14]. Im März 2018 erschien außerdem die lange erwartete EXPAND-Studie, die die Nachfolgesubstanz von FTY720, Siponimod (BAF312), in einer doppelblinden, Placebo-kontrollierten Phase III-Studie an n = 1.645 SPMS-Patienten in 31 Ländern testete [20]. Signifikant

weniger Patienten zeigten in der Siponimod-Gruppe nach 3 und 6 Monaten einen Fortschritt der Behinderung im Vergleich zur Placebo-Behandlung. Bei ähnlichem Nebenwirkungsprofil wie Fingolimod (Kapitel 1.2.4), konnte Siponimod darüber hinaus in der MRT den Verlust an Hirnvolumen minimieren [20]. Weniger Patienten entwickelten Gadolinium-anreichernde T1-Läsionen und auch bezüglich der Anzahl an neuen oder vergrößerten Läsionen in der T2-Wichtung war die Placebo-Gabe unterlegen. Interessanterweise zeigte sich jedoch bei einem Gehstest über 25 Meter nach 3 Monaten kein Unterschied zwischen den Gruppen, was laut Autoren aber daran liegen könnte, dass mehr als die Hälfte der Patienten zu Studienbeginn bereits auf Gehhilfen angewiesen war [20]. Als Konsequenz aus den EXPAND-Ergebnissen ist die Zulassung von Siponimod für die SPMS in Zukunft zu erwarten.

1.1.4 Pathogenese und Immunologie

Die Immunologie der MS ist bis heute nur in Teilen verstanden und Gegenstand lebhafter Diskussionen. Ein Grund dafür könnte sein, dass zum Zeitpunkt einer MS-Diagnose die Immunprozesse schon lange angelaufen sind und sich die frühen Meilensteine der Pathogenese so weitgehend den Forschern entziehen [21]. Ein großer Teil des heutigen Verständnisses basiert deshalb auf Tiermodellen der MS (Kapitel 1.3), die nur bedingt auf den Menschen zu übertragen sind [13]. Während im Stadium der RRMS hauptsächlich inflammatorische Prozesse für die Schübe verantwortlich sind, stehen im weiteren Krankheitsverlauf bei der SPMS Demyelinisierung, axonaler Schaden mit Neuronenverlust und Hirnatrophie im Vordergrund [6, 13, 22]. Akute Herde beim Menschen sind hauptsächlich durch perivaskuläre und an T-Zellen reiche Infiltrate gekennzeichnet [13, 23], wohingegen intrameningeale und lymphoid aktive B-Zell-Ansammlungen eher ein Merkmal der SPMS darstellen (Kapitel 1.4) [24 - 26].

Vermutlich verläuft die Immunpathogenese in folgenden, vereinfachten Schritten: Ein unspezifischer Entzündungsprozess (*bystander activation*) oder eine Kreuzreaktion aus körpereigenen und fremden Strukturen, wie z.B. viralen Proteinen (*molecular mimicry*), führt in der Peripherie zur Bildung von autoreaktiven T-Zellen, die von einer antigenpräsentierenden Zelle (APZ)

aktiviert werden [6, 22]. Die Kontrolle durch regulatorische T-Zellen ist dabei fehlgeleitet und es kann keine Immuntoleranz vermittelt werden [13]. Den aktivierten T-Zellen gelingt es nun die Blut-Hirn-Schranke (BHS) zu überwinden (Transmigration) und das ZNS zu infiltrieren [22]. Die CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen werden am Zielort von Mikrogliazellen erneut aktiviert und attackieren durch proinflammatorische Zytokine bzw. durch die Stimulation von z.B. Makrophagen die Myelinscheide („Pattern I“-Läsion) [22, 27]. Durch Interleukine (IL) werden überdies B-Zellen zur Produktion von spezifischen Auto-Antikörpern angeregt, die ihrerseits die Myelinscheide schädigen bzw. durch die Aktivierung der Komplementkaskade zur Entmarkung beitragen können („Pattern II“-Läsion) [22, 27]. Wahrscheinliche Antigene der Myelinscheide sind dabei u.a. das Myelin-Basische-Protein (MBP), das Proteolipidprotein (PLP) oder das Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein (MOG) [6, 21]. Da die Remyelinisierung unzureichend bleibt, kommt es im Verlauf zu axonaler Degeneration und einer sklerotischen Narbe (namensgebend für die Erkrankung) [22, 23].

Entgegen der lange gültigen Annahme, eine MS sei auf das ZNS beschränkt, bestehen erste Hinweise, dass auch das enterische Nervensystem (ENS) betroffen sein könnte: Nicht nur zeigen viele Patienten gastrointestinale Symptome, es wurden beispielsweise auch Autoantikörper gegen ENS-Antigene im Plasma von Patienten gefunden, während diese bei einem Kontrollkollektiv fehlten [28]. In Kolon-Gewebeproben von MS-Patienten konnte im Gegensatz zu den Kontrollen eine ENS-Degeneration festgestellt werden und im Mausmodell war eine ENS-Beteiligung sogar noch vor Einsetzen der neurologischen Symptomatik zu beobachten [28].

1.1.4.1 Die Rolle der B-Zellen

Das derzeitige Interesse an der B-Zell-orientierten MS-Forschung gründet sich auf einige klinische und experimentelle Beobachtungen: Patienten mit einem KIS wiesen im Liquor klonal expandierte B-Zellen und eine somatische Hypermutation in den variablen Ig-Schwerketten-Genen auf [29]. Sowohl die Vermehrung der B-Zellen als auch die Affinitätsreifung waren Ausdruck einer adaptiven Immunantwort und deuteten auf eine Beteiligung der B-Zelle schon im Anfangsstadium einer MS hin [29]. Bei zehn von 13 KIS-Patienten mit klonal

expandierten, intrathekalen B-Zellen entwickelte sich innerhalb von 6 Jahren eine definite MS [29]. Außerdem impliziert der regelhafte diagnostische Nachweis von Antikörpern, die im ZNS produziert wurden (OKB), ein günstiges Milieu für B- und Plasmazellen, um im ZNS von MS-Patienten zu überleben und zu proliferieren [30]. Des Weiteren stellten „Pattern II“-Läsionen (Antikörperablagerung und Komplementaktivierung, Kapitel 1.1.4) in einer Untersuchung von 83 Gewebeproben die häufigste Form der Demyelinisierung dar [27]. Passenderweise sprach dieser Läsionstyp auch am besten auf eine therapeutische Plasmapherese (Antikörperextraktion) an [31, 32]: Dieses Verfahren verbesserte bei 55 % der Patienten mit „Pattern II“-Läsionen die klinische Symptomatik und bei 40 % den EDSS [32]. Bei der Untersuchung von mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC) von 67 MS-Patienten konnten darüber hinaus bei 79 % ZNS-reaktive B-Zellen gefunden werden, während dies in der Kontrollgruppe nicht der Fall war [33].

Nicht überraschend zeigten also auch Studien zur B-Zell-Depletion therapeutische Erfolge bei der MS: Der chimäre anti-CD20 Antikörper Rituximab verminderte im Vergleich zu Placebo bei RRMS-Patienten (n = 104) die inflammatorischen Hirn-Läsionen und die Schübe [34]. Der neuere humanisierte anti-CD20 Antikörper Ocrelizumab zeigte sich ebenfalls bei der RRMS im Vergleich zu einer Placebo- und IFN- β -Behandlung überlegen [35, 36]. Während der Verlauf einer PPMS durch Rituximab nicht signifikant beeinflusst werden konnte [37], erwies sich eine Ocrelizumab-Behandlung auch bei dieser Verlaufsform als vorteilhaft: In der randomisierten, Placebo-kontrollierten ORATORIO-Studie (n = 732) wurde das Fortschreiten der Behinderung und die Progression im MRT-Befund der PPMS-Patienten verlangsamt [38].

Zusammenfassend geht die Rolle der B-Zelle wohl über die oben beschriebene humorale Funktion hinaus (Kapitel 1.1.4). B-Zellen fungieren als APZs für autoreaktive T-Zellen, können diese stimulieren und in das ZNS locken, nachdem sie selbst über die entzündlich geschädigte BHS gelangt sind [6]. Für die Migration und die Aggregation im entzündeten ZNS spielen anziehende Chemokine wie z.B. CXCL13 eine entscheidende Rolle (Kapitel 2.4.3) [12, 39]. Die B-Zelle agiert vermutlich als Verbindungsglied zwischen dem humoralen und

zellulären Schenkel des Immunsystems [13], so dass die Pathogenese am ehesten auf einem Zusammenspiel aus gestörter B-Zell-Aktivierung und T-Zell-vermittelter Immunantwort basiert [12]. Weitere Argumente für einen zentralen Stellenwert der B-Zelle in der Pathogenese der MS finden sich in Kapitel 1.4.

1.2 Fingolimod

1.2.1 Meilensteine der Entwicklung

In der traditionellen chinesischen Medizin war der Pilz *Isaria sinclairii* bereits als Mittel für die ewige Jugend bekannt, bevor für sein Stoffwechselprodukt ISP-I (Myriocin) eine starke immunsuppressive Wirkung beschrieben wurde [40]. Nach chemischen Vereinfachungen mit dem Hintergedanken die Toxizität und die pharmakologischen Eigenschaften dieser Ausgangssubstanz zu verbessern, konnte FTY720 im Jahr 1992 zum ersten Mal synthetisiert werden [41, 42]. Ein Jahrzehnt später wurde dann, gerade im Hinblick auf einen Einsatz in der Transplantationsmedizin, ein Wirkmechanismus für die phosphorylierte Form von Fingolimod (FTY720P) beschrieben: Strukturelle Ähnlichkeit zu Sphingosin-1-Phosphat (S1P) und Modulation der Lymphozyten-Zirkulation durch Bindung an S1P-Rezeptoren (S1PR, Kapitel 1.2.3) [43]. Da eine Kombinationstherapie mit Fingolimod bei Patienten nach Nierentransplantation dem Standardtherapieschema gegenüber allerdings nicht überlegen war, im Gegenteil sogar ein ungünstigeres Nebenwirkungsprofil aufwies, wurde dieses Einsatzgebiet wieder verlassen [44, 45]. Im Jahr 2010 wurde FTY720 dann unter dem Handelsnamen Gilenya in Europa und den USA als erstes orales Medikament überhaupt zur Behandlung der RRMS zugelassen [46].

1.2.2 S1P und S1PR

S1P ist überwiegend das Produkt der ubiquitär vorkommenden Sphingosin-Kinase (SPK) 1 und wirkt über G-Protein gekoppelte Rezeptoren (S1PR₁₋₅) auf verschiedene Zelltypen (u.a. Lymphozyten, Neurone, Astrozyten, Mikroglia und Oligodendrozyten) [42, 47]. S1P ist somit in viele Signalwege, z.B. in Proliferation, Zell-Zell-Kontakte, Differenzierung oder in das Überleben der betreffenden Zelle eingebunden [48]. Gerade im ZNS kommt es in hoher

Konzentration vor [49] und wirkt zum Beispiel über S1PR₁ chemoattraktiv auf neurale Stamm- und Progenitorzellen bei Rückenmarksverletzungen [50]. Fingolimod wird dagegen vorwiegend durch die SPK 2 zum S1P-Analogen FTY720P phosphoryliert (Abbildung 1 A, B) und bindet ebenfalls an vier der fünf S1P-Rezeptoren (S1PR_{1,3-5}) [43, 51]. Die Nachfolgesubstanz Siponimod (Kapitel 1.1.3, Kapitel 4.4) vermittelt ihre Effekte dagegen nur über die S1PR_{1,5} und ist somit noch selektiver [52].

1.2.3 Wirkmechanismen und Pharmakologie

Durch die Retention von zirkulierenden Lymphozyten in den sekundär lymphatischen Organen (SLOs) sorgt Fingolimod für eine Abnahme der Lymphozytenzahl im peripheren Blut und hindert somit auch die autoreaktiven Immunzellen daran ins ZNS zu gelangen und dort Schaden zu verursachen [47]. Physiologisch herrscht im Blut und der Lymphe eine hohe, im Lymphknoten dagegen eine niedrige S1P-Konzentration, woraus ein auswärts gerichteter S1P-Gradient resultiert [53]. Zirkulierende Lymphozyten (mit herunterreguliertem S1PR₁) gelangen auf der Suche nach ihrem spezifischen Antigen irgendwann in einen Lymphknoten. Der Übertritt aus einer hochendothelialen Venole (HEV) in das lymphatische Gewebe basiert dabei auf einem komplexen Zusammenspiel aus Integrinen, Selektinen und Chemokin-Rezeptoren und ist nicht vom S1P-Gradienten abhängig [53]. Im SLO treffen die Lymphozyten entweder kein passendes Antigen an und regulieren nach einiger Zeit den S1PR₁ hoch oder sie werden von einer APZ aktiviert. In diesem Falle wird der S1PR₁ zuerst weiter herunterreguliert. Dadurch wird die Immunzelle unempfindlich für den S1P-Gradienten und verbleibt im Zuge der Proliferation und Differenzierung im Lymphknoten, bevor im Anschluss der S1PR₁ auf der Zelloberfläche reexprimiert wird. In beiden Szenarien kann der Lymphozyt dann dem S1P-Gradienten folgend das lymphatische Gewebe wieder verlassen (Abbildung 1 C) [47, 48, 54]. FTY720P ist u.a. ein S1PR₁-Modulator: Einerseits stößt es, ebenso wie S1P, initial eine intrazelluläre Signalkaskade und anschließend die Internalisierung des Rezeptors an (Agonismus), andererseits bewirkt FTY720P eine Degradierung des Rezeptors im Proteasom (funktioneller Antagonismus), während eine S1P-Bindung zum Recycling des S1PR₁ führt [48]. Ein Lymphozyt ohne S1PR₁ auf der

Zelloberfläche ist in der Folge nicht mehr in der Lage, anhand des S1P-Gradienten aus dem lymphatischen Organ auszuwandern (Abbildung 1 D) [55]. Prinzipiell gilt dieser Mechanismus sowohl für T- als auch B-Zellen [48, 54].

Es wird vermutet, dass S1PR-abhängige Signalwege bei neurodegenerativen Erkrankungen einen wichtigen Stellenwert haben [56]. So exprimieren beispielsweise Astrozyten in MS-Läsionen vermehrt die S1PR_{1,3} auf ihrer Zelloberfläche [57]. Da die verschiedenen S1PR auch in vielen anderen Nervenzellen eine Rolle spielen (Kapitel 1.2.2), stehen als Wirkmechanismus neben oben beschriebener Umverteilung der Lymphozyten auch direkte Effekte von FTY720P auf das ZNS zur Diskussion: Tierversuche zeigten, dass sich das lipophile Fingolimod über die BHS im Gehirn verteilen [58] und dort phosphoryliert werden kann (endogene SPK 2) [59]. In verschiedenen *in vitro* und *in vivo* Versuchsansätzen konnte FTY720 darüber hinaus neuroprotektiv und direkt anti-inflammatorisch wirken [57, 60]. Fingolimod verminderte zum Beispiel die Apoptose von menschlichen Oligodendrozyten-Vorläuferzellen deutlich [61] und verbesserte über die S1PR_{3,5} *in vitro* die Remyelinisierung [62]. Eine definitive Klärung einer direkten Wirkung von Fingolimod im menschlichen ZNS bedarf letztlich allerdings weiterer Studien.

Beim Menschen werden in der Regel 0,5 mg Fingolimod täglich oral verabreicht, die Bioverfügbarkeit ist mit 93 % hoch und die Halbwertszeit beträgt 6 - 9 Tage [46]. Das Medikament wird unter anderem über die Leber (Cytochrom P 4F2) verstoffwechselt (Anpassung der Dosis bei gestörter Leberfunktion) und anschließend renal eliminiert [46].

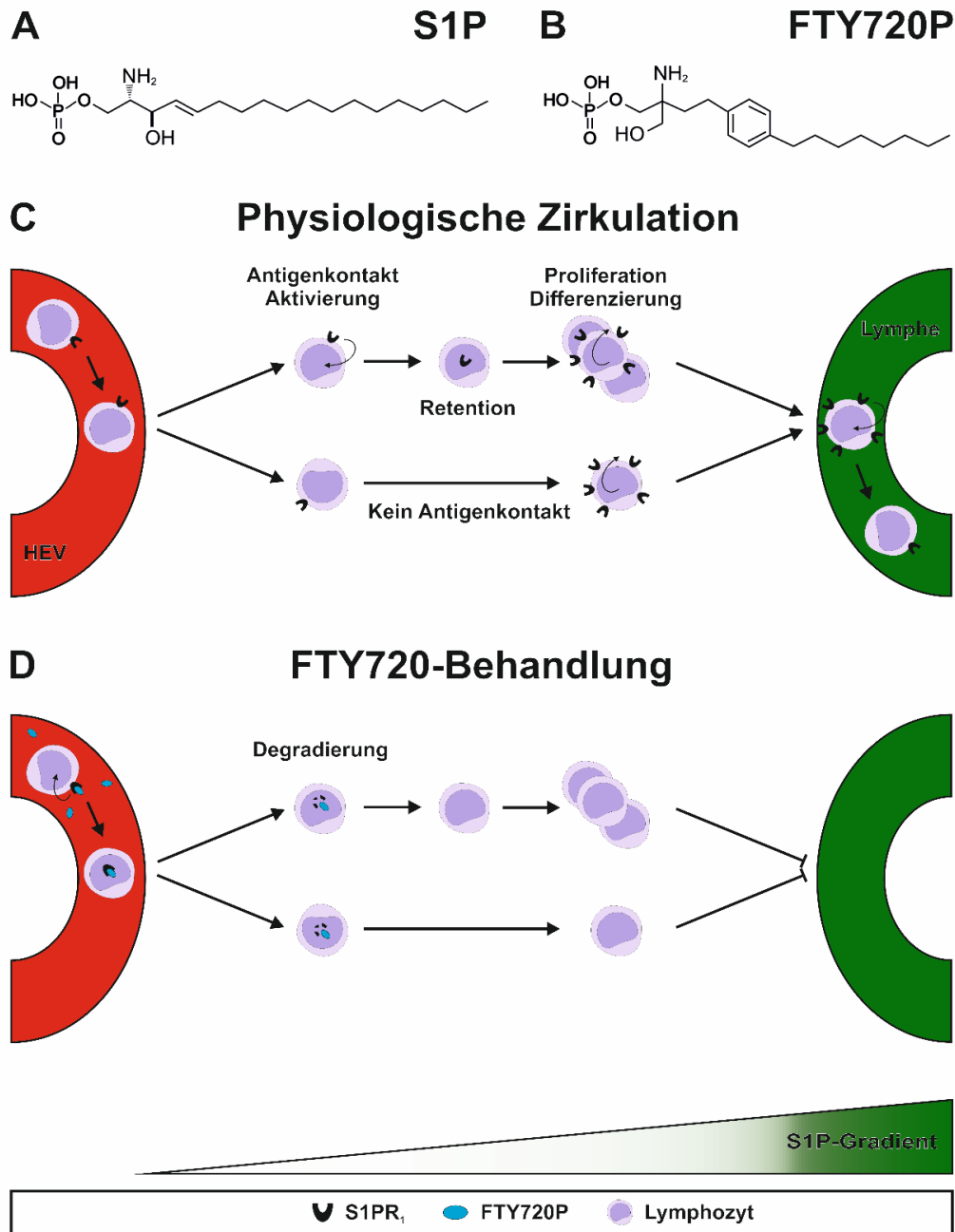


Abbildung 1: Struktur und Wirkmechanismus von Fingolimod. **A, B)** Strukturelle Ähnlichkeit zwischen S1P und FTY720P. **C)** Vereinfachte physiologische Zirkulation eines Lymphozyten durch einen Lymphknoten. Da S1P in der Lymphe in hoher und im Lymphknoten in niedriger Konzentration vorliegt, verlässt der Lymphozyt nach Hochregulation des S1PR₁ dem Gradienten folgend das SLO mit der efferenten Lymphe. Antigenkontakt führt zuvor zu einer Herunterregulierung des Rezeptors, womit der Lymphozyt für die Zeit der Proliferation und Differenzierung dem Gefälle gegenüber unsensibel wird und im SLO verbleibt. **D)** Weil Fingolimod zu einer Internalisierung und Degradierung des S1PR₁ führt, verhindert es den S1P-getriebenen Lymphozytenegress. Abbildung basierend auf einer Grafik aus [47]. Übernahme der Molekülstrukturen mit freundlicher Genehmigung von Prof. Dr. Jerold Chun. FTY720P, FTY720-Phosphat; HEV, Hochendotheliale Venole; S1P, Sphingosin-1-Phosphat; S1PR, Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptor; SLO, Sekundär lymphatisches Organ.

1.2.4 Zulassungsstudien und therapeutischer Stellenwert

Im Jahr 2010 wurden zwei randomisierte Phase III-Doppelblind-Studien veröffentlicht, die die Wirksamkeit einer Fingolimod-Behandlung bei RRMS-Patienten belegten: In der auf 24 Monate ausgelegten FREEDOMS-Studie (n = 1.033) wurde die FTY720-Therapie mit Placebo-Gabe verglichen. Unter täglicher Fingolimod-Einnahme war das Schubrisiko reduziert und die Zeit bis zum nächsten Schub verlängert. Ebenso schritt die Behinderung langsamer fort, es waren weniger Gadolinium-anreichernde Läsionen in der MRT zu sehen und der Verlust von Hirnvolumen war geringer als bei der Placebo-Gruppe [63]. Ähnliche Ergebnisse konnte die TRANSFORMS-Studie (n = 1.153) über 12 Monate beim Vergleich der Fingolimod- und IFN- β -Therapie liefern. Auch hier zeigten sich unter FTY720 weniger Schübe und ein geringerer Verlust an Hirnvolumen sowie weniger neue oder vergrößerte Gadolinium-anreichernde Läsionen in der MRT. In Bezug auf das Fortschreiten der Behinderung bestand dagegen kein Unterschied zwischen den beiden Therapieformen [64]. Da FTY720 bei der RRMS-Behandlung im Vergleich zu den beschriebenen Transplantations-Studien (Kapitel 1.2.1) in Monotherapie gegeben und geringer dosiert werden kann, stellt sich das Nebenwirkungsprofil deutlich vergünstigt dar [46]. Die Lymphopenie unter FTY720-Behandlung beruht auf einer reversiblen Umverteilung der Lymphozyten und nicht auf einer Depletion, wodurch das Infektionsrisiko im Gegensatz zu herkömmlichen Immunsuppressiva nur gering erhöht ist, zumal die Lymphknoten- und Lymphozytenfunktion, ebenso wie die humorale Abwehr, intakt bleiben (Kapitel 3.3.3) [48]. Auch sind die Effektor-Gedächtnis-T-Zellen, welche nicht durch die Lymphknoten zirkulieren, sondern in peripherem Gewebe eine direkte Antwort auf etwaige Pathogene ermöglichen, von FTY720 unbeeinträchtigt [65]. Trotzdem traten im FTY720-behandelten TRANSFORMS-Patientenkollektiv zwei Todesfälle aufgrund von Infektionen (Herpes-Simplex-Enzephalitis und primäre, disseminierte Varizella-Zoster-Infektion) auf, wobei in beiden Fällen zusätzlich Kortikosteroide verabreicht wurden [64]. Das Spektrum der unerwünschten Arzneimittelwirkungen in den beiden Zulassungsstudien umfasste ansonsten u.a. Leberwerterhöhungen, Makulaödeme, unkomplizierte Herpesvirusinfektionen und kardiovaskuläre

Nebenwirkungen (Hypertension, Atrioventrikulärer Block I° und II°, Bradykardie) [63, 64]. Als Konsequenz der häufigen Bradykardien zu Beginn der Therapie sollte ein Patient leitliniengerecht nach der ersten FTY720-Gabe für 6 Stunden am Monitor überwacht werden [14]. Auch wenn in den beiden Zulassungsstudien kein Zusammenhang zwischen FTY720-Therapie und malignen Erkrankungen beschrieben wurde (kleine n-Zahl), warnte ein Rote-Hand-Brief aus dem Jahr 2016 vor Fällen von Basalzellkarzinomen. Im gleichen Brief wurde über das Auftreten einer progressiven multifokalen Leukenzephalopathie (PML) unter Fingolimod-Behandlung berichtet [66].

Die hochaktive Verlaufsform der RRMS stellt derzeit die einzige Indikation für FTY720 dar, auch wenn der Einsatz bei anderen Krankheitsentitäten (z.B. Psoriasis, rheumatoide Arthritis, chronisch entzündliche Darmerkrankungen oder Sepsis) ebenfalls vorteilhaft sein könnte [46]. Die Zulassung von Fingolimod rückte neben den S1PR auch weitere Rezeptoren aus der Lysophospholipid-Familie in den Fokus klinischer Forschung, so dass das Medikament ein Wegbereiter für neuartige Therapieoptionen bei verschiedensten Krankheitsbildern werden könnte [52].

1.3 Experimentelle autoimmune Encephalomyelitis

1.3.1 Entwicklungsgeschichte

Der amerikanische Virologe Thomas Milton Rivers war Mitte der 1930er Jahre fasziniert von dem Phänomen, dass die damalige Tollwut-Vakzine (ZNS-Material infizierter Kaninchen) bei manchen Impfungen zu Lähmungen führte (*post-vaccinal encephalomyelitis*) [67]. Es gelang ihm daraufhin bei Rhesus-Affen durch Injektion von Hirnextrakten aus Kaninchen eine akute disseminierte Encephalomyelitis auszulösen [68, 69]. Jahre später beschleunigte die Einführung von Freund-Adjuvans bei Versuchen an Meerschweinchen die Induktion der experimentellen autoimmunen Encephalomyelitis (EAE), wobei das „A“ noch für „allergisch“ stand, die Bezeichnung, die in der damaligen Zeit einer Entzündung am nächsten kam [67]. Um das Jahr 1970 herum wurden Parallelen zwischen einer EAE und MS beschrieben [70, 71] und erst in den 1980er Jahren

setzte sich der relativ neue Begriff „autoimmun“ durch [67]. Heute ist die EAE bei multiplen Spezies anwendbar, darunter Ratten und verschiedene murine Stämme [72]. Sie ist deshalb so essentiell für die MS-Forschung, da es kaum möglich ist parallel zum Krankheitsverlauf aktuelle menschliche Hirngewebe-Proben für die Histopathologie zu gewinnen [73].

1.3.2 Klassische Modelle

Wie in Kapitel 1.3.1 schon angeklungen, lässt sich eine Autoimmunantwort gegen die Myelinscheiden z.B. in Nagern erzielen, wenn die Tiere mit verschiedenen ZNS-Antigenen und durch Adjuvantien verstärkt immunisiert werden (aktive EAE) [13]. Dieses Verfahren kann z.T. durch zusätzliche Injektion von Pertussis-Toxin (PTX), welches neben direkt stimulativen Effekten auf das Immunsystem die BHS für die Migration von autoreaktiven Lymphozyten öffnet, zuverlässiger und effektiver gemacht werden [74]. Es existiert eine Vielzahl an EAE-Modellen, die je nach der für sie charakteristischen Kombination aus Versuchstier und ZNS-Antigen verschiedene Teilaspekte der MS abbilden können: Die PLP-induzierte EAE in SJL/J-Mäusen verläuft beispielsweise schubförmig, während die MOG-induzierte EAE in Lewis N1-Ratten durch einen chronischen Verlauf gekennzeichnet ist. Wird die EAE in B10.PL-Mäusen durch MBP ausgelöst, erleiden die Tiere eine monophasische Krankheitsattacke, von der sie sich anschließend erholen [72]. Je nach Modell treten die Läsionen überdies an spezifischen Lokalisationen im ZNS auf und weisen z.T. neben der Infiltration auch eine demyelinisierende Komponente auf [73, 75]. Die meisten EAE-Modelle sind T-Zell-vermittelt, durch einen Transfer von autoreaktiven T-Zellen in ein gesundes Tier kann eine EAE sogar ausgelöst werden (passive EAE, *adoptive transfer EAE*) [13, 72].

Unbestritten sind EAE-Modelle in der Grundlagenforschung oder bei der Etablierung neuer Therapieoptionen (u.a. Fingolimod) äußerst hilfreich, dennoch können sie, ob der Vielschichtigkeit und Komplexität der MS, niemals alle Facetten der Erkrankung umfassen [72]. Das „beste“ EAE-Modell gibt es aus diesem Grund nicht, am ehesten ist die zielführende Kombination verschiedener Modelle der Realität am nächsten [76]. Es bleibt daher entsprechend schwierig

Ergebnisse aus den Tierversuchen auf den Menschen zu übertragen, bzw. direkte Schlüsse für die Klinik zu ziehen [73].

1.3.3 B-Zell-abhängige EAE

Elliot et al. führten 1997 das Fusionsprotein MP4 ein, das aus Abschnitten der beiden häufigsten Myelinantigene, MBP und PLP, besteht. Dies geschah unter der Vorstellung, dass die intravenöse Applikation von Antigenen eine gewisse Immuntoleranz erzeugen und damit MP4 (*tolerogenic protein*) einen therapeutischen Nutzen bei der MS haben könne [77]. Tatsächlich waren entsprechende EAE-Versuche an immunisierten SJL/J-Mäusen vielversprechend: Nicht nur konnte eine MP4-Behandlung den EAE-Beginn verhindern, sie verbesserte außerdem den klinischen Verlauf einer bestehenden EAE drastisch. In der gleichen Studie ließ sich durch MP4 bei gesunden SJL/J-Mäusen allerdings auch effektiv eine EAE induzieren [77].

Angesichts der gestiegenen Aufmerksamkeit für B-Zellen in der MS-Forschung (Kapitel 1.1.4.1) bei gleichzeitig fehlender B-Zell-Beteiligung in den klassischen EAE-Modellen (Kapitel 1.3.2) [72] entwickelten Kuerten et al. diese Erkenntnis weiter: Im Jahr 2006 stellten sie ein B-Zell-abhängiges, MP4-induziertes EAE-Modell in C57BL/6- (*Black 6-*, B6-) Mäusen vor [76]. Der beliebte B6-Hintergrund galt dabei aufgrund der einfachen Verfügbarkeit genetisch veränderter *knock-out* (KO) und *knock-in* Stämme als besonders praktisch [73, 75]. MP4 konnte in diesen Versuchen reproduzierbar einen schweren, chronifizierenden EAE-Verlauf in Wildtyp-Mäusen und verspätet in CD8-KO-Mäusen induzieren. B-Zell-defiziente Mäuse entwickelten im Vergleich dazu keine schwere EAE, CD4-KO-Mäuse waren gänzlich resistent gegenüber einer EAE-Induktion [76]. In späteren Versuchen konnte bei verschiedenen B-Zell-defizienten Stämmen durch MP4 keine EAE ausgelöst werden [78]. Nach Transfer von Myelin-reaktiven und MP4-spezifischen Antikörpern aus immunisierten Wildtyp-Tieren entwickelten die immunisierten B-Zell-defizienten Mäuse dagegen wiederum eine schwere EAE [78]. Diese Ergebnisse charakterisierten die neuartige MP4-EAE als T- und, als eines von nur sehr wenigen Modellen, B-Zell-abhängig und Antikörper-vermittelt [72, 76, 78]. Das histologische Bild der MP4-induzierten EAE war von perivaskulär gelegenen Infiltraten und im Verlauf von demyelinisierten Arealen

mit Verlust von Nervenfasern geprägt [76, 78]. Das Intervall vom Einsetzen der klinischen Symptomatik bis zum Übergang in ein chronisches Stadium einige Tage nach Erreichen des höchsten EAE-Scores (Kapitel 2.3.3) wurde und wird auch in dieser Arbeit als akute EAE definiert [75]. Die Infiltrate fanden sich im akuten Krankheitsstadium v.a. im Gehirn (meningeal und periventrikulär) und später auch im Rückenmark. Infiltrate im Kleinhirn waren erst 25 Tage nach Immunisierung nachweisbar und nahmen im Verlauf zu, während die Infiltration des Gehirns im chronischen EAE-Stadium wieder abnahm [75]. Ein weiteres charakteristisches Merkmal der MP4-induzierten EAE war die B-Zell-Aggregation im ZNS (Kapitel 1.4): Tertiär lymphatische Organe (TLOs) bildeten sich im EAE-Verlauf periventrikulär und im Rückenmark (Parenchym und Meningen), aber am häufigsten im Kleinhirn-Parenchym aus [79], weshalb auch in dieser Arbeit zerebelläres Gewebe untersucht wurde (Kapitel 2.2).

1.4 Lymphoide Neogenese im ZNS

Als primär lymphatische Organe gelten das Knochenmark und der Thymus, als SLOs die Lymphknoten, die Milz und Mukosa-assoziierte lymphatische Organe [80]. Gewebe, das chronischen Immunreaktionen ausgesetzt ist, wird von verschiedenen Immunzellen infiltriert, die sich, ähnlich wie in einem SLO, mit Ausbildung von B-Zell-Follikeln und T-Zell-Bereichen formieren können. Diese Gebilde werden dann TLOs oder ektopen lymphatische Strukturen genannt, der Vorgang lymphoide Neogenese [81]¹. Ebenso wie bei verschiedenen anderen Autoimmunkrankheiten (z.B. bei der rheumatoiden Arthritis oder der Hashimoto Thyreoiditis) konnte eine lymphoide Neogenese auch bei der MS, v.a. der SPMS, in Form von ektopen B-Zell-Follikeln im ZNS nachgewiesen werden [25, 81]. Die Terminologie ist hierbei uneinheitlich, umstritten und unscharf: Während manche Autoren auch beim MS-Patienten und der EAE von TLOs sprechen [79, 83],

¹ Diese gängigen Definitionen haben eine gewisse Inkonsistenz inne, da das Adjektiv „lymphoid“ eher die Bedeutung von „lymphähnlich oder lymphartig“ innehat, „lymphatisch“ dagegen impliziert eine tatsächliche Zugehörigkeit zum Lymphsystem („die Lymphe betreffend“) [82].

bevorzugen andere Arbeitsgruppen den Begriff B-Zell-Follikel (-ähnliche) Strukturen [84]. Im Prinzip beschreiben aber alle Bezeichnungen ektope B-Zell-Aggregate mit je nach Publikation leicht verschiedenen Kriterien: Kuerten et al. definierten beispielsweise eine T- und B-Zell-Kompartimentalisierung und den Nachweis von HEVs als TLO-Bedingung. Weitere fakultative Eigenschaften waren ein Netzwerk aus follikulären dendritischen Zellen (FDCs), retikuläre Fasern, Plasmazellen und der Nachweis von somatischen Hypermutationen im Keimzentrum. Erwähnt wurden außerdem lymphatische Chemokine, wie z.B. CXCL13 [79]. Die Evolution hin zum TLO wird als dynamischer Prozess verstanden: Aus spärlichen Lymphozyten-Infiltraten gehen unreife B-Zell-Aggregate hervor, die sich wiederum bei geeignetem inflammatorischen Umfeld in hochgradig differenzierte, ektope lymphatische Strukturen entwickeln [79, 81, 83, 84]. Auch in dieser Arbeit wurde zwischen diffusen B-Zell-Infiltraten, B-Zell-Aggregaten und B-Zell-Aggregaten mit lymphoiden Charakteristika unterschieden (Kapitel 2.4.6.2). Letztere wurden dabei in drei Grade eingeteilt, wobei ein hochgradig differenziertes B-Zell-Aggregat mit lymphoiden Charakteristika am ehesten einem TLO entsprach (Kapitel 3.5.2).

Auch wenn noch nicht abschließend geklärt, häufen sich doch die Indizien, dass TLOs aktiv zum immunologischen Krankheitsprozess beitragen und nicht nur eine Begleiterscheinung des Selbigen darstellen [83]: In einem spontanen EAE-Modell konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass meningeale B-Zell-Aggregate aktiv an der ZNS-Immunantwort beteiligt sind. Die B-Zellen proliferierten in Keimzentren, es kam zur somatischen Hypermutation, zur Affinitätsreifung und zum Ig-Klassen-Wechsel [85]. Diese Vorgänge waren auch in Keimzentren von ektopem lymphatischem Gewebe bei SPMS-Patienten nachweisbar [25, 86]. SPMS-Patienten mit B-Zell-Follikel-ähnlichen Strukturen im ZNS offenbarten dabei *post mortem* deutlich größere demyelinisierte Areale und mehr inflammatorische Infiltrate als Patienten ohne ektope lymphatische Strukturen [84]. Das Vorhandensein von meningealen B-Zell-Follikeln war außerdem mit einer erhöhten entzündlichen Aktivität der MS-Läsionen und einem schwereren Krankheitsverlauf (jüngeres Erkrankungsalter, geringere Lebenserwartung) assoziiert [24, 84]. Auch die Proliferation von T-Zellen konnte im TLO gezeigt

werden [79]. In Mäusen, die mit MP4 immunisiert wurden, fanden sich neben MP4-reaktiven T-Zellen auch MOG:35-55-reaktive T-Zellen im ZNS. Letztere waren allerdings in der Milz und den Lymphknoten nicht nachweisbar, was darauf hindeutete, dass ein *Priming* von T-Zellen gegen andere Neuroantigene im ZNS möglich war (*determinant spreading*). Zeitlich fiel dieser Vorgang mit der Bildung von TLOs im chronischen EAE-Stadium zusammen [79].

Zusammenfassend scheinen ektope lymphatische Strukturen bei Autoimmunerkrankungen humoral und Zell-vermittelt eine Quelle der lokalen Immunantwort darzustellen und den Krankheitsprozess zu beschleunigen, indem sie die Entzündung direkt im Zielgewebe aufrecht erhalten [83, 85, 87]. TLOs bieten in diesem Rahmen u.a. den B-Zellen ein günstiges Milieu, um sich zu differenzieren und zu (Auto-) Antikörper-sezernierenden Plasmazellen zu reifen [88].

1.5 Zielsetzung und Fragestellung der Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit war im B-Zell-abhängigen, MP4-induzierten EAE-Modell den Einfluss von Fingolimod auf die B-Zellen generell und insbesondere die B-Zell-Aggregation im ZNS zu untersuchen. Da B-Zell-Aggregate bei SPMS-Patienten mit einem ausgeprägten pathologischen Korrelat und letztlich schlechterem klinischen *Outcome* einhergingen (Kapitel 1.4), erschien die Prävention einer B-Zell-Aggregation äußerst zielführend, weshalb die Versuchstiere mit Einsetzen der Symptomatik behandelt wurden (Kapitel 2.3.5). Aus diesem Ansatz ergaben sich folgende Fragestellungen bezüglich erstens der Klinik der behandelten EAE-Tiere, zweitens der peripheren sowie drittens auch der zentralen Fingolimod-Wirkung:

1. Profitieren die Versuchstiere klinisch von einer Behandlung mit FTY720 (Kapitel 3.2)? Gibt es einen Zusammenhang zwischen der klinischen Präsentation und dem Ausmaß der Kleinhirn-Infiltration (Kapitel 3.4.4)?
2. Bestehen Hinweise für einen direkten Einfluss von Fingolimod auf die B-Zell-Funktion (Kapitel 3.3.3)? Kann Fingolimod auch bei der B6-Maus

Lymphozyten im SLO zurückhalten (Kapitel 3.3.2) und gibt es dafür ein histologisches Korrelat (Kapitel 3.3.1)?

3. Führt eine Fingolimod-Therapie zu einer signifikanten Reduktion der Kleinhirn-Infiltration und somit Inflammation (Kapitel 3.4.2)? Lassen sich unterschiedliche Infiltrat-Muster abgrenzen und wie kann deren Einordnung objektiviert werden (Kapitel 2.4.6.2)? Kann eine B-Zell-Aggregat-Bildung und TLO-Formation durch akute FTY720-Behandlung verhindert werden (Kapitel 3.4.3)? Bilden B-Zell-Aggregate schon nach 30-tägiger Krankheit alle Merkmale eines TLO aus (Kapitel 3.5.2)? Lassen sich Rückschlüsse auf den zeitlichen Ablauf der lymphoiden Neogenese ziehen (Kapitel 4.3)?

Außerdem sollten durch die vorliegenden Experimente gewisse Schlüsselmerkmale der MP4-induzierten EAE (z.B. Immunisierung, Krankheitsverlauf, zerebelläre Infiltration etc.) reproduziert und verglichen werden (Kapitel 3.1, Kapitel 3.4.1, Kapitel 4.1). Die exemplarische Testung des gängigen MS-Therapeutikums FTY720 in diesem Setting sollte außerdem das Profil der MP4-induzierten EAE schärfen und markierte den Anfang einer Reihe von weiteren, ähnlichen Medikamentenstudien (Kapitel 4.2, Alemtuzumab, Siponimod u.a.) in der Arbeitsgruppe. Für diese Folgeprojekte sollte sich auch die Etablierung der Labormethodik als Grundlage eignen. Beispielhaft sei hierbei auf die adaptierte FTY720-Dosierung und orale Applikation (Kapitel 2.3.4), die Festlegung eines geeigneten histologischen *Marker-Panels* zur Identifikation der lymphoiden Neogenese (Kapitel 2.4.3) und die Definition von Auswertungsstandards verwiesen (Kapitel 2.4.6, Kapitel 2.7, Kapitel 3.5.2).

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Allgemeine Labormaterialien

Alle Materialien wurden den Herstellerangaben entsprechend gelagert. Materialien sind im Folgenden nicht aufgelistet, wenn sie nur in der Etablierungsphase eingesetzt oder getestet wurden.

2.1.1 Puffer, Medien, Chemikalien

Tabelle 1: Pufferlösungen

Pufferlösung	Zusammensetzung/Herkunft
Citratpuffer pH 6,0	- 21 g/l $C_6H_8O_7$ (Citronensäure) - 29,4 g/l $Na_3C_6H_5O_7$ (Trinatriumcitrat) - in A. dest.
Dulbecco's PBS	- Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA - steril
PB pH 7,36 - 7,4	- 2,45 g/l KH_2PO_4 (Kaliumdihydrogenphosphat) - 14,6 g/l Na_2HPO_4 (Dinatriumhydrogenphosphat) - alternativ 11,65 g/l Na_2HPO_4 wasserfrei - in A. dest.
PBS	- 8,006 g/l NaCl (Natriumchlorid) - 1,72 g/l Na_2HPO_4 (bzw. 1,36 g Na_2HPO_4 wasserfrei) - 0,2 g/l KCl (Kaliumchlorid) - 0,27 g/l KH_2PO_4 - in A. dest.
PBS-Tween 0,05 % bzw. 0,025 %	- 0,5 bzw. 0,25 g/l Tween 20 - in PBS
RBC-Puffer pH 7,2 - 7,4	- 8,3 g/l NH_4Cl (Ammoniumchlorid) - 0,8 g/l $NaHCO_3$ (Natriumhydrogencarbonat) - 0,037 g/l $C_{10}H_{16}N_2O_8$ (EDTA) - In A. dest.
Tris-HCl (Chlorwasserstoffsäure) pH 8,2 - 8,5	- 12,1 g/l Trizma-Base - in A. dest.
Tris-NaCl pH 7,6	- 6,1 g/l Trizma-Base - 8,8 g/l NaCl - in A. dest.

A. dest., Aqua destillata; EDTA, Ethylendiamintetraessigsäure; MO, Missouri; PB, Phosphatpuffer; PBS, Phosphatgepufferte Salzlösung; RBC, Erythrozyten-Lyse.

Tabelle 2: Immunisierungs-, Fixier- und Färbelösungen

Immunisierungs-/ Fixier-/ Färbelösung	Zusammensetzung/Herkunft
Ammoniumchlorid	- 180 g/l NH ₄ Cl - in A. dest.
CFA	- 5 g/l Mycobacterium tuberculosis H37 RA - in IFA
D (+) Glucose 10 %	- 100 g/l C ₆ H ₁₂ O ₆ (Glucose) - in A. dest.
DAB	- 22,5 g/l C ₁₂ H ₁₄ N ₄ (DAB) - in Tris NaCL
Eosin	- 1 g/l Eosin - in A. dest.
GOD	- 1,2 g/l GOD - in A. dest.
Hämalaun	- 1 g/l Hämatoxylin - 0,2 g/l NaIO ₃ (Natriumiodat) - 50 g/l KAl(SO ₄) ₂ (Kaliumaluminiumsulfat) - 50 g/l C ₂ H ₃ Cl ₃ O ₂ (Chloralhydrat) - 1 g/l kristalline C ₆ H ₈ O ₇ - in A. dest.
Horizon Fixable Viability Stain 450	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
IFA	- Paraffin Öl und Mannid Monooleat (Mischung 9:1).
Kernechtrot 0,1 %	- 1 g/l Kernechtrot - in 5 % Al ₂ (SO ₄) ₃ · 18 H ₂ O (Aluminiumsulfat-18 hydrat)
Nickelsulfat	- 13 g/l NiSO ₄ (Nickelsulfat) - in A. dest.
PFA 4 %	- 40 g/l PFA - in PBS - Erhitzen (<60 °C)
Trypanblau 0,1 %	- 1 g/l Trypanblau - in PBS

A. dest., Aqua destillata; CA, Kalifornien; CFA, Komplettes Freund-Adjuvans; DAB, Diaminobenzidin; GOD, Glucoseoxidase; IFA, Inkomplettes Freund-Adjuvans; PBS, Phosphatgepufferte Salzlösung; PFA, Paraformaldehyd.

Tabelle 3: Erreger und Pharmazeutika

Erreger/Pharmazeutika	Herkunft
Fingolimod (FTY720)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Heparin Natrium 25.000 Internationale Einheiten (Liquemin)	Roche, Basel, Schweiz
Mycobacterium tuberculosis (H37 RA)	Difco Laboratories, Franklin Lakes, NJ, USA
Penicillin-Streptomycin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
PTX	List Biological Laboratories, Campbell, CA, USA

CA, Kalifornien; MO, Missouri; PTX, Pertussis-Toxin.

Tabelle 4: Chemikalien und Medien

Chemikalie/Medium	Herkunft
Aluminiumsulfat-18-hydrat	Honeywell Specialty Chemicals, Seelze, Deutschland
Ammoniumchlorid	Fluka, heute Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Aqua Poly/Mount	Polysciences, Warrington, PA, USA
Chloralhydrat	AppliChem, St. Louis, MO, USA
Citronensäure	AppliChem, St. Louis, MO, USA
D (+) Glucose	AppliChem, St. Louis, MO, USA
DAB	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
DePex	Serva, Heidelberg, Deutschland
Dinatriumhydrogenphosphat	AppliChem, St. Louis, MO, USA
Eosin Y	AppliChem, St. Louis, MO, USA
Ethanol absolut	AppliChem, St. Louis, MO, USA bzw. Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Ethanol technisch	Nordbrand, Nordhausen, Deutschland
EDTA	Merck, Darmstadt, Deutschland
FACS Clean	BD Biosciences, San Jose, CA USA
FACS Flow (Waschmedium)	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
FACS Shutdown Solution	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
GOD	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Hämatoxylin	Chroma, heute Waldeck, Münster, Deutschland
HL-1	Lonza, Basel, Schweiz
Kaliumaluminiumsulfat	AppliChem, St. Louis, MO, USA
Kaliumchlorid	AppliChem, St. Louis, MO, USA
Kaliumdihydrogenphosphat	AppliChem, St. Louis, MO, USA
Kernechtrot	Merck, Darmstadt, Deutschland
L-Glutamin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Mannid Monooleat	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
MP4	Alexion Pharmaceuticals, Cheshire, CT, USA
Natriumchlorid	AppliChem, St. Louis, MO, USA
Natriumhydrogencarbonat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumiodat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Nickelsulfat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Paraffin Öl	EMScience, Gibbstown, NJ, USA
PFA	AppliChem, St. Louis, MO, USA
RPMI 1640	Biochrom, Berlin, Deutschland
Schwefelsäure	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
TMB	eBioscience, San Diego, CA, USA
Trinatriumcitrat	AppliChem, St. Louis, MO, USA bzw. Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Trizma-Base	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Trypanblau	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tween 20	AppliChem, St. Louis, MO, USA
Wasserstoffperoxid 30 %, 33 %	Honeywell Specialty Chemicals, Seelze, Deutschland bzw. AppliChem, St. Louis, MO, USA
Xylol	Intern, Universität Würzburg, Deutschland

CA, Kalifornien; CT, Connecticut; DAB, Diaminobenzidin; EDTA, Ethylendiamintetraessigsäure; FACS, Fluorescence-activated Cell Sorter; GOD, Glucoseoxidase; MO, Missouri; NJ, New Jersey; PA, Pennsylvania; PFA, Paraformaldehyd; TMB, Tetramethylbenzidin.

2.1.2 Antigene, Antikörper, Blocklösungen, Kits

Tabelle 5: Antigene

Antigen	Verwendung	Stock	Herkunft
Anti-Maus IgG	1:33, ELISPOT	0,5 mg/ml	Mabtech AB, Nacka Strand, Schweden
MP4	1:200, ELISPOT 1:667, ELISA	2 mg/ml	Alexion Pharmaceuticals, Cheshire, CT, USA

CT, Connecticut; ELISA, Ezyme-linked Immunosorbent Assay; ELISPOT, Enzyme-linked Immuno Spot Assay; Ig, Immunglobulin.

Tabelle 6: Antikörper

Primärantikörper	Spezies	Verwendung	Herkunft
Anti-CD3	Kaninchen, monoklonal	1:100, IHC	Abcam, Cambridge, MA, USA
Anti-CD45R (B220)	Ratte, monoklonal	1:500, IHC	eBioscience, San Diego, CA, USA
Anti-CXCL13/BLC/BCA-1	Ziege, polyklonal	1:80, IHC	R&D Systems, Minneapolis, Minnesota (MN), USA
Anti-FDC-SP	Kaninchen, polyklonal	1:500, IHC	Bioss, Woburn, MA, USA
Anti-Maus Ig, biotinyliert	Ziege, polyklonal	1:1.000, IHC	Dako, Carpinteria, CA, USA
Anti-PNAd (MECA-79)	Ratte, monoklonal	1:200, IHC	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
APC anti-Maus CD19	Ratte	nach Zellzahl, DFZ	BioLegend, San Diego, CA, USA
PerCP-Cy 5.5 anti-Maus CD4	Ratte	nach Zellzahl, DFZ	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
Sekundärantikörper			
Anti-Kaninchen IgG, biotinyliert	Ziege	1:250, IHC	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA
Anti-Maus IgG, biotinyliert	Ziege, polyklonal	1:2.000, ELISPOT	Dako, Carpinteria, CA, USA
Anti-Maus IgG, biotinyliert	Ratte, polyklonal	1:800, ELISA	eBioscience, San Diego, CA, USA
Anti-Ratte IgG, biotinyliert	Ziege	1:250, IHC	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA
Anti-Ziege IgG, biotinyliert	Kaninchen	1:250, IHC	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA
PAP			
Kaninchen PAP	Kaninchen, polyklonal	1:250, IHC	Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, USA

APC, Allophycocyanin; CA, Kalifornien; CD, Cluster of Differentiation; Cy, Cyanin; DFZ, Durchflusszytometrie; ELISA, Ezyme-linked Immunosorbent Assay; ELISPOT, Enzyme-linked Immuno Spot Assay; FDC, Follikulär dendritische Zelle; Ig, Immunglobulin; IHC, Immunhistochemie; MA, Massachusetts; MN, Minnesota; PA, Pennsylvania; PAP, Peroxidase-anti-Peroxidase-Komplex; PerCP, Peridinin Chlorophyll Protein; PNAd, Peripheral Lymph Node Addressin.

Tabelle 7: Enzyme

Enzym	Verwendung	Herkunft
AP-Streptavidin	1:500, IHC 1:800, ELISPOT	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA
HRP-Avidin	1:1.000, ELISA	BD Biosciences, San Jose, CA, USA bzw. eBioscience, San Diego, CA, USA

Weitere Vertreter waren in den kommerziellen Kits enthalten (Tabelle 9). AP, Alkalische Phosphatase; CA, Kalifornien; ELISA, Ezyme-linked Immunosorbent Assay; ELISPOT, Enzyme-linked Immuno Spot Assay; HRP, Meerrettichperoxidase; IHC, Immunhistochemie.

Tabelle 8: Blocklösungen

Blocklösung	Verwendung	Herkunft
FCS	10 %, 0,5 %, ELISPOT	Biochrom, Berlin, Deutschland
Magermilchpulver	1 %, 0,1 %, ELISA	Heirler Cenovis, Radolfzell, Deutschland
NrbS	5 %, IHC	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
NGS	5 %, IHC	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

ELISA, Ezyme-linked Immunosorbent Assay; ELISPOT, Enzyme-linked Immuno Spot Assay; FCS, Fetales Kälberserum; IHC, Immunhistochemie; MO, Missouri; NGS, Normales Ziegen Serum; NrbS, Normales Kaninchenserum.

Tabelle 9: Färbekits

Kit	Herkunft
VECTASTAIN ABC Kit (Standard)	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA
VECTOR Blue AP Substrate Kit	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA

ABC, Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex; AP, Alkalische Phosphatase; CA, Kalifornien.

2.1.3 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 10: Verbrauchsmaterialien

Allgemein	
CELLSTAR Glaspipetten 1 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml	Greiner Bio-One International, Kremsmünster, Österreich
Parafilm „M“	Pechiney Plastic Packaging, Chicago, IL, USA
Rasierklingen	Apollo Herkenrath, Solingen, Deutschland
Reaktionsgefäße 1,5 ml, 2 ml, 50 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Reaktionsgefäße 15 ml	Greiner Bio-One International, Kremsmünster, Österreich
Rundfilter d = 80 mm, d = 150 mm	Laborversand A. Hartenstein, Würzburg, Deutschland
Tierhaltung und Gewebeaufbereitung	
Deckgläser 21 x 26 mm, 24 x 32 mm, 24 x 40 mm, 24 x 50 mm, 24 x 60 mm	Marienfeld, Lauda Königshofen, Deutschland
Histosec Pastillen (Paraffin)	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
Mikrotomklingen Surgipath DB80 LX	Leica, Wetzlar, Deutschland
Objektträger	Marienfeld, Lauda Königshofen, Deutschland
Rotilabo-Einbettkassetten	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Routine VI Einbettkassetten	Leica, Wetzlar, Deutschland
Spezialfutter Sonderdiät C1000 glukosearm	Altromin Spezialfutter, Lage, Deutschland
Superfrost Plus Objektträger	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Immunoassays und DFZ	
70 µm Nylon Cell Strainer	Falcon, heute Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
CELLSTAR 96-Well Zellkultur-Mikroplatte	Greiner Bio-One International, Kremsmünster, Österreich
Falcon Zellkulturschale 60 x 15 mm	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
MultiScreen _{HTS} -IP 0,45 µm 96-Well ELISPOT-Platte	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
Nunclon Delta Surface 96-Well ELISA-Platte	Nalge Nunc International, Rochester, NY, USA
Zählkammer Neubauer-improved	Marienfeld, Lauda Königshofen, Deutschland

Weitere grundlegende Materialien (Pipettenspitzen, Handschuhe, Tierstreu etc.) sind in dieser Auflistung nicht enthalten. CA, Kalifornien; DFZ, Durchflusszytometrie; ELISA, Enzyme-linked Immunosorbent Assay; ELISPOT, Enzyme-linked Immuno Spot Assay; IL, Illinois; MA, Massachusetts; NY, New York.

2.1.4 Geräte

Tabelle 11: Geräte

Allgemein	
FE20 - FiveEasy pH Meter	Mettler-Toledo, Greifensee, Schweiz
Feinwaage AB 104	Mettler-Toledo, Greifensee, Schweiz
Feinwaage LC 2200 P	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Kombischüttler KL 2	Edmund Bühler, Tübingen, Deutschland
Magnetrührer Ikamag RH	IKA-Werke, Staufen, Deutschland
Wasserbad 1004	Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel, Deutschland
Zentrifugen	
Allegra X-30R	Beckman Coulter, Brea, CA, USA
Biofuge 28RS	Heraeus, Hanau, Deutschland
Microcentrifuge 5415C	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Minizentrifuge/Vortex Combi Spin FVL-2400N	Laborversand A. Hartenstein, Würzburg, Deutschland
Pipetten	
Accu Jet	Brand, Wertheim, Deutschland
Brand Transferpette S 20 - 200 µl, 100 - 1.000 µl, 10 - 100 µl	Brand, Wertheim, Deutschland
Brand Transferpette S-12 30 - 300 µl	Brand, Wertheim, Deutschland
Finnpipette 1 - 10 µl, 10 - 100 µl, 100 - 1.000 µl	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Pipetboy Acu	INTEGRA Biosciences, Biebertal, Deutschland
Einbettung und Schnitt	
Einbettautomat TP 1020	Leica, Wetzlar, Deutschland
Gießstation	Bavimed Laborgeräte, Birkenau, Deutschland
Kühlplatte EG1150 C	Leica, Wetzlar, Deutschland
Mikrotom SM2000R	Leica, Wetzlar, Deutschland
Paraffinstreckbad	Medax, Neumünster, Deutschland bzw. Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel, Deutschland
Mikroskope	
DM 2000 LED (Objektive 2,5 x, 5 x, 10 x, 20 x, 40 x), MC170 HD Mikroskopkamera	Leica, Wetzlar, Deutschland
Leitz Diavert	Leica, Wetzlar, Deutschland
Lichtmikroskope u.a. Primo Star	Carl Zeiss Microscopy, Jena, Deutschland
ELISPOT und ELISA	
Hera Cell 240 Inkubator	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
ImmunoSpot Series 6 Analyzer	Cellular Technology Limited, Shaker Heights, OH, USA
Victor 3 1420 Multilabel Counter	Perkin Elmer, Waltham, MA, USA
DFZ	
Eismaschine AF 100	Scotsman, Ipswich, Großbritannien
FACS Canto II	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
Infrarotlampe Sanitas SIL 06	Hans Dinslage, Uttenweiler, Deutschland
Mausretainer	Eigenbau, Institut für Anatomie und Zellbiologie, Würzburg, Deutschland

Zur Grundausstattung des Labors gehörende Geräte (Ofen, Kühl- und Gefrierschränke, Mikrowellen, Abzüge, Käfige etc.) sind in dieser Auflistung nicht enthalten. CA, Kalifornien; DFZ, Durchflusszytometrie; ELISA, Enzyme-linked Immunosorbent Assay; ELISPOT, Enzyme-linked Immuno Spot Assay; FACS, Fluorescence-activated Cell Sorter; MA, Massachusetts; OH, Ohio.

2.1.5 Software

Tabelle 12: Software

Software	Verwendung (zugehöriges Gerät)	Version	Unternehmen
Application Suite	Mikroskopie (DM 2000 LED)	4.4.0	Leica, Wetzlar, Deutschland
BioSpot/ImmunoSpot	ELISPOT (ImmunoSpot Series 6 Analyzer)	5.1.36	Cellular Technology Limited, Shaker Heights, OH, USA
Draw X7	Grafiken	17.5.0.907	Corel, München, Deutschland
Endnote X7	Literatur	7.5	Thomson Reuters, New York, NY, USA
FACSDiva	DFZ (BD FACS Canto II)	6.1.3	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
FlowJo	DFZ	10.0.8	FlowJo, Ashland, OR, USA
ImageJ	Vermessung	1.48	National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA
Office 365 ProPlus (Word, Excel, PowerPoint 2013)	Text, Auswertung, Präsentation	1705	Microsoft, Redmond, WA, USA
Prism 7	Statistik	7.03	GraphPad Software, La Jolla, CA, USA
Wallac 1420 Manager	ELISA (Victor 3 1420 Multilabel Counter)	3.0	Perkin Elmer, Waltham, MA, USA

CA, Kalifornien; DFZ, Durchflusszytometrie; ELISA, Enzyme-linked Immunosorbent Assay; ELISPOT, Enzyme-linked Immuno Spot Assay; FACS, Fluorescence-activated Cell Sorter; MA, Massachusetts; MD, Maryland; OH, Ohio; OR, Oregon; WA, Washington.

2.2 Experimentdesign und Versuchsvorbereitung

Die mit MP4 immunisierten Versuchstiere (B6-Mäuse) wurden willkürlich in zwei Gruppen unterteilt, wobei der eine Teil oral mit Vehikel-Lösung (25 % Ethanol, n = 5), der andere Teil oral mit Fingolimod in 25 % Ethanol (n = 9) behandelt wurde. Die Behandlung wurde nach Möglichkeit bei Einsetzen der ersten Krankheitssymptomatik im akuten EAE-Stadium begonnen und für 30 Tage fortgeführt. Nach dieser Behandlungszeit erfolgte die Tötung der Tiere im chronischen EAE-Stadium. Mit einem *Enzyme-linked Immuno Spot Assay* (ELISPOT) und einem *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA) wurde der Einfluss von Fingolimod auf die B-Zell-Funktion im Sinne der Antikörperproduktion untersucht, während die Histologie an Paraffinschnitten darüber hinaus Einblicke in die peripheren (Lymphknoten) und zentralen (Kleinhirn) Wirkungsweisen von FTY720 lieferte. Der Versuchsaufbau erlaubte

eine quantitative Analyse der Kleinhirn-Infiltration und eine qualitative Beurteilung der Infiltrate nicht zuletzt durch Färbung verschiedenster Marker der lymphoiden Neogenese an B-Zell-Aggregaten. Die Versuchstiere wurden aus drei zeitlich versetzten Kohorten akquiriert (Tabelle 13).

Tabelle 13: Zeitversetzte Aufteilung der Versuchstiere in die Kohorten

	Behandlung Vehikel (n = 5)	Behandlung FTY720 (n = 9)	Immunisierungsdatum
Kohorte 1	2	5	17.03.2015
Kohorte 2	3	2	17.06.2015
Kohorte 3	0	2	02.10.2015

Ergänzend lagen Daten von weiteren Mäusen (n = 8, jeweils vier Vehikel- und FTY720-Tiere) mit zweiwöchiger Behandlungsdauer vor, um die Verteilung der T- und B-Lymphozyten im peripheren Blut der Tiere durchflusszytometrisch zu bestimmen.

Vor Beginn der Experimente wurde die Methodik an fünf unbehandelten, immunisierten B6-Mäusen erprobt und etabliert. Auch wurden anhand dieser Mäuse, die selbst nicht mit in die Endauswertung der Arbeit gingen, relevante Auswertungskriterien festgelegt. Zum Ausschluss einer alkoholbedingten Verzerrung der Ergebnisse wurden außerdem als Vorversuch drei nicht-immunisierte Tiere über einen Zeitraum von 30 Tagen mit der täglichen Vehikel-Dosis von 5 µl Ethanol behandelt, wobei weder Verhaltensauffälligkeiten noch phänotypische Veränderungen, wie z.B. Fellausfall, beobachtet wurden. Die angefertigten Hämatoxylin-Eosin- (HE-) Färbungen der Lebern zeigten histologisch eine intakte Zentralvenen-Läppchen-Architektur. Dies bestätigte sich auch bei zwei regulären Versuchstieren aus dem Fingolimod-Behandlungsarm. Makroskopisch zeigte sich hier eine glatte, unauffällige Leberoberfläche. Mikroskopisch waren keine alkoholtypischen Pathologien (Mallory-Körper, Leberverfettung, Hepatitis, Fibrosierung bis hin zur Leberzirrhose [89]) bei regulärer histologischer Struktur nachweisbar (Abbildung 2).

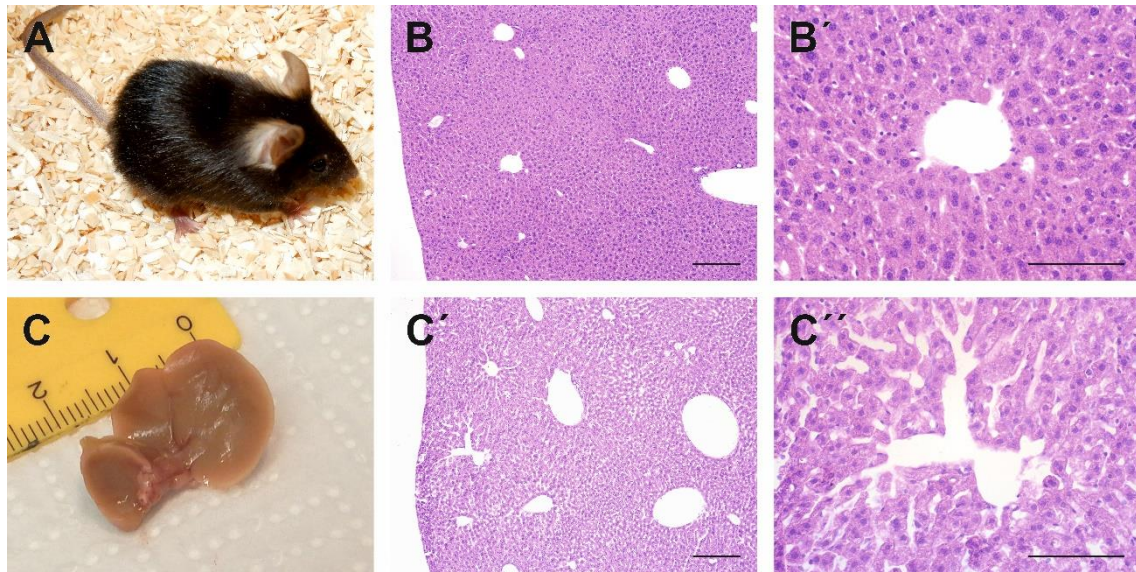


Abbildung 2: Kein Nachweis einer alkoholinduzierten Pathologie. **A)** Phänotypisch unauffällige, nicht-immunisierte und mit Alkohol behandelte C57BL/6-Maus. **B)** Leberhistologie einer nicht-immunisierten Maus nach 30-tägiger Alkoholbehandlung. HE-Färbung, Messbalken 200 µm. **B')** Vergrößerung aus B, Messbalken 100 µm. **C)** Makroskopische Leber einer immunisierten Maus nach 28-tägiger Fingolimod Behandlung von kaudal. Das FTY720 war in Ethanol gelöst. **C')** Mikroskopische Übersichtsaufnahme der Leber aus C. HE-Färbung, Messbalken 200 µm. **C'')** Vergrößerung aus C', Messbalken 100 µm. HE, Hämatoxylin-Eosin.

2.3 Versuchstiere und Behandlung

2.3.1 B6-Maus

Die B6-Versuchstiere (Weibchen) wurden von Janvier Labs (Saint-Berthevin, Frankreich) und Harlan Laboratories (heute Envigo, Indianapolis, Indiana (IN), USA) erworben und unterschiedlich am Ohr markiert, um die Individuen auseinanderhalten zu können. Im Alter von etwa 8 Wochen (Mittelwert (MW) = 56,79 d; Standardabweichung (SD) = 1,67 d; Mindestalter = 53,00 d; Höchstalter = 58,00 d) wurden die Mäuse immunisiert. Eine Ausnahme stellten die Tiere für die durchflusszytometrischen Experimente dar, die zum einen männlich und zum anderen nicht immunisiert waren (Kapitel 2.6). Alle Tierversuche fanden mit Genehmigung der zuständigen Tierschutzbehörde der Regierung von Unterfranken statt (Zeichen: 55.2-2531.01-91/14, Versuchsleitung Prof. Dr. Stefanie Kürten). Die Mäuse wurden unter speziellen pathogen-freien Bedingungen und festem 12 Stunden Tag-Nacht-Rhythmus in einer geeigneten Einrichtung der Klinik und Poliklinik für

Mund-, Kiefer- und Plastische Gesichtschirurgie der Universität Würzburg gehalten, immunisiert, klinisch beurteilt und täglich behandelt. Allen Versuchstieren stand Wasser und Spezialfutter *ad libitum* zur Verfügung. Die Einschläferung erfolgte mittels CO₂-Narkose.

Tabelle 14: Übersicht über die Anzahl der verwendeten Versuchstiere

Versuch	Anzahl der Versuchstiere
Etablierung und Versuchsvorbereitung	13
IHC, ELISPOT, ELISA, klinische Verlaufsbeobachtung	14
DFZ ^a	9
Summe^b	36

^a Hiervon sind die Daten einer Maus nicht auswertbar. ^b Nicht aufgeführt wurden hier erfolglos immunisierte Tiere ohne Symptom-Entwicklung, die für die Versuche nicht verwendbar waren. Außerdem Mäuse, deren Gewebe Teil des allgemeinen Laborbestandes war und von denen nur einzelne Schnitte als Kontrolle oder zur Etablierung verwendet wurden. DFZ, Durchflusszytometrie; ELISA, Enzyme-linked Immunosorbent Assay; ELISPOT, Enzyme-linked Immuno Spot Assay; IHC, Immunhistochemie.

2.3.2 Induktion der EAE

Die Tiere wurden dem ursprünglichen Protokoll für die MP4-EAE folgend aktiv immunisiert [76]: Inkomplettes Freund Adjuvans (IFA) wurde zur Erstellung von komplettem Freund Adjuvans (CFA) mit 5 mg/ml des *Mycobacterium tuberculosis* H37 Ra versetzt. Eine im Wirkungsplateau (ab 150 µg [76]) liegende Dosis von 200 - 400 µg MP4 in CFA (Gesamtvolumen 200 µl) wurde den Versuchstieren dann subkutan in die Flanken injiziert. Anschließend wurden pro Maus 200 ng PTX in 500 µl steriler phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) intraperitoneal verabreicht. Selbige Dosis PTX erhielten die Tiere im Zeitraum von 48 - 72 Stunden ein weiteres Mal.

2.3.3 Scoring

Nach Untersuchung jeder einzelnen Maus wurde der EAE-Score anhand der allgemeingültigen, standardisierten Skala (Score 0 - 5) auf täglicher Basis festgelegt: keine EAE (0), parethischer Schwanz (1), Schwäche der Hinterläufe (2), Lähmung der Hinterläufe (3), Quadriplegie (4), Tod (5). Ein höherer Wert spiegelte hierbei schwerwiegendere Symptome und einen schlechteren Krankheitsverlauf wider. Lag eine Maus zwischen diesen klar definierten Abstufungen, wurde sie entsprechend in 0,5er-Schritten eingeordnet.

An wenigen Tagen konnte keine Klinik erhoben werden. In diesen Fällen wurde der Score vom Vortag übernommen. Den letzten Wert bekamen die Labortiere unmittelbar vor ihrer Präparation zugeteilt. Auch wenn das Einteilungssystem in dieser Art weithin verwendet wird, muss doch erwähnt werden, dass es zur motorischen Einschätzung des Versuchstieres geeignet ist. Defizite auf einer anderen Ebene (z.B. Verhaltensauffälligkeiten oder Harninkontinenz) konnten mitunter nicht erfasst werden.

2.3.4 Fingolimod-Dosierung und Applikation

In einer Literaturrecherche zur oralen Fingolimod-Therapie im EAE-Setting fand sich eine tägliche Dosierung von 0,3 mg/kg Körpergewicht am häufigsten wieder. Beispielhaft konnte mit dieser Dosierung die EAE-Entwicklung in Wistar-Ratten verhindert [43] und bei B6-Mäusen ein klinischer und neuroprotektiver Nutzen erzielt werden [90]. Ein weiteres orales Dosierungsschema sah täglich sogar 1 mg/kg FTY720 für die Tiere vor. Darunter dokumentierten zum Beispiel Fujino et al. bei der MBP-induzierten EAE an Lewis-Ratten ausgeprägte anti-inflammatorische Effekte [91] und Kataoka et al. beschrieben eine Prävention neuerlicher Erkrankungsschübe bei der PLP-induzierten EAE in SJL/J-Mäusen [92]. Aus EAE-Versuchsreihen an *Dark Agouti*-Ratten mit verschiedenen FTY720-Dosierungen zwischen 0,03 mg/kg und 0,9 mg/kg wurde ein Wirksamkeitsplateau ab 0,3 mg/kg abgeleitet [93]. Das ursprüngliche Vorhaben, einen ähnlichen *Ceiling*-Effekt durch den Vergleich beider Dosierungen (0,3 mg/kg und 1 mg/kg) auch für die MP4-induzierte EAE zu untersuchen, wurde in Rücksprache mit der Tierschutzbehörde verworfen. Die Entscheidung fiel dann bei den vorliegenden Experimenten zugunsten der höheren Dosierung von 1 mg/kg täglich, auch um einen zu niedrigen Wirkspiegel auszuschließen. Den Dosierungs-Berechnungen wurde dabei ein Körpergewicht von 20 g für eine B6-Maus zugrunde gelegt. Diese Annahme ließ sich retrospektiv verifizieren, da die 14 Versuchstiere durchschnittlich in einem Alter von 74,86 d (SD = 4,13 d; Mindestalter = 70,00 d; Höchstalter = 85,00 d) zum ersten Mal behandelt wurden. Anhand von Wachstumskurven der Zuchtlabore konnte dieses mittlere Alter relativ genau der gewählten Gewichtsklasse zugeordnet werden [94, 95].

Die Arbeitsgruppe um Carolyn Foster verabreichte Fingolimod beispielhaft in ihren Publikationen über eine Magensonde (*gavage*), was die Applikation von ausreichend Wasser (5 ml/kg) zur Lösung des pulverförmigen Medikamentes erlaubte [93, 96]. Im Gegensatz dazu wurde bei der vorliegenden Arbeit von der Sonden-Gabe abgesehen, da die Tiere möglichst geringem Stress und Pneumonie-Risiko ausgesetzt werden sollten. Direktes Pipettieren in das Maul des Versuchstieres (Abbildung 3 A) ermöglichte stattdessen die orale Medikamentengabe, wobei auf diese Weise nur ein Volumen von 20 µl pro Maus und Tag zugeführt werden konnte. Einerseits ließ sich durch diese geringe Flüssigkeitsmenge ein Ausspucken des Medikamentes verhindern, andererseits konnte die Fingolimod-Dosis nicht in so wenig Wasser gelöst werden, weshalb 25 % unvergälltes Ethanol in Aqua destillata (A. dest.) als Vehikel benutzt wurde (Kapitel 2.2). Diese Vehikel-Lösung wurde entweder pur (Vehikel-Gruppe) oder mit der entsprechenden, darin gelösten FTY720-Dosis (Fingolimod-Gruppe) verabreicht. Die Medikamentengabe stellte sich als sehr effizient und für die Versuchstiere schonend heraus.

2.3.5 Behandlung und Präparation

Der MW der Behandlungsdauer lag für alle 14 Versuchstiere bei 29,93 d (SD = 1,77 d). Mindestens erstreckte sich die Medikamenten- oder Vehikel-Gabe dabei über 27,00 d und höchstens über 34,00 d. Zwischen den Behandlungsgruppen bestand bezüglich der Behandlungsdauer kein statistischer Unterschied (Signifikanzwert (p) = 0,91). Der MW der Vehikel-Gruppe lag bei 29,80 d (SD = 0,45 d) im Vergleich zu 30,00 d (SD = 2,24 d) bei der Fingolimod-Gruppe. Von den 14 Versuchstieren wurde bei sieben mit einsetzender Symptomatik, bei fünf wenige Tage später im Krankheitspeak und bei zwei Mäusen 3 Tage nach dem Krankheitspeak mit der Behandlung (Vehikel oder Fingolimod) begonnen. Sieben Mäuse bekamen die letzte Dosis am Präparationstag, sieben Mäuse wurden bereits am Vortag final behandelt. Im Mittel waren die Tiere bei Präparation 104,30 d alt (SD = 4,51 d; Minimum = 98,00 d; Maximum = 112,00 d). Auch hier bestand kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Behandlungsgruppen (p = 0,59). Der MW von

103,40 d (SD = 2,19 d) in der Vehikel-Gruppe stand dem mittleren Alter von 104,80 d (SD = 5,47 d) bei den mit Fingolimod behandelten Tieren entgegen.

Im Anschluss an die Tötung der Versuchstiere wurden Thorax und Abdomen im Längsschnitt eröffnet und die *Vena cava inferior* (VCI) durchtrennt. Das austretende Vollblut wurde dann aus der Thoraxhöhle abgezogen und gekühlt gelagert, bis nach 2 Tagen das Serum für den ELISA abgenommen werden konnte. Als nächster Präparationsschritt wurde bei der Maus ein nicht-perfundierter Lymphknoten in der Flanke freigelegt und entnommen, der dann im ELISPOT weiterverarbeitet wurde. Über einen linksventrikulären, intrakardialen Zugang in den intakten, großen Kreislauf wurde nacheinander PBS zur Auswaschung des Blutes und eine Paraformaldehyd- (PFA-) Lösung (4 %) zur Fixierung des Gewebes infundiert. Nach ca. 10 min wurde dann der kontralaterale, drainierende Leistenlymphknoten freipräpariert und für die Histologie in ein Reaktionsgefäß mit 4 % PFA überführt. Dazu kam außerdem das Kleinhirn, das nach Bruch der Schädelkalotte im Bereich zwischen den Augen freipräpariert und vom Großhirn abgetrennt wurde.

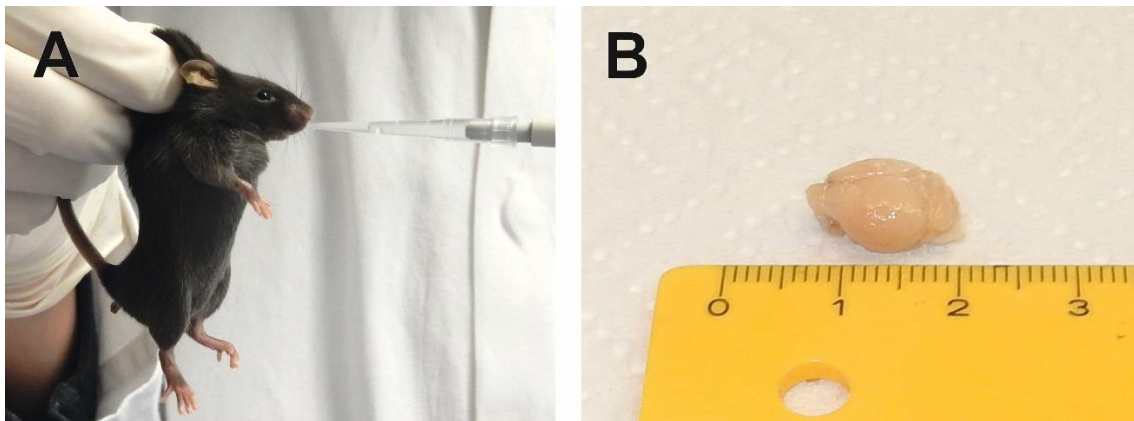


Abbildung 3: Vehikel- bzw. Fingolimod-Gabe und Präparation. **A)** Orale Behandlung einer C57BL/6-Maus mit Pipette. **B)** Entnommenes Groß- und Kleinhirn der Maus aus A.

2.4 Immunhistochemie

2.4.1 Paraffineinbettung und Mikrotomie

Nach der Präparation lagerte das Gewebe bewegt und gekühlt über Nacht in 4 % PFA bevor es in Einbettkassetten überführt und in mehrfach gewechselter PBS gewaschen wurde. Am folgenden Tag durchliefen die Präparate dann in einem Einbettautomaten eine aufsteigende Alkoholreihe und wurden anschließend in flüssigem Paraffin gebadet. In der Folge wurden an der Gießstation Paraffinblöcke um das Mausgewebe gegossen. Dabei wurde v.a. bei den Kleinhirnen auf eine gleichmäßige Ausrichtung und Position im Paraffinblock geachtet, um später die Schnittebenen besser vergleichen zu können.

Die fertig eingebetteten Organe konnten im Anschluss mit einem Mikrotom unter intermittierender Kühlung bearbeitet werden. Aus jedem Block wurden dabei 5 µm dicke Schnitte aus vergleichbarer Gewebetiefe aufgezogen. Die Platzierung der Proben auf den Objektträgern folgte einem speziell entwickelten und über die Kohorten hinweg angepassten Serienschema, das die lückenlose Untersuchung eines Areals mit unterschiedlichen histologischen Markern sicherstellte. Generell wurden bei den Lymphknoten bis zu 39 (sechs Ebenen) und bei den Kleinhirnen bis zu 84 Serienschnitte (12 Ebenen) pro Präparat aufgezogen, was einer durchgemusterten Tiefe von 195 µm bzw. 420 µm entsprach. Die bestückten Objektträger wurden dann über Nacht bei 37 °C getrocknet, bevor sie bereit zur Färbung waren.

2.4.2 Grundlagen der immunhistochemischen Färbung

Die (Gewebe-) Antigene bzw. Oberflächenmerkmale von Zellen (CD) wurden in den vorliegenden Versuchen durch spezifische Antikörper markiert. Die daraus resultierenden Immunkomplexe konnten durch die Peroxidase-vermittelte Oxidation des Chromogens Diaminobenzidin (DAB), die zur Präzipitation eines Farbproduktes führte, sichtbar gemacht werden [97]. Da in fixiertem Gewebe, beispielsweise durch Vorhandensein vieler Erythrozyten, bereits eine hohe endogene Peroxidase-Aktivität zu unspezifischen Farbniederschlägen führen hätte können, wurde diese zu Beginn der Versuche durch Zugabe eines Substratüberschusses aus 3 % Wasserstoffperoxid gehemmt [97]. Die Fixierung

und Einbettung der Organe erschwerte den Erstantikörpern durch Vernetzungsreaktionen im Gewebe überdies den Zugang zu den Antigenen (Maskierung), weshalb diese in einem nächsten Schritt mit der sauren, hitzeinduzierten Demaskierung (*heat-induced epitope retrieval*) wieder freigelegt werden mussten [98]. Da sich Proteine und somit auch Antikörper unter hydrophoben und elektrostatischen Gesichtspunkten leicht an unspezifische Bindungsstellen im Gewebe anlagern und so zu einer unerwünschten Hintergrundfärbung beitragen können, wurde darauffolgend eine Proteinlösung auf die Schnitte aufgebracht, die die unspezifischen Elemente blockierte [98]. Verwendet wurde immer Normalserum (Nicht-Immuserum) aus derselben Tierspezies wie der Zweitantikörper, so dass eine Bindung des Brückenantikörpers an die Blocklösung ausgeschlossen werden konnte. Anschließend konnte ein passender Erstantikörper inkubiert werden (Abbildung 4 A), der sich an das gesuchte Antigen anlagerte. Gegen die Tierspezies des Primärantikörpers gerichtet, wurde dann ein universeller, mit Biotin konjugierter Zweitantikörper zugegeben. Je nach Erstantikörper stand außerdem ein Peroxidase-anti-Peroxidase-Komplex (PAP) zur weiteren Verstärkung der Färbung (mehr Enzymmoleküle pro Gewebeantigen) zur Verfügung, der seinerseits an den Brückenantikörper binden konnte. Dessen Biotinylierung diente bei der darauffolgenden Zugabe eines vorgeformten Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplexes (ABC) als Andockstelle. Avidin besitzt vier Bindungsstellen für das Vitamin Biotin, das es hochaffin bindet und somit für hohe Empfindlichkeit bei der Darstellung der Färbereaktion sorgt [98]. In der Konsequenz waren also viele Enzymmoleküle Peroxidase über einige Brückenstrukturen mit dem Gewebeantigen verbunden (Abbildung 4 A). Durch Zugabe der DAB-Entwicklungsreagenzien setzte die Peroxidase nun, ohne verbraucht zu werden, den Elektronendonator DAB in ein farbiges, unlösliches Produkt um, das an der Stelle des gesuchten Antigens präzipitierte. Der Partner dieser Redoxreaktion war Wasserstoffperoxid, das zu Wasser reduziert wurde [97]. Das H_2O_2 entstand zusammen mit Gluconolacton seinerseits aus einer zweiten Redoxreaktion, die nach der Zugabe von Glucoseoxidase (GOD) zum Entwicklungsansatz gestartet werden konnte. Sauerstoff und Glucose dienten

dabei als Substrat. Zugefügtes Nickelsulfat und Ammoniumchlorid sorgten für eine Intensivierung der Färbung und ein braun-schwarzes Reaktionsprodukt [97].

Antigene durch Peroxidase darzustellen ist nur eine Möglichkeit, zum Teil wird in der Immunhistochemie (IHC) auch auf andere Enzyme zurückgegriffen. Ein Beispiel hierfür wäre die alkalische Phosphatase (AP), die auch bei der vorliegenden Arbeit im Rahmen der DAB-basierten Doppelfärbung Verwendung fand. Die Kopplung mit Streptavidin stellte die Verbindungsstruktur zwischen biotinyliertem Zweitantikörper und Enzym dar.

2.4.3 Marker für lymphoide Neogenese und Etablierung

Auf Basis der TLO-Definition von Kuerten et al. (Kapitel 1.4) wurden verschiedene immunhistochemische Marker zusammengestellt und etabliert [79]: Um die verschiedenen Kompartimente anzufärben, sollten anti-CD3 Antikörper die T-Zellen (beispielhaft verwendet in [84, 99]) und anti-CD45R (B220) Antikörper die B-Zellen (beispielhaft verwendet in [79, 99]) als Grundstock einer jeden Serie anfärben. Da das B220-Epitop z.B. auch auf manchen aktivierten, murinen T-Zellen beschrieben wurde [100], bedurfte es, um sich einer ausreichenden B-Zell-Spezifität sicher zu sein, zweier unabhängiger Vorversuche an verschiedenen Kleinhirn-Infiltraten, bei denen zusätzlich der B-Zell-Marker CD20 (beispielhaft verwendet in [24, 84], Kapitel 1.1.4.1) und Ig vergleichend gefärbt wurden. Ig selbst, produziert von und als Antigen für Plasmazellen, wurde im Laufe der Experimente als Ergänzung in die Auswahl aufgenommen. Ig⁺-Zellen stellen v.a. bei der SPMS in menschlichem Nervengewebe einen wichtigen Marker für B-Zell-Aggregate dar [24, 84]. Plasmazellen gelangen über den Blutstrom ins ZNS oder differenzieren vor Ort aus B-Zellen [24]. In den TLOs bzw. den ektopen lymphatischen Strukturen liegen sie dann bei Maus und Mensch diffus verteilt vor (Abbildung 5 D, Abbildung 17 E) [24, 79]. Etablierungsversuche ergaben, dass für eine adäquate Anfärbung, trotz biotinyliertem Ig als Erstantikörper, ein zusätzlicher biotinylierter Zweitantikörper wichtig war. Beim Übertritt von Plasmazellen und Lymphozyten aus der HEV in umliegendes Gewebe (*Leukodiapedese, homing*) läuft die Erkennung des jeweiligen Zielgewebes über das Zusammenspiel verschiedener Moleküle, wie $\alpha\beta7$ Integrin und

Mucosal Addressin Cell Adhesion Molecule-1 (MAdCAM-1) bzw. L-Selektin und *Peripheral Lymph Node Addressin* (PNAd) [101, 102]. Antikörper gegen MadCAM-1 (MECA-367) und PNAd (MECA-79) können also HEVs anfärben und ergänzen sich in der Literatur gut [79]. Trotz mehrfacher Experimente konnte allerdings keine verlässliche MadCAM-1-Färbung etabliert werden, so dass hier nur PNAd als HEV-Marker genutzt werden konnte. Dies lag am ehesten daran, dass die vorhandenen Antikörper im Laborbestand beschädigt waren. Gemäß der obigen Definition wurde CXCL13 (*B-lymphocyte chemoattractant*) als weiterer Marker ausgewählt. Da es in aktiven MS-Läsionen hochreguliert wird und mit der Anzahl an Immunzellen im Liquor korreliert, scheint es an der Rekrutierung von Lymphozyten in das ZNS beteiligt zu sein [103]. CXCL13 fand sich sowohl in der EAE als auch beim SPMS-Patienten in intrameningealen B-Zell-Aggregaten und wird im entzündlichen Setting unter anderem von FDCs gebildet [25, 104]. Über den Marker FDC-SP (nach frustranen Etablierungsversuchen mit FDC-M1) konnten ebendiese dendritischen Zellen immunhistochemisch nachgewiesen werden. Über ihre Ausläufer bilden sie ein retikuläres Gerüst und versorgen die B-Zellen im Keimzentrum mit Überlebens- und Proliferationsfaktoren [81].

Initial diskutiert und gefärbt wurde außerdem ein anti-CD10 Antikörper als Keimzellmarker [105], wovon aber aufgrund unverlässlicher Färbeergebnisse und umständlichen Protokollabweichungen (alkalische Demaskierung etc.) Abstand genommen wurde. Ebenso verhielt es sich mit dem Proliferationsmarker Ki67, der zwar gut zu färben, allerdings auch relativ unspezifisch für ein B-Zell-Aggregat oder TLO war, da natürlich auch normale Infiltrate proliferieren konnten. Außerdem stand zu bedenken, dass ein B-Zell-Aggregat für alle Marker in Serienschnitten durchgefärbt werden sollte, in seiner Tiefenausdehnung aber beschränkt war. So musste die Auswahl dahingehend verkleinert werden, als dass pro Aggregat nur wenige Folgeschnitte zur Verfügung standen, wovon bereits einer für eine HE-Übersichtsfärbung benötigt wurde. Zusammenfassend wurden also alle B-Zell-Aggregate in Zusammenschau der Serienschnitte mit der Markerkombination aus Tabelle 15 angefärbt.

Tabelle 15: Verwendete Immunhistochemie-Marker mit dem jeweils angefarbten Charakteristikum für lymphoide Neogenese

Antigen	Zielzelle/Zielstruktur
CD3	T-Zelle ^a
B220	B-Zelle ^a
CXCL13	Lymphatisches Chemokin
FDC-SP	FDC
Ig	Plasmazelle
PNAd	HEV

^a In einer Doppelfärbung verwendet um die B- und T-Zell Kompartimentalisierung darzustellen. CD, Cluster of Differentiation; FDC, Follikulär dendritische Zelle; HEV, Hochendotheliale Venole; Ig, Immunglobulin; PNAd, Peripheral Lymph Node Addressin.

Die ersten Probefärbungen wurden als Immunfluoreszenz (IF) durchgeführt, wobei aufgrund der relativ geringen Halbwertszeit der Fluorochrome bald nach einer weniger lichtempfindlichen Alternative gesucht wurde (Abbildung 4 B, C). Die Wahl fiel auf die DAB-Färbung, die, wenn auch mit etwas aufwendigerem Färbeprotokoll (Kapitel 2.4.4), durch eine lange Haltbarkeit der Schnitte und die lichtmikroskopische Beurteilbarkeit überzeugte. Nachteilig wirkte sich nur aus, dass der DAB-Ansatz ungeeignet für Doppelfärbungen war, da das immerzu schwarzbraune Reaktionsprodukt farblich nicht zwischen verschiedenen Markern unterscheiden lies. Gerade diese Unterscheidung war allerdings zum Nachweis der B- und T-Zell-Kompartimentalisierung im B-Zell-Aggregat nötig und erforderte so die Etablierung einer DAB-basierten Doppelfärbung, die am Ende zwei Farben darstellen konnte. Der Versuch, eine vorangehende DAB-Reaktion gegen CD3 (Farbprodukt schwarzbraun) mit einer Aminoethylcarbazol- (AEC-) Substratlösung zur Darstellung von B220 (Farbprodukt rot) zu komplettieren, scheiterte daran, dass beide Chromogene demselben Enzym, nämlich der Meerrettichperoxidase (HRP), als Elektronendonoren dienten [97]. Die folgende Suche nach einer Peroxidase-unabhängigen Farbreaktion führte zur AP, die B220 blau entwickeln konnte. Es stellte sich in mehreren Testfärbungen heraus, in welchen Konzentrationen und mit welchen Inkubationszeiten die AP für die IHC zu verwenden war und dass sich die blauen und schwarzbraunen Farbniederschläge lichtmikroskopisch klar unterscheiden ließen (Abbildung 4 C'). Problematisch blieb nur die Kernfärbung, da AP-Färbungen in der Regel mit wässrigen Medien eingedeckt werden [97], gängige Gegenfärbungen wie z.B. Kernechtrot aber wasserlöslich sind (das

wasserunlösliche Hämalaun wurde ebenfalls an einigen Markern getestet, schied aber gerade bei der Doppelfärbung wegen der ebenfalls bläulichen Farbgebung aus). Um dieses Problem zu umgehen, wurde zeitweise mit dem Fluoreszenzfarbstoff Diamidinphenylindol (DAPI) experimentiert, der dann aber unter dem Lichtmikroskop nicht mehr beurteilbar gewesen wäre, was ja einer der großen Vorteile der DAB-Reaktion gegenüber der IF war. Da die Kernfärbung für die Auswertung der vorliegenden Versuche keine große Rolle spielte, setzte sich zum Schluss die Lösung mit Kernechtrot durch, das innerhalb der ersten Woche nach Eindeckung noch gut sichtbar war. Es gelang immer, die Schnitte innerhalb dieses Zeitraumes unter dem Mikroskop zu beurteilen und fotografisch zu dokumentieren. Vereinzelt wurden Antikörper an murinen Milzschnitten getestet, hauptsächlich wurden die Färbungen aber an Lymphknoten von EAE-Mäusen und nicht-immunisierten Tieren etabliert, da sich alle obigen Marker für lymphoide Neogenese im Lymphknoten wiederfanden (Abbildung 5). Aus diesem Grund diente Lymphknotengewebe in allen Folgefärbungen sowohl als Positiv- als auch Negativkontrolle (zwei Kontroll-Objektträger unterschiedlicher Tiere pro Färbeansatz). Negativkontrollen auf Aggregatebene (Abbildung 17) wurden überdies stichprobenartig durchgeführt. Die Antikörperkonzentrationen wurden, soweit nicht vom Hersteller angegeben oder aus Erfahrungswerten bekannt, in Titrationsversuchen festgelegt. Es stellte sich heraus, dass die Ergebnisse auch auf das Kleinhirn der Maus übertragbar waren.

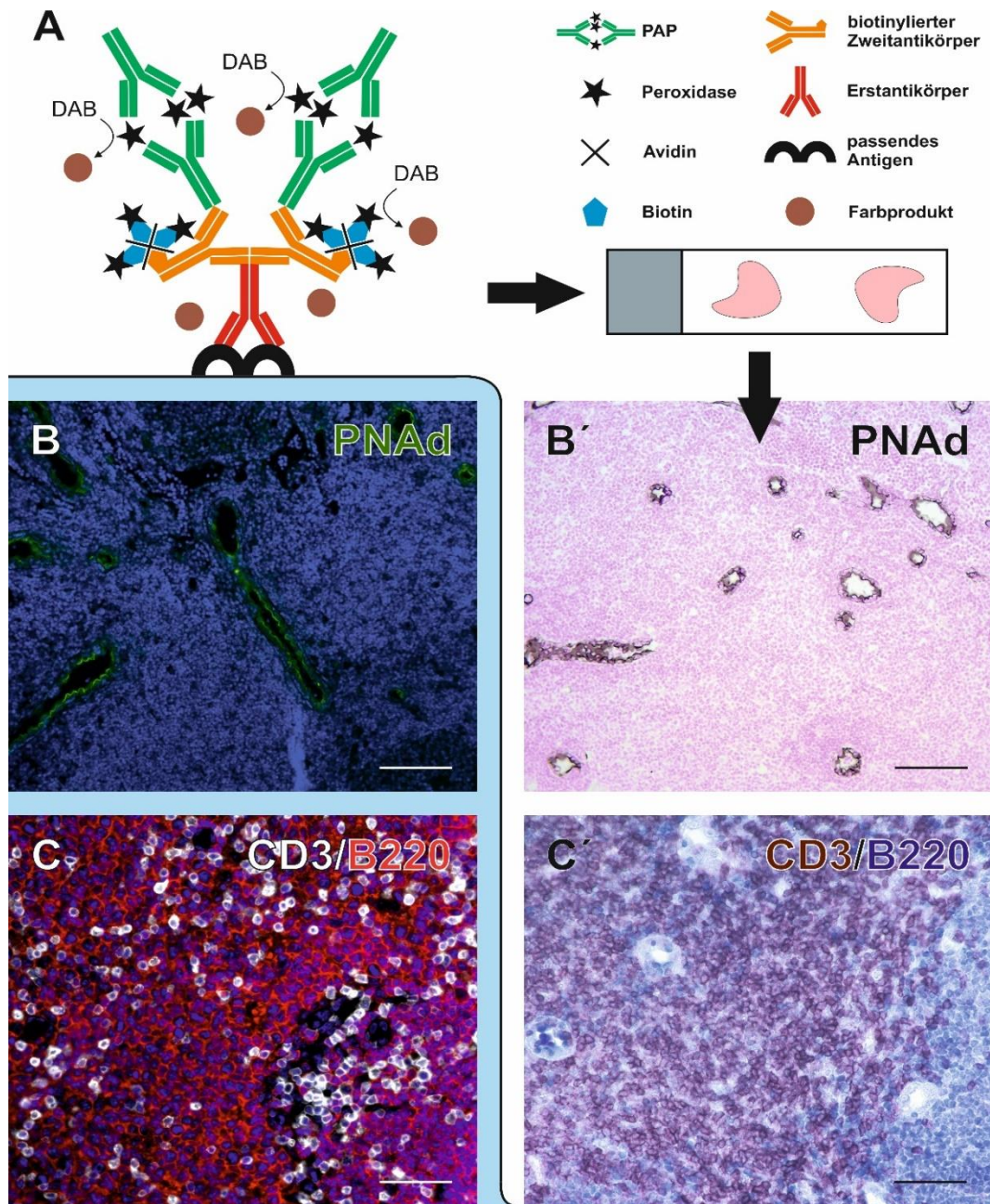


Abbildung 4: Grundlagen der DAB-basierten Färbung und Etablierungsversuche mit IF. **A)** Schematische Seitansicht der Antikörperverhältnisse bei der DAB-Immunhistochemie. Die Farbreaktion ist vereinfacht und aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht an jedem Peroxidase-Molekül dargestellt (Kapitel 2.4.2, Abbildung basierend auf einer Grafik aus [106]). Nach der Färbung wurden die Objektträger mikroskopiert. **B', C')** Beispielhaft mit DAB gefärbtes Lymphknotengewebe. Die Doppelfärbung in **C'** findet sich der Einfachheit halber nicht in dem Schema aus **A** wieder. **B, C)** Den DAB-Färbungen aus **B'** und **C'** sind entsprechende IF-Bilder von Lymphknoten gegenübergestellt, wie sie in der Etablierungsphase initial getestet wurden. Die DAPI-Kernfärbung ist als blaue Fluoreszenz zu erkennen. Letztlich fiel die Entscheidung zugunsten der haltbareren und lichtmikroskopisch beurteilbaren DAB-Färbung. Messbalken **B** und **B'** 100 µm, **C** und **C'** 50 µm. CD, Cluster of Differentiation; DAB, Diaminobenzidin; DAPI, Diamidinphenylindol; IF, Immunfluoreszenz; PAP, Peroxidase-anti-Peroxidase-Komplex; PNAd, Peripheral Lymph Node Addressin.

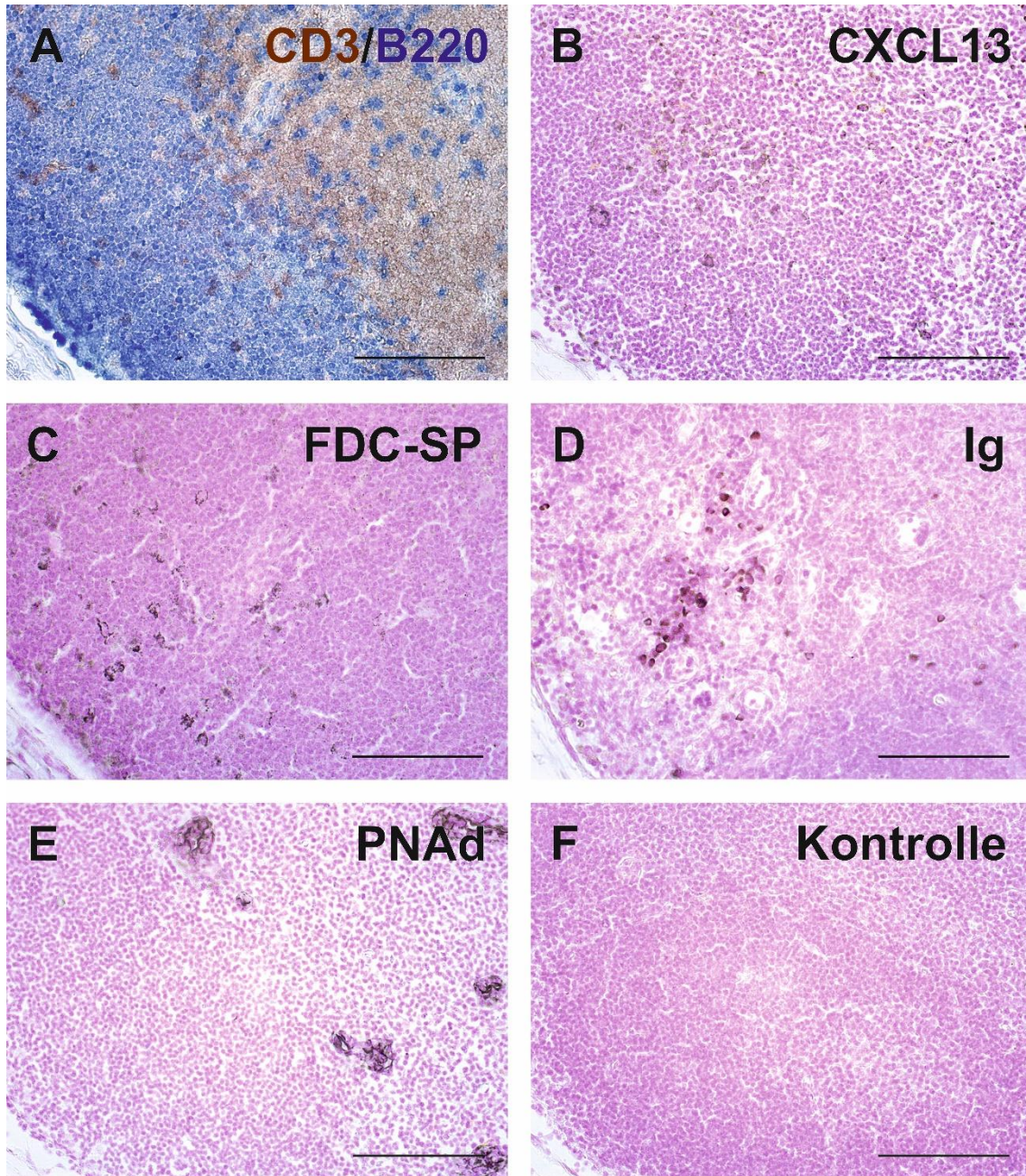


Abbildung 5: Anfärbung der Marker für lymphoide Neogenese an Lymphknotengewebe, DAB-Färbung, Messbalken 100 μm . **A)** Doppelfärbung mit B- und T-Zell-Kompartimentalisierung. Der B-Zell-Follikel stellte sich blau dar. **B)** CXCL13-sezernierende Zellen lagen im B-Zell-Follikel (Farbniederschläge im Randbereich der Zellen bzw. interzellulär). **C)** Die Ausläufer der FDCs waren teilweise erkennbar. **D)** Plasmazellen (Ig^+) häuften sich im B-Zell-Follikel, es zeigten sich aber auch auswandernde Zellen (rechter Bildrand). **E)** Die T-Zell-Zone des Lymphknotens beherbergte PNAd^+ hochendotheliale Venolen. **F)** Repräsentative Negativkontrolle. Bei Weglassen des Primärantikörpers fanden sich keine DAB-typischen schwarzbraunen Farbniederschläge. CD, Cluster of Differentiation; DAB, Diaminobenzidin; FDC, Follikulär dendritische Zelle; Ig, Immunglobulin; PNAd, Peripheral Lymph Node Addressin.

2.4.4 Färbeprotokolle

Generell fanden alle Verdünnungen und Waschungen, falls nicht anders beschrieben, in PBS statt, wobei für die Verdünnungen pH-kontrollierte PBS (0,01 M; pH 7,4) verwendet wurde. Nach Durchlaufen der absteigenden Alkoholreihe (Xylol, 2 x 10 min; Ethanol 100 %, 2 x 5 min; Ethanol 96 %, 80 %, 70 %, A. dest., je 5 min) folgte der endogene Peroxidase-Block für 10 min bei Raumtemperatur (RT) und Dunkelheit in 3 % H₂O₂ in A. dest. Anschließend wurden die Schnitte in A. dest. gewaschen (2 x 5 min) und in 10 mM Citratpuffer (pH 6,0) in der Mikrowelle sauer demaskiert. Bei einer Leistung von 800 W wurden die Objektträger dabei in ca. einminütigen Abständen 7 x für 10 s aufgekocht, um dann für etwa 30 min bei RT abzukühlen. In der Folge wurde der Citratpuffer fließend durch A. dest. ersetzt, die Schnitte für 3 x 5 min in PBS gewaschen und mit 5 % normalem Ziegenserum (NGS, alle Kaninchen oder Ratten Antikörper: anti-CD3, anti-FDC-SP, anti-PNAd) bzw. 5 % normalem Kaninchenserum (NrbS, alle Ziegen Antikörper: anti-CXCL13, anti-Ig) für 1 - 2 h geblockt. Der Primärantikörper wurde in entsprechender Verdünnung (anti-CD3 1:100, anti-CXCL13 1:80, anti-FDC-SP 1:500, anti-Ig 1:1.000, anti-PNAd 1:200) über Nacht bei 4 °C auf das Gewebe aufgebracht (ca. 30 µl pro Schnitt), wobei die Negativkontrollen nur mit PBS behandelt wurden. Am nächsten Tag wurde der Sekundärantikörper 1:250 verdünnt und nach einem Waschschrift (3 x 5 min) für 1 h bei RT auf den Schnitten inkubiert. Dabei wurden biotinylierte anti-Kaninchen Zweitantikörper von der Ziege bei allen Kaninchen Erstantikörpern (anti-CD3, anti-FDC-SP), biotinylierte anti-Ziege Zweitantikörper vom Kaninchen bei allen Ziegen Erstantikörpern (anti-CXCL13, anti-Ig) und biotinylierte anti-Ratte Zweitantikörper von der Ziege bei anti-PNAd als Ratten Erstantikörper verwendet. Anschließend folgte eine erneute Waschung (3 x 5 min), bevor zur Verstärkung der Farbreaktion bei allen Kaninchen Erstantikörpern ein Kaninchen PAP (1:250, 30 min im Dunkeln bei RT) verwendet wurde. Dieser wurde darauffolgend um den bereits 30 min zuvor angesetzten ABC (1:250) ergänzt, nachdem die Schnitte wiederum 3 x 5 min gewaschen worden waren. Der PAP-Schritt entfiel bei den Ratten und Ziegen Erstantikörpern. Nach einer halbstündigen Inkubationszeit des ABC im Dunkeln

erfolgten zusätzliche Waschschriffe in PBS (2 x 5 min) und Phosphatpuffer (PB; 0,1 M; pH 7,4; 2 x 5 min). Währenddessen konnten die DAB-Entwicklungsreagenzien bereits vorbereitet werden: Zu den vorgelegten 67,5 ml PB kamen neben 1350 µl Nickelsulfat und ebenso viel Glucose (10 %), 150 µl Ammoniumchlorid, 1,5 ml DAB und kurz vor Zugabe des Gemisches zu den Schnitten 225 µl GOD. Wurden aufgrund hoher Schnitzzahl mehrere Küvetten benötigt, konnten die *Aliquots* mengenmäßig entsprechend vervielfacht und der große Ansatz gleichmäßig auf die Reaktionsbehälter verteilt werden. Die Entwicklungslösung konnte dann lichtgeschützt auf das Gewebe einwirken, während gleichzeitige Mikroskop-Kontrollen den Färbeerfolg belegten und die individuelle Färbedauer (maximal 30 min) bestimmten (CD3: 10 - 25 min, CXCL13: 6 - 28 min, FDC-SP: 20 - 28 min, Ig: 7 - 11 min, PNAd: 7 - 11 min). Abgestoppt wurde die Reaktion im Anschluss mit PBS gefolgt von weiteren Waschschriffen (3 x 5 min in PBS, Eintauchen in A. dest. zur Entsalzung). Nach dreiminütiger Kernfärbung mit 0,1 % Kernechtrot wurde das Gewebe in der Folge in der aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert (A. dest., Spülung; Ethanol 70 %, 80 %, 96 %, je 1 min; Ethanol 100 %, 2 x 3 min; Xylol, 2 x 5 min) und abschließend mit DePex eingedeckt.

Für den Marker CD3, der nur als Teil eingangs beschriebener Doppelfärbung mit B220 verwendet wurde, galt nach der DAB-Entwicklung ein abweichendes Protokoll (Waschschriffe siehe oben). Ein erneuter Block mit 5 % NGS für 1 - 2 h bereitete die zweite Erstantikörper-Inkubation mit anti-B220 (Ratten Antikörper, 1:500) über Nacht bei 4 °C vor (die Negativkontrollen wurden wiederum nur mit PBS beschichtet). Analog zu obigem Ablauf wurde dann am dritten Tag der biotinylierte anti-Ratte Sekundärantikörper von der Ziege (1:250) für 1 h bei RT inkubiert. Mit einer Verdünnung von 1:500 wurde anschließend die AP mit Streptavidin für 30 min auf die dunkelstehenden Schnitte aufgetragen. Die Entwicklung erfolgte mit dem Vector *Blue Substrate Kit*, dessen Reagenzien der Herstelleranweisung entsprechend in 500 µl 100 mM Tris HCL (pH 8,2) gut durchmischt wurden. Das Gewebe wurde im Anschluss für ca. 10 - 15 min mit der Reaktionslösung versetzt, wobei regelmäßige Mikroskop-Kontrollen erfolgten. Auch hier konnte die Reaktion mit PBS gestoppt werden. Wiederum

diente 0,1 % Kernechtrot zur Färbung der Zellkerne, die allerdings aufgrund der Wasserlöslichkeit und folgenden wässrigen Eindeckung mit Aqua Poly/Mount 8 min in Anspruch nahm.

Die HE-Färbung wurde nach Standardprotokoll zentral für das gesamte Institut angefertigt. Spülungen erfolgten in A. dest. Nach Entparaffinierung in der absteigenden Alkoholreihe (Xylol, 2 x 10 min; Ethanol 100 %, 2 x 2 min; Ethanol 96 %, 80 %, 70 %, 50 %, A. dest., je 2 min) folgte die Behandlung der Proben mit Hämalaun nach Mayer für 10 min. Nach Spülung wurden die Schnitte in fließendem Leitungswasser gebläut und die Färbung so stabilisiert (10 min). Anschließend wurde erneut gespült und die Färbung mit angesäuertem Eosin (0,1 %) komplettiert (10 min), so dass die Zellkerne blau und das Zytoplasma rot imponierten. In die aufsteigende Alkoholreihe, die der DePex Eindeckung vorweg ging, konnte man wegen der Wasserlöslichkeit von Eosin nach kurzem Abwaschen der Schnitte erst bei 96 % Ethanol (2 min) einsteigen. Es folgten 100 % Ethanol und Xylol, jeweils 2 x 5 min.

2.4.5 Mikroskopie

Die fertig gefärbten und abgedampften Schnitte wurden mikroskopiert, abfotografiert und archiviert. Die Bilder konnten von der Kamerasoftware automatisch mit Messbalken versehen werden. Diese dienten als eine maßstabsgetreue Vorlage für die Abbildungen dieser Arbeit, in die die Skalen nachträglich eingefügt wurden. Es wurde bei der Fotografie in Abhängigkeit von der Färbeintensität auf eine möglichst konstante Belichtung geachtet. Für die Flächenvermessung des Kleinhirn-Parenchyms (Kapitel 2.4.6.1) wurden überlappende Bilder der HE-gefärbten Kleinhirne in der 5-fachen Vergrößerung angefertigt, die später am Computer zusammengesetzt wurden. Die Einteilung in die drei Infiltrat-Kategorien (Kapitel 2.4.6.2) erfolgte anhand der 20-fachen Vergrößerung, während die Marker-Besetzung der B-Zell-Aggregate in der 40-fachen Vergrößerung bestimmt wurde. Jedes B-Zell-Aggregat wurde über mehrere Folgeschnitte und somit Marker-Färbungen hinweg mikroskopisch verfolgt, um es dann in der Zusammenschau der verschiedenen Aufnahmen charakterisieren zu können.

2.4.6 IHC-Auswertung

Der erste Gewebeschnitt auf jeder Ebene der Serie wurde mit HE gefärbt, der jeweils darauffolgende dann mit der CD3/B220-Färbung. Nur wenn in der Doppelfärbung ein B-Zell-Aggregat gefunden wurde (*conditio sine qua non*), wurden die nachfolgenden Schnitte für die Marker aus Kapitel 2.4.3 durchgefärbt, um das Aggregat hinsichtlich der lymphoiden Neogenese charakterisieren zu können. Hier unterscheidet sich das Vorgehen etwas im Vergleich zu vorangehenden Arbeiten, bei denen die HE-Färbung als Übersicht galt, anhand derer entschieden wurde, ob der Bereich des Gewebes weiter immunhistochemisch untersucht werden sollte [79, 84]. Hier diente die HE-Färbung dagegen lediglich zur Vermessung der Parenchymfläche, Entscheidungsgrundlage für die Weiterfärbung war einzig die CD3/B220-Färbung.

2.4.6.1 Vermessung der Parenchymfläche

Da durch gering verschiedene Einbettungswinkel, minimal abweichende Schnitttiefen oder interindividuell verschiedene Kleinhirne eine unterschiedlich große Markfläche jeder Maus auf das Vorhandensein von Infiltraten hin untersucht wurde, wohnte der absoluten Zahl der Infiltrate eine Verzerrung inne. Um diese Absolut-Zahl flächenkorrigiert und somit berichtet darstellen zu können, war es nötig, die Anzahl der Infiltrate in Bezug zu der mikroskopisch ausgewerteten Parenchymfläche jedes Tieres zu setzen: $\text{Infiltrate/Fläche [1/mm}^2\text{]}$. Zur Vermessung wurden die überlappenden Kleinhirnaufnahmen in der kalibrierten Vermessungssoftware nebeneinandergelegt und deren Markraum manuell umfahren (Grenze zwischen Mark und Körnerzellschicht, einschließlich der Infiltrate). Da wiederholte Testmessungen gleicher Areale dabei im Vorfeld eine stabil reproduzierbare Flächenerhebung ergaben, wurde jeder Schnitt nur einmalig vermessen und die Werte der unterschiedlichen Schnitthöhen zur Gesamtparenchymfläche des jeweiligen Tieres aufsummiert. Aufgrund der schlechten histologischen Markdarstellung in der CD3/B220-Färbung, konnte die Fläche am doppeltgefärbten Schnitt, an dem auch die Infiltrate gezählt wurden, nicht vermessen werden, sondern musste im vorangehenden HE-Schnitt ermittelt werden. Auch hier deuteten einige Testmessungen daraufhin, dass der

flächenmäßige Unterschied zweier aufeinanderfolgender Schnitte zu vernachlässigen war. Im Mittel wurde bei den 14 Versuchstieren für die Histologie eine Parenchymfläche von 8,91 mm² pro Maus (SD = 3,06 mm²; Minimum = 4,11 mm²; Maximum = 15,33 mm²) auf das Vorhandensein von Infiltraten hin untersucht. Dieser Durchschnittswert lag in der Vehikel-behandelten Gruppe mit 11,48 mm² (SD = 3,68 mm²) höher als bei den Fingolimod-Tieren mit 7,48 mm² (SD = 1,43 mm²). Eine Erklärung könnte sein, dass bei den mit FTY720 behandelten Tieren weniger Gewebedestruktion durch lymphoide Infiltration vorhanden war. Gerade ausgedehnte Infiltrate erweiterten, wenn sie an die Übergangszone zur Körnerzellschicht reichten, in der Vehikel-Gruppe die Fläche des Markraumes. Ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen bestand allerdings bezüglich der untersuchten Markfläche nicht ($p = 0,06$).

2.4.6.2 Einteilung der Infiltrate

Das Konzept, zwischen diffusen Infiltraten bzw. Entzündungsvorgängen und B-Zell-Aggregaten, die dann ihrerseits Merkmale der lymphoiden Neogenese ausbilden konnten, zu unterscheiden, war bekannt (Kapitel 1.4). Dieser Ansatz wurde hier auf Grundlage der CD3/B220-Zellfärbung noch um einen zusätzlichen Infiltrattyp ergänzt: Abhängig vom Gehalt und der Anordnung der B-Zellen und somit entsprechend dem B-Zell-Fokus dieser Arbeit, wurde zwischen Non-B-Zell-Infiltraten, diffusen B-Zell-Infiltraten und B-Zell-Aggregaten unterschieden (Abbildung 13). Die Zellansammlungen wurden anhand der festgelegten Kriterien in Tabelle 16 in die verschiedenen Gruppen eingeteilt.

Anschließend wurden die B-Zell-Aggregate weiter untersucht: Ein Aggregat wurde für die Marker Ig und FDC-SP als positiv befunden, wenn mindestens eine Zelle im oder in unmittelbarer Nähe des B-Zell-Aggregates positiv gefärbt war. Für das vorwiegend interzelluläre Chemokin CXCL13 galt dagegen, dass mindestens drei Farbniederschläge in enger Beziehung zum B-Zell-Aggregat vorhanden sein mussten, bevor es als CXCL13⁺ gewertet wurde. Der HEV-Marker PNA_d galt bei Anfärbung eines Gefäßes oder dreier markierter Zellen im B-Zell-Aggregat oder der unmittelbaren Umgebung als positiv. Für die Definition des B-Zell-Aggregates mit lymphoiden Charakteristika bedurfte es in diesem

Rahmen der positiven Färbung mindestens eines der obigen Marker (CXCL13, FDC-SP, Ig, PNA_d) in dem entsprechenden B-Zell-Aggregat (*conditio sine qua non*).

Tabelle 16: Einteilungskriterien für die Infiltrat-Klassen

Infiltrat-Kategorie	Kriterien
A) Non-B-Zell-Infiltrat	- nur T-Zellen - diffus, locker gepackt - zum Infiltrat gehöriges Gefäß ^{a,b}
B) Diffuses B-Zell-Infiltrat	- T- und B-Zellen vorhanden ^c - diffus, locker gepackt - zum Infiltrat gehöriges Gefäß ^a
C) B-Zell-Aggregat	- > 1/3 B-Zellen - enges Zellcluster - mehrere Zelllagen, zentrales Gefäß - > 3.000 µm ² ^d

In Betracht gezogen wurden nur zerebelläre Infiltrate mit Bezug zum Parenchym, keine Mindestzellzahl war nötig. Generell mussten zur Wertung alle Kriterien für das entsprechende Infiltrat erfüllt sein. Ausnahme: War ein Infiltrat zwar eng gepackt, hatte aber zu wenig B-Zellen oder war zu klein, um als B-Zell-Aggregat klassifiziert zu werden, dann wurde es als diffuses B-Zell-Infiltrat gewertet. Mehrfachverbände derselben oder unterschiedlicher Infiltrat-Kategorien wurden als einzelne Infiltrate gezählt, wenn jeweils Gefäße mit eigenen, am Lumen ausgerichteten Lymphozyten vorhanden waren und die Infiltrate für sich genommen alle entsprechenden Kriterien der jeweiligen Kategorie erfüllten. ^a Gefäß musste mit Lymphozyten assoziiert bzw. in diese eingebettet und die Lymphozyten in mehr als einem Ring um das Gefäß angeordnet sein. ^b Bei massiver T-Zell-Infiltration konnte ein Non-B-Zell-Infiltrat auch ohne Gefäß gezählt werden. ^c Eine einzelne B-Zelle war schon zur Abgrenzung von A ausreichend. ^d Da sehr kleine Ansammlungen von Zellen z.T. kein eindeutiges Cluster bildeten oder nicht mehrreihig um das fraglich vorhandene Gefäß angeordnet waren, gab es zu Beginn der Auswertung mit den ursprünglichen Kriterien vereinzelt schwierige Einteilungen. Um in diesen wenigen Fällen möglichst objektiv entscheiden zu können, wurde die Mindestfläche nach Vermessung und Analyse dieser Streitfälle als weitere Bedingung für ein B-Zell-Aggregat definiert.

2.5 Quantitative Immunoassays

2.5.1 B-Zell-ELISPOT

2.5.1.1 ELISPOT-Grundlagen

Der ELISPOT findet in der klinischen Forschung und Diagnostik breite Anwendung, wobei v.a. der T-Zell-ELISPOT zur Messung von bestimmten Zytokinen in der Onkologie, Immunologie oder Infektiologie eine Rolle spielt [106]. Beispielhaft in der Tuberkulosedagnostik bewährte sich die, im Vergleich zu herkömmlichen Verfahren, wie z.B. dem Tuberkulin-Hauttest, hohe Spezifität und Sensitivität des ELISPOT [107]. Auch gegenüber dem ELISA wird das

Verfahren als sensitiver angesehen [106]. Normalerweise basiert die Nachweismethode auf dem Aussäen eines Fänger-Antikörpers, der bei Inkubation der T-Zellen die sezernierten Zytokine bindet. Diese „Antigene“ können dann über einen zweiten enzymgekoppelten Antikörper nachgewiesen werden [106].

Im Vergleich zum klassischen Versuchsaufbau wurde beim vorliegenden B-Zell-ELISPOT allerdings ausgenutzt, dass die gesuchten MP4-spezifischen B-Zellen selbst die entsprechenden Antikörper produzierten, so dass MP4 als Antigen aufgebracht werden konnte. Zusätzlich wurde für jede Maus in separaten *Wells* auch anti-Maus IgG aufgetragen. Dies diente zur Bestimmung der Gesamtantwort aller B-Zellen und somit als Positivkontrolle. Weitere *Wells* wurden nur mit steriler PBS beschichtet im Sinne einer Negativkontrolle. Geblockt wurde die Platte mit 10 % fetalem Kälberserum (FCS), um dem später zugegebenen anti-Maus Zweitantikörper von der Ziege keine unspezifische Angriffsfläche zu bieten. Die Zellen aus den zerkleinerten Lymphknoten der immunisierten Tiere wurden nach entsprechender Vorbereitung plattiert. Im Inkubator bei annähernder Körpertemperatur produzierten die B-Zellen, die MP4 als spezifisches Antigen erkannt hatten, über 24 Stunden dann entsprechende Antikörper, die am Ort der B-Zelle im *Well* an MP4 banden. Parallel stellte das anti-Maus IgG in den *Wells* der Positivkontrolle ein Antigen für alle murinen B-Zellen dar, während bei der Negativkontrolle überhaupt keine Antigenerkennung stattfinden konnte. In einem gründlichen Waschschrift wurden anschließend alle Zellen abgelöst, während die gebundenen Antikörper im *Well* verankert blieben und für den biotinylierten anti-Maus Zweitantikörper als Andockstelle dienten. Das Biotin wiederum verband sich mit der an Streptavidin gekoppelten AP, die die Substrate aus einem kommerziellen Kit in einen blauen Farbniederschlag an der Stelle der ursprünglichen B-Zelle umwandelte (Abbildung 6 A, B). Die Grundlage der Entwicklungslösung bildete dabei ein Tris-HCL-Puffer, der das Milieu in Richtung des alkalischen pH-Optimums (9 - 10) des Enzyms verschob [106]. Da eine B-Zelle mehrere Färbekaskaden an ihren zahlreichen Antikörpern nach sich zog, ergaben sich in der Aufsicht des *Wells* flächig gefärbte Areale, sogenannte Spots. Während des ganzen Experiments wurde akribisch darauf

geachtet die Platte so wenig wie möglich zu bewegen, um sicher zu stellen, dass jede Zelle tatsächlich nur an einem Ort Antikörper produzierte.

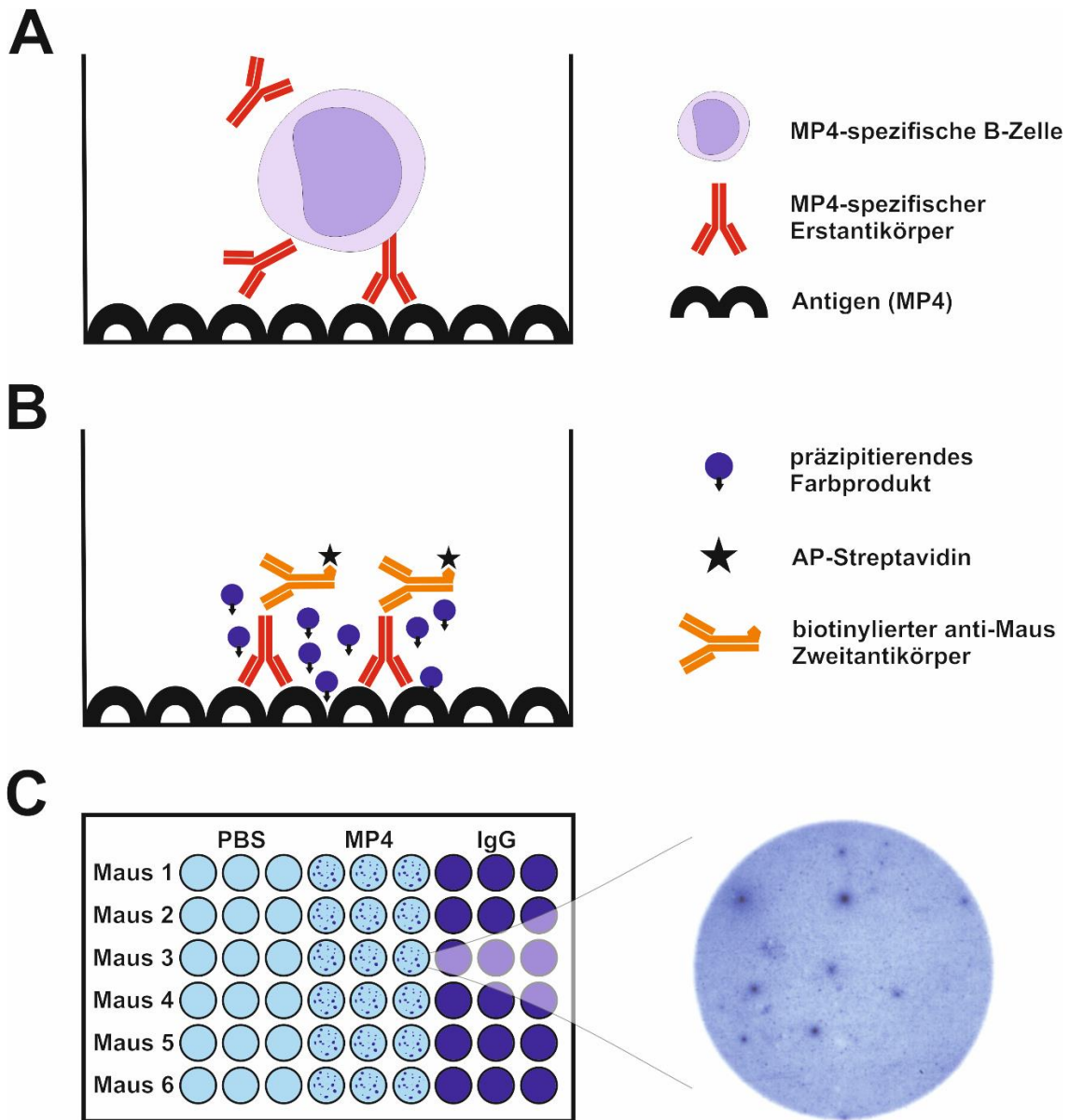


Abbildung 6: ELISPOT. A, B) Schematisches Well mit Darstellung der Antikörperverhältnisse beim ELISPOT in der Seitansicht. Nachdem die spezifische B-Zelle Antikörper gegen MP4 gebildet hatte (A), wurde sie abgewaschen. Die Antigen-Antikörperbindung wurde über eine enzymatische Färbekaskade am ehemaligen Ort der B-Zelle sichtbar (B). C) Schematisches Plattenlayout in der Aufsicht nach ELISPOT-Entwicklung: Jede Maus bekam eine Zeile, PBS (Negativkontrolle), MP4 und anti-Maus IgG (Positivkontrolle) je drei benachbarte Spalten auf der Platte zugeteilt. Vergrößert ist beispielhaft das mit MP4 beschichtete Well einer Maus mit Vehikel-Behandlung. Aus Übersichtsgründen zeigt die Grafik keine 96-Well-Platte. Abbildung basierend auf einer Grafik aus [106]. AP, Alkalische Phosphatase; ELISPOT, Enzyme-linked Immuno Spot Assay; Ig, Immunglobulin; PBS, Phosphatgepufferte Salzlösung.

2.5.1.2 ELISPOT-Protokoll

Das viertägige B-Zell-ELISPOT-Protokoll begann mit dem *Coating* der Antigene auf die beschriftete *Multiwell*-Platte am Vortag der Mauspräparation (Abbildung 6 C). Die ersten Schritte des Experimentes wurden unter einer Sterilbank und möglichst hygienischen Bedingungen durchgeführt. Für MP4 wurde eine Konzentration von 10 µg/ml, für anti-Maus IgG 15 µg/ml im *Well* angestrebt, wobei pro *Well* ein Volumen von 80 µl aufgebracht wurde. Als Negativkontrolle diente sterile PBS. Über Nacht lagerte die Platte im Kühlschrank, bevor sie am Präparationstag 3 x in PBS gewaschen (Standard-Waschvolumen 200 µl/*Well*) und anschließend mit 10 % FCS in PBS geblockt wurde (2 h bei RT). Der unperfundierte Leistenlymphknoten der Versuchsmaus wurde währenddessen entnommen und in 5 ml RPMI-1640 (versetzt mit L-Glutamin und 1 % Penicillin-Streptomycin) mit einem Spritzenstempel zerkleinert, bis eine Trübung des Mediums sichtbar wurde. Anschließend wurde das zellreiche Medium über einen 70 µm Zellfilter in ein Reaktionsgefäß überführt, dessen Inhalt mit RPMI-1640 auf 10 ml Volumen aufgefüllt wurde. Danach wurde mit den Lymphknoten der anderen Versuchstiere analog verfahren. Nach 10 min Zentrifugation bei 277 x g konnte der Überstand verworfen, das Zellpellet resuspendiert und erneut 5 ml Medium zugegeben werden. Um später vergleichbare Zellzahlen plattieren zu können, wurden für jede Maus 10 µl einer 1:10 Verdünnung des zellreichen Mediums mit 0,1 % Trypanblau in eine Zählkammer pipettiert und mikroskopisch ausgezählt. Der MW der Lymphozyten-Zählung aus zwei unterschiedlichen Bereichen der Kammer (jeweils 16 Felder) stellte im Anschluss die Grundlage dar, um das gesuchte Verdünnungsvolumen bei einer angestrebten Zellzahl von 1×10^6 Zellen in einem Endvolumen von 200 µl/*Well* für jede Maus individuell zu berechnen. Es wiederholte sich der bereits bekannte Zentrifugationsschritt, mit dem Unterschied, dass die resuspendierten Zellen in der Folge mit L-Glutamin-haltigem HL-1 Medium oder RPMI (mit 1 % Penicillin-Streptomycin und 10 % FCS) versetzt wurden (unterschiedliche Volumina entsprechend obiger Rechnung). Zum Ende des zweiten Versuchstages und nach Ablauf der Blockzeit konnten nun mit 200 µl Zelllösung der jeweiligen Maus nach dreimaliger steriler

PBS-Waschung der Platte 1×10^6 Lymphozyten/*Well* plattiert werden und bei $37\text{ }^\circ\text{C}$ und 7% CO_2 für 24 h inkubieren. Bei einzelnen Mäusen waren zu wenig Zellen für alle neun vorgesehenen *Wells* im Medium, so dass entsprechend weniger *Wells* mit Priorität auf MP4 plattiert wurden. Zum Teil wurde auch mit einer Zellzahl von 5×10^5 Zellen/*Well* experimentiert, diese Mäuse finden sich allerdings nicht in der Auswertung wieder. Nach Ablauf der Inkubationszeit am dritten Tag wurde die Platte intensiven Waschschritten (3 x PBS; 3 x PBS-Tween 0,025 %) unterzogen, um die Zellen wieder zu entfernen. Ab diesem Schritt konnte der Arbeitsprozess außerhalb der Sterilbank fortgeführt werden. Als Zweitantikörper wurden dann biotinylierte anti-Maus IgGs von der Ziege in 0,5 % FCS/PBS verdünnt (1:2.000) und auf alle belegten *Wells* über Nacht im Kühlschrank aufgebracht (80 $\mu\text{l}/\text{Well}$). Die Entwicklung und farbige Darstellung der produzierten Antikörper (und damit der indirekte B-Zell-Nachweis) wurde dann am letzten Tag mittels AP-Streptavidin (1:800 in 0,5 % FCS/PBS für 2 h bei RT) und entsprechendem Vector *Blue Substrate* Kit bewerkstelligt, wobei auch hier zahlreiche Waschschriffe in PBS-Tween 0,025 % (4 x) vorausgingen bzw. sich anschlossen (3 x PBS-Tween 0,025 %; 3 x A. dest.). Die verschiedenen Reagenzien des Entwicklungskits wurden der Anleitung des Herstellers entsprechend einem 0,1 M Tris-HCL-Puffer (pH 8,4) beigemischt. Die Zugabe von 80 $\mu\text{l}/\text{Well}$ dieser Entwicklungslösung färbte auf der Platte blaue Spots an. Die Färbung wurde nach Ermessen (in der Regel nach etwa 10 min) abgestoppt, indem die Platte intensiv mit fließendem A. dest. gewaschen wurde (3 x).

2.5.1.3 ELISPOT-Auswertung

Über Nacht konnte die Platte bei RT und fernab von direktem Lichteinfluss trocknen, um dann ausgelesen zu werden. In der ImmunoSpot-Software wurden zuerst möglichst allgemeingültige Parameter für die Auswertung voreingestellt, in einem zweiten Schritt erlaubte die sogenannte *Quality Control* eine individuelle Nachbewertung der Computerzählung für jedes einzelne *Well*. Die auf diese Weise gezählten Spots flossen folgendermaßen in die Auswertung ein: Allein entscheidend war die Anzahl der Spots, nicht etwa deren Größe. Aus allen Spots der MP4-*Wells* einer Maus wurde der MW gebildet, von dem wiederum der MW der Negativkontrollen desselben Versuchstieres abgezogen wurde (analog

wurde auch mit anti-Maus IgG verfahren). Die Ergebnisse aller Vehikel- und Fingolimod-Mäuse wurden dann als MW zusammengefasst. Auf laborinternen Erfahrungswerten zu B-Zell-ELISPOT-Platten basierte ein *Too numerous to count*- (TNTC-) Wert von 500 Spots/*Well*. Ab dieser Menge erschien das *Well* blau, ohne dass sich sicher Spots differenzieren ließen. Versuchstiere wurden in der Auswertung nur dann berücksichtigt, wenn ausreichend Zellen plattiert werden konnten und die Zusammenschau aus Negativ- und Positivkontrolle mit den MP4-*Wells* plausibel war.

2.5.2 ELISA

2.5.2.1 ELISA-Grundlagen

Beim ELISA wird über den Substratumsatz auf die Konzentration der zu bestimmenden Messgröße rückgeschlossen, wobei je nach Technik entweder Antigene (kompetitiver ELISA, Sandwich-ELISA) oder Antikörper (direkter ELISA) quantifiziert werden sollen [106]. Da hier die Antikörperkonzentration gegen MP4 im Serum der Mäuse bestimmt werden sollte, bezieht sich dieser Abschnitt rein auf den direkten ELISA. Hydrophobe Wechselwirkungen sorgten im ersten Schritt beim *Coating* der Mikrotiterplatte für eine Haftung des Antigens, das, um sogenannte *Multilayer* zu verhindern, in einer Konzentration von 0,5 - 10 µg/ml zugegeben werden sollte (hier 3 µg/ml MP4) [106]. Mit 1 % Milchpulver konnten dann unspezifische Proteinbindungsstellen für die enzymgekoppelten Antikörper blockiert und somit die Hintergrundaktivität des Assays gesenkt werden [106]. Die Antikörper im Serum der Versuchstiere gegen MP4 konnten im Anschluss inkubieren und banden in einem weiteren Schritt einen biotinylierten anti-Maus Zweitantikörper von der Ratte (Abbildung 7). Als Enzym wurde an Avidin gebundene HRP bevorzugt, wobei Avidin die Bindung an den biotinylierten Zweitantikörper bewerkstelligte. Die Enzymaktivität konnte bei der Entwicklung farblich durch das HRP-Substrat Tetramethylbenzidin (TMB) bestimmt werden. Dieses wurde, solange die Peroxidase in ihrem pH-Optimum (5 - 7) arbeitete [106], in ein blaues Farbprodukt umgesetzt. Sobald die richtige Färbintensität erreicht war (Verfärbung der Negativ-*Wells*), konnte das Milieu der HRP durch Zugabe von Schwefelsäure angesäuert und die Reaktion so gestoppt werden. Colorimetrisch wurde dann die Konzentration des bis zu

diesem Zeitpunkt entstandenen Produkts und damit proportional die Konzentration der Antikörper gegen MP4 gemessen [106].

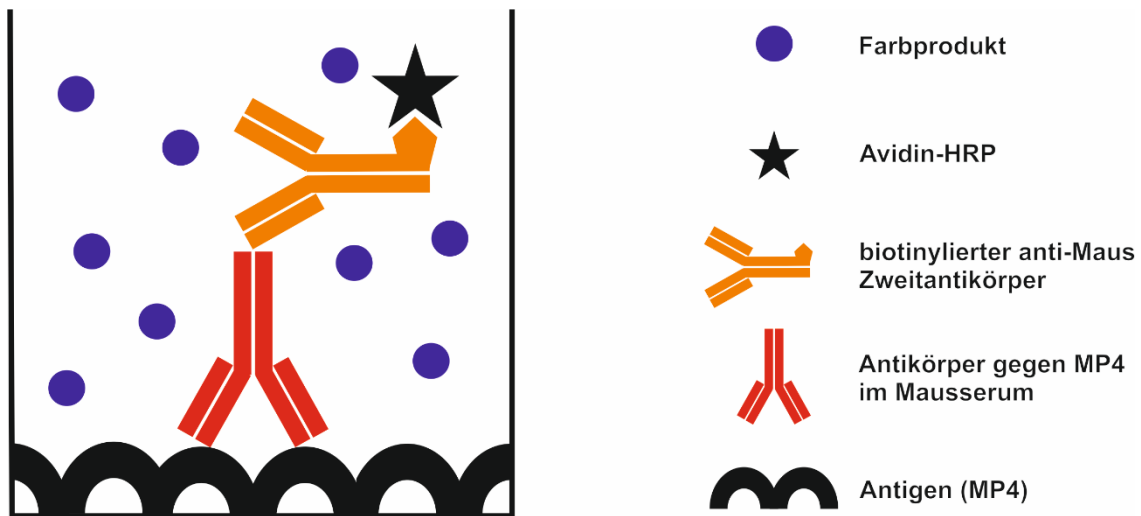


Abbildung 7: Antikörperverhältnisse beim direkten ELISA. Well in der Seitansicht. Abbildung basierend auf einer Grafik aus [106]. ELISA, Enzyme-linked Immunosorbent Assay; HRP, Meerrettichperoxidase.

2.5.2.2 ELISA-Protokoll

Generell wurden alle Wasch- und Blocklösungen (PBS-Tween, PBS, 1 % Milchpulver) mit einem Volumen von 200 μl /Well auf die 96-Well-Platte aufgebracht, wohingegen Antigen, Antikörper, Enzym und Substrat mit 100 μl /Well pipettiert wurden. PBS-Tween wurde in einer Konzentration von 0,05 % verwendet. Das Experiment begann mit dem Aufbringen von MP4 in einer Konzentration von 3 $\mu\text{g/ml}$ steriler PBS auf die Platte, die anschließend über Nacht im Kühlschrank verblieb, um am nächsten Tag zuerst 3 x mit PBS-Tween gewaschen zu werden. Es folgte der Block in 1 % Milchpulver (aufgelöst in PBS-Tween) für 2 h bei RT. Während der Wartezeit wurde stets auf eine Abdeckung der Platte geachtet. Nach Abkippen der Blocklösung wurde das Mausserum in Duplikaten auf die Platte pipettiert (1 μl des aufgetauten Serums jeder Maus wurde vorher 1:1.000 in 1 % Milchpulver verdünnt). Für die Negativkontrolle wurden zwei bis vier Wells nur mit 1 % Milchpulver belegt. Das übrige Mausserum wurde für etwaige Wiederholungsversuche wieder eingefroren (-20 °C). Erneut wurde die Platte über Nacht kühl gelagert. Der biotinylierte anti-Maus Zweitantikörper wurde in 0,1 % Milchpulver mit einem Mischungsverhältnis von

1:800 verdünnt und nach einer dreimaligen Waschung der Platte in PBS-Tween aufgebracht (auch auf die Negativkontrollen). Wiederum erfolgte die Lagerung des Nachts im Kühlen. Am vierten Tag des Experiments konnte nach einer erneuten PBS-Tween Waschung (3 x) das Enzym Avidin-HRP (1:1.000 in 0,1 % Milchpulver) für 2 h bei RT in den *Wells* inkubieren. Erneute Waschschriffe (PBS-Tween, PBS) gingen der Entwicklung mittels 100 µl TMB pro *Well* voraus. Bei bläulicher Färbung der Negativkontrolle, wurde die Reaktion dann mit 50 µl Schwefelsäure (25 % in A. dest.) in jedem *Well* abgestoppt und die Platte anschließend bei einer Wellenlänge von 450 nm ausgelesen.

2.5.2.3 ELISA-Auswertung

Das Auslesegerät stellte die optische Dichte (OD) eines jeden *Wells* zur Verfügung. Da pro Maus zwei *Wells* plattiert wurden, ließ sich für jedes Tier der MW bilden. Davon konnte man den MW der zwei bzw. vier Negativ-*Wells* abziehen, so dass zum Schluss jede Maus durch einen korrigierten Absorptionwert charakterisiert wurde. Diese MWs konnte man wiederum gruppieren (Vehikel und FTY720) und statistisch gegenüberstellen. Vergleichbare Daten lieferte sowohl ein erstes Experiment als auch ein zusätzlicher Wiederholungsversuch (Kapitel 3.3.3).

2.6 Durchflusszytometrie

2.6.1 Blutproben und Etablierung

Acht nicht-immunisierten B6-Wildtypmännchen wurde in zwei zeitlich versetzten Experimenten ($n_1 = 6$, $n_2 = 2$) ca. 100 µl Vollblut aus der Schwanzvene abgenommen, nachdem sie im Mittel für 13,25 d (SD = 1,39 d), mit einer minimalen Behandlungsdauer von 10,00 d und einer maximalen Behandlungsdauer von 14,00 d, entweder mit Vehikellösung ($n = 4$) oder Fingolimod ($n = 4$, alle im ersten Experiment untersucht; Dosierung und Applikation wie in Kapitel 2.3.4) behandelt wurden. Bezüglich der Behandlungsdauer bestand kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen ($p = 0,14$) mit einem MW des Behandlungszeitraumes bei den Vehikel-Tieren von 12,50 d (SD = 1,73 d) und 14,00 d in der Fingolimod-Gruppe

(SD = 0,00 d). Zum Zeitpunkt der Blutentnahme waren die Männchen zwischen 60 d und 148 d alt (MW = 90,13 d; SD = 36,24 d). Auch hier bestand kein statistischer Unterschied zwischen den Behandlungsgruppen ($p = 0,57$): Im Mittel waren Tiere der Vehikel-Gruppe 91,50 d alt (SD = 38,72 d), während der MW der Fingolimod-Gruppe bei 88,75 d (SD = 39,50 d) lag. Da die vorliegenden Versuche am Anfang des laborinternen Etablierungsprozesses von Durchflusszytometrie-(DFZ-) Analysen an peripherem Mausblut standen, fanden sich im Protokoll gewisse Inkonsistenzen zwischen den beiden Experimenten. Im Gegensatz zum ersten Versuch wurde im zweiten Ansatz nur eine einzelne Lyse der Blutproben durchgeführt, dafür allerdings ein modifizierter, Ethylendiamintetraessigsäure-(EDTA-) haltiger Erythrozyten-Lyse- (RBC-) Puffer verwendet. Auch wurde das erste Experiment nicht durchgängig auf Eis durchgeführt, während man im zweiten Versuch auf ununterbrochene und akkurate Kühlung der Zellen achtete. Überdies variierte der Einsatz von Waschpuffer und PBS sowie das Vorgehen bei der Antikörper-Zugabe. Das in Kapitel 2.6.4 aufgeführte Protokoll stellte also die Synthese der Etablierungsversuche dar, von der die individuellen Ansätze z.T. abwichen. Vorexperimente zu dieser Versuchsreihe umfassten drei weitere unabhängige Mäuse und eine Blutprobe vor Behandlungsbeginn bei fünf der acht eigentlichen Versuchstiere (Daten nicht in der Auswertung). Auch wurde das Datenpaket einer fünften Vehikel- und somit neunten Gesamtmaus ausgeschlossen, da das Tier während der Behandlung an einer chronischen Wunde in der Flanke litt und außerdem keine plausible Auswertung erbrachte (jeweils 0,00 % T- und B-Lymphozyten).

2.6.2 Grundlagen der durchflusszytometrischen Messung

Die DFZ ist ein immunologisches Verfahren, bei dem mit einem hohen Durchsatz in geringer Zeit automatisch Eigenschaften verschiedenster Zellen oder Partikel detektiert und aufgezeichnet werden können [106]. Der technisch hochkomplexe Aufbau eines Durchflusszytometers und die Grundlagen des Verfahrens seien hier allerdings nur kurz und vereinfachend angesprochen: Im Zentrum des hier verwendeten *Fluorescence-activated Cell Sorter* (FACS) stand ein Laser, an dem die zu untersuchenden Zellen in einem laminaren Probenstrom vorbeiströmten. Das monochromatische und gebündelte Laserlicht traf dabei auf die einzelne

Zelle und wurde je nach Größe und Granularität verschieden gestreut (Abbildung 8) [106]. Diese unterschiedliche Ablenkung wurde durch ein kompliziertes System aus Blenden, Filtern und Spiegeln vom Gerät verarbeitet und so das Vorwärtsstreulicht (FSC) und das Seitwärtsstreulicht (SSC) erfasst. Zusätzlich konnte die Energie des Lasers Fluorochrome anregen, die ihrerseits wieder Licht mit einer höheren Wellenlänge aussendeten. Auch diese Lichtquanten konnten vom Gerät exakt gemessen werden. So gelang es unterschiedliche Zelltypen (im vorliegenden Fall T- und B-Zellen) durch Kopplung an jeweils charakteristisch fluoreszierende Antikörper voneinander zu unterscheiden. Da jeder Fluoreszenzfarbstoff durch bestimmte Wellenlängen angeregt werden und ein charakteristisches Absorptions- und Emissionsmaximum vorweisen konnte, war das Gerät in der Lage die verschieden markierten Zellen zu erkennen und zu zählen. Die spektrale Überlappung der unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffe sollte dabei so gering wie möglich sein, damit jedem Fluorochrom und somit indirekt jeder Zellart ein spezifisches Signal zugeordnet werden konnte [106]. Je mehr Laser einem Durchflusszytometer also zur Verfügung stehen, desto mehr verschiedene Anregungswellenlängen können abgedeckt werden und umso mehr steigen die Einsatzmöglichkeiten des Gerätes. Das BD FACS Canto II verfügte in diesem Fall über drei verschiedene Laser: Zwei Festkörper-Laser ($\lambda = 405 \text{ nm}$ und 488 nm) emittierten Licht im violetten bzw. blauen Bereich und wurden durch einen roten Helium-Neon-Gas-Laser ($\lambda = 633 \text{ nm}$) ergänzt. Das Licht der einzelnen Laser traf dabei zeitlich versetzt auf die Zelle (*laser delay*), um so weitere optische Störfaktoren zu minimieren. Folgender Ablauf lag einer Messung zugrunde: Die Lymphozyten mussten aus dem abgenommenen Vollblut der Tiere separiert werden. Dies gelang mit mehreren Zentrifugationsschritten und einem RBC-Puffer, der die roten Blutkörperchen zerstörte, die weißen jedoch aussparte. Eine Tot-Lebend-Färbung differenzierte die übrigen Leukozyten von toten Zellen, indem sie u.a. an intrazellulären Aminen band. Da diese bei einer permeablen Zellmembran deutlich besser zugänglich waren, wurden tote Zellen intensiver angefärbt als lebendige mit intakter Membran [108]. Über die Oberflächenantigene CD4 und CD19 wurden dann

entsprechende T- und B-Lymphozyten mit unterschiedlichen fluoreszenzgekoppelten Antikörpern direkt markiert. Die aufbereitete Probe wurde anschließend in das FACS geleitet und gelangte zusammen mit einer Trägerflüssigkeit in eine Messküvette, in der die Zellen einzeln an den Lasern vorbeiströmen konnten, bevor sie verworfen wurden [106].

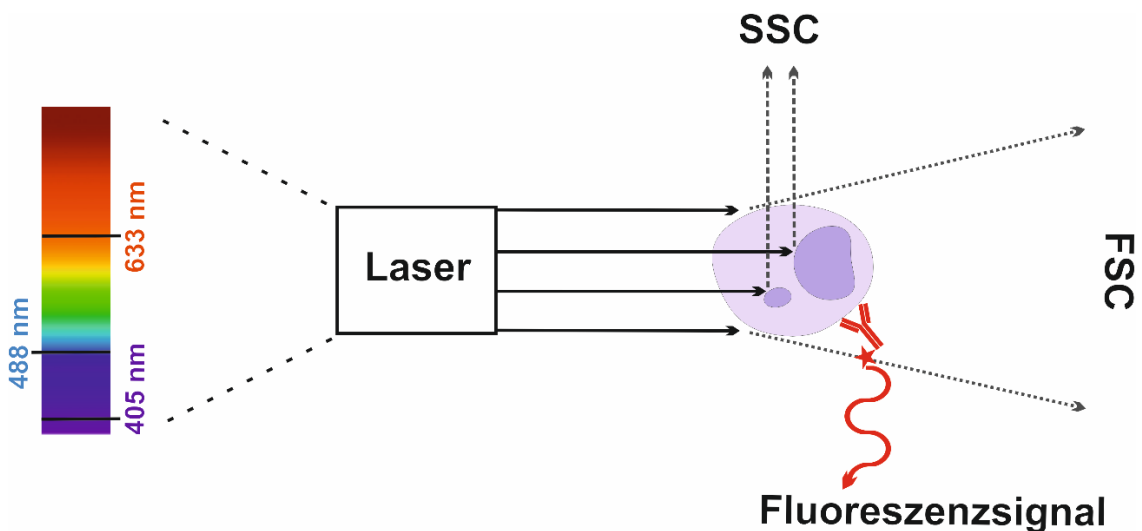


Abbildung 8: Grundlagen der Durchflusszytometrie. Schematische Darstellung der verschiedenen Messgrößen im Durchflusszytometer. Die Laserstrahlen sind vereinfacht nicht als farbige Welle dargestellt. Trifft ein Lichtstrahl auf die Zelle wird er je nach Größe (FSC) und Granularität (SSC) in verschiedene Richtungen abgelenkt. Das Laserlicht regt die fluoreszenzgekoppelten Antikörper (rot) zur charakteristischen Signalausendung an. Im Lichtspektrum sind die drei Wellenlängen der hier verwendeten Laser des BD FACS Canto II eingezeichnet. Abbildung basierend auf einer Grafik aus [106]. FACS, Fluorescence-activated Cell Sorter; FSC, Vorwärtsstreuung; SSC, Seitwärtsstreuung.

2.6.3 Durchflusszytometrische Marker

Die Kombination aus dem Oberflächenmolekül CD4 zur Charakterisierung von T-Zellen und CD19 als B-Zell-Marker fand in der Literatur beispielsweise schon bei einer FACS-Analyse von PBMC von RRMS-Patienten Verwendung, in der nach dreimonatiger Fingolimod-Behandlung eine signifikante Reduktion der CD4⁺ T- und CD19⁺ B-Zellen nachgewiesen werden konnte [109]. Auch an B6-Mäusen wurden die Marker CD4 und CD19 zur durchflusszytometrischen Analyse der Lymphozyten-Zirkulation durch die lymphatischen Organe beispielhaft verwendet. Ähnlichkeiten zur vorliegenden Arbeit bestehen, da es sich zum einen um nicht-immunisierte und zum Teil männliche Tiere handelte, zum anderen

erhielten die Mäuse für 21 d eine nur geringfügig höhere Fingolimod-Dosis als in diesen Versuchen (täglich ca. 1,25 mg/kg) [110]. Die Antikörper gegen beide Oberflächenmoleküle mussten an unterschiedliche Fluoreszenzfarbstoffe gekoppelt verwendet werden. Hier wurden die Kombinationen aus Peridinin Chlorophyll Protein (PerCP), Cyanin 5.5 (Cy 5.5) und anti-CD4 sowie Allophycocyanin (APC) und anti-CD19 eingesetzt. Während PerCP-Cy5.5 von blauem Licht mit einer Wellenlänge von 488 nm angeregt und ein Emissionsmaximum von $\lambda = 695$ nm aussandte, wurde APC durch den Helium-Neon-Laser ($\lambda = 633$ nm) im Rotlichtbereich angeregt. Das Emissionsmaximum lag hier bei 660 nm, so dass man PerCP-Cy5.5 abgrenzen konnte [106]. Bei PerCP-Cy5.5 handelte es sich überdies um ein Tandemkonjugat aus zwei Farbstoffen: Nach Anregung der ersten Komponente durch den blauen Laser wurde die Energie des emittierten Lichtes direkt auf den zweiten Farbstoff übertragen, der dann seinerseits zur Emission angeregt wurde [106]. Durch den dritten Laser im violetten Bereich ($\lambda = 405$ nm) konnte außerdem der Tot-Lebend-Farbstoff abgedeckt werden, der Lichtquanten mit einer deutlich kürzeren Wellenlänge ($\lambda = 448$ nm) als APC oder PerCP-Cy5.5 emittierte [108]. Durch die Möglichkeit jeden Laser mit nur einem Farbstoff zu belegen, konnte man bereits im Vorfeld kompensatorische Effekte ausschließen.

2.6.4 DFZ-Protokoll

Die Versuchstiere wurden in einem *Retainer* fixiert und ihr Schwanz mit infrarotem Licht angewärmt. Durch einen Anschnitt mit einer scharfen Rasierklinge wurde die vasodilierte Schwanzvene eröffnet und das Vollblut tropfenweise in ein mit 40 - 60 μ l Heparin befülltes Röhrchen überführt. Akribisch wurde auf einen sauberen und möglichst oberflächlichen Schnitt geachtet. Das Proberöhrchen wurde mit kalter PBS aufgefüllt, durchmischt und anschließend gekühlt für 5 min zentrifugiert (500 x g). Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 1 ml kalter PBS resuspendiert, bevor 3 ml kalter RBC-Puffer für 5 min auf Eis inkubiert wurde. Durch Zugabe von 10 ml PBS konnte die Reaktion unterbrochen werden und die übrigen Lymphozyten durch erneute zweimalige Zentrifugation (4 °C, 5 min, 500 x g), Abpipettieren des Überstandes und Resuspension in 1 ml PBS gezählt werden. Die Zählkammer wurde dabei mit

einer 1:10 verdünnten Zellsuspension in 0,1 % Trypanblau (Anfärbung toter Zellen) befüllt und unter dem Mikroskop standardgemäß ausgezählt. Anschließend wurde der MW aus bis zu vier Feldern gebildet und mit der bekannten Kammertiefe und dem Kammervolumen sowie der Verdünnung verrechnet, so dass am Ende individuell für jede Probe die Zellzahl/ml bekannt war. Anschließend wurden alle Proben auf 5×10^5 Zellen/ml in PBS verdünnt und 5×10^5 Zellen für die Färbungen entnommen. Der Zellüberstand diente als ungefärbte Kontrolle und wurde in den nächsten Schritten nur mit Trägermedium, nicht aber mit Farbstoffen verdünnt. Es folgte die Tot-Lebend-Färbung, indem auf Grundlage der Herstellerangaben pro ml Zellsuspension 1 μ l Farbstoff (Horizon *Fixable Viability Stain 450*) für 30 min auf Eis inkubiert wurde. Danach wurden die Proben mit Waschmedium auf 2 ml aufgefüllt und erneut zentrifugiert (4 °C, 10 min, 720 x g). Nachdem der Überstand entfernt worden war, wurden den vorher verdünnten 5×10^5 Zellen jeweils 0,125 μ g beider Antikörper (PerCP-Cy 5.5 anti-Maus CD4, APC anti-Maus CD19) zugegeben, die zuvor mit Waschpuffer zu einem Volumen von insgesamt 50 μ l gemischt worden waren (*mastermix*). Waren bei einzelnen Mäusen weniger als 5×10^5 Zellen in der Probe, wurden die Antikörper individuell verdünnt zugegeben. Erneut mussten die Antikörper für 30 min auf Eis inkubieren. Zur Vorbereitung der Messung wurden die Proben ein weiteres Mal für 10 min gekühlt zentrifugiert (2.000 x g). Nachdem der Überstand verworfen worden war, wurden 200 μ l Waschmedium zu jeder Probe zugegeben und die markierten Zellen in ein Probenröhrchen überführt. Es folgte die Messung.

2.6.5 Gatingstrategie und Auswertung

Über einen voreingestellten *Threshold* (hier 5.000) am Gerät wurde schon bei der Messung bezüglich der FSC eine Detektionsgrenze festgelegt. Signale mit einer geringeren Intensität wurden vom Gerät nicht aufgezeichnet, womit einige Zelltrümmer schon ausgeschlossen wurden. In der anschließenden Auswertung der Daten wurde dann unter Berücksichtigung der Größe und Granularität der gezählten Ereignisse bezüglich lebender und einzelner Zellen adjustiert und ein sogenanntes *Gate* um die Lymphozyten-Population gelegt, wodurch andere Leukozyten, wie Monozyten oder Granulozyten, sowie größere Zelltrümmer von

der Messung ausgeschlossen wurden. Anhand ihrer Fluoreszenzeigenschaften wurde die ausgewählte Zellfraktion dann weiterführend charakterisiert. Die Gatingstrategie (Abbildung 11 A, B) lässt sich wie folgt darstellen, wobei ein Impuls durch drei Größen charakterisiert werden kann: die Fläche unter der Kurve (A), die Höhe (H) und die Breite (W).

1. SSC-A versus Tot-Lebend-Farbstoff, um die lebenden Zellen herauszufiltern
2. FSC-H versus FSC-A, um die einzelnen Zellen zu erkennen
3. SSC-A versus FSC-A, um die Lymphozyten zu charakterisieren
4. CD19 APC-A versus CD4 PerCP-Cy5.5-A zur Differenzierung der B- und T-Zellen

In den Negativkontrollen wurden für CD19 APC-A und CD4 PerCP-Cy5.5-A keine Signale registriert. Dies belegte die Spezifität der Antikörper-Messung.

2.7 Statistische Auswertung

Alle Analysen und deskriptiven Statistiken wurden mit GraphPad Prism 7 berechnet. Die beiden experimentellen Gruppen (Vehikel und Fingolimod) wurden aufgrund der nicht-normalverteilten Daten und der geringen Fallzahl mithilfe des ungepaarten, nicht-parametrischen Mann-Whitney Rangsummentests verglichen. Berechnet wurden exakte, zweiseitige p-Werte. Beschreibend wurden für alle Analysen des gesamten Mauskollektivs die MWs mit entsprechender SD und die Minimal- bzw. Maximalwerte im Text bzw. den Abbildungen angegeben. Außerdem wurden die MWs und SDs auch für die einzelnen Behandlungsgruppen getrennt aufgeführt. Für die Korrelationen wurde der nicht-parametrische Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman (Spearman's rho, r_s) berechnet. Ein kleiner p-Wert sprach hierbei gegen zufällige Datenverteilung und für einen echten Zusammenhang. Zusätzlich wurde das 95 % Konfidenzintervall (KI) angegeben. Die Ausgleichsgeraden in Abbildung 16 basierten auf einer einfachen linearen Regression (Kleinstquadrate-Schätzung). Das Signifikanzniveau wurde für alle Auswertungen auf $\alpha = 5 \%$ festgelegt (hierbei wurde $p < 0,05$ durch einen (*), $p < 0,01$ durch zwei (**), und $p < 0,001$ durch drei (***) Sterne dargestellt). Das Vorgehen orientierte sich unter anderem

an Empfehlungen der statistischen Beratung des Epidemiologischen Institutes der Universität Würzburg und des Universitären Zentrums für Gesundheitswissenschaften am Klinikum Augsburg.

3 ERGEBNISSE

3.1 Immunisierungsstatistik und Krankheitsbeginn

Die Erfolgsquote der Immunisierung unterlag zwischen den drei Kohorten (Tabelle 13) nennenswerten Schwankungen und ergab im Mittel einen Wert von 39,30 % (SD = 26,23 %). Am wenigsten Tiere erkrankten in der ersten (23,33 %) und am meisten in der dritten Kohorte (69,57 %; Tabelle 19). Frühestens 12 d und spätestens 21 d nach Immunisierung traten erste Krankheitssymptome auf (MW = 15,93 d; SD = 2,90 d). Tiere, die im Verlauf mit Vehikel-Lösung behandelt wurden, wurden im Mittel 14,20 d (SD = 1,30 d) nach Immunisierung krank, während erste Symptome in der späteren Fingolimod-Gruppe durchschnittlich nach 16,89 d (SD = 3,14 d) auftraten ($p = 0,12$).

3.2 Gebesserter klinischer Verlauf bei Fingolimod-Behandlung

Zu Behandlungsbeginn (erster Tag in Abbildung 9 A) bestand kein signifikanter, klinischer Unterschied zwischen den Tieren, die für die Vehikel- beziehungsweise für die Fingolimod-Gruppe ausgewählt wurden ($p = 0,28$). Beide Kurvenverläufe stiegen bis zum fünften Behandlungstag an, unterschieden sich an ihrem höchsten Punkt zum ersten Mal statistisch ($p = 0,049$) und fielen zunächst parallel ab. Erst über die Behandlungszeit hinweg verbesserte sich die klinische Symptomatik der FTY720-behandelten Mäuse deutlich im Vergleich zur Vehikel-Gruppe, die sich auf einem Plateau stabilisierte (Abbildung 9 A, durchgehende Signifikanz ab Behandlungstag 17). Der größte Unterschied bestand an Tag 25 ($p = 0,005$). Der höchste Score, den ein einzelnes Versuchstier über beide Gruppen hinweg erreichte, war 3,5. Im Verlauf jeder einzelnen Maus fand sich mindestens ein EAE-Score von 1,5.

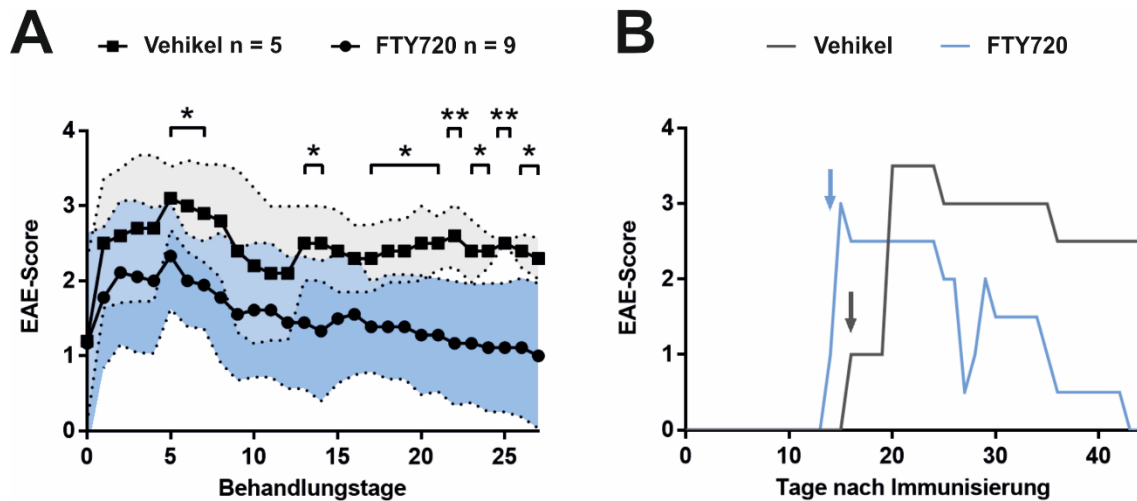


Abbildung 9: Verbesserung des klinischen EAE-Verlaufes unter Fingolimod-Behandlung. **A)** Gezeigt sind die Mittelwerte der beiden Gruppen für die einzelnen Behandlungstage. Das Fehlerband (Standardabweichung) der Vehikel-Tiere ist grau, das der FTY720-behandelten Mäuse blau hinterlegt (Überschneidungsbereich hellblau). Ein statistischer Vergleich erfolgte an jedem einzelnen Behandlungstag. Die Klammern fassen Tage mit ähnlichen Unterschieden zusammen. **B)** Repräsentative Krankheitsverläufe einer Vehikel- und einer Fingolimod-Maus. Die Pfeile markieren jeweils den Behandlungsbeginn. EAE, Experimentelle autoimmune Encephalomyelitis.

3.3 Periphere Wirkung von Fingolimod

3.3.1 Keine morphologischen Veränderungen am Lymphknoten

Die vergleichende Durchsicht der gefärbten Lymphknotenserienschnitte lieferte keine offensichtlichen, morphologischen Unterschiede zwischen den Vehikel- und FTY720-behandelten Tieren, weder was Größe und Beschaffenheit der Lymphknoten noch was die Ausstattung mit den verschiedenen Markern betraf. Dieser mikroskopische Eindruck ließ sich aber methodisch nicht quantifizieren. Dies lag daran, dass es bei der Einbettung des Gewebes kaum möglich war die kleinen, verschieden geformten Lymphknoten einheitlich im Paraffinblock auszurichten, was in unterschiedlichen Schnittwinkeln und -tiefen resultierte und die Ebenen nicht miteinander vergleichbar machte. Außerdem waren die Lymphknoten zwischen den Individuen sehr unterschiedlich, so dass sich bei der geringen Zahl an Versuchstieren kaum eine allgemeingültige Aussage treffen ließ (Abbildung 10).

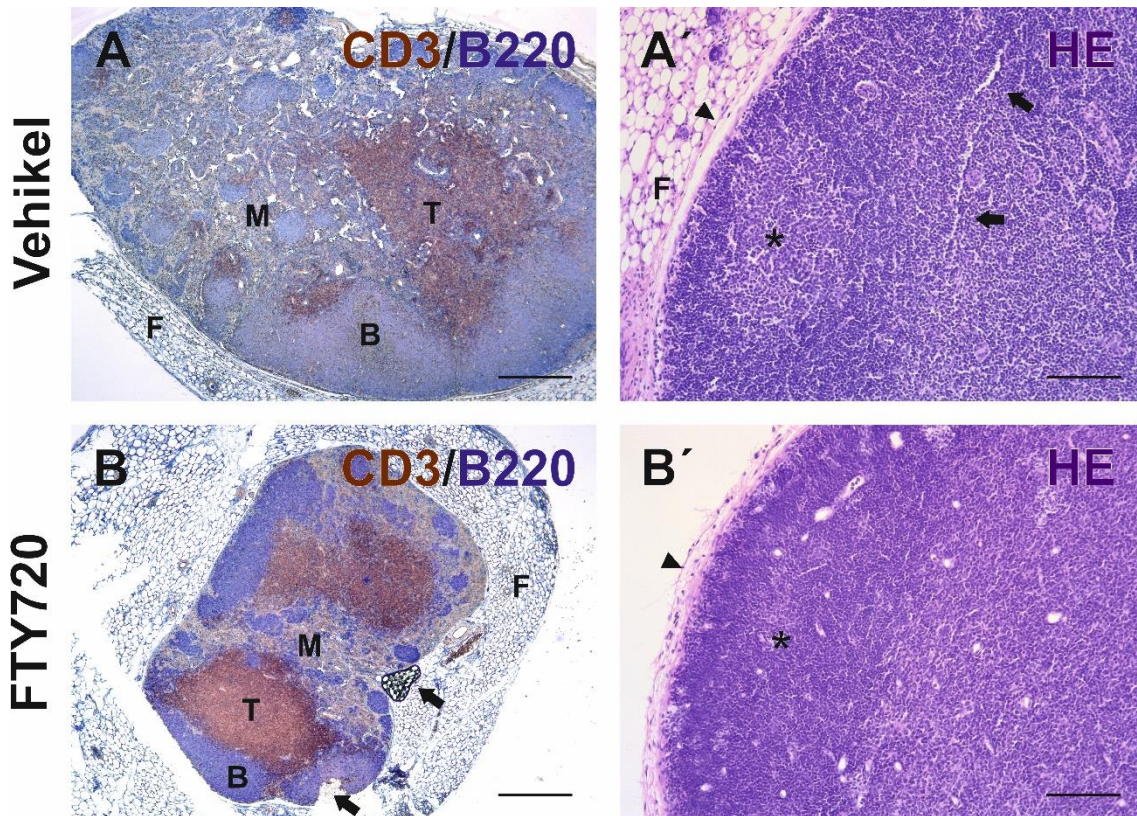


Abbildung 10: Methodische Problematik beim Lymphknotenvergleich. **A, A')** Lymphknoten von Vehikel-Tieren, **B, B')** zum Vergleich Lymphknoten aus der Fingolimod-Gruppe mit umgebendem Fettgewebe (F). **A, B)** Die histologische Gliederung des Lymphknotens in B-Zone (blau, B), T-Zone (braun, T) und Mark mit Marksinus (M) war in der Übersichtsfärbung in beiden Gruppen mehr oder weniger deutlich erhalten. Trotz gleicher Vergrößerung (Messbalken 400 μ m) ist der Vehikel-Lymphknoten in diesem Bild deutlich größer, was aber nach Durchsicht aller Gewebeprobeen vermutlich auf eine andere Schnittebene oder interindividuelle Größenschwankungen und nicht etwa auf die Behandlung zurückzuführen war. **A', B')** Keine histologischen Unterschiede zwischen den beiden Gruppen erkennbar. Jeweils ein B-Zell-Follikel (*) und der Randsinus des Lymphknotens (Pfeilspitze) sind markiert. Messbalken 100 μ m. Eine weitere Schwierigkeit bei der Aufbereitung der zellreichen Lymphknoten waren häufige Risse und Artefakte (Pfeile). CD, Cluster of Differentiation; HE, Hämatoxylin-Eosin.

3.3.2 Verminderung der CD4⁺ T-Zellen im peripheren Blut

Im Mittel wurden im Durchflusszytometer 73.069 Zellen pro Maus (SD = 29.213 Zellen) bei einer minimalen Zellzahl von 15.610 und einer maximalen Zellzahl von 100.000 registriert, auch bestand hierbei kein Unterschied zwischen den beiden Gruppen (MW Vehikel-Gruppe = 89.219 Zellen, SD = 21.563 Zellen; MW FTY720-Gruppe = 56.919 Zellen, SD = 28.824 Zellen; $p = 0,20$). Im Durchschnitt waren von den lebenden Einzelzellen

40,66 % Lymphozyten (SD = 20,24 %; Minimum = 21,30 %; Maximum = 75,40 %). Der Lymphozyten-Anteil an den lebenden Einzelzellen war in der Vehikel-Gruppe signifikant größer (MW = 56,28 %; SD = 17,02 %) als bei den Fingolimod-behandelten Tieren (MW = 25,05 %; SD = 4,01 %; $p = 0,0286$). Ebenso war der prozentuelle Anteil der CD4⁺ T-Zellen an den Gesamtlymphozyten bei Vehikel-Gabe signifikant höher im Vergleich zur FTY720-Behandlung ($p = 0,0286$), während sich der CD19⁺ B-Zell-Anteil im Gegensatz dazu nicht unterschied ($p > 0,99$; Abbildung 11 C, C'). Die Verringerung des Lymphozyten- und speziell des CD4⁺ T-Lymphozyten-Anteils unter Fingolimod-Behandlung an B6-Mäusen war mit dem Hauptmechanismus von FTY720, der S1P-vermittelten Retention der Lymphozyten in den SLOs (Kapitel 1.2.3), vereinbar. Auch konnte so die Fingolimod-Dosis von 1 mg/kg validiert werden.

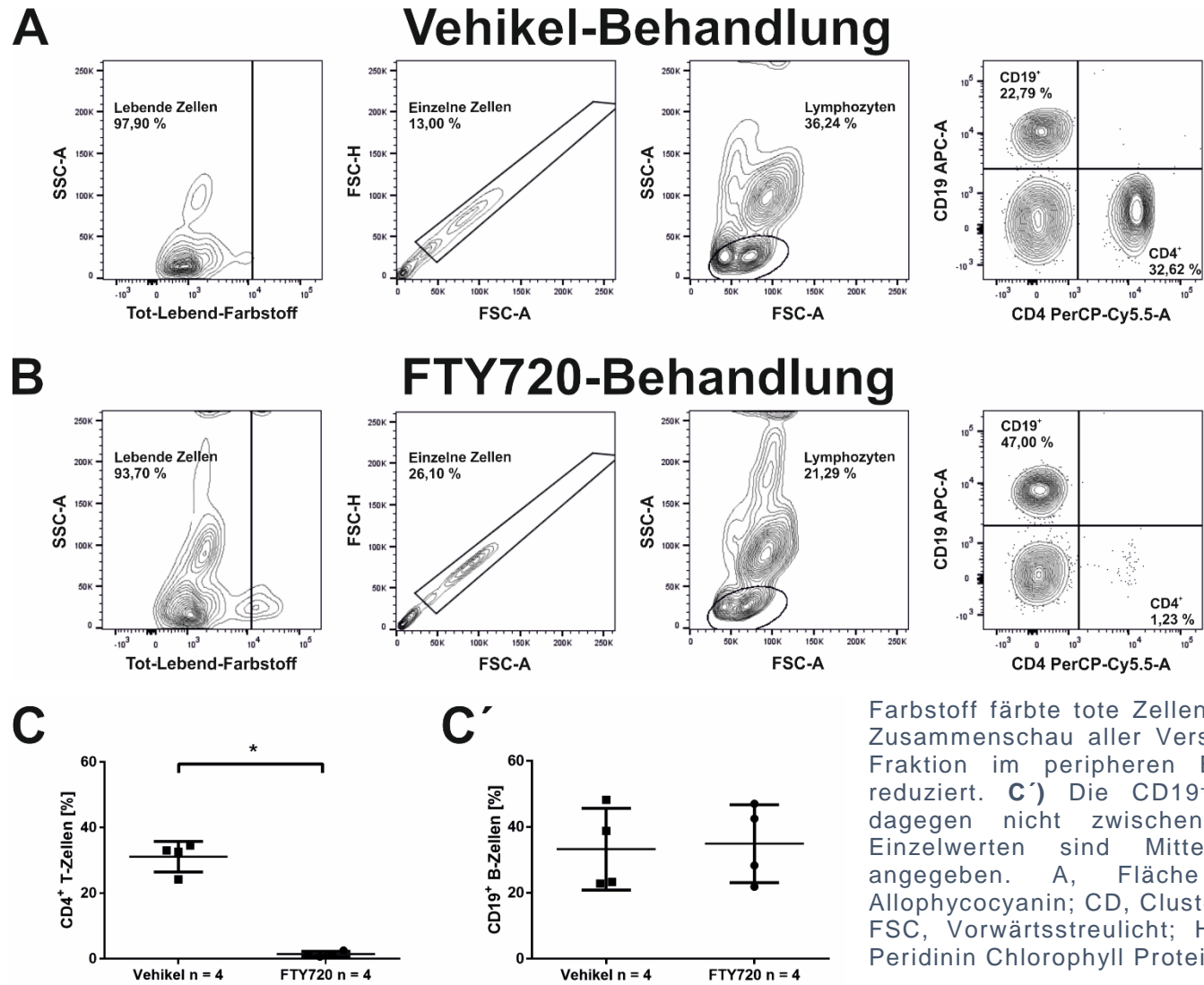


Abbildung 11: Ergebnisse Durchflusszytometrie. **A, B)** Gatingstrategie (Kapitel 2.6.5), gezeigt an je einer beispielhaften Maus mit Vehikel- und Fingolimod-Behandlung. Die %-Zahlen beziehen sich auf die im jeweils vorigen Graphen ausgewählte Zellpopulation, bzw. im ersten Plot auf die Gesamtzellzahl (56.875 bzw. 79.730). Im jeweils letzten Plot der Reihe sind doppelt positive Zellen abwesend (rechter oberer Quadrant; Vehikel = 0,34 %; FTY720 = 0,05 %), doppelt negative Lymphozyten finden sich dagegen links unten (Vehikel = 44,25 %, FTY720 = 51,72 %). Bereits hier zeigte sich die verminderte T-Zell-Fraktion unter FTY720-Behandlung. Der Tot-Lebend-Farbstoff färbte tote Zellen an. $K = 1.000$. **C)** Auch in der Zusammenschau aller Versuchstiere war die CD4⁺ T-Zell-Fraktion im peripheren Blut unter FTY720 signifikant reduziert. **C')** Die CD19⁺ B-Zellen unterschieden sich dagegen nicht zwischen den Gruppen. Neben den Einzelwerten sind Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben. A, Fläche unter der Kurve; APC, Allophycocyanin; CD, Cluster of Differentiation; Cy, Cyanin; FSC, Vorwärtsstreulicht; H, Höhe des Impulses; PerCP, Peridinin Chlorophyll Protein; SSC, Seitwärtsstreulicht.

3.3.3 Keine Beeinträchtigung der MP4-spezifischen B-Zell-Antwort

Beim Vergleich der MP4-reaktiven B-Zellen im ELISPOT ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen Vehikel- und FTY720-Behandlung ($p = 0,905$), was die Anzahl der Spots pro einer Million Zellen betraf. Ein Spot repräsentierte eine einzelne MP4-spezifische B-Zelle. Auch die Gesamtantwort aller B-Zellen auf anti-Maus IgG war zwischen den Gruppen vergleichbar ($p = 0,683$; Abbildung 12 B, B').

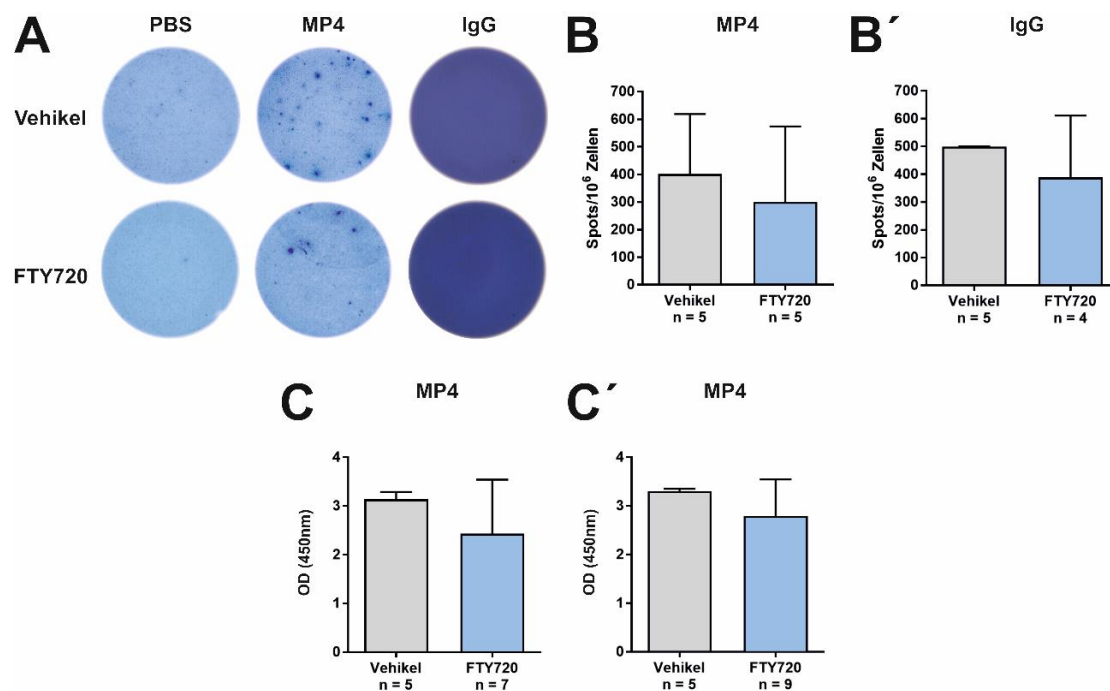


Abbildung 12: Keine Beeinträchtigung der MP4-spezifischen B-Zell-Antwort. **A)** Repräsentative Wells im B-Zell-ELISPOT. **B)** MP4-spezifische-Antwort und **B')** totale IgG-Antwort im B-Zell-ELISPOT. TNTC = 500. **C, C')** MP4-spezifische Antikörper im ELISA. Graph C enthält Daten der ersten beiden Kohorten, C' den kompletten Datensatz. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert + Standardabweichung. ELISA, Enzyme-linked Immunosorbent Assay; ELISPOT, Enzyme-linked Immuno Spot Assay; Ig, Immunglobulin; OD, Optische Dichte; PBS, Phosphatgepufferte Salzlösung; TNTC, Too numerous to count.

Die humorale Antwort (Antikörperproduktion) gegen MP4 blieb im ELISA in zwei Wiederholungsexperimenten ebenso unbeeinträchtigt von der Fingolimod-Behandlung: Das erste ELISA-Experiment wurde nach den ersten beiden Kohorten (12 Tiere) durchgeführt und zeigte keinen Unterschied zwischen der Vehikel- und FTY720-Gruppe ($p = 0,082$; Abbildung 12 C). Nach der dritten Kohorte folgte ein Wiederholungsexperiment mit allen 14 ausgewerteten

Mäusen, das ein vergleichbares Ergebnis lieferte ($p = 0,112$; Abbildung 12 C'). Die OD galt als vergleichbares Maß der Antikörperspiegel im Serum. Die MP4-spezifische Reaktion zeigte zugleich eine erfolgreiche Immunisierung.

3.4 Zentrale Wirkung von Fingolimod

3.4.1 Übersicht über die Versuchstiere

Bei der histologischen Zusammenschau der Versuchstiere (Tabelle 17) fiel auf, dass fünf FTY720-behandelte Mäuse generell keine Kleinhirn-Infiltration aufwiesen. Ihr Kleinhirn-Parenchym stellte sich unter dem Mikroskop, sowohl in der HE- als auch in der CD3/B220-Färbung, blande dar (Abbildung 14 A'). Insgesamt wurden bei den anderen Versuchstieren 846 Infiltrate erfasst, die nach den Kriterien aus Kapitel 2.4.6.2 in drei Kategorien eingeteilt werden konnten (Abbildung 13).

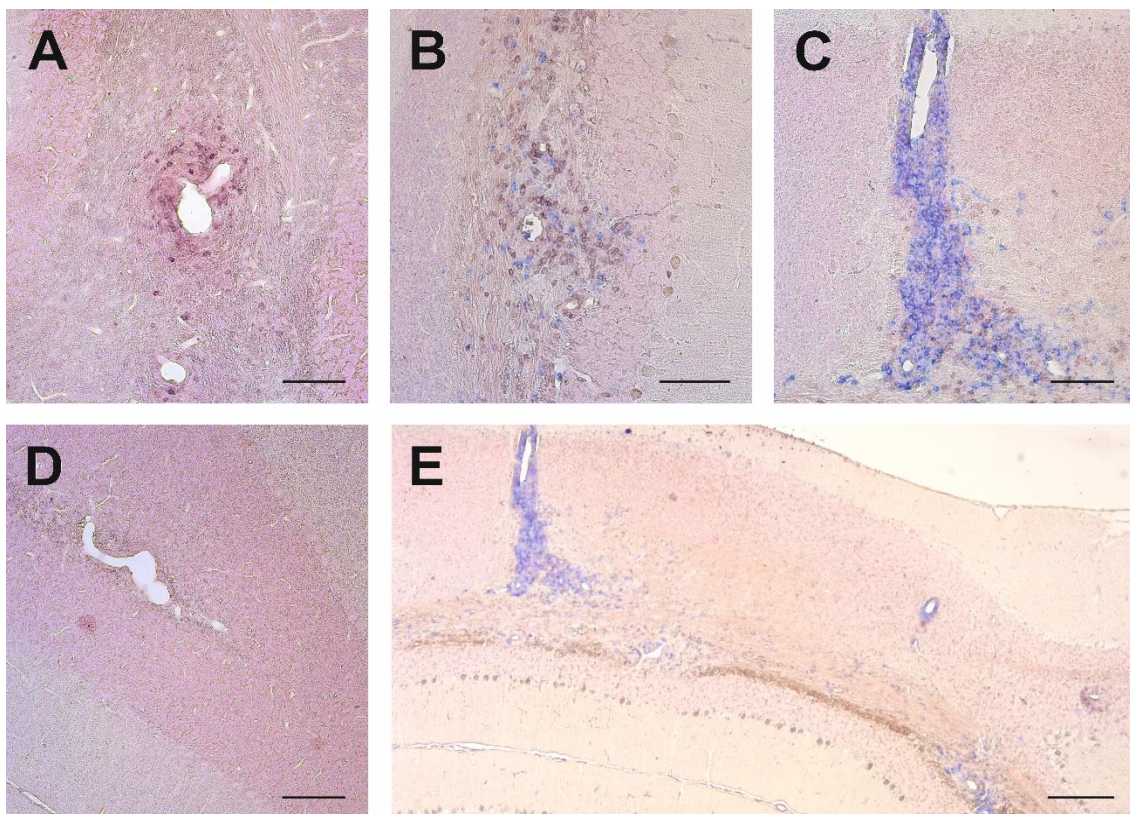


Abbildung 13: Verschiedene Infiltrat-Kategorien, Diaminobenzidin-Doppelfärbung, CD3 (braun)/B220 (blau), Kleinhirngewebe von Vehikel-Tieren. **A)** Non-B-Zell-Infiltrat, **B)** diffuses B-Zell-Infiltrat, **C)** B-Zell-Aggregat (Ausschnitt aus E), **D)** Gefäß ohne Infiltration. **E)** Übersichtsaufnahme mit dem Nebeneinander verschiedener Infiltrat-Typen. Messbalken A - D 100 µm, E 200 µm. CD, Cluster of Differentiation.

Die diffusen B-Zell-Infiltrate repräsentierten dabei den größten Anteil (68,20 %), gefolgt von den Non-B-Zell-Infiltraten (24,23 %). Am seltensten waren B-Zell-Aggregate anzutreffen (7,57 %). Von dieser Verteilung abweichend konnte bei einer Vehikel-Maus und einer FTY720-Maus ein größerer T-Zell-Einfluss (Non-B-Zell-Infiltrate \geq diffuse B-Zell-Infiltrate) und bei zwei Vehikel-Tieren ein deutlich betonter B-Zell-Einfluss (B-Zell-Aggregate $>$ Non-B-Zell-Infiltrate, Tabelle 17) vermutet werden. In jeder Maus mit Kleinhirn-Infiltration wurden diffuse B-Zell-Infiltrate gefunden. Dies gilt mit Ausnahme von einem FTY720-Tier mit insgesamt nur einem Infiltrat auch für Non-B-Zell-Infiltrate.

	Fingolimod n = 9									Vehikel n = 5							
Kohorte	1	1	1	1	2	1	2	3	3	1	1	2	2	2			
Score Behandlungsbeginn	1 ^a	1 ^a	1,5 ^a	1 ^a	3 ^b	1 ^a	1,5 ^c	3 ^b	3 ^c	1 ^a	2,5 ^a	3 ^b	3 ^b	3 ^b			
Score Präparation	0 ^d	0 ^d	0 ^d	0 ^d	0 ^e	0,5 ^d	0,5 ^e	2 ^a	2 ^a	2,5 ^d	3 ^d	2 ^e	2 ^e	2 ^e			
Behandlungstage	29	34	31	31	32	30	27	28	28	29	30	30	30	30			
Parenchymfläche [mm ²]	7,23	7,65	8,43	4,11	7,66 ^{f,g}	7,75	7,48 ^{f,g}	9,44	7,58	5,66	15,33	10,70	12,15	13,57			
Gesamtanzahl Infiltrate	0	0	0	0	0	1	9	7	6	14	239	89	333	148			
Infiltrate/Fläche [1/mm ²]	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,13	1,20	0,74	0,79	2,47	15,59	8,32	27,40	10,91			
Infiltrat-Kategorien																	
Non-B-Zell-Infiltrate	0	0	0	0	0	0	3	3	3	1	19	23	72	81			
Diffuse B-Zell-Infiltrate	0	0	0	0	0	1	6	4	3	11	191	65	238	58			
B-Zell-Aggregate	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2 ^h	29 ^{h,i}	1	23	9			
lymphoide Charakteristika	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	16	1	20	8			
geringgradig	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	12	1	3	0			
mittelgradig	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	17	8			
hochgradig	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
Prozentuale Verteilung [%]																	
Non-B-Zell-Infiltrate																	
Diffuse B-Zell-Infiltrate																	
B-Zell-Aggregate																	
lymphoide Charakteristika ^l	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	7,14	6,69	1,12	6,01	5,41	50,00	55,17	100,00	86,96	88,89
lymphoide Charakteristika ^k																	
geringgradig ^l																	
mittelgradig ^l																	
hochgradig ^l																	

Tabelle 17: Gesamtübersicht über die histologischen Daten aller 14 Versuchstiere. Jede Spalte enthält die Werte einer Maus. Die lymphoiden Charakteristika beziehen sich jeweils auf die B-Zell-Aggregate, die Grade auf die B-Zell-Aggregate mit lymphoiden Charakteristika (Kapitel 3.5). Aus Übersichtsgründen ist in den Kreisdiagrammen je nur eine Fraktion beziffert. ^a Behandlungsbeginn mit Symptomeintritt, ^b Behandlungsbeginn mit Krankheitspeak, ^c Behandlungsbeginn drei Tage nach Krankheitspeak, ^d Behandlungsende am Präparationstag, ^e Behandlungsende am Tag vor Präparation, ^f abweichende Schnittebenen, ^g weniger Ebenen untersucht, ^h keine Information über den Ig⁺ Marker-Status, ⁱ ein Aggregat nicht für CXCL13 auswertbar, ^j prozentualer Anteil an der Gesamtzahl der Infiltrate, ^k prozentualer Anteil an B-Zell-Aggregaten, ^l prozentualer Anteil an B-Zell-Aggregaten mit lymphoiden Charakteristika. Ig, Immunglobulin.

3.4.2 Attenuierte Kleinhirn-Infiltration unter Fingolimod-Behandlung

Bei den Vehikel-Mäusen wurden signifikant mehr Infiltrate registriert (823 Infiltrate) als in der mit FTY720 behandelten Gruppe (23 Infiltrate), in der nur bei vier von neun Tieren überhaupt eine schwache Infiltration nachgewiesen werden konnte ($p = 0,001$). Bei Betrachtung der Mittelwerte (Abbildung 14 B, rechtes Diagramm) entsprach dies einer Reduktion der Kleinhirn-Infiltration um 98,44 % unter FTY720-Behandlung. Die geringste, vorkommende Zahl an Infiltraten in einer Vehikel-Maus (14 Infiltrate) lag über dem Höchstwert bei FTY720-Behandlung (9 Infiltrate, Tabelle 17). Nicht nur in Absolut-Zahlen, sondern auch bezogen auf die ausgewertete, zerebelläre Parenchymfläche bestand sowohl zwischen der Gesamtinfiltrat-Zahl ($p = 0,001$), den Non-B-Zell-Infiltraten ($p = 0,006$) und den diffusen B-Zell-Infiltraten ($p = 0,001$) ein signifikanter Unterschied zwischen Fingolimod- und Vehikel-Gabe (Abbildung 14 B, C, D).

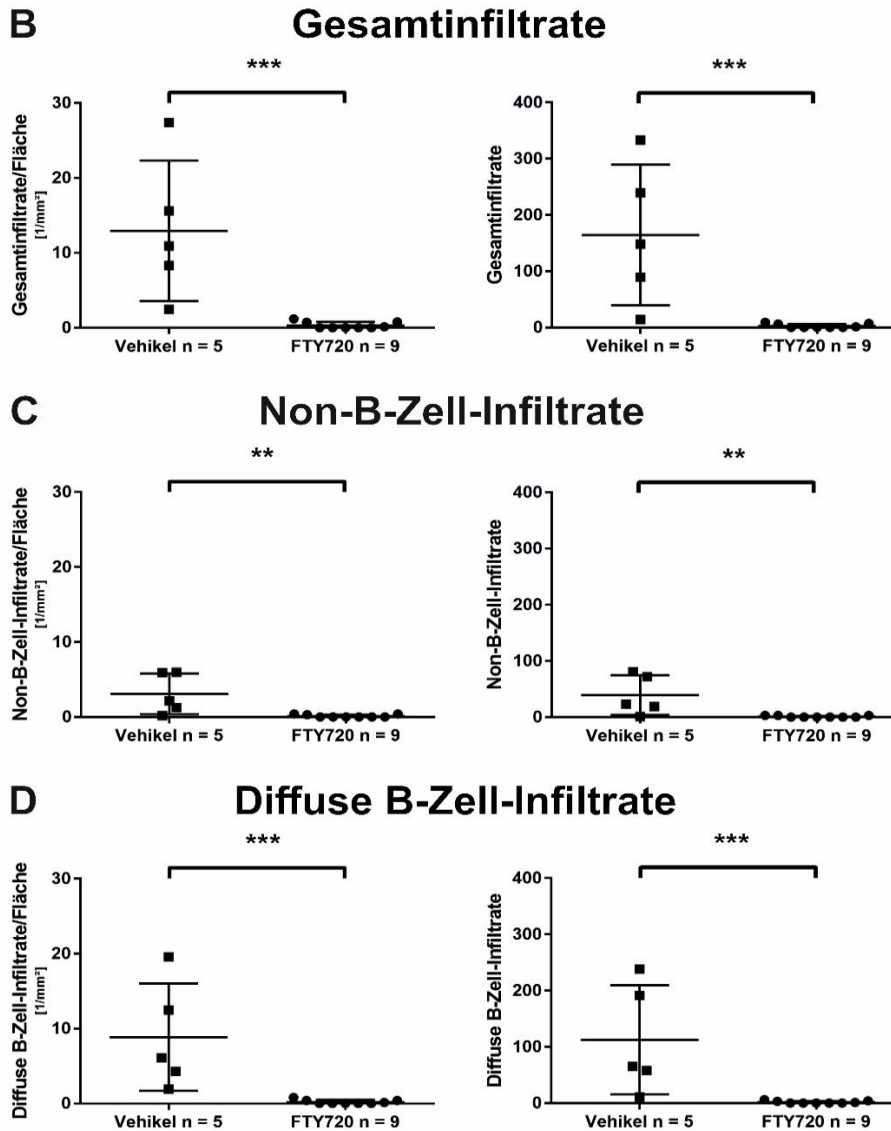
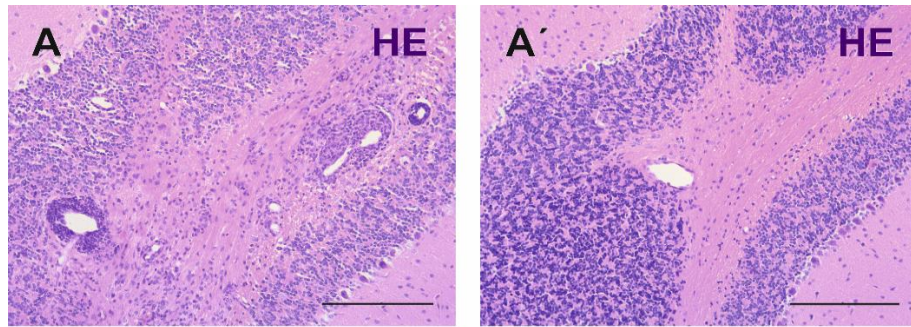


Abbildung 14: Deutlich verminderte Kleinhirn-Infiltration unter Fingolimod. **A)** Massiv infiltriertes Kleinhirn-Parenchym einer Vehikel-Maus, **A')** Unauffälliges Parenchym bei einer mit FTY720 behandelten Maus. HE-Färbung, Messbalken je 200 µm. **B-D)** Gegenüberstellung der flächenkorrigierten Gesamtinfiltrate, der Non-B-Zell-Infiltrate und der diffusen B-Zell-Infiltrate mit den jeweiligen Absolut-Werten. Der flächenbedingte Fehler war vernachlässigbar klein. Diagramme zeigen neben den Einzelwerten auch den Mittelwert ± Standardabweichung. HE, Hämatoxylin-Eosin.

3.4.3 Keine B-Zell-Aggregat-Bildung bei Fingolimod-Behandlung

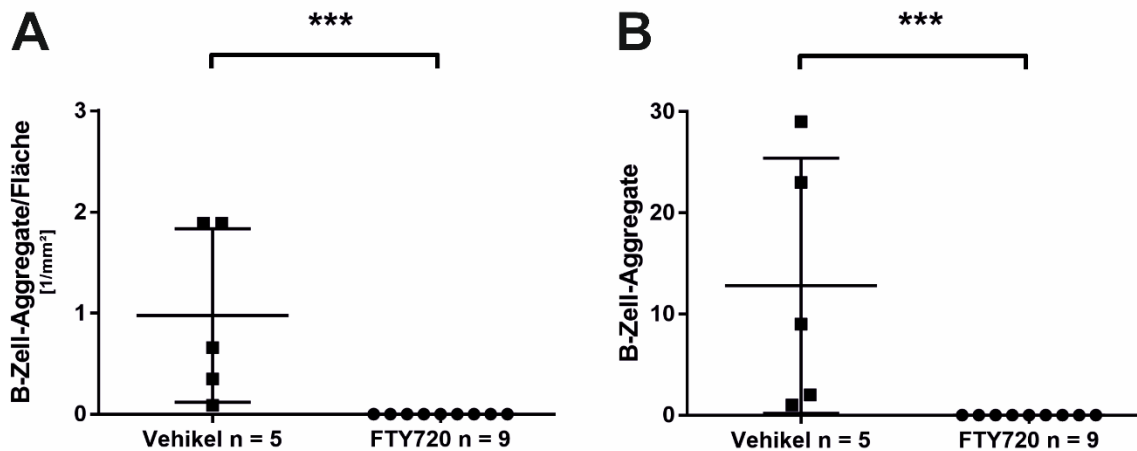


Abbildung 15: Keine Bildung von B-Zell-Aggregaten unter Fingolimod. Gegenüberstellung der **A)** flächenkorrigierten B-Zell-Aggregate und **B)** Absolut-Zahlen. Keine Maus, die mit FTY720 behandelt wurde, wies B-Zell-Aggregate auf. Zu finden waren diese Strukturen dagegen in jedem Vehikel-Tier. Diagramme zeigen Einzelwerte und den Mittelwert \pm Standardabweichung.

Jedes Vehikel-Tier wies mindestens ein B-Zell-Aggregat auf, während in keiner mit FTY720 behandelten Maus ein B-Zell-Aggregat gefunden wurde (Tabelle 17). Dies stand im Gegensatz zu den Non-B-Zell-Infiltraten und diffusen B-Zell-Infiltraten, die in der Kontroll- und Fingolimod-Gruppe nachgewiesen wurden. Der Unterschied zwischen den B-Zell-Aggregaten war sowohl in Bezug auf die Parenchymfläche als auch als Absolut-Wert hochsignifikant ($p = 0,0005$; Abbildung 15). Fingolimod verhinderte dementsprechend bei Behandlung im akuten Krankheitsstadium effektiv die Bildung von B-Zell-Aggregaten im ZNS der MP4-EAE-Mäuse.

3.4.4 Zusammenhang Kleinhirn-Infiltration und klinischer Score

Unabhängig von der jeweiligen Behandlungsgruppe ($n = 14$) wurde untersucht, inwieweit eine stärkere Infiltration und Inflammation des Kleinhirn-Parenchyms mit einem schlechteren klinischen *Outcome* einherging (Abbildung 16). Dazu wurde die Gesamtzahl aller Infiltrate im Kleinhirn der jeweiligen Maus mit dem letzten Score vor Präparation korreliert. Es zeigte sich ein signifikanter Zusammenhang ($p = 0,0001$; $r_s = 0,88$; KI = 0,65 bis 0,96), der auch nach Bezug auf die Parenchymfläche in dieser Deutlichkeit bestehen blieb. Die Wahrscheinlichkeit, dass ein EAE-Score von mindestens 0,5 gemessen wurde,

wenn das Versuchstier gleichzeitig Infiltrate aufwies, lag bei 100,00 % (Sensitivität). Andersherum war ein Score $< 0,5$ bei allen fünf Mäusen ohne Kleinhirn-Infiltration (jeweils EAE Score 0; Kapitel 3.4.1) zu finden (Spezifität 100,00 %). Auch bei Auftragung der B-Zell-Aggregate ($p = 0,0017$; $r_s = 0,76$; KI = 0,37 bis 0,92) bzw. der B-Zell Aggregate mit lymphoiden Charakteristika ($p = 0,0055$; $r_s = 0,73$; KI = 0,31 bis 0,91) gegen den finalen Krankheitsscore war die Korrelation signifikant und hielt auch hier wiederum der Flächenkorrektur stand. B-Zell-Aggregate mit und ohne lymphoide Neogenese fanden sich nur bei Tieren mit einem EAE-Score von ≥ 2 . Dieser *Cut-off*-Wert als Test für das Vorhandensein von B-Zell-Aggregaten oder B-Zell-Aggregaten mit lymphoiden Charakteristika erreichte in diesen Versuchen eine Sensitivität von 100,00 % und eine Spezifität von 77,78 %.

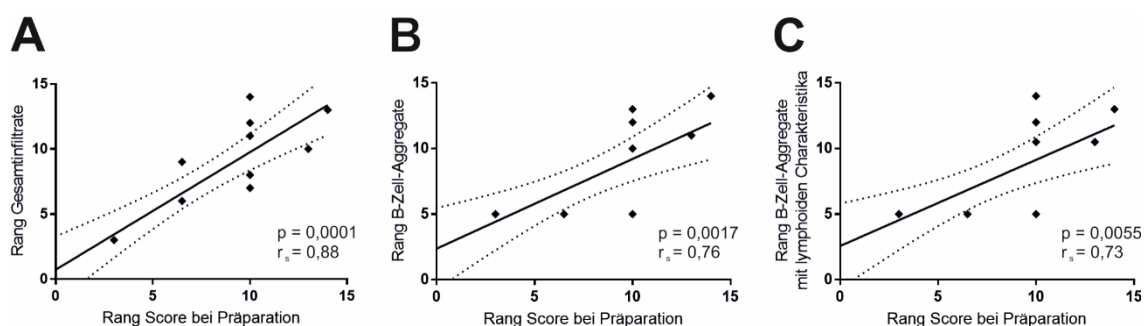


Abbildung 16: Korrelation nach Spearman zwischen **A)** Gesamtinfiltraten **B)** B-Zell-Aggregaten **C)** B-Zell-Aggregaten mit lymphoiden Charakteristika und dem letzten klinischen Score vor Präparation der Maus. Auf den Achsen sind jeweils die entsprechenden Ränge aufgetragen. Jede Maus ($n = 14$) wird durch eine Markierung dargestellt, wobei manche Koordinaten (x/y) mehrfach belegt sind (A: 3/3 x 5; B: 3/5 x 5; 6,5/5 x 2; 10/5 x 2; C: 3/5 x 5; 6,5/5 x 2; 10/5 x 2). Die durchgezogene Ausgleichsgerade stellt den linearen Zusammenhang zwischen den Variablen dar. Gestrichelt ist das 95 % Konfidenzintervall zu dieser Schätzung angegeben. In allen drei Diagrammen besteht ein hochkorrelierter, positiver Zusammenhang. p , Signifikanzwert; r_s , Spearmans Rangkorrelationskoeffizient.

3.5 Analyse der B-Zell-Aggregate

3.5.1 Lymphoide Neogenese als überwiegendes Charakteristikum

Da bei den FTY720-behandelten Tieren kein B-Zell-Aggregat vorhanden war, beschränkte sich die Betrachtung der lymphoiden Neogenese auf die B-Zell-Aggregate der Vehikel-Gruppe (Tabelle 17). Mit 71,88 % wies der Großteil der B-Zell-Aggregate im Sinne der Definition aus Kapitel 2.4.6.2 um den

30. Krankheitstag herum lymphoide Charakteristika auf (Abbildung 18 A). Auch war bei jeder Vehikel-Maus zumindest ein B-Zell-Aggregat mit lymphoiden Charakteristika zu finden. Ein beispielhaftes B-Zell-Aggregat mit mehreren positiven Markern und entsprechender Negativkontrolle auf Aggregatebene wird in Abbildung 17 gezeigt.

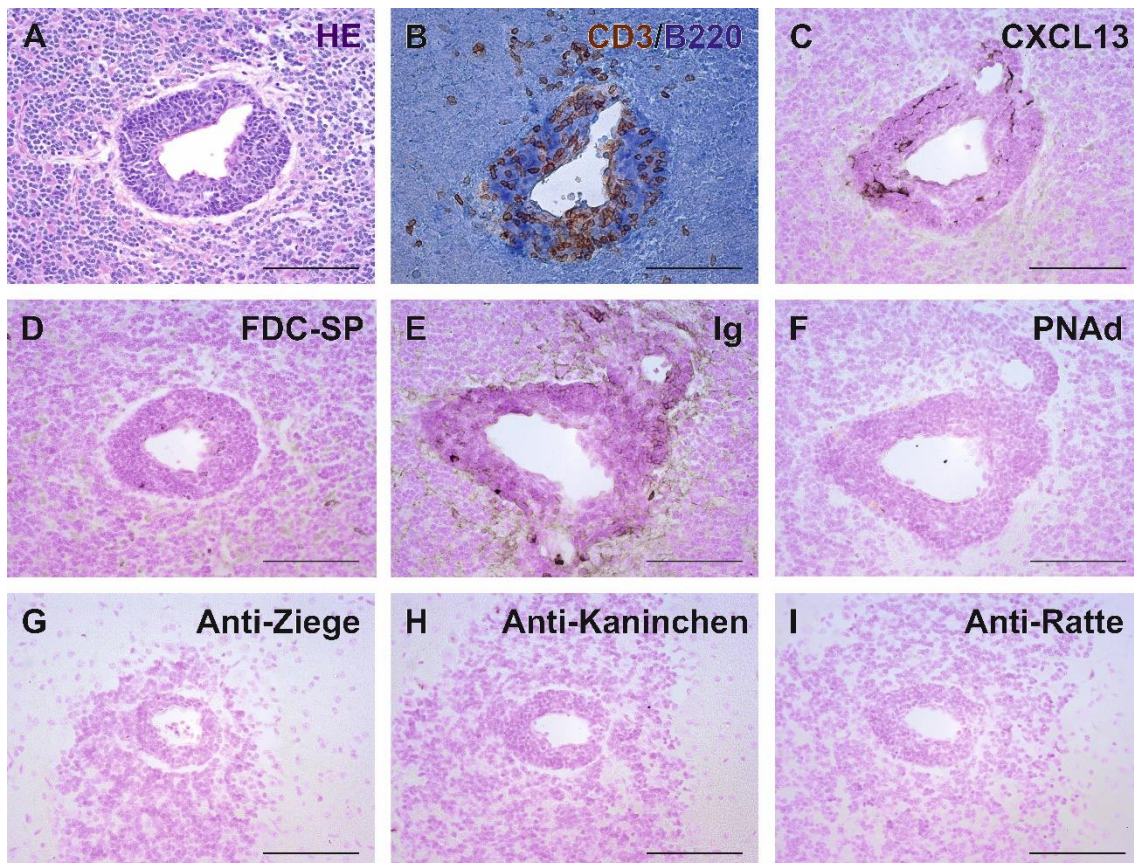


Abbildung 17: Beispielhaftes B-Zell-Aggregat mit lymphoiden Charakteristika im Kleinhirn-Parenchym einer Vehikel-Maus, Messbalken 100 μ m. Alle Bilder stammen von demselben B-Zell-Aggregat. **A)** HE-Färbung. **B)** Eindrücklich ist das enge Zellcluster mit mehr als einem Drittel B-Zellen (blau) um ein zentrales Gefäß. Die CD3/B220-Färbung stellte die Grundlage für die weitere Anfärbung des B-Zell-Aggregates gegen **C)** CXCL13, **D)** FDC-SP (vereinzelte, schwach gefärbte Zellen im Aggregat erkennbar), **E)** Ig und **F)** PNAd dar. Bis auf PNAd sind alle Marker positiv. **G-I)** Negativkontrollen auf Aggregatebene. Der Primärantikörper (Spezies entweder Ziege, Kaninchen oder Ratte) wurde ausgespart und nur der passende biotinylierte Sekundärantikörper aufgetragen, bei H in Kombination mit einem Kaninchen Peroxidase-anti-Peroxidase-Komplex (Kapitel 2.4.4). Alle drei Färbungen sind negativ. CD, Cluster of Differentiation; FDC, Follikulär dendritische Zelle; HE, Hämatoxylin-Eosin; Ig, Immunglobulin; PNAd, Peripheral Lymph Node Addressin.

3.5.2 Fehlen von hochgradig differenzierten B-Zell-Aggregaten

Um den Differenzierungsfortschritt des B-Zell-Aggregates mit lymphoiden Charakteristika einordnen zu können, wurden die B-Zell-Aggregate wie in Tabelle 18 in verschiedene Grade eingeteilt, wobei ein hochgradiges B-Zell-Aggregat am ehesten einem ausgereiften TLO entsprach. Nach diesem Schema konnte das Aggregat in Abbildung 17 beispielsweise als mittelklassig klassifiziert werden (CXCL13⁺, FDC-SP⁺, Ig⁺, PNAd⁻).

Tabelle 18: Einordnung der B-Zell-Aggregate mit lymphoiden Charakteristika in verschiedene Schweregrade anhand der Marker-Ausstattung

Bezeichnung	Anzahl positiver Marker (CXCL13, FDC-SP, Ig, PNAd)
B-Zell-Aggregat	0
B-Zell-Aggregat mit lymphoiden Charakteristika	
geringgradig	1
mittelgradig	2 oder 3
hochgradig	4

FDC, Follikulär dendritische Zelle; Ig, Immunglobulin; PNAd, Peripheral Lymph Node Addressin.

Wie in Abbildung 18 B zu sehen, waren die meisten B-Zell-Aggregate zum Zeitpunkt der Präparation mittelgradig entwickelt. Kein Aggregat wies zu diesem Zeitpunkt eine hochgradige lymphoide Neogenese auf. Dies lag daran, dass in keinem Kleinhirn PNAd⁺ HEVs gefunden werden konnten, wohingegen diese Färbung am Lymphknotengewebe stabil und deutlich positiv ausfiel (Abbildung 4 B', Abbildung 5 E). Am häufigsten wurde eine positive FDC-SP-Färbung (39 x) gezählt, gefolgt von CXCL13 (33 x). Plasmazellen (Ig⁺) wurden in den B-Zell-Aggregaten am seltensten gefunden (15 x, Abbildung 18 C).

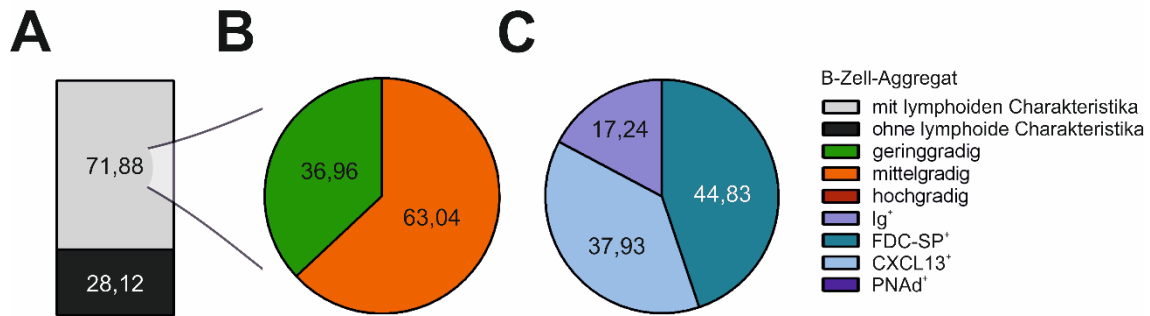


Abbildung 18: Charakterisierung der B-Zell-Aggregate und Verteilung der Marker in %-Zahlen. **A)** Insgesamt wurden 64 B-Zell-Aggregate in den n = 5 Vehikel-Mäusen gezählt. Alle B-Zell-Aggregate mit lymphoiden Charakteristika wurden weiter in Schweregrade unterteilt. **B)** Zum Zeitpunkt der Präparation war (noch) kein hochgradiges B-Zell-Aggregat vorhanden. Die 46 gering- und mittelgradigen B-Zell-Aggregate mit lymphoiden Charakteristika wurden dann in **C)** weiter auf ihre Marker-Expression hin analysiert. Insgesamt waren 87 Färbungen für die verschiedenen Marker positiv. PNAd konnte in keinem Aggregat angefärbt werden. FDC, Follikulär dendritische Zelle; Ig, Immunglobulin; PNAd, Peripheral Lymph Node Addressin.

3.6 Zusammenfassung der Ergebnisse

Fingolimod schien im Mausmodell auf den ersten Blick wenig Einfluss auf die B-Zellen zu haben: Weder waren die B-Lymphozyten im peripheren Blut verringert noch zeigte sich ihre MP4-spezifische Reaktivität eingeschränkt. Trotzdem verbesserte FTY720 bei Behandlung im Krankheitsgipfel nicht nur den klinischen Verlauf der MP4-EAE deutlich, sondern hemmte auch effektiv die Kleinhirn-Infiltration. Einer B-Zell-Aggregat-Bildung mit folgender lymphoide Neogenese wurde konsequent vorgebeugt.

Methodisch erwies sich dabei die CD3/B220-Doppelfärbung als äußerst geeignete Grundlage für die Detektion von B-Zell-Aggregaten, die mit dem nachgeschalteten *Marker-Panel* strukturiert und umfassend analysiert werden konnten. Bei nur gering abweichenden Ergebnissen kann ggf. in zukünftigen Versuchsansätzen auf eine Flächenkorrektur verzichtet werden.

4 DISKUSSION

4.1 Vergleich, Einflüsse und Aussagekraft des EAE-Verlaufes

Unabhängig von der Fingolimod-Behandlung lädt die Arbeit dazu ein, den MP4-induzierten EAE-Verlauf zu vergleichen und dessen Einflüsse zu diskutieren. Als Kuerten et al. zum ersten Mal das MP4-Modell an der B6-Maus vorstellten, berichteten sie über ein frühes Einsetzen der Symptome nach Immunisierung (5 - 10 Tage) [76]. Im Vergleich entwickelte sich die EAE in den vorliegenden Versuchen später (12 - 21 Tage nach Immunisierung, Kapitel 3.1). Nachdem die MP4-Dosis, die als wesentlicher Einflussfaktor auf den EAE-Verlauf beschrieben wurde [76], adäquat war (Kapitel 2.3.2), bleibt die Ursachenforschung weitgehend spekulativ. Abweichende Haltungsbedingungen der Versuchstiere könnten die Diskrepanz aber beispielsweise erklären [111]. Eine Gemeinsamkeit beider Arbeiten war dagegen, dass die akute EAE nach einem Krankheitspeak in ein chronisches Stadium ohne Schübe oder Remission überging (Kapitel 3.2), wobei das durchschnittliche Plateau bei Kuerten et al. mit einem Score von ca. 1,8 [76] sogar etwas niedriger lag als bei den Vehikel-Tieren dieses Projektes mit einem Score von ca. 2,4 (Abbildung 9 A). Den Grund für die schlechtere neurologische Präsentation im Vehikel Ethanol zu suchen, erscheint dabei im Hinblick auf Kapitel 2.2 eher unwahrscheinlich. Während der Score in dieser Arbeit gegen die Behandlungstage aufgetragen wurde, nutzten vorherige Studien die Tage nach Immunisierung [76] bzw. die Krankheitstage [79], um die EAE zeitlich zu charakterisieren. Für eine bessere Vergleichbarkeit der Abläufe am MP4-Modell wäre es deshalb bei zukünftigen Projekten sinnvoll, den Referenzzeitpunkt zu vereinheitlichen. Selbst dann scheint es allerdings, ob der interindividuellen Unterschiede zwischen den Versuchstieren, kaum möglich einen pauschalen Zeitpunkt zu definieren, an dem das akute Stadium der MP4-induzierten EAE endet und von einem chronischen Verlauf gesprochen werden kann. Man wird sich also auch weiterhin mit etwas unscharfen Definitionen, wie in Kapitel 1.3.3, behelfen müssen.

Interessanterweise konnte die Quote der erfolgreich immunisierten Mäuse über die drei Kohorten hinweg beinahe verdreifacht werden (Kapitel 3.1, Tabelle 19).

Tabelle 19: Geht eine hohe Quote an erfolgreich mit MP4 immunisierten Mäusen mit einem aggressiveren EAE-Verlauf einher?

Kohorte (n/n _{Vehikel})	Immunisierungs-Quote [%]	Krankheitsbeginn nach Immunisierung [d]	Infiltrate/Fläche bei Vehikel-Mäusen [1/mm ²]
1 (7/2)	23,33	17,00 ± 2,58 d	9,03 ± 9,28
2 (5/3)	25,00	15,60 ± 3,21 d	15,54 ± 5,98
3 (2/0)	69,57 ^a	13,00 ± 1,41 d	Keine Vehikel-Tiere

Die Daten sind wegen geringer n-Zahlen (Spalte 1: Gesamtzahl der Versuchstiere pro Kohorte und Anzahl der Vehikel-Tiere) nicht ausreichend aussagekräftig. ^a Die beiden Tiere der dritten Kohorte Teil waren zudem Teil eines größeren Ansatzes, der auch Mäuse für das Folgeprojekt enthielt. Die Erfolgsquote bezog sich also im Gegensatz zum Krankheitsbeginn nicht nur auf die zwei Tiere aus Kohorte 3 mit vorliegendem Krankheitsverlauf. Dargestellt sind in den beiden rechten Spalten die Mittelwerte ± Standardabweichungen. EAE, Experimentelle autoimmune Encephalomyelitis.

Die Gründe hierfür bleiben ebenfalls unklar, zumal insbesondere zwischen der zweiten und dritten Kohorte keine Änderung am Protokoll oder Prozedere vorgenommen wurde. Tatsächlich erfolgte ein Wechsel des Anbieters für Versuchstiere, dies allerdings bereits nach der ersten Kohorte. Von einer Auswirkung war dabei, aufgrund der genetisch identischen Individuen, ohnehin nicht auszugehen. Bei Betrachtung von Tabelle 19 fällt außerdem auf, dass mit steigender Erfolgsquote der Krankheitsbeginn nach Immunisierung verkürzt und, soweit zutreffend, die Zahl der Infiltrate/Fläche bei den von der Fingolimod-Behandlung unbehelligten Vehikel-Tieren erhöht war. Auch bei Kuerten et al. geht eine hohe Immunisierungsrate mit einem frühen Symptombeginn einher [76]. Die auf den ersten Blick naheliegende Schlussfolgerung, eine höhere Immunisierungsquote könnte einen aggressiveren EAE-Verlauf zur Folge haben, ließ sich allerdings allein aus den vorliegenden Daten nicht ziehen: Zum einen war durch die geringe n-Zahl (nur zwei Vehikel-Tiere in der ersten bzw. zwei Versuchstiere in der dritten Kohorte) keine Grundlage für eine belastbare Statistik gegeben, zum anderen verhielt sich die Durchschnittszahl der Infiltrate/Fläche gegensätzlich zu der der B-Zell-Aggregate/Fläche (MW der ersten Kohorte = 1,12 1/mm²; SD = 1,09 1/mm²; MW der zweiten Kohorte = 0,88 1/mm²; SD = 0,92 1/mm²).

In diesem Kontext erwähnenswert ist außerdem, dass sich für die 14 Versuchstiere anhand der beschränkten Daten keine Aussage zu einem Zusammenhang zwischen frühem und schwerem Krankheitsbeginn

herausarbeiten lies (Korrelation zwischen der Dauer von Immunisierung bis Symptombeginn und der Höhe des ersten gemessenen EAE-Scores; $p = 0,23$; $r_s = -0,35$; KI = -0,75 bis 0,24). Auch fällt es weiterhin schwer von der klinischen Präsentation der Mäuse direkt auf das Ausmaß der Infiltrat- und B-Zell-Aggregat-Bildung rückzuschließen. Zwar korrelierte die Kleinhirn-Infiltration in diesen Versuchen mit dem klinischen *Outcome* der Mäuse (Kapitel 3.4.4), da der Krankheitsverlauf aber nicht im Längsschnitt abgebildet wurde, konnte z.B. nicht geklärt werden, ob die B-Zell-Aggregate kausal für die klinische Verschlechterung verantwortlich oder nur Ausdruck einer generell erhöhten inflammatorischen Aktivität waren. Um tatsächlich parallel zum EAE-Verlauf einen Einblick in die aktuelle Infiltrations-Situation zu erhalten, wären v.a. bildgebende Verfahren geeignet, wobei selbst MRT-Befunde beim Menschen nur eine eingeschränkte Aussagekraft über den klinischen MS-Verlauf haben (*clinico-radiological paradox*) und es Schwierigkeiten bereitet die entzündliche Infiltration korrekt einzuschätzen [112]. Experimentelle Ultrahochfeld-MR-Scanner mit einer Feldstärke von 7 Tesla können indes bei der Untersuchung von MS-Läsionen unter optimalen Bedingungen Blutgefäße mit einer Querschnittsfläche von 0,008 mm² auflösen [113]. Das murine B-Zell-Aggregat in Abbildung 17 beispielsweise weist in etwa eine Fläche von 0,023 mm² auf und sollte somit, rein von der Größenordnung her, neuroradiologisch darstellbar sein.

Gerade für weitere Studien an B-Zell-Aggregaten und TLOs wäre es methodisch sehr hilfreich mit dem EAE-Score einen Hinweis zu bekommen, ob bereits eine Aggregation oder lymphoide Neogenese stattgefunden hat. So könnte zum Beispiel ein optimaler Zeitpunkt für die Präparation bestimmt werden. Die Testgütekriterien aus Kapitel 3.4.4 legen nahe, dass ab einem EAE-Score von 0,5 mit Infiltraten generell und ab einem Score von 2 speziell mit B-Zell-Aggregaten und lymphoider Neogenese zu rechnen ist. Diese Berechnungen an allen 14 Versuchstieren setzen allerdings vereinfachend voraus, dass Fingolimod hauptsächlich über die verminderte Kleinhirn-Infiltration auf den EAE-Score Einfluss nimmt. Kuerten et al. stellten dies beispielsweise insofern in Frage, als dass bei ihnen eine Korrelation zwischen B-Zell-Aggregaten und klinischem EAE-Score negativ ausfiel, was sie dem Einfluss der Rückenmarks-Pathologie

auf die klinische Symptomatik zugeschrieben [79]. So oder so ist darüber hinaus keine Aussage über das Ausmaß der Infiltration und Aggregation vom EAE-Score abzuleiten.

4.2 Differenzierte Wirkung von Fingolimod auf B-Zellen

Die vorliegenden Ergebnisse wurden in einer gemeinschaftlichen Veröffentlichung der Arbeitsgruppe (Kapitel 7) publiziert. Einen wichtigen Teil dieser Publikation stellten auch die Versuche des Folgeprojektes dar. Einige Erkenntnisse des Artikels werden im Folgenden als Diskussionsgrundlage kurz zusammengefasst [114]: Im Wesentlichen wurde der hier verwendeten Behandlung im akuten Krankheitspeak eine zweite Therapiestrategie gegenübergestellt. Eine 30-tägige FTY720-Gabe nach 50 Krankheitstagen im chronischen EAE-Stadium konnte den klinischen Verlauf im Vergleich zu den Vehikel-Tieren nicht verbessern. Zwischen den Gruppen bestand in diesem Ansatz auch kein Unterschied bezüglich der Kleinhirn-Infiltration, insbesondere der Anzahl der B-Zell-Aggregate. Einzig die lymphoide Neogenese war bei der chronischen Vehikel-Gruppe ausgeprägter als bei entsprechender Fingolimod-Behandlung [114]. Daraus wurde der Schluss gezogen, dass Fingolimod bereits etablierte B-Zell-Aggregate zwar nicht rückgängig machen, vermutlich aber deren Transformation in Richtung TLO verlangsamen konnte [114].

In Zusammenschau mit den Ergebnissen aus Kapitel 3.4.3, in denen FTY720 jegliche B-Zell-Aggregation eindrücklich bei rechtzeitiger Therapie verhinderte, und in dem Wissen um die Wichtigkeit der B-Zelle bei der MS-Pathogenese (Kapitel 1.1.4.1), stellte sich die Frage nach dem genauen Einfluss von FTY720 auf B-Zellen. Die Immunoassays erbrachten diesbezüglich kaum Wegweisendes. Sowohl die Anzahl der Gesamt- als auch MP4-reaktiven B-Zellen unterschied sich nicht zwischen der Vehikel- und Fingolimod-Gruppe, ebenso wenig wie die Antikörperproduktion gegen MP4, was auf eine intakte B-Zell-Funktion hindeutete (Kapitel 3.3.3). Dies deckte sich mit Ergebnissen von Pinschewer et al., die ebenfalls über eine ungestörte Funktionalität der B-Zellen und der humoralen Immunantwort unter FTY720 berichteten [115]. Trotzdem

wurden verschiedene Auswirkungen von Fingolimod auf gewisse B-Zell-Subsets (z.B. erhöhte Migrationsfähigkeit regulatorischer B-Zellen) von Lehmann-Horn et al. zusammengefasst [116] und auch auf genetischer Ebene schien FTY720 die B-Zellen zu beeinflussen: Eine Genexpressionsanalyse von B-Zellen aus den Milzen immunisierter und im akuten Krankheitsstadium behandelter Mäuse ergab, dass einige Gene des B-Zell-Rezeptor-vermittelten Signalwegs unter FTY720 herunter-, proapoptische Gene dagegen hinaufreguliert waren [114].

In der DFZ wiederum verringerte Fingolimod im Blut der Tiere zwar die Anzahl der CD4⁺ T-Zellen im Vergleich zur Vehikel-Behandlung, nicht jedoch die CD19⁺ B-Zellen (Kapitel 3.3.2). Ein unterschiedlicher Besatz der beiden Zelltypen mit S1PR₁ schien dabei als Erklärung unwahrscheinlich, da die Expression des Rezeptors in beiden Behandlungsgruppen sowohl bei den T- als auch bei den B-Zellen vergleichbar war [114]. Einzig die Prozentzahlen der S1PR₁⁺-Zellen lagen im Blut der Mäuse über der im Lymphknoten [114], was mit der weiteren Herunterregulierung von S1PR₁ während der Differenzierung und Proliferation im SLO vereinbar war (Kapitel 1.2.3). Ein weiterer Erklärungsversuch für die unveränderte B-Zellzahl im Blut nach Fingolimod-Behandlung könnte von Sinha et al. stammen, die dem klassischen S1PR₁-vermittelten Egress aus dem Lymphknoten bei den B-Zellen nur eine geringe Rolle einräumen und stattdessen ein Zusammenspiel aus S1PR₁, S1PR₃ und Zellaktivierung vorschlagen [117]. Wie in Kapitel 2.6.3 näher ausgeführt bemühten Morris et al. einen ähnlichen Versuchsaufbau zur Messung von Lymphozyten im Blut von B6-Mäusen. Sowohl in der von Ihnen angeführten Literatur als auch bei den eigenen Experimenten, zeigte die Fingolimod-Behandlung einen stärkeren Effekt auf T- als auf B-Zellen. Die B-Zellen waren allerdings, im Gegensatz zu dieser Arbeit, trotzdem signifikant verringert [110], wie dies auch bei MS-Patienten berichtet wurde [118]. Sicherlich ließe sich die Belastbarkeit der vorliegenden DFZ-Ergebnisse im Hinblick auf die Protokolländerungen aus Kapitel 2.6.1 diskutieren, weitere Versuche im Verlauf lieferten allerdings vergleichbare Resultate, es konnte sogar eine erhöhte Gesamtzahl an B220⁺ B-Zellen in den Milzen akut behandelter Mäuse nachgewiesen werden [114]. Dies deutete darauf hin, dass es zumindest zu einer gewissen Retention von B-Zellen im SLO unter FTY720-Therapie kam.

Unter der Vorstellung die zurückgehaltenen T- und B-Zellen im SLO mikroskopisch nachzuweisen, wurden die Lymphknoten der mit Vehikel und Fingolimod behandelten Mäuse eingebettet und verglichen (Kapitel 3.3.1). Mit der Einschränkung der bereits ausgeführten methodischen Problematik, zeigte sich auch bei den retinierenden Lymphknoten unter Fingolimod-Behandlung kein offensichtlicher Größenunterschied im Vergleich zum Vehikel-Gewebe. Starke interindividuelle Größenabweichungen innerhalb der Behandlungsgruppen könnten dabei je nach Lymphabstromgebiet als Reaktion auf die Immunisierung gewertet werden. Die Lymphknoten-Morphologie war, soweit beurteilbar, ebenfalls vergleichbar. Laut Chun und Hartung waren diese Ergebnisse auch nicht anders zu erwarten, da sowieso nur 2 % der gesamten Lymphozyten-Population zeitgleich im Blut zirkulieren und potentiell in den SLOs zurückgehalten werden können [47].

4.3 Von der B-Zelle über das B-Zell-Aggregat bis hin zum TLO

Auf den ersten Blick schienen obige Ausführungen widersprüchlich: Einerseits wurde die B-Zell-Aggregation im Kleinhirn der Mäuse durch die akute Fingolimod-Behandlung komplett verhindert, andererseits konnten dafür nicht die Retentionseffekte von FTY720 verantwortlich gemacht werden, da die CD19⁺ B-Zellen im Blut eben nicht verringert waren. In anderen Worten: Es wären genug B-Zellen vorhanden gewesen um Aggregate zu bilden, dies geschah allerdings unter Fingolimod-Einfluss im Gegensatz zur Vehikel-Gruppe nicht, was ein ungeklärtes Bindeglied zwischen den B-Zellen und deren Aggregation implizierte. Ein direkter Effekt von FTY720 auf die B-Zell-Aggregation konnte dabei *in vitro* nicht gezeigt werden [114]. Der Suche nach einem Mechanismus für die B-Zell-Aggregat-Bildung sei einschränkend vorangestellt, dass es methodisch natürlich besser gewesen wäre, die B-Zellen durchflusszytometrisch an denselben Mäusen zu messen, von denen auch die Histologie angefertigt wurde.

Trotzdem kommen verschiedene Möglichkeiten zur Erklärung der Beobachtung in den Sinn: Schon länger wird eine stabilisierende Wirkung von Fingolimod auf die BHS diskutiert. In *Dark Agouti*-Ratten konnte Fingolimod zum Beispiel durch

Regulierung verschiedener Enzyme die BHS-Integrität fördern und die Durchlässigkeit sogar noch nach einem EAE-Monat rückgängig machen [119]. Darüber hinaus erhöhte die Inkubation von MS-Patienten-Serum zwar die Durchlässigkeit von *Tight Junctions* im BHS-Modell, dies konnte allerdings durch vorherige Behandlung mit Fingolimod verhindert werden [120]. Als Konsequenz wäre es also denkbar, dass zwar genug B-Zellen im Blut der Mäuse vorhanden waren, unter Fingolimod-Behandlung aber zu wenige dieser Zellen ins ZNS wandern konnten, um dort zu aggregieren. Gegen diese These spricht zum einen eine *in vitro*-Studie von Schuhmann et al., in der FTY720 in entzündlichem Setting keine stabilisierende Wirkung auf die BHS aufwies [121]. Zum anderen erbrachten durchflusszytometrische Messungen von B- und Plasmazellen in aufbereitetem Hirn-, Kleinhirn- und Rückenmarksgewebe akut behandelter MP4-EAE-Mäuse keine Unterschiede zwischen der Vehikel- und Fingolimod-Gruppe [114].

Dies machte eine andere Theorie im Zusammenhang mit der fehlenden B-Zell-Aggregation unter FTY720-Therapie wahrscheinlicher, nämlich, dass B-Zellen für die Aggregation ein geeignetes inflammatorisches Milieu benötigten. Nicht nur reduzierte Fingolimod in dieser Arbeit die gesamte Kleinhirn-Infiltration drastisch (Kapitel 3.4.2), auch in der Literatur wurde gezeigt, dass FTY720 inflammatorische Gene herunterregulieren [119] und B-Zellen dazu stimulieren konnte, das anti-inflammatorische Zytokin IL-10 zu exprimieren [122]. Insbesondere wird den IL-17-sezernierenden CD4⁺ T-Helfer- (T_H17-) Zellen eine wesentliche Rolle bei der B-Zell-Aggregation und ektopen lymphoiden Neogenese eingeräumt: Peters et al. konnten zum Beispiel TLOs in B6-Mäusen durch einen Transfer MOG-spezifischer T_H17-Zellen induzieren, während dies mit anderen T-Zell-Subsets nicht gelang [99]. Auch in der MP4-induzierten EAE wurden T_H17-Zellen in enger Assoziation zu den TLOs nachgewiesen [79] und beim MS-Patienten mehrere Studien aufgeführt, in denen die T_H17-Zellzahlen im Blut und Liquor erhöht waren [83]. Zwar ist das genaue Abhängigkeitsverhältnis zwischen T_H17-Zellen und TLO-Bildung nicht zufriedenstellend geklärt, eine mögliche Rolle könnte aber das Chemokin CXCL13 (Kapitel 2.4.3) spielen, das durch IL-17 induziert wird und B-Zellen in das ZNS locken kann [83]. Alternativ

wurde in einer weiteren passiven EAE mit PLP-spezifischen T_H17-Zellen und SJL/J-Mäusen gezeigt, dass u.a. IL-17 die Stromazellen beeinflussen und so zur Ausbildung eines fibrösen Grundgerüsts für das TLO beitragen konnte [123]. Zusammenfassend scheint FTY720 also durch Zurückhalten der T_H17-Zellen die B-Zell-Aggregation und einhergehend die lymphoide Neogenese zu verhindern. Außerdem gibt es Hinweise, dass Fingolimod synergistisch durch die Interferenz mit S1PR₁ und nachgeschalteten Signalwegen die Polarisierung von T-Zellen zu T_H17-Zellen beeinflussen konnte [124]. Durchflusszytometrisch wurden die T_H17-Zellen in den vorliegenden Versuchen nicht gesondert, sondern wenn im stark verminderten CD4⁺ T-Zell-Kollektiv miterfasst, wobei bei nicht-immunisierten Mäusen natürlich generell nur mit sehr wenigen T_H17-Zellen zu rechnen ist.

In Kapitel 1.4 wurde die Entwicklung vom inflammatorischen Infiltrat über das B-Zell-Aggregat hin zum TLO und dessen aktive Beteiligung am immunologischen Geschehen bereits beschrieben, wobei Non-B-Zell-Infiltrate in der entsprechenden Literatur nicht abgegrenzt wurden und so nicht klar ist, welchen Stellenwert diese Strukturen einnehmen. Insgesamt verteilten sich in dieser Arbeit 205 Non-B-Zell-Infiltrate auf fünf Vehikel- und drei Fingolimod-Tiere. Bei zwei Mäusen waren sie mengenmäßig ebenso oder stärker vertreten als die diffusen B-Zell-Infiltrate (Tabelle 17). Schon die große Anzahl der Non-B-Zell-Infiltrate machte es unwahrscheinlich, dass es sich dabei fälschlicherweise um verkannte diffuse B-Zell-Infiltrate handelte, die als dreidimensionale Gebilde nur zufällig auf einer Ebene ohne B-Zellen angeschnitten wurden. Zumindest denkbar wäre, dass es sich bei den Non-B-Zell-Infiltraten ihrerseits um eine Vorstufe der diffusen B-Zell-Infiltrate handelt: Am Anfang der B-Zell-Aggregation und lymphoiden Neogenese stehen tatsächlich sogenannte hämatopoetische *Lymphoid Tissue Inducer Cells* (LTI), die gewisse Ähnlichkeiten zu T-Zellen aufweisen. Sie exprimieren nicht nur das Oberflächenmerkmal CD4, sondern sezernieren auch ein ähnliches Zytokin-Profil wie beispielsweise T_H17-Zellen [83, 125]. Sie wurden sogar als mögliche Vorläufer der CD4⁺ T-Zellen gehandelt [125], auch wenn dies umstritten ist [81]. Trotzdem kann es sich bei den angefärbten Zellen im Non-B-Zell-Infiltrat offensichtlich nicht um LTI handeln, die charakteristischerweise negativ für CD3 sind [81, 83, 125]. In einem

MOG-induzierten EAE-Modell mit Ephrin B1- und B2-KO-Mäusen war die T-Zell-Infiltration im ZNS im Vergleich zum Wildtyp deutlich verringert. Die Studie zeigte, dass Ephrine u.a. Bestandteil einer Signalkaskade sind, die beispielsweise für die chemotaktisch gesteuerte Migration der T-Zellen (z.B. in Richtung CCL21) verantwortlich ist. Interessanterweise differenzierten Ephrin-defiziente CD4⁺ T-Zellen dann auch schlechter in T_H17-Zellen [126], weshalb dieser *Pathway* beispielsweise die Bildung von Non-B-Zell-Infiltraten als Vorläuferstrukturen initiieren und anschließend via T_H17-Zellen und CXCL13 auf die B-Zellen und deren Aggregation Einfluss nehmen könnte. Alternativ steht zur Diskussion, dass es sich bei den Non-B-Zell-Infiltraten nicht um eine Entwicklungsstufe, sondern tatsächlich um eine eigene Entität handelt. Die Tatsache, dass in den Kleinhirnen z.T. ausgeprägte Non-B-Zell-Infiltrate nebst deutlich kleinerer diffuser B-Zell-Infiltrate vorhanden waren, macht dies wahrscheinlich. Was dann allerdings B-Zellen dazu bewegt in das eine Infiltrat einzuwandern und das andere zu meiden, müsste in zukünftigen Studien weiter adressiert werden, ebenso wie die Frage, ob bzw. welche Rolle die Non-B-Zell-Infiltrate im Rahmen der B-Zell-Aggregat-Bildung einnehmen.

Insgesamt 71,88 % der B-Zell-Aggregate wiesen in den vorliegenden Versuchen Zeichen der lymphoiden Neogenese auf und es wurde kein hochgradiges B-Zell-Aggregat mit lymphoiden Charakteristika gefunden (Kapitel 3.5.1, Kapitel 3.5.2). Da dagegen im Folgeprojekt mit deutlich längerer Krankheitsdauer (Kapitel 4.2) bei allen B-Zell-Aggregaten der chronischen Vehikel-Gruppe lymphoide Merkmale vorhanden waren und sogar ein pNAD⁺, hochgradiges B-Zell-Aggregat mit lymphoiden Charakteristika dokumentiert wurde [114], könnten die Ergebnisse im Licht der TLO-Evolution gewertet werden: Die B-Zell-Aggregate dieser Arbeit waren nach 30-tägiger Vehikel-Behandlung schlicht noch nicht so weit fortgeschritten. Auch Kuerten et al. fanden den Großteil der TLOs bei der MP4-induzierten EAE zwischen dem 30. und 57. Krankheitstag, auch wenn dabei überrascht, dass ein TLO bereits nach 8 Krankheitstagen dokumentiert wurde und sich insgesamt 60 % der Kleinhirn-Infiltrate als TLO einstufen ließen [79], eine Größenordnung die natürlich auch das Folgeprojekt bei Weitem verfehlte. Obwohl die hier verwendeten Marker der lymphoiden Neogenese an

der TLO-Definition von Kuerten et al. angelehnt waren (Kapitel 1.4), ist der Grund für die Diskrepanz zumindest teilweise durch die Methodik zu erklären: Während in diesem Projekt nur B-Zell-Aggregate als hochgradig bezeichnet werden konnten, wenn sie für die Marker CXCL13, FDC-SP, Ig und PNAd allesamt positiv waren (Kapitel 3.5.2), qualifizierte ein B-Zell-Aggregat bei Kuerten et al. schon allein durch die Kompartimentalisierung, einen HEV-Nachweis und ein weiteres Kriterium, wie z.B. die Aggregat-unspezifische Ki67-Proliferationsaktivität (Kapitel 2.4.3) als TLO. Zum HEV-Nachweis gab es dabei zwei Möglichkeiten, denn neben PNAd wurde auch der Marker MadCAM-1 eingesetzt [79]. In der vorliegenden Arbeit wurde PNAd⁺ Kleinhirngewebe nicht gefunden (Kapitel 3.5.2) und die Etablierung von MadCAM-1 misslang (Kapitel 2.4.3). Nachdem MadCAM-1 schon in einem früheren Stadium der HEV-Entwicklung exprimiert wird als PNAd [81], könnte dies der Grund für den hier fehlenden HEV- und somit TLO-Nachweis nach 30-tägiger Behandlung im akuten EAE-Stadium sein. Außerdem ist PNAd in ektopem lymphatischem Gewebe im ZNS umstritten, so wurde PNAd⁺ Endothel zwar in der chronischen MP4-EAE nachgewiesen [79, 114], nicht aber im Hirnparenchym und den Meningen von sechs SPMS-Patienten [25]. Indes erscheint es durchaus logisch, dass auch schon bei den B-Zell-Aggregaten der Vehikel-Tiere dieser Arbeit evtl. noch nicht vollständig entwickeltes, aktiviertes Endothel mit HEV-Eigenschaften als Infrastruktur für die stattgefundenene Lymphozyten-Akkumulation vorhanden war [81].

Gefunden wurde dagegen in den 46 B-Zell-Aggregaten mit lymphoiden Charakteristika der Marker FDC-SP am häufigsten, gefolgt von CXCL13 und Ig am seltensten (Kapitel 3.5.2). Das Konzept, zwischen gering- und mittelgradig entwickelten B-Zell-Aggregaten zu unterscheiden, implizierte, dass verschiedene Aggregate auf dem Weg zum TLO unterschiedlich weit fortgeschritten waren. Als Erklärung der Häufigkeiten der verschiedenen Marker ließ sich ein stark vereinfachter, zeitlicher Ablauf der lymphoiden Neogenese im B-Zell-Aggregat konstruieren, der sich im Wesentlichen mit Aloisi et al. deckte [81]: Stromazellen, die sich im Verlauf zu FDCs entwickelten, produzierten CXCL13 und lockten damit weitere, sich differenzierende Immunzellen an den Ort der Entzündung. Darunter befanden sich Plasmazellen, die wiederum im Anschluss Ig

produzierten. Tatsächlich wurden Ig⁺-Zellen nie alleine, sondern nur in mittelgradigen B-Zell-Aggregaten mit lymphoiden Charakteristika nachgewiesen. Dabei gingen 80,00 % der Ig-Färbungen sowohl mit einer positiven FDC-SP- als auch CXCL13-Färbung einher, was weit fortgeschrittene Aggregate andeutete. Einschränkend muss allerdings zu diesen Überlegungen gesagt werden, dass Ig erst im Verlauf als Marker etabliert wurde, um einen Bezug zu menschlichen IHC-Studien zu schaffen (Kapitel 2.4.3). Dadurch liegt die Ig-Färbung für die B-Zell-Aggregate von zwei Vehikel-Mäusen nicht vor, was natürlich ebenfalls die obige Häufigkeitsverteilung erklären kann. Bei alleiniger Betrachtung der drei komplett gefärbten Vehikel-Tiere ergibt sich jedoch die gleiche Reihenfolge: FDC-SP > CXCL13 > Ig.

In der Konsequenz steht also bei einerseits strengen Anforderungen für die Definition eines hochgradigen B-Zell-Aggregates mit lymphoiden Charakteristika und andererseits bei fehlender MadCAM-1- sowie unvollständiger Ig-Färbung zu vermuten, dass die lymphoide Neogenese bei den Vehikel-Mäusen der vorliegenden Versuche tendenziell unterschätzt wurde.

4.4 Prävention der lymphoiden Neogenese durch frühe Therapie

Eine kleine Studie in Brasilien bemerkte, dass die OKB unter Natalizumab-Behandlung bei vier von sechs RRMS-Patienten aus dem Liquor verschwanden, wobei der anti-VLA4 Antikörper v.a. CD4⁺ T-Zellen bei der Migration über die BHS behinderte. Dies musste in irgendeiner Weise zu einer beeinträchtigten B-Zell-Aktivierung und lokalen Antikörperproduktion im ZNS führen, so mutmaßten die Autoren in einem Versuch die fehlenden OKB zu erklären [127]. Ein mögliches Bindeglied könnten an dieser Stelle erneut die T_H17-Zellen sein, da sie als Untergruppe der CD4⁺ T-Lymphozyten folgerichtig auch von einer Natalizumab-Therapie betroffen waren: Sie stiegen im peripheren Blut von behandelten MS-Patienten stark an und sanken erst nach Absetzen der Medikation und damit dem Ende der BHS-Blockade durch Rezirkulation ins ZNS wieder ab [128]. In Kapitel 4.3 wurde neben der Wichtigkeit der T_H17-Zellen bei der TLO-Bildung auch das ektopische lymphatische Gewebe als Ursprungsort für Ig-

produzierende Plasmazellen diskutiert. Unter der Annahme, dass OKB zumindest teilweise auf diesen lokalen Antikörpern fußen, scheint es schlüssig, die fehlenden OKB in der brasilianischen Arbeit auf eine gestörte lymphoide Neogenese bei therapiebedingtem T_H17-Zell-Mangel zurückzuführen. Diese Überlegungen sprächen dafür, dass ein TLO keine stabile und dauerhafte Struktur darstellt, sondern auf konstanten Nachschub von Immunzellen angewiesen ist [114]. Theoretisch ließe sich auch die attenuierte lymphoide Neogenese unter FTY720-Therapie im chronischen Setting des Folgeprojektes mit einer mangelnden Zufuhr an T_H17-Zellen erklären [114], die Tatsache allerdings, dass Fingolimod dabei bereits bestehende B-Zell-Aggregate nicht mehr auflösen vermochte (Kapitel 4.2), spricht eine andere Sprache: Da das Zurückhalten der Lymphozyten im Lymphknoten unter FTY720 einer unterbrochenen Versorgung mit Immunzellen gleichkam, musste ein B-Zell-Aggregat für den therapieresistenten Bestand eine mehr oder weniger autarke und beständige Zell-Formation darstellen [114].

Bei aller Zurückhaltung bezüglich Übertragbarkeit von der EAE zur MS (Kapitel 1.3.2) könnte sich daraus eine wichtige klinische Implikation der vorliegenden Arbeit ergeben: Ektope B-Zell-Follikel gelten als charakteristisches und v.a. pathogenetisch relevantes Merkmal der SPMS (Kapitel 1.4), für die die Therapiemöglichkeiten aktuell beschränkt sind (Kapitel 1.1.3). Es scheint in diesem Licht äußerst erstrebenswert die Bildung solcher progressiver B-Zell-Aggregate in einem frühen Erkrankungsstadium zu verhindern, insbesondere wenn sie tatsächlich als stabil etablierte und autonome Strukturen später im Krankheitsverlauf kaum mehr auflösen sind. Tatsächlich gelang durch die vorliegende Fingolimod-Behandlung bei akutem EAE-Beginn eine Unterdrückung der B-Zell-Aggregation und lymphoiden Neogenese eindrucksvoll, einhergehend mit einer beachtlichen Reduktion der gesamten Kleinhirn-Infiltration und einer Besserung der klinischen Präsentation. Das Versuchs-Setting wies dabei Ähnlichkeiten mit der RRMS auf (Kapitel 1.1.4), da auch im Mausmodell diffuse inflammatorische Prozesse die größte Rolle spielten und die B-Zell-Aggregation mit 7,57 % nur einen kleinen Teil der gesamten Entzündung darstellte (Kapitel 3.4.1). Auch wenn diese Arbeit natürlich eine

abwägende Risikoanalyse hinsichtlich behandlungsassoziierter Nebenwirkungen und eine Bewertung anderer Therapiekonzepte schuldig bleibt, deuten die Daten in der Zusammenschau darauf hin, dass eine Fingolimod-Therapie zu einem sehr frühen Zeitpunkt im Krankheitsverlauf vorteilhaft sein könnte.

Um einen solchen vorgezogenen Behandlungsbeginn näher zu spezifizieren, wäre ein zeitlicher und verallgemeinernder Ablauf der lymphoiden Neogenese beim MS-Patienten hilfreich. Diesen zu skizzieren ist allerdings sehr schwierig, da, wie in Kapitel 4.1 bereits erörtert, eine longitudinale Messung der einzelnen Infiltrate und B-Zell-Aggregate derzeit nicht erfolgt und sich die Studien durch abweichende Methodik und Schwerpunktsetzung unterscheiden. Bekannt sind hauptsächlich die Eckpunkte: Lucchinetti et al. fanden in Hirnbiopsien von akut erkrankten MS-Patienten nach einer medianen Krankheitsdauer von 27 Tagen vorwiegend diffuse Entzündungsinfiltrate, wobei interessanterweise bereits von einigen wenigen, nicht näher klassifizierten, B-Zell-Aggregaten berichtet wurde [129]. Das andere Ende des Spektrums markieren immunhistochemische Färbungen an *post-mortem* Hirngewebe von SPMS-Patienten mit einer mittleren Krankheitsdauer von 25 Jahren, in denen vollständig etablierte B-Zell-Follikel nachgewiesen wurden [24]. Irgendwann dazwischen scheint die Reifung der B-Zell-Aggregate zu vollständigen TLOs individuell fortzuschreiten und sich die RRMS in die SPMS zu wandeln, wobei eine Assoziation der progredienten lymphoiden Neogenese mit dem Übergang der beiden Verlaufsformen angedacht wurde [79]. Dieser Argumentation folgend wäre es denkbar, dass eine rechtzeitige Fingolimod-Therapie sogar den Übertritt in ein chronisches Krankheitsstadium beeinflussen könnte. Aktuelle Daten (EXPAND-Studie, Kapitel 1.1.3) zeigten darüber hinaus, dass selbst Patienten, die sich im Mittel bereits seit 3,8 Jahren im SPMS-Stadium befanden, noch von einer Therapie mit dem Fingolimod-Nachfolger Siponimod profitierten [20]. Der Versuch diese Ergebnisse teilweise mit der weiter oben diskutierten Verlangsamung der TLO-Transformation unter FTY720 zu erklären, setzt einerseits ein vergleichbares Wirkprofil beider S1PR₁-Modulatoren voraus und würde andererseits implizieren, dass die lymphoide Neogenese etwaiger B-Zell-Aggregate im EXPAND-

Patientenkollektiv nach durchschnittlich 16,8 Krankheitsjahren bei Behandlung noch im Gange war.

Der Behandlungserfolg von Siponimod bei der SPMS sei dabei ergänzend und keineswegs konträr zu obigem Plädoyer für eine frühe Fingolimod-Gabe im RRMS-Rahmen zu verstehen, zumal auch in der Literatur eine vorgezogene MS-Therapie im Allgemeinen [130, 131] und eine zeitige FTY720-Gabe im Speziellen befürwortet wird [132]. Trotzdem ist Fingolimod derzeit nur dann als Erstlinientherapie vorgesehen, wenn die RRMS einen hochaktiven Krankheitsverlauf nimmt, was i.d.R. erst nach mindestens zwei behindernden Schüben und einer Progression in der Bildgebung beurteilt werden kann [13]. Diese Latenz steht dem zeitnahen Einsatz des Therapeutikums natürlich entgegen. Dazu kommt, dass sich die Diagnosestellung und der Therapiebeginn in der Realität oft noch weiter verzögern, da Patienten mit MS-typischen Symptomen beispielsweise erst verspätet ärztlichen Rat einholen. In einer spanischen Studie betrug dieser Aufschub 19,2 Monate, die Zeitspanne zwischen Symptombeginn und Diagnose sogar 24,9 Monate [133]. Durch die 2017 revidierten McDonald-Kriterien zur frühen Diagnosestellung (Kapitel 1.1.3) wurde eine Anstrengung unternommen, das Intervall bis zur Diagnose bzw. Behandlung zu verkürzen [16]. Weitere Bemühungen in diese Richtung, z.B. das Bewusstsein für die Erkrankung in der Bevölkerung und Ärzteschaft zu schärfen, sind darüber hinaus sinnvoll und wichtig.

5 SCHLUSSFOLGERUNG UND AUSBLICK

Nach ausgiebiger Literaturrecherche scheinen die vorliegenden Versuche die ersten Daten zur Wirkung von Fingolimod auf die B-Zell-Aggregation und die lymphoide Neogenese im ZNS überhaupt zu liefern. Außerdem handelt es sich um die erste Medikamentenstudie am MP4-induzierten EAE-Modell. Die Integration dieser vielseitigen Teilbereiche vermag in der aktuellen Kontroverse um den Stellenwert der B-Zelle bei der MS einen Beitrag zu leisten, wobei die Inkonsistenzen und Schwachstellen der Arbeit beachtet werden müssen. Zu einem großen Teil standen diese in Zusammenhang mit den Etablierungsprozessen, die aber eine solide Grundlage auch für ähnliche Folgeprojekte (Kapitel 1.5, Kapitel 4.2) darstellten. Besonders herauszuheben ist hier vor allem die DAB-basierte Doppelfärbung und das anschließende Vorgehen zur Kategorisierung der Infiltrat-Typen und Analyse der B-Zell-Aggregate. Leider ist es dabei nach wie vor kaum möglich die lymphoide Neogenese im Längsschnitt abzubilden. Bildgebende Techniken könnten die TLO-Forschung deshalb in Zukunft auf ein neues Niveau heben. Ein zentrales Ergebnis dieser Arbeit war, dass eine Fingolimod-Behandlung im akuten Krankheitsstadium die B-Zell-Aggregation und lymphoide Neogenese konsequent verhindern konnte. Dies besitzt angesichts der Rolle der ektopen B-Zell-Follikel im chronischen MS-Verlauf und der Evaluation von S1PR₁-Modulatoren als SPMS-Therapeutika klinische Relevanz. Eine Prävention der B-Zell-Aggregation kann außerdem als Argument für den frühzeitigen Einsatz von FTY720 bei MS-Patienten verwendet werden. Inwiefern sich zukünftige Leitlinien in diese Richtung entwickeln, bleibt, ebenso wie der klinische Stellenwert von Siponimod, abzuwarten.

6 ZUSAMMENFASSUNG DER STUDIE, ABSTRACT

Die MP4-induzierte EAE erlaubt eine fokussierte Betrachtung von B-Zellen, die eine wichtige Rolle bei der Pathogenese der MS spielen. Es konnte z.B. gezeigt werden, dass das Vorhandensein von B-Zell-Aggregaten im ZNS von MS-Patienten mit einem aggravierten Krankheitsverlauf assoziiert war. Diese Follikel könnten dabei als ektoper lymphatische Strukturen den Immunprozess aktiv gestalten und somit ein therapeutisches Ziel darstellen. In der vorliegenden Studie wurde deshalb der Effekt des S1PR-Modulators Fingolimod auf B-Zell-Aggregate im Kleinhirn der MP4-EAE-Mäuse untersucht. Fingolimod hält Immunzellen in den SLOs zurück, womit diese nicht mehr für eine Entzündungsreaktion im ZNS zur Verfügung stehen.

Weibliche B6-Mäuse wurden mit MP4 immunisiert (n = 14) und in zwei Gruppen eingeteilt. Für 9 Tiere begann im akuten Krankheitsstadium eine ca. 30-tägige, orale Behandlung mit 1 mg/kg Fingolimod täglich, während 5 Kontroll-Mäuse stattdessen eine Vehikel-Lösung erhielten. Es wurde die MP4-spezifische B-Zell-Antwort verglichen (ELISPOT, ELISA) sowie die Kleinhirne immunhistochemisch bezüglich Art und Ausmaß der Infiltration und Fortschritt der lymphoiden Neogenese in B-Zell-Aggregaten untersucht. Die T- und B-Zellzahlen im peripheren Blut weiterer Mäuse (Vehikel- und Fingolimod-Gruppe, je n = 4) wurden durchflusszytometrisch ermittelt.

In dieser Arbeit konnte ein Zusammenhang zwischen klinischer Präsentation der Mäuse und Kleinhirn-Pathologie etabliert sowie eine Detailanalyse der Infiltrat-Typen und lymphoiden Neogenese durchgeführt werden. Unter Fingolimod-Einfluss war weder die B-Zell-Funktion (MP4-spezifische Reaktivität) eingeschränkt, noch die B-Zellzahl im peripheren Blut verringert. Trotzdem zeigten die Tiere einen milderen klinischen Verlauf, eine massiv reduzierte Kleinhirn-Infiltration und ein vollständiges Fehlen von B-Zell-Aggregaten. Die Ergebnisse liefern Denkanstöße u.a. zur Entstehung und Stabilität von B-Zell-Aggregaten. Sie können darüber hinaus im Sinne der aktuellen Diskussion um die Rolle der T_H17-Zellen bei der TLO-Formation interpretiert werden. Die vollständige Prävention einer B-Zell-Aggregat-Bildung durch frühzeitige Behandlung trifft den Zeitgeist moderner MS-Therapiestrategien.

7 VORABVERÖFFENTLICHUNG DER DATEN

Posterpräsentationen:

- Geteilte Erstautorenschaft: Notz Q und Bail K et al.
The effect of FTY720 treatment on B cell aggregation in the central nervous system in a B cell-dependent mouse model of multiple sclerosis.
111. Jahrestagung Anatomische Gesellschaft, Göttingen, 21.-24.09.2016.
- Erstautorenschaft: Notz Q et al.
How acute fingolimod treatment influences B cells and their aggregation in a B cell-dependent mouse model of multiple sclerosis.
Research Day MS, Berlin, 26.-27.01.2017.

Publikation [114]:

- Geteilte Erstautorenschaft: Bail K und Notz Q et al.
Differential effects of FTY720 on the B cell compartment in a mouse model of multiple sclerosis.
Journal of Neuroinflammation, online publiziert am 24.07.2017.

8 LITERATURVERZEICHNIS

1. Petersen G, Wittmann R, Arndt V, Gopffarth D. Epidemiology of multiple sclerosis in Germany: regional differences and drug prescription in the claims data of the statutory health insurance. *Nervenarzt*. 2014;85:990-998.
2. Flachenecker P, Stuke K, Elias W, Freidel M, Haas J, Pitschnau-Michel D, Schimrigk S, Zettl UK, Rieckmann P. Multiple sclerosis registry in Germany: results of the extension phase 2005/2006. *Dtsch Arztebl Int*. 2008;105:113-119.
3. Confavreux C, Vukusic S, Adeleine P. Early clinical predictors and progression of irreversible disability in multiple sclerosis: an amnesic process. *Brain*. 2003;126:770-782.
4. Dyment DA, Ebers GC, Sadovnick AD. Genetics of multiple sclerosis. *Lancet Neurol*. 2004;3:104-110.
5. Ebers GC, Sadovnick AD, Risch NJ. A genetic basis for familial aggregation in multiple sclerosis. Canadian Collaborative Study Group. *Nature*. 1995;377:150-151.
6. Sospedra M, Martin R. Immunology of Multiple Sclerosis. *Annu. Rev. Immunol*. 2005;23:683-747.
7. Hayes CE. Vitamin D: a natural inhibitor of multiple sclerosis. *Proc Nutr Soc*. 2000;59:531-535.
8. Pierrot-Deseilligny C, Souberbielle JC. Is hypovitaminosis D one of the environmental risk factors for multiple sclerosis? *Brain*. 2010;133:1869-1888.
9. Kurtzke JF. Epidemiology in multiple sclerosis: a pilgrim's progress. *Brain*. 2013;136:2904-2917.
10. Wandinger K, Jabs W, Siekhaus A, Bubel S, Trillenberger P, Wagner H, Wessel K, Kirchner H, Hennig H. Association between clinical disease activity and Epstein-Barr virus reactivation in MS. *Neurology*. 2000;55:178-184.
11. Wunsch M, Hohmann C, Milles B, Rostermund C, Lehmann PV, Schroeter M, Bayas A, Ulzheimer J, Maurer M, Ergun S, Kuerten S. The Correlation between the Virus- and Brain Antigen-Specific B Cell Response in the Blood of Patients with Multiple Sclerosis. *Viruses*. 2016;8:105.
12. Franciotta D, Salvetti M, Lolli F, Serafini B, Aloisi F. B cells and multiple sclerosis. *Lancet Neurol*. 2008;7:852-858.
13. Stangel M, Mäurer M. Autoimmunerkrankungen in der Neurologie - Diagnostik und Therapie. Springer-Verlag. 2012;1:2-53.
14. Gold R. Diagnose und Therapie der Multiplen Sklerose. Deutsche Gesellschaft für Neurologie - Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie. 2014:2 - 52.
15. Berlit P. Basiswissen Neurologie. Springer-Verlag. 2014;6:275-285.
16. Thompson AJ, Banwell BL, Barkhof F, Carroll WM, Coetzee T, Comi G, Correale J, Fazekas F, Filippi M, Freedman MS, Fujihara K, Galetta SL, Hartung HP, Kappos L, Lublin FD, Marrie RA, Miller AE, Miller DH, Montalban X, Mowry EM, Sorensen PS, Tintore M, Traboulsee AL, Trojano M, Uitdehaag BMJ, Vukusic S, Waubant E, Weinshenker BG, Reingold SC, Cohen JA. Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria. *Lancet Neurol*. 2018;17:162-173.
17. DGN. Diagnose und Therapie der Multiplen Sklerose. Verfügbar unter: <https://www.dgn.org/leitlinien/2333-II-31-2012-diagnose-und-therapie-der-multiplen-sklerose>. Stand: 29.07.2018.
18. Roche. Roche's OCREVUS (ocrelizumab) approved in the European Union for relapsing forms of multiple sclerosis and primary progressive multiple sclerosis. Media Release. 2018:1-7.
19. Lublin F, Miller DH, Freedman MS, Cree BA, Wolinsky JS, Weiner H, Lubetzki C, Hartung HP, Montalban X, Uitdehaag BM, Merschhemke M, Li B, Putzki N, Liu FC, Haring DA, Kappos L. Oral fingolimod in primary progressive multiple sclerosis (INFORMS): a phase 3, randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet*. 2016;387:1075-1084.
20. Kappos L, Bar-Or A, Cree BAC, Fox RJ, Giovannoni G, Gold R, Vermersch P, Arnold DL, Arnould S, Scherz T, Wolf C, Wallstrom E, Dahlke F. Siponimod versus placebo in secondary progressive multiple sclerosis (EXPAND): a double-blind, randomised, phase 3 study. *Lancet*. 2018;391:1263-1273.

21. Lehmann PV, Rottlaender A, Kuerten S. The autoimmune pathogenesis of multiple sclerosis. *Pharmazie*. 2015;70:5-11.
22. Kleinschnitz C, Meuth SG, Kieseier BC, Wiendl H. Multiple-Sklerose-Update zur Pathophysiologie und zu neuen immuntherapeutischen Ansätzen. *Nervenarzt*. 2007;78:883-911.
23. Compston A, Coles A. Multiple sclerosis. *Lancet*. 2002;359:1221-1231.
24. Magliozzi R, Howell O, Vora A, Serafini B, Nicholas R, Puopolo M, Reynolds R, Aloisi F. Meningeal B-cell follicles in secondary progressive multiple sclerosis associate with early onset of disease and severe cortical pathology. *Brain*. 2007;130:1089-1104.
25. Serafini B, Rosicarelli B, Magliozzi R, Stigliano E, Aloisi F. Detection of ectopic B-cell follicles with germinal centers in the meninges of patients with secondary progressive multiple sclerosis. *Brain Pathol*. 2004;14:164-174.
26. Magliozzi R, Howell OW, Reeves C, Roncaroli F, Nicholas R, Serafini B, Aloisi F, Reynolds R. A Gradient of neuronal loss and meningeal inflammation in multiple sclerosis. *Ann Neurol*. 2010;68:477-493.
27. Lucchinetti C, Bruck W, Parisi J, Scheithauer B, Rodriguez M, Lassmann H. Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination. *Ann Neurol*. 2000;47:707-717.
28. Wunsch M, Jabari S, Voussen B, Enders M, Srinivasan S, Cossais F, Wedel T, Boettner M, Schwarz A, Weyer L, Gocer O, Schroeter M, Maeurer M, Woenckhaus M, Pollok K, Radbruch H, Klotz L, Scholz CJ, Nickel J, Friebe A, Addicks K, Ergun S, Lehmann PV, Kuerten S. The enteric nervous system is a potential autoimmune target in multiple sclerosis. *Acta Neuropathol*. 2017;134:281-295.
29. Qin Y, Duquette P, Zhang Y, Olek M, Da RR, Richardson J, Antel JP, Talbot P, Cashman NR, Tourtellotte WW, Wekerle H, Van Den Noort S. Intrathecal B-cell clonal expansion, an early sign of humoral immunity, in the cerebrospinal fluid of patients with clinically isolated syndrome suggestive of multiple sclerosis. *Lab Invest*. 2003;83:1081-1088.
30. Stangel M, Fredrikson S, Meinl E, Petzold A, Stuve O, Tumani H. The utility of cerebrospinal fluid analysis in patients with multiple sclerosis. *Nat Rev Neurol*. 2013;9:267-276.
31. Keegan M, König F, McClelland R, Bruck W, Morales Y, Bitsch A, Panitch H, Lassmann H, Weinshenker B, Rodriguez M, Parisi J, Lucchinetti CF. Relation between humoral pathological changes in multiple sclerosis and response to therapeutic plasma exchange. *Lancet*. 2005;366:579-582.
32. Stork L, Ellenberger D, Beissbarth T, Friede T, Lucchinetti CF, Bruck W, Metz I. Differences in the Responses to Apheresis Therapy of Patients With 3 Histopathologically Classified Immunopathological Patterns of Multiple Sclerosis. *JAMA Neurol*. 2018;75:428-435.
33. Kuerten S, Pommerschein G, Barth SK, Hohmann C, Milles B, Sammer FW, Duffy CE, Wunsch M, Rovituso DM, Schroeter M, Addicks K, Kaiser CC, Lehmann PV. Identification of a B cell-dependent subpopulation of multiple sclerosis by measurements of brain-reactive B cells in the blood. *Clin Immunol*. 2014;152:20-24.
34. Hauser SL, Waubant E, Arnold DL, Vollmer T, Antel J, Fox RJ, Bar-Or A, Panzara M, Sarkar N, Agarwal S, Langer-Gould A, Smith CH. B-cell depletion with rituximab in relapsing-remitting multiple sclerosis. *N Engl J Med*. 2008;358:676-688.
35. Hauser SL, Bar-Or A, Comi G, Giovannoni G, Hartung HP, Hemmer B, Lublin F, Montalban X, Rammohan KW, Selmaj K, Traboulsee A, Wolinsky JS, Arnold DL, Klingelschmitt G, Masterman D, Fontoura P, Belachew S, Chin P, Mairon N, Garren H, Kappos L. Ocrelizumab versus Interferon Beta-1a in Relapsing Multiple Sclerosis. *N Engl J Med*. 2017;376:221-234.
36. Kappos L, Li D, Calabresi PA, O'Connor P, Bar-Or A, Barkhof F, Yin M, Leppert D, Glanzman R, Tinbergen J, Hauser SL. Ocrelizumab in relapsing-remitting multiple sclerosis: a phase 2, randomised, placebo-controlled, multicentre trial. *Lancet*. 2011;378:1779-1787.
37. Hawker K, O'Connor P, Freedman MS, Calabresi PA, Antel J, Simon J, Hauser S, Waubant E, Vollmer T, Panitch H, Zhang J, Chin P, Smith CH. Rituximab in patients with

- primary progressive multiple sclerosis: results of a randomized double-blind placebo-controlled multicenter trial. *Ann Neurol*. 2009;66:460-471.
38. Montalban X, Hauser SL, Kappos L, Arnold DL, Bar-Or A, Comi G, de Seze J, Giovannoni G, Hartung HP, Hemmer B, Lublin F, Rammohan KW, Selmaj K, Traboulsee A, Sauter A, Masterman D, Fontoura P, Belachew S, Garren H, Mairon N, Chin P, Wolinsky JS. Ocrelizumab versus Placebo in Primary Progressive Multiple Sclerosis. *N Engl J Med*. 2017;376:209-220.
 39. Meinl E, Krumbholz M, Hohlfeld R. B lineage cells in the inflammatory central nervous system environment: migration, maintenance, local antibody production, and therapeutic modulation. *Ann Neurol*. 2006;59:880-892.
 40. Fujita T, Inoue K, Yamamoto S, Ikumoto T, Sasaki S, Toyama R, Chiba K, Hoshino Y, Okumoto T. Fungal metabolites. Part 11. A potent immunosuppressive activity found in *Isaria sinclairii* metabolite. *J Antibiot (Tokyo)*. 1994;47:208-215.
 41. Adachi K, Kohara T., Nakao N., Arita M., Chiba K., Mishina T., Sasaki SaF, T. Design, synthesis, and structure-activity relationships of 2-substituted-2-amino-1,3-propanediols: discovery of a novel immunosuppressant, FTY720. *Bioorg. Med. Chem. Lett*. 1995;5:853-856.
 42. Adachi K, Chiba K. FTY720 story. Its discovery and the following accelerated development of sphingosine 1-phosphate receptor agonists as immunomodulators based on reverse pharmacology. *Perspect Medicin Chem*. 2008;1:11-23.
 43. Brinkmann V, Davis MD, Heise CE, Albert R, Cottens S, Hof R, Bruns C, Prieschl E, Baumruker T, Hiestand P, Foster CA, Zollinger M, Lynch KR. The immune modulator FTY720 targets sphingosine 1-phosphate receptors. *J Biol Chem*. 2002;277:21453-21457.
 44. Salvadori M, Budde K, Charpentier B, Klempnauer J, Nashan B, Pallardo LM, Eris J, Schena FP, Eisenberger U, Rostaing L, Hmissi A, Aradhye S. FTY720 versus MMF with cyclosporine in de novo renal transplantation: a 1-year, randomized controlled trial in Europe and Australasia. *Am J Transplant*. 2006;6:2912-2921.
 45. Tedesco-Silva H, Pescovitz MD, Cibrik D, Rees MA, Mulgaonkar S, Kahan BD, Gugliuzza KK, Rajagopalan PR, Esmeraldo Rde M, Lord H, Salvadori M, Slade JM. Randomized controlled trial of FTY720 versus MMF in de novo renal transplantation. *Transplantation*. 2006;82:1689-1697.
 46. Huwiler A, Zangemeister-Wittke U. The sphingosine 1-phosphate receptor modulator fingolimod as a therapeutic agent: Recent findings and new perspectives. *Pharmacol Ther*. 2017.
 47. Chun J, Hartung HP. Mechanism of action of oral fingolimod (FTY720) in multiple sclerosis. *Clin Neuropharmacol*. 2010;33:91-101.
 48. Cohen JA, Chun J. Mechanisms of fingolimod's efficacy and adverse effects in multiple sclerosis. *Ann Neurol*. 2011;69:759-777.
 49. Edsall LC, Spiegel S. Enzymatic measurement of sphingosine 1-phosphate. *Anal Biochem*. 1999;272:80-86.
 50. Kimura A, Ohmori T, Ohkawa R, Madoiwa S, Mimuro J, Murakami T, Kobayashi E, Hoshino Y, Yatomi Y, Sakata Y. Essential roles of sphingosine 1-phosphate/S1P1 receptor axis in the migration of neural stem cells toward a site of spinal cord injury. *Stem Cells*. 2007;25:115-124.
 51. Paugh SW, Payne SG, Barbour SE, Milstien S, Spiegel S. The immunosuppressant FTY720 is phosphorylated by sphingosine kinase type 2. *FEBS Lett*. 2003;554:189-193.
 52. Kihara Y, Mizuno H, Chun J. Lysophospholipid receptors in drug discovery. *Exp Cell Res*. 2015;333:171-177.
 53. Schwab SR, Cyster JG. Finding a way out: lymphocyte egress from lymphoid organs. *Nat Immunol*. 2007;8:1295-1301.
 54. Brinkmann V, Cyster JG, Hla T. FTY720: sphingosine 1-phosphate receptor-1 in the control of lymphocyte egress and endothelial barrier function. *Am J Transplant*. 2004;4:1019-1025.
 55. Matloubian M, Lo CG, Cinamon G, Lesneski MJ, Xu Y, Brinkmann V, Allende ML, Proia RL, Cyster JG. Lymphocyte egress from thymus and peripheral lymphoid organs is dependent on S1P receptor 1. *Nature*. 2004;427:355-360.

56. Brinkmann V. FTY720 (fingolimod) in Multiple Sclerosis: therapeutic effects in the immune and the central nervous system. *Br J Pharmacol.* 2009;158:1173-1182.
57. Colombo E, Di Dario M, Capitolo E, Chaabane L, Newcombe J, Martino G, Farina C. Fingolimod may support neuroprotection via blockade of astrocyte nitric oxide. *Ann Neurol.* 2014;76:325-337.
58. Meno-Tetang GM, Li H, Mis S, Pyszczyński N, Heining P, Lowe P, Jusko WJ. Physiologically based pharmacokinetic modeling of FTY720 (2-amino-2[2-(4-octylphenyl)ethyl]propane-1,3-diol hydrochloride) in rats after oral and intravenous doses. *Drug Metab Dispos.* 2006;34:1480-1487.
59. Billich A, Bornancin F, Devay P, Mechtcheriakova D, Urtz N, Baumruker T. Phosphorylation of the immunomodulatory drug FTY720 by sphingosine kinases. *J Biol Chem.* 2003;278:47408-47415.
60. Cipriani R, Chara JC, Rodriguez-Antiguedad A, Matute C. FTY720 attenuates excitotoxicity and neuroinflammation. *J Neuroinflammation.* 2015;12:86.
61. Miron VE, Jung CG, Kim HJ, Kennedy TE, Soliven B, Antel JP. FTY720 modulates human oligodendrocyte progenitor process extension and survival. *Ann Neurol.* 2008;63:61-71.
62. Miron VE, Ludwin SK, Darlington PJ, Jarjour AA, Soliven B, Kennedy TE, Antel JP. Fingolimod (FTY720) enhances remyelination following demyelination of organotypic cerebellar slices. *Am J Pathol.* 2010;176:2682-2694.
63. Kappos L, Radue EW, O'Connor P, Polman C, Hohlfeld R, Calabresi P, Selmaj K, Agoropoulou C, Leyk M, Zhang-Auberson L, Burtin P. A placebo-controlled trial of oral fingolimod in relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med.* 2010;362:387-401.
64. Cohen JA, Barkhof F, Comi G, Hartung HP, Khatri BO, Montalban X, Pelletier J, Capra R, Gallo P, Izquierdo G, Tiel-Wilck K, de Vera A, Jin J, Stites T, Wu S, Aradhye S, Kappos L. Oral fingolimod or intramuscular interferon for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med.* 2010;362:402-415.
65. Mehling M, Brinkmann V, Antel J, Bar-Or A, Goebels N, Vedrine C, Kristofic C, Kuhle J, Lindberg RL, Kappos L. FTY720 therapy exerts differential effects on T cell subsets in multiple sclerosis. *Neurology.* 2008;71:1261-1267.
66. Färber L, Kreiß A. Fingolimod (Gilenya®): Risiken im Zusammenhang mit den Auswirkungen auf das Immunsystem. *Rote-Hand-Brief, Novartis Pharma GmbH.* 2016:1-3.
67. Mackay IR, Anderson WH. What's in a name? Experimental encephalomyelitis: 'allergic' or 'autoimmune'. *J Neuroimmunol.* 2010;223:1-4.
68. Rivers TM, Sprunt DH, Berry GP. Observations on attempts to produce acute disseminated encephalomyelitis in monkeys. *J Exp Med.* 1933;58:39-53.
69. Rivers TM, Schwentker FF. Encephalomyelitis accompanied by myelin destruction experimentally produced in monkeys. *J Exp Med.* 1935;61:689-702.
70. Paterson PY. Immune processes and infectious factors in central nervous system disease. *Annu Rev Med.* 1969;20:75-100.
71. Mackay IR, Carnegie PR, Coates AS. Immunopathological comparisons between experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Clin Exp Immunol.* 1973;15:471-482.
72. Batoulis H, Recks MS, Addicks K, Kuerten S. Experimental autoimmune encephalomyelitis--achievements and prospective advances. *APMIS.* 2011;119:819-830.
73. Kuerten S, Angelov DN. Comparing the CNS morphology and immunobiology of different EAE models in C57BL/6 mice - a step towards understanding the complexity of multiple sclerosis. *Ann Anat.* 2008;190:1-15.
74. Hofstetter HH, Shive CL, Forsthuber TG. Pertussis toxin modulates the immune response to neuroantigens injected in incomplete Freund's adjuvant: induction of Th1 cells and experimental autoimmune encephalomyelitis in the presence of high frequencies of Th2 cells. *J Immunol.* 2002;169:117-125.
75. Kuerten S, Kostova-Bales DA, Frenzel LP, Tigno JT, Tary-Lehmann M, Angelov DN, Lehmann PV. MP4- and MOG:35-55-induced EAE in C57BL/6 mice differentially targets brain, spinal cord and cerebellum. *J Neuroimmunol.* 2007;189:31-40.

76. Kuerten S, Lichtenegger FS, Faas S, Angelov DN, Tary-Lehmann M, Lehmann PV. MBP-PLP fusion protein-induced EAE in C57BL/6 mice. *J Neuroimmunol.* 2006;177:99-111.
77. Elliott EA, McFarland HI, Nye SH, Cofield R, Wilson TM, Wilkins JA, Squinto SP, Matis LA, Mueller JP. Treatment of experimental encephalomyelitis with a novel chimeric fusion protein of myelin basic protein and proteolipid protein. *J Clin Invest.* 1996;98:1602-1612.
78. Kuerten S, Pauly R, Rottlaender A, Rodi M, Gruppe TL, Addicks K, Tary-Lehmann M, Lehmann PV. Myelin-reactive antibodies mediate the pathology of MBP-PLP fusion protein MP4-induced EAE. *Clin Immunol.* 2011;140:54-62.
79. Kuerten S, Schickel A, Kerkloh C, Recks MS, Addicks K, Ruddle NH, Lehmann PV. Tertiary lymphoid organ development coincides with determinant spreading of the myelin-specific T cell response. *Acta Neuropathol.* 2012;124:861-873.
80. Lüllmann-Rauch R. Taschenlehrbuch Histologie. Thieme-Verlag. 2009;3:287-329.
81. Aloisi F, Pujol-Borrell R. Lymphoid neogenesis in chronic inflammatory diseases. *Nat Rev Immunol.* 2006;6:205-217.
82. Duden.de. Wörterbuch: lymphoid; Wörterbuch: lymphatisch. Verfügbar unter: <https://www.duden.de/suchen/dudenonline/lymphoid>; <https://www.duden.de/suchen/dudenonline/lymphatisch>. Stand 28.01.2018.
83. Mitsdoerffer M, Peters A. Tertiary Lymphoid Organs in Central Nervous System Autoimmunity. *Front Immunol.* 2016;7:451.
84. Howell OW, Reeves CA, Nicholas R, Carassiti D, Radotra B, Gentleman SM, Serafini B, Aloisi F, Roncaroli F, Magliozzi R, Reynolds R. Meningeal inflammation is widespread and linked to cortical pathology in multiple sclerosis. *Brain.* 2011;134:2755-2771.
85. Lehmann-Horn K, Wang SZ, Sagan SA, Zamvil SS, von Budingen HC. B cell repertoire expansion occurs in meningeal ectopic lymphoid tissue. *JCI Insight.* 2016;1:e87234.
86. Serafini B, Rosicarelli B, Franciotta D, Magliozzi R, Reynolds R, Cinque P, Andreoni L, Trivedi P, Salvetti M, Faggioni A, Aloisi F. Dysregulated Epstein-Barr virus infection in the multiple sclerosis brain. *J Exp Med.* 2007;204:2899-2912.
87. Weyand CM, Kurtin PJ, Goronzy JJ. Ectopic lymphoid organogenesis: a fast track for autoimmunity. *Am J Pathol.* 2001;159:787-793.
88. Drayton DL, Liao S, Mounzer RH, Ruddle NH. Lymphoid organ development: from ontogeny to neogenesis. *Nat Immunol.* 2006;7:344-353.
89. Krams M, Frahm SO, Kellner U, Mawrin C. Kurzlehrbuch Pathologie. Thieme-Verlag. 2013;2:301.
90. Rossi S, Lo Giudice T, De Chiara V, Musella A, Studer V, Motta C, Bernardi G, Martino G, Furlan R, Martorana A, Centonze D. Oral fingolimod rescues the functional deficits of synapses in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Br J Pharmacol.* 2012;165:861-869.
91. Fujino M, Funeshima N, Kitazawa Y, Kimura H, Amemiya H, Suzuki S, Li XK. Amelioration of experimental autoimmune encephalomyelitis in Lewis rats by FTY720 treatment. *J Pharmacol Exp Ther.* 2003;305:70-77.
92. Kataoka H, Sugahara K, Shimano K, Teshima K, Koyama M, Fukunari A, Chiba K. FTY720, sphingosine 1-phosphate receptor modulator, ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis by inhibition of T cell infiltration. *Cell Mol Immunol.* 2005;2:439-448.
93. Foster CA, Howard LM, Schweitzer A, Persohn E, Hiestand PC, Balatoni B, Reuschel R, Beerli C, Schwartz M, Billich A. Brain penetration of the oral immunomodulatory drug FTY720 and its phosphorylation in the central nervous system during experimental autoimmune encephalomyelitis: consequences for mode of action in multiple sclerosis. *J Pharmacol Exp Ther.* 2007;323:469-475.
94. Envigo. C57BL/6 - Substrain Information. Technical Datasheet. 2015:1-4.
95. Janvier. C57BL/6JRj Mouse. Technical Datasheet. 2017:1.
96. Balatoni B, Storch MK, Swoboda EM, Schonborn V, Koziel A, Lambrou GN, Hiestand PC, Weissert R, Foster CA. FTY720 sustains and restores neuronal function in the DA rat model of MOG-induced experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain Res Bull.* 2007;74:307-316.
97. Kumar GL, Rudbeck L. Immunohistochemical Staining Methods. Dako Education Guide. 2009;5:1-42, 51-60, 103-122.

98. Lang G. *Histotechnik Praxislehrbuch für die Biomedizinische Analytik*. Springer. 2006:257-294.
99. Peters A, Pitcher LA, Sullivan JM, Mitsdoerffer M, Acton SE, Franz B, Wucherpfennig K, Turley S, Carroll MC, Sobel RA, Bettelli E, Kuchroo VK. Th17 cells induce ectopic lymphoid follicles in central nervous system tissue inflammation. *Immunity*. 2011;35:986-996.
100. Watanabe Y, Akaike T. Activation signal induces the expression of B cell-specific CD45R epitope (6B2) on murine T cells. *Scand J Immunol*. 1994;39:419-425.
101. Michie SA, Streeter PR, Bolt PA, Butcher EC, Picker LJ. The human peripheral lymph node vascular addressin. An inducible endothelial antigen involved in lymphocyte homing. *Am J Pathol*. 1993;143:1688-1698.
102. Berlin C, Berg EL, Briskin MJ, Andrew DP, Kilshaw PJ, Holzmann B, Weissman IL, Hamann A, Butcher EC. Alpha 4 beta 7 integrin mediates lymphocyte binding to the mucosal vascular addressin MAdCAM-1. *Cell*. 1993;74:185-195.
103. Krumbholz M, Theil D, Cepok S, Hemmer B, Kivisakk P, Ransohoff RM, Hofbauer M, Farina C, Derfuss T, Hartle C, Newcombe J, Hohlfeld R, Meinl E. Chemokines in multiple sclerosis: CXCL12 and CXCL13 up-regulation is differentially linked to CNS immune cell recruitment. *Brain*. 2006;129:200-211.
104. Magliozzi R, Columba-Cabezas S, Serafini B, Aloisi F. Intracerebral expression of CXCL13 and BAFF is accompanied by formation of lymphoid follicle-like structures in the meninges of mice with relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol*. 2004;148:11-23.
105. Dogan A, Bagdi E, Munson P, Isaacson PG. CD10 and BCL-6 expression in paraffin sections of normal lymphoid tissue and B-cell lymphomas. *Am J Surg Pathol*. 2000;24:846-852.
106. Luttmann W, Bratke K, Küpper M, Myrtek D. *Der Experimentator: Immunologie*. Springer Spektrum. 2014;4:73-101; 111-120.
107. Pai M, Zwerling A, Menzies D. Systematic review: T-cell-based assays for the diagnosis of latent tuberculosis infection: an update. *Ann Intern Med*. 2008;149:177-184.
108. BD. BD Horizon Fixable Viability Stain 450 (FVS450). Technical Datasheet. 2015.
109. Muls N, Dang HA, Sindic CJ, van Pesch V. Fingolimod increases CD39-expressing regulatory T cells in multiple sclerosis patients. *PLoS One*. 2014;9:e113025.
110. Morris MA, Gibb DR, Picard F, Brinkmann V, Straume M, Ley K. Transient T cell accumulation in lymph nodes and sustained lymphopenia in mice treated with FTY720. *Eur J Immunol*. 2005;35:3570-3580.
111. Arndt A, Hoffacker P, Zellmer K, Goecer O, Recks MS, Kuerten S. Conventional housing conditions attenuate the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *PLoS One*. 2014;9:e99794.
112. Mollison D, Sellar R, Bastin M, Mollison D, Chandran S, Wardlaw J, Connick P. The clinico-radiological paradox of cognitive function and MRI burden of white matter lesions in people with multiple sclerosis: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One*. 2017;12:e0177727.
113. Tallantyre EC, Morgan PS, Dixon JE, Al-Radaideh A, Brookes MJ, Evangelou N, Morris PG. A comparison of 3T and 7T in the detection of small parenchymal veins within MS lesions. *Invest Radiol*. 2009;44:491-494.
114. Bail K, Notz Q, Rovituso DM, Schampel A, Wunsch M, Koeniger T, Schropp V, Bharti R, Scholz CJ, Foerstner KU, Kleinschnitz C, Kuerten S. Differential effects of FTY720 on the B cell compartment in a mouse model of multiple sclerosis. *J Neuroinflammation*. 2017;14:148.
115. Pinschewer DD, Ochsenbein AF, Odermatt B, Brinkmann V, Hengartner H, Zinkernagel RM. FTY720 immunosuppression impairs effector T cell peripheral homing without affecting induction, expansion, and memory. *J Immunol*. 2000;164:5761-5770.
116. Lehmann-Horn K, Kinzel S, Weber MS. Deciphering the Role of B Cells in Multiple Sclerosis-Towards Specific Targeting of Pathogenic Function. *Int J Mol Sci*. 2017;18.
117. Sinha RK, Park C, Hwang IY, Davis MD, Kehr JH. B lymphocytes exit lymph nodes through cortical lymphatic sinusoids by a mechanism independent of sphingosine-1-phosphate-mediated chemotaxis. *Immunity*. 2009;30:434-446.

118. Nakamura M, Matsuoka T, Chihara N, Miyake S, Sato W, Araki M, Okamoto T, Lin Y, Ogawa M, Murata M, Aranami T, Yamamura T. Differential effects of fingolimod on B-cell populations in multiple sclerosis. *Mult Scler*. 2014;20:1371-1380.
119. Foster CA, Mechtcheriakova D, Storch MK, Balatoni B, Howard LM, Bornancin F, Wlachos A, Sobanov J, Kinnunen A, Baumruker T. FTY720 rescue therapy in the dark agouti rat model of experimental autoimmune encephalomyelitis: expression of central nervous system genes and reversal of blood-brain-barrier damage. *Brain Pathol*. 2009;19:254-266.
120. Nishihara H, Shimizu F, Sano Y, Takeshita Y, Maeda T, Abe M, Koga M, Kanda T. Fingolimod prevents blood-brain barrier disruption induced by the sera from patients with multiple sclerosis. *PLoS One*. 2015;10:e0121488.
121. Schuhmann MK, Bittner S, Meuth SG, Kleinschnitz C, Fluri F. Fingolimod (FTY720-P) Does Not Stabilize the Blood-Brain Barrier under Inflammatory Conditions in an in Vitro Model. *Int J Mol Sci*. 2015;16:29454-29466.
122. Grutzke B, Hucke S, Gross CC, Herold MV, Posevitz-Fejfar A, Wildemann BT, Kieseier BC, Dehmel T, Wiendl H, Klotz L. Fingolimod treatment promotes regulatory phenotype and function of B cells. *Ann Clin Transl Neurol*. 2015;2:119-130.
123. Pikor NB, Astarita JL, Summers-Deluca L, Galicia G, Qu J, Ward LA, Armstrong S, Dominguez CX, Malhotra D, Heiden B, Kay R, Castanov V, Touil H, Boon L, O'Connor P, Bar-Or A, Prat A, Ramaglia V, Ludwin S, Turley SJ, Gommerman JL. Integration of Th17- and Lymphotoxin-Derived Signals Initiates Meningeal-Resident Stromal Cell Remodeling to Propagate Neuroinflammation. *Immunity*. 2015;43:1160-1173.
124. Garris CS, Wu L, Acharya S, Arac A, Blaho VA, Huang Y, Moon BS, Axtell RC, Ho PP, Steinberg GK, Lewis DB, Sobel RA, Han DK, Steinman L, Snyder MP, Hla T, Han MH. Defective sphingosine 1-phosphate receptor 1 (S1P1) phosphorylation exacerbates TH17-mediated autoimmune neuroinflammation. *Nat Immunol*. 2013;14:1166-1172.
125. Kim MY, Kim KS, McConnell F, Lane P. Lymphoid tissue inducer cells: architects of CD4 immune responses in mice and men. *Clin Exp Immunol*. 2009;157:20-26.
126. Luo H, Broux B, Wang X, Hu Y, Ghannam S, Jin W, Larochelle C, Prat A, Wu J. EphrinB1 and EphrinB2 regulate T cell chemotaxis and migration in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Neurobiol Dis*. 2016;91:292-306.
127. von Glehn F, Farias AS, de Oliveira AC, Damasceno A, Longhini AL, Oliveira EC, Damasceno BP, Santos LM, Brandao CO. Disappearance of cerebrospinal fluid oligoclonal bands after natalizumab treatment of multiple sclerosis patients. *Mult Scler*. 2012;18:1038-1041.
128. Haas J, Schneider K, Schwarz A, Korporal-Kuhnke M, Faller S, von Glehn F, Jarius S, Wildemann B. Th17 cells: A prognostic marker for MS rebound after natalizumab cessation? *Mult Scler*. 2017;23:114-118.
129. Lucchinetti CF, Popescu BF, Bunyan RF, Moll NM, Roemer SF, Lassmann H, Bruck W, Parisi JE, Scheithauer BW, Giannini C, Weigand SD, Mandrekar J, Ransohoff RM. Inflammatory cortical demyelination in early multiple sclerosis. *N Engl J Med*. 2011;365:2188-2197.
130. Noyes K, Weinstock-Guttman B. Impact of diagnosis and early treatment on the course of multiple sclerosis. *Am J Manag Care*. 2013;19:s321-331.
131. Montalban X, Gold R, Thompson AJ, Otero-Romero S, Amato MP, Chandraratna D, Clanet M, Comi G, Derfuss T, Fazekas F, Hartung HP, Havrdova E, Hemmer B, Kappos L, Liblau R, Lubetzki C, Marcus E, Miller DH, Olsson T, Pilling S, Selmaj K, Siva A, Sorensen PS, Sormani MP, Thalheim C, Wiendl H, Zipp F.ECTRIMS/EAN guideline on the pharmacological treatment of people with multiple sclerosis. *Eur J Neurol*. 2018;25:215-237.
132. Agius M, Meng X, Chin P, Grinspan A, Hashmonay R. Fingolimod therapy in early multiple sclerosis: an efficacy analysis of the TRANSFORMS and FREEDOMS studies by time since first symptom. *CNS Neurosci Ther*. 2014;20:446-451.
133. Fernandez O, Fernandez V, Arbizu T, Izquierdo G, Bosca I, Arroyo R, Garcia Merino JA, de Ramon E. Characteristics of multiple sclerosis at onset and delay of diagnosis and treatment in Spain (the Novo Study). *J Neurol*. 2010;257:1500-1507.

9 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Struktur und Wirkmechanismus von Fingolimod.....	12
Abbildung 2: Kein Nachweis einer alkoholinduzierten Pathologie	30
Abbildung 3: Vehikel- bzw. Fingolimod-Gabe und Präparation	34
Abbildung 4: Grundlagen der DAB-basierten Färbung und Etablierungsversuche mit IF	41
Abbildung 5: Anfärbung der Marker für lymphoide Neogenese an Lymphknotengewebe.....	42
Abbildung 6: ELISPOT	50
Abbildung 7: Antikörperverhältnisse beim direkten ELISA.....	54
Abbildung 8: Grundlagen der Durchflusszytometrie.....	58
Abbildung 9: Verbesserung des klinischen EAE-Verlaufes unter Fingolimod-Behandlung.....	64
Abbildung 10: Methodische Problematik beim Lymphknotenvergleich.....	65
Abbildung 11: Ergebnisse Durchflusszytometrie.....	67
Abbildung 12: Keine Beeinträchtigung der MP4-spezifischen B-Zell-Antwort	68
Abbildung 13: Verschiedene Infiltrat-Kategorien.....	69
Abbildung 14: Deutlich verminderte Kleinhirn-Infiltration unter Fingolimod	73
Abbildung 15: Keine Bildung von B-Zell-Aggregaten unter Fingolimod	74
Abbildung 16: Korrelation nach Spearman	75
Abbildung 17: Beispielhaftes B-Zell-Aggregat mit lymphoiden Charakteristika	76
Abbildung 18: Charakterisierung der B-Zell-Aggregate	78

DANKSAGUNG

Ganz herzlich möchte ich mich bei meiner Arbeitsgruppe bedanken, die mich über die Jahre tatkräftig unterstützt und die Arbeit durch viele Ideen und Diskussionen bereichert hat. Leider können in diesem Rahmen nicht alle Mitglieder namentlich erwähnt werden, auch wenn sie maßgeblich zu einer guten Stimmung im Labor beigetragen haben. Allen voran gilt mein Dank natürlich Frau Prof. Dr. Stefanie Kürten für die außergewöhnliche persönliche Betreuung, die praktische Anleitung in experimentellen Fragen und die engagierte Leitung des Projektes. Immer ansprechbar und motivierend war sie als erfahrene Wissenschaftlerin ein Vorbild für die ganze Arbeitsgruppe. Eine weitere entscheidende Personalie war die naturwissenschaftliche Doktorandin Marie Wunsch, die mir ebenfalls mit Rat und Tat im Labor zur Seite stand und von deren Sachverstand ich oft profitieren konnte. Für die gute Zusammenarbeit möchte ich mich besonders bei Brigitte Treffny bedanken, die mich in ihrem IHC-Labor aufnahm und mir geduldig die Grundlagen der Färbungen beibrachte. Auch muss an dieser Stelle Kathrin Bail erwähnt werden, die das unmittelbare Folgeprojekt betreute und sprichwörtlich „im selben Boot“ saß. Mit der folgenden Auflistung möchte ich mich außerdem bei weiteren Institutsmitarbeitern bedanken, die mich im Rahmen verschiedener Versuche unterstützten:

Versuchstiere: Prof. Dr. Stefanie Kürten, Marie Wunsch, Dr. Andrea Schampel, Alla Ganscher

Histologie: Erna Kleinschroth, Brigitte Treffny, Elke Varin, Doris Dettelbacher-Weber

Immunoassays: Prof. Dr. Stefanie Kürten, Marie Wunsch

DFZ: Dr. Damiano M. Rovituso, Prof. Dr. Stefanie Kürten

Organisation: Roswitha Grabandt, Sabine Katzschmann, Michael Christof

Statistik: Epidemiologisches Institut der Universität Würzburg, Universitäres Zentrum für Gesundheitswissenschaften am Klinikum Augsburg

Natürlich gebührt auch Herrn Prof. Dr. Süleyman Ergün ein Dankeschön, der mir ermöglichte in seinem Institut zu promovieren, ebenso wie Herrn Prof. Dr. Andreas Friebe als Mitglied meines Betreuungskomitees, Frau Prof. Dr. Claudia Sommer für die Übernahme des Korreferats und Frau Prof. Dr. Nurcan Üçeyler für die Berichterstattung.

Der Schluss der Danksagung soll aber meiner Familie und Freundin gewidmet sein, die mir immer ein verlässlicher Rückhalt und treue Weggefährten sind.