



**Einfluss der murinen Anti-CD52-Antikörper-Therapie auf die
Neurodegeneration in der chronischen MP4-induzierten
experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis als Mausmodell der
Multiplen Sklerose**

Effect of murine anti-CD52 antibody therapy on neurodegeneration in
chronic MP4-induced experimental autoimmune encephalomyelitis as a
mouse model for multiple sclerosis

Dissertation zur Erlangung des medizinischen Doktorgrades
der Graduate School of Life Sciences,
Julius-Maximilians-Universität Würzburg,
Fachbereich Neurowissenschaften.

Vorgelegt von

Rojda Ipek

aus

Wertheim

Würzburg 2020

Eingereicht am:.....

Mitglieder des Promotionskomitees:

Vorsitzende: Prof. Dr. med. Alma Zerneck-Madsen

1. Betreuer: Prof. Dr. med. Stefanie Kürten

2. Betreuer: Prof. Dr. med. Christoph Kleinschnitz

3. Betreuer: Prof. Dr. Christian Stigloher

4. Betreuer: Prof. Dr. Philip Kollmannsberger

Tag des Promotionskolloquiums:.....

Doktorurkunden ausgehändigt am:.....

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation „Einfluss der murinen Anti-CD52-Antikörper-Therapie auf die Neurodegeneration in der chronischen MP4-induzierten experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis als Mausmodell der Multiplen Sklerose“ eigenständig, d.h. insbesondere selbstständig und ohne Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters, angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Ich erkläre außerdem, dass die Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Würzburg,

Rojda Ipek

Affidavit

I hereby confirm that my thesis entitled “Effect of murine anti-CD52 antibody therapy on neurodegeneration in chronic MP4-induced experimental autoimmune encephalomyelitis as a mouse model for multiple sclerosis” is the result of my own work. I did not receive any help or support from commercial consultants. All sources and / or materials applied are listed and specified in the thesis.

Furthermore, I confirm that this thesis has not yet been submitted as part of another examination process neither in identical nor in similar form.

Würzburg,

Rojda Ipek

Für meine Familie

2.2	EAE-Induktion und klinische Beurteilung.....	20
2.3	Behandlung der chronischen EAE und Untersuchungsdesign.....	21
2.4	Durchflusszytometrie	22
2.4.1	Probengewinnung	22
2.4.2	Färbung.....	24
2.4.3	Messung und Auswertung	24
2.5	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)</i>	27
2.5.1	MP4-spezifische Antikörper.....	27
2.5.2	Phosphoryliertes Neurofilament- <i>Heavy</i> (pNF-H)	29
2.6	Elektronenmikroskopie	32
2.6.1	Perfusion, Präparation und Einbettung.....	32
2.6.2	Herstellung von Semi- und Ultradünnschnitten	35
2.6.3	Ultrastrukturelle Auswertung	38
2.6.3.1	Myelinisierung	39
2.6.3.2	Axonschaden	41
2.7	<i>In vivo</i> kraniale Magnetresonanztomographie (MRT).....	43
2.8	Statistische Analyse	46
3	Ergebnisse	47
3.1	Unveränderte klinische Symptomatik nach der Behandlung mit dem murinen Anti-CD52-Antikörper in der chronischen Phase der EAE.....	47
3.2	Signifikante Lymphozytendepletion ohne Einfluss auf die humorale Immunantwort durch den murinen Anti-CD52-Antikörper.....	50
3.3	Unverändertes Ausmaß an freigesetzten Neurofilamenten durch den murinen Anti-CD52-Antikörper	53
3.4	Signifikante Reduktion der Axonpathologie ohne Veränderung der Myelinpathologie nach der murinen Anti-CD52-Antikörperbehandlung.....	54

3.5	Keine hirnvolumetrischen Veränderungen nach der Behandlung mit dem murinen Anti-CD52-Antikörper	58
3.6	Zusammenfassung der Ergebnisse	60
4	Diskussion.....	61
4.1	EAE-Vergleich und Einfluss auf den Krankheitsverlauf	61
4.2	Einfluss auf die Inflammation	63
4.3	Einfluss auf die Neurodegeneration	66
4.4	Einfluss auf die Neuroregeneration.....	70
4.5	Schlussfolgerung und Ausblick	73
5	Zusammenfassung	74
6	Summary	76
7	Eigenanteil und Vorabveröffentlichung der Daten	78
8	Literaturverzeichnis	79
9	Anhang.....	99
9.1	Danksagung.....	99
9.2	<i>Curriculum Vitae</i>	100

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Durchflusszytometrische Gatingstrategie.....	26
Abb. 2	Schematische Darstellung des indirekten ELISAs für MP4-spezifische Antikörper	29
Abb. 3	Schematische Darstellung des indirekten pNF-H <i>Sandwich</i> -ELISAs.....	31
Abb. 4	Methylenblaugefärbter Semidünnschnitt vom lumbalen Rückenmark.....	36
Abb. 5	Methylenblaugefärbter Semidünnschnitt vom Kleinhirn	36
Abb. 6	Darstellung der Messungen zur Bestimmung der <i>g-Ratio</i>	40
Abb. 7	Darstellung von Nervenfasern mit Axonschäden.....	42
Abb. 8	Krankheitsverlauf der MP4-immunisierten behandelten Mäuse.....	49
Abb. 9	Durchflusszytometrische Analyse der Lymphozytendepletion.....	51
Abb. 10	ELISA-basierte Bestimmung von MP4-spezifischen Antikörpern.....	52
Abb. 11	ELISA-basierte Bestimmung von freigesetzten Neurofilamenten	53
Abb. 12	Elektronenmikroskopische Analyse der Myelin- und Axonpathologie im lumbalen Rückenmark von MP4-immunisierten behandelten Mäusen	56
Abb. 13	Elektronenmikroskopische Analyse der Myelin- und Axonpathologie im Kleinhirn von MP4-immunisierten behandelten Mäusen	57
Abb. 14	MRT-basierte Analyse der Hirnatrophie von MP4-immunisierten behandelten Mäusen	59

Tabellenverzeichnis

Tab. 1	Verwendete Puffer für die Durchflusszytometrie	23
Tab. 2	Einstellung der Spannungen am FACSCanto II Zellscanner	25
Tab. 3	Verwendete Wasch- und Blocklösung für den MP4-ELISA	28
Tab. 4	Verwendete Waschlösung für den pNF-H-ELISA.....	30
Tab. 5	Verwendete Puffer und Fixiermittel für die Elektronenmikroskopie.....	34
Tab. 6	Verwendete Einbettmittel für die Elektronenmikroskopie.....	35
Tab. 7	Verwendete Kontrastmittel für die Elektronenmikroskopie	37
Tab. 8	Technische Einstellungen am MAGNETOM Magnetresonanztomographen Teil 1.....	44
Tab. 9	Technische Einstellungen am MAGNETOM Magnetresonanztomographen Teil 2.....	45
Tab. 10	Klinische Parameter der Isotyp-Kontroll- vs. Anti-mCD52-AK behandelten Mäuse	48

Abkürzungsverzeichnis

2D	Zweidimensional
°C	Grad Celsius
α	Signifikanzniveau
λ	Wellenlänge
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
A	<i>Area, Anterior</i> (Vorderer)
Abb.	Abbildung
ADCC	<i>Antibody-Dependent Cell-Mediated Cytotoxicity</i> (Antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität)
ANOVA	<i>Analysis of Variance</i> (Varianzanalyse)
Anti-mCD52-AK	Muriner Anti-CD52-spezifischer IgG2a-Isotypantikörper
APC	Allophycocyanin
APZ	Antigenpräsentierende Zelle
B6	C57BL/6
BHS	Bluthirnschranke
c	<i>Cranial</i> (Kraniell)
C	Coronal (Frontal)
$\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_8$	Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)
Campath-1H	<i>Cambridge, Pathology, Human 1</i>
CCTB	<i>Center for Computational and Theoretical Biology</i>
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
CDC	<i>Complement-Dependent Cytolysis</i> (Komplementabhängige Zytolyse)
CFA	<i>Complete Freund's Adjuvant</i> (Komplettes Freund-Adjuvans)
CIS	<i>Clinically Isolated Syndrome</i> (Klinisch isoliertes Syndrom)
CNS	<i>Central Nervous System</i>
CO_2	Kohlenstoffdioxid
Cy	Cyanin
DDSA	Dodecylbernsteinsäureanhydrid
DGN	Deutsche Gesellschaft für Neurologie

DMP	2,4,6-Tris(dimethylamniomethyl)phenol
DMT	<i>Disease Modifying Therapy</i> (Verlaufsmodifizierende Therapie)
EAE	Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis
EBV	Epstein-Barr-Virus
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
F	<i>Feet</i>
FACS	<i>Fluorescence-Activated Cell Sorting</i>
FLAIR	<i>Fluid Attenuated Inversion Recovery</i>
FSC	<i>Forward Scatter</i> (Vorwärtsstreulicht)
FVS	<i>Fixable Viability Stain</i>
g	Gramm, Erdbeschleunigung
GA	Glutaraldehyd
h	Stunde
H	<i>Heavy, Height, Head</i>
HS	Hinterstrang
IFA	<i>Incomplete Freund's Adjuvant</i> (Inkomplettes Freund-Adjuvans)
IFN-β	Interferon-β
Ig	Immunglobulin
Isotyp-Kontroll-AK	Muriner unspezifischer IgG2a-Isotyp-Kontroll-Antikörper
ITP	Idiopathische thrombozytopenische Purpura
i. v.	intravenös
Kat-Nr.	Katalognummer
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
KH	Kleinhirn
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
KKNMS	Krankheitsbezogenes Kompetenznetz Multiple Sklerose
K. O.	<i>Knock-Out</i>
kV	Kilovolt
L	<i>Light, Läsion, Left</i>

Verzeichnisse

LINGO-1	<i>Leucine rich repeat and Immunoglobulin-like domain-containing protein 1</i>
M	<i>Medium, Molar, Mark</i>
MAdCAM-1	<i>Mucosal Addressin Cell Adhesion Molecule-1</i>
MBP	Myelin-Basisches-Protein
mg	Milligramm
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i> (Haupthistokompatibilitätskomplex)
min	Minute
MIP	<i>Maximum Intensity Projection</i>
MIPAV	<i>Medical Image Processing, Analysis and Visualization</i>
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mm ²	Quadratmillimeter
mm ³	Kubikmillimeter
MNA	Methyl Nadic Anhydrid
MOG	Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein
MOG ₃₅₋₅₅	MOG Peptid 35-55
MP4	MBP-PLP-Fusionsprotein
MR	Magnetresonanz
MRT	Magnetresonanztomograph, Magnetresonanztomographie
ms	Millisekunde
MS	Multiple Sklerose
MSC	<i>Mesenchymal Stem Cell</i> (Mesenchymale Stammzelle)
MTC	<i>Magnetization Transfer Contrast</i>
MW	Mittelwert
n	Anzahl
N	Normal
NaCl	Natriumchlorid
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NaH ₂ PO ₄	Natriumdihydrogenphosphat
ng	Nanogramm
NH ₄ Cl	Ammoniumchlorid

nm	Nanometer
NNND	<i>Nearest Neighbour Neurofilament Distance</i>
NO	Stickstoffmonoxid
OD	Optische Dichte
OKB	Oligoklonale Banden
OPC	<i>Oligodendrocyte Precursor Cell</i> (Oligodendrozyten-Vorläuferzelle)
OsO ₄	Osmiumtetroxid
p	<i>Petite</i> (Klein), <i>Phosphorylated</i> (Phosphoryliert), <i>Probability Value</i> (Signifikanzwert)
P	<i>Posterior</i> (Hinterer)
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i> (Phosphatgepufferte Salzlösung)
PerCP	Peridinin-Chlorophyll-Protein
PFA	Paraformaldehyd
PLP	Proteolipidprotein
PLP ₁₃₉₋₁₅₁	PLP Peptid 139-151
pNF-H	<i>Phosphorylated Neurofilament-Heavy</i>
pNPP	<i>para</i> -Nitrophenylphosphat
PPMS	<i>Primary Progressive Multiple Sclerosis</i> (Primär progrediente Multiple Sklerose)
R	Rinde, <i>Right</i>
RBC	<i>Red Blood Cell</i>
RM	Rückenmark
rMOG ₁₋₁₂₁	Rekombinantes MOG Peptid 1-121
RRMS	<i>Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis</i> (Schubförmig-remittierende Multiple Sklerose)
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
S	Sagittal
S1P	Sphingosin-1-Phosphat
SEM	<i>Standard Error of the Mean</i> (Standardfehler des Mittelwerts)
SPMS	<i>Secondary Progressive Multiple Sclerosis</i> (Sekundär progrediente Multiple Sklerose)
SSC	<i>Side Scatter</i> (Seitwärtsstreulicht)

Verzeichnisse

Std-Abw.	Standardabweichung
t	Zeitpunkt
T	Tesla, Transversal
T1	Längsrelaxationszeit
T2	Querrelaxationszeit
Tab.	Tabelle
TBS	<i>Tris-buffered saline</i> (Tris-gepufferte Salzlösung)
TD	<i>Trigger Delay</i>
TE	<i>Time to Echo</i>
T _H 1	Typ1-T-Helferzelle
T _H 17	Typ17-T-Helferzelle
TimCT	<i>Total imaging matrix Continuous Table</i>
TLO	Tertiär lymphatisches Organ
TMEV	<i>Theiler's Murine Encephalomyelitis Virus</i> (Theiler-Maus-Enzephalomyelitis-Virus)
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
TR	<i>Time to Repetition</i>
Treg	Regulatorische T-Zelle
V	Volt
VCAM-1	<i>Vascular Cell Adhesion Molecule-1</i>
VLA-4	<i>Very Late Antigen-4</i>
VSS	Vorderseitenstrang
W	<i>Width</i>
ZNS	Zentrales Nervensystem

1 Einleitung

1.1 Multiple Sklerose (MS)

Die Multiple Sklerose ist eine chronisch-entzündliche Autoimmunerkrankung des zentralen Nervensystems (ZNS), die sich meist im jungen Erwachsenenalter manifestiert und die häufigste Ursache frühzeitiger Behinderung junger Erwachsener darstellt [1-3]. Sie ist gekennzeichnet durch Inflammation, Demyelinisierung und Axonschädigung, was zu multiplen anfangs reversiblen im weiteren Verlauf irreversiblen neurologischen Defiziten führt [2, 4]. Diese reichen von motorischen und sensorischen bis hin zu kognitiven und psychischen Störungen [5]. Derzeit gelingt es, mit verlaufsmodifizierenden Therapeutika die Immunantwort abzuschwächen und die Krankheitsaktivität zu verringern. Die Krankheitsprogression kann zwar dadurch verlangsamt werden, eine Heilung der MS ist jedoch bislang nicht möglich [3]. Da nicht bekannt ist, ob die neuen Therapieoptionen darüber hinaus einen anhaltenden Schutz vor der langfristigen Neurodegeneration bieten, sind Forschungsanstrengungen und -schwerpunkte erforderlich, um die zugrunde liegenden Patho- und Effektormechanismen, welche nicht vollständig geklärt sind, besser verstehen und in Zukunft alle Aspekte der Krankheit behandeln zu können.

1.1.1 Epidemiologie und Ätiologie

Der durchschnittliche Erkrankungsbeginn der MS liegt zwischen dem zweiten und vierten Lebensjahrzehnt, wobei Frauen 2-3 Mal häufiger betroffen sind als Männer [3]. Die genaue Ursache für den erhöhten Frauenanteil ist nicht bekannt. Vermutlich beeinflussen Geschlechtshormone die Immunantwort und damit die differenzielle Suszeptibilität für MS. Erhöhte Östrogen- und niedrige Progesteronwerte korrelieren entsprechend mit einer erhöhten im Magnetresonanztomographen (MRT) messbaren Krankheitsaktivität, was durch eine reduzierte Schubrate während der Schwangerschaft mit anschließend erhöhter Rückfallrate und Verschlechterung der MS während der Menstruation bestätigt wird [5]. Die Inzidenz der MS liegt bei 6–8 Fällen/100.000 Einwohnern pro Jahr in Europa [6], wobei die Zahl der Betroffenen in Deutschland auf 200.000 geschätzt wird [7]. Hohe Prävalenzen zeigen sich insbesondere in den gemäßigten Breiten der nördlichen und

südlichen Hemisphäre, wie in Nordamerika, Kanada, im nördlichen Europa und in südlichen Teilen von Australien und Neuseeland [1].

Die Ursache der MS ist bisher weitgehend unbekannt. Es wird angenommen, dass ein komplexes Zusammenspiel von genetischer Prädisposition, spezifischer Erregerexposition sowie Umweltfaktoren für den Beginn und das Voranschreiten der Erkrankung verantwortlich ist [1]. So wurde bei MS-Patienten festgestellt, dass mehrere Gene auf Chromosom 6p21, welche Informationen zum Haupthistokompatibilitätskomplex (*Major Histocompatibility Complex* = MHC) liefern, verändert sind [5]. Zudem wurden Polymorphismen auf weiteren Allelen wie den T-Zell-Rezeptor-Genen identifiziert [5] sowie ein erhöhtes Erkrankungsrisiko für Familienmitglieder von Betroffenen festgestellt: Verwandte 1. Grades von MS-Patienten haben ein Risiko von 2 % (Kinder) bis 5 % (Geschwister), während das Erkrankungsrisiko der Allgemeinbevölkerung bei 0,3 % liegt [1]. Ferner wird ein Zusammenhang zwischen einer EBV (Epstein-Barr-Virus)-Infektion und MS beschrieben, da MS-Patienten in mehreren Studien seropositiv für EBV sind und EBV-Reaktivierungen wie die infektiöse Mononukleose mit der Krankheitsaktivität zu korrelieren scheinen. Weitere Faktoren, die in Studien wiederholt mit einem erhöhten MS-Risiko assoziiert waren, sind Zigarettenrauchen, eine verminderte Sonnenlichtexposition und damit auch ein verringerter Vitamin-D-Spiegel. Letzterer wird als mögliche Ursache für die erhöhte Inzidenz in den gemäßigten Zonen diskutiert [1, 5]. Neben der multifaktoriellen Ätiologie weist die Erkrankung eine große klinische und pathologische Heterogenität auf und wird in verschiedene Verlaufsformen bzw. Phänotypen unterteilt.

1.1.2 Verlaufsformen

Bei der MS unterscheidet man folgende Verlaufsformen: Die schubförmig-remittierende MS (*Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis* = RRMS), an der mit 85-90 % ein Großteil der Patienten leidet [5, 8]. Sie ist gekennzeichnet durch das Auftreten neurologischer Defizite im Rahmen von Schüben, die sich meist über mehrere Tage entwickeln und nach einer Plateauphase innerhalb von Wochen vollständig oder unvollständig zurückbilden, wobei in den Intervallen zwischen den Schüben keine Behinderungszunahme zu verzeichnen ist [9]. Nach dem initial schubförmigen Verlauf gehen nach einer

durchschnittlichen Krankheitsdauer von 20-25 Jahren etwa 60-70 % der RRMS-Patienten in die sekundär progrediente Verlaufsform (*Secondary Progressive Multiple Sclerosis* = SPMS) über [8], die durch eine progrediente Behinderungszunahme mit oder ohne aufgesetzten Schüben, geringfügigen Remissionen oder Plateaus charakterisiert ist [9]. Bei 10-15 % der MS-Patienten nimmt die Erkrankung einen primär progredienten Verlauf (*Primary Progressive Multiple Sclerosis* = PPMS) mit progressiver Zunahme der neurologischen Defizite von Krankheitsbeginn an, wobei Plateauphasen oder Phasen leichter Besserung möglich sind [5, 8].

Dieses Klassifikationsschema wurde um das Kriterium der klinischen und kernspintomographischen Aktivität bei jeder der Verlaufsformen ergänzt und um das klinisch isolierte Syndrom (*Clinically Isolated Syndrome* = CIS) erweitert. Das CIS wird als mögliche Erstmanifestation einer MS gewertet, die sich häufig als Sensibilitäts-, Seh- oder Gangstörungen äußert, bei der die Diagnosekriterien der MS jedoch noch nicht erfüllt sind [10]. Eine spezifischere Beschreibung des Krankheitsverlaufs ist damit möglich und die Anerkennung des CIS für die frühe Therapie und Prognose der MS von Bedeutung.

1.1.3 Pathogenese

An der Entstehung der multifokalen ZNS-Läsionen insbesondere in der weißen, aber auch in der grauen Substanz mit Prädilektionsstellen im juxtakortikalen und periventrikulären Marklager, Kleinhirn und Rückenmark, die klinisch variable Ausfallerscheinungen zur Folge haben, sind drei wesentliche Prozesse beteiligt: Inflammation (entzündliche Schädigung), Demyelinisierung (Schädigung und Verlust der neuronalen Myelinscheiden) sowie Axondegeneration (Schädigung und Verlust von Axonen) [4].

Die Immunpathogenese ist allerdings bis heute nicht vollständig geklärt. Durch ein bisher noch nicht genau verstandenes Ereignis kommt es zur Bildung von autoreaktiven CD4⁺ T- Zellen (*Cluster of Differentiation* = CD), sogenannte T-Helfer-Zellen vom T_H1- oder T_H17-Typ, und CD8⁺ T-Zellen in der Peripherie, die gegen ZNS-Antigene gerichtet sind [5, 11, 12]. ZNS-Antigene, die als körperfremd erkannt werden, sind u. a. das Myelin-Basische-Protein (MBP), das Proteolipidprotein (PLP) oder das Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein (MOG) [5, 13]. Als Hypothesen für den initialen Auslöser werden u. a. eine Kreuzreaktion zwischen körpereigenen und -fremden

(z. B. viralen) Proteinen (*Molekulare Mimikry*), die vermehrte Synthese von prozessierten Autoantigenen, sog. Neo-Epitopen, infolge einer Infektion mit Erweiterung des Spektrums erkannter Autoantigene (*Epitope Spreading*) und die Aktivierung unbeteiligter autoreaktiver T-Zellen im Rahmen eines unspezifischen Entzündungsprozesses (*Bystander Activation*) diskutiert [5, 12, 14]. Die Selektion autoreaktiver T-Zellen durch regulatorische T-Zellen (Tregs) ist dabei gestört, sodass es zur Aufhebung der immunologischen Toleranz kommen kann [12]. Während unter physiologischen Bedingungen die Bluthirnschranke (BHS) den Übertritt von Zellen aus dem zirkulierenden Blut ins ZNS verhindert, wird die BHS bei MS-Patienten durchlässig, sodass eine Transmigration der autoreaktiven T-Zellen und Infiltration des ZNS stattfinden kann [12, 14]. Im ZNS werden die CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen durch antigenpräsentierende Zellen (APZ) wie Mikrogliazellen reaktiviert und setzen proinflammatorische Zytokine frei. Dies führt entweder direkt oder durch Rekrutierung weiterer Entzündungszellen wie Makrophagen, CD8⁺ T-Zellen und B-Zellen aus dem peripheren Blut zur Schädigung der Myelinscheide, der Oligodendrozyten selbst und auch der Axone [5, 14]. Dabei scheinen folgende Mechanismen im Vordergrund zu stehen, die interindividuell unterschiedlich zur Pathogenese beitragen [15]:

- Zytotoxische T-Zell- und Makrophagen-vermittelte Myelinschäden (Pattern I-Läsion) [4, 14, 15].
- Autoantikörper- und Komplement-vermittelte Schädigung der Myelinscheide (Pattern II-Läsion) [4, 14, 15].
- Primäre Schädigung von Oligodendrozyten durch Apoptose (Pattern III-Läsion) [4, 15].
- Schädigung der Myelinscheide und Axone durch lösliche Substanzen, die im Rahmen der Entzündung freigesetzt werden, z. B. Zytokine, Sauerstoffradikale wie Stickstoffmonoxid (NO), und Glutamat. Die erhöhte Ausschüttung des exzitatorischen Neurotransmitters Glutamat führt hierbei zur Umverteilung von Ionenkanälen mit Erhöhung der intrazellulären Natriumionen- und/oder Kalziumionenkonzentration. Der gestörte zelluläre Metabolismus triggert Apoptose und Nekrose [16].

In Zusammenschau führen diese Prozesse zur Demyelinisierung der Neurone mit unzureichender Remyelinisierung durch verbliebene Oligodendrozyten [5, 14],

Axontransektionen mit angeschwollenen Axonenden [5] und axonaler Degeneration [4]. Im Verlauf der Krankheit kommt es zu der namensgebenden gliösen Vernarbung durch Astrozyten, welche Charcot als *sclérose en plaques* beschrieb, sowie zur progredienten Atrophie von Gehirn und Rückenmark [4].

Entgegen der lange gültigen Annahme, dass die Autoimmunpathologie hauptsächlich T-Zell-vermittelt ist, zeigen jüngste klinische und experimentelle Studien eine erhebliche Interaktion zwischen T- und B-Zellen und eine wichtige Rolle der B-Zellen bei der Aufrechterhaltung der Erkrankung [17-19]. Neben den bereits erwähnten Antikörper- und Komplement-vermittelten Läsionen kann bei MS-Patienten im Liquor eine erhöhte intrathekale Synthese von IgG (Immunglobulin G) in Form von oligoklonalen Banden (OKB), die sich auf eine klonale Expansion der B-Zellen zurückführen lassen [20], nachgewiesen werden [5]. Die Bedeutung der B-Zellen für die MS wird darüber hinaus durch den klinischen Erfolg einer B-Zell-depletierenden Antikörperbehandlung [21, 22] und Plasmapherese bei Kortikosteroid-resistenten RRMS-Patienten [23] unterstrichen. Auch das traditionelle Paradigma einer inflammations-induzierten Neurodegeneration steht in Frage, da histopathologische Studien und neue kernspintomographische Untersuchungsverfahren darauf hindeuten, dass bereits in sehr frühen Phasen der MS neben den entzündlichen Veränderungen axonale Schäden und Hirnatrophie nachweisbar sind [16]. Eine Schädigung der Axone sowie eine Volumenminderung der Hirnsubstanz scheinen somit bereits in frühen Krankheitsstadien aufzutreten, sodass insbesondere Studien zur Neurodegeneration für die Entwicklung therapeutischer Strategien erforderlich sind.

1.1.4 Diagnose

Für die Diagnose einer MS sind weder bestimmte klinische Charakteristika noch einzelne diagnostische Tests allein ausreichend. Neben der neurologischen Untersuchung, kommen daher Labor-, Liquor-, elektrophysiologische Untersuchungen sowie die Magnetresonanz(MR)-Bildgebung zum Einsatz. Während labormedizinische Untersuchungen dem Ausschluss von Differentialdiagnosen (z. B. Borreliose) dienen, können in der Liquordiagnostik eine lymphozytäre Pleozytose und OKBs sowie bei den verschiedenen evozierten Potentialen Latenzverzögerungen nachgewiesen werden [3, 24]. Eine wesentliche Bedeutung für die Diagnosestellung und Verlaufskontrolle kommt

der kraniellen und spinalen Magnetresonanztomographie (MRT) zu, bei der die zuletzt 2017 revidierten McDonald-Kriterien zum Nachweis einer *räumlichen* und *zeitlichen* Dissemination angewandt werden: Der Nachweis von *Läsionen in mindestens zwei von fünf MS-typischen Regionen* (periventrikulär, kortikal, juxtakortikal, infratentoriell und spinal) und einer *neuen Läsion im Verlaufs-MRT oder von kontrastmittelaufnehmenden und nicht-aufnehmenden Läsionen beim ersten klinischen Symptom* sichert dabei unter Berücksichtigung spezifischer MRT-Kriterien die Diagnose [25]. Etablierte MRT-Sequenzen sind dabei T1-gewichtete Sequenzen (T1 = Längsrelaxationszeit) mit oder ohne Kontrastmittel (Gadolinium) und T2-gewichtete Sequenzen (T2 = Querrelaxationszeit) zur Unterscheidung von alten und neuen Läsionen sowie die FLAIR (*Fluid Attenuated Inversion Recovery*)-Sequenz mit einem Wassersignal unterdrückenden zusätzlichen Impuls zur Darstellung ventrikelnaher Läsionen [26]. Die MRT sollte nach aktuellen Konsensusempfehlungen bei einer Feldstärke von mind. 1,5 Tesla (T), wenn möglich 3 T, mit einer Schichtdicke von 3 mm durchgeführt werden [27]. Im Rahmen der Revision der McDonald-Kriterien ist ferner die sofortige MS-Diagnose und damit frühzeitige Therapie beim CIS möglich, sofern eine typische Symptomatik vorliegt sowie eine örtliche Dissemination und liquorspezifische OKBs nachgewiesen werden können [25]. Studien belegen, dass bei Patienten mit CIS die Konversionsrate zu einer klinisch gesicherten MS im Verlauf zwischen 60 – 70 % beträgt, wobei ein abnormer MRT- und positiver Liquorbefund starke Prädiktoren für eine spätere Konversion sind [28, 29].

1.1.5 Therapeutische Strategien

Die Behandlung der MS umfasst drei Therapiesäulen: Schubtherapie, symptomatische Therapie und verlaufsmodifizierende Immuntherapie [3]. Sie basieren auf den Empfehlungen des Krankheitsbezogenen Kompetenznetzes Multiple Sklerose (KKNMS) [30] sowie auf der in Revision befindlichen Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Neurologie (DGN) aus dem Jahr 2014 [24], mit deren Aktualisierung noch in diesem Jahr zu rechnen ist [31].

Zur Therapie des akuten Schubs werden in erster Linie Glukokortikoide (Methylprednisolon) hochdosiert appliziert, in zweiter Linie erfolgt bei therapierefraktärer Schubsymptomatik eine Plasmaseparation (Plasmapherese oder

Immunadsorption) [24, 30]. Glukokortikoide hemmen multiple Entzündungsmediatoren, die zelluläre und humorale Immunantwort, führen zur Restauration der BHS und inhibieren damit die Migration von Immunzellen [24]. Die symptomatische Therapie MS-assoziiierter Beschwerden beinhaltet Physio-, Ergo-, Psycho- und die antispastische Therapie, um die funktionellen Fähigkeiten der Patienten wiederherstellen zu können [24]. In den vergangenen Jahren hat insbesondere die verlaufsmodifizierende Stufentherapie aufgrund der zunehmenden Zahl hochwirksamer Immuntherapeutika einen deutlichen Wandel erfahren. Mit Immunmodulatoren wie Interferon- β (IFN- β) oder Glatirameracetat wird das CIS therapiert [24, 30]. Sie hemmen die T-Zell-Aktivierung, führen zu einem Shift der T-Helferzellen (Th1/Th2) und induzieren neurotrophische Faktoren [32]. Zur Therapie von milden bzw. moderaten Verläufen der RRMS sind neben IFN- β und Glatirameracetat die Immunmodulatoren Dimethylfumarat und Teriflunomid zugelassen [24, 30]. Bei (hoch-)aktiven Verläufen einer RRMS werden hingegen das Immunsuppressivum Cladribin, der Sphingosin-1-Phosphat-(S1P)-Rezeptor Agonist Fingolimod oder der gegen das *Very Late Antigen* (VLA) 4 gerichtete rekombinante humanisierte monoklonale Antikörper Natalizumab eingesetzt [30]. Während Cladribin zu einer selektiven Reduktion von sich teilenden und nicht teilenden T- und B-Zellen führt [33], verhindert Fingolimod den Egress von T- und B-Zellen aus den sekundär lymphatischen Organen [34] und Natalizumab die Migration von Immunzellen durch die BHS [35]. Seit 2018 ist auch der rekombinante humanisierte monoklonale Antikörper Ocrelizumab, der gegen CD20 auf B-Zellen gerichtet ist, für die Therapie der (hoch-)aktiven RRMS zugelassen. Mit Ocrelizumab ist ferner erstmalig die medikamentöse Behandlung der PPMS möglich [36]. Bei therapierefraktärer (hoch-)aktiver RRMS oder rascher RRMS-Progression werden das Immunsuppressivum Mitoxantron oder der rekombinante Anti-CD52-Antikörper Alemtuzumab eingesetzt [30], dessen Wirkung in der vorliegenden Arbeit anhand eines murinen Anti-CD52-Antikörpers untersucht wurde. Die SPMS hingegen wurde bislang entweder mit IFN- β oder Mitoxantron behandelt [24, 30]. Seit Januar 2020 ist allerdings auch Siponimod, das wie Fingolimod zur Gruppe der S1P-Systemmodulatoren gehört, in der Europäischen Union zugelassen, sodass für die aktuell schwer behandelbare SPMS eine neue Therapieoption zu Verfügung steht [37]. Daneben ist seit Mai 2020 mit Ozanimod ein weiterer S1P-Rezeptor Agonist zur Erstlinientherapie der aktiven RRMS zugelassen [38].

1.1.5.1 Die Rolle von Alemtuzumab in der Therapie der hochaktiven schubförmig-remittierenden MS

Alemtuzumab ist der erste humanisierte monoklonale Antikörper, der hergestellt und vor Einführung von internationalen Freinamen als Campath-1H (*Cambridge, Pathology, Human*) bezeichnet wurde [39]. Alemtuzumab ist gegen das Glycoprotein CD52 gerichtet, das mit bisher noch ungeklärter Funktion unterschiedlich stark auf Immunzellen exprimiert wird [40], die durch Alemtuzumab Komplement- und/oder Antikörper-vermittelt depletiert werden [41]. Zellen des erworbenen Immunsystems wie T- und B-Zellen weisen eine hohe CD52-Expression auf und werden damit in erster Linie depletiert, während Zellen des angeborenen Immunsystems, wie natürliche Killerzellen und Monozyten, geringe Mengen CD52 exprimieren und weniger stark depletiert werden. Plasmazellen und hämatopoetische Stammzellen exprimieren kein CD52, sodass sie von der Depletion nicht betroffen sind [40]. Dies ermöglicht hämatopoetischen Vorläuferzellen die Repopulation nach der Behandlung. Während B-Zellen relativ schnell repopulieren und ihren Ausgangswert vorübergehend überschreiten [42, 43], benötigen CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen länger, wobei innerhalb der CD4⁺ T-Zellpopulation regulatorische T-Zellen rascher rekonstituiert werden als Effektor-T-Helfer-Zellen [44-46]. Diese Repopulationskinetik wird als „Resetting und Reprogrammierung des Immunsystems“ interpretiert und scheint einen langanhaltenden Effekt nach der Behandlung zu induzieren [47].

Alemtuzumab war ursprünglich zur Behandlung der chronisch lymphatischen Leukämie zugelassen. Erste Studien während der 1990er Jahren zeigten jedoch auch eine deutliche Wirksamkeit auf die im MRT gemessene Entzündungsaktivität und jährliche Schubrate bei RRMS- und SPMS-Patienten. Allerdings kam es nur bei den RRMS-Patienten, die eine hohe Entzündungsaktivität zeigten, zu einer klinischen Verbesserung, während die Behinderung und ZNS-Atrophie bei den SPMS-Patienten zunahm, sodass man ein günstiges Wirkungsprofil in frühen und aktiven Phasen der Erkrankung durch den Schutz vor Inflammation und die Prävention von Demyelinisierung und axonaler Degeneration annahm [48]. Es folgte eine randomisierte Vergleichsstudie (CAMMS-223 Phase-II-Studie) zwischen Alemtuzumab und IFN- β in der Behandlung der frühen aktiven RRMS, die eine hohe Wirksamkeit des Antikörpers im Vergleich zu IFN- β hinsichtlich Schubratenreduktion und Verringerung der Behinderungsprogression zeigte [49].

Anschließend wurden zwei jeweils über zwei Jahre laufende komplementäre Phase-III-Studien durchgeführt, die die Überlegenheit von Alemtuzumab gegenüber IFN- β bestätigten: Die CARE-MS-1-Studie an therapienaiven RRMS-Patienten [50] und die CARE-MS-2-Studie an RRMS-Patienten mit unzureichendem Ansprechen auf eine vorangegangene immunmodulierende Therapie [51]. Beide Studien zeigten eine signifikante Schubratenreduktion durch Alemtuzumab (54,9 % bei CARE-MS-1, 49,4 % bei CARE-MS-2). Bei CARE-MS-1 betrug der Anteil schubfreier Patienten 78 % unter Alemtuzumab verglichen mit 59 % unter IFN- β , bei CARE-MS-2 65 % unter Alemtuzumab gegenüber 47 % unter IFN- β [50, 51]. Außerdem wurde in CARE-MS-2 eine signifikante Reduktion der Behinderungsprogression unter Alemtuzumab festgestellt [51]. Dies war in CARE-MS-1 nicht der Fall, vermutlich aufgrund der in der Kontrollgruppe unerwartet niedrigen Behinderungsprogression [50].

Diese Studiendaten führten 2013 zur Zulassung von Alemtuzumab unter dem neuen Handelsnamen Lemtrada zur Therapie der RRMS, die durch klinischen Befund oder Bildgebung als aktiv definiert ist. Die Gabe des Antikörpers erfolgt in zwei Zyklen im Abstand von zwölf Monaten: Im 1. Jahr werden 12 mg/Tag Alemtuzumab an fünf aufeinanderfolgenden Tagen, im 2. Jahr an drei aufeinanderfolgenden Tagen i. v. verabreicht [3]. Die vormals breite Indikation von Alemtuzumab wurde jedoch 2019 aufgrund nicht unerheblicher, in Einzelfällen tödlicher Nebenwirkungen eingeschränkt [52]. Zum Nebenwirkungsspektrum gehören Infektionen wie Infekte der Harnwege und oberen Atemwege sowie virale Infektionen mit Herpes-Reaktivierungen und die Entwicklung sekundärer Autoimmunerkrankungen wie eine autoimmune Thyreoditis, autoimmune Glomerulonephritis sowie eine chronische Immunthrombozytopenie (Idiopathische thrombozytopenische Purpura = ITP) [53]. Warum es unter Alemtuzumab zu Autoimmunerkrankungen kommt, ist nicht gänzlich geklärt. Unter den Patienten, die eine Autoimmunität entwickelten, wurde eine reduzierte Neubildung von T-Zellen im Thymus festgestellt. Man nimmt an, dass bei ihnen die Repopulation der T-Zellen nach der Depletion über die homöostatische Proliferation von noch vorhandenen T-Zellen erfolgte. Da für diesen Prozess der Kontakt zu Antigenen erforderlich ist, kann es zur Selektion autoreaktiver T-Zellen kommen, wenn diese auf passende Autoantigene treffen [54]. Ferner wurde ein zeitlicher Zusammenhang mit kardiovaskulären Ereignissen beobachtet und ein kausaler Zusammenhang mit Autoimmunhepatitis, Hämophilie A und

hämophagozytischer Lymphohistiozytose identifiziert [52]. Laut aktuellem Rote-Hand-Brief vom Januar 2020 kann Alemtuzumab jedoch unter folgenden Voraussetzungen und risikominimierenden Maßnahmen bei hochaktiver RRMS weiterhin eingesetzt werden: Kein Ansprechen von mind. einer krankheitsmodifizierenden Therapie oder rasche Progression, definiert durch mind. zwei Schübe innerhalb eines Jahres mit Behinderungsprogression und mind. eine Gadolinium-aufnehmende Läsion im cMRT (*c = cranial*) oder signifikante Zunahme von T2-Läsionen im cMRT. Gegenanzeigen (aktive schwere Infektion, anamnestisch Myokardinfarkt/Schlaganfall, Koagulopathie) sind zu beachten und Vorsichtsmaßnahmen (Möglichkeit intensivmedizinischer Behandlung, Überwachung auf Autoimmunkrankheiten im Verlauf) zu ergreifen [55]. Demgegenüber liegen zur Nachhaltigkeit der Therapie mittlerweile Fünf-Jahres-Daten aus der CARE-MS-1- und CARE-MS-2-Studie vor, aus denen folgende Langzeitwirkungen von Alemtuzumab hervorgehen: Ca. 50-70 % der Patienten zeigten keine neue Krankheitsaktivität, keine aktiven MRT-Läsionen und benötigten keinen dritten Behandlungszyklus. Außerdem wurde eine Reduktion der jährlichen Hirnvolumenminderung beschrieben [56, 57]. Ferner ergab eine *post-hoc* Subgruppenanalyse der CAMMS223-Studie, dass unter den Patienten, die weder kurz vor der Behandlung eine klinische Aktivität noch im Verlauf eine klinische und radiologische Krankheitsaktivität zeigten, eine Reduktion der Beeinträchtigung sowie erhöhte Mengen neurotropher Faktoren festgestellt werden konnten [58]. Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass dieser Effekt nicht allein durch die antiinflammatorische Wirkung von Alemtuzumab infolge der Lymphozytendepletion zu erklären ist, sondern nach Rekonstitution eine „neuroprotektive Immunität“ erzielt wird [58], die die Reparatur bestehender Hirnschäden ermöglicht bzw. fördert.

1.2 Tiermodelle der MS

Auch wenn bildgebende Verfahren longitudinale Studien zur Entstehung von ZNS-Läsionen erlauben, sind parallele Untersuchungen an ZNS-Gewebe in Hinblick auf die zugrunde liegenden Pathomechanismen kaum möglich, zumal die Immunprozesse bereits angelaufen sind. Für ein tiefergehendes Verständnis der MS-Pathologie und die Etablierung neuer Therapieoptionen ist die Forschung daher auf Tiermodelle angewiesen. Drei wesentliche Tiermodelle der MS sind dabei das Cuprizon-Modell, die Infektion mit

dem Theiler-Maus-Enzephalomyelitis-Virus (TMEV) sowie die experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis (EAE).

Beim Cuprizon-Modell wird das Toxin Cuprizon über die Nahrung verabreicht, was zu einem vollständigen Verlust des Myelins mit nachfolgender Neubildung führt [59]. Da allerdings die autoimmun-inflammatorische Komponente fehlt, eignet sich dieses Modell eher zur Untersuchung der Vorgänge bei der De- und Remyelinisierung [60]. Auch wenn die genauen Mechanismen der Cuprizon-Intoxikation nicht vollständig geklärt sind, wird angenommen, dass Cuprizon als Kupferchelator die Enzyme der Atmungskette inhibiert, die Kupfer als Cofaktor benötigen. Dies führt zu oxidativem Stress und in Folge dessen zur Apoptose von Oligodendrozyten und Aktivierung von Mikrogliazellen. Vier bis fünf Wochen nach Cuprizon-Applikation sind die Neurone vollständig demyelinisiert [60]. Wird die Cuprizon-Ernährung auf normale umgestellt, beginnt die Remyelinisierung [59, 60].

Das Theiler-Modell wird induziert durch die Infektion des ZNS mit dem TMEV via Inokulation und führt zu einer diphasischen Autoimmunreaktion im ZNS [61]. Während der akuten Phase der Erkrankung kommt es zur Apoptose der Nervenfasern in der grauen Substanz, wohingegen die chronische Phase durch eine inflammatorische Demyelinisierung und axonale Degeneration in der weißen Substanz gekennzeichnet ist [62]. Die TMEV-Infektion dient damit der Untersuchung der möglichen, aber nicht einwandfrei belegten, Virusätiologie der MS.

1.2.1 Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis (EAE)

Das am häufigsten verwendete und intensiv untersuchte Tiermodell der MS ist die EAE, seit deren Einführung sich viele Erkenntnisse zur Immunpathogenese und Therapie der MS ergeben haben [63-65]. Im Gegensatz zu den anderen Modellen ist die EAE vielseitig anwendbar und autoimmunvermittelt. Die EAE wird u. a. durch aktive Immunisierung von Tieren mit ZNS-Antigenen und durch Adjuvantien verstärkt induziert [66], was ursprünglich auf erste Entwicklungen einer Tollwutimpfung durch Pasteur im Jahr 1885 zurückzuführen ist. Sein Versuch, die Patienten mit dem Tollwutvakzin, welches Rückenmark infizierter Kaninchen enthielt, zu immunisieren, führte unbeabsichtigt zu Lähmungen. In den 1930er Jahren gelang es Rivers, aus diesen Beobachtungen bei Kaninchen und Rhesusaffen durch Injektion von ZNS-Emulsionen von nicht-infizierten

Kaninchen eine Enzephalomyelitis hervorzurufen, die von Inflammation und Demyelinisierung gekennzeichnet war und bei der ZNS-spezifische Antikörper nachgewiesen werden konnten. Durch die Ähnlichkeit zu demyelinisierenden Erkrankungen des Menschen wird die EAE seitdem als Tiermodell der MS verwendet [64]. Das „A“ im Akronym stand zunächst für „allergisch“, da man von externen Agentien als Auslöser der Immunantwort ausging. Erst im weiteren Verlauf mit Anerkennung von autoimmunen Prozessen setzte sich der Begriff der experimentellen „autoimmunen“ Enzephalomyelitis durch [67]. Die EAE kann bei vielen Tierarten angewandt werden, wird heutzutage jedoch mehrheitlich an verschiedenen Mausstämmen durchgeführt [63].

1.2.1.1 Induktion

Die EAE kann auf verschiedene Weisen induziert werden: spontan, passiv mittels adoptivem T-Zell-Transfer oder durch aktive Immunisierung. Bei den spontanen Modellen entwickeln transgene Mäuse aufgrund Myelin-spezifischer T-Zell-Rezeptoren eine spontan auftretende EAE. Allerdings wird im Gegensatz zur Situation beim Menschen nicht die gesamte Immunbiologie abgebildet, da die transgenen Mäuse lediglich die entsprechenden T-Zellen exprimieren [65]. Bei der passiven EAE werden aus immunisierten Tieren autoreaktive Myelin-spezifische T-Zellen isoliert, die in naive Tiere transferiert werden. Sie bietet die Möglichkeit, mittels Markierung den Ort und die Aktivität Myelin-spezifischer T-Zellen in den Empfängertieren zu bestimmen oder durch vorherige Manipulation der Effektorfunktion den pathologischen Einfluss einzelner T-Zelllinien zu untersuchen [68]. Für die aktive Immunisierung (aktive EAE) werden verschiedene Myelin-Peptide und Myelin-Proteine als ZNS-(Auto-)Antigene verwendet, die in komplettem Freund-Adjuvans (*Complete Freund's Adjuvans* = CFA) emulgiert werden, um die Immunantwort gegen die Myelinscheide und die Antikörperproduktion zu verstärken. CFA besteht aus Paraffinöl, Mannid-Monooleat sowie inaktiviertem *Mycobacterium tuberculosis*, das zu einer proinflammatorischen Immunantwort führt [63]. Die zusätzliche Verabreichung von Pertussis-Toxin fördert die EAE-Induktion durch stimulierende Effekte auf das Immunsystem und verursacht eine vermehrte Durchlässigkeit der BHS [69]. Klinisch ist die EAE durch eine aufsteigende Paralyse gekennzeichnet, die im Schwanz beginnt, sich dann über die Hinterläufe bis zu den

Vorderläufen ausbreitet und dabei anhand von standardisierten EAE-Scores (0 - 5) erfasst wird [66].

Auch wenn die EAE ein unverzichtbares Mittel in der Grundlagenforschung ist, deckt sie aufgrund der Komplexität und interindividuellen Heterogenität der MS nicht die gesamte pathophysiologische Entität der MS ab [65].

1.2.1.2 Phänotypen

Je nach Spezies, Tierstamm, ZNS-Antigen und Wahl der EAE-Induktion resultiert ein unterschiedlicher Verlauf der Enzephalomyelitis, der die MS-Pathologie in Teilaspekten widerspiegeln kann. Die dabei am meisten untersuchten Myelinantigene sind PLP, MOG und MBP [63, 65]. Die PLP-induzierte aktive EAE verursacht in C57BL/6-Mäusen einen chronischen Verlauf, während sie in SJL/J-Mäusen schubförmig verläuft. Die aktive Immunisierung mit MOG nimmt in Lewis N1-Ratten und C57BL/6-Mäusen einen chronischen Verlauf [65], wohingegen die passiv induzierte EAE mit MOG-spezifischen T-Zellen einen monophasischen Verlauf nimmt [63]. Der akute monophasische Krankheitsverlauf ist durch eine kurze Episode mit nachfolgender Remission charakterisiert, der auch durch MBP in B10.PL- und PL/J-Mäusen ausgelöst werden kann [65]. Je nach EAE-Modell unterscheidet sich die Läsionstopologie (Großhirn vs. Rückenmark vs. Kleinhirn), die Histopathologie (Inflammation, Demyelinisierung und axonale Schädigung) der ZNS-Läsionen sowie die Immunbiologie (T-Zell- vs. B-Zell-vermittelt) [70, 71]. Um die Komplexität der MS-Pathophysiologie entsprechend darstellen und verbesserte therapeutische Strategien entwickeln zu können, ist eine große Auswahl und Kombination verschiedener EAE-Modelle erforderlich [72]. Da die klassischen EAE-Modelle hauptsächlich T-Zell-abhängig sind und die Beteiligung von B-Zellen nicht adäquat abbilden, führten Kuerten *et al.* 2006 ein neues EAE-Modell ein: die MP4-induzierte aktive EAE in C57BL/6 (*Black 6*, B6) -Mäusen [72], die in dieser Arbeit verwendet wurde.

1.2.1.3 MP4-Modell

MP4 ist ein Fusionsprotein, das aus Bestandteilen der beiden häufigsten Proteine der Myelinscheide, MBP und PLP, besteht und ursprünglich zur Entwicklung einer Antigen-spezifischen Immuntherapie der MS mit dem Ziel der Induktion einer Immuntoleranz

generiert wurde [73]. So konnte die systemische Behandlung mit MP4 bei immunisierten SJL/J-Mäusen die Entwicklung einer EAE verhindern und die Symptome einer bestehenden EAE verbessern. Die Immunisierung von gesunden SJL/J-Mäusen mit MP4 in CFA löste wiederum eine schwere EAE aus [73].

Mit dieser Kenntnis gelang es Kuerten *et al.*, durch aktive Immunisierung mit MP4 auch in B6-Stämmen eine EAE zu induzieren. Da auf B6-genetischem Hintergrund die meisten genmodifizierten *Knock-Out*- (K. O.) und *Knock-In*-Mäuse generiert werden, war es nun möglich, mithilfe des neuen EAE-Modells neben den Pathomechanismen die Immunpathogenese der MS und damit die noch nicht vollständig geklärte Rolle der B-Zellen näher zu untersuchen [70-72]: Die MP4-Immunisierung von B6-Stämmen löste in Wildtyp- und verzögert in CD8-K.O.-Mäusen eine schwere chronisch verlaufende EAE aus, während B-Zell-defiziente μ MT Mäuse eine milde EAE und CD4-K.O.-Mäuse keine EAE entwickelten [72]. Im weiteren Verlauf konnte bei einem anderen B-Zell-defizienten Mausstamm (J_HT) durch MP4 ebenfalls keine EAE induziert werden. Nachdem jedoch MBP/PLP-spezifische Autoantikörper aus MP4-immunisierten Wildtyp-Mäusen isoliert und in MP4-immunisierte B-Zell-defiziente μ MT und J_HT Mäuse transferiert wurden, konnte wieder eine schwere EAE ausgelöst werden [74]. Somit kann die MP4-induzierte EAE als ein T- und B-Zell-abhängiges sowie Antikörpervermitteltes Modell gesehen werden [65, 74].

Die ZNS-Histopathologie der MP4-EAE ist charakterisiert durch Inflammation, Demyelinisierung und Axondegeneration: Die inflammatorischen perivaskulär gelegenen Infiltrate setzen sich im Verlauf der Krankheit aus unterschiedlichen Zellen zusammen. Während in der akuten EAE (Zeitraum bis zum Erreichen des höchsten EAE-Scores) überwiegend CD4⁺ T-Zellen, Makrophagen und Granulozyten vorliegen, können in der chronischen EAE (ab Erreichen des höchsten EAE-Scores auf einem stabilen Plateau) vermehrt CD8⁺ T-Zellen, B-Zellen und dendritische Zellen sowie eine Formation der B-Zellen zu Lymphfollikel-ähnlichen Gebilden, sog. tertiär lymphatischen Organen (TLOs), nachgewiesen werden [19, 70, 75]. Die Infiltrate befinden sich in der akuten EAE im Großhirn (v. a. in den Meningen und periventriculär) und im weiteren Verlauf auch im Rückenmark. Erst im chronischen Stadium wird auch das Kleinhirn zunehmend befallen, während die cerebrale Infiltration mit der Zeit abnimmt [19, 70]. Die Demyelinisierung erfolgt im Vergleich zu anderen EAE-Modellen früher und persistiert

bis ins chronische Stadium [71, 76]. Das Ausmaß an Axonschäden verhält sich ähnlich zu anderen EAE-Modellen und findet sich sowohl in der akuten als auch in der chronischen EAE. Da mit zunehmenden Axonschäden die Krankheit voranschreitet, könnte der Axonschaden als morphologisches Korrelat für die chronische Beeinträchtigung der Mäuse gesehen werden [76].

In Zusammenschau spiegelt dieses Modell viele Eigenschaften der humanen MS wider und ist damit besonders geeignet für experimentelle Studien zur Untersuchung neuer Therapeutika (z. B. Alemtuzumab), die Einfluss auf die B-Zell-Antwort nehmen.

1.3 Merkmale der Neurodegeneration

Die irreversiblen neurologischen Defizite von MS-Patienten korrelieren mit dem Ausmaß der Neurodegeneration, die von Demyelinisierung, Axonschäden und einer globalen ZNS-Atrophie gekennzeichnet ist [16]. Um diese Prozesse und die therapeutische Wirksamkeit neuer Substanzen dahingehend besser zu verstehen und die MS in Zukunft effektiv zu behandeln, können zur Untersuchung von Myelin- und Axonpathologien spezifische ultrastrukturelle Merkmale, Biomarker im Serum und Liquor sowie zum Monitoring von Hirnatrophien bildgebende Verfahren hinzugezogen werden.

1.3.1 Myelinpathologie

Die Myelinscheide ist eine multilamelläre lipidreiche Membran, welche im ZNS von Oligodendrozyten gebildet wird und die Axone spiralförmig umgibt, um in Form der saltatorischen Erregungsweiterleitung eine schnelle Weiterleitung elektrischer Signale zu ermöglichen [77]. Wird die Myelinscheide im Rahmen einer Autoimmunreaktion attackiert, lösen sich zunächst die einzelnen Myelinlamellen voneinander und werden im weiteren Verlauf bis zum vollständigen Verlust der Myelinscheide abgebaut [78]. Die Demyelinisierung führt in Folge dessen zur Verlangsamung oder Blockade der Nervenleitung und ist vermutlich für die frühen Symptome der MS verantwortlich [16]. Bereits wenige Tage nach Entmarkung finden sich allerdings auch regenerative Prozesse im Sinne einer Remyelinisierung [79]. Die Remyelinisierung ist zwar im Initialstadium stark ausgeprägt, verläuft jedoch aufgrund der andauernden Schädigung der Oligodendrozyten unvollständig und nimmt in späteren Stadien der Läsionsbildung ab

[80]. Es resultieren remyelinisierte Neurone, die durch eine dünne Myelinscheide aus dicht aneinander liegenden Myelinlamellen gekennzeichnet sind [79].

Um den Grad der Myelinisierung ultrastrukturell objektiv erfassen zu können, wird die *g-Ratio* nach Guy *et al.* angewandt. Hierfür wird der kleinste Axondurchmesser durch den kleinsten Gesamtdurchmesser der Nervenfasern (Myelin und Axon) geteilt [81]. Die *g-Ratio* kann Werte zwischen 0 und 1 annehmen, wobei der physiologische Wert dem Mittelwert aus gemessenen Werten von gesunden Kontrolltieren entspricht. Dieser physiologisch „optimale“ Wert liegt im ZNS von Ratten nach Berechnungen von Chomiak *et al.* bei 0,77 [82]. Ein Wert von 1 spiegelt hingegen eine vollständig demyelinisierte Nervenfasern wider (Gesamtdurchmesser der Nervenfasern entspricht Axondurchmesser), wohingegen Werte unterhalb des berechneten physiologischen Wertes demyelinisierende Nervenfasern (verbreiterte Myelinscheide), Werte oberhalb des berechneten physiologischen Wertes remyelinisierende Nervenfasern (dünne Myelinscheide) darstellen.

1.3.2 Axonpathologie

Neben dem Myelinisierungsgrad bestimmt auch der Durchmesser des Axons die Reizleitungsgeschwindigkeit: Je größer der Axondurchmesser, desto schneller wird der elektrische Impuls weitergeleitet. Die Größe des axonalen Durchmessers hängt wiederum von der Anzahl an Neurofilamenten ab, die je nach Phosphorylierungsstatus innerhalb des Axons unterschiedlich verteilt werden [83, 84]. Eine kompakte Axondichte gilt hierbei als Indikator für eine beginnende Axonpathologie [84]. Lunn *et al.* untersuchten ultrastrukturell den Abstand benachbarter Neurofilamente, die sog. *nearest neighbour neurofilament distance* (NNND), und konnten insbesondere in demyelinisierten und demyelinisierenden Axonen eine Verringerung des Abstands und damit eine pathologische NNND nachweisen [83].

Ein weiteres morphologisches Korrelat einer Axonschädigung ist die Demyelinisierungsassoziierte bzw. isolierte Axondegeneration mit vollständigem Abbau des Axonkörpers (Axolyse) und Verlust von Axonen im weiteren Verlauf (*axonal loss*) [4, 5]. Es kommt zu einem vollständigen Funktionsausfall und dem Absterben der Nervenfasern. Da Neurone im ZNS nicht oder nur schwer regenerieren, ist die Axondegeneration für die irreversiblen neurologischen Defizite verantwortlich [2].

1.3.3 Biomarker

Während der Stellenwert von Antikörpern gegen z. B. MOG und MBP als Diagnose- oder Prognosemarker aufgrund diskrepanter Publikationen unklar ist [85, 86], wird der Nachweis von Neurofilamenten im Liquor und Serum als Marker für einen akuten Axonschaden diskutiert und mit einer Progression der Hirnatrophie und Behinderung assoziiert [87, 88].

Neurofilamente (NF) bestimmen maßgeblich die Struktur und Funktion von Axonen und sind aus drei verschiedenen Untereinheiten aufgebaut, die entsprechend ihres Molekulargewichts bezeichnet werden: NF-L (*Light*: 68 kDa), NF-M (*Medium*: 150 kDa) und NF-H (*Heavy*: 190-210 kDa) [89]. Sie sind zu etwa 80 % phosphoryliert (p) und werden durch *Cross-Linking* in das Axonskelett integriert [89]. Zwei der Neurofilament-Untereinheiten werden im Rahmen von neurodegenerativen Prozessen freigesetzt und können zur Bestimmung der Axondegeneration mittels ELISA (*Enzyme-linked Immunosorbent Assay*) sowohl im Serum als auch im Liquor nachgewiesen werden: NF-L [88] und NF-H [87]. Das NF-L Protein ist die am häufigsten vorkommende und kleinste Untereinheit [89]. Es eignet sich somit gut als Surrogatmarker, der in mehreren klinischen Studien zur MS mit der Krankheitsaktivität korrelierte und einer jüngsten klinischen Studie bei RRMS-Patienten zufolge als Biomarker mit prognostischem Potenzial zur Verlaufs- und Therapiekontrolle eingesetzt werden könnte [88]. NF-L ist jedoch gegenüber Proteasen empfindlich, die im Liquor reichlich vorhanden sind [89]. Der Stellenwert von NF-H, welches das am stärksten phosphorylierte Protein im menschlichen Gehirn und in seiner phosphorylierten Form (pNF-H) gegenüber Proteasen resistent ist, wird daher ebenfalls untersucht [89]. So scheint pNF-H sowohl in experimentellen als auch in klinischen Untersuchungen ebenfalls ein geeigneter Biomarker für einen akuten und chronischen Axonschaden zu sein [87, 90, 91]. Der Einsatz von Biomarkern in der klinischen Routine ist allerdings noch nicht etabliert [92]. Die Quantifizierung von freigesetzten Neurofilamenten könnte hingegen Aufschluss über die Dynamik von Axonschäden geben und damit zu einem besseren Verständnis für neurodegenerative Erkrankungen beitragen.

1.3.4 ZNS-Atrophie

Die ZNS-Atrophie ist ein entscheidender Prädiktor für die Entwicklung einer langanhaltenden Zustandsverschlechterung und ist bereits in frühen Krankheitsstadien nachweisbar [16]. Sie macht sich durch eine Atrophie des Rückenmarks, eine Vergrößerung der Ventrikel sowie eine je nach MS-Form jährliche Hirnatrophie um 0,6 – 1 % bemerkbar [93]. Die globale Hirnatrophie scheint dabei mit physischen Einschränkungen eher zu korrelieren als die Läsionslast und könnte die paradoxe Klinik der MS erklären, bei der die Patienten im MRT Läsionen, jedoch keine Beeinträchtigung aufweisen, oder die Krankheit voranschreitet, ohne dass neue Läsionen nachgewiesen werden können (*clinical-radiological paradox*) [94, 95]. Ferner steht die Atrophie der grauen Substanz, der Lobär- und Subkortikalregionen in moderatem Zusammenhang mit neuropsychologischen und kognitiven Defiziten, welche die Lebensqualität von MS-Patienten wesentlich reduzieren [94]. Auch die Atrophie des Rückenmarks wird mit physischen Einschränkungen assoziiert [94]. Sie scheint allerdings unabhängig von der Hirnatrophie voranzuschreiten und lässt sich aufgrund des kleinen Durchmessers im MRT nur schwer erfassen [94, 96].

Somit ist die Bestimmung der Hirnatrophie im MRT wichtig für die Beurteilung des Krankheitsverlaufs und könnte als Surrogatmarker für eine erfolgreiche Therapie herangezogen werden.

1.4 Zielsetzung und Fragestellung der Studie

Trotz intensiver MS-Forschung ist bislang nicht genau geklärt, ob bzw. inwiefern die verlaufsmodifizierenden Therapiemöglichkeiten einer Neurodegeneration vorbeugen oder regenerative Prozesse verstärken können. In dieser Studie galt es, die in mehreren Publikationen angedeutete neuroprotektive Wirkung von Alemtuzumab (s. u.) genauer zu eruieren. Denn auch wenn der therapeutische Stellenwert von Alemtuzumab in der Behandlung der hochaktiven RRMS stets neu evaluiert wird, sind weitere Studien erforderlich, um festzustellen, ob der Antikörper bei progredienter MS gleichermaßen effektiv ist oder ob bestimmte Patienten-Subgruppen von einer individualisierten Behandlung profitieren.

Folgende tierexperimentelle Arbeiten anderer Forschungsgruppen waren für ein tiefergehendes Verständnis der Wirkmechanismen von Alemtuzumab vorangegangen:

Ein humaner CD52 transgener Mausstamm wurde generiert [97], bei dem die CD52-Expression auf Leukozyten und die Depletionskapazität von Alemtuzumab vergleichbar zum Menschen ist [98]. Zur Vereinfachung von Studien an EAE-Modellen wurde in Folge dessen ein muriner Anti-CD52-Antikörper etabliert [99]. Die Behandlung mit dem murinen Anti-CD52-Antikörper wurde im MOG₃₅₋₅₅- [99-101] und rMOG₁₋₁₂₁-induzierten EAE-Modell in B6-Mäusen sowie im PLP₁₃₉₋₁₅₁-induzierten EAE-Modell in SJL-Mäusen untersucht [99]: Bei all diesen Modellen wurden die immunisierten Mäuse im frühen Krankheitsstadium an fünf aufeinanderfolgenden Tagen mit dem Antikörper behandelt, was zu einer ähnlichen B- und T-Zell-Depletion wie bei mit Alemtuzumab behandelten MS-Patienten führte. Die durch den murinen Anti-CD52-Antikörper vermittelte Lymphozytendepletion milderte dabei signifikant den klinischen Verlauf der EAE, verminderte die periphere Produktion proinflammatorischer Zytokine und reduzierte die Inflammation, die Demyelinisierung sowie den Axonschaden im ZNS.

Allerdings wurden diese Studien an T-Zell-vermittelten EAE-Modellen durchgeführt, sodass die zunehmend an Bedeutung gewinnende B-Zell- und Antikörper-Abhängigkeit der MS unberücksichtigt blieb. Darüber hinaus wurde der Antikörper gleich zu Beginn der EAE-Symptomatik ohne Erreichen des höchsten EAE-Scores verabreicht, sodass nicht geklärt ist, ob die murine Anti-CD52-Antikörperbehandlung bei einer schweren chronischen EAE genauso effektiv und neuroprotektiv wirkt.

Daher wurde in dieser Arbeit der Einfluss der murinen Anti-CD52-Antikörper-Therapie auf die Neurodegeneration in der chronischen MP4-induzierten EAE als T-Zell-, B-Zell- sowie Antikörper-vermitteltes Mausmodell der MS untersucht, mit dem Ziel, folgende Fragen zu klären: Hat die murine Anti-CD52-Antikörperbehandlung auch im chronischen Krankheitsstadium einen günstigen Effekt auf den klinischen Verlauf und die Schwere der EAE? Kann durch die Behandlung eine Reduktion der Neurodegeneration mithilfe eines Biomarkers nachgewiesen werden? Wie wirkt sich der murine Anti-CD52-Antikörper auf die De- und Remyelinisierung, den Axonschaden und die Hirnatrophie aus? Darüber hinaus ist es zur Kontrolle einer erfolgreichen Therapie wichtig, festzustellen, in welchem Ausmaß B- und T-Zellen im MP4-Modell durch den murinen Anti-CD52-Antikörper depletiert werden. Inwiefern die Behandlung dabei Einfluss auf die gegen das immunisierende Myelinisationsprotein gerichtete Antikörperantwort hat, wurde ebenfalls untersucht.

2 Material und Methoden

2.1 Mäuse

N = 28 sechs Wochen alte weibliche B6-Mäuse wurden von der Firma Envigo (NM Horst, Niederlande) bezogen und unter spezifisch pathogenfreien Bedingungen in der tierexperimentellen Einrichtung der Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Plastische Gesichtschirurgie der Universität Würzburg gehalten. Die Mäuse hatten freien Zugang zu autoklavierten Futterpellets (C 1000 Kontrolldiät für Ratten/Mäuse; Altromin Spezialfutter, Lage, Deutschland) und autoklaviertem Wasser. Für die Mäuse mit paralytischen Symptomen (EAE-Score $\geq 2,5$) wurden die Futterpellets mit Wasser aufgeweicht und auf Bodenhöhe angeboten, um eine ausreichende Versorgung der Tiere zu gewährleisten. Die Raumtemperatur wurde zwischen 20-22 °C bei einer Luftfeuchte von 65 % und einem Beleuchtungsprogramm mit 12-stündigem Hell-Dunkel-Rhythmus gehalten. Alle Tierversuche wurden mit Genehmigung der Tierschutzbehörde der Regierung von Unterfranken (Deutschland) (Bestätigungs-Nr. 55.2-2531.01-91/14) und dem deutschen Tierschutzgesetz entsprechend durchgeführt.

2.2 EAE-Induktion und klinische Beurteilung

Die aktive Immunisierung der Mäuse wurde nach dem MP4-EAE-Modell von Kuerten *et al.* durchgeführt [72]: Zunächst wurde inkomplettes Freund-Adjuvans (IFA) durch Mischen von Paraffinöl (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA; Kat-Nr. #18512) und Mannid-Monooleat (Sigma-Aldrich; Kat-Nr. #M8819) im Verhältnis von 9:1 hergestellt. Um komplettes Freund-Adjuvans (CFA) zu erhalten, wurde IFA mit 5mg/ml *Mycobacterium tuberculosis* H37 Ra (Difco Laboratories, Franklin Lakes, New Jersey, USA; Kat-Nr. #231141) versetzt. Anschließend wurden je 200 µg MP4 (Alexion Pharmaceuticals, Cheshire, Connecticut, USA) in 200 µl CFA $n = 20$ Mäusen im Alter von etwa acht Wochen (54 Tage) subkutan in die Flanken injiziert. Jeder Maus wurde zusätzlich intraperitoneal 200 ng Pertussis-Toxin (List Biological Laboratories, Hornby, Ontario, Kanada; Kat-Nr. #181) in 500 µl steriler phosphatgepufferter Salzlösung (*phosphate-buffered saline* = PBS) (Dulbecco's PBS; Sigma-Aldrich) am Tag der Immunisierung sowie 48 h danach appliziert. $N = 8$ Mäuse wurden nicht immunisiert, sondern der unbehandelten (gesunden) Kohorte zugeordnet.

Die immunisierten Mäuse wurden täglich, bis zum Tag ihrer Präparation, nach folgendem standardisierten EAE-Scoring-System beurteilt, um den Beginn und Verlauf der EAE zu erfassen: (0) ohne pathologischen Befund, (1) Schwanzparese, (2) Schwäche der Hinterläufe, (3) Parese der Hinterläufe (Paraparese), (4) Tetraplegie, (5) Tod. Eine Steigerung des Wertes um 0,5 wurde gewählt, wenn sich die Mäuse in Zwischenstadien befanden. Mit dieser Score-Einteilung werden somit motorische, allerdings keine sensorischen Defizite und Verhaltensauffälligkeiten erfasst.

2.3 Behandlung der chronischen EAE und Untersuchungsdesign

Je $n = 10$ Mäusen wurden etwa 60 (49-60) Tage nach Erkrankungsbeginn („chronische EAE“) entweder 200 μg (10 mg/kg KG) monoklonaler muriner Anti-CD52-spezifischer IgG2a-Isotypantikörper (Anti-mCD52-AK) (Sanofi Genzyme, Cambridge, Massachusetts, USA) oder monoklonaler muriner unspezifischer IgG2a-Isotyp-Kontroll-Antikörper (Isotyp-Kontroll-AK) (InVivo, Henningdorf, Deutschland) in sterilem PBS (Dulbecco's PBS; Sigma-Aldrich) an fünf aufeinanderfolgenden Tagen intraperitoneal injiziert. Die Dosiswahl basiert auf Erfahrungen aus bereits publizierten Studien, in denen bei einer Behandlung mit 10 mg/kg KG Anti-mCD52-AK eine vergleichbare Lymphozytendepletion und Repopulationskinetik wie in mit Alemtuzumab behandelten MS-Patienten und transgenen Mäusen, die humanes CD52 exprimieren, beobachtet werden konnte [97-99]. Der Behandlungszeitpunkt wurde deshalb so gewählt, da etwa 60 Tage nach Beginn der MP4-induzierten EAE-Symptomatik der klinische Score, welcher maßgeblich von der Rückenmarkspathologie bestimmt wird [19, 70], ein stabiles Plateau erreicht hatte, und das Kleinhirn vermutlich maximal infiltriert war (erste Kleinhirninfiltrate 25 Tage nach Immunisierung [70]), sodass eine chronische ZNS-Schädigung anzunehmen war [75].

Vor Behandlungsbeginn wurde zur Randomisierung der Studie jede immunisierte Maus entsprechend ihrer klinischen Symptomatik alternierend einer der beiden Behandlungsgruppen zugeordnet, sodass sich in beiden Kohorten der durchschnittliche EAE-Score nicht signifikant unterschied.

Die immunisierten Mäuse wurden nach der Behandlung täglich für mind. zehn (10-11) weitere Tage nach dem EAE-Scoring-System in Hinblick auf eine klinische Veränderung beurteilt. Anschließend wurde die Lymphozytendepletion durchflusszytometrisch

ermittelt sowie mittels ELISA Myelin-reaktive Antikörper gemessen und freigesetzte Neurofilamente im Serum als Biomarker für eine Axondegeneration quantitativ bestimmt. Außerdem wurde das Rückenmark und Kleinhirn elektronenmikroskopisch auf neurodegenerative und -regenerative Prozesse untersucht sowie vor und zehn Tage nach der Behandlung *in vivo* cMRT-Aufnahmen zur Bestimmung des Hirnvolumens generiert.

2.4 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie wurde einen Tag vor der Tötung der Mäuse durchgeführt. Hierfür wurden den immunisierten Mäusen ca. zehn (10-11) Tage nach der fünftägigen Behandlung mit Anti-mCD52-AK oder Isotyp-Kontroll-AK Blutproben aus der Schwanzvene entnommen und via *Fluorescence-Activated Cell Sorting* (FACS) auf eine B- und T-Zell-Depletion untersucht.

2.4.1 Probengewinnung

Die Mäuse wurden in einem *Retainer* (Eigenbau, Institut für Anatomie und Zellbiologie, Würzburg, Deutschland) fixiert und der Schwanz mit einer Infrarotlampe (Sanitas SIL 06; Hans Dinslage, Uttenweiler, Deutschland) angewärmt. Die vasodilierte Schwanzvene wurde mit einer Rasierklinge (Apollo Herkenrath, Solingen, Deutschland) angeschnitten und das austretende Vollblut (fünf Tropfen, ca. 150 μ l) mit einem 2 ml Röhrchen (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland), das mit 40 μ l Heparin (Liquemin N 25000; Roche, Basel, Schweiz) befüllt war, aufgefangen. Alle nachfolgenden Schritte wurden bei 4 °C durchgeführt und die Proben während der Inkubationszeiten auf Eis (Eismaschine AF 100; Scotsman, Ipswich, Großbritannien) gelegt: Die Blutprobe wurde anschließend mit kaltem 0,01 M PBS zu einem Gesamtvolumen von 1 ml aufgefüllt, suspendiert und für 5 min gekühlt zentrifugiert (500 x g; 4 °C; Microcentrifuge 5415C; Eppendorf, Hamburg, Deutschland). Der Überstand wurde entfernt und das Sediment mit kaltem PBS auf 1 ml aufgefüllt, resuspendiert und in ein 15 ml Röhrchen (Greiner Bio One International, Kremsmünster, Österreich) überführt. Der Zellsuspension wurde 3 ml kalter RBC (*Red Blood Cell*) -Lysepuffer (= Erylysatpuffer) hinzugegeben, die Lösung durch 1-2 x Schwenken durchmischt und für 10 min auf Eis inkubiert. Durch Zugabe von 10 ml PBS wurde die Reaktion gestoppt. Die verbliebenen Leukozyten wurden durch erneutes Zentrifugieren (5 min; 500 x g; 4 °C; Allegra X-30R;

Beckmann Coulter, Brea, Kalifornien, USA) und Abpipettieren des Überstandes gewonnen. Das Leukozytensediment wurde anschließend mit PBS auf 0,4 ml aufgefüllt und resuspendiert. Pro Maus wurden davon je 0,2 µl für die weitere Färbung und je 0,2 µl für die Negativkontrolle auf eine Zellkulturplatte (Greiner Bio-One International) überführt. Die Negativkontrollen wurden in den nachfolgenden Schritten nur mit Trägermedium, jedoch nicht mit Farbstoffen versetzt. Die Zusammensetzung und die Bezugsquellen der für die Durchflusszytometrie verwendeten Puffer sind in Tab. 1 gelistet.

Tab. 1 Verwendete Puffer für die Durchflusszytometrie

Lösung	Zusammensetzung	Herkunft
0,01 M PBS (<i>Phosphate-buffered saline</i>) pH = 7,4	- 8,006 g NaCl/l (Natriumchlorid) - 1,72 g Na ₂ HPO ₄ /l (Dinatriumhydrogenphosphat) - 0,2 g KCl/l (Kaliumchlorid) - 0,27 g KH ₂ PO ₄ /l (Kaliumdihydrogenphosphat) in <i>Aqua destillata</i>	AppliChem, St. Louis, Missouri, USA; Kat-Nr. #A1149 AppliChem; Kat-Nr. #A3905 AppliChem, Kat-Nr. #A2939 AppliChem; Kat-Nr. #A1043 Ampuwa; Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland; Kat-Nr. #1080181
RBC-Lysepuffer (<i>Red blood cell</i>) pH = 7,2 -7,4	- 8,3 g NH ₄ Cl/l (Ammoniumchlorid) - 0,8 g NaHCO ₃ /l (Natriumhydrogencarbonat) - 0,037 g C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₈ /l (Ethylendiamintetraessigsäure = EDTA) in <i>Aqua destillata</i>	Sigma-Aldrich; Kat-Nr. #A9434 Merck, Darmstadt, Deutschland; Kat-Nr. #106329 Merck; Kat-Nr. #4005-OP s. o.

2.4.2 Färbung

Zuerst wurde die Tot-Lebend-Färbung mit dem Fluoreszenzfarbstoff *Fixable Viability Stain 450* (FVS450) (BD Biosciences, San Jose, Kalifornien, USA; Kat-Nr. #562247) durchgeführt, indem nach Herstellerangaben pro 1 ml Zellsuspension 1 μ l FVS450 (entspricht 0,2 μ l) hinzugegeben und für 30 min im Dunkeln auf Eis inkubiert wurde. Dieser Farbstoff wird von violetterem Licht mit einer Wellenlänge von 405 nm angeregt [102]. Danach wurden die Proben zentrifugiert (10 min; 500 x g; 4 °C; Biofuge 28RS; Heraeus, Hanau, Deutschland) und der Überstand abpipettiert. Es folgte die Färbung der T-Zellen mit dem PerCP-Cy5.5 gekoppelten Ratte-anti-Maus-CD4-Antikörper (BD Biosciences; Kat-Nr. #550954) und die der B-Zellen mit dem APC gekoppelten Ratte-anti-Maus-CD19-Antikörper (BioLegend, San Diego, Kalifornien, USA; Kat-Nr. #115511). Hierfür wurde bei einer durch Vorversuche der Arbeitsgruppe etablierten Zellzahl von nicht mehr als 5×10^5 Zellen je 0,125 μ g pro Antikörper (entspricht bei einer Antikörper-Stammkonzentration von 0,2 mg/ml einem Volumen von 0,625 μ l) in 50 μ l Waschpuffer (FACS Flow; BD Biosciences; Kat-Nr. #342003) als *Mastermix* hinzugegeben und erneut für 30 min im Dunkeln auf Eis inkubiert. Bei PerCP-Cy5.5 handelt es sich um ein Tandemkonjugat, das aus den beiden Fluorochromen Peridinin-Chlorophyll-Protein sowie Cyanin 5.5 besteht und durch blaues Licht ($\lambda = 488$ nm) angeregt wird, während Allophycocyanin (APC) durch rotes Licht ($\lambda = 633$ nm) zur Fluoreszenz fähig ist [103, 104]. Nach der Inkubation wurde den Proben je 150 μ l FACS Flow zugegeben, zentrifugiert (5 min; 500 x g; 4 °C; Biofuge 28RS) und der Überstand abpipettiert. Jeder Probe wurden erneut 150 μ l FACS Flow hinzugegeben, bevor sie zur Messung in ein Proberöhrchen (BD Biosciences) überführt wurde.

2.4.3 Messung und Auswertung

Die Messung wurde mit dem BD FACSCanto II Zellscanner (BD Biosciences), der über einen violetten, blauen und roten Laser verfügt, unter Verwendung der BD FACSDiva Software (Version 6.1.3; BD Biosciences) durchgeführt. Der Schwellenwert (*Threshold*) bei der Messung der FSC (s. u.) wurde auf 30.000 festgelegt, sodass Signale mit geringerer Intensität wie Zelltrümmer nicht aufgezeichnet wurden. Die weitergehende Auswertung erfolgte mit der FlowJo Software (Version 10.0.6; Tree Star, Ashland, USA) unter Berücksichtigung der Größe, Granularität und Fluoreszenzeigenschaft der

gezählten Ereignisse, die gegeneinander aufgetragen wurden. Das Vorwärtsstreulicht (*Forward Scatter* = FSC) diene als Maß für die Größe und das Seitwärtsstreulicht (*Side Scatter* = SSC) als Maß für die Granularität, wobei die Fläche (*Area* = A), Höhe (*Height* = H) und Breite (*Width* = W) des Impulses in die Analyse einbezogen wurden. Zuerst wurden die lebenden und einzelnen Zellen definiert. Anschließend wurde die Lymphozytenpopulation von Monozyten und Granulozyten abgegrenzt. Aus dieser Population wurden die B- und T-Zellen bestimmt, die als CD19⁺CD4⁻ bzw. CD19⁻CD4⁺ typisiert wurden. Die gemessenen Signale durch PerCP-Cy5.5 und APC waren spezifisch für die Antikörper, an die sie gekoppelt waren, da in den Negativkontrollen diesbezüglich keine Signale registriert wurden. Nachfolgende Tab. 2 zeigt die Einstellung der Spannungen am BD FACSCanto II Zellscanner, gefolgt von einer Gesamtübersicht zur Gatingstrategie (Abb. 1).

Tab. 2 Einstellung der Spannungen am FACSCanto II Zellscanner

Parameter	Spannung
FSC – A/H/W = Größe	280V
SSC – A/H/W = Granularität	430V
FVS450 (Violett) = Tot/Lebend	410V
PerCP – Cy5.5 (Blau) = CD4	594V
APC (Rot) = CD19	535V

FSC = *Forward Scatter*; SSC = *Side Scatter*; A = *Area*; H = *Height*; W = *Width*; FVS = *Fixable Viability Stain*; PerCP – Cy = *Peridinin-Chlorophyll-Protein – Cyanin*; APC = *Allophycocyanin*; CD = *Cluster of Differentiation*; FACS = *Fluorescence-Activated Cell Sorting*.

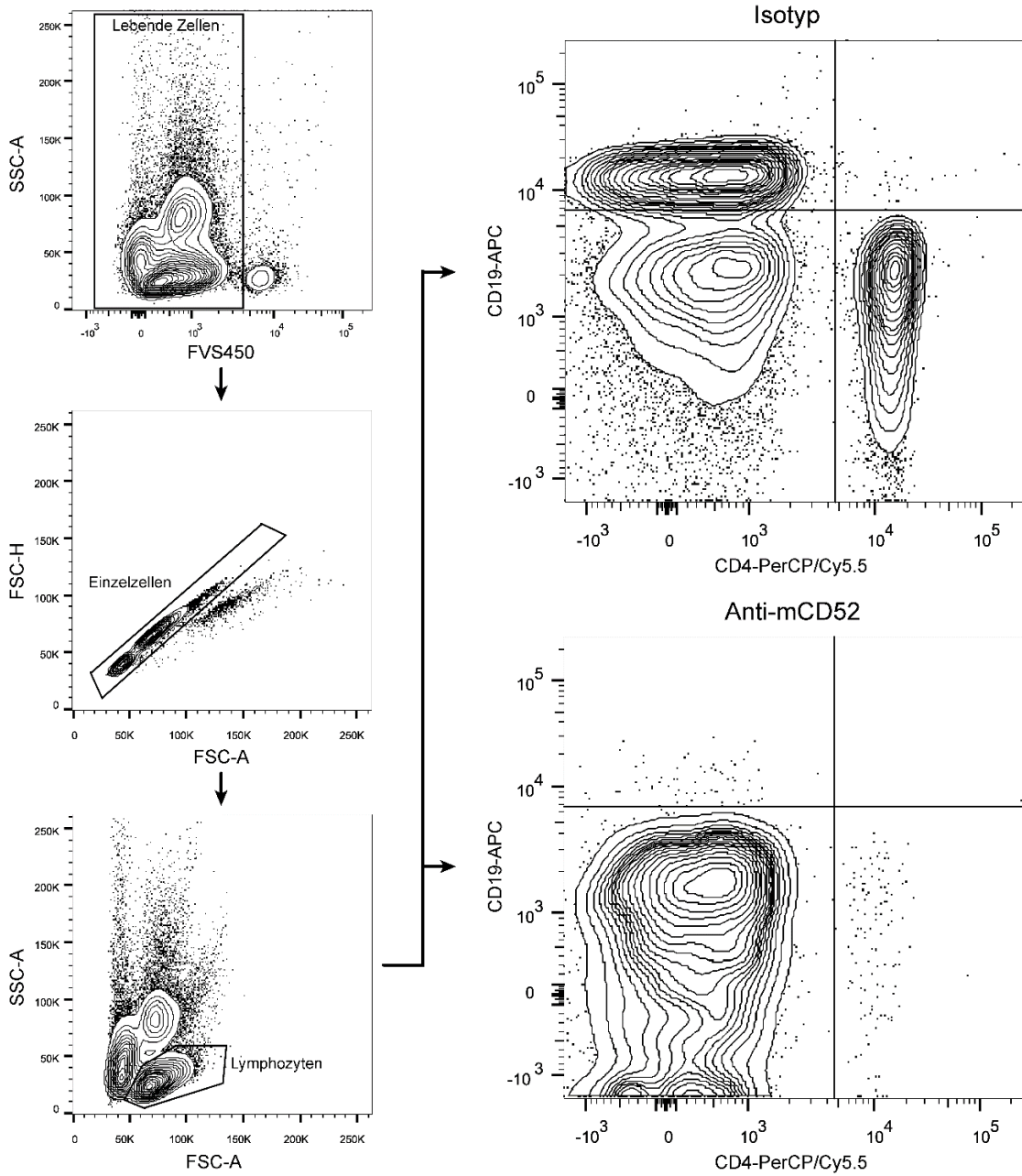


Abb. 1 Durchflusszytometrische Gatingstrategie

Bestimmung von CD19⁺ B-Zellen und CD4⁺ T-Zellen im venösen Blut der Mäuse, die entweder mit Anti-mCD52-AK oder Isotyp-Kontroll-AK behandelt wurden. FSC = *Forward Scatter*; SSC = *Side Scatter*; A = *Area*; H = *Height*; FVS = *Fixable Viability Stain*; CD = *Cluster of Differentiation*; APC = *Allophycocyanin*; PerCP/Cy = *Peridinin-Chlorophyll-Protein / Cyanin*; Anti-mCD52-AK = muriner Anti-CD52-spezifischer IgG2a-Isotypantikörper; Isotyp-Kontroll-AK = muriner unspezifischer IgG2a-Isotyp-Kontroll-Antikörper. Ins Deutsche übersetzt aus Simon *et al.* (2018) [105], einer gemeinschaftlichen Veröffentlichung, in der Teilergebnisse der vorliegenden Arbeit vorab publiziert wurden.

Copyright-Vermerk: <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

2.5 *Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)*

Mit zwei verschiedenen *Assays* wurde über den Substratumsatz zum einen auf das Verhältnis von Myelin-reaktiven Antikörpern und zum anderen von freigesetzten Neurofilamenten als Marker für einen Axonschaden im Serum rückgeschlossen: MP4-spezifische Antikörper wurden über einen indirekten ELISA und pNF-H über einen indirekten *Sandwich*-ELISA quantifiziert.

Zur Gewinnung des Serums für den ELISA wurden die immunisierten behandelten sowie die gleichaltrigen nicht-immunisierten unbehandelten Mäuse durch tiefe CO₂-Inhalation getötet. Im Anschluss wurden die Mäuse in Rückenlage fixiert und der Thorax über einen Medianschnitt geöffnet, um nach Durchtrennung der *Vena cava inferior* das austretende Herzblut abzuziehen und in ein 2 ml Röhrchen (Sarstedt) zu überführen. Nach der Gerinnung wurden die Proben über Nacht bei 4 °C gelagert. Am nächsten Tag wurden die Proben 10 min zentrifugiert (10.000 x g; Microcentrifuge 5415C; Eppendorf) und der Überstand, welcher dem Serum entsprach (etwa 200 µl), in 0,5 ml Röhrchen (Sarstedt) überführt und bei -20 °C eingefroren.

2.5.1 **MP4-spezifische Antikörper**

Bei diesem *Assay* wurden Antigen, Antikörper, Enzym und Substrat mit 100 µl pro *Well* aufgebracht, während das Waschen und Blocken der Platte mit 200 µl/*Well* erfolgte. Die Zusammensetzung und die Bezugsquellen der für den MP4-ELISA verwendeten Wasch- und Blocklösung sind in Tab. 3 gelistet.

Die ELISA-Platte (Nunclon Delta Surface 96-MicroWell, Nalge Nunc International, Rochester, New York, USA) wurde zuerst mit MP4 (Alexion Pharmaceuticals) in einer Konzentration von 3 µg/ml sterilem PBS (Dulbecco's PBS; Sigma-Aldrich) beschichtet (*Coating*), was bei einer MP4-Stammkonzentration von 2 mg/ml einer 1:667 Verdünnung entspricht, und über Nacht bei 4 °C gelagert. Während dieser und der nachfolgenden Wartezeiten wurde die Mikrotiterplatte stets abgedeckt.

Am nächsten Tag wurde die Platte 3 x mit PBS-Tween gewaschen und danach mit 1 % Milchpulver in PBS-Tween für 2 h bei Raumtemperatur (RT) geblockt. Nach dem Abkippen der Blocklösung wurde von jeder Maus das aufgetaute Serum, das zuvor 1:1000 mit 1 % Milchpulver in PBS-Tween verdünnt wurde, in Duplikaten auf die Platte

pipettiert. Für die Negativkontrolle wurde ein *Well*-Duplikat nur mit 1 % Milchpulver in PBS-Tween belegt. Die Platte wurde erneut über Nacht bei 4 °C gelagert.

Nach dreimaligem Waschen der Platte mit PBS-Tween wurde der polyklonale biotinylierte Ratte-anti-Maus-IgG-Antikörper (eBioscience, Waltham, Massachusetts, USA; Kat-Nr. #13401385), der zuvor 1:800 mit 0,1 % Milchpulver in PBS-Tween verdünnt wurde, den Proben einschließlich der Negativkontrolle hinzugegeben und über Nacht bei 4 °C inkubiert.

Am vierten Tag wurde nach erneutem Waschen der Platte mit PBS-Tween (3 x) das Enzym *Avidin-Horseradish*(Meerrettich)-Peroxidase (BD Biosciences; Kat-Nr. #554058), verdünnt 1:1000 mit 0,1 % Milchpulver in PBS-Tween, in jedes *Well* pipettiert und für 2 h bei RT inkubiert. Es folgte ein letzter Waschschrift (PBS-Tween und PBS je 3 x), bevor das Substrat Tetramethylbenzidin (eBioscience) für die Farbentwicklung hinzugefügt wurde. Sobald sich die Negativkontrolle blau färbte, wurde die Reaktion mit 50 µl 25% Schwefelsäure (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) in *Aqua destillata* (Ampuwa; Fresenius Kabi) in jedem *Well* gestoppt. In Abb. 2 wird das Prinzip zum Nachweis MP4-spezifischer Antikörper schematisch dargestellt.

Tab. 3 Verwendete Wasch- und Blocklösung für den MP4-ELISA

Lösung	Zusammensetzung	Herkunft
PBS-Tween (<i>Phosphate-buffered saline</i>)	- 0,5 ml Tween 20/l in 0,01 M PBS	AppliChem; Kat-Nr. #162312 s. Tab. 1
1 % Milchpulver-Lösung	- 1 g Milchpulver /100 ml in PBS-Tween	Bio Magermilchpulver; Heirler Cenovis, Radolfzell, Deutschland; Kat-Nr. #3030

ELISA = *Enzyme-linked Immunosorbent Assay*.

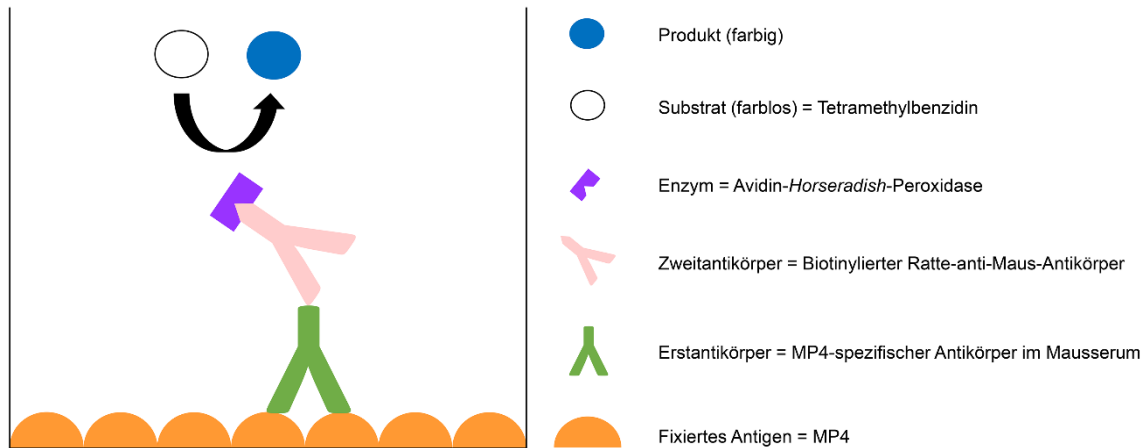


Abb. 2 Schematische Darstellung des indirekten ELISAs für MP4-spezifische Antikörper
 Seitenansicht eines *Wells*. Prinzip zum Nachweis von im Serum vorhandenen MP4-spezifischen Antikörpern. ELISA = *Enzyme-linked Immunosorbent Assay*.

Direkt im Anschluss wurde die Platte mit einem Mikrotiterlesegerät (Victor 3 1420 Multilabel Counter; Perkin Elmer, Waltham, Massachusetts, USA) bei einer Wellenlänge von 450 nm mit der Wallac 1420 Software (Version 3.00, Revision 5; Perkin Elmer) ausgelesen. Mithilfe des Lesegeräts wurde kolorimetrisch die optische Dichte (OD) des bis dahin entstandenen Produkts in jedem *Well* gemessen. Da die OD proportional zur Konzentration der MP4-spezifischen Antikörper ist, wurde zunächst für jede Maus der Mittelwert (MW) aus den Duplikaten gebildet. Davon wurde der MW aus den zwei Negativ-*Wells* abgezogen, um pro Maus einen korrigierten Absorptionswert zu erhalten. Diese MWs wurden je nach Behandlung der immunisierten Mäuse (Anti-mCD52-AK oder Isotyp-Kontroll-AK) gruppiert und einander gegenübergestellt.

2.5.2 Phosphoryliertes Neurofilament-*Heavy* (pNF-H)

Der indirekte pNF-H *Sandwich*-ELISA wurde nach dem kommerziell verfügbaren ELISA-Kit von Merck (Kat-Nr. #NS170) durchgeführt.

Bei der 96-*Well*-Platte handelt es sich um eine Immunplatte, die mit dem polyklonalen Huhn-anti-pNF-H-Antikörper beschichtet ist. Zum Anfeuchten der Platte wurde in jedes *Well* 100 μ l 1 \times Tris-gepufferte Salzlösung (*tris-buffered saline* = TBS), die zuvor durch 1:20 Verdünnung von 20 \times TBS in *Aqua destillata* (Ampuwa; Fresenius Kabi) hergestellt wurde, pipettiert und für 10 min bei RT inkubiert. Während der Wartezeiten wurde die Mikrotiterplatte stets abgedeckt. Nach Entfernen des TBS wurde pro *Well* 50 μ l der

bovinen pNF-H Standardreihe bzw. der aufgetauten Serumproben in Duplikaten hinzugegeben. Für die Negativkontrolle wurden zwei *Wells* nur mit Waschpuffer (TBS-Tween, Zusammensetzung s. Tab. 4) belegt. Die Platte wurde im Anschluss für 1 h bei RT gelagert.

Die pNF-H Standardreihe wurde folgendermaßen hergestellt: 14,4 µl pNF-H Standard mit einer Stammkonzentration von 250 ng/ml wurde in ein Röhrchen mit 225,6 µl Assaypuffer (enthält 0,05 % Kathon) pipettiert und resuspendiert. Aus dieser Ausgangslösung mit einer Konzentration von 15 ng/ml wurden durch seriell Verdünnen von je 120 µl in 120 µl Assaypuffer zwölf Verdünnungsstufen hergestellt, wobei das letzte Röhrchen nur mit Assaypuffer befüllt wurde (15; 7,5; 3,75; 1,875; 0,9375; 0,4688; 0,2344; 0,1172; 0,0586; 0,0293; 0,0146; 0 [ng/ml]).

Nach der Inkubation wurde die Platte drei Mal mit 200 µl/*Well* TBS-Tween gewaschen. Danach wurde der polyklonale Kaninchen-anti-pNF-H-Antikörper, der vorher 1:100 in Assaypuffer verdünnt wurde, mit 100 µl pro *Well* auf die Platte pipettiert und für 1 h bei RT inkubiert. Nach erneutem Waschen der Platte mit TBS-Tween (3 x mit 200 µl/*Well*) wurde der polyklonale mit alkalischer Phosphatase konjugierte Ziege-anti-Kaninchen-Antikörper, verdünnt 1:2000 in Assaypuffer, mit 100 µl/*Well* hinzugegeben und für 1 h bei RT inkubiert. Nach einem letzten Waschschrift (3 x mit 200 µl/*Well* TBS-Tween, 1 x mit 200 µl/*Well* TBS) wurde als Substrat 100 µl 1 × *para*-Nitrophenylphosphat (pNPP) in jedes *Well* pipettiert und für 3,5 h im Dunkeln inkubiert. 1 × pNPP wurde zuvor durch 1:50 Verdünnung von 50 × pNPP in pNPP-Puffer hergestellt. In Abb. 3 wird das Prinzip zum Nachweis der pNF-H-Konzentration schematisch dargestellt.

Tab. 4 Verwendete Waschlösung für den pNF-H-ELISA

Lösung	Zusammensetzung	Herkunft
TBS-Tween (<i>Tris-buffered saline</i>)	- 2,5 ml Tween 20/l - 50 ml 20 × TBS/l in <i>Aqua destillata</i>	Merck; Kat-Nr. #NS170 Merck; Kat-Nr. #NS170 Ampuwa; Fresenius Kabi; Kat-Nr. #1080181

pNF-H = phosphoryliertes Neurofilament-Heavy; ELISA = *Enzyme-linked Immunosorbent Assay*.

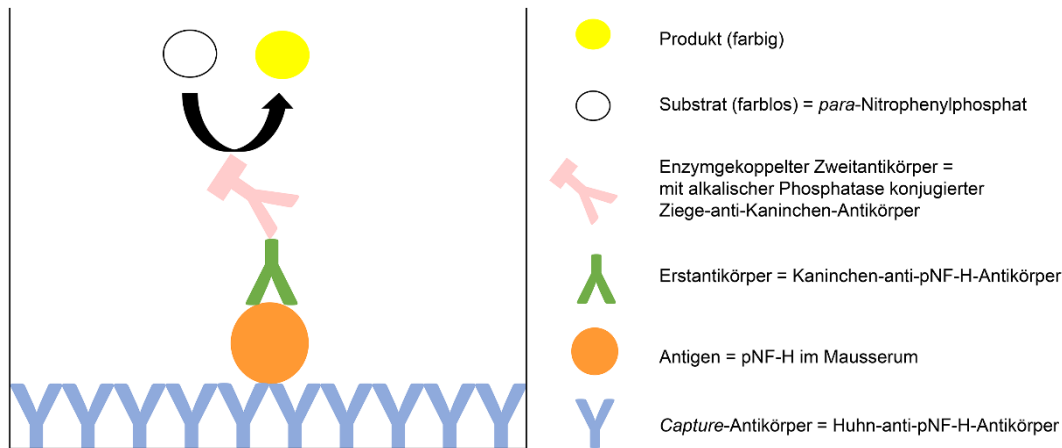


Abb. 3 Schematische Darstellung des indirekten pNF-H Sandwich-ELISAs

Seitenansicht eines *Wells*. Prinzip zum Nachweis von im Serum vorhandenem pNF-H. pNF-H = phosphoryliertes Neurofilament-*Heavy*; ELISA = *Enzyme-linked Immunosorbent Assay*.

Die Platte wurde direkt nach der Inkubation mit einem Mikrotiterlesegerät (Victor 3 1420 Multilabel Counter; Perkin Elmer) bei einer Wellenlänge von 405 nm mit der Wallac 1420 Software (Version 3.00, Revision 5; Perkin Elmer) ausgelesen. Auch hier wurde für jede Maus der OD-MW aus den Duplikaten gebildet, von dem der OD-MW aus den zwei Negativ-*Wells* abgezogen wurde, um pro Maus den korrigierten Absorptionswert zu erhalten. Mithilfe der pNF-H Standardreihe mit bekannten Konzentrationen konnte aus dem korrigierten Absorptionswert die korrespondierende pNF-H Konzentration in den jeweiligen Serumproben berechnet werden. Diese Konzentrationen wurden nach den entsprechenden Kohorten (nicht-immunisiert unbehandelt, immunisiert mit Anti-mCD52-AK oder Isotyp-Kontroll-AK behandelt) gruppiert und einander gegenübergestellt.

2.6 Elektronenmikroskopie

Das lumbale Rückenmark, welches im EAE-Modell als erstes infiltriert wird (aszendierende Parese der Mäuse ohne Läsionen im zervikalen Rückenmark) [76], und das Kleinhirn, in dem sich im chronischen Stadium der MP4-induzierten EAE die meisten B-Zell-Aggregate befinden [19], wurden nach der Behandlung ultrastrukturell auf neurodegenerative und -regenerative Prozesse untersucht, da die Elektronenmikroskopie die präzise Evaluation der ZNS-Pathologie auf der Ebene individueller Nervenfasern ermöglicht.

2.6.1 Perfusion, Präparation und Einbettung

Nachdem das Herzblut für die ELISA-Analysen entnommen wurde, erfolgte die Vorspülung des vaskulären Systems mit 0,1 M PBS über einen linksventrikulären intrakardialen Zugang (Venofix A 0,8/G21; Braun, Melsungen, Deutschland) bei gleichzeitig eröffnetem rechten Ventrikel für etwa 2 min. Direkt im Anschluss wurde 4 % Paraformaldehyd (PFA) / 4 % Glutaraldehyd (GA) in 0,1 M PBS bei einem pH-Wert von 7,4 für 15 – 20 min infundiert.

Nach der Fixation wurde die Schädelkalotte im Bereich zwischen den Augen aufgebrochen, das Gehirn freipräpariert, das Kleinhirn vom Großhirn abgetrennt und der Bereich der Wirbelsäule zwischen Thorax und Cauda equina herausgelöst. Kleinhirn und Wirbelsäule wurden in 10 ml Rollrand-Schnappdeckelgläschen (Laborversand A. Hartenstein, Würzburg, Deutschland) mit 4 % PFA / 4 % GA in PBS überführt und über Nacht bei 4 °C unter leichter Rotation (Wippschüttler Mini Rocker WS21; Laborversand A. Hartenstein) immersionsfixiert. Am nächsten Tag wurden die Präparate 1 x in PBS gewaschen, das Kleinhirn sagittal in sechs gleich breite Abschnitte geteilt und das lumbale Rückenmark aus der Wirbelsäule präpariert. Die Proben wurden erneut in Rollrand-Schnappdeckelgläschen überführt, drei Mal für je 10 min in 0,1 M Cacodylatpuffer gewaschen und über Nacht bei 4 °C unter leichter Rotation in 0,1 M Cacodylatpuffer gelagert, um das Fixans herauszulösen.

Für die Epon-Einbettung wurden die Proben erneut in 0,1 M Cacodylatpuffer (3 x für je 10 min) gewaschen, um dann zur weiteren Fixierung in 1 % Osmiumtetroxid (OsO₄) in 0,1 M Cacodylatpuffer für 4 h bei RT lichtgeschützt unter leichter Rotation eingelegt zu werden. Nach der Osmierung erfolgte die zweimalige Spülung in *Aqua destillata*

(Ampuwa; Fresenius Kabi) für je 15 min und die Entwässerung der Gewebe in einer aufsteigenden Alkoholreihe für je 15 min in 30 %, 50 %, 70 %, 80 %, 90 % und 96 % Ethanol sowie abschließend zwei Mal für je 15 min in 100 % Ethanol (Sigma-Aldrich). Die Proben wurden dann zwei Mal für je 30 min in Propylenoxid (EMS: Electron Microscopy Sciences, Hatfield, Pennsylvania, USA; Kat-Nr. #20401) eingelegt, bevor sie in ein 1:1 Gemisch aus Propylenoxid und Epon überführt und über Nacht bei RT darin belassen wurden. Am darauffolgenden Tag erfolgte die Behandlung der Gewebe mit reinem frischem Epon für 2 h, welches für die abschließende Einbettung gewechselt wurde. Hierfür wurden die Kleinhirnsegmente mit der Schnittfläche nach kaudal in Beem-Kapseln (Plano, Wetzlar, Deutschland; Kat-Nr. # G360) und das lumbale Rückenmark in eine flache Silikonform (Plano; Kat-Nr. #10505) mit der größeren Querschnittfläche Richtung trapezförmigem Ende überführt und mit Epon überschichtet. Es folgte die Polymerisation bei 60 °C für 48 h. Die Zusammensetzung und Bezugsquellen der für die Einbettung verwendeten Substanzen sind in Tab. 5 und 6 gelistet.

Tab. 5 Verwendete Puffer und Fixiermittel für die Elektronenmikroskopie

Lösung	Zusammensetzung	Herkunft
0,2 M PBS (<i>Phosphate-buffered saline</i>) als Stammlösung pH = 7,4	- 28,8 g Na ₂ HPO ₄ /l (Dinatriumhydrogenphosphat) - 5,2 g NaH ₂ PO ₄ /l (Natriumdihydrogenphosphat) - 17,53 g NaCl/l (Natriumchlorid) in <i>Aqua destillata</i>	AppliChem; Kat-Nr. #A3905 AppliChem; Kat-Nr. #A1047 AppliChem; Kat-Nr. #A1149 Ampuwa; Fresenius Kabi; Kat-Nr. #1080181
0,1 M PBS pH = 7,4	- 500 ml 0,2 M PBS/l in <i>Aqua destillata</i>	s. o.
4 % PFA / 4 % GFA in 0,1 M PBS pH = 7,4	Pro Liter: - 500 ml 0,2 M PBS - 40 g PFA (Paraformaldehyd) in 340 ml <i>Aqua destillata</i> (Erhitzen auf 60 °C + einige Tropfen 1 N Natronlauge, bis sich die Lösung klärt) - 160 ml 25 % GA (Glutaraldehyd)	AppliChem; Kat-Nr. #A3813 s. o. Merck; Kat-Nr. #137031 Carl Roth; Kat-Nr. #3778
0,2 M Cacodylatpuffer als Stammlösung pH = 7,35	- 42,8 g/l Cacodylsäure-Natriumsalz-Trihydrat in <i>Aqua destillata</i>	Sigma-Aldrich; Kat-Nr. #C0250 s. o.
0,1 M Cacodylatpuffer pH = 7,35	- 500 ml 0,2 M Cacodylatpuffer/l in <i>Aqua destillata</i>	s. o.
1 % OsO ₄ in 0,1 M Cacodylatpuffer pH = 7,35	Pro Milliliter: - 0,25 ml 4 % OsO ₄ (Osmiumtetroxid) - 0,5 ml 0,2 M Cacodylatpuffer - 0,25 ml <i>Aqua destillata</i>	EMS; Kat-Nr. #19190 s. o.

Tab. 6 Verwendete Einbettmittel für die Elektronenmikroskopie

Lösung	Zusammensetzung	Herkunft
Epon	- 26 g Glycidether 100	Serva, Heidelberg, Deutschland; Kat-Nr. #21045
	- 11 g DDSA (Dodecenybernsteinsäureanhydrid)	Serva; Kat-Nr. #20755
	- 15 g MNA (Methyl Nadic Anhydrid)	Serva; Kat-Nr. #29452
	- 0,25 ml DMP (2,4,6-Tris(dimethylamniomethyl) phenol)	Serva; Kat-Nr. #36975

2.6.2 Herstellung von Semi- und Ultradünnschnitten

Die eingebetteten Rückenmarksquer- und Kleinhirnsagittalschnitte wurden zunächst getrimmt, indem überschüssiges Eponharz mithilfe einer Rasierklinge (Plano) entfernt wurde. Anschließend wurden 1 µm dicke Semidünnschnitte an einem Ultramikrotom (Ultracut E; Leica, Wetzlar, Deutschland) mithilfe eines Diamantmessers (EMS) vom lumbalen Rückenmark sowie allen sechs Kleinhirnblöcken angefertigt. Die Schnitte wurden aus der wassergefüllten Wanne des Diamantmessers auf Menzel-Deckgläser (Plano), auf die zuvor ein Tropfen *Aqua destillata* (Ampuwa; Fresenius Kabi) aufgetragen wurde, übertragen und auf einem Heiztisch (MEDAX, Neumünster, Deutschland) bei 60 °C für mind. 20 min getrocknet. Danach wurden sie für etwa 45 s mit Methylenblau (Merck; Kat-Nr. # 115943) gefärbt, mit *Aqua destillata* gespült und erneut auf dem Heiztisch bei 60 °C für mind. 15 min getrocknet. Anschließend wurden die Deckgläser auf Objektträger (Plano) mit DEPEX (Serva; Kat-Nr. #18243) gelegt, sodass die gefärbten Schnitte damit eingedeckt waren. Von den hergestellten Semidünnschnitten wurden am Lichtmikroskop (DM LB2; Leica), welches mit einer Kamera (AxioCam MRc; Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland) ausgestattet war, digitale Bilder unter Verwendung der AxioVision 40 Software (Version 4.7; Carl Zeiss) angefertigt (Abb. 4 und 5).

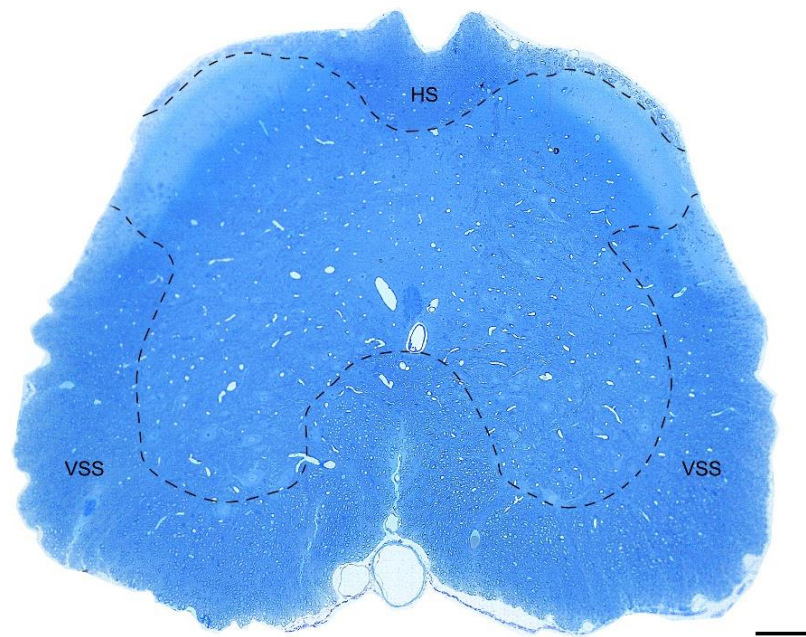


Abb. 4 Methylenblaugefärbter Semidünnschnitt vom lumbalen Rückenmark

Nicht-immunisiert und unbehandelt. HS = Hinterstrang; VSS = Vorderseitenstrang.
Die Maßstabsleiste zeigt 100 μm .

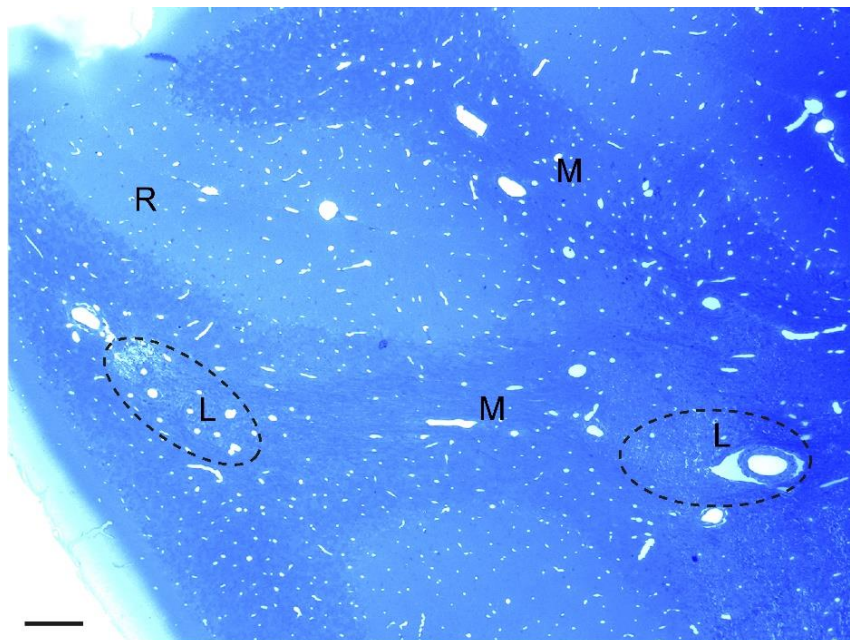


Abb. 5 Methylenblaugefärbter Semidünnschnitt vom Kleinhirn

MP4-immunisiert und mit Isotyp-Kontroll-AK behandelt. R = Rinde; M = Mark; L = Läsion;
Isotyp-Kontroll-AK = muriner unspezifischer IgG2a-Isotyp-Kontroll-Antikörper.
Die Maßstabsleiste zeigt 20 μm .

Für die Herstellung der Ultradünnschnitte wurden von den eingebetteten lumbalen Rückenmarksquerschnitten alle Rückenmarksblöcke aus den jeweiligen Kohorten angeschnitten. Von den eingebetteten Kleinhirnsegmenten wurden alle Blöcke aus der nicht-immunisierten unbehandelten Kohorte, jedoch nur jene Blöcke der MP4-immunisierten Mäuse ultradünn angeschnitten, bei denen anhand der entsprechenden Semidünnschnitte unter dem Lichtmikroskop Areale erkannt wurden, welche lymphozytäre Aggregate enthielten und damit nach Kuerten *et al.* [19, 70] auf eine Neurodegeneration hinweisen (Abb. 5). Die 65-85 nm dicken Ultradünnschnitte (Ultracut E; Leica) wurden in der wassergefüllten Wanne des Diamantmessers mit Chloroform (AppliChem; Kat-Nr. #A1585) gestreckt und danach vorsichtig auf 100 Mesh Nickelnetze (Plano; Kat-Nr. #G205N), die mit Formvar (Plano; Kat-Nr. #R1202) beschichtet waren, aufgezogen. Für eine weitere Kontrastverstärkung wurden die Schnitte lichtgeschützt für 30 min mit der glänzenden Seite auf einzelne Tropfen einer Lösung mit 4 % Uranylacetat-Ersatzfärbemittel gelegt, gespült (je 10 x Eintauchen in fünf Rollrandgläschen mit *Aqua destillata*) und anschließend für 7 min einer Bleicitratlösung ausgesetzt, wobei für eine CO₂-freie Umgebung Natriumhydroxid-Plätzchen (AppliChem; Kat-Nr. #A3910) hinzugelegt wurden. Nach erneutem Spülen (je 10 x Eintauchen in fünf Rollrandgläschen mit *Aqua destillata*) wurden die Netze für 30 min luftgetrocknet und in *Grid*-Boxen (Plano) überführt. Die Zusammensetzung und die Bezugsquellen der für die Kontrastierung verwendeten Substanzen werden in Tab. 7 aufgeführt.

Tab. 7 Verwendete Kontrastmittel für die Elektronenmikroskopie

Lösung	Zusammensetzung	Herkunft
4 % Uranylacetat-Ersatzfärbemittel	- 0,267 ml 15 % Uranylacetat-Ersatzfärbemittel/ml in <i>Aqua destillata</i>	EMS; Kat-Nr. #22405 Ampuwa; Fresenius Kabi; Kat-Nr. #1080181
Bleicitrat-Lösung nach Reynolds pH = 12	- 1,33 g Bleinitrat und 1,76 g tri-Natriumcitrat-Dihydrat <i>Ad</i> 30 ml abgekochtes <i>Aqua destillata</i> - 8 ml 1 N Natronlauge <i>Ad</i> 50 ml abgekochtes <i>Aqua destillata</i>	Sigma-Aldrich; Kat-Nr. #228621 Sigma-Aldrich; Kat-Nr. #S4641 s. o. Merck; Kat-Nr. #137031 s. o.

2.6.3 Ultrastrukturelle Auswertung

Die Analyse der Ultradünnschnitte erfolgte am Transmissionselektronenmikroskop (LEO 912 AB; Carl Zeiss) mit 80 kV Beschleunigungsspannung. Digitale Aufnahmen wurden mit einer integrierten Kamera (CCD Camera TRS Sharp:eye; Tröndle, Moorenweis, Deutschland), die mit der ImageSP Software (SysPro, Minsk, Weißrussland) angesteuert wurde, angefertigt.

Zunächst wurde die zuvor im Lichtmikroskop festgestellte Unterscheidung von Vorderseiten- und Hinterstrang beim Rückenmark, von Kleinhirnrinde und -mark sowie von gesundem und pathologischem Gewebe elektronenmikroskopisch bei $125 \times$ Vergrößerung nachvollzogen. Danach wurden in $6300 \times$ Vergrößerung Bilder von den Läsionsgebieten im Vorderseitenstrang und im Kleinhirnmark bei den immunisierten behandelten Mäusen und von äquivalenten Regionen bei den nicht-immunisierten unbehandelten Mäusen aufgenommen. Pro Maus und Gewebe wurden mind. zehn Bilder mithilfe der ImageJ Software (Version 1.50i; National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA) auf Myelin- und Axonpathologien untersucht.

In Kooperation mit dem *Center for Computational and Theoretical Biology* (CCTB) der Universität Würzburg, welches Methoden zur automatisierten Analyse und Quantifizierung biologischer Bilddaten entwickelt, wurde versucht, die bisher von Hand ausgeführte Bildauswertung mithilfe von Mustererkennungen der Makro-Funktion innerhalb der ImageJ Software zu vereinfachen. Allerdings ließ sich diese Funktion aufgrund der unterschiedlichen Qualität der Rückenmarks- und Kleinhirnbilder nicht valide umsetzen, sodass alle Bilder manuell ausgewertet wurden.

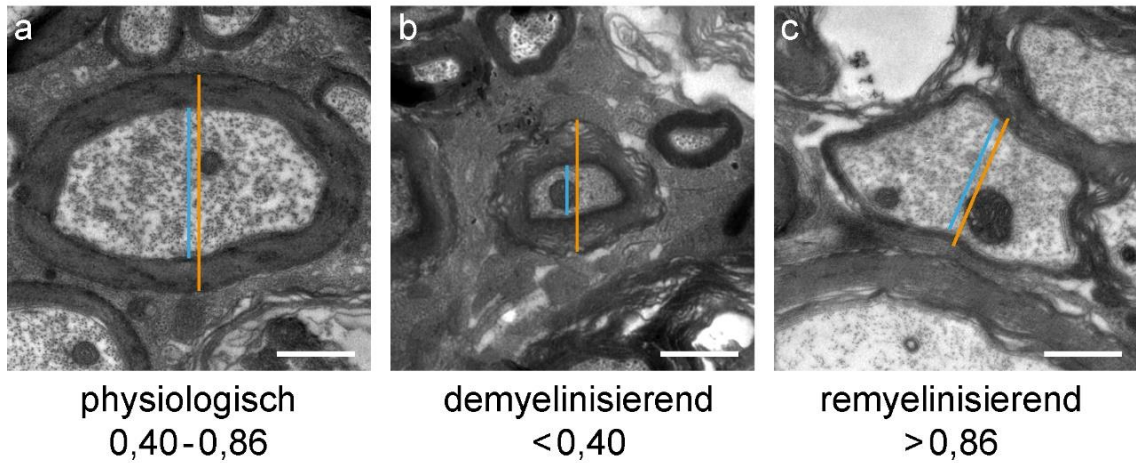
2.6.3.1 Myelinisierung

Um die Myelinisierung von Nervenfasern auf eine Pathologie hin untersuchen zu können, wurde die *g-Ratio* nach Guy *et al.* [81] und Chomiak *et al.* [82] bei der Auswertung des Rückenmarks und Kleinhirns angewandt, die es erlaubt, zwischen einer De- und Remyelinisierung zu unterscheiden. Um die *g-Ratio* zu erhalten, wird der kleinste Axondurchmesser durch den kleinsten Gesamtdurchmesser der Nervenfaser (Myelin und Axon) geteilt. Zuerst wurde die *g-Ratio* von jeder fotografierten Nervenfaser der nicht-immunisierten unbehandelten Mäuse bestimmt. Danach wurde aus allen Werten der Mittelwert \pm zehnfache Standardabweichung berechnet, welcher den physiologischen Bereich der *g-Ratio* in der vorliegenden Arbeit darstellt. Durch die Berücksichtigung der Standardabweichung wurden präparations- oder einbettungsbedingte Artefakte einkalkuliert.

Im lumbalen Rückenmark (RM) entsprach dieser physiologische Bereich der *g-Ratio* einem Wert zwischen 0,40-0,86 und im Kleinhirn (KH) einem Wert zwischen 0,48-0,82. Eine *g-Ratio* unterhalb von 0,4 (RM) / 0,48 (KH) spiegelt somit eine Nervenfaser im Prozess der Demyelinisierung wider, wohingegen eine *g-Ratio* oberhalb von 0,86 (RM) / 0,82 (KH) eine remyelinisierende Nervenfaser darstellt (Abb. 6).

Im nächsten Schritt wurde die *g-Ratio* von jeder fotografierten Nervenfaser der immunisierten behandelten Mäuse bestimmt. Mit Kenntnis des physiologischen Bereichs der *g-Ratio* wurde aus den Werten der prozentuale Anteil von physiologischen, de- und remyelinisierenden Nervenfasern bei den nicht-immunisierten unbehandelten sowie den MP4-immunisierten mit Isotyp-Kontroll-AK bzw. Anti-mCD52-AK behandelten Mäusen berechnet.

Lumbales Rückenmark



Kleinhirn

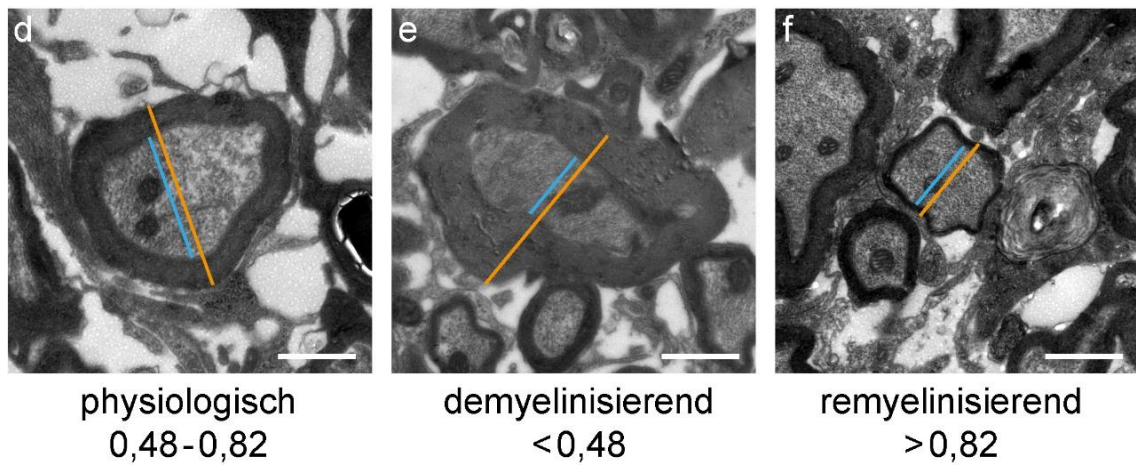


Abb. 6 Darstellung der Messungen zur Bestimmung der *g-Ratio*

Physiologische (a,d), demyelinisierende (b,e) und remyelinisierende (c,f) Nervenfasern aus dem lumbalen Rückenmark und Kleinhirn. Die Maßstabsleiste zeigt 1 μm .

2.6.3.2 Axonschaden

Während der Beginn des Axonsschadens anhand einer verringerten *nearest neighbour neurofilament distance* (NNND) festgestellt wurde, die sich in einer Verminderung des Abstandes der einzelnen Neurofilamente innerhalb eines Axons darstellt, wurde der irreversible Axonschaden durch das Ausmaß an axolytischen Axonen und axonalem Verlust bestimmt. Hierfür wurde der prozentuale Anteil von Axonen mit pathologischer NNND und von axolytischen Axonen mit vollständiger Axondegeneration an Gesamtaxonen sowie die Gesamtzahl an physiologischen (= intakte Myelinscheide) Axonen pro mm² sowohl im Rückenmark als auch im Kleinhirn bei den nicht-immunisierten unbehandelten sowie den MP4-immunisierten behandelten Mäusen berechnet. Die entsprechenden Axone wurden dabei anhand ihrer Morphologie identifiziert und bestimmt (Abb. 7).

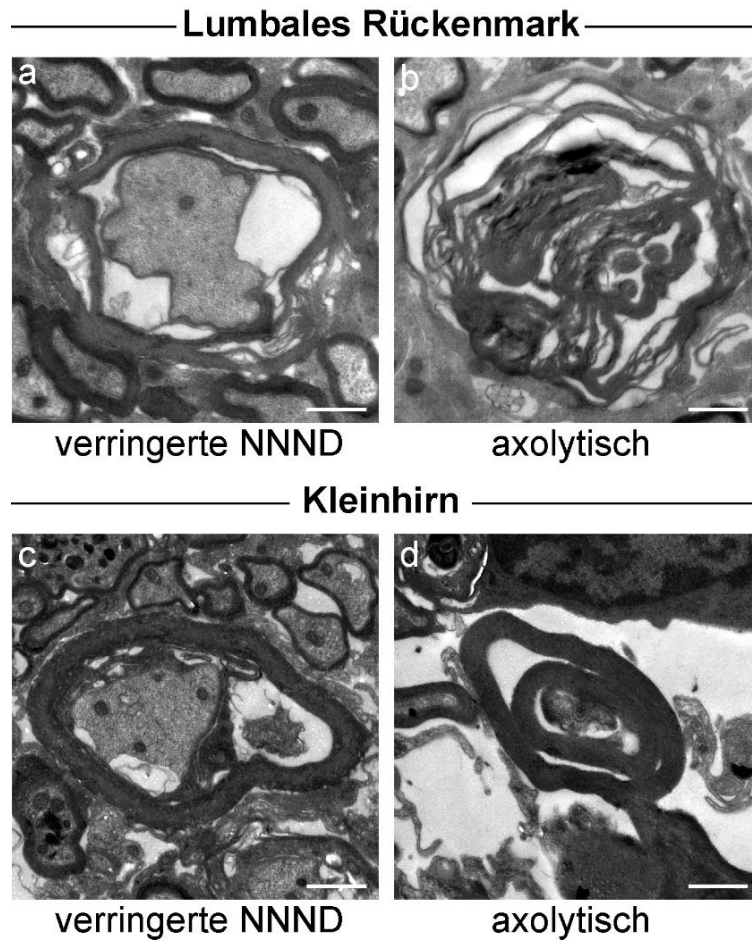


Abb. 7 Darstellung von Nervenfasern mit Axonschäden

Axone mit pathologischer NNND (a,c) und axolytische Axone (b,d) aus dem lumbalen Rückenmark und Kleinhirn. NNND = *nearest neighbour neurofilament distance*. Die Maßstableiste zeigt 1 µm.

2.7 *In vivo* kranielle Magnetresonanztomographie (MRT)

In Kooperation mit dem Institut für Diagnostische und Interventionelle Neuroradiologie des Universitätsklinikums Würzburg wurden *in vivo* T2-gewichtete Schnittbildaufnahmen vom Kopf der Mäuse in der Frontalebene mithilfe eines 3 T Human-MRT (MAGNETOM Trio, A Tim System; Siemens, Erlangen, Deutschland), an dessen Tisch eine Ein-Kanal Mauskopfspule (RAPID Biomedical, Rimpar, Deutschland) angebracht wurde, unter Verwendung der Syngo MR B19 Software (Siemens) angefertigt. Die Schnittbildaufnahmen wurden vor der Behandlung mit dem Anti-mCD52-AK bzw. Isotyp-Kontroll-AK sowie zehn Tage nach der fünftägigen Behandlung aufgenommen. Hierfür wurden die Mäuse mit Isofluran CP 1 ml/ml (CP-Pharma, Burgdorf, Deutschland) anästhesiert. Die T2-gewichteten Bilder wurden mit einer Turbo-Spin-Echo-Sequenz bei einer Echozeit = 113 ms, einer Repetitionszeit = 2100 ms, einer *in-plane* Auflösung = 0,17 x 0,17 mm sowie einer Schichtdicke = 1,0 mm aufgenommen. Großhirn-, Kleinhirn- und Ventrikelvolumen wurden in mm³ mit der MIPAV (*Medical Image Processing, Analysis and Visualization*) Software (Version 7.4.0; National Institutes of Health) bestimmt. Die anatomischen Strukturen wurden hierbei in jeder Schnittbildebene von Hand nachgezeichnet, die sich daraus ergebenden Flächen addiert und mit der Schichtdicke multipliziert. Die technischen Einstellungen am MAGNETOM-MRT werden in Tab. 8 und 9 aufgeführt.

Tab. 8 Technische Einstellungen am MAGNETOM Magnetresonanztomographen Teil 1

Eigenschaften		Kontrast	
<i>Prio</i> Rekonstruktion	Aus	TD (<i>Trigger Delay</i>)	0,0 ms
Vor der Messung		MTC (<i>Magnetization Transfer Contrast</i>)	Aus
Nach der Messung		Magnetische Präparation	Keine
<i>Load to viewer</i>	Ein	Flipwinkel	170 Grad
<i>Inline movie</i>	Aus	Fettunterdrückung	Keine
<i>Auto store images</i>	Ein	Wasserunterdrückung	Keine
<i>Load to stamp segments</i>	Ein	Magnetisierung wiederherstellen	Aus
Bilder in großes Bildsegment laden		Mittelungsmodus	Langzeit
<i>Auto open inline display</i>	Aus	Rekonstruktion	Betrag
<i>Start measurement without further preparation</i>	Ein	Messungen	1
Auf Start durch Benutzer warten	Aus	Mehrere Serien	Jede Messung
<i>Start measurements</i>	<i>single</i>		
Routine		Auflösung	
Schichtgruppe 1		Basis-Auflösung	256
Schichten	20	Phasen-Auflösung	100 %
Distanzfaktor	0 %	Phasen <i>Partial Fourier</i>	Aus
Position	L2.2 A37.2 H1.6	Trajektorie	Kartesisch
Orientierung	T > C-7.8 > S0.4	Interpolation	Aus
Phasenkodierrichtung	R >> L	Parallele Akquisitionstechnik	Keine
Rotation	90,30 Grad	Matrix Spulen Modus	<i>Auto (Circularly Polarized)</i>
Phasen-Oversampling	0 %	Image Filter	Aus
<i>Field of View</i> Auslese	43 mm	Verzeichniskorrektur	Ein
<i>Field of View</i> Phase	60,9 %	Modus	2D
Schichtdicke	1,0 mm	Ungefilterte Bilder	Aus
TR (<i>Time to Repetition</i>)	2100 ms	<i>Prescan</i> Normalisierung	Aus
TE (<i>Time to Echo</i>)	113 ms	Normalisierung	Ein
Mittelungen	2	Intensität	Mittel
Verknüpfungen	4	Abschneiden	20
Filter	Verzeichnis-korrektur (2D), Normalisierung	Breite	4
Spulenelemente	711	Rohdaten	Aus
		Elliptischer Filter	Aus
Geometrie		Physio	
Mehrschichtmodus	Verschachtelt	1. Signal/Modus	Kein
Serie	Verschachtelt	<i>Dark Blood</i>	Aus
Spezifische Sättiger	Keine	Atemkontrolle	Aus
TimCT (<i>Total imaging matrix Continuous Table</i>)	Aus		

S = Sagittal; C = Coronal; T = Transversal; R = *Right*; L = *Left*; A = *Anterior*; H = *Head*.

Tab. 9 Technische Einstellungen am MAGNETOM Magnetresonanztomographen Teil 2

System		Inline	
Body	Aus	Subtrahieren	Aus
711	Ein	Std-Abw.-Sagittal	Aus
Positionierungsmodus	FIX	(Standardabweichung)	
Tischposition	H	Std-Abw.-Coronal	Aus
Tischposition	0 mm	Std-Abw.-Transversal	Aus
<i>Multi-slice-multi-angle</i>	S – C – T	Std-Abw.-Zeit	Aus
Sagittal	R >> L	MIP-Sagittal	Aus
Coronal	A >> P	(<i>Maximum Intensity</i>	
Transversal	F >> H	<i>Projection</i>)	
Unkombiniert speichern	Aus	MIP-Coronal	Aus
Kanalkombination	<i>Adaptive</i>	MIP-Transversal	Aus
	<i>Combine</i>	MIP-Zeit	Aus
Automatische Spulen-	<i>Default</i>	Originalbilder speichern	Ein
anwahl		Sequenz	
<i>Shim</i> Modus	Standard	Einleitung	Ein
Mit Körperspule justieren	Aus	Dimension	2D
<i>Frequency Justage</i>	Aus	Kompensiere T2 Zerfall	Aus
bestätigen		Reduzierter Bewegungs-	Aus
Von Silikon ausgehen	Aus	empfang	
<i>Reference Amplitude 1H</i>	0,000 V	Kontraste	1
Justagetoleranz	<i>Auto</i>	Bandbreite	120 Hertz/Pixel
Justagevolumen		Flusskompensation	Auslese
Position	L2.2 A37.2 H1.6	Erlaubte Verzögerung	30 s
Orientierung	T > C-7.8 > S0.4	Echoabstand	18,8 ms
Rotation	90,30 Grad	Definiere	Turbofaktor
A >> P	43 mm	Turbofaktor	10
R >> L	27 mm	Echozüge pro Schicht	16
F >> H	20 mm	Hochfrequenz-Puls-Typ	Normal
		Gradientenmodus	Normal

S = Sagittal; C = Coronal; T = Transversal; R = *Right*; L = *Left*; A = *Anterior*; P = *Posterior*; F = *Feet*; H = *Head*.

2.8 Statistische Analyse

Beim Vergleich zwischen den experimentellen Kohorten (Anti-mCD52-AK vs. Isotyp-Kontroll-AK) wurde aufgrund der geringen Fallzahl und der nicht normverteilten Daten der ungepaarte nicht-parametrische Mann-Whitney-Test mit exaktem zweiseitigem p -Wert angewandt. Bei der Gegenüberstellung aller drei Kohorten (nicht-immunisiert und unbehandelt, immunisiert und mit Anti-mCD52-AK behandelt, immunisiert und mit Isotyp-Kontroll-AK behandelt) oder der experimentellen Kohorten zu verschiedenen Zeitpunkten wurde die Einweg-Varianzanalyse (*one-way analysis of variance* = *one-way ANOVA*) mit adjustiertem p -Wert durchgeführt, die für Vergleiche zwischen mehr als zwei Gruppen geeignet ist. Hierfür wurde die Prism 6 Software (Version 6.01; Graphpad Software, La Jolla, Kalifornien, USA) verwendet, mit der auch die Graphen erstellt wurden. Alle Daten sind als Mittelwerte (MW) mit Standardfehler des Mittelwerts (*standard error of the mean* = SEM) angegeben. Das Signifikanzniveau wurde auf $\alpha = 5\%$ festgelegt, wobei $p < 0,05$ durch einen (*), $p < 0,01$ durch zwei (**) und $p < 0,001$ durch drei (***) Sterne gekennzeichnet wurde.

3 Ergebnisse

Teilergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden in einer gemeinschaftlichen Veröffentlichung der Arbeitsgruppe vorab publiziert (Kapitel 7): In diesem Aufsatz wurde die murine Anti-CD52-Antikörper-Therapie der chronischen MP4-EAE der Behandlung im akuten Krankheitspeak gegenübergestellt und dabei der Einfluss auf die Autoimmunantwort, Neurodegeneration und Neuroregeneration untersucht [105].

3.1 Unveränderte klinische Symptomatik nach der Behandlung mit dem murinen Anti-CD52-Antikörper in der chronischen Phase der EAE

Den MP4-immunisierten B6-Mäusen wurde bei Erreichen eines stabilen Plateaus der EAE-Symptomatik (etwa 60 Tage nach Erkrankungsbeginn) entweder 200 µg Anti-mCD52-AK ($n = 18$; davon $n = 10$ aus der Arbeit von Co-Doktorand M. Simon und $n = 8$ aus dieser Arbeit) oder Isotyp-Kontroll-AK ($n = 14$; davon $n = 10$ aus der Arbeit von Co-Doktorand M. Simon und $n = 4$ aus dieser Arbeit) in sterilem PBS (Dulbecco's PBS; Sigma-Aldrich) an fünf aufeinanderfolgenden Tagen intraperitoneal verabreicht. Der durchschnittliche Erkrankungsbeginn bei allen behandelten Mäusen war etwa 16 Tage (MW = 15,72; SEM = 0,60) nach Immunisierung. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Schwere der Erkrankung (= EAE-Score) bei Behandlungsbeginn ($p = 0,59$) sowie ca. 11 Tage (MW = 11,31; SEM = 0,11) nach der Behandlung ($p = 0,85$). Die klinische Symptomatik der chronischen EAE blieb nach der Anti-mCD52-AK-Behandlung damit unverändert ($p = 0,47$), siehe Tab. 10 und Abb. 8.

Tab. 10 Klinische Parameter der Isotyp-Kontroll- vs. Anti-mCD52-AK behandelten Mäuse

	EAE-Beginn (Tage nach Immunisierung)	Score bei Behandlungs- beginn	Erkrankungs- dauer vor Behandlung (in Tagen)	Finaler Score	Score- Differenz
Isotyp					
<i>n</i> = 14	16,29 ± 0,85	2,61 ± 0,09	61,57 ± 1,27	2,43 ± 0,15	0,18 ± 0,10
Anti-mCD52					
<i>n</i> = 18	15,28 ± 0,85	2,57 ± 0,11	61,72 ± 1,20	2,47 ± 0,13	0,10 ± 0,07
<i>p</i>-Wert	0,29	0,59	0,95	0,85	0,47

Von *n* = 14 Isotyp-Kontroll-AK behandelten Mäusen *n* = 10 aus der Arbeit von Co-Doktorand M. Simon; von *n* = 18 Anti-mCD52-AK behandelten Mäusen *n* = 10 aus der Arbeit von Co-Doktorand M. Simon. Alle Werte sind als MW ± SEM angegeben. Der Mann-Whitney-Test wurde angewandt, um die statistische Signifikanz zu berechnen. Anti-mCD52-AK = muriner Anti-CD52-spezifischer IgG2a-Isotypantikörper; Isotyp-Kontroll-AK = muriner unspezifischer IgG2a-Isotyp-Kontroll-Antikörper; EAE = experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis. Ins Deutsche übersetzt aus Simon *et al.*, 2018 [105].

Copyright-Vermerk: <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

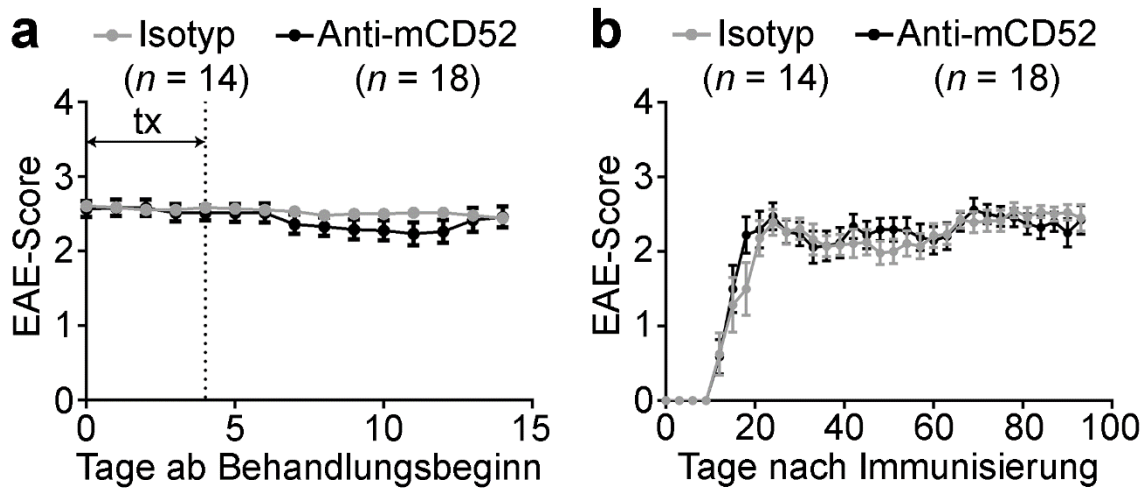


Abb. 8 Krankheitsverlauf der MP4-immunisierten behandelten Mäuse

(a) Die MP4-immunisierten Mäuse erhielten etwa 60 Tage nach EAE-Beginn 200 μ g Anti-mCD52-AK oder Isotyp-Kontroll-AK an fünf aufeinanderfolgenden Tagen (= tx) und wurden für mind. zehn weitere Tage klinisch beurteilt. (b) Gesamter Krankheitsverlauf einschließlich Behandlungs- und Nachbeobachtungszeitraum ab Immunisierung der Mäuse. Von $n = 14$ Isotyp-Kontroll-AK behandelten Mäusen $n = 10$ aus der Arbeit von Co-Doktorand M. Simon; von $n = 18$ Anti-mCD52-AK behandelten Mäusen $n = 10$ aus der Arbeit von Co-Doktorand M. Simon. Alle Werte sind als $MW \pm SEM$ angegeben. Der Mann-Whitney-Test wurde angewandt. Die Statistik wurde basierend auf Unterschieden in der täglichen EAE-Score-Ermittlung berechnet. EAE = experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis; Anti-mCD52-AK = muriner Anti-CD52-spezifischer IgG2a-Isotypantikörper; Isotyp-Kontroll-AK = muriner unspezifischer IgG2a-Isotyp-Kontroll-Antikörper. Ins Deutsche übersetzt aus Simon *et al.*, 2018 [105]. *Copyright*-Vermerk: <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

3.2 Signifikante Lymphozytendepletion ohne Einfluss auf die humorale Immunantwort durch den murinen Anti-CD52-Antikörper

Um das Ausmaß der Depletion zirkulierender Lymphozyten nach der Anti-mCD52-AK-Behandlung festzustellen, wurden durchflusszytometrische Analysen vom Schwanzvenenblut bei $n = 16$ ($n = 8$ aus der Arbeit von Co-Doktorand M. Simon und $n = 8$ aus dieser Arbeit) Anti-mCD52-AK und $n = 10$ ($n = 6$ aus der Arbeit von Co-Doktorand M. Simon und $n = 4$ aus dieser Arbeit) Isotyp-Kontroll-AK behandelten Mäusen durchgeführt. Das Blut wurde etwa 10 d (MW = 10,37; SEM = 0,18) nach der Behandlung entnommen, um den prozentualen Anteil lebender CD4⁺ T-Zellen und CD19⁺ B-Zellen an der Lymphozytenpopulation zu bestimmen.

Pro Maus wurden durchschnittlich 59.288 Zellen (SEM = 4891 Zellen) registriert. Der Lymphozytenanteil an den lebenden Einzelzellen betrug bei der Isotyp-Kontrollgruppe im Mittel 45,53 % (SEM = 5,78 %) und bei der Anti-mCD52-Gruppe MW = 10,13 % (SEM = 1,16 %). Innerhalb dieser Population zeigte sich bei den Anti-mCD52-AK behandelten Mäusen eine signifikante Reduktion der CD4⁺ T-Zellen (MW = 3,39 %; SEM = 0,52 %) gegenüber der Isotyp-Kontrollgruppe (MW = 24,02 %; SEM = 1,71 %) mit $p < 0,001$ (Abb. 9a). Der Anteil CD19⁺ B-Zellen war ebenfalls signifikant reduziert auf MW = 6,70 % (SEM = 1,23 %) verglichen mit MW = 38,28 % (SEM = 2,82 %) in der mit dem Isotyp-Kontroll-AK behandelten Kohorte ($p < 0,001$; Abb. 9b). Die Verringerung der T- und B-Zellen war demnach mit der Wirkung des Antikörpers, der gegen CD52 gerichtet ist, vereinbar.

Darüber hinaus wurde mithilfe eines indirekten ELISAs der Einfluss der Depletion auf die MP4-spezifische Antikörperproduktion anhand der Seren von $n = 16$ ($n = 10$ aus der Arbeit von Co-Doktorand M. Simon und $n = 6$ aus dieser Arbeit) Anti-mCD52-AK und $n = 15$ ($n = 9$ aus der Arbeit von Co-Doktorand M. Simon und $n = 6$ aus dieser Arbeit) Isotyp-Kontroll-AK behandelten Mäusen untersucht. Wie in Abb. 10 dargestellt, blieb der Anti-MP4-spezifische IgG-Titer nach der Behandlung unbeeinträchtigt ($p = 0,75$). Die OD wurde hierbei als Korrelat für die Antikörperkonzentration herangezogen. Der Nachweis MP4-spezifischer Autoantikörper bewies jedoch wiederum eine erfolgreiche Immunisierung.

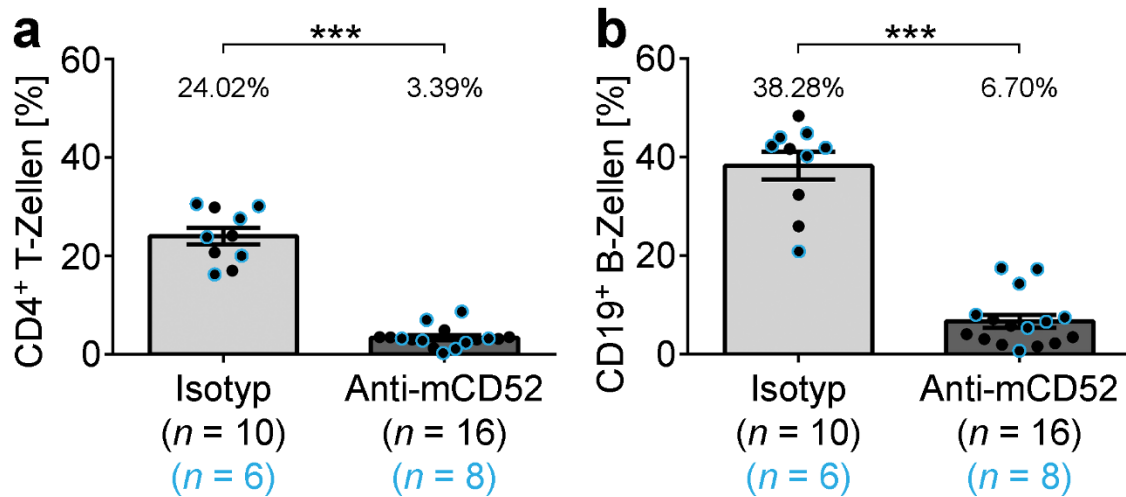


Abb. 9 Durchflusszytometrische Analyse der Lymphozytendepletion

(a,b) Prozentualer Anteil von CD4⁺ T-Zellen und CD19⁺ B-Zellen an Gesamtlymphozyten im venösen Blut der Mäuse nach der Behandlung mit Anti-mCD52-AK verglichen mit Isotyp-Kontroll-AK. $N = 6$ Isotyp-Kontroll-AK und $n = 8$ Anti-mCD52-AK behandelte Mäuse aus der Arbeit von Co-Doktorand M. Simon. Alle Werte sind als MW \pm SEM angegeben. *** = $p < 0,001$; Mann-Whitney-Test. CD = *Cluster of Differentiation*; Anti-mCD52-AK = muriner Anti-CD52-spezifischer IgG2a-Isotypantikörper; Isotyp-Kontroll-AK = muriner unspezifischer IgG2a-Isotyp-Kontroll-Antikörper. Ins Deutsche übersetzt und modifiziert aus Simon *et al.*, 2018 [105].
Copyright-Vermerk: <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

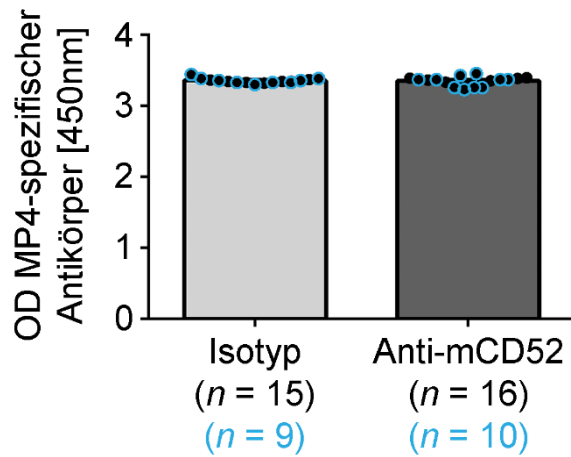


Abb. 10 ELISA-basierte Bestimmung von MP4-spezifischen Antikörpern

OD MP4-spezifischer Serumantikörper bei Anti-mCD52-AK oder Isotyp-Kontroll-AK behandelten Mäusen. $N = 9$ Isotyp-Kontroll-AK und $n = 10$ Anti-mCD52-AK behandelte Mäuse aus der Arbeit von Co-Doktorand M. Simon. Alle Werte sind als $MW \pm SEM$ angegeben. Mann-Whitney-Test. OD = Optische Dichte; Anti-mCD52-AK = muriner Anti-CD52-spezifischer IgG2a-Isotypantikörper; Isotyp-Kontroll-AK = muriner unspezifischer IgG2a-Isotyp-Kontroll-Antikörper; ELISA = *Enzyme-linked Immunosorbent Assay*. Ins Deutsche übersetzt und modifiziert aus Simon *et al.*, 2018 [105].

Copyright-Vermerk: <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

3.3 Unverändertes Ausmaß an freigesetzten Neurofilamenten durch den murinen Anti-CD52-Antikörper

Als Marker für Axonschäden wurde im Serum vorhandenes pNF-H mit einem indirekten Sandwich-ELISA bei $n = 10$ mit Anti-mCD52-AK behandelten, $n = 10$ mit Isotyp-Kontroll-AK behandelten und $n = 8$ nicht-immunisierten unbehandelten Mäusen bestimmt. In einer experimentellen Studie zu Rückenmarks- und Hirnläsionen bei Ratten war pNF-H sowohl im Liquor als auch im Blut erhöht [106]. Der Nachweis von pNF-H steht überdies in Zusammenhang mit amyotropher Lateralsklerose [91], Optikusneuritis [107] und MS [87]. In dieser Arbeit wurde ein signifikant erhöhtes Maß an pNF-H in den Seren der MP4-immunisierten Mäuse im Vergleich zu den nicht-immunisierten Kontrollmäusen festgestellt ($p < 0,001$). Allerdings zeigte sich kein Unterschied zwischen Anti-mCD52-AK und Isotyp-Kontroll-AK behandelten Mäusen ($p = 0,20$; Abb. 11).

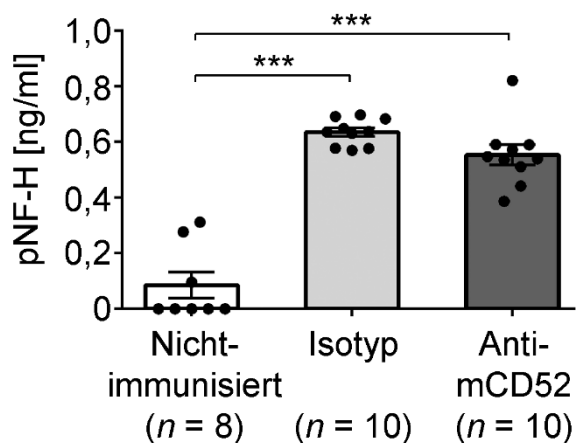


Abb. 11 ELISA-basierte Bestimmung von freigesetzten Neurofilamenten

Im Serum vorhandene pNF-H-Konzentration in ng/ml bei nicht-immunisierten unbehandelten sowie MP4-immunisierten mit Isotyp-Kontroll-AK bzw. Anti-mCD52-AK behandelten Mäusen. Alle Werte sind als $MW \pm SEM$ angegeben. *** = $p < 0,001$; ANOVA. Anti-mCD52-AK = muriner Anti-CD52-spezifischer IgG2a-Isotypantikörper; Isotyp-Kontroll-AK = muriner unspezifischer IgG2a-Isotyp-Kontroll-Antikörper; pNF-H = phosphoryliertes Neurofilament-Heavy; ELISA = *Enzyme-linked Immunosorbent Assay*. Ins Deutsche übersetzt aus Simon *et al.*, 2018 [105].

Copyright-Vermerk: <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

3.4 Signifikante Reduktion der Axonpathologie ohne Veränderung der Myelinpathologie nach der murinen Anti-CD52-Antikörperbehandlung

Während die pNF-H-Serumanalyse einen ersten Einblick hinsichtlich einer Neurodegeneration liefert, sind ultrastrukturelle Untersuchungen für eine detaillierte Quantifizierung der chronischen Schädigung erforderlich. Aus diesem Grund erfolgte die elektronenmikroskopische Untersuchung vom Rückenmark (Abb. 12) und Kleinhirn (Abb. 13) auf Myelin- sowie beginnende und irreversible Axonschäden bei $n = 8$ bzw. $n = 5$ Anti-mCD52-AK und $n = 4$ Isotyp-Kontroll-AK behandelten Mäusen.

Um beim Grad der Myelinisierung zwischen De- und Remyelinisierung unterscheiden zu können, wurde die *g-Ratio* nach Guy *et al.* [81] und Chomiak *et al.* [82] angewandt. Diese *Ratio* beschreibt das Verhältnis der Myelinscheide zur jeweiligen Nervenfasern. Die Analyse von $n = 8$ nicht-immunisierten unbehandelten Mäusen lieferte den physiologischen Bereich für die *g-Ratio* sowohl im lumbalen Rückenmark als auch im Kleinhirn. Anhand dessen wurden physiologische, de- und remyelinisierende Nervenfasern quantifiziert (Abb. 12b, Abb. 13b). Der Beginn eines Axonschadens kann an einer verringerten *nearest neighbour neurofilament distance* (NNND) festgestellt werden, wohingegen sich der irreversible Axonschaden durch das Ausmaß an axolytischen Axonen und axonalem Verlust widerspiegelt. Durch die Bestimmung der jeweiligen pathologischen Axone und der axonalen Dichte wurde der Axonschaden entsprechend evaluiert (Abb. 12c, Abb. 13c). Auch hier wurden $n = 8$ nicht-immunisierte unbehandelte Mäuse als Referenz hinzugezogen.

In Abb. 12 und 13 ist zu erkennen, dass die MP4-immunisierten behandelten Mäuse im Vergleich zu den nicht-immunisierten unbehandelten Mäusen eine signifikant erhöhte Anzahl pathologischer Nervenfasern im Sinne einer Demyelinisierung ($p < 0,01$; $p < 0,001$) und eines Axonschadens ($p < 0,05$; $p < 0,001$) aufzeigten, die sowohl im Rückenmark als auch im Kleinhirn vorlag. Dementsprechend war auch die Zahl der Axone mit physiologischer Myelinisierung und die Gesamtzahl der Axone pro mm^2 in beiden EAE-Kohorten reduziert ($p < 0,01$; $p < 0,001$). Diese Ergebnisse unterstützen demnach die Erkenntnisse aus der Serumanalyse.

Während das Ausmaß an de- und remyelinisierenden Nervenfasern zwischen den Anti-mCD52-AK und Isotyp-Kontroll-AK behandelten Mäusen keinen Unterschied ergab ($p = 0,38-0,93$; Abb. 12b und 13b), konnte bei den Anti-mCD52-AK behandelten Mäusen eine signifikante Abnahme pathologischer Axone und ein verringerter axonaler Verlust gegenüber der Isotyp-Kohorte festgestellt werden ($p < 0,05$; $p < 0,01$; $p < 0,001$; Abb. 12c und 13c). Dies lässt annehmen, dass der murine Anti-CD52-Antikörper in der chronischen Phase der EAE zwar nicht den neuroregenerativen Prozess der Remyelinisierung verstärkt, jedoch insofern neuroprotektiv wirkt, als dass die Axondegeneration unter der Behandlung vermindert wird.

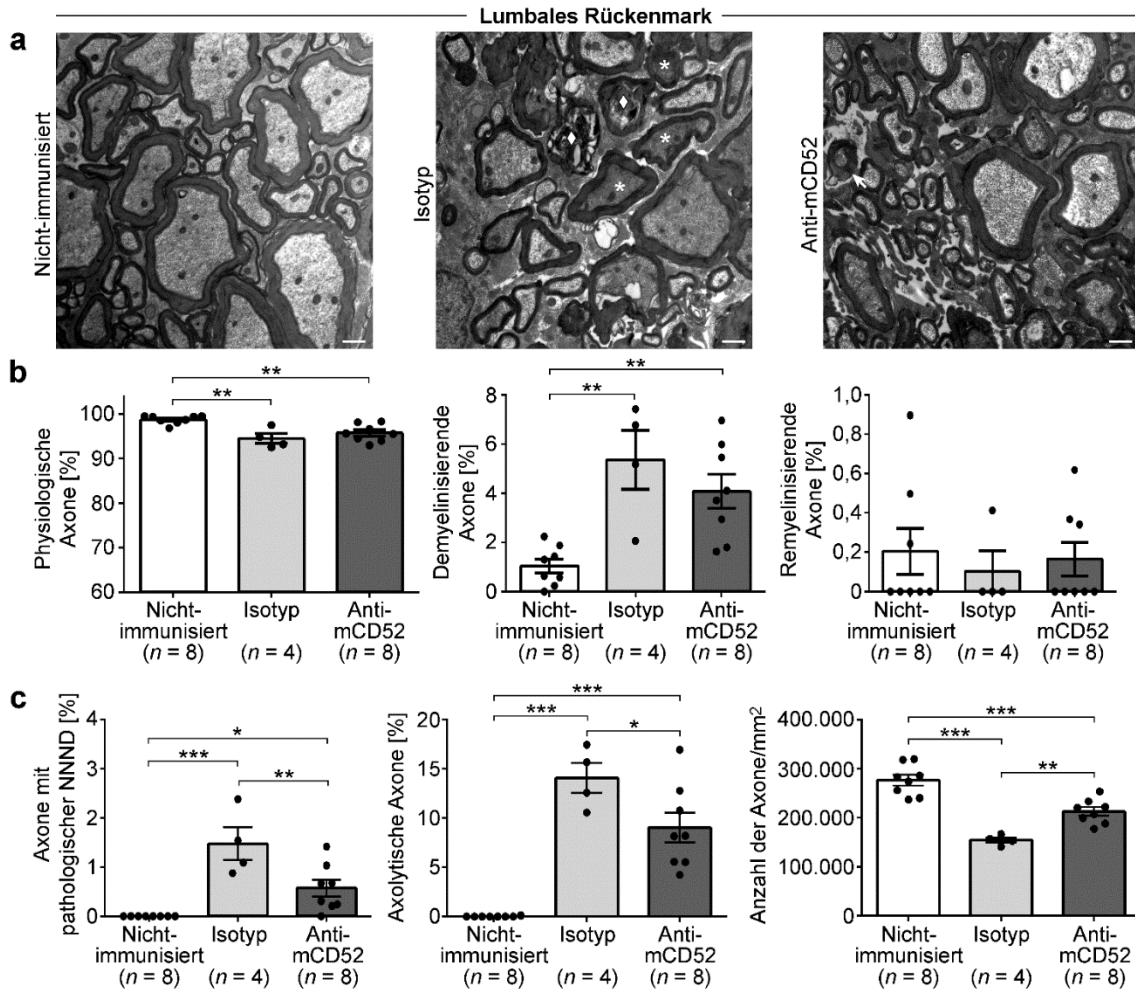


Abb. 12 Elektronenmikroskopische Analyse der Myelin- und Axonpathologie im lumbalen Rückenmark von MP4-immunisierten behandelten Mäusen

(a) Repräsentative elektronenmikroskopische Bilder vom lumbalen Rückenmark nicht-immunisierter unbehandelter und MP4-immunisierter Mäuse, die entweder mit dem Isotyp-Kontroll-AK oder dem Anti-mCD52-AK ~ 60 Tage nach EAE-Beginn behandelt wurden. Die Maßstabsleiste zeigt 1 μ m. Der Pfeil deutet auf eine demyelinisierende Nervenfasern. Der Stern repräsentiert Axone mit einer verringerten NNND. Die Raute spiegelt axolytische Axone wider.

(b) Prozentuale Quantifizierung physiologischer, de- und remyelinisierender Nervenfasern in nicht-immunisierten unbehandelten vs. MP4-immunisierten behandelten Mäusen.

(c) Quantifizierung pathologischer Axone in Prozent und Bestimmung des axonalen Verlusts pro mm^2 in nicht-immunisierten unbehandelten vs. MP4-immunisierten behandelten Mäusen. Alle Werte sind als $\text{MW} \pm \text{SEM}$ angegeben. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$; ANOVA. Anti-mCD52-AK = muriner Anti-CD52-spezifischer IgG2a-Isotypantikörper; Isotyp-Kontroll-AK = muriner unspezifischer IgG2a-Isotyp-Kontroll-Antikörper; NNND = *nearest neighbour neurofilament distance*. Ins Deutsche übersetzt aus Simon *et al.*, 2018 [105].

Copyright-Vermerk: <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

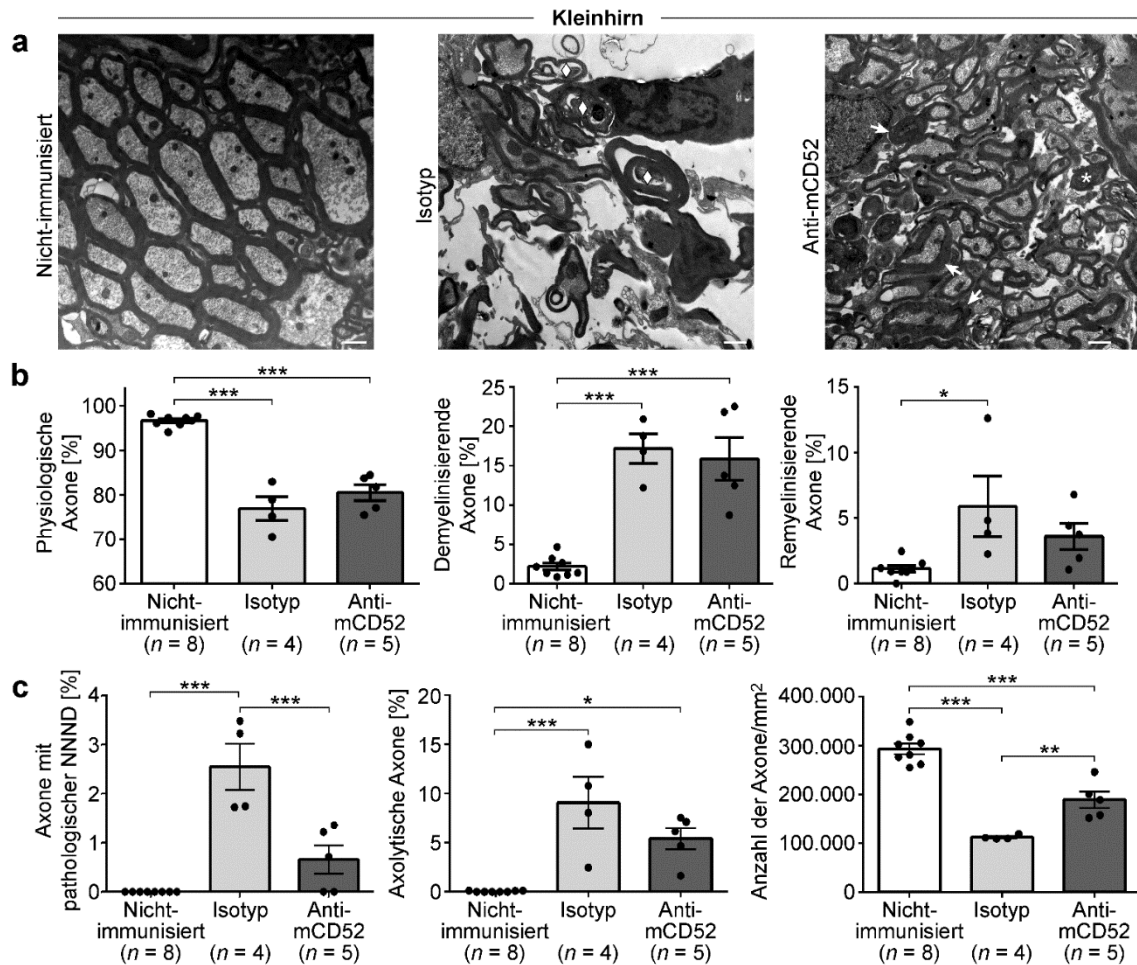


Abb. 13 Elektronenmikroskopische Analyse der Myelin- und Axonpathologie im Kleinhirn von MP4-immunisierten behandelten Mäusen

(a) Repräsentative elektronenmikroskopische Bilder vom Kleinhirn nicht-immunisierten unbehandelten und MP4-immunisierten behandelten Mäusen, die entweder mit dem Isotyp-Kontroll-AK oder dem Anti-mCD52-AK ~60 Tage nach EAE-Beginn behandelt wurden. Die Maßstabsleiste zeigt 1 μm . Der Pfeil deutet auf demyelinisierende Nervenfasern. Der Stern repräsentiert ein Axon mit einer verringerten NNND. Die Raute spiegelt axolytische Axone wider. (b) Prozentuale Quantifizierung physiologischer, de- und remyelinisierender Nervenfasern in nicht-immunisierten unbehandelten vs. MP4-immunisierten behandelten Mäusen. (c) Quantifizierung pathologischer Axone in Prozent und Bestimmung des axonalen Verlusts pro mm^2 in nicht-immunisierten unbehandelten vs. MP4-immunisierten behandelten Mäusen. Alle Werte sind als $\text{MW} \pm \text{SEM}$ angegeben. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$; ANOVA. Anti-mCD52-AK = muriner Anti-CD52-spezifischer IgG2a-Isotypantikörper; Isotyp-Kontroll-AK = muriner unspezifischer IgG2a-Isotyp-Kontroll-Antikörper; NNND = *nearest neighbour neurofilament distance*. Ins Deutsche übersetzt aus Simon *et al.*, 2018 [105].

Copyright-Vermerk: <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

3.5 Keine hirnvolumetrischen Veränderungen nach der Behandlung mit dem murinen Anti-CD52-Antikörper

Die potenziell neuroprotektive Wirkung des Anti-CD52-Antikörpers gegenüber einer Hirnatrophie wurde über eine cMRT-basierte Hirnvolumetrie vor und nach der Behandlung mit Anti-mCD52-AK ($n = 8$) bzw. Isotyp-Kontroll-AK ($n = 4$) untersucht. Die manuelle Segmentierung der T2-gewichteten frontalen Schnittbilder ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den *Baseline*- ($t_1 = 58 \pm 3$ Tage nach EAE-Beginn) und den *Follow-up-Scans* ($t_2 = 10$ Tage nach fünf tägiger Behandlung: ~75 Tage nach EAE-Beginn), siehe Abb. 14: Das Großhirn- und Kleinhirnvolumen blieb über die Zeit hinweg sowie im Vergleich von Anti-mCD52-AK mit Isotyp-Kontroll-AK behandelten Mäusen nahezu konstant ($p_{(\text{Großhirnvolumen})} = 0,8$; $p_{(\text{Kleinhirnvolumen})} = 0,59$). Die Daten der ventrikulären Volumetrie deuten auf eine Zunahme bei den Anti-mCD52-AK behandelten Mäusen im Zeitverlauf hin, allerdings wurde keine statistische Signifikanz erreicht ($p_{(\text{Ventrikelvolumen})} = 0,21$).

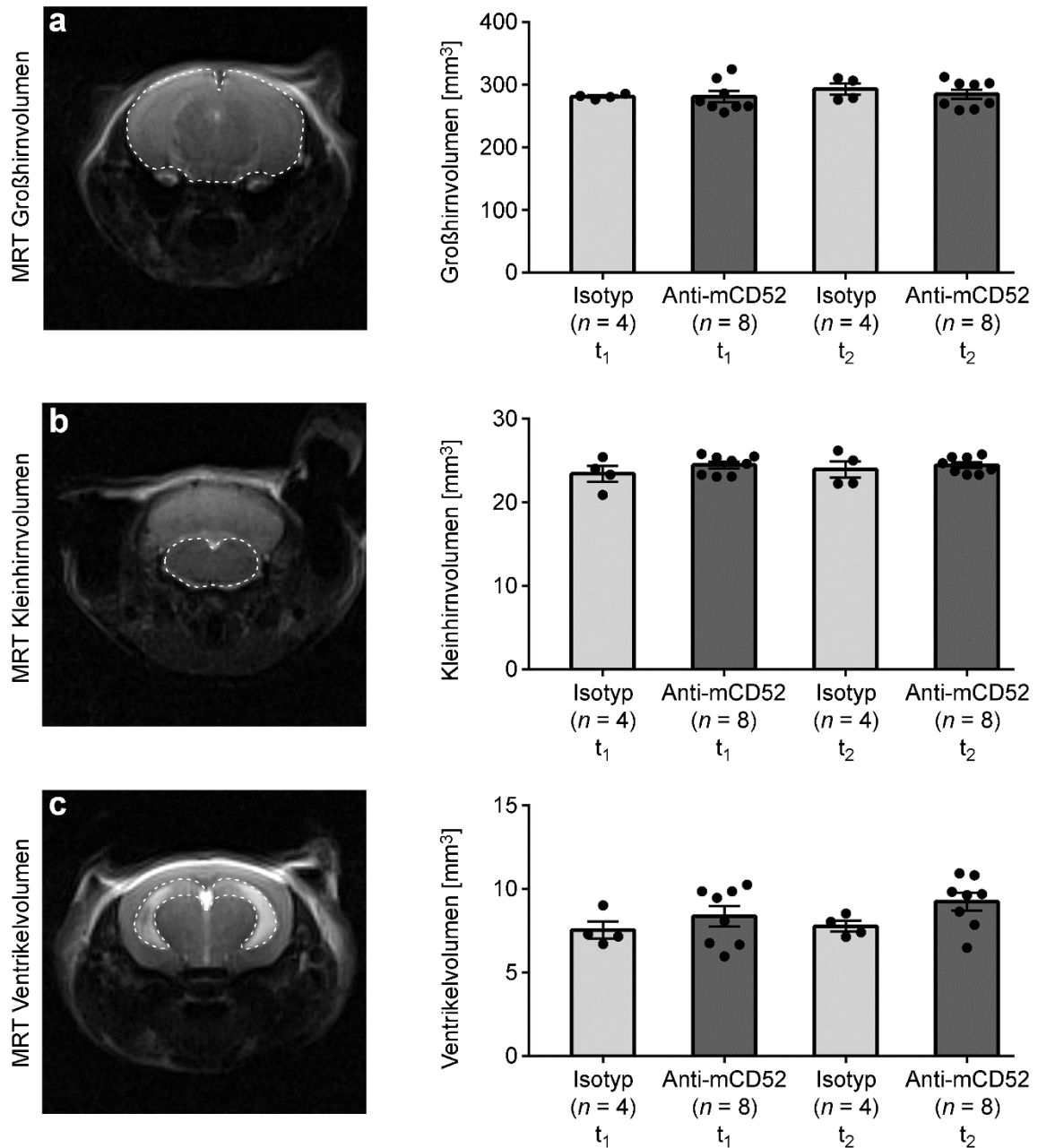


Abb. 14 MRT-basierte Analyse der Hirnatrophie von MP4-immunisierten behandelten Mäusen

Bestimmung von Großhirn- (a), Kleinhirn- (b) und Ventrikelvolumen (c) in mm³ vor der Behandlung mit Anti-mCD52-AK bzw. Isotyp-Kontroll-AK (t₁ = ~60 Tage nach EAE-Beginn) und 15 Tage später (t₂ = 10 Tage nach fünf tägiger Behandlung: ~75 Tage nach EAE-Beginn). Alle Werte sind als MW ± SEM angegeben. ANOVA. MRT = Magnetresonanztomographie; Anti-mCD52-AK = muriner Anti-CD52-spezifischer IgG2a-Isotypantikörper; Isotyp-Kontroll-AK = muriner unspezifischer IgG2a-Isotyp-Kontroll-Antikörper.

3.6 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die Behandlung mit dem murinen Anti-CD52-Antikörper hat in der chronischen Phase der MP4-induzierten EAE in B6-Mäusen wenig Einfluss auf die neurodegenerativen und keinen Einfluss auf die neuroregenerativen Prozesse: Bei signifikanter T- und B-Zell-Depletion konnte keine Verbesserung des Krankheitsverlauf erreicht werden. Die MP4-spezifische Reaktivität und die Demyelinisierung blieben unbeeinträchtigt. Eine gesteigerte Neuroregeneration im Sinne einer verstärkten Remyelinisierung war nach der Behandlung nicht festzustellen. Auf ultrastruktureller Ebene konnte allerdings ein geringerer Axonschaden nachgewiesen werden, wohingegen das Ausmaß der im Serum zu verzeichnenden Neurofilament-Untereinheit pNF-H und das Hirnvolumen unverändert blieben.

4 Diskussion

4.1 EAE-Vergleich und Einfluss auf den Krankheitsverlauf

Ziel dieser Studie war es, den Schutz vor einer Neurodegeneration durch Alemtuzumab im chronischen Stadium der MS an einem der humanen MS nahe kommenden Mausmodell zu untersuchen, nachdem in mehreren Tiermodellen in der Akutphase der Erkrankung eine Neuroprotektion durch die Behandlung mit dem Antikörper festgestellt werden konnte [99-101]. Hierfür wurde die MP4-induzierte EAE in B6-Mäusen als Tiermodell verwendet, welche einen chronischen Verlauf ohne Schübe oder Remission nimmt und als eines von wenigen Modellen neben der T-Zell-Abhängigkeit die an Bedeutung zunehmende B-Zell-Komponente der MS darstellt [65, 74]. Nach der MP4-Immunisierung der Mäuse wurde der murine Anti-CD52-Antikörper erst mit Erreichen eines stabilen Plateaus der klinischen EAE-Symptomatik verabreicht, wobei der gesamte Krankheitsverlauf eng kontrolliert wurde:

Im Gegensatz zum erstmalig beschriebenen MP4-Modell, in dem sich die EAE 5-10 Tage nach der Immunisierung entwickelte [72], setzten erste Symptome in dieser Studie bei adäquater MP4-Dosis später ein (durchschnittlich 16 Tage nach Immunisierung; Tab. 10). Die Erkrankungsschwere erreichte nach etwa 60 Krankheitstagen ein stabiles Plateau (Tab. 10) und liegt damit zwischen den Erfahrungswerten aus jüngeren Studien von Kuerten *et al.* (30-57 Krankheitstage; 3 Monate nach EAE-Beginn) [19, 76], die diesen Zeitpunkt als Übergang in ein chronisches Stadium definieren. Dieses Plateau lag mit einem durchschnittlichen EAE-Score von ca. 2,6 (Tab. 10) deutlich über dem aus einer vorangegangenen Studie der Arbeitsgruppe, welche das MP4-Modell mit traditionellen EAE-Modellen verglich (stabiles Plateau bereits bei einem Score von ca. 2,0) [76]. Der Grund für den unterschiedlich chronifizierenden und schweren Verlauf der MP4-induzierten EAE könnte bei ansonsten unverändertem Vorgehen im Wechsel der Zulieferer, von denen die Versuchstiere bezogen wurden, liegen. Bei genetisch identischem Hintergrund der Mäuse scheinen Unterschiede im Mikrobiom und eine abweichende Tierhaltung [108], aber auch der anhand der klinischen Präsentation schwierig festzustellende genaue Zeitpunkt des Übergangs von der akuten in eine chronische EAE für die Differenzen verantwortlich zu sein. Eine präzise Charakterisierung des Krankheitsverlaufs ist allerdings wichtig, um den Zeitpunkt für therapeutische Interventionen eindeutig identifizieren und deren Erfolg besser evaluieren

zu können. Boretius *et al.* ergänzten deshalb ihr EAE-Scoring-System bei der MOG-induzierten EAE in Marmoset-Affen um bildgebende Untersuchungen, in denen die im MRT nachweisbaren Läsionen mit der ZNS-Symptomatik zusammenfielen [109]. Gleiches war in der vorliegenden Arbeit nicht umsetzbar, da die klinische Symptomatik der murinen MP4-induzierten EAE weniger mit Infiltrationen im Gehirn, sondern vielmehr mit der Rückenmarksschädigung korreliert [19], welche aufgrund der geringen Auflösung im 3T Human-MRT nicht darstellbar war. In einem 7 T Kleintier-MRT, welcher mit einer Rückenmarksspule ausgestattet ist, können die Läsionen im Rückenmark hingegen visualisiert werden, wenn die EAE passiv durch enzephalitogene mit magnetischen Nanopartikeln beladenen T-Zellen induziert wird [110]. Jene kernspintomographischen Befunde korrelierten in einer longitudinalen Bildgebungsstudie allerdings nur schwach mit dem klinischen Verlauf und weisen, wie auch bei MS-Patienten, auf ein klinisch-radiologisches Paradoxon hin [111]. Für die Festlegung des Behandlungszeitpunkts wird man sich also weiterhin an der klinischen Präsentation der Mäuse orientieren müssen.

Im Vergleich zu den vorangegangenen Studien [99-101] führte die Antikörperbehandlung im chronischen Stadium der MP4-EAE zu keiner Besserung der Symptomatik (Abb. 8). Der EAE-Score blieb unverändert (Tab. 10) und ist bei der Betrachtung der Ergebnisse des pNF-H ELISAs (Abb. 11) und der ultrastrukturellen Analyse (Abb. 12c u. 13c) vermutlich dadurch zu erklären, dass der murine Anti-CD52-Antikörper keinen Einfluss auf bereits vorhandene irreversible Axonschäden hat, welche ähnlich zu MS-Patienten mit der Schwere klinisch bleibender neurologischer Defizite korrelieren [76, 112]. Allerdings konnte durch die Behandlung scheinbar das Fortschreiten der Axondegeneration (Abb. 12c u. 13c) und damit vermutlich eine Verschlechterung der EAE-Symptomatik verhindert werden. Der Krankheitsverlauf der Mäuse deckt sich demnach mit Ergebnissen aus den 6-Jahres-Follow-up-Daten der klinischen Studie von Willis *et al.*, die über eine anhaltende Reduktion der Schubrate, jedoch ohne Besserung der Behinderung bei mit Alemtuzumab behandelten Patienten berichtete, die prognostisch ungünstige Faktoren wie eine hohe Schubrate, eine radiologisch nachgewiesene hohe Krankheitsaktivität und eine rasche Behinderungsprogression aufwiesen [113]. Die murine Anti-CD52-Antikörperbehandlung im akuten Stadium der MP4-induzierten EAE verbesserte dagegen wiederum den klinischen Verlauf [105]. Dies legt die Vermutung

nahe, dass die Wirkung des Antikörpers von der Erkrankungsschwere und -dauer abhängig zu sein scheint. Inwiefern dies eine Rolle spielt, soll im nachfolgenden Abschnitt im Kontext der inflammatorischen Prozesse, die in der gemeinschaftlichen Veröffentlichung der Arbeitsgruppe ebenfalls untersucht wurden [105], diskutiert werden.

4.2 Einfluss auf die Inflammation

Trotz vielversprechender Behandlungserfolge unter Alemtuzumab in mehreren klinischen Studien [50, 51, 56, 57], ist, angesichts der gestiegenen Aufmerksamkeit für die B-Zell-Komponente der MS, der Einfluss des Medikaments auf die Immunpathogenese der Erkrankung nicht hinreichend geklärt. Der erst kürzlich veröffentlichte Bericht über die therapierefraktäre Behinderungsprogression bei hochaktiver RRMS, die erst unter der B-Zell-depletierenden Rituximab-Therapie verlangsamt wurde, unterstreicht die Relevanz von weiterführender Forschung [114].

Im MP4-Modell führte die Behandlung mit dem Anti-mCD52-AK zu einer effektiven Depletion zirkulierender CD4⁺ T-Zellen und CD19⁺ B-Zellen (Abb. 9), während die Antikörperproduktion gegen MP4 unbeeinträchtigt blieb (Abb. 10). Die Anzahl der korrespondierenden MP4-spezifischen B-Zellen war in der gemeinschaftlichen Veröffentlichung der Arbeitsgruppe ebenso wenig verändert [105]. Diese Ergebnisse stehen in Übereinstimmung mit vorherigen Studien zur Wirkung des Anti-CD52-Antikörpers in der EAE [99-101] und MS [42, 44, 45, 115] und waren nicht anders zu erwarten, da das Glykoprotein CD52 auf Immunzellen unterschiedlich stark exprimiert wird [40]. So werden auf Plasmazellen geringe Mengen/kein CD52 exprimiert [40, 115] (s. 1.1.5.1).

Interessanterweise konnte durch die Behandlung darüber hinaus im Kleinhirn die Aggregation von B220⁺ B-Zellen verhindert und bereits vorhandene B220⁺ B-Zell-Aggregate aufgelöst werden [105]. Die klinische Relevanz von B-Zell-Aggregaten ist zwar umstritten, der *post-mortem* Nachweis von B-Zell-Follikel ähnlichen Strukturen in den Meningen von SPMS-Patienten wird jedoch mit einem früheren Erkrankungsbeginn, einer raschen Behinderungsprogression und einem früheren Tod in Verbindung gebracht [18, 116]. Allerdings ist unklar, ob das Fehlen der cerebellären B-Zell-Aggregate nach der Antikörperbehandlung in der chronischen EAE auf einen mangelnden Nachschub

zirkulierender peripherer B-Zellen oder auf eine Depletion bereits aggregierter B-Zellen zurückzuführen ist.

Im Vergleich zu Natalizumab und Fingolimod, die in den Prozess der ZNS-Invasion eingreifen, sind diesbezüglich folgende Überlegungen möglich: Einleitend wurde bereits erwähnt, dass Natalizumab als potenter Anti-VLA4-Antikörper den Übertritt von Lymphozyten ins ZNS verhindert, indem es deren Bindung an die Zelladhäsionsmoleküle (VCAM-1 und MAdCAM-1) auf den Endothelzellen der BHS verhindert [35]. Das komplette bzw. teilweise Verschwinden von OKBs im Liquor bei einer Gruppe von mit Natalizumab behandelten RRMS-Patienten [117, 118], impliziert, dass ein konstanter Nachschub aus der Peripherie notwendig ist, um die B-Zell-Aggregation aufrechtzuerhalten, vorausgesetzt klonal expandierte B-Zellen sind der Grund für die Entwicklung von OKBs. Hierbei wird angenommen, dass zumindest ein Teil dieser B-Zellen gegen Myelin und Axone reaktiv ist [20]. Bezüglich des S1P-Rezeptor Agonisten Fingolimod, welcher den Lymphozytenegress aus sekundär lymphatischen Organen verhindert [34], konnte in Vorversuchen der Arbeitsgruppe nachgewiesen werden, dass durch die Fingolimod-Behandlung in der akuten MP4-induzierten EAE die Aggregation von B220⁺ B-Zellen im Kleinhirn ebenfalls verhindert wurde, während sie keinen Einfluss auf bereits bestehende Infiltrate in der chronischen EAE hatte [119]. Dies lässt wiederum annehmen, dass die B-Zell-Aggregation nicht von einem B-Zell-Nachschub aus der Peripherie abhängt. Allerdings zeigte dieselbe Studie, wie auch bei vorherigen Untersuchungen [120], dass Fingolimod einen stärkeren Effekt auf T- als auf B-Zellen hat [119]. Das sog. *Homing* der Lymphozyten hängt stark von der Expression verschiedener Chemokine, wie CCR7, ab, das für die Retention der Zellen verantwortlich ist [121], und erklärt damit den differenziellen Einfluss von Fingolimod. Daraus wurde der Schluss gezogen, dass B-Zellen unter der Fingolimod-Therapie weiterhin ins ZNS einwandern können, während Natalizumab deren Migration effektiv verhindert und Alemtuzumab zirkulierende B- einschließlich T-Zellen drastisch depletiert [105]. Dies deckt sich mit den Ergebnissen aus der Vergleichsstudie von Kalincik *et al.* zur klinischen Präsentation behandelter RRMS-Patienten, deren Schubrate durch Alemtuzumab stärker als durch Fingolimod, jedoch gleichermaßen wie durch Natalizumab reduziert wurde [122].

Eine effektive Depletion der Lymphozyten im ZNS ist hingegen stark abhängig von der Durchlässigkeit der BHS für den Antikörper. Die veränderte Integrität der BHS im Rahmen der MS ist zwar für eine gesteigerte Permeabilität und die damit einhergehende Infiltration mit Immunzellen verantwortlich [14, 123], die sich in der Kernspintomographie als Gadolinium-anreichernde Läsionen darstellen lassen, was als aktiver Entzündungsprozess gewertet wird [124, 125]. Allerdings ist die Schrankenstörung je nach Erkrankungsschwere, -dauer und ZNS-Region unterschiedlich [126]. So wird die BHS in klinischen Studien zur intravenösen Gabe von Rituximab bei RRMS-Patienten, gemessen an der Reduktion der klinisch-radiologischen Aktivität, als für Antikörper offen beschrieben, während sie bei PPMS-Patienten aufgrund der unveränderten Klinik und dem Fehlen KM-anreichernder Läsionen im MRT für Antikörper undurchlässig zu sein scheint [127]. Es wird vermutet, dass die Entzündungsprozesse in der chronisch progredienten MS hinter einer weitgehend geschlossenen BHS kompartimentalisiert sind und durch eine immunmodulatorische Therapie nicht wesentlich beeinflusst werden können [128]. In den histopathologischen Untersuchungen der Arbeitsgruppe zur Charakterisierung der Kinetik und Schwere der BHS-Störung in der MP4-induzierten EAE waren die ZNS-B-Zell-Aggregate im chronischen Stadium der Erkrankung allerdings nachweislich mit einer erhöhten Permeabilität assoziiert [129]. Dies steht in Einklang mit der Annahme, dass die ektopen meningealen B-Zell-Follikel bei SPMS-Patienten proinflammatorische Zytokine sezernieren, die zu einer direkten Schädigung des umliegenden Gewebes führen [18]. Eine alternative Erklärung für das geringe Ansprechen immunmodulatorischer Therapeutika in der chronisch-progredienten Phase ist, dass Antikörper bei intravenöser Applikation nur schwer ins ZNS gelangen, selbst bei Patienten mit aktiven MS-Läsionen und starker Schädigung der BHS [130, 131]. Bei Patienten mit ZNS-Lymphom etwa, denen Rituximab intravenös verabreicht wurde, entsprach die im Liquor messbare Konzentration des Anti-CD20-Antikörpers nur 0,1 % der im Serum nachweisbaren Konzentration [132]. Doch eine hohe Antikörperkonzentration im Liquor führt nicht zwangsläufig zu einer besseren Wirksamkeit, wie durch eine klinische Studie mit intrathekaler Applikation von Rituximab bei SPMS-Patienten demonstriert wurde: Die Anzahl der B-Zellen im Liquor wurde zwar signifikant reduziert, allerdings wurden nur 10-20 % der B-Zellen im ZNS depletiert [127]. Der Mangel an natürlichen Killerzellen

und Komplement wurde für das Therapieversagen verantwortlich gemacht [127]. Es scheint, als sei die Wirksamkeit der zurzeit verfügbaren Typ-I-Antikörper vielmehr von der Aktivierung der antikörperabhängigen zellvermittelten Zytotoxizität (*antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity* = ADCC) und der komplementabhängigen Zytolyse (*complement dependent cytotoxicity* = CDC) abhängig [127, 133, 134]. Selbiges wurde für Alemtuzumab sowohl *in vitro* [41] als auch *in vivo* [97] beschrieben, weshalb jene Gründe für eine erfolglose Therapie in fortgeschrittenen Stadien der MS auch für Alemtuzumab gelten könnten. Doch letztlich bedürfen die Prozesse der Schrankenstörung und die Mechanismen der Antikörperwirkung im ZNS weiterer eingehender Untersuchungen, wobei in der Verwendung von *Brain-Shuttles* zur Verbesserung der Penetration der Antikörper [135] und der Entwicklung von Typ-II-Antikörpern, die eine direkte Apoptose der Zielzellen induzieren [136], mögliche Lösungsansätze liegen könnten.

In Zusammenschau scheint nach Alemtuzumab-Gabe die Depletion zirkulierender B-Zellen in der Peripherie und nicht die bereits aggregierter B-Zellen für das Verschwinden der B-Zell-Aggregate im Kleinhirn der chronischen EAE-Mäuse verantwortlich zu sein.

4.3 Einfluss auf die Neurodegeneration

Um den neurologischen Defiziten der MS vorbeugen oder sie sogar rückgängig machen zu können, konzentrieren sich aktuelle Studien nicht nur auf die Entwicklung immunmodulatorischer Therapeutika, sondern auch auf die Etablierung neuroprotektiver Strategien [137, 138]. So erweckten die vielversprechenden Ergebnisse aus der *post-hoc* Subgruppenanalyse der CAMMS223-Studie den Eindruck, dass durch die Therapie mit Alemtuzumab eine „neuroprotektive Autoimmunität“ geschaffen wird, auf die die Verbesserung der Klinik bei RRMS-Patienten ohne aktive Entzündungsaktivität zurückzuführen ist [58] (s. 1.1.5.1). Tatsächlich berichtete die Gruppe um Turner *et al.* über eine Reduktion der demyelinisierten weißen Substanz und des Axonschadens im Rückenmark von MOG₃₅₋₅₅-immunisierten B6-Mäusen, die während der akuten EAE mit dem Anti-mCD52-AK behandelt worden waren [99]. Da der Effekt des Antikörpers auf die neurodegenerativen Prozesse in der chronischen Phase der EAE bis dato nicht untersucht worden war, wurde der Antikörper in der gemeinschaftlichen Studie der Arbeitsgruppe etwa 60 Tage nach Beginn der MP4-induzierten EAE in B6-Mäusen

verabreicht und dessen Wirkung auf das lumbale Rückenmark und Kleinhirn sowohl immunhistochemisch als auch ultrastrukturell evaluiert [105]: Im Gegensatz zu Turner *et al.* konnten in der lichtmikroskopischen Analyse zur Myelinschädigung mittels Luxol-Fast-Blue-Färbung und zur Axonschädigung mittels SMI-32-Färbung (Antikörper gegen nichtphosphoryliertes Neurofilament) keine Unterschiede zwischen Anti-mCD52- und Isotyp-Kontroll-AK behandelten Mäusen festgestellt werden [105]. Da sich in der Immunhistochemie demyelinisierende Nervenfasern aufgrund der noch vorhandenen Myelinlamellen durchaus normal anfärben lassen und damit das Bild einer vermeintlich physiologischen Myelinscheide entstehen kann, wurde die Morphologie der Markscheide zusätzlich im Elektronenmikroskop beurteilt, in dem das Ablösen der Myelinlamellen ultrastrukturell eindeutig sichtbar und mithilfe der *g-Ratio* objektiv quantifizierbar ist (2.6.3.1). Ferner sind im Elektronenmikroskop einzelne Neurofilamente darstellbar, sodass zwischen einer beginnenden und irreversiblen Axonschädigung unterschieden werden kann (2.6.3.2). Die ultrastrukturelle Betrachtung ist damit sensitiver als die lichtmikroskopische. Im Rahmen der elektronenmikroskopischen Auswertung war es allerdings aufgrund der Bildqualität nicht möglich, ein Makro zur automatisierten Analyse der Bilder zu etablieren (2.6.3). Mit einem Makro könnte die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse jedoch verbessert und die Grundlage für ähnliche Folgeprojekte gebildet werden, weshalb die Arbeitsgruppe um eine Optimierung der Bildqualität (Verbesserung des Einbettprotokolls für das Kleinhirn) bemüht ist. Die Schwierigkeit bestand in der gleichmäßigen Fixierung bis ins Gewebeinnere bei der im Vergleich zum Rückenmark großen Oberfläche und dem umgekehrten Verhältnis von weißer (innen) und grauer (außen) Substanz des Kleinhirns. Ein möglicher Ansatzpunkt wäre das von Heidelberger Forschern entwickelte Fixier- und Färbeverfahren, wodurch sich das Gehirn der Maus so präparieren lässt, dass es in seiner Gesamtheit mit der *serial block-face*-Elektronenmikroskopie analysiert und myelinisierte Axone verfolgt werden können [139].

Wie auch in der vorangegangenen longitudinalen ultrastrukturellen Studie der Arbeitsgruppe zur MP4-induzierten EAE in B6-Mäusen [140] war die Anzahl der Axone, die eine Demyelinisierung und einen Axonschaden aufwiesen, und der Axonverlust bei den immunisierten Mäusen im Vergleich zu den nicht-immunisierten Mäusen in der vorliegenden Arbeit signifikant erhöht (Abb. 12-13). Doch auch die ultrastrukturelle

Analyse der Myelindegeneration ergab keine Unterschiede zwischen den mit Anti-mCD52- und Isotyp-Kontroll-AK behandelten Mäusen (Abb. 12b u. 13b). Da durch den Anti-CD52-Antikörper Plasmazellen nicht/kaum depletiert werden (4.2), scheint die resultierende unbeeinträchtigte Antikörperproduktion gegen das Myelinisationsprotein MP4 (Abb. 10) als Grund für die persistierende Demyelinisierung sehr wahrscheinlich (Pattern II-Läsion, s. 1.1.3). Die Mechanismen, die zu einer Axonschädigung führen können, ob nun als Folge der Demyelinisierung oder isoliert auftretend, sind vielfältig [141] und stellen alle potentiell neuroprotektive Behandlungsansätze dar [138]: Die klassische Auffassung ist, dass es durch die Demyelinisierung zu einer erheblichen Störung der Reizweiterleitung kommt und infolgedessen Oligodendrozyten aktiviert und zur Bildung extrinsischer Faktoren angeregt werden, die Einfluss auf die Reifung und Trophik des Axons nehmen [142]. Bereits eine kleine Veränderung der Myelinkomposition hat somit Auswirkungen auf die Neurofilamentphosphorylierung, das Axonkaliber und kann letztlich zu axonaler Degeneration/axonalem Verlust führen [143]. Weiterhin ist es naheliegend, dass demyelinisierte Nervenfasern durch die Sekretionsprodukte von aktivierten Immunzellen leichter geschädigt werden können [141]. Inzwischen berichten jedoch immer mehr Studien, dass die Axondegeneration zumindest teilweise auch unabhängig von der Demyelinisierung sowohl bei MS-Patienten als auch im Tiermodell auftritt und bereits in frühen Phasen der Erkrankung nachgewiesen werden kann [16, 144, 145]. So können auch Axone mit intakter Markscheide u. a. durch toxische Faktoren (TNF- α , NO, Glutamat) aktivierter Makrophagen und Mikroglia [16, 146, 147] (1.1.3), Komplementaktivierung [148] und CD8⁺ zytotoxische T-Zellen [149, 150] geschädigt werden.

Nun konnte im Gegensatz zur immunhistochemischen Analyse ultrastrukturell bei den Anti-mCD52-AK behandelten Mäusen eine signifikante Reduktion pathologischer Axone und ein verringerter axonaler Verlust festgestellt werden (Abb. 12c und 13c), weshalb man schlussfolgern könnte, dass die Depletion CD8⁺ T-Zellen durch den Antikörper [45] dafür verantwortlich ist. Da es methodisch allerdings nicht möglich war, das Ausmaß der Depletion CD8⁺ T-Zellen zu bestimmen (BD FACSCanto II Zellscanner ist lediglich mit drei Lasern ausgestattet), bleibt diese Vermutung spekulativ. Bei zukünftigen Projekten wäre es daher sinnvoll, CD8⁺ T-Zellen, die in der MS-Pathogenese

eine größere Rolle spielen als bislang vermutet [11, 12], in die Untersuchungen miteinzubeziehen.

Letztlich kann durch die ultrastrukturelle Untersuchung die ZNS-Mikromorphologie zwar eindeutig beschrieben werden, Rückschlüsse auf den zugrunde liegenden Pathomechanismus sind aber nur eingeschränkt möglich.

Zuletzt wurde die Bestimmung des Hirnvolumens vor und nach der Behandlung der Mäuse als Verlaufparameter für eine Behinderungsprogression herangezogen. Die Untersuchung zeigte, dass das Groß- und Kleinhirnvolumen nach der murinen Anti-CD52-Antikörper-Therapie unverändert blieb, während das Ventrikelvolumen scheinbar zunahm (Abb. 14). Die naheliegende Schlussfolgerung, der Antikörper könne eine Progression der Hirnatrophie in fortgeschrittenen Stadien der Erkrankung nicht verhindern, kann aus den vorliegenden Daten jedoch nicht gezogen werden, da aufgrund der geringen Gruppengröße keine belastbare Statistik gegeben ist. Demgegenüber wäre eine longitudinale Studie zur Hirnatrophie über mehrere Wochen in Korrelation zum „atypischen“ EAE-Score, in dem die sensomotorischen Defizite erfasst werden [66], aussagekräftiger als der Vergleich zu dem in dieser Studie verwendeten „typischen“ EAE-Score, mit dem lediglich die motorische Einschränkung der Mäuse beurteilt werden kann und der vielmehr mit der Rückenmarksschädigung/-atrophie, die im MRT nur bedingt darstellbar ist [151], einhergeht. Es scheint allerdings so, dass selbst bei dieser Studienkonstellation der Antikörper bei Gabe in der chronisch-progredienten Phase der EAE keinen Einfluss auf die Hirnatrophie nehmen wird, da in einer Studie zum Langzeiteffekt von Alemtuzumab bei SPMS-Patienten demonstriert wurde, dass es trotz erfolgreicher Suppression der Inflammation zu einer progredienten ZNS-Atrophie und Behinderung der Patienten kam [152]. Dies legt nahe, dass die degenerativen Prozesse unabhängig von den anfangs gewiss entscheidenden inflammatorischen Prozessen ablaufen und ab einem bestimmten Zeitpunkt (vermutlich mit dem Erreichen der kritischen Schwelle für irreversible Schäden [12]) selbst bei maximaler immunmodulatorischer Therapie nicht zu beeinflussen sind. Da die Mäuse in dem hier verwendeten Tiermodell von Beginn an eine chronische Klinik aufweisen, überschreiten sie vermutlich sehr früh nach dem akuten Krankheitspeak diese Schwelle, weshalb wahrscheinlich die murine Anti-CD52-Antikörper-Therapie in der vorliegenden Arbeit nicht mehr greifen konnte. Umso interessanter wäre es deshalb, im Vergleich zur

vorliegenden Arbeit die Wirkung von Ocrelizumab in der MP4-induzierten EAE zu untersuchen. Mit dem humanisierten Antikörper Ocrelizumab, einer Weiterentwicklung von Rituximab aufgrund der vielversprechenden Datenlage zur B-Zell-Depletion bei autoimmunen Erkrankungen, welcher an ein anderes Epitop von CD20 bindet und dadurch vorwiegend eine ADCC hervorruft [153], steht seit 2018 erstmals ein Medikament zur Verfügung, das zu einer signifikanten Reduktion der Behinderungsprogression bei PPMS führt [154] (siehe 1.1.5). So konnte in der Phase-III-Studie (ORATORIO-Studie) gezeigt werden, dass die mit Ocrelizumab behandelten PPMS-Patienten bessere Ergebnisse im Gehstest, ein geringeres cerebrales Läsionsvolumen und eine geringere Hirnatrophie gegenüber Placebo hatten [154]. Bislang ist jedoch nur wenig über die zugrundeliegenden Mechanismen bekannt [155], weshalb es sich anbieten würde, den Einfluss des Antikörpers auf die neurodegenerativen Prozesse im MP4-Modell der Arbeitsgruppe zu evaluieren. Allerdings ist zu beachten, dass trotz vieler Gemeinsamkeiten zwischen diesem Modell und der humanen MS (1.2.1.3) bisher noch kein EAE-Modell existiert, welches die spezifische Klinik und die neuropathologischen Eigenschaften der progredienten MS exakt wiedergibt [156], weshalb die Übertragbarkeit von Ergebnissen aus Tierversuchen auf den Menschen kontrovers diskutiert wird.

4.4 Einfluss auf die Neuroregeneration

Trotz der enormen Verbesserung der Immunantwort durch die Immunmodulation neu zugelassener MS-Therapeutika, ist wenig über deren Potenzial zur spezifischen Förderung von Reparaturmechanismen, vor allem der Remyelinisierung, bekannt. Die genauen Mechanismen der Remyelinisierung sind zwar noch nicht hinreichend geklärt, während der Remyelinisierung werden jedoch im Wesentlichen die Prozesse der physiologischen Myelinisierung wiederholt, die im ZNS, allerdings nur unvollständig, durch Oligodendrozyten-Vorläuferzellen (*oligodendrocyte precursor cells* = OPCs) vermittelt werden [143, 157]. Wird eine Nervenzelle im ZNS geschädigt, proliferieren die OPCs (durch neurotrophe Faktoren angeregt), wandern zum reparaturbedürftigen Neuron und differenzieren zum reifen markbildenden Oligodendrozyten [143, 157]. Experimentelle und klinische Studien zum Anti-CD52-Antikörper deuteten auf einen remyelinisierungsfördernden Effekt hin, gemessen an der erhaltenen axonalen

Leitungsgeschwindigkeit in der MOG₃₅₋₅₅-induzierten akuten EAE [99] und der vermehrten Synthese von Neurotrophinen bei RRMS-Patienten [58] nach der Antikörperbehandlung. Im Gegensatz dazu konnte bei den MP4-induzierten chronisch kranken Mäusen nach der Antikörperbehandlung weder in der immunhistochemischen (Olig2⁺APC⁺ Färbung) [105] noch in der ultrastrukturellen Analyse (Abb. 12b u. 13b) des lumbalen Rückenmarks und Kleinhirns eine gesteigerte Remyelinisierung festgestellt werden. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte darin liegen, dass analog zur Situation bei MS die Kapazität zur Remyelinisierung mit dem Alter abnimmt, was auf eine erschwerte Differenzierung der OPCs durch die zunehmende Azetylierung von Histonen im Alter zurückzuführen ist [143].

Neuere therapeutische Ansätze zur Regeneration konzentrieren sich daher auf die direkte Unterstützung der endogenen Remyelinisierung: So wurde Opicinumab, ein monoklonaler Antikörper gegen das ausschließlich im ZNS exprimierte Transmembranprotein LINGO-1 (*Leucine rich repeat and Immunoglobulin-like domain-containing protein 1*), entwickelt, da grundlagenwissenschaftliche Studien gezeigt hatten, dass LINGO-1 die Remyelinisierung hemmt und die Inhibition von LINGO-1 eine verstärkte OPC-Differenzierung in mehreren MS-Tiermodellen bewirkte [158, 159]. In der placebokontrollierten Phase-II-Studie zu anti-LINGO-1 bei RRMS- und SPMS-Patienten (SYNERGY-Studie) wurde der primäre Endpunkt mit Verbesserung der neurophysiologischen und kognitiven Funktionen jedoch nicht erreicht [160]. Die *Post-hoc*-Analyse der SYNERGY-Studie deutet allerdings darauf hin, dass das Medikament in einer Subgruppe der Studienteilnehmer, die sich u. a. durch eine kurze Erkrankungsdauer kennzeichnete, besser wirksam ist, weshalb die aktuell laufende AFFINITY-Studie initiiert wurde, um jene Subpopulation zu identifizieren, die von einer Opicinumab-Behandlung profitieren könnte [161]. Weitere derzeit verfolgte remyelinisierungsfördernde Therapiestrategien umfassen u. a. hochdosiertes Biotin (Vitamin B₇), welches in einer Phase-II-Studie an PPMS-Patienten zeigte, dass perorales Biotin (vermutlich als Kofaktor für Enzyme der Myelinbildung) die Behinderungsprogression, gemessen an der Gehfähigkeit, aufhalten/verbessern kann [162, 163] sowie das Antihistaminikum Clemastin, das in einer Phase-II-Studie bei RRMS-Patienten mit chronischer Optikusneuropathie zu einer signifikanten

P100-Latenzverbesserung führte, was als Zeichen einer Remyelinisierung gedeutet wurde [164].

Seit einigen Jahren finden sich außerdem Bemühungen, untergegangene Oligodendrozyten durch Transplantation myelinbildender Stammzellen zu ersetzen, wobei kritische Aspekte für die Anwendung beim Menschen die Herkunft und Art der Stammzellen sowie das Entartungsrisiko darstellen [165]. Derzeit am vielversprechendsten erscheint die autologe Transplantation von aus dem Knochenmark gewonnenen mesenchymalen Stammzellen (*Mesenchymal Stem Cells* = MSCs): Connick *et al.* berichteten in einer Phase-IIa-Studie an zehn SPMS-Patienten über eine sichere intravenöse Applikation autologer MSCs, die zu einer signifikanten Verbesserung des Visus und der Latenzen der visuell evozierten Potenziale führte [166]. Darüber hinaus zeigte eine kleine Pilotstudie zur intrathekalen Transplantation autologer MSCs bei Patienten mit progredienter MS eine Verringerung der klinischen Beeinträchtigung bei vier von sechs Patienten, die über einen Zeitraum von etwa sieben Jahren nachbeobachtet wurden [167]. Es wird angenommen, dass MSCs im ZNS durch ihre immunregulatorischen und neurotrophen Eigenschaften regenerative Prozesse fördern [168]. Da das therapeutische Potenzial der MSC-Transplantation bei MS aufgrund der aktuellen Datenlage nicht abzuschätzen ist, wurden größere u. a. weltweite placebokontrollierte, doppelblinde und randomisierte Studien an Patienten mit schubförmig-remittierender und progredienter MS initiiert (MESEMS- u. ACTiMuS-Studie) [165, 169], um nach Analyse einer größeren Teilnehmerzahl und unterschiedlicher Verläufe sichere Aussagen über den Nutzen dieser innovativen, aber aufwendigen und invasiven Behandlungsstrategie treffen zu können.

In Zusammenschau unterdrücken die verlaufsmodifizierenden Therapeutika der MS zwar effektiv den autoimmunen Entzündungsprozess (4.2), sie haben jedoch wenig Einfluss auf die Neurodegeneration (4.3). Die Remyelinisierungsförderung als neues Therapiekonzept der MS ist deshalb zunehmend Gegenstand aktueller Forschung, wodurch viele verschiedene potenziell neuroregenerative Ansätze identifiziert werden konnten. Es bleibt abzuwarten, welchen Stellenwert die medikamentöse Therapie und die Stammzelltransplantation zur Förderung der Neuroregeneration in Zukunft einnehmen wird und ob eine Umsetzung in die Klinik aufgrund der Heterogenität der Patienten und des unvollständigen Verständnisses der Remyelinisierung beim Menschen gelingen wird.

4.5 Schlussfolgerung und Ausblick

Bei der vorliegenden Arbeit handelt es sich um die erste detaillierte Untersuchung zum Einfluss des murinen Anti-CD52-Antikörpers auf die neurodegenerativen Prozesse Demyelinisierung, Axonschaden und Hirnatrophie in der MP4-induzierten EAE der B6-Maus im chronischen Stadium der Erkrankung. Während bei effektiver T- und B-Zell-Depletion das Fortschreiten der Axonschädigung verhindert werden konnte, hatte der Antikörper keinen Effekt auf bereits vorhandene Axonschäden. Die Myelindegeneration und -regeneration sowie der Verlust der Hirnsubstanz blieben von der Behandlung unbeeinflusst, wobei Schwachstellen der Studie berücksichtigt werden müssen. Betrachtet man darüber hinaus die unveränderte Klinik der behandelten Mäuse, konnten die vielversprechenden Ergebnisse zur Akuttherapie der EAE bei Applikation des Antikörpers im chronischen Verlauf nicht bestätigt werden. Für ein besseres Verständnis der zugrunde liegenden Mechanismen sind jedoch, auch in Hinblick auf Ocrelizumab als PPMS-Therapeutikum, weitere Studien zur Durchlässigkeit der BHS für Antikörper und ihrer Wirkung im ZNS erforderlich. Die Entwicklung von Typ-II-Antikörpern, die weniger CDC abhängig, sondern vielmehr durch direkte Apoptoseinduktion wirken [136, 170], könnte eine Strategie darstellen. Weiterhin könnte der Einsatz von selektiveren neuroprotektiven [138] und remyelinisierungsfördernden [143, 165] Behandlungsansätzen, welche ein hochaktuelles Gebiet der MS-Forschung darstellen, die bestehenden immunmodulatorischen Therapeutika in Zukunft sinnvoll ergänzen. Insgesamt bleibt abzuwarten, inwieweit eine Kombinationstherapie zu einer besseren Kontrolle der Erkrankung beitragen kann.

5 Zusammenfassung

Die Multiple Sklerose (MS) ist eine chronisch-entzündliche Autoimmunerkrankung des zentralen Nervensystems (ZNS) und stellt die häufigste Ursache frühzeitiger Behinderung junger Erwachsener dar. Kennzeichnend sind multifokale ZNS-Läsionen, die durch Inflammation, Demyelinisierung und Axonschäden geprägt sind und zu multiplen neurologischen Defiziten führen. Derzeit ist es mithilfe der verlaufsmodifizierenden Therapie möglich, die Immunantwort abzuschwächen und damit die Krankheitsprogression zu verzögern. Geheilt werden kann die Erkrankung jedoch bislang nicht. Dabei ist nicht hinreichend geklärt, ob die neuen Therapieoptionen über die Immunmodulation/-suppression hinaus einen anhaltenden Schutz vor der langfristigen Neurodegeneration bieten.

Basierend auf den vielversprechenden Ergebnissen klinischer Studien zur Therapie der schubförmig-remittierenden MS mit dem Anti-CD52-Antikörper Alemtuzumab, der zu einer Depletion CD52-exprimierender Immunzellen führt, wurden diesbezüglich Analysen in MS-Tiermodellen durchgeführt. Da die Untersuchung der zugrunde liegenden Patho- und Effektoormechanismen am Menschen kaum möglich ist, ist die MS-Forschung für ein tiefergehendes Verständnis auf Tiermodelle angewiesen. Die experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis (EAE) ist hierbei das am weitesten verbreitete Modell der MS, wofür vor allem der C57BL/6 (B6) -Mausstamm verwendet wird, da auf diesem Hintergrund die meisten genmodifizierten Mäuse gezüchtet werden. Jene tierexperimentellen Studien, in denen ein muriner Anti-CD52-Antikörper im frühen Krankheitsstadium der EAE (Aufreten erster paralytischer Symptome) verabreicht wurde, erbrachten den Hinweis einer neuroprotektiven und scheinbar regenerativen Wirkung des Antikörpers.

Über einen neuroprotektiven Effekt von Alemtuzumab im schwer behandelbaren chronisch-progredienten Stadium der MS ist jedoch wenig bekannt. Die vorliegende Arbeit ist die erste detaillierte Untersuchung zum Einfluss des murinen Anti-CD52-Antikörpers auf die Demyelinisierung, den Axonschaden und die Hirnatrophie in der MP4-induzierten EAE der B6-Maus im chronischen Verlauf der Erkrankung (ab stabilem Plateau der klinischen Symptomatik). MP4 ist ein Myelinisationsprotein aus MBP (Myelin-Basisches-Protein) und PLP (Proteolipidprotein), welches in B6-Mäusen durch aktive Immunisierung eine EAE induziert, die chronisch verläuft und als eines von

wenigen Modellen neben der T-Zell-Abhängigkeit die an Bedeutung zunehmende B-Zell-Komponente der MS darstellt. Histopathologisch finden sich in der chronischen MP4-induzierten EAE eine ausgeprägte Rückenmarks- und Kleinhirnschädigung, die vor allem im Kleinhirn durch eine B-Zell-Aggregation charakterisiert ist.

Nachdem die MP4-immunisierten Mäuse im chronischen Stadium der EAE an fünf aufeinanderfolgenden Tagen mit 10 mg/kg Körpergewicht murinem Anti-CD52-spezifischem IgG2a-Isotypantikörper bzw. murinem unspezifischem IgG2a-Isotyp-Kontroll-Antikörper behandelt worden waren, wurde die Lymphozytendepletion im peripheren Blut durchflusszytometrisch ermittelt und deren Einfluss auf MP4-spezifische Antikörper anhand eines indirekten *Enzyme-linked Immunosorbent Assays* (ELISAs) untersucht. Als Marker für Axonschäden wurde im Serum vorhandenes phosphoryliertes Neurofilament-*Heavy* (pNF-H) mithilfe eines indirekten *Sandwich-ELISAs* quantitativ bestimmt. Rückenmark und Kleinhirn wurden ultrastrukturell auf Veränderungen der Myelinisierung (mittels *g-Ratio*: Axondurchmesser geteilt durch Gesamtdurchmesser der Nervenfasern) und auf Axonpathologien (verringertes Abstand benachbarter Neurofilamente, axolytische Axone, axonaler Verlust) untersucht. Die Hirnatrophie wurde MRT-basiert gemessen und der klinische Verlauf täglich evaluiert.

Durch die Anti-CD52-Antikörperbehandlung wurde die T- und B-Zellzahl zwar drastisch vermindert, die MP4-spezifische Antikörperproduktion blieb davon jedoch unbeeinträchtigt. Ein günstiger Effekt auf die De- und Remyelinisierung war nicht festzustellen. Das Hirnvolumen und die klinische Präsentation der Mäuse blieben ebenfalls unverändert. Während kein Unterschied der pNF-H-Konzentration zu erkennen war, konnte ultrastrukturell jedoch ein geringerer Axonschaden nachgewiesen werden.

Insgesamt legen diese Ergebnisse nahe, dass der Anti-CD52-Antikörper im chronischen Verlauf der EAE/MS wenig Einfluss auf die neurodegenerativen Prozesse nimmt und die Regeneration nicht fördern kann. Die Ursache liegt vermutlich in der Undurchlässigkeit der Bluthirnschranke für Antikörper sowie dem limitierten Verständnis der Antikörperwirkung im ZNS. Die vorliegende Studie regt somit zur Etablierung von ZNS-wirksamen Antikörpern an und unterstreicht die Bedeutung der Entwicklung von selektiveren neuroprotektiven und remyelinisierungsfördernden Behandlungsansätzen, die eine wertvolle Ergänzung zur verlaufsmodifizierenden Therapie darstellen könnten.

6 Summary

Multiple sclerosis (MS) is a chronic inflammatory autoimmune disorder of the central nervous system (CNS) and the most frequent cause of early disabilities in young adults. Multifocal CNS lesions are typical for the disease and characterized by inflammation, demyelination and axonal pathology that lead to multiple neurological deficits. Currently disease modifying therapies (DMTs) make it possible to reduce the immune response and to delay the progression of the disease, but there is still no cure for MS. However, it is not fully understood whether these new treatment options provide long-lasting protection against neurodegeneration beyond immune modulation/-suppression.

Based on promising data from clinical studies of the anti-CD52 antibody alemtuzumab for the treatment of relapsing-remitting MS that leads to depletion of CD52-expressing lymphocytes, investigations on this question were performed in animal models for MS. Since studies of the underlying pathomechanisms and effector functions are difficult to carry out in humans, MS research is still dependent on animal models to gain deeper understanding. Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) is the most widely distributed model for MS, for which the C57BL/6 (B6) mouse strain is commonly used, since most gene-modified mice are bred on this background. The animal experiments that applied a murine anti-CD52 antibody at early disease stage of EAE (first appearance of paralytic symptoms) indicated a neuroprotective and apparent regenerative effect of the antibody.

Indeed, little is known about a neuroprotective effect of alemtuzumab when given at the chronic progressive phase of MS which is still difficult to treat. The present study is the first detailed investigation on the impact of the murine anti-CD52 antibody on demyelination, axonal damage and brain atrophy in MP4-induced EAE in B6 mice during the chronic stage of the disease (starting at stable plateau of clinical symptoms). MP4 is a myelin fusion protein of MBP (myelin basic protein) and PLP (proteolipid protein) that induces chronic EAE in B6 mice via active immunization. MP4-induced EAE is one of the few models that reflects the B cell component in addition to the T cell-mediated features of MS. Its chronic stage is characterized by severe spinal cord and cerebellar pathology with B cell aggregation especially in the cerebellum.

After MP4-induced mice were treated at the chronic stage of EAE either with 10 mg/kg body weight murine anti-CD52 specific IgG2a isotype antibody or murine unspecific

IgG2a isotype control antibody for five consecutive days, flow cytometric analysis of lymphocyte depletion was performed on peripheral blood and its effect on MP4-specific antibodies was determined by indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The level of released phosphorylated neurofilament-heavy (pNF-H) in the serum as a marker for axonal damage was measured by indirect Sandwich-ELISA. Change of myelination (by using the g-ratio: axon diameter divided by nerve fiber diameter) and axonal pathology (decreased nearest neighbour neurofilament distance, axolytic axons, axonal loss) was evaluated in spinal cord and cerebellum by electron microscopy. Brain atrophy was measured based on MRI and clinical course was daily evaluated.

The treatment with the anti-CD52 antibody drastically reduced the number of T cells and B cells, while the titers of MP4-specific antibodies remained unaffected. There was no effect on de- and remyelination. Furthermore, brain volume and clinical disease severity remained unaltered. While there was no difference in pNF-H concentration, on the ultrastructural level the number of damaged axons was decreased.

In sum, these data reveal that the anti-CD52 antibody has a low impact on neurodegenerative processes and none on regeneration in the chronic stage of EAE/MS. This is probably due to the impermeability of the blood-brain barrier for antibodies and the limited understanding of the effects of antibody treatment in the CNS. Thus, this study points towards the need for effective antibody treatment in the CNS as well as for more selective neuroprotective and remyelination promoting therapeutic strategies that could complement the existing DMTs.

7 Eigenanteil und Vorabveröffentlichung der Daten

Diese Studie wurde im Rahmen eines gemeinschaftlichen Projektes der Arbeitsgruppe durchgeführt. Die Untersuchung der klinischen Parameter, der Lymphozytendepletion und der MP4-spezifischen Antikörperproduktion der chronisch kranken Mäuse wurde zu gleichen Teilen gemeinsam von meinem Co-Doktoranden Herrn M. Simon und mir durchgeführt und ausgewertet (3.1 – 3.2). Die Analyse der Neurodegeneration und -regeneration bezüglich Demyelinisierung, Remyelinisierung, Axonschaden und Hirnatrophie mittels Elektronenmikroskopie, pNF-H-ELISA und MR-Bildgebung wurde von mir durchgeführt, ausgewertet und dient der Beantwortung der zentralen Forschungsfrage dieser Arbeit (3.3 – 3.5). Herr M. Simon führte die Auswertung der klinischen Parameter der akut kranken Mäuse, den Immunassay (*Enzyme-linked Immuno Spot Assay*) zur Bestimmung MP4-spezifischer B-Zellen und die Analyse der B-Zell-Aggregation, Demyelinisierung, Remyelinisierung und Axonschädigung mittels Immunhistochemie durch. Seine Ergebnisse werden in Kapitel 4.1 bis 4.4 mit meinen Ergebnissen verglichen, um die Einordnung in den Gesamtkontext zu ermöglichen.

Teilergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden in folgendem Aufsatz [105] vorab veröffentlicht:

Simon M*, Ipek R*, Homola GA, Rovituso DM, Schampel A, Kleinschnitz C, Kuerten S (2018) Anti-CD52 antibody treatment depletes B cell aggregates in the central nervous system in a mouse model of multiple sclerosis. *J Neuroinflammation* 15(1): 225.

* geteilte Erstautorenschaft

8 Literaturverzeichnis

1. Compston A, Coles A (2008) Multiple sclerosis. *Lancet* 372(9648): 1502-1517.
2. Trapp BD, Nave KA (2008) Multiple sclerosis: an immune or neurodegenerative disorder? *Annu Rev Neurosci* 31: 247-269.
3. Wiendl H, Klotz L, Friese M, Limmroth V et al. (2018) Multiple Sklerose und andere demyelinisierende Erkrankungen, S. 684-769. In *Therapie und Verlauf neurologischer Erkrankungen*. (Hrsg.) HC Diener, C Gerloff, M Dieterich. Stuttgart: Kohlhammer.
4. Popescu BF, Pirko I, Lucchinetti CF (2013) Pathology of multiple sclerosis: where do we stand? *Continuum (Minneapolis)* 19(4 Multiple Sclerosis): 901-921.
5. Sospedra M, Martin R (2005) Immunology of multiple sclerosis. *Annu Rev Immunol* 23: 683-747.
6. Kingwell E, Marriott JJ, Jette N, Pringsheim T et al. (2013) Incidence and prevalence of multiple sclerosis in Europe: a systematic review. *BMC Neurol* 13: 128.
7. Petersen G, Wittmann R, Arndt V, Gopffarth D (2014) [Epidemiology of multiple sclerosis in Germany: regional differences and drug prescription in the claims data of the statutory health insurance]. *Nervenarzt* 85(8): 990-998.
8. Dutta R, Trapp BD (2014) Relapsing and progressive forms of multiple sclerosis: insights from pathology. *Curr Opin Neurol* 27(3): 271-278.
9. Lublin FD, Reingold SC (1996) Defining the clinical course of multiple sclerosis: results of an international survey. National Multiple Sclerosis Society (USA) Advisory Committee on Clinical Trials of New Agents in Multiple Sclerosis. *Neurology* 46(4): 907-911.

10. Lublin FD, Reingold SC, Cohen JA, Cutter GR et al. (2014) Defining the clinical course of multiple sclerosis: the 2013 revisions. *Neurology* 83(3): 278-286.
11. Friese MA, Fugger L (2009) Pathogenic CD8(+) T cells in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 66(2): 132-141.
12. Dendrou CA, Fugger L, Friese MA (2015) Immunopathology of multiple sclerosis. *Nat Rev Immunol* 15(9): 545-558.
13. Lehmann PV, Rottlaender A, Kuerten S (2015) The autoimmune pathogenesis of multiple sclerosis. *Pharmazie* 70(1): 5-11.
14. Kleinschnitz C, Meuth SG, Kieseier BC, Wiendl H (2007) [Update on pathophysiologic and immunotherapeutic approaches for the treatment of multiple sclerosis]. *Nervenarzt* 78(8): 883-911.
15. Lucchinetti C, Bruck W, Parisi J, Scheithauer B et al. (2000) Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination. *Ann Neurol* 47(6): 707-717.
16. Friese MA, Schattling B, Fugger L (2014) Mechanisms of neurodegeneration and axonal dysfunction in multiple sclerosis. *Nat Rev Neurol* 10(4): 225-238.
17. Meinl E, Krumbholz M, Hohlfeld R (2006) B lineage cells in the inflammatory central nervous system environment: migration, maintenance, local antibody production, and therapeutic modulation. *Ann Neurol* 59(6): 880-892.
18. Magliozzi R, Howell O, Vora A, Serafini B et al. (2007) Meningeal B-cell follicles in secondary progressive multiple sclerosis associate with early onset of disease and severe cortical pathology. *Brain* 130(Pt 4): 1089-1104.

19. Kuerten S, Schickel A, Kerkloh C, Recks MS et al. (2012) Tertiary lymphoid organ development coincides with determinant spreading of the myelin-specific T cell response. *Acta Neuropathol* 124(6): 861-873.
20. von Budingen HC, Harrer MD, Kuenzle S, Meier M et al. (2008) Clonally expanded plasma cells in the cerebrospinal fluid of MS patients produce myelin-specific antibodies. *Eur J Immunol* 38(7): 2014-2023.
21. Hauser SL, Waubant E, Arnold DL, Vollmer T et al. (2008) B-cell depletion with rituximab in relapsing-remitting multiple sclerosis. *N Engl J Med* 358(7): 676-688.
22. Hauser SL, Bar-Or A, Comi G, Giovannoni G et al. (2017) Ocrelizumab versus Interferon Beta-1a in Relapsing Multiple Sclerosis. *N Engl J Med* 376(3): 221-234.
23. Cortese I, Chaudhry V, So YT, Cantor F et al. (2011) Evidence-based guideline update: Plasmapheresis in neurologic disorders: report of the Therapeutics and Technology Assessment Subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology* 76(3): 294-300.
24. Gold R (2014) S2e-Leitlinie Diagnose und Therapie der Multiplen Sklerose. *Deutsche Gesellschaft für Neurologie (DGN)*: 1 - 52.
25. Thompson AJ, Banwell BL, Barkhof F, Carroll WM et al. (2018) Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria. *Lancet Neurol* 17(2): 162-173.
26. Filippi M, Rocca MA, De Stefano N, Enzinger C et al. (2011) Magnetic resonance techniques in multiple sclerosis: the present and the future. *Arch Neurol* 68(12): 1514-1520.

27. Rovira A, Wattjes MP, Tintore M, Tur C et al. (2015) Evidence-based guidelines: MAGNIMS consensus guidelines on the use of MRI in multiple sclerosis-clinical implementation in the diagnostic process. *Nat Rev Neurol* 11(8): 471-482.
28. Ruet A, Arrambide G, Brochet B, Auger C et al. (2014) Early predictors of multiple sclerosis after a typical clinically isolated syndrome. *Mult Scler* 20(13): 1721-1726.
29. Kuhle J, Disanto G, Dobson R, Adutori R et al. (2015) Conversion from clinically isolated syndrome to multiple sclerosis: A large multicentre study. *Mult Scler* 21(8): 1013-1024.
30. KKNMS Krankheitsbezogenes Kompetenznetz Multiple Sklerose e. V. (2020). Qualitätshandbuch MS / NMOSD: Empfehlungen zur Therapie der Multiplen Sklerose / Neuro myelitis-optica-Spektrum-Erkrankungen für Ärzte. Verfügbar unter: https://www.kompetenznetz-multiplesklerose.de/wp-content/uploads/2020/03/KKNMS_Qualit%C3%A4tshandbuch-MSNMOSED_202001_webfrei-1.pdf. Stand: Januar 2020.
31. DGN Deutsche Gesellschaft für Neurologie. Diagnose und Therapie der Multiplen Sklerose. Verfügbar unter: <https://www.dgn.org/leitlinien/2333-ll-31-2012-diagnose-und-therapie-der-multiplen-sklerose>. Stand: 25.11.2019.
32. Yong VW (2002) Differential mechanisms of action of interferon-beta and glatiramer acetate in MS. *Neurology* 59(6): 802-808.
33. Schmidt S (2010) [Oral cladribine for relapsing-remitting multiple sclerosis: another purine analogue or a genuine therapeutic innovation?]. *Nervenarzt* 81(10): 1231-1241.
34. Brinkmann V, Davis MD, Heise CE, Albert R et al. (2002) The immune modulator FTY720 targets sphingosine 1-phosphate receptors. *J Biol Chem* 277(24): 21453-21457.

35. Steinman L (2005) Blocking adhesion molecules as therapy for multiple sclerosis: natalizumab. *Nat Rev Drug Discov* 4(6): 510-518.
36. ROCHE (2018) Roche's OCREVUS (ocrelizumab) approved in the European Union for relapsing forms of multiple sclerosis and primary progressive multiple sclerosis. *Roche Group Media Relations*: 1-7.
37. NOVARTIS. Novartis announces EU approval of Mayzent® (siponimod) for adult patients with secondary progressive multiple sclerosis (SPMS) with active disease. Verfügbar unter: <https://www.novartis.com/news/media-releases/novartis-announces-eu-approval-mayzent-siponimod-adult-patients-secondary-progressive-multiple-sclerosis-spms-active-disease>. Stand: 20.01.2020.
38. EUROPEAN MEDICINES AGENCY. Zeposia. Verfügbar unter: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/zeposia>. Stand: 27.05.2020.
39. Hale G, Xia MQ, Tighe HP, Dyer MJ et al. (1990) The CAMPATH-1 antigen (CDw52). *Tissue Antigens* 35(3): 118-127.
40. Rao SP, Sancho J, Campos-Rivera J, Boutin PM et al. (2012) Human peripheral blood mononuclear cells exhibit heterogeneous CD52 expression levels and show differential sensitivity to alemtuzumab mediated cytotoxicity. *PLoS One* 7(6): e39416.
41. Lowenstein H, Shah A, Chant A, Khan A (2006) Different mechanisms of Campath-1H-mediated depletion for CD4 and CD8 T cells in peripheral blood. *Transpl Int* 19(11): 927-936.
42. Thompson SA, Jones JL, Cox AL, Compston DA et al. (2010) B-cell reconstitution and BAFF after alemtuzumab (Campath-1H) treatment of multiple sclerosis. *J Clin Immunol* 30(1): 99-105.

43. Heidt S, Hester J, Shankar S, Friend PJ et al. (2012) B cell repopulation after alemtuzumab induction-transient increase in transitional B cells and long-term dominance of naive B cells. *Am J Transplant* 12(7): 1784-1792.
44. Cox AL, Thompson SA, Jones JL, Robertson VH et al. (2005) Lymphocyte homeostasis following therapeutic lymphocyte depletion in multiple sclerosis. *Eur J Immunol* 35(11): 3332-3342.
45. Zhang X, Tao Y, Chopra M, Ahn M et al. (2013) Differential reconstitution of T cell subsets following immunodepleting treatment with alemtuzumab (anti-CD52 monoclonal antibody) in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. *J Immunol* 191(12): 5867-5874.
46. Havari E, Turner MJ, Campos-Rivera J, Shankara S et al. (2014) Impact of alemtuzumab treatment on the survival and function of human regulatory T cells in vitro. *Immunology* 141(1): 123-131.
47. Wiendl H, Bourdette D, Ciccarelli O (2017) Can immune reprogramming with alemtuzumab induce permanent remission in multiple sclerosis? *Neurology* 89(11): 1098-1100.
48. Coles AJ, Cox A, Le Page E, Jones J et al. (2006) The window of therapeutic opportunity in multiple sclerosis: evidence from monoclonal antibody therapy. *J Neurol* 253(1): 98-108.
49. Investigators CT, Coles AJ, Compston DA, Selmaj KW et al. (2008) Alemtuzumab vs. interferon beta-1a in early multiple sclerosis. *N Engl J Med* 359(17): 1786-1801.
50. Cohen JA, Coles AJ, Arnold DL, Confavreux C et al. (2012) Alemtuzumab versus interferon beta 1a as first-line treatment for patients with relapsing-remitting multiple sclerosis: a randomised controlled phase 3 trial. *Lancet* 380(9856): 1819-1828.

51. Coles AJ, Twyman CL, Arnold DL, Cohen JA et al. (2012) Alemtuzumab for patients with relapsing multiple sclerosis after disease-modifying therapy: a randomised controlled phase 3 trial. *Lancet* 380(9856): 1829-1839.
52. SANOFI (2019) Rote-Hand-Brief: Alemtuzumab (LEMTRADA): Einschränkung der Anwendung bei Multipler Sklerose aufgrund von Sicherheitsbedenken. *Sanofi-Aventis Deutschland GmbH*: 1-3.
53. Klotz L, Meuth SG, Kieseier B, Wiendl H (2013) [Alemtuzumab for relapsing-remitting multiple sclerosis. Results of two randomized controlled phase III studies]. *Nervenarzt* 84(8): 984-994.
54. Jones JL, Thompson SA, Loh P, Davies JL et al. (2013) Human autoimmunity after lymphocyte depletion is caused by homeostatic T-cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110(50): 20200-20205.
55. SANOFI (2020) Rote-Hand-Brief: Lemtrada® (Alemtuzumab): Einschränkung der Indikation, zusätzliche Gegenanzeigen und risikominimierende Maßnahmen. *Sanofi-Aventis Deutschland GmbH*: 1-4.
56. Havrdova E, Arnold DL, Cohen JA, Hartung HP et al. (2017) Alemtuzumab CARE-MS I 5-year follow-up: Durable efficacy in the absence of continuous MS therapy. *Neurology* 89(11): 1107-1116.
57. Coles AJ, Cohen JA, Fox EJ, Giovannoni G et al. (2017) Alemtuzumab CARE-MS II 5-year follow-up: Efficacy and safety findings. *Neurology* 89(11): 1117-1126.
58. Jones JL, Anderson JM, Phuah CL, Fox EJ et al. (2010) Improvement in disability after alemtuzumab treatment of multiple sclerosis is associated with neuroprotective autoimmunity. *Brain* 133(Pt 8): 2232-2247.

59. Ludwin SK (1978) Central nervous system demyelination and remyelination in the mouse: an ultrastructural study of cuprizone toxicity. *Lab Invest* 39(6): 597-612.
60. Kipp M, Nyamoya S, Hochstrasser T, Amor S (2017) Multiple sclerosis animal models: a clinical and histopathological perspective. *Brain Pathol* 27(2): 123-137.
61. Dal Canto MC, Kim BS, Miller SD, Melvold RW (1996) Theiler's Murine Encephalomyelitis Virus (TMEV)-Induced Demyelination: A Model for Human Multiple Sclerosis. *Methods* 10(3): 453-461.
62. Tsunoda I, Fujinami RS (2010) Neuropathogenesis of Theiler's murine encephalomyelitis virus infection, an animal model for multiple sclerosis. *J Neuroimmune Pharmacol* 5(3): 355-369.
63. Gold R, Linington C, Lassmann H (2006) Understanding pathogenesis and therapy of multiple sclerosis via animal models: 70 years of merits and culprits in experimental autoimmune encephalomyelitis research. *Brain* 129(Pt 8): 1953-1971.
64. Baxter AG (2007) The origin and application of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Nat Rev Immunol* 7(11): 904-912.
65. Batoulis H, Recks MS, Addicks K, Kuerten S (2011) Experimental autoimmune encephalomyelitis--achievements and prospective advances. *APMIS* 119(12): 819-830.
66. Stromnes IM, Goverman JM (2006) Active induction of experimental allergic encephalomyelitis. *Nat Protoc* 1(4): 1810-1819.
67. Mackay IR, Anderson WH (2010) What's in a name? Experimental encephalomyelitis: 'allergic' or 'autoimmune'. *J Neuroimmunol* 223(1-2): 1-4.

68. Stromnes IM, Goverman JM (2006) Passive induction of experimental allergic encephalomyelitis. *Nat Protoc* 1(4): 1952-1960.
69. Hofstetter HH, Shive CL, Forsthuber TG (2002) 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* 169(1): 117-125.
70. Kuerten S, Kostova-Bales DA, Frenzel LP, Tigno JT et al. (2007) MP4- and MOG:35-55-induced EAE in C57BL/6 mice differentially targets brain, spinal cord and cerebellum. *J Neuroimmunol* 189(1-2): 31-40.
71. Kuerten S, Angelov DN (2008) 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* 190(1): 1-15.
72. Kuerten S, Lichtenegger FS, Faas S, Angelov DN et al. (2006) MBP-PLP fusion protein-induced EAE in C57BL/6 mice. *J Neuroimmunol* 177(1-2): 99-111.
73. Elliott EA, McFarland HI, Nye SH, Cofield R et al. (1996) Treatment of experimental encephalomyelitis with a novel chimeric fusion protein of myelin basic protein and proteolipid protein. *J Clin Invest* 98(7): 1602-1612.
74. Kuerten S, Pauly R, Rottlaender A, Rodi M et al. (2011) Myelin-reactive antibodies mediate the pathology of MBP-PLP fusion protein MP4-induced EAE. *Clin Immunol* 140(1): 54-62.
75. Kuerten S, Javeri S, Tary-Lehmann M, Lehmann PV et al. (2008) Fundamental differences in the dynamics of CNS lesion development and composition in MP4- and MOG peptide 35-55-induced experimental autoimmune encephalomyelitis. *Clin Immunol* 129(2): 256-267.

76. Kuerten S, Gruppe TL, Laurentius LM, Kirch C et al. (2011) Differential patterns of spinal cord pathology induced by MP4, MOG peptide 35-55, and PLP peptide 178-191 in C57BL/6 mice. *APMIS* 119(6): 336-346.
77. Aggarwal S, Yurlova L, Simons M (2011) Central nervous system myelin: structure, synthesis and assembly. *Trends Cell Biol* 21(10): 585-593.
78. Merrill JE, Scolding NJ (1999) Mechanisms of damage to myelin and oligodendrocytes and their relevance to disease. *Neuropathol Appl Neurobiol* 25(6): 435-458.
79. Bruck W, Kuhlmann T, Stadelmann C (2003) Remyelination in multiple sclerosis. *J Neurol Sci* 206(2): 181-185.
80. Goldschmidt T, Antel J, König FB, Bruck W et al. (2009) Remyelination capacity of the MS brain decreases with disease chronicity. *Neurology* 72(22): 1914-1921.
81. Guy J, Ellis EA, Hope GM, Emerson S (1991) Maintenance of myelinated fibre g ratio in acute experimental allergic encephalomyelitis. *Brain* 114 (Pt 1A): 281-294.
82. Chomiak T, Hu B (2009) What is the optimal value of the g-ratio for myelinated fibers in the rat CNS? A theoretical approach. *PLoS One* 4(11): e7754.
83. Lunn MP, Crawford TO, Hughes RA, Griffin JW et al. (2002) Anti-myelin-associated glycoprotein antibodies alter neurofilament spacing. *Brain* 125(Pt 4): 904-911.
84. Petzold A, Gveric D, Groves M, Schmierer K et al. (2008) Phosphorylation and compactness of neurofilaments in multiple sclerosis: indicators of axonal pathology. *Exp Neurol* 213(2): 326-335.

85. Berger T, Rubner P, Schautzer F, Egg R et al. (2003) Antimyelin antibodies as a predictor of clinically definite multiple sclerosis after a first demyelinating event. *N Engl J Med* 349(2): 139-145.
86. Rauer S, Euler B, Reindl M, Berger T (2006) Antimyelin antibodies and the risk of relapse in patients with a primary demyelinating event. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 77(6): 739-742.
87. Gresle MM, Liu Y, Dagley LF, Haartsen J et al. (2014) Serum phosphorylated neurofilament-heavy chain levels in multiple sclerosis patients. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 85(11): 1209-1213.
88. Kuhle J, Kropshofer H, Haering DA, Kundu U et al. (2019) Blood neurofilament light chain as a biomarker of MS disease activity and treatment response. *Neurology* 92(10): e1007-e1015.
89. Petzold A (2005) Neurofilament phosphoforms: surrogate markers for axonal injury, degeneration and loss. *J Neurol Sci* 233(1-2): 183-198.
90. Shaw G (2015) The Use and Potential of pNF-H as a General Blood Biomarker of Axonal Loss: An Immediate Application for CNS Injury. In *Brain Neurotrauma: Molecular, Neuropsychological, and Rehabilitation Aspects*. (Hrsg.) FH Kobeissy. Boca Raton (FL)
91. Li Y, Zhang L, Kallakuri S, Cohen A et al. (2015) Correlation of mechanical impact responses and biomarker levels: A new model for biomarker evaluation in TBI. *J Neurol Sci* 359(1-2): 280-286.
92. Teunissen CE, Malekzadeh A, Leurs C, Bridel C et al. (2015) Body fluid biomarkers for multiple sclerosis--the long road to clinical application. *Nat Rev Neurol* 11(10): 585-596.

93. Miller DH, Barkhof F, Frank JA, Parker GJ et al. (2002) Measurement of atrophy in multiple sclerosis: pathological basis, methodological aspects and clinical relevance. *Brain* 125(Pt 8): 1676-1695.
94. Bakshi R, Dandamudi VS, Neema M, De C et al. (2005) Measurement of brain and spinal cord atrophy by magnetic resonance imaging as a tool to monitor multiple sclerosis. *J Neuroimaging* 15(4 Suppl): 30S-45S.
95. Barkhof F (2002) The clinico-radiological paradox in multiple sclerosis revisited. *Curr Opin Neurol* 15(3): 239-245.
96. Ceccarelli A, Bakshi R, Neema M (2012) MRI in multiple sclerosis: a review of the current literature. *Curr Opin Neurol* 25(4): 402-409.
97. Hu Y, Turner MJ, Shields J, Gale MS et al. (2009) Investigation of the mechanism of action of alemtuzumab in a human CD52 transgenic mouse model. *Immunology* 128(2): 260-270.
98. Turner MJ, Lamorte MJ, Chretien N, Havari E et al. (2013) Immune status following alemtuzumab treatment in human CD52 transgenic mice. *J Neuroimmunol* 261(1-2): 29-36.
99. Turner MJ, Pang PT, Chretien N, Havari E et al. (2015) Reduction of inflammation and preservation of neurological function by anti-CD52 therapy in murine experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* 285: 4-12.
100. Pant AB, Wang Y, Mielcarz DW, Kasper EJ et al. (2017) Alteration of CD39+Foxp3+ CD4 T cell and cytokine levels in EAE/MS following anti-CD52 treatment. *J Neuroimmunol* 303: 22-30.
101. Barbour M, Wood R, Hridi SU, Wilson C et al. (2018) The therapeutic effect of anti-CD52 treatment in murine experimental autoimmune encephalomyelitis is

- associated with altered IL-33 and ST2 expression levels. *J Neuroimmunol* 318: 87-96.
102. BD Biosciences (2017) BD Horizon Fixable Viability Stain 450 (FVS450). *Technical Datasheet*: 1-2.
103. BD Biosciences (2008) BD PerCP-Cy5.5 and PerCP (Conjugated Reagents). *Product List*: 1-4.
104. Biolegend (2013) APC anti-mouse CD19 Antibody. *Technical Datasheet*: 1-2.
105. Simon M, Ipek R, Homola GA, Rovituso DM et al. (2018) Anti-CD52 antibody treatment depletes B cell aggregates in the central nervous system in a mouse model of multiple sclerosis. *J Neuroinflammation* 15(1): 225.
106. Shaw G, Yang C, Ellis R, Anderson K et al. (2005) Hyperphosphorylated neurofilament NF-H is a serum biomarker of axonal injury. *Biochem Biophys Res Commun* 336(4): 1268-1277.
107. Petzold A, Rejdak K, Plant GT (2004) Axonal degeneration and inflammation in acute optic neuritis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 75(8): 1178-1180.
108. Arndt A, Hoffacker P, Zellmer K, Goecer O et al. (2014) Conventional housing conditions attenuate the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *PLoS One* 9(6): e99794.
109. Boretius S, Schmelting B, Watanabe T, Merkler D et al. (2006) Monitoring of EAE onset and progression in the common marmoset monkey by sequential high-resolution 3D MRI. *NMR Biomed* 19(1): 41-49.
110. Anderson SA, Shukaliak-Quandt J, Jordan EK, Arbab AS et al. (2004) Magnetic resonance imaging of labeled T-cells in a mouse model of multiple sclerosis. *Ann Neurol* 55(5): 654-659.

111. Wuerfel J, Tysiak E, Prozorovski T, Smyth M et al. (2007) Mouse model mimics multiple sclerosis in the clinico-radiological paradox. *Eur J Neurosci* 26(1): 190-198.
112. De Stefano N, Guidi L, Stromillo ML, Bartolozzi ML et al. (2003) Imaging neuronal and axonal degeneration in multiple sclerosis. *Neurol Sci* 24 Suppl 5: S283-286.
113. Willis MD, Harding KE, Pickersgill TP, Wardle M et al. (2016) Alemtuzumab for multiple sclerosis: Long term follow-up in a multi-centre cohort. *Mult Scler* 22(9): 1215-1223.
114. Haghikia A, Dendrou CA, Schneider R, Gruter T et al. (2017) Severe B-cell-mediated CNS disease secondary to alemtuzumab therapy. *Lancet Neurol* 16(2): 104-106.
115. Ellebedy AH, Jackson KJ, Kissick HT, Nakaya HI et al. (2016) Defining antigen-specific plasmablast and memory B cell subsets in human blood after viral infection or vaccination. *Nat Immunol* 17(10): 1226-1234.
116. Serafini B, Rosicarelli B, Magliozzi R, Stigliano E et al. (2004) Detection of ectopic B-cell follicles with germinal centers in the meninges of patients with secondary progressive multiple sclerosis. *Brain Pathol* 14(2): 164-174.
117. von Glehn F, Farias AS, de Oliveira AC, Damasceno A et al. (2012) Disappearance of cerebrospinal fluid oligoclonal bands after natalizumab treatment of multiple sclerosis patients. *Mult Scler* 18(7): 1038-1041.
118. Harrer A, Tumani H, Niendorf S, Lauda F et al. (2013) Cerebrospinal fluid parameters of B cell-related activity in patients with active disease during natalizumab therapy. *Mult Scler* 19(9): 1209-1212.

119. Bail K, Notz Q, Rovituso DM, Schampel A et al. (2017) Differential effects of FTY720 on the B cell compartment in a mouse model of multiple sclerosis. *J Neuroinflammation* 14(1): 148.
120. Morris MA, Gibb DR, Picard F, Brinkmann V et al. (2005) Transient T cell accumulation in lymph nodes and sustained lymphopenia in mice treated with FTY720. *Eur J Immunol* 35(12): 3570-3580.
121. Cyster JG (2005) Chemokines, sphingosine-1-phosphate, and cell migration in secondary lymphoid organs. *Annu Rev Immunol* 23: 127-159.
122. Kalincik T, Brown JW, Robertson N, Willis M et al. (2017) Treatment effectiveness of alemtuzumab compared with natalizumab, fingolimod, and interferon beta in relapsing-remitting multiple sclerosis: a cohort study. *Lancet Neurol* 16(4): 271-281.
123. Minagar A, Alexander JS (2003) Blood-brain barrier disruption in multiple sclerosis. *Mult Scler* 9(6): 540-549.
124. McFarland HF, Frank JA, Albert PS, Smith ME et al. (1992) Using gadolinium-enhanced magnetic resonance imaging lesions to monitor disease activity in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 32(6): 758-766.
125. Cramer SP, Simonsen H, Frederiksen JL, Rostrup E et al. (2014) Abnormal blood-brain barrier permeability in normal appearing white matter in multiple sclerosis investigated by MRI. *Neuroimage Clin* 4: 182-189.
126. Obermeier B, Daneman R, Ransohoff RM (2013) Development, maintenance and disruption of the blood-brain barrier. *Nat Med* 19(12): 1584-1596.
127. Komori M, Lin YC, Cortese I, Blake A et al. (2016) Insufficient disease inhibition by intrathecal rituximab in progressive multiple sclerosis. *Ann Clin Transl Neurol* 3(3): 166-179.

128. Lassmann H (2011) Pathophysiology of inflammation and tissue injury in multiple sclerosis: what are the targets for therapy. *J Neurol Sci* 306(1-2): 167-169.
129. Bell L, Koeniger T, Tacke S, Kuerten S (2019) Characterization of blood-brain barrier integrity in a B-cell-dependent mouse model of multiple sclerosis. *Histochem Cell Biol* 151(6): 489-499.
130. Shen DD, Artru AA, Adkison KK (2004) Principles and applicability of CSF sampling for the assessment of CNS drug delivery and pharmacodynamics. *Adv Drug Deliv Rev* 56(12): 1825-1857.
131. Helliwell CL, Coles AJ (2009) Monoclonal antibodies in multiple sclerosis treatment: current and future steps. *Ther Adv Neurol Disord* 2(4): 195-203.
132. Rubenstein JL, Combs D, Rosenberg J, Levy A et al. (2003) Rituximab therapy for CNS lymphomas: targeting the leptomeningeal compartment. *Blood* 101(2): 466-468.
133. Kern DJ, James BR, Blackwell S, Gassner C et al. (2013) GA101 induces NK-cell activation and antibody-dependent cellular cytotoxicity more effectively than rituximab when complement is present. *Leuk Lymphoma* 54(11): 2500-2505.
134. Dubey D, Kieseier BC, Hartung HP, Hemmer B et al. (2015) Clinical management of multiple sclerosis and neuromyelitis optica with therapeutic monoclonal antibodies: approved therapies and emerging candidates. *Expert Rev Clin Immunol* 11(1): 93-108.
135. Niewoehner J, Bohrmann B, Collin L, Urich E et al. (2014) Increased brain penetration and potency of a therapeutic antibody using a monovalent molecular shuttle. *Neuron* 81(1): 49-60.

136. Mossner E, Brunker P, Moser S, Puntener U et al. (2010) Increasing the efficacy of CD20 antibody therapy through the engineering of a new type II anti-CD20 antibody with enhanced direct and immune effector cell-mediated B-cell cytotoxicity. *Blood* 115(22): 4393-4402.
137. Ransohoff RM, Hafler DA, Lucchinetti CF (2015) Multiple sclerosis-a quiet revolution. *Nat Rev Neurol* 11(3): 134-142.
138. Enders M, Heider T, Ludwig A, Kuerten S (2020) Strategies for Neuroprotection in Multiple Sclerosis and the Role of Calcium. *Int J Mol Sci* 21(5)
139. Mikula S, Binding J, Denk W (2012) Staining and embedding the whole mouse brain for electron microscopy. *Nat Methods* 9(12): 1198-1201.
140. Prinz J, Karacivi A, Stormanns ER, Recks MS et al. (2016) Correction: Time-Dependent Progression of Demyelination and Axonal Pathology in MP4-Induced Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *PLoS One* 11(5): e0155197.
141. Recks MS, Bader J, Kaiser CC, Schroeter M et al. (2011) Die Bedeutung axonaler Pathologie für das Konzept der Neurodegeneration bei der Multiplen Sklerose. *Fortschr Neurol Psychiatr* 79(03): 161-170.
142. Wilkins A, Majed H, Layfield R, Compston A et al. (2003) Oligodendrocytes promote neuronal survival and axonal length by distinct intracellular mechanisms: a novel role for oligodendrocyte-derived glial cell line-derived neurotrophic factor. *J Neurosci* 23(12): 4967-4974.
143. Franklin RJ, ffrench-Constant C, Edgar JM, Smith KJ (2012) Neuroprotection and repair in multiple sclerosis. *Nat Rev Neurol* 8(11): 624-634.
144. De Stefano N, Narayanan S, Francis SJ, Smith S et al. (2002) Diffuse axonal and tissue injury in patients with multiple sclerosis with low cerebral lesion load and no disability. *Arch Neurol* 59(10): 1565-1571.

145. Garbern JY, Yool DA, Moore GJ, Wilds IB et al. (2002) Patients lacking the major CNS myelin protein, proteolipid protein 1, develop length-dependent axonal degeneration in the absence of demyelination and inflammation. *Brain* 125(Pt 3): 551-561.
146. Lassmann H (2003) Axonal injury in multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 74(6): 695-697.
147. Waxman SG (2006) Axonal conduction and injury in multiple sclerosis: the role of sodium channels. *Nat Rev Neurosci* 7(12): 932-941.
148. Mead RJ, Singhrao SK, Neal JW, Lassmann H et al. (2002) The membrane attack complex of complement causes severe demyelination associated with acute axonal injury. *J Immunol* 168(1): 458-465.
149. Rivera-Quinones C, McGavern D, Schmelzer JD, Hunter SF et al. (1998) Absence of neurological deficits following extensive demyelination in a class I-deficient murine model of multiple sclerosis. *Nat Med* 4(2): 187-193.
150. Howe CL, Adelson JD, Rodriguez M (2007) Absence of perforin expression confers axonal protection despite demyelination. *Neurobiol Dis* 25(2): 354-359.
151. Denic A, Macura SI, Mishra P, Gamez JD et al. (2011) MRI in rodent models of brain disorders. *Neurotherapeutics* 8(1): 3-18.
152. Paolillo A, Coles AJ, Molyneux PD, Gawne-Cain M et al. (1999) Quantitative MRI in patients with secondary progressive MS treated with monoclonal antibody Campath 1H. *Neurology* 53(4): 751-757.
153. Kausar F, Mustafa K, Sweis G, Sawaqed R et al. (2009) Ocrelizumab: a step forward in the evolution of B-cell therapy. *Expert Opin Biol Ther* 9(7): 889-895.

154. Montalban X, Hauser SL, Kappos L, Arnold DL et al. (2017) Ocrelizumab versus Placebo in Primary Progressive Multiple Sclerosis. *N Engl J Med* 376(3): 209-220.
155. Hausler D, Hausser-Kinzel S, Feldmann L, Torke S et al. (2018) Functional characterization of reappearing B cells after anti-CD20 treatment of CNS autoimmune disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 115(39): 9773-9778.
156. Lassmann H, Bradl M (2017) Multiple sclerosis: experimental models and reality. *Acta Neuropathol* 133(2): 223-244.
157. Stangel M (2004) Remyelinating and neuroprotective treatments in multiple sclerosis. *Expert Opin Investig Drugs* 13(4): 331-347.
158. Mi S, Miller RH, Lee X, Scott ML et al. (2005) LINGO-1 negatively regulates myelination by oligodendrocytes. *Nat Neurosci* 8(6): 745-751.
159. Sun JJ, Ren QG, Xu L, Zhang ZJ (2015) LINGO-1 antibody ameliorates myelin impairment and spatial memory deficits in experimental autoimmune encephalomyelitis mice. *Sci Rep* 5: 14235.
160. Mullard A (2016) Remyelination researchers regroup after proof-of-concept setback in multiple sclerosis. *Nat Rev Drug Discov* 15(8): 519-521.
161. Cadavid D, Mellion M, Hupperts R, Edwards KR et al. (2019) Safety and efficacy of opicinumab in patients with relapsing multiple sclerosis (SYNERGY): a randomised, placebo-controlled, phase 2 trial. *Lancet Neurol* 18(9): 845-856.
162. Tourbah A, Lebrun-Frenay C, Edan G, Clanet M et al. (2016) MD1003 (high-dose biotin) for the treatment of progressive multiple sclerosis: A randomised, double-blind, placebo-controlled study. *Mult Scler* 22(13): 1719-1731.

163. Sedel F, Bernard D, Mock DM, Tourbah A (2016) Targeting demyelination and virtual hypoxia with high-dose biotin as a treatment for progressive multiple sclerosis. *Neuropharmacology* 110(Pt B): 644-653.
164. Green AJ, Gelfand JM, Cree BA, Bevan C et al. (2017) Clemastine fumarate as a remyelinating therapy for multiple sclerosis (ReBUILD): a randomised, controlled, double-blind, crossover trial. *Lancet* 390(10111): 2481-2489.
165. Ciotti JR, Cross AH (2018) Disease-Modifying Treatment in Progressive Multiple Sclerosis. *Curr Treat Options Neurol* 20(5): 12.
166. Connick P, Kolappan M, Crawley C, Webber DJ et al. (2012) Autologous mesenchymal stem cells for the treatment of secondary progressive multiple sclerosis: an open-label phase 2a proof-of-concept study. *Lancet Neurol* 11(2): 150-156.
167. Harris VK, Vyshkina T, Sadiq SA (2016) Clinical safety of intrathecal administration of mesenchymal stromal cell-derived neural progenitors in multiple sclerosis. *Cytotherapy* 18(12): 1476-1482.
168. Harris VK, Faroqui R, Vyshkina T, Sadiq SA (2012) Characterization of autologous mesenchymal stem cell-derived neural progenitors as a feasible source of stem cells for central nervous system applications in multiple sclerosis. *Stem Cells Transl Med* 1(7): 536-547.
169. Uccelli A, Laroni A, Brundin L, Clanet M et al. (2019) MEsenchymal StEm cells for Multiple Sclerosis (MESEMS): a randomized, double blind, cross-over phase I/II clinical trial with autologous mesenchymal stem cells for the therapy of multiple sclerosis. *Trials* 20(1): 263.
170. Tobinai K, Klein C, Oya N, Fingerle-Rowson G (2017) A Review of Obinutuzumab (GA101), a Novel Type II Anti-CD20 Monoclonal Antibody, for the Treatment of Patients with B-Cell Malignancies. *Adv Ther* 34(2): 324-356.

9 Anhang

9.1 Danksagung

Besonderer Dank gebührt meiner Doktormutter Prof. Dr. med. Stefanie Kürten für die Bereitstellung des Dissertationsthemas und die ausgezeichnete Betreuung. Ihre Unterstützung und ihr entgegengebrachtes Vertrauen habe ich während der gesamten Arbeit als große Motivation empfunden.

Außerdem möchte ich mich bei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe für die konstruktiven Gespräche bedanken, insbesondere aber bei Dr. Andrea Schampel für die Beratung und hilfreichen Anregungen bei der Planung des Dissertationsvorhabens. Hervorheben möchte ich außerdem Co-Doktorand Micha Simon für die offene und kollegiale Zusammenarbeit an diesem Projekt.

Prof. Dr. med. Stefanie Kürten danke ich darüber hinaus für die Anleitung bei den Tierversuchen und Immunassays, Dr. Damiano M. Rovituro für die Hilfe bei der durchflusszytometrischen Analyse sowie Sieglinde Schenk und Karin Reinfurt-Gehm für die technische Unterstützung bei den elektronenmikroskopischen Experimenten. Außerdem danke ich Dr. György A. Homola und Dr. Andrea Schampel für die Unterstützung bei der MR-Bildgebung sowie Michael Christof für die Hilfe bei der Erstellung der Abbildungen.

Mein Dank gilt auch Prof. Dr. med. Süleyman Ergün für die Möglichkeit, an seinem Institut promovieren zu dürfen. Ebenso danke ich den Mitgliedern meines Betreuungskomitees Prof. Dr. med. Christoph Kleinschnitz, Prof. Dr. Christian Stigloher und Prof. Dr. Philip Kollmannsberger für die konstruktiven Ideen und Diskussionen.

Meinen Freunden Natalie und Romina danke ich sehr für die aufbauenden Worte und das aufwendige Korrekturlesen.

Vor allem aber möchte ich mich bei meiner Familie für ihren uneingeschränkten Rückhalt bedanken. Ein ganz besonderer Dank geht dabei an meine Eltern, die entscheidend dazu beigetragen haben, dass ich so weit kommen konnte.

9.2 *Curriculum Vitae*