

**Aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie
der Universität Würzburg**

Vorstand: Professor Dr. med. Süleyman Ergün

**Durchflusszytometrische Analyse CEACAM1-
exprimierender Immunzellen bei Patienten mit Multipler
Sklerose**

Inauguraldissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Sandra Lauer-Schmaltz

aus Schweinfurt

Würzburg, Dezember 2021

Referentin: Prof. Dr. med. Stefanie Kürten

Korreferent: Prof. Dr. med. Claudia Sommer

Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 24.05.2022

Die Promovendin ist Ärztin.

Meinen Großeltern,
meinen Eltern,
meinen Geschwistern und
Daniel.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	6
1.1	Die Multiple Sklerose als entzündlich degenerative Erkrankung des zentralen Nervensystems	6
1.1.1	Epidemiologie, Ätiologie und Prävalenz.....	6
1.1.2	Pathogenese	7
1.1.3	Symptome und Verlaufsformen	8
1.1.3.1	Symptome.....	8
1.1.3.2	Schubereignis	8
1.1.3.3	Klinisch isoliertes Syndrom (CIS)	8
1.1.3.4	Schubförmig remittierende MS (RRMS)	9
1.1.3.5	Sekundär progrediente MS (SPMS)	9
1.1.3.6	Primär progrediente MS (PPMS).....	9
1.1.4	Diagnostik und Kriterien.....	9
1.1.4.1	Expanded Disability Status Scale (EDSS).....	10
1.1.4.2	Liquordiagnostik.....	10
1.1.4.3	Bildgebung.....	10
1.1.5	Therapie	11
1.1.5.1	Schubtherapie.....	11
1.1.5.2	Immuntherapie	11
1.1.5.3	B-Zell-Medikamente in der MS	14
1.1.5.4	Experimentelle Therapieformen	15
1.2	Immunzellen und MS	15
1.2.1	B-Lymphozyten.....	16
1.2.1.1	Immunologische Einordnung	16
1.2.1.2	Subsets.....	16

1.2.1.3	B-Zellen und MS	17
1.2.1.3.1	Oligoklonale Banden und Antikörperproduktion	17
1.2.1.3.2	Autoreaktive B-Zellen	18
1.2.1.3.3	APC und T-Zell-Aktivierung	18
1.2.1.3.4	Zytokinproduktion	19
1.2.1.3.5	Aggregatbildung	19
1.2.2	T-Lymphozyten	19
1.2.2.1	Immunologische Einordnung und Subsets	19
1.2.2.2	T-Zellen und MS	20
1.2.3	Monozyten	21
1.2.3.1	Immunologische Einordnung	21
1.2.3.2	Monozyten und MS	21
1.2.4	NK-Zellen	22
1.2.4.1	Immunologische Einordnung	22
1.2.4.2	NK-Zellen und MS	22
1.3	CEACAM1 und MS	23
1.3.1	Rolle und Funktion in der Immunologie	24
1.3.2	Aktueller Forschungsstand in Bezug auf die MS	25
2	Ziele der Arbeit	27
3	Material und Methoden	28
3.1	Teilnehmer	28
3.2	Liste mit Puffern und Lösungsmitteln	29
3.3	Liste mit Antikörper	30
3.4	Geräte	30
3.5	Methoden	30
3.5.1	Probengewinnung und Transport	30

3.5.2	Isolierung peripherer mononukleärer Blutzellen (PBMC) mittels Dichtegradientenzentrifugation	31
3.5.3	Zellzählung	31
3.5.4	Polyklonale Stimulation	32
3.5.5	Färbung	32
3.5.5.1	Panel CEACAM1-exprimierender Immunzellen	32
3.5.5.2	Panel CEACAM1-exprimierender B- und T-Lymphozyten	33
3.5.5.3	Panel für die Färbung nach polyklonaler Stimulation	34
3.5.6	Messung am Durchflusszytometer	35
3.5.6.1	Messprinzip	35
3.5.6.2	Settingkontrolle	36
3.5.6.3	Kompensation	36
3.5.6.4	Isotypkontrolle	37
3.5.6.5	Messung	37
3.5.7	Auswertung der durchflusszytometrischen Daten	37
3.5.7.1	Gating-Strategie	37
3.5.7.2	Statistischer Vergleich der verschiedenen Settings	42
3.5.7.3	Statistische Auswertung mittels GraphPad Prism	43
4	Ergebnisse	44
4.1	Unterschiede zwischen dem prozentualen Anteil von Immunzellen und deren Subpopulationen bei RRMS-Patienten und gesunden Probanden	44
4.1.1	Vergleich der Immunzellen bei RRMS-Patienten und HC vor polyklonaler Stimulation	44
4.1.1.1	Erhöhte Prozentzahl von B-Lymphozyten bei RRMS-Patienten	44
4.1.1.2	Verminderter Anteil von T-Lymphozyten und erhöhter prozentualer Anteil von T _H -Zellen bei RRMS-Patienten	47

4.1.1.3	Erniedrigter prozentualer Anteil von CD56 ^{dim} -NK-Zellen bei RRMS-Patienten	48
4.1.1.4	Keine signifikanten Unterschiede beim prozentualen Anteil von Monozyten und deren Subpopulationen	49
4.1.1.5	Keine signifikanten Unterschiede beim prozentualen Anteil der NKLT.....	51
4.1.2	Vergleich der Immunzellen von RRMS-Patienten und Gesunden nach polyklonaler Stimulation	52
4.1.2.1	Tendenzielle Erhöhung von B-Lymphozyten bei RRMS-Patienten nach polyklonaler Stimulation	52
4.1.2.2	Kein Unterschied bei T-Lymphozyten bei RRMS-Patienten nach polyklonaler Stimulation	53
4.1.2.3	Kein Unterschied bei NK-Zellen bei RRMS-Patienten nach polyklonaler Stimulation.....	54
4.1.2.4	Kein Unterschied bei Monozyten bei RRMS-Patienten nach polyklonaler Stimulation.....	55
4.1.2.5	Kein Unterschied bei NKLT bei RRMS-Patienten nach polyklonaler Stimulation.....	56
4.2	CEACAM1-Expression auf Immunzellen bei RRMS-Patienten und gesunden Probanden.....	57
4.2.1	CEACAM1-Expression auf B-Lymphozyten	57
4.2.2	CEACAM1-Expression auf T-Zellen.....	60
4.2.3	CEACAM1-Expression auf NK-Zellen und deren Subpopulationen.....	61
4.2.4	CEACAM1-Expression auf Monozyten und deren Subpopulationen.....	62
4.2.5	CEACAM1-Expression auf NKLT.....	64
4.3	Besondere Ergebnisse hinsichtlich Zellpopulationen und CEACAM1-Expression bei anderen MS-Verlaufsformen	65

4.3.1	PPMS: B-Zellen, Monozyten, CD14 ^{bright} -Monozyten und CD56 ^{bright} -NK-Zellen.....	66
4.3.2	SPMS: B-Zellen, T-Zellen, CD14 ^{dim} -Monozyten, CD66a ⁺ CD14 ^{dim} -Monozyten, CD56 ^{bright} -NK-Zellen.....	67
4.3.3	Schub: CD14 ^{dim} -Monozyten, CD56 ^{bright} -NK-Zellen und CD56 ^{dim} -NK-Zellen, T-Zellen	70
4.3.4	CIS: B-Zellen, Monozyten, CD14 ^{bright} -Monozyten	71
4.4	Korrelation der klinischen Daten mit ausgewählten Immunzell-Daten	72
5	Diskussion	74
5.1	Autoreaktive T-Zellen als zentraler Bestandteil der Pathogenese der MS.....	74
5.2	Unterschiede zwischen bisherigen Forschungsergebnissen und unseren Ergebnissen bei B-Zellen und CEACAM1 ⁺ B-Zellen.....	75
5.3	CD56 ^{dim} -NK-Zellen könnten eine proinflammatorische Rolle in der MS spielen	77
5.4	Monozyten als neue Biomarker in der MS?.....	78
6	Ausblick	81
7	Zusammenfassung	82
8	Literaturverzeichnis.....	85

Appendix

- I. Abkürzungsverzeichnis
- II. Abbildungsverzeichnisverzeichnis
- III. Tabellenverzeichnis
- IV. Danksagung

1 Einleitung

1.1 Die Multiple Sklerose als entzündlich degenerative Erkrankung des zentralen Nervensystems

Die Multiple Sklerose (MS, auch Encephalomyelitis disseminata genannt), ist eine chronisch verlaufende, entzündliche Erkrankung des zentralen Nervensystems (ZNS). Auch wenn sie erstmalig bereits im 20. Jahrhundert von dem französischen Neurologen Charcot beschrieben wurde, ist ihre Ursache bis heute unklar. Mit einer Inzidenz von 3-7 Erkrankten pro 100.000 Einwohner in Mitteleuropa ist sie eine der häufigsten organischen Erkrankungen des Nervensystems.¹ Die neurologische Symptomatik ist aufgrund der unterschiedlichen Lokalisation der auftretenden Entzündungsherde mannigfaltig und führt zu einer zunehmenden Behinderung der Patienten. Weltweit sind mehr als 2,3 Millionen Menschen von der Erkrankung betroffen.² Eine kurative Therapie existiert bis heute nicht.

1.1.1 Epidemiologie, Ätiologie und Prävalenz

Die Erstmanifestation klinischer Symptome bei MS-Erkrankten tritt meistens zwischen dem 20. und 40. Lebensjahr auf. Das tatsächliche Erkrankungsalter ist jedoch 10 Jahre früher anzunehmen, da häufig bereits „stumme“ Herde bei der Erstdiagnose vorliegen.¹ Die Erkrankung kann jedoch auch schon im Kindesalter auftreten. In Deutschland wird jährlich bei mindestens 50 Kindern die Erstdiagnose MS gestellt.³ Mit zunehmendem Alter nimmt die Häufigkeit der Neuerkrankungen kontinuierlich ab¹. Frauen sind von der Erkrankungen doppelt so häufig betroffen wie Männer⁴.

Bei der MS lässt sich eine geographische Verteilung feststellen. So ist die Erkrankung in Äquatornähe sowie südlich davon eher selten, nimmt jedoch auf der nördlichen sowie südlichen Erdhalbkugel mit wachsender Entfernung vom Äquator zu. In Mitteleuropa wird aktuell die Prävalenz auf 8-10 pro 100.000 Einwohner geschätzt.⁵ Die Gründe für die regionale Verteilung sind noch nicht abschließend erklärt. Möglicherweise spielen Umweltfaktoren oder genetische Faktoren eine Rolle. Auch ein Zusammenhang mit einem Vitamin D-Mangel

durch verminderte Sonnenexposition in den äquatorfernen Regionen wurde diskutiert⁶⁻⁸. Anhand von Migrationsstudien lässt sich feststellen, dass im Fall einer Migration nach dem 15. Lebensjahr das Erkrankungsrisiko des Herkunftslandes besteht. Erfolgte jedoch die Migration vor der Pubertät wird das Erkrankungsrisiko des Gastlandes erworben.⁹

Neben den Umweltfaktoren spielt auch die genetische Prädisposition eine Rolle. Die Konkordanzrate liegt bei monozygoten Zwillingen bei 25%, bei dizygoten Zwillingen bei 3,5 %¹⁰. Bislang verlief die Identifikation krankheitsbestimmender Gene weitestgehend erfolglos. Eine Assoziation mit dem humanen Leukozytenantigen HLA-DR 2 ist jedoch reproduzierbar nachgewiesen^{1,4}.

Daneben zählen Rauchen sowie Adipositas zu weiteren Risikofaktoren^{11,12}. Auch eine Assoziation mit einer Epstein-Barr-Virus (EBV)-Infektion wird diskutiert¹³⁻¹⁵.

1.1.2 Pathogenese

Die Pathogenese der MS ist noch nicht abschließend geklärt. Ein Teil unseres Verständnisses der Pathogenese geht aus Studien zur experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE) hervor. Bei der EAE handelt es sich um eine entzündliche Erkrankung des ZNS bei Labortieren, die mit der MS beim Menschen zumindest zum Teil vergleichbar ist¹⁶. Man geht davon aus, dass autoreaktive, periphere T-Zellen u.a. durch molekulares Mimikry¹⁷⁻¹⁹ aktiviert werden, an die Rezeptoren von Endothelzellen binden und durch chemotaktische Einflüsse die Blut-Hirn-Schranke überwinden und ins ZNS immigrieren²⁰. Hier kommt es zunächst zu einer klonalen Proliferation der autoreaktiven T-Zellen mit anschließender Aktivierung. Durch Erkennung von hirneigenen Strukturen (z.B. dem basischen Myelinprotein als Bestandteil des Myelins) als Antigene kommt es zu einer Freisetzung proinflammatorischer Zytokine sowie der Aktivierung weiterer Bestandteile des Immunsystems (u.a. B-Zellen und Makrophagen)²¹⁻²³. Dies führt insbesondere in der weißen Substanz, jedoch teilweise auch in der grauen Substanz, zu einer lokalen Inflammationsreaktion, in deren Folge es zu einer aktiven Demyelinisierung kommt²⁴⁻²⁷. Konsekutiv führt dies zu einer axonalen und neuronalen Schädigung. Im Verlauf kommt es zu einer teilweisen

Remyelinisierung sowie reaktiven Proliferation von Astrozyten, die für eine gliöse Vernarbung sorgen („Sklerose“).¹ Prädilektionsstellen für die Läsionen sind dabei der Hirnstamm, das Kleinhirn, das Rückenmark sowie das juxtakortikale und periventrikuläre Marklager¹.

1.1.3 Symptome und Verlaufsformen

Eine Überarbeitung der Einteilung der MS-Verlaufsform war zuletzt 2013 erfolgt. Die Verlaufsformen wurden dabei anhand der Beschreibung der „Aktivität“ sowie der „Progression“ weiter differenziert. Die „Aktivität“ beschreibt dabei das Auftreten von Schüben und/oder MRT-Aktivität, wohingegen die „Progression“ sich auf eine schubunabhängige klinische Verschlechterung bezieht.²⁸

1.1.3.1 Symptome

Die Symptome bei MS-Erkrankten variieren je nach Lokalisation der Läsion. Häufige Frühsymptome sind die Optikusneuritis, die Retrobulbärneuritis, Gangstörungen sowie Fatigue-Symptomatik. Im Verlauf können Störungen der Okulomotorik oder anderer Hirnnerven, vegetative Symptome wie z.B. Blasenentleerungsstörungen, motorische Defekte bis hin zur Para- oder Tetraparese, Sensibilitätsstörungen, kognitive oder psychische Veränderungen und Schmerzen hinzukommen.¹

1.1.3.2 Schubereignis

Als Schub bezeichnet man neu aufgetretene oder sich deutlich verschlechternde Symptome der MS, die mindestens 24 Stunden andauern und mindestens in einem 30-tägigen zeitlichen Abstand zum letzten Schubereignis stehen¹. Zudem sollte die Symptomatik nicht im Rahmen von Fieber oder einer Infektion aufgetreten sein¹. Die Symptome bilden sich meist nach einigen Tagen bis Wochen vollständig oder unvollständig zurück (Remission) und führen oft zu einer erheblichen Beeinträchtigung der Lebensqualität der Patienten^{29,30}.

1.1.3.3 Klinisch isoliertes Syndrom (CIS)

Beim klinisch isolierten Syndrom finden sich häufig Frühsymptome wie z.B. Sensibilitäts- oder Gangstörungen oder eine einseitige Optikusneuritis, die

passend zu einer MS wären. Allerdings werden beim CIS die Diagnosekriterien der MS noch nicht erfüllt.¹ Ein CIS kann jedoch in 20-75% der Fälle in eine MS übergehen³¹.

1.1.3.4 Schubförmig remittierende MS (RRMS)

Die schubförmig remittierende MS (RRMS) entspricht der am häufigsten bei Erstdiagnose auftretenden Verlaufsform (85%). Hierbei kommt es im Rahmen von Schüben zu einem Auftreten neurologischer Defizite, die sich entweder vollständig oder unvollständig zurückbilden.¹

1.1.3.5 Sekundär progrediente MS (SPMS)

Die sekundär progrediente MS (SPMS) ist die zweit häufigste MS-Verlaufsform und entwickelt sich aus der RRMS heraus. Nach einem initial schubförmigen Krankheitsverlauf geht dieser in eine kontinuierliche Zunahme neurologischer Defizite über. Schübe können dabei weiterhin zusätzlich auftreten.^{32,33} Man unterscheidet hierbei anhand der Aktivität und Progression in eine aktive nicht-progrediente, aktive progrediente, nicht-aktive progrediente sowie nicht-aktive nicht-progrediente Form³⁴.

1.1.3.6 Primär progrediente MS (PPMS)

Bei der primär progredienten MS (PPMS) handelt es sich um eine Verlaufsform, die von Krankheitsbeginn an mit einer kontinuierlichen progredienten neurologischen Verschlechterung einhergeht. Schübe treten hierbei nicht auf.^{1,35}

1.1.4 Diagnostik und Kriterien

Neben der Anamnese sowie der körperlichen Untersuchung gibt es verschiedene diagnostische Mittel, mithilfe derer die Diagnose MS gestellt werden kann. Im Folgenden wird eine Auswahl der relevantesten Diagnostikkriterien aufgeführt und erläutert. Daneben gibt es jedoch auch andere diagnostische Felder wie z.B. die Elektrophysiologie.

1.1.4.1 Expanded Disability Status Scale (EDSS)

Die EDSS-Skala dient der Erfassung des Behinderungsgrads von MS-Erkrankten zum Zeitpunkt der Erhebung anhand der Mobilität und Gehstrecke. Der Wert 0 entspricht dabei der Erkrankung ohne neurologische Defizite, wohingegen 10 den Tod infolge einer MS-Erkrankung beschreibt. Mithilfe der EDSS kann somit der Verlauf der Erkrankung hinsichtlich der Einschränkung vor allem motorischer Fähigkeiten dokumentiert werden. ^{1,36,37}

1.1.4.2 Liquordiagnostik

Zentraler Bestandteil der MS-Diagnostik ist die Untersuchung des *Liquor cerebrospinalis* (Zerebrospinalflüssigkeit, CSF) mittels isoelektrischer Fokussierung, bei der durch Gelelektrophorese Proteine anhand ihres isoelektrischen Punkts aufgetrennt werden³⁸. Dabei lassen sich bei 90% der untersuchten MS-Patienten oligoklonale Banden (OCB) detektieren³⁹. Diese sind das immunhistochemische Korrelat für eine intrathekale Synthese monoklonaler Antikörper (Immunglobuline, Ig), speziell für IgG⁴⁰. Unter anderem lassen sich hierbei häufig Antikörper gegen Masern, Röteln und/oder Varizella-Zoster-Viren (MRZ-Reaktion) nachweisen⁴¹.

1.1.4.3 Bildgebung

Neben der Liquordiagnostik spielt die kraniospinale Bildgebung mittels Magnetresonanztomographie (MRT) eine entscheidende Rolle sowohl in der Primärdiagnostik als auch bei den Verlaufskontrollen. Durch die verschiedenen MR-Sequenzen lassen sich die oft multilokulären Läsionen darstellen. Dabei ist die Kontrastmittelanreicherung frischer Läsionen bildmorphologischer Ausdruck der Störung der Blut-Hirn-Schranke bei an MS Erkrankten. ⁴²

Mithilfe der McDonald-Kriterien wird die Diagnose MS gestellt. Dabei müssen sowohl die Kriterien der zeitlichen (Nachweis einer nicht-symptomatischen frischen Läsion bei der Erstuntersuchung oder Nachweis einer frischen oder neuen Läsion in der Verlaufsbildgebung) als auch räumlichen (Nachweis einer Läsion in mind. 2 von 4 MS-typischen Regionen) Dissemination erfüllt sein. ⁴³

1.1.5 Therapie

Die Therapie der MS setzt sich zusammen aus der Schubtherapie sowie der Immuntherapie als verlaufsmodifizierende Therapie. Daneben sollte jedoch immer eine symptomatische Therapie mit Ergotherapie, Physiotherapie, Psychotherapie, antispastischer Therapie und/oder Logopädie angepasst an die jeweiligen Bedürfnisse des Patienten erfolgen.

1.1.5.1 Schubtherapie

Bei der Schubtherapie ist die erste Wahl eine Glucocorticoid Hochdosistherapie mit 1000 mg Methylprednisolon i.v. für 3-5 Tage. Im Falle einer therapierefraktären Schubsymptomatik kann eine Eskalationstherapie auf eine höhere Glucocorticoiddosis in Erwägung gezogen werden. Bei fehlender Remission kann eine Plasmapherese erfolgen.¹

1.1.5.2 Immuntherapie

Bei der immunmodulatorischen Stufentherapie handelt es sich um eine Therapieform, die auf die Schubprophylaxe abzielt. Es soll ein Voranschreiten der klinischen und radiologischen Entzündungsaktivität und damit der irreversiblen Behinderungsprogression im Langzeitverlauf entgegengewirkt werden. Aufgrund der intensiven Forschung der letzten Jahre kamen hier einige neue Substanzklassen hinzu. Die verlaufsmodulierende Stufentherapie richtet sich dabei nach der klinisch und radiologischen Krankheitsaktivität, wodurch ein milder/moderater und ein hochaktiver bzw. aktiver Verlauf unterschieden werden. Sowohl bei der SPMS als auch PPMS sind die Behandlungsmöglichkeiten weiterhin sehr begrenzt.¹

In Tabelle 1 werden zunächst in alphabetischer Reihenfolge die einzelnen Substanzklassen mit ihren Wirkeigenschaften erläutert. Die tabellarische Übersicht in Tabelle 2 bezieht sich auf die aktuelle S2k-Leitlinie zur Diagnose und Therapie der MS von der Deutschen Gesellschaft für Neurologie von 2021 und veranschaulicht die Therapieoptionen.

Tabelle 1: Erläuterung der Substanzklassen mit ihren Wirkeigenschaften in alphabetischer Reihenfolge.

Substanzklasse (Handelsname)	Eigenschaften und Wirkmechanismus	Applikations- form	Indikation
Alemtuzumab (<i>Lemtrada</i>)	Monoklonaler Anti-CD52-Antikörper (Oberflächenmolekül auf Lymphozyten und Monozyten) → komplement- und zellabhängige Lymphozytendepletion	i.v.	RRMS
β-Interferone: Interferon-β _{1a} (<i>Avonex</i>) Interferon-β _{1a} (<i>Plegridy</i>) Interferon-β _{1b} (<i>Betaferon</i>) Interferon-β _{1a} (<i>Rebif</i>)	Antagonisierung Interferon- induzierter proinflammatorischer Effekte	Avonex i.m. Plegridy s.c. Betaferon s.c. Rebif s.c.	CIS RRMS SPMS
Dimethylfumarat (<i>Tecfidera</i>)	Immunmodulator → Induktion von Apoptose in T- und B-Lymphozyten → Supprimieren der Expression proinflammatorischer Gene durch Hemmung von Transkriptionsfaktoren (NfkappaB)	p.o.	RRMS
Fingolimod (<i>Gilenya</i>)	Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptor- Modulator → verhindert Migration der Lymphozyten aus Lymphknoten	p.o.	RRMS

Glatirameracetat (<i>Copaxone</i>)	Synthetisches Polypeptid aus L-Glutamat, L-Lysin, L-Alanin und L-Tyrosin (GLAT) → Wirkung noch unklar, vermutlich Blockade myelinreaktiver T-Lymphozyten durch Aktivierung GLAT-reaktiver Zellen → Induktion spezifischer T-Suppressorzellen	s.c.	CIS RRMS
Mitoxantron (<i>Ralenova</i>)	Immunsuppressivum	i.v.	früher bei RRMS und SPMS
Natalizumab (<i>Tysabri</i>)	Rekombinanter humanisierter, monoklonaler Antikörper, der Adhäsionsmoleküle ($\alpha_4\beta_1$ - und $\alpha_4\beta_7$ -Integrin) auf der Oberfläche von Immunzellen bindet → Bindung der Lymphozyten an Endothelzellen der Blutgefäße und damit Migration ins ZNS gestört	i.v.	RRMS
Ocrelizumab (<i>Ocrevus</i>)	Monoklonaler anti-CD20-Antikörper → Depletion von B-Lymphozyten	i.v.	RRMS PPMS
Siponimod (<i>Mayzent</i>)	Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptor-Modulator → verhindert Migration der Lymphozyten aus Lymphknoten	p.o.	SPMS
Teriflunomid (<i>Aubagio</i>)	Hemmung der <i>de novo</i> Pyrimidin-Synthese → antiproliferativer Effekt auf Immunzellen	p.o.	RRMS

Tabelle 2: Therapieoptionen der MS entsprechend der aktuellen S2k-Leitlinie von 2021

Indikation	CIS	RRMS	SPMS	PPMS
Krankheitsaktivität/Progression	Keine Immuntherapie regelmäßige klinische und radiologische Kontrollen			
	<u>Kategorie 1:</u> Dimethylfumarat Glatirameroide IFN-β Teriflunomid		Cladribin IFN-β 1a/1b Ocrelizumab (Rituximab) ¹ Siponimod	Ocrelizumab (Rituximab) ¹
	<u>Kategorie 2:</u> Cladribin Fingolimod Ozanimod			
	<u>Kategorie 3:</u> Alemtuzumab Natalizumab Ocrelizumab (Rituximab) ¹			
Schub	1. Wahl: Glucocorticoid-Hochdosistherapie 2. Wahl: Plasmapherese			

1 off label

Alle aufgeführten Medikamente in der Tabelle sind alphabetisch geordnet, nicht nach ihrer Priorität

1.1.5.3 B-Zell-Medikamente in der MS

Die monoklonalen Antikörper, die sich gegen das CD20-Antigen richten, führen zu einer Depletion von im Blut zirkulierenden B-Zellen. Auch ein geringer Teil CD20-positiver T-Zellen ist hiervon betroffen. Bislang sind als anti-CD20-Antikörper Ocrelizumab sowie Ofatumumab zur Behandlung der MS zugelassen.

44–47

Ein weiterer CD20-Antikörper, der noch in den aktuellen Leitlinien als off-label-Therapie für alle Verlaufsformen der MS zur Verfügung steht, ist Rituximab.

Hierzu gab es bereits mehrere Studien, darunter auch Phase III-Studien, die die Wirksamkeit des Medikaments in der MS belegen konnten. ^{48–52}

Daneben wurden in Phase II-Studien mit Ofatumumab, einem weiteren anti-CD-20-Antikörper, eine Reduktion der MRT-Aktivität festgestellt ^{53,54}. Die Phase III-Studien (Asclepios I und II) ergaben eine geringere jährliche Schubrate bei RRMS-Patienten unter der Therapie mit Ofatumumab im Vergleich zu einer Therapie mit Teriflunomid. ⁵⁵ Im April 2021 wurde Ofatumumab in der EU als Therapie der RRMS zugelassen⁴⁷.

Ein weiterer Anti-CD20-Antikörper, dessen Therapieansatz auf der B-Zell-Depletion liegt, ist Ublituximab. In einer multizentrischen Phase II-Studie konnte bei RRMS-Patienten unter Ublituximab-Therapie ein Rückgang an MRT-Läsionen sowie eine verminderte Schubfrequenz verzeichnet werden⁵⁶. Aktuell wird Ublituximab in einer Phase III-Studie hinsichtlich der Effizienz sowie Verträglichkeit bei RRMS-Patienten im Vergleich zu Teriflunomid getestet⁵⁷.

1.1.5.4 Experimentelle Therapieformen

Im Gegensatz zu den anderen monoklonalen Antikörpern in der MS, die vornehmlich eine immunmodulatorische Wirkung haben, zielt der LINGO1-Antikörper Opicinumab auf die Remyelinisierung durch Oligodendrozyten ab⁵⁸. Dies ließ sich bereits in präklinischen Studien nachweisen^{58–60}. In der Phase II-Studie SYNERGY konnte jedoch kein signifikanter Therapieeffekt von Opicinumab festgestellt werden^{61,62}.

1.2 Immunzellen und MS

Da die MS die häufigste Autoimmunerkrankung des ZNS ist, werden im Folgenden die von uns untersuchten Immunzellen in besonderem Hinblick auf deren Rolle in der MS beleuchtet. Die immunphänotypische Einordnung der verschiedenen Immunzellen erfolgt dabei anhand des *clusters of differentiation* (CD), das bestimmten Oberflächenmolekülen auf den jeweiligen Immunzellen entspricht⁶³.

1.2.1 B-Lymphozyten

1.2.1.1 Immunologische Einordnung

B-Zellen oder B-Lymphozyten sind Teil des adaptiven Immunsystems und entstehen im Knochenmark. B-Zellen wandern von dort in die peripheren lymphatischen Gewebe (oder auch sekundäre lymphatische Gewebe genannt) wie z.B. die Lymphknoten, die Milz oder das lymphatische Gewebe der Schleimhäute⁶⁴. Ihre Aufgabe ist es Antigene zu erkennen und dadurch die pathogenen Organismen zu bekämpfen. Hierfür stehen den B-Zellen verschiedene Mechanismen zur Verfügung. Zum einen fungieren B-Zellen als Antigen-präsentierende Zellen (APC), was wiederum zu einer Aktivierung von T-Zellen führt.^{65,66} Zum anderen können sie Zytokine sezernieren und Immunglobuline (Ig) Antigen-spezifisch bilden^{67,68}. Befinden sich die Immunglobuline membrangebunden an der Zelloberfläche von B-Lymphozyten und fungieren dadurch als Antigenrezeptor, nennt man sie B-Zell-Rezeptor (BCR)⁶⁹. Bindet ein B-Zell-Rezeptor ein Antigen, wird durch eine intrazelluläre Signalkaskade die B-Zelle zur klonalen Expansion und spezifischen Antikörperproduktion aktiviert⁶⁹. Werden Immunglobuline von ausdifferenzierten B-Zellen, den Plasmablasten oder Plasmazellen, sezerniert, heißen sie Antikörper⁷⁰. Das Antikörpermolekül setzt sich aus zwei Regionen zusammen, wobei die variable Region als Erkennungsstruktur für die Antigenbindung fungiert, während die konstante Region für den Effektormechanismus zuständig ist. Der Effektormechanismus dient der Rekrutierung von anderen Zellen (z. B. Phagozyten) und Molekülen (Komplement), die das gebundene Antigen zerstören.^{71,72}

1.2.1.2 Subsets

Bei den B-Lymphozyten lassen sich mehrere Untergruppen (*subsets*) anhand ihrer Entwicklung, Lokalisation und Funktion unterscheiden. Die naiven B-Zellen kann man dabei in B1-Zellen und B2-Zellen untergliedern⁷³. Die B1-Zellen (CD3⁻, CD20⁺, CD27⁺) gehen aus Vorläuferzellen der fetalen Leber hervor und können wiederum in B1a- und B1b-Zellen unterschieden werden⁷³. Die B2-Zellen entstammen dem Knochenmark. Sie können in folliculäre B-Zellen und

Marginalzonen-B-Zellen unterteilt werden⁷². Die folliculären B-Zellen können durch Antigenbindung aktiviert werden und sich dadurch zur Plasmazelle (CD3⁻, CD20⁺, CD21⁺) oder Gedächtniszelle (CD3⁻, CD20⁺, CD43⁺) weiterdifferenzieren⁷⁴. Plasmazellen zeichnen sich durch die Bildung und Sekretion von Antikörpern aus, während Gedächtniszellen B-Zell-Rezeptoren auf ihrer Oberfläche tragen⁷⁵. Die B-Zellen der Marginalzonen bilden eine kleine Population, die hauptsächlich in der Milz vorkommt.^{72,74}

1.2.1.3 B-Zellen und MS

Die Pathogenese der MS wurde lange als T-Zell-vermittelt proklamiert. In den letzten Jahren rückte zunehmend die Rolle der B-Zellen in der Pathogenese sowie der Behandlung der Multiplen Sklerose in den Fokus der Wissenschaft⁷⁶.

1.2.1.3.1 Oligoklonale Banden und Antikörperproduktion

Wie bereits unter 1.1.4.2 aufgeführt, gehört die Liquordiagnostik und dabei im Speziellen der Nachweis von OCB zur MS-Diagnostik. Patienten, bei denen OCB nachweisbar sind, haben eine schlechtere Prognose, was den Symptomprogress betrifft⁹⁸. Dabei lassen sich zwar im Liquor jedoch nicht im Serum bei 90% der MS-Patienten spezielle Immunglobuline (vor allem IgG) nachweisen. Sie sind also Indikator für eine intrathekale Immunglobulin-Synthese.⁷⁷⁻⁷⁹ Studien haben gezeigt, dass B-Zellen im Liquor von MS-Patienten Autoantikörper bilden können, die Reaktivität gegen Neurone und Astrozyten aufwiesen⁸⁰. Weitere Daten lassen vermuten, dass Autoantikörper im Liquor neurologische Dysfunktionen und Demyelinisierung begünstigen könnten⁸¹.

Zudem lassen sich im Liquor von MS-Patienten oligoklonale B-Zellen nachweisen⁸²⁻⁸⁷. Durch Vergleich des Ig-Transkriptoms der B-Zellen mit dem Ig-Proteom des Liquors ließ sich darstellen, dass die oligoklonalen B-Zellen im Liquor von MS-Patienten die OCB produzieren⁴⁰. Bisher ließ sich jedoch kein singuläres Antigen feststellen, das die Bildung von OCB hervorruft. Viel mehr vermutet man u.a., dass die OCB Ausdruck einer Reaktion auf ubiquitär vorhandenen Zelldebris sind.^{88,89}

Die B-Zell-Klone konnten dabei nicht nur in unterschiedlichen ZNS-Kompartimenten bei MS-Patienten nachgewiesen werden, sondern sowohl im ZNS als auch in der Peripherie^{90–94}. Dies wiederum legt eine bidirektionale Migration dieser B-Zell-Klone zwischen ZNS und Peripherie nahe. Bislang ist unklar, ob die oligoklonalen B-Zellen durch Autoantikörper-Produktion die Inflammation im ZNS bei MS-Erkrankten tatsächlich mitverantworten. Hierzu konnten noch keine eindeutigen Aussagen getroffen werden.^{95–97}

1.2.1.3.2 Autoreaktive B-Zellen

Autoreaktive B-Zellen kommen auch bei Gesunden vor⁷². Jedoch durchlaufen diese normalerweise einen zentralen sowie einen peripheren Checkpoint und werden dadurch unschädlich gemacht⁷². Der Entwicklungsprozess der B-Zellen obliegt hierbei eines geordneten Ablaufs⁹⁹. Zunächst durchlaufen die B-Zellen den zentralen Checkpoint im Knochenmark^{99,100}. Hiernach erfolgt dann ein weiterer Selektionsprozess zwischen autoreaktiven und ausgereiften B-Zellen in der Milz^{101–103}. Bei MS-Erkrankten ließ sich – im Gegensatz zu vielen anderen Autoimmunerkrankungen – ein Defekt des peripheren Checkpoints nachweisen. Hierdurch kommt es zu einer erhöhten Anzahl an autoreaktiven B-Zellen.¹⁰⁴

1.2.1.3.3 APC und T-Zell-Aktivierung

B-Zellen fungieren auch als Antigen-präsentierende Zellen (APC)^{65,66}. In der MS binden Erkrankungs-relevante Gedächtniszellen mithilfe ihres B-Zell-Rezeptors spezielle Antigene, die sie wiederum pathogenen T-Zellen präsentieren, die daraufhin ins ZNS wandern und für eine vermehrte Entzündungsaktivität sorgen¹⁰⁵. Selbst bei niedriger Antigenkonzentration erfüllen sie diese Aufgabe effektiv und induzieren hierdurch eine systemische T-Zell-Antwort mit Aktivierung der Effektor-T-Zellen (T_{eff}) sowie der Bildung von regulatorischen T-Zellen (T_{reg})^{66,106–108}. Insbesondere im ZNS sind B-Zellen potente Antigen-Präsentatoren^{109,110}. Dabei spielen in der T-Zell-APC-Interaktion und konsekutiven T-Zell-Aktivierung und Proliferation costimulierende Moleküle wie z.B. CD80 eine Rolle, die wiederum bei MS-Erkrankten im Vergleich zu Gesunden vermehrt vorkommen^{111,112}.

1.2.1.3.4 Zytokinproduktion

Abhängig von ihrem Zytokinprofil können B-Zellen entweder als Effektor-B-Zellen (B_{eff}) oder als regulatorische B-Zellen (B_{reg}) fungieren. Als Effektor-B-Zellen produzieren sie dabei proinflammatorische Zytokine wie Tumornekrose-Faktor α (TNF- α), Interleukin-6 (IL-6), IL-15, Interferon- γ (IFN- γ), Lymphotoxin- β oder *granulocyte macrophage colony stimulating factor* (GM-CSF) und wirken damit aktivierend auf T-Zellen und myeloische Zellen. In ihrer Funktion als regulatorische B-Zellen hingegen hemmen sie die Aktivität von T-Zellen und myeloischen Zellen durch Sekretion von IL-10 oder IL-35.^{97,113} Bei MS-Erkrankten lassen sich deutlich erhöhte Spiegel von proinflammatorischen Zytokinen feststellen^{114–117}. Dies führt wiederum zu einer vermehrten Aktivierung anderer Immunzellen und damit zu einer verstärkten Inflammationsreaktion.

1.2.1.3.5 Aggregatbildung

Mehrere Studien belegen eine klonale B-Zellexpansion im CSF sowie in den Meningen und der weißen Substanz von MS-Patienten^{86,90}. Serafini et al. beschrieben erstmals die Entdeckung von B-Zell-Aggregaten in den Meningen von Patienten mit SPMS, die strukturell an B-Zell-Follikel mit Keimzentren erinnern und die Funktion zur B-Zell-Proliferation und Differenzierung zu Plasmazellen besitzen¹¹⁸. Die Aggregate waren mit einem früheren Erkrankungsbeginn, einem schwereren klinischen Verlauf und ausgedehnteren kortikalen Schäden vergesellschaftet¹¹⁹. Inzwischen ließen sich diese B-Zell-Aggregate, die auch als tertiär lymphatische Organe bezeichnet werden, auch in frühen Erkrankungsstadien nachweisen^{120,121}.

1.2.2 T-Lymphozyten

1.2.2.1 Immunologische Einordnung und Subsets

T-Zellen oder T-Lymphozyten sind ebenfalls Teil der adaptiven Immunabwehr. Sie gehen aus dem Knochenmark hervor und werden im Thymus geprägt¹²². Auch T-Zellen besitzen einen Rezeptor auf ihrer Oberfläche, den T-Zell-Rezeptor (TCR). Mithilfe dessen können sie an Plasmamembranproteine körpereigener Zellen, den *Major histocompatibility complex-Molekülen* (MHC I und II), binden,

die Antigen-Fragmente tragen und sie so den T-Zellen präsentieren⁷⁴. Die T-Zellen durchlaufen daraufhin ebenfalls wie die B-Zellen nach Antigenerkennung den Prozess der Aktivierung, Proliferation und Differenzierung hin zur Effektorzelle¹²². Je nach Oberflächenmolekül bzw. Co-Rezeptor – bei T-Zellen CD4 oder CD8 – bilden sich als Effektorzellen T-Helfer-Zellen (T_H, CD3⁺, CD20⁻, CD4⁺) oder zytotoxische T-Lymphozyten (CTL, CD3⁺, CD20⁻, CD8⁺) aus¹²³. T_H-Zellen binden im Körper an MHC II-Moleküle und dienen der Sekretion von Zytokinen zur Unterstützung der Immunantwort und Aktivierung anderer Abwehrzellen¹²³. CTL erkennen Antigene, die ihnen über MHC I-Moleküle präsentiert werden, aktivieren durch Sekretion von Zytokinen Makrophagen und führen durch Ausschüttung zytotoxischer Granula zur Apoptose der Zielzelle⁶⁴.

Eine kleine Einheit von CD4⁺-T-Zellen bildet die Gruppe der regulatorischen T-Zellen (T_{reg}, CD4⁺, CD25⁺) aus, die vor einer überschießenden Immunantwort durch Sekretion von Zytokinen (u.a. IL-10) und somit Hemmung der angeborenen und adaptiven Immunantwort schützen sollen.⁶⁴

Es existiert auch eine Subpopulation von T-Zellen, die sowohl Eigenschaften von T-Zellen als auch von Natürlichen Killer-Zellen (NK Zellen) besitzen, die *Natural killer like T-cells* (NKLT, CD3⁺, CD20⁻, CD56⁺)⁷¹. Diese tragen zwar unter anderem einen T-Zell-Rezeptor, bilden jedoch in ihrer Funktion eine Brücke zwischen dem angeborenen und adaptiven Immunsystem^{71,124}. NKLT scheinen dabei sowohl eine pro- als auch antiinflammatorische Rolle zu spielen¹²⁵. Durch Sekretion von Zytokinen nehmen sie an der Immunabwehr teil¹²⁴. Dennoch fand man in Bezug auf Autoimmunerkrankungen widersprüchliche Beobachtungen. So scheinen sie im Fall der ulzerativen Colitis eine proinflammatorische Rolle inne zu haben^{126–128}, während sie beispielsweise beim systemischen Lupus erythematodes durch ein vermindertes Vorkommen zur vermehrten Krankheitsaktivität beitragen^{125,129}.

1.2.2.2 T-Zellen und MS

Wie bereits in 1.1.2 aufgeführt, geht man davon aus, dass CD4⁺ autoreaktive T-Zellen, die sich gegen Myelinproteine richten, die Blut-Hirn-Schranke überwinden

und ins ZNS immigrieren^{130,131}. Hier werden sie durch APCs reaktiviert und aktivieren wiederum durch Sekretion von Zytokinen weitere T-Zellen und Makrophagen, was zu einer lokalen Inflammationsreaktion führt²⁴. In MS-Läsionen ließen sich passend hierzu vor allem im Zentrum CD4⁺ T-Zellen nachweisen, während sich an den Ränder der Läsionen eher CD8⁺ T-Zellen fanden^{132,133}. Durch die lokale Entzündungsreaktion mit konsekutiver Demyelinisierung kommt es zu einer persistierenden Aktivierung der autoreaktiven T-Zellen¹³⁴. Arbeiten an Tiermodellen suggerieren, dass T_H1-Zellen eine Schlüsselrolle in der Inflammationsreaktion durch Sekretion proinflammatorischer Zytokine wie IFN- γ , IL-2 oder TNF- α spielen^{130,135}. Eine weitere Zelllinie, die hierbei maßgeblich beteiligt zu sein scheint, sind die T_H17-Zellen, deren proinflammatorische Wirkung insbesondere auf der Sekretion von IL-17 beruht^{136–138}. CD8⁺ T-Zellen können wiederum direkten axonalen Schaden ausüben durch MHC I-Bindung von Neuronen oder Oligodendrozyten¹³⁹.

1.2.3 Monozyten

1.2.3.1 Immunologische Einordnung

Monozyten (CD3⁻, CD20⁻, CD14⁺) gehen aus hämatopoetischen Stammzellen des Knochenmarks hervor und gehören zu den Leukozyten. Sie zirkulieren für kurze Zeit im Blut, bevor sie ins Gewebe einwandern und zu Makrophagen heranreifen. Sie bilden einen Teil der APC und können durch Phagozytose Bakterien vernichten. Zudem sezernieren sie pro- und antiinflammatorische Zytokine.⁷⁴

1.2.3.2 Monozyten und MS

Monozyten tragen durch ihre Funktion als APC sowie als Effektorzellen zur Inflammation in der MS bei. Durch ihre Interaktion mit T-Zellen führen sie zu einer Exazerbation der Erkrankung. In der Untersuchung sowohl von aktiven als auch chronischen MS-Läsionen ließen sich verschiedene Monozyten- und Makrophagenpopulationen feststellen.^{140–142}

Im Tiermodell konnte festgestellt werden, dass eine Transmigration von Monozyten ins ZNS mit dem klinischen Beginn der EAE in zeitlichem

Zusammenhang stand. Zudem führte die ZNS-Infiltration von Monozyten zu einem Krankheitsprogress.^{143–145}

Im peripheren Blut von MS-Patienten konnte ein im Vergleich zu dem Blut von Gesunden erhöhtes Vorkommen von proinflammatorischen Monozyten, die IL-6 und IL-12 sezernieren, festgestellt werden¹⁴⁶. Zudem scheint die Erhöhung von IL-12 sezernierender Monozyten mit dem Fortschreiten der körperlichen Behinderung sowie dem Fortschreiten der Erkrankung zu korrelieren¹⁴⁷.

1.2.4 NK-Zellen

1.2.4.1 Immunologische Einordnung

Die natürlichen Killer-Zellen (NK-Zellen, CD3⁻, CD20⁻, CD56⁺, CD16^{+/-}) gehören ebenso wie die B- und T-Zellen zu den Lymphozyten. Funktionell sind sie jedoch Teil der angeborenen Immunabwehr. NK-Zellen zeichnen sich durch ihre zytotoxischen Fähigkeiten aus. Wird ihnen von einer Effektorzelle ein Antikörper präsentiert, können sie durch ihre zytolytischen Granula die betroffene Zelle zur Apoptose bewegen. Zudem können sie proinflammatorische Zytokine wie IFN- γ , TNF, IL-3 und GM-CSF sezernieren. Hierdurch tragen sie zur Induktion der Immunantwort bei und können Antigen-unabhängig Phagozyten stimulieren. Anhand der Expression weiterer Oberflächenmoleküle kann man die NK-Zellen in weitere Untergruppen unterteilen, die teilweise unterschiedliche funktionelle Rollen einnehmen. So sind CD56^{+bright} NK-Zellen durch Hemmung autoreaktiver T-Zellen eher antiinflammatorisch wirksam, wohingegen CD56^{+dim} NK-Zellen eher proinflammatorische Funktionen erfüllen^{148,149}.

1.2.4.2 NK-Zellen und MS

Die Rolle der NK-Zellen in der MS ist noch nicht abschließend geklärt. So können NK-Zellen sowohl eine pro- als auch eine antiinflammatorische Rolle in der MS spielen. Dies scheint sowohl vom Krankheitsstadium als auch der Krankheitsaktivität abhängig zu sein¹⁵⁰. Bei RRMS-Patienten fanden sich Hinweise, dass eine erhöhte NK-Zell-Aktivität mit einem erhöhten Risiko aktiver MRT-Läsionen und damit einer erhöhten Krankheitsaktivität einhergeht¹⁵¹. Dementgegen konnte bei einer Therapie mit dem vormals zugelassenen

monoklonalen IL-2 Rezeptor-Antikörper Daclicumab eine Regredienz der MRT-Läsionen mit jedoch zeitgleichem Anstieg der CD56^{bright} NK-Zellen beobachtet werden¹⁵². Passend hierzu ließ sich auch unter Therapie mit Interferon-β eine Erhöhung der CD56^{bright} NK-Zellen verzeichnen¹⁵³.

Vergleicht man jedoch das Verhalten von CD56^{bright} NK-Zellen auf autoreaktive T-Zellen bei Gesunden im Vergleich zu MS-Erkrankten, so lässt sich bei NK-Zellen von MS-Erkrankten eine weniger effektive Hemmung von T-Zellen feststellen als bei Gesunden¹⁵⁴.

1.3 CEACAM1 und MS

CEACAM1 gehört zu der Gruppe der *Carcinoembryonic-antigen-related cell-adhesion molecules* (CEACAM). Hierbei handelt es sich um Glykoproteine bzw. Zelladhäsionsmoleküle, die sowohl an interzellulären Prozessen als auch an intrazellulären Signalmechanismen beteiligt sind, die für Wachstum, Differenzierung und Überleben von normalen sowie von Krebszellen zuständig sind. So spielt beispielsweise CEA (CEACAM5) bereits seit 1965 eine Rolle als Tumormarker¹⁵⁵. Anderen CEACAM-Molekülen wird eine spezifische funktionelle Aufgabe zuteil wie z.B. CEACAM16 beim Hören im Innenohr¹⁵⁶. Während einige CEACAM-Moleküle nur von speziellen epithelialen oder myeloischen Zellen exprimiert werden, kommen andere CEACAM-Moleküle bei verschiedenen Zelltypen vor¹⁵⁷. Es handelt sich also um Zelladhäsionsmoleküle, denen eine Fülle an Aufgaben in allgemeinen Zellprozessen wie Differenzierung, Proliferation und Zellüberleben zuteilwird¹⁵⁸. Der CEACAM-Gruppe wird zudem eine Beteiligung an der Immunantwort in Zusammenhang mit Infektionen, Inflammation sowie Krebserkrankungen zugesprochen¹⁵⁹. Insgesamt kann man 12 Moleküle unterscheiden: CEACAM1, CEACAM3, CEACAM4, CEACAM5, CEACAM6, CEACAM7, CEACAM8, CEACAM16, CEACAM18, CEACAM19, CEACAM20 und CEACAM21¹⁶⁰.

1.3.1 Rolle und Funktion in der Immunologie

Unser Fokus richtet sich auf CEACAM1 (CD 66a, *biliary glycoprotein*), das als regulierender Co-Rezeptor an lymphatischen sowie an myeloischen Zelltypen interagieren kann. Bei CEACAM1 unterscheidet man wiederum 11 Isoformen, die durch alternatives Splicing entstehen¹⁵⁹. Prinzipiell besteht CEACAM1 aus einer extrazellulären Ig-Domäne und einer transmembranen Komponente, mithilfe derer die zytoplasmatischen Interaktionen hervorgerufen werden¹⁵⁸. Die Zell-Zell-Interaktion geschieht meistens durch homophile in manchen Fällen jedoch auch durch heterophile Bindung¹⁵⁸. Die extrazelluläre glykosilierte Ig-ähnliche Domäne ist sehr flexibel und kann sowohl Teil einer anti-parallelen (trans) als auch einer parallelen (cis) homophilen Bindung sein¹⁶¹. Von der transmembranen Komponente existiert eine kurze „*short*“-Isoform (CEACAM1-S), die 10 Aminosäuren lang ist, sowie eine lange „*long*“-Isoform (CEACAM1-L), die 71 Aminosäuren umfasst. Der intrazelluläre Anteil von CEACAM1-L enthält Peptidketten, das sog. *Immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif* (ITIM), das wiederum eine entscheidende Rolle in den durch CEACAM1 hervorgerufenen intrazellulären Signalpfaden spielen¹⁵⁹. Beide intrazellulären Isoformen von CEACAM1 können dabei sowohl eine aktivierende als auch eine inhibierende Funktionen ausüben^{159,162}.

Die Expression von CEACAM1 ist auf Epithel- und Endothelzellen, Granulozyten, Monozyten, NK-Zellen, B-Zellen, T-Zellen und dendritischen Zellen nachgewiesen^{163–165}. Erstmals trat CEACAM1 in der Immunologie auf Granulozyten als aktivierender Faktor in Erscheinung. So führt CEACAM1 auf Granulozyten beispielsweise zu einer erhöhten Adhäsionskapazität^{166,167}.

Bei T-Zellen lässt sich auf T-Helferzellen eine hohe CEACAM1-Expression nachweisen¹⁶⁸. Zudem wird die Expression von CEACAM1 auf der Oberfläche von aktivierten T-Zellen hochreguliert¹⁶⁸. Insgesamt wirkt sich CEACAM1 auf T-Zellen inhibierend aus und führt zu einer verminderten Zytokinproduktion sowie verminderten Proliferation^{169,170}. Dies spielt insbesondere im Gastrointestinaltrakt eine große Rolle. Im Tiermodell ließ sich nachweisen, dass durch die Expression von CEACAM1-L die T-Zellproliferation gehemmt und damit entzündliche

Darmerkrankungen verhindert werden¹⁷¹. CEACAM1-S führte zu einer vermehrten IgA-Sekretion der Darmmukosa, da die Expression von CEACAM1-S sich stimulierend auf IgA-sezernierende B-Zellen in den Payer-Plaques, regulatorische T-Zellen und T-Helfer-Zellen auswirkte¹⁷². Außerdem tritt CEACAM1 auch als Co-Rezeptor auf T-Zellen auf und wirkt dadurch immunmodulierend^{173,174}. So wird die T-Zell-inhibierende Wirkung von TIM-3 (*T-cell immunoglobulin domain and mucin domain-3* bzw. auch HAVCR2 genannt), einem Oberflächenmolekül auf T-Zellen, das eine Erschöpfung in T-Zellen in chronischen viralen Infekten sowie in Tumorzuständen hervorruft, unter anderem durch die heterophile Bindung von CEACAM1 an TIM-3 induziert^{174–179}.

Bei B-Zellen lässt sich CEACAM1 auf allen B-Zell-*subsets* nachweisen. Dabei scheint CEACAM1 in der Aktivierung und Differenzierung von B-Zellen eine Rolle zu spielen. Zwar trägt CEACAM1 nicht zur Proliferation von B-Zellen bei, jedoch unterstützt es das Überleben von proliferierenden B-Zellen. Zudem wirkt sich CEACAM1 regulierend auf den B-Zell-Rezeptor (BCR) aus.^{180–183} CEACAM1 scheint zur Ausbildung von B-Zellfollikeln beizutragen¹⁸². Die CD19-vermittelte B-Zellaggregation wurde in einer experimentellen Studie durch CEACAM1 begünstigt¹⁸¹.

1.3.2 Aktueller Forschungsstand in Bezug auf die MS

Welche Rolle CEACAM1 in der MS spielt, ist bislang noch nicht hinreichend geklärt. Es zeichnet sich jedoch ab, dass CEACAM1 im Hinblick auf die Entwicklung neuer immunmodulatorischer Therapieansätze ein möglicher Ansatzpunkt sein könnte.

Fujita et al. fanden heraus, dass die durch CEACAM1 hervorgerufenen Signale zu einem mildereren Verlauf der Inflamationsreaktion bei EAE führten¹⁸⁴. Dabei spielen Zytokine wie IFN- γ und IL-17 in der Entstehung und dem Fortschreiten der EAE eine entscheidende Rolle^{185–187}. Durch CEACAM1 kommt es zu einer Reduktion von IFN- γ und IL-17, was wiederum einen mildereren Verlauf der EAE begünstigt¹⁸⁴. Dies ist zum Teil darauf zurückzuführen, dass CEACAM1 auf

aktivierten invarianten NKT-Zellen (iNKT) vermehrt exprimiert wird und sich auch auf deren Zytokinproduktion u.a. von IFN- γ auswirkt¹⁸⁴.

Bei PPMS-Patienten lässt sich ein Defizit an CEACAM1-exprimierenden T-Lymphozyten feststellen, was die Inflamationsreaktion begünstigt. Da CEACAM1 als Ligand für TIM-3 fungiert und durch die Interaktion zwischen CEACAM1 und TIM-3 eine Inhibition und Apoptose von Antigen-spezifischen T-Lymphozyten hervorgerufen wird, wirkt sich dies positiv auf die Immuntoleranz aus. Liegt nun ein Defizit an CEACAM1-exprimierenden T-Zellen vor, kommt es zu einer verminderten Apoptoserate von T-Zellen und zu einer vermehrten Produktion von proinflammatorischen Zytokinen.^{188–190}

CEACAM1 und TIM-3 sind jedoch nicht nur Immunmodulatoren bei T-Zellen, sondern auch bei B-Zellen¹⁹¹. Zudem fand sich im Blut von RRMS-Patienten eine erhöhte Anzahl an CEACAM1 exprimierenden B-Zellen¹⁹¹. Außerdem wurden in ZNS-Läsionen von MS-Patienten CEACAM1-positive B-Zellen nachgewiesen¹⁹¹.

2 Ziele der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es, die Rolle von CEACAM1 auf verschiedenen Immunzellen bei MS-Erkrankten zu untersuchen und die Unterschiede dabei im Vergleich zu Gesunden herauszufinden. Hierbei widmeten wir uns den B-Zellen und ihren Untergruppen, den T-Zellen und ihren Untergruppen, den Monozyten, den NK-Zellen und den NKLT. Wir beleuchteten dabei auch den Aspekt, ob es hinsichtlich des prozentualen Anteils der Immunzellen bei MS-Erkrankten einen Unterschied zu Gesunden gibt und ob sich dieser im Fall eines Schubereignisses ändert. Außerdem wollten wir herausfinden, ob ein Zusammenhang zwischen dem prozentualen Anteil der Immunzellen und klinischen Parametern hergestellt werden kann.

3 Material und Methoden

3.1 Teilnehmer

Im Folgenden wird das generische Maskulinum verwendet. Alle Teilnehmer waren kaukasischer Herkunft. Insgesamt nahmen $n = 25$ Patienten mit schubförmig remittierender MS teil, von denen $n = 19$ mit Natalizumab, $n = 1$ mit Interferon-beta-1a und $n = 2$ mit Teriflunomid behandelt wurden. $N = 3$ dieser Patienten hatten vor der Messung ein Schubereignis, wobei $n = 2$ therapieaiv waren und $n = 1$ mit Interferon-beta-1a therapiert wurde. Die PPMS-Patienten ($n = 2$) und der CIS-Patient ($n = 1$) waren therapieaiv. Von den SPMS-Patienten ($n = 3$) wurde einer mit Interferon-beta-1b therapiert, wohingegen die übrigen zwei Patienten therapieaiv waren. Als Kontrollgruppe nahmen $n = 18$ gesunde Probanden (*healthy controls*, HC) teil. Es wurde darauf geachtet, dass die Kontrollgruppe bezüglich der Verteilung von Alter und Geschlecht der Probanden der Teilnehmergruppe angepasst war. Alle Versuche waren von der Ethikkommission für das Caritas-Krankenhaus Bad Mergentheim sowie die Universität Würzburg genehmigt (Bayerische Landesärztekammer: Aktenzeichen mb BO 14043; Ethikkommission der Universität Würzburg: Aktenzeichen 258/14). Für die Versuche wurde von jedem Patienten sowie jedem gesunden Probanden eine mündliche und schriftliche Einverständniserklärung eingeholt. Eine Übersicht über die Patienten wird in Tabelle 3 aufgeführt.

Tabelle 3: Übersicht über die Probanden

Code	Geschlecht	Alter bei Test (y)	EDSS ¹ bei Test	Verlaufsform bei Test	ED ²	TSLR ³ bei Test (m)	Therapiedauer bei Test (m)	Therapieform bei Test
BIII070714	w	35	2	RRMS	01.07.2003	26	21	Natalizumab
FIII130814	m	40	3,5	RRMS	01.07.2004	15	11	Natalizumab
GIII140814	w	33	6	RRMS	01.07.2003	5	4	Natalizumab
HIII130814	w	56	6,5	RRMS	01.07.1999	2	1	Natalizumab
HIII100614	w	56	3	RRMS	01.05.2009	37	1	Teriflunomid
HIII270514	w	46	5,5	RRMS	01.04.2012	27	3	Natalizumab
JIII060814	m	32	2	RRMS	01.07.2008	1	6	Teriflunomid
JIII270314	w	36	1,5	RRMS	01.12.2011	3	30	Interferon beta 1a
MIII050814	w	34	2	RRMS	01.01.2008	78	78	Natalizumab
OIII050814	m	39	2	RRMS	01.03.2008	62	63	Natalizumab
RIII270514	w	18	1	RRMS	01.05.2011	26	24	Natalizumab
SIII070714	m	54	5	RRMS	01.07.1995	10	3	Natalizumab
SBIII250614	m	46	4	RRMS	01.07.2005	44	38	Natalizumab
SAIII250614	w	48	3	RRMS	01.07.2004	33	32	Natalizumab
SIII240614	m	29	3,5	RRMS	01.10.2012	6	9	Natalizumab
SIII270514	w	55	6	RRMS	01.07.1998	57	53	Natalizumab
WIII280514	m	46	4	RRMS	01.07.2009	20	12	Natalizumab
ZIII070714	m	48	2	RRMS	01.07.2007	48	43	Natalizumab
UIII230215	m	46	4,5	RRMS	01.01.2003	3	1	Natalizumab
LIII240513	w	34		RRMS	01.05.2013		5	Natalizumab
SIII130613	w	30	4	RRMS	01.06.2013	5	11	Natalizumab
BIII090315	w	25	4	RRMS	01.05.2013	8	3	Natalizumab
SIII130613	w	29	5	RRMS/SCHUB	01.06.2013 /		9	Interferon beta 1a
KIII230514	m	41 /		RRMS/SCHUB /	/	/		therapienaiv
BIII180315	m	20	3	RRMS/SCHUB	01.03.2015	1 /		therapienaiv
KV030914	m	72	6,5	PPMS	01.07.2007	3 /		therapienaiv
RV030914	w	61	6	PPMS	01.07.2010	3 /		therapienaiv
SIV070814	w	63	6,5	SPMS	01.07.1999 /		128	Interferon beta 1b
PIV030914	w	41	7	SPMS	01.07.1998 /	/		therapienaiv
SIV030914	m	65	9	SPMS	01.07.1983 /	/		therapienaiv
RII280314	m	29 /		CIS	/	/	/	therapienaiv

¹ EDSS: Expanded disability status scale (s. 1.1.4.1)

² ED: Erstdiagnose

³ TSLR: „Time since last relapse“ entspricht der Zeit in Monaten seit dem letzten Schubereignis

3.2 Liste mit Puffern und Lösungsmitteln

Puffer/Lösungsmittel	Hersteller
Biocoll separating solution 1,077 g/ml	Biochrom AG
β-Mercaptoethanol 1 µmol/l	Sigma-Aldrich
Bovines Serumalbumin (BSA) 1%	PAA
Fetales Kälberserum (FBS)	Gibco
IL-2 15 ng/ml	Peptotech
Penicillin/Streptomycin (P/S) 10000 U/ml	Sigma

Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS, <i>phosphate-buffered saline</i>) 0,1 M	Biochrom AG
R848 2,5 µg/ml	Enzo Life Science
RPMI-1640 Medium	Biochrom AG
Trypanblau 0,5 %	ROTH

3.3 Liste mit Antikörper

Tabelle 4: Tabellarische Übersicht über die verwendeten Antikörper

Spezifität	Label	Isotyp	Klon	Hersteller
Maus-Anti-Human-CD3	APC-H7	Maus IgG1, κ	SK7	BD Pharmingen
Maus-Anti-Human-CD20	PerCP-Cy5.5	Maus IgG2b,	2H7	BD Pharmingen
Maus-Anti-Human-CD66a	FITC	Maus IgG1	B-D60	Diaclone
Maus-Anti-Human-CD14	V450	Maus IgG2b,	MφP9	BD Horizon
Maus-Anti-Human-CD14	V500	Maus IgG2a,	M5E2	BD Horizon
Maus-Anti-Human-CD56	PE	Maus IgG1, κ	B159	BD Pharmingen
Maus-Anti-Human-CD4	PE-Cy7	Maus IgG1, κ	SK3	BD Pharmingen
Maus-Anti-Human-CD8	V500	Maus IgG1, κ	SK1	BD Horizon
Maus-Anti-Human-CD27	APC	Maus IgG1, κ	M-T271	BD Pharmingen
Maus-Anti-Human-CD43	PE	Maus IgG1, κ	1G10	BD Pharmingen

3.4 Geräte

Gerät	Hersteller
Biofuge 28RS	Heraeus Sepatech
Centrifuge 5418	Eppendorf
Advanced Vortex Mixer ZX3	VELP Scientifica
Allegra X-30R Centrifuge	Beckman Coulter
Heracell 240i CO2-Incubator	Thermo Scientific
Durchflusszytometer BD FACS Canto II	BD
Lichtmikroskop	Diavert
Neubauerzählkammer	Hecht Assistent
Mikropipetten	Eppendorf
Sterilwerkbank	PRETTTL GmbH

3.5 Methoden

3.5.1 Probengewinnung und Transport

Die venöse Blutentnahme erfolgte in 9 ml-Lithium-Heparinröhrchen im Rahmen der ambulanten Betreuung der Patienten in der MS-Ambulanz des Caritas Krankenhauses in Bad Mergentheim. Es wurden durchschnittlich 18 ml Blut pro

Patient auf Eis gekühlt transportiert und 3,5 Stunden nach der Blutentnahme weiterverarbeitet.

3.5.2 Isolierung peripherer mononukleärer Blutzellen (PBMC) mittels Dichtegradientenzentrifugation

Das Blut wurde im Verhältnis 1:1 mit PBS 0,1 M verdünnt und an der Sterilwerkbank 30 ml des verdünnten Vollblutes auf 15 ml der Trennlösung (*Biocoll separating solution*, Biochrom) geschichtet. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation (30 Min., 531 x g, 20 °C) ohne Bremse. Die Methode basiert auf der unterschiedlichen Dichte und Sedimentationsgeschwindigkeit von Stoffen. Dies führt dazu, dass mithilfe von Zentrifugalkräften einem Gradienten folgend eine Phasentrennung erreicht werden kann. Demnach sammeln sich die Bestandteile mit erhöhter Dichte - in diesem Fall ein Zellpellet aus Erythrozyten und Granulozyten - am Boden des Röhrchens an. Darüber befand sich die Trennlösung, die wiederum durch eine Grenzschicht bestehend aus den PBMC vom darauf befindlichen Plasma getrennt wurde. Der weiße Ring aus PBMC wurde vorsichtig mithilfe einer Pasteurpipette abgenommen und in ein 50 ml Röhrchen überführt. In diesem Röhrchen wurden die PBMC dreimal einem Waschschrift mit einem Kulturmedium (RPMI-1640 Medium + 1% P/S, einmal 50 ml, zweimal 20 ml) mit anschließender Zentrifugation (10 Min., 300 x g, mit Bremse bei 20 °C) unterzogen. Der Überstand wurde jeweils abgenommen und verworfen. Die Zellen wurden vorsichtig in Kulturmedium resuspendiert.

3.5.3 Zellzählung

Zur Zellzählung wurden 10 µl der Zellsuspension im Verhältnis 1:10 mit Trypanblau 0,5 % (in 0,9% NaCl sterilfiltriert) versetzt. Nachdem das Deckglas so auf die Neubauerzählkammer gelegt wurde, dass „Newtonringe“ entstanden, wurden 10 µl der mit Trypanblau versetzten Zellsuspension auf die Zählkammer gegeben. Dabei wurde die Pasteurpipettenspitze an den Rand der Zählkammer angesetzt und durch Kapillarkräfte die Zellsuspension zwischen Deckglas und Kammer gesaugt. Die Zellzählung erfolgte unter dem Lichtmikroskop. Mithilfe der durch die Einteilungslinien entstandenen Quadrate der Neubauerzählkammer wurden die lebenden ungefärbten Zellen in jedem Quadrat gezählt und der

Mittelwert gebildet. Dieser entsprach der absoluten Zellzahl lebender Zellen pro 10 ml Zellsuspension.

3.5.4 Polyklonale Stimulation

Nach einem Zentrifugationsschritt (10 Min., 300 x g, mit Bremse bei 20°C) mit anschließendem Dekantieren des Überstandes wurden die Zellen mit dem Kulturmedium (RPMI-1640 Medium + 1% P/S + 10% FBS) auf eine Konzentration von 3×10^6 Zellen/ml aufgefüllt und 4,5 ml (entspricht $13,5 \times 10^6$ Zellen) für die folgende Färbung entnommen. Die restlichen Zellen wurden mit β -Mercaptoethanol (10 μ l auf 10 ml), R848 (5 μ l auf 10 ml) und IL-2 (1,5 μ l auf 10 ml) versetzt, in eine Kulturflasche umgefüllt und für 96 h bei 37 °C und 7% CO₂ im Brutschrank kultiviert. Nach Ablauf der 96 h wurde die Zellsuspension drei Waschschritten mit PBS und anschließender Zentrifugation (10 Min., 300 x g, bei 20°C) unterzogen und danach eine Zellzählung durchgeführt.

3.5.5 Färbung

Für die Färbung wurden zunächst jeweils 1×10^6 Zellen auf 2 ml Reaktionsgefäße verteilt, bei 300 x g für 10 Min. bei Raumtemperatur pelletiert und der Überstand abpipettiert. Dann wurden pro Reaktionsgefäß 1 ml PBS und mit Ausnahme des Gefäßes für die Ungefärbt-Probe 1 μ l Tot-Lebendfarbstoff hinzugegeben, mittels Vortex-Mischers miteinander vermischt und lichtgeschützt für 10 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte ein Blockierungsschritt mit 1 ml PBS 1% BSA und eine Zentrifugation (300 x g, 10 Min., 20°C), bei der der Überstand dekantiert wurde. Pro Reaktionsgefäß wurden 50 μ l des im Folgenden aufgelisteten Antikörpermix dazugegeben und 30 Min. lichtgeschützt bei 20 °C inkubiert. Nach zwei sich anschließenden Waschschritten mit 1 ml PBS + 1% BSA und Zentrifugation (300 x g, 5 Min., 20°C) mit Dekantieren des Überstands, wurde das Pellet resuspendiert und auf 400 μ l mit PBS 1 % BSA zur Messung am Durchflusszytometer aufgefüllt und auf Eis gelagert.

3.5.5.1 Panel CEACAM1-exprimierender Immunzellen

Bei diesem Panel standen neben den CEACAM 1-exprimierenden B (CD3⁻, CD20⁺)- und T (CD3⁺, CD20⁻)-Lymphozyten vor allem natürliche Killer-Zellen

(NK-Zellen, CD3⁻, CD20⁻, CD56⁺), Monozyten (CD3⁻, CD20⁻, CD14⁺) und NKLT (CD3⁺, CD20⁻, CD56⁺) im Vordergrund. Die Menge der eingesetzten Fluoreszenzfarbstoffe richtete sich dabei nach den Herstellerangaben. Da die Panels mehrere Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelte Antikörper umfassten und es dabei zur spektralen Überlappung und somit zu falsch positiven Signalen sowie einem hohen unspezifischen Hintergrund zwischen den einzelnen Fluoreszenzfarbstoffen kommen konnte, wurden zusätzliche Kontrollfärbungen („*fluorescence minus one*“, FMO) für das Gating eingesetzt. Dabei handelt es sich um Färbungen, bei denen alle Fluoreszenzfarbstoffe außer dem zu Testenden hinzugegeben werden, sodass sich die Obergrenze für die maximal zu erwartende Fluoreszenz der ungefärbten Zellen in diesem Kanal bestimmen lässt. Diese Obergrenze entspricht zugleich der Untergrenze für die gefärbten Daten in diesem Kanal. Dadurch wird die Trennung zwischen ungefärbten und gefärbten Daten und somit das „*Gating*“, also die Selektion einer bestimmten Zellpopulation, erleichtert. Diese Kontrollfärbungen sind jedoch nicht für alle Fluoreszenzfarbstoffe notwendig. Bei Fluoreszenzfarbstoffen, die keine Streustrahlung anderer Fluorochrome in ihren Kanälen verzeichnen, genügt als Kontrollfärbung eine Ungefärbtprobe (*Unstained*). In diesem Panel wurde neben einer Ungefärbtprobe eine Kontrollfärbung für FITC, PE und V500 durchgeführt wie in der folgenden gezeigt.

Tabelle 5: Übersicht über das Panel CEACAM1-exprimierender Immunzellen sowie ihrer Kontrollfärbungen

	PER-CP CY5.5	APC-H7	V500	PE	FITC
PROBE	CD 20	CD 3	CD 14	CD 56	CD 66a
FMO FITC	CD 20	CD 3	CD 14	CD 56	---
FMO PE	CD 20	CD 3	CD 14	---	CD 66a
FMO V500	CD 20	CD 3	---	CD 56	CD 66a
UNSTAINED	---	---	---	---	---

3.5.5.2 Panel CEACAM1-exprimierender B- und T-Lymphozyten

Bei diesem Panel lag das Hauptaugenmerk auf CEACAM1- exprimierenden B- und T-Lymphozyten sowie B1-Zellen (CD3⁻, CD20⁺, CD27⁺), Gedächtniszellen

(CD3⁻, CD20⁺, CD43⁺), naiven B-Zellen (CD3⁻, CD20⁺, CD27⁻, CD43⁻), Plasmazellen (CD3⁻, CD20⁻, CD27⁺), T_H-Zellen (CD3⁺, CD20⁻, CD4⁺) und zytotoxischen T-Lymphozyten (CD3⁺, CD20⁻, CD8⁺).

Als Gatingkontrolle dienten neben einer Ungefärbtprobe Kontrollfärbungen für FITC, PE und zunächst APC. Da sich APC als sehr stabile Färbung mit einer klaren Grenze zwischen gefärbten und ungefärbten Zellen herausgestellt hat, wurde ab dem 05.08.2014 auf weitere Kontrollfärbungen für APC verzichtet.

Tabelle 6: Übersicht über das Panel für CEACAM1-exprimierende B- und T-Lymphozyten sowie die Kontrollfärbungen

	PER-CP CY5.5	APC-H7	V500	PE-CY7	APC	PE	FITC
PROBE	CD 20	CD 3	CD 8	CD 4	CD 27	CD 43	CD 66a
FMO PE	CD 20	CD 3	CD 8	CD 4	CD 27	---	CD 66a
FMO APC	CD 20	CD 3	CD 8	CD 4	---	CD 43	CD 66a
FMO FITC	CD 20	CD 3	CD 8	CD 4	CD 27	CD 43	---
UNSTAINED	---	---	---	---	---	---	---

3.5.5.3 Panel für die Färbung nach polyklonaler Stimulation

Die polyklonale Stimulation sollte einen Zustand der Inflammation simulieren. Der Fokus bei dieser Färbung lag bei den B- und T-Lymphozyten sowie den Monozyten, NK-Zellen und NKLT-Zellen. Die Kontrollfärbungen umfassten in diesem Panel eine Ungefärbtprobe sowie eine Kontrollfärbung für FITC.

Tabelle 7: Übersicht über das Panel nach polyklonaler Stimulation sowie die Kontrollfärbungen

	PER-CP CY5.5	APC-H7	V500	PE	FITC
PROBE	CD 20	CD 3	CD 14	CD 56	CD 66a
FMO FITC	CD 20	CD 3	CD 14	CD 56	---
UNSTAINED	---	---	---	---	---

3.5.6 Messung am Durchflusszytometer

Die Messung mit dem Durchflusszytometer (FACS, *fluorescence-activated Cell sorting*) wurden im FACS-Labor des Instituts für Anatomie und Zellbiologie in Würzburg durchgeführt.

3.5.6.1 Messprinzip

Die FACS-Analyse ist ein Verfahren zur quantitativen Bestimmung von Oberflächenmolekülen und intrazellulären Proteinen. Sie ermöglicht eine Zelltypisierung von Einzelzellen aufgrund ihrer Fluoreszenz- und Streulichteigenschaften. Basierend auf dem Prinzip der Antikörper-Antigen-Reaktion werden Einzelzellen in Suspension mit durch Fluoreszenzfarbstoff markierten Antikörpern versetzt. Mittels einer Kapillare werden die Zellen in einen koaxialen Hüllstrom eingesogen und so an der Messkammer vorbeigeführt, dass sie sequenziell zwischen Laserstrahl und Flüssigkeitsstrom fokussiert werden (hydrodynamische Fokussierung). Durch den monochromatischen Laserstrahl kommt es zur Absorption von Lichtenergie in dem für den Fluoreszenzfarbstoff charakteristischen Wellenlängenbereich. Dadurch werden Elektronen auf ein höheres Energieniveau angehoben und durch Zurückfallen auf das Ausgangsniveau wird Energie in Form von Photonen freigesetzt. Die emittierte Photonenkonzentration wird mithilfe eines Photonendetektors gemessen und verhält sich proportional zur Menge an gebundenen Antikörpern. Neben der emittierten Fluoreszenz wird außerdem das Streulicht detektiert, das Aufschluss über Größe und Komplexität der Zellen gibt. Das Vorwärtsstreulicht (FSC, *forward scatter*) entspricht der Intensität des Lichts, die in Vorwärtsrichtung entlang des einfallenden Lichtstrahls in einem geringen Ablenkungswinkel streut und abhängig vom Volumen der Zelle ist. Es ist damit ein Maß für die Größe einer Zelle. Das Seitwärtsstreulicht (SSC, *sideward scatter*) gibt die Lichtbrechung entlang eines 90° Winkels an und wird von der Granularität der Zelle beeinflusst. Mittels dieser beiden Komponenten lassen sich die Zellen morphologisch voneinander abgrenzen.

3.5.6.2 Settingkontrolle

Um eine Vergleichbarkeit der Daten zu gewährleisten, sind bei der Durchflusszytometrie verschiedene Kontrollmechanismen notwendig. Einer davon ist die Settingkontrolle. Dabei werden die Einstellungen des Durchflusszytometers überprüft und anhand einer Vergleichsprobe sichergestellt, dass die gefärbten Zellen im erwarteten Fluoreszenzintensitätsspektrums liegen. Neben der Einstellung der Laser und Filter liegt das Hauptaugenmerk dabei auf der angelegten Spannung (*Voltage*). Diese wurde optimiert, wenn die Signalintensität der einzelnen Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Antikörper nicht im erwarteten Spektrum lag. In der folgenden ist exemplarisch die Settingkontrolle für die Färbungen zwischen dem 24.07.2014 und dem 14.08.2014 dargestellt.

Tabelle 8: Settingkontrolle für die Färbungen vom 24.07.2014 bis 14.08.2014

Parameter (\$PnN)	Stain (\$PnS)	Range (\$PnR)	Bits (\$PnB)	Decades (\$PnE)	Gain (\$PnG)	Voltage (\$PnV)
FSC-A		262144	32	0,0	1,0	286
FSC-H		262144	32	0,0	1,0	286
FSC-W		262144	32	0,0	1,0	286
SSC-A		262144	32	0,0	1,0	434
SSC-H		262144	32	0,0	1,0	434
SSC-W		262144	32	0,0	1,0	434
FITC-A	cd66a	262144	32	0,0	1,0	400
PE-A	cd56	262144	32	0,0	1,0	421
PerCP-Cy5-5-A	cd20	262144	32	0,0	1,0	561
PE-Cy7-A		262144	32	0,0	1,0	582
APC-A		262144	32	0,0	1,0	520
APC-Cy7-A	cd3	262144	32	0,0	1,0	599
Pacific Blue-A	death	262144	32	0,0	1,0	350
AmCyan-A	cd14	262144	32	0,0	1,0	477

3.5.6.3 Kompensation

Ein weiterer Kontrollmechanismus ist die Kompensation. Diese sollte nach der Settingkontrolle und damit nach der Korrektur der eingestellten Spannung erfolgen. Hintergrund ist auch hierbei die Tatsache, dass die einzelnen Fluoreszenzfarbstoffe bei einer Mehrfarbenanalyse nicht nur Fluoreszenzsignale in den eigens dafür vorgesehenen Kanal, sondern auch Impulse in die anderen Kanäle streuen. Die Kompensation entspricht dabei der rechnerischen Korrektur der Impulsstärke, die ein Fluorochrom in einen anderen Kanal abgibt. Dabei wurde pro Fluorochrom 1 µl in ein Eppendorfreaktionsgefäß gegeben und mit je

einem Tropfen eines positiven und negativen Kontrollbeads versehen. Nach einer lichtgeschützten Inkubationszeit (15 Min., 20 °C) erfolgte die Messung am Durchflusszytometer. Die Software des Durchflusszytometers gibt an, wieviel die einzelnen Fluorochrome prozentual gesehen in die Kanäle anderer hereinstrahlen, sodass eine rechnerische Korrektur vorgenommen werden kann.

3.5.6.4 Isotypkontrolle

Die Isotypkontrolle dient der Bestimmung des Ausmaßes an Hintergrundsignalen der Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Antikörper, die durch unspezifische Bindung und Autofluoreszenz der Zellen zustande kommen. Die Autofluoreszenz der Zellen entspricht der Lichtemission durch intrazelluläre zytoplasmatische Fluorochrome.

3.5.6.5 Messung

Nach dem Justieren und Kalibrieren des Durchflusszytometers erfolgte die Messung. Es wurde eine elektronische Signalschwelle (Diskriminator) für die Vorwärts-Seitwärts-Streulicht-Darstellung von 50 K festgesetzt, um unspezifische Störsignale von Verunreinigungen und Störpartikeln von toten Zellen zu vermeiden. Es wurden pro Proberöhrchen 200.000 Zellen bei den Färbungen und Kontrollfärbungen sowie 100.000 Zellen bei den Ungefärbtproben akquiriert. Die Durchflussrate betrug zwischen 200 und 300 Zellen pro Sekunde.

3.5.7 Auswertung der durchflusszytometrischen Daten

3.5.7.1 Gating-Strategie

Die Gating-Strategie dient der logischen Sortierung der Messdaten und hat als Zielsetzung das Herausfiltern der einzelnen Zelllinien und Subpopulationen durch Gegenüberstellung verschiedener Parameter und Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelter Antikörper. Da bei einigen Färbungen die Tot-Lebend-Färbung nicht durchgeführt wurde, wurde auf eine Tot-Lebend-Diskriminierung verzichtet und bei der Gating-Strategie mit einem morphologischen Lymphozytengate begonnen (Abbildung 1).

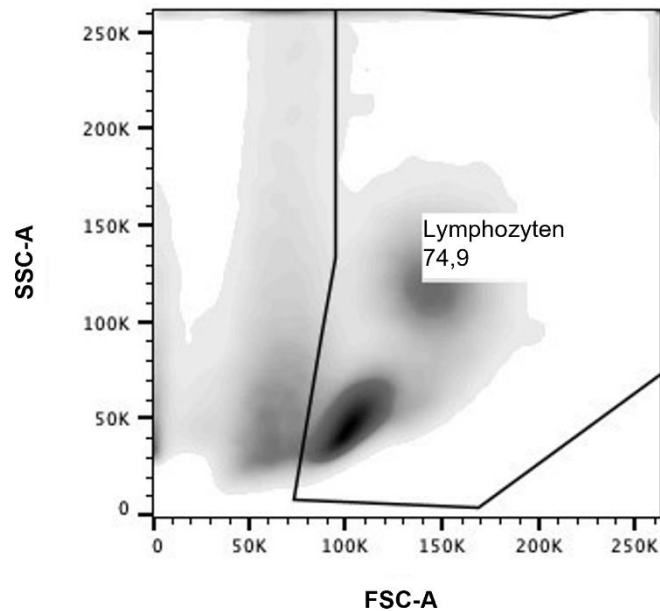


Abbildung 1: *Beispiel für ein Lymphozytengate anhand der Färbung von SA11250614 am 25.06.2014*

Bei einem statistischen Vergleich zwischen der Gating-Strategie, die auf dem morphologischen Lymphozytengate basiert (Strategie 1) und der die Tot-Lebend-Diskriminierung enthaltenden Gating-Strategie (Strategie 2) zeigten sich keine signifikanten Unterschiede ($p = 0,074$), was die Verteilung der Zelllinien und ihrer Subpopulationen angeht. Der statistische Vergleich erfolgte mittels GraphPad PRISM 7 und wurde mithilfe eines gepaarten, zweiseitigen t-Tests durchgeführt. Die Dublettendiskriminierung erfolgte sowohl im Vorwärts- als auch im Seitwärts-Streulicht-Gate (Abbildung 2).

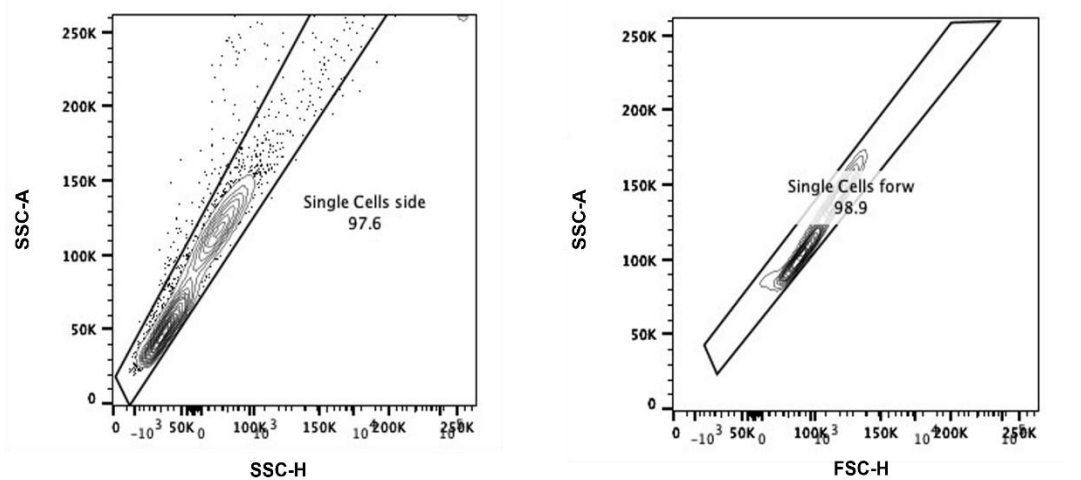


Abbildung 2: Beispiel der Dublettendiskriminierung anhand der Färbung von SAIII250614 am 25.06.2014

Sofern eine Kontrollfärbung für die einzelnen Fluoreszenzfarbstoffe vorhanden war, diente diese als Negativkontrolle. Alternativ wurde die Ungefärbtprobe als Maß für die Untergrenze des jeweiligen Gates herangezogen. Bei den Monozyten und NK-Zellen wurde außerdem in eine Subpopulation mit hoher („*bright*“) und eine mit niedriger („*dim*“) Fluoreszenzintensität unterschieden. Die Grenzen hierfür orientierten sich an der Negativkontrolle und dem morphologischen Bild der Immunzellen (Abbildung 3).

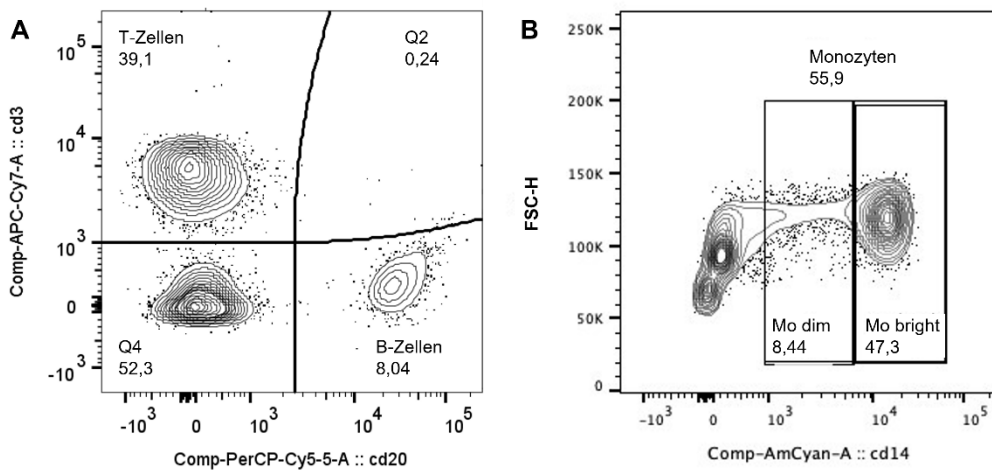


Abbildung 3: Beispiel für die Gatingstrategie der einzelnen Zelllinien

Erläuterung: **A:** Gating der Zellen in T-Zellen, B-Zellen, $CD3^+CD20^+$ sowie $CD3^-CD20^-$ Zellen anhand der Beispielfärbung von SA11250614 vom 25.06.2014 **B:** Gating der $CD3^-CD20^-$ Monozyten in eine „dim“ und „bright“ Subpopulation anhand der Beispielfärbung von SA11250614 vom 25.06.2014

In den folgenden Abbildungen (Abbildung 4, Abbildung 5 und Abbildung 6) sind die einzelnen Gating-Strategien für die verschiedenen Panels aufgeführt. Dabei entspricht die Gating-Strategie für das Panel der CEACAM1-exprimierenden B- und T-Lymphozyten vor polyklonaler Stimulation dem nach polyklonaler Stimulation.

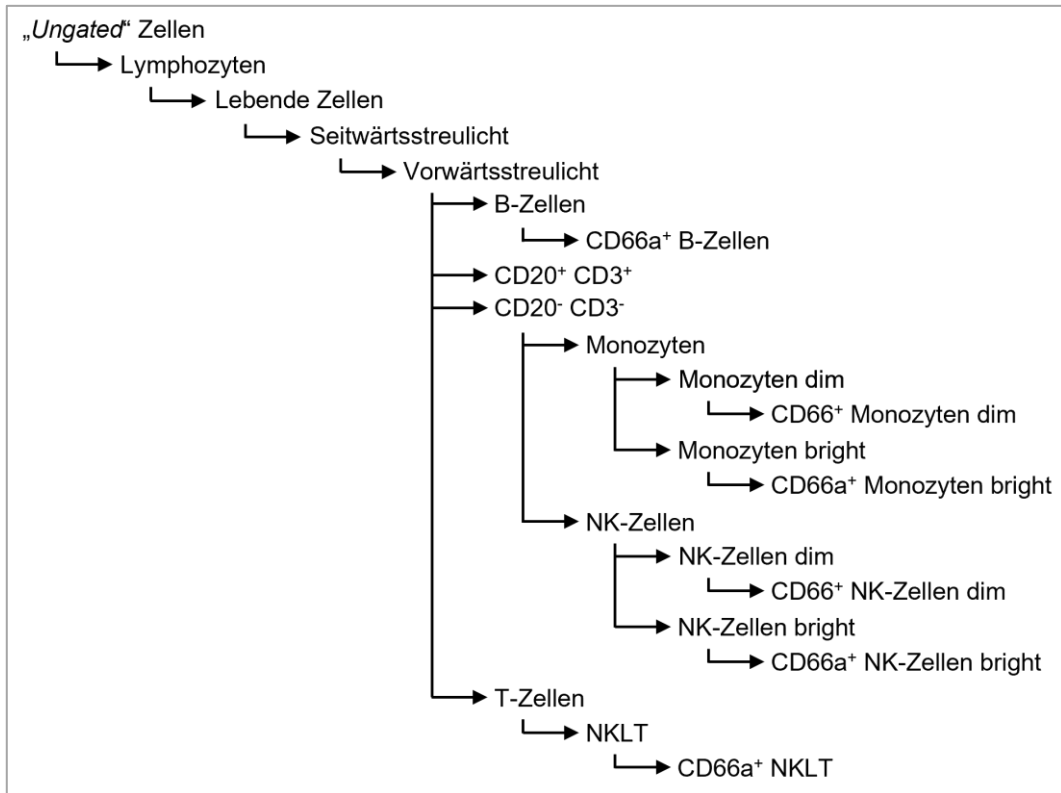


Abbildung 4: Übersicht über die Gating-Strategie des Panels CEACAM1-exprimierender Immunzellen

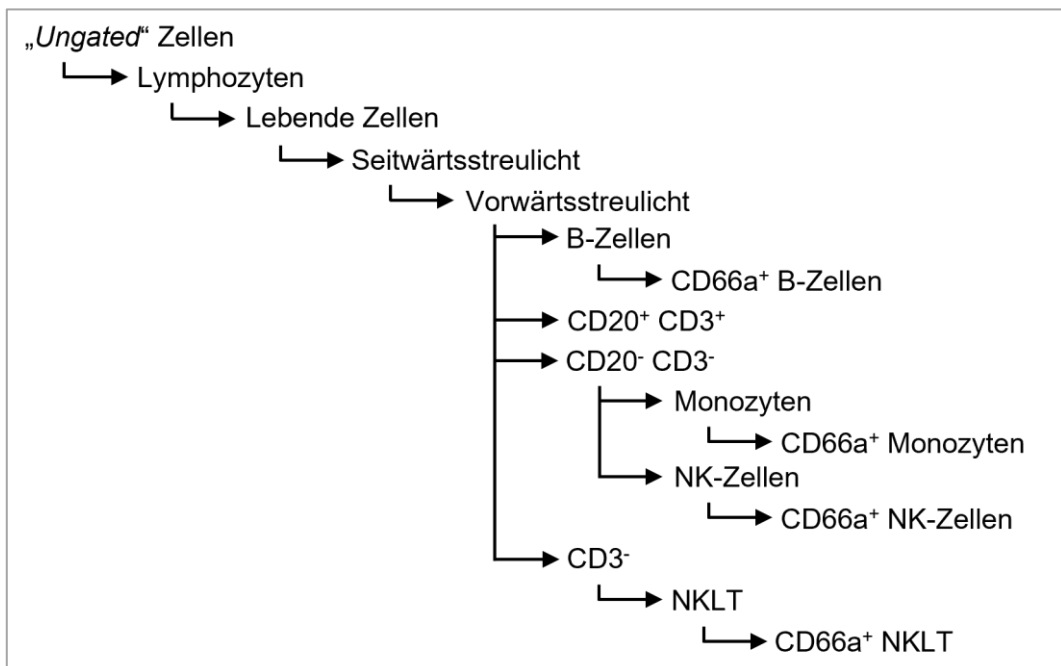


Abbildung 5: Übersicht über die Gating-Strategie für das Panel CEACAM1-exprimierender Immunzellen nach polyklonaler Stimulation

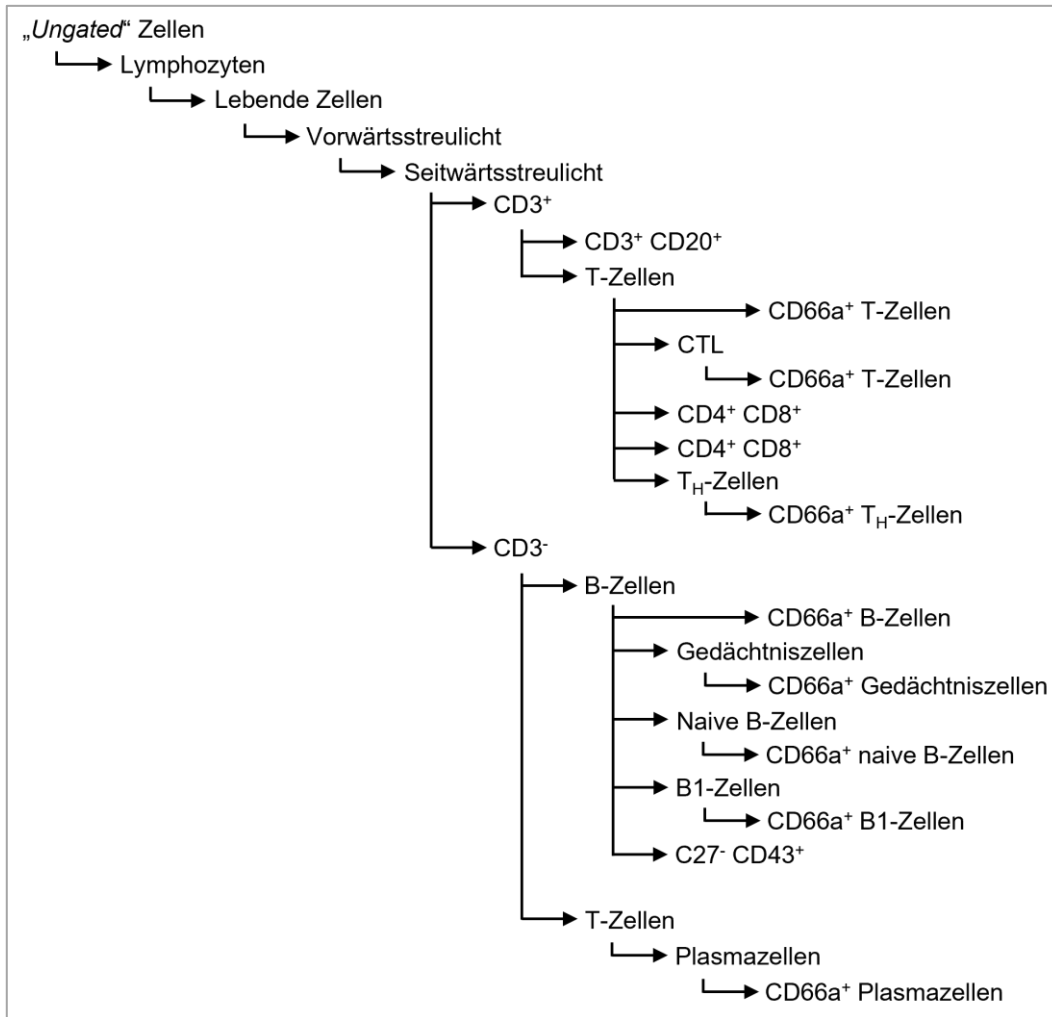


Abbildung 6: Übersicht über die Gating-Strategie für das Panel CEACAM1-exprimierender B- und T-Lymphozyten und deren Subpopulationen

3.5.7.2 Statistischer Vergleich der verschiedenen Settings

Es wurde für jedes Setting eine Gating-Vorlage anhand einer der mit dem jeweiligen Setting durchgeführten Messungen erstellt. Diese diente dann als Vorlage für alle weiteren Messungen des jeweiligen Settings. Um zu überprüfen, ob die verschiedenen Settings trotz Unterschiede in den Einstellungen als homogene Gruppe in der statistischen Datenauswertung behandelt werden konnten oder ob für jedes Setting eine eigene statistische Auswertung erfolgen sollte, wurde ein statistischer Vergleich der verschiedenen Settings durchgeführt. Für alle statistischen Auswertungen diente GraphPad Prism 7 als Software. Als Vergleichstest wurde in diesem Fall die einfaktorielle ANOVA herangezogen (Signifikanzniveau $p < 0,05$), da wir die einzelnen Settings als unabhängige

Gruppen definierten. Die Nullhypothese besagte, dass die Zelllinien durch die Settings unbeeinträchtigt bleiben. Hierbei ließ sich im Vergleich der Settings keine signifikanten Unterschiede in den Zellpopulationen und ihren Subpopulationen feststellen. In der statistischen Auswertung der Daten blieben daher die einzelnen Settings unberücksichtigt.

3.5.7.3 Statistische Auswertung mittels GraphPad Prism

Die statistische Auswertung der experimentell erhobenen Daten erfolgte mithilfe des Statistikprogramms GraphPad Prism 7 im Institut für Anatomie und Zellbiologie Würzburg.

Es wurden die Unterschiede in der Anzahl der Immunzellen und CEACAM-1-exprimierenden Immunzellen zwischen gesunden Probanden und MS-Erkrankten untersucht. Als statistischer Test diente der zweiseitige, ungepaarte t-Test. Dieser ermöglicht den Vergleich zweier unabhängiger Gruppen. Da bei der Gegenüberstellung von gesunden Probanden und MS-Erkrankten davon auszugehen ist, dass die Verteilung der Zelllinien einer Normalverteilung (Gauß-Verteilung) unterliegt, wurde ein parametrischer Test angewandt. Auf die Welch's Korrektur wurde verzichtet, da angenommen wurde, dass beide Stichproben ähnliche Standardabweichungen und Varianzenhomogenität aufweisen. Die Nullhypothese besagte, dass es zwischen den geprüften Stichproben keinen Unterschied gibt. Das Signifikanzniveau als maximale Wahrscheinlichkeit, die Nullhypothese irrtümlich abzulehnen, wurde auf $\alpha = 0,05$ festgelegt. Die graphische Darstellung der Ergebnisse erfolgte in Form von Scatterplot-Diagrammen. Jeder einzelne Punkt repräsentiert dabei einen Probanden. Der Mittelwert sowie die Standardabweichungen sind als horizontale Linie dargestellt. Messungen, bei denen es zu keinem signifikanten Unterschied zwischen den verglichenen Proben kam, wurden nicht gesondert gekennzeichnet. War ein signifikanter Unterschied zu verzeichnen, wurde dies mit „*“ markiert. Die Anzahl der Sternchen entspricht dabei der Anzahl an Nachkommastellen mit „0“. Messungen, bei denen die Zellzahl 100000 unterschritten hat, wurden dabei ebenso nicht berücksichtigt wie die Messungen, die statt mit CD20 als B-Zell-Marker mit CD19 durchgeführt wurden.

4 Ergebnisse

4.1 Unterschiede zwischen dem prozentualen Anteil von Immunzellen und deren Subpopulationen bei RRMS-Patienten und gesunden Probanden

Um eine Aussage darüber treffen zu können, ob einzelne Immunzellen und Subpopulationen bei MS-Erkrankten im Vergleich zu gesunden Probanden in ihrer Prozentzahl erhöht oder erniedrigt sind, wurden diese mittels zweiseitigem, ungepaarten t-Test miteinander verglichen. Da es sich bei der schubförmig remittierenden MS um die häufigste der Verlaufsformen handelt, gehörten die meisten der MS-erkrankten Teilnehmer zu dieser Gruppe. Insgesamt wurden 22 Teilnehmer mit RRMS verzeichnet. Dabei wurden bei der Hälfte der Patienten (n = 11) durchflusszytometrische Messungen vor und nach polyklonaler Stimulation durchgeführt. Diese diente zur Imitation eines proinflammatorischen immunologischen Prozesses im Sinne eines Schubereignisses.

4.1.1 Vergleich der Immunzellen bei RRMS-Patienten und HC vor polyklonaler Stimulation

Im Folgenden werden die statistisch ausgewerteten, durchflusszytometrischen Ergebnisse der einzelnen Immunzellen und Subpopulationen bei RRMS-Patienten im Vergleich zu gesunden Probanden bei einer Testung ohne polyklonale Stimulation aufgezeigt.

4.1.1.1 Erhöhte Prozentzahl von B-Lymphozyten bei RRMS-Patienten

Im Vergleich zu den gesunden Probanden (n = 18; mean \pm SD, 4,44 \pm 2,23; CI [3,33;5,55]) war der prozentuale Anteil der durchflusszytometrisch gemessenen B-Lymphozyten bei Patienten mit schubförmiger MS signifikant erhöht (n = 16; mean \pm SD, 8,85 \pm 4,24; CI [6,59;11,11]; p = 0,0005) (Abbildung 7A).

Bei den Gedächtniszellen ließ sich kein signifikanter Unterschied zwischen RRMS-Patienten (n = 17; mean \pm SD 34,77 \pm 20,24; CI [24,37;45,18]; p = 0,9313) und gesunden Probanden (n = 16; mean \pm SD 34,23 \pm 15,37; CI [26,04;42,42]) feststellen (Abbildung 7B).

Auch bei den naiven B-Zellen konnte kein signifikanter Unterschied zwischen RRMS-Patienten ($n = 17$; mean \pm SD $59,88 \pm 19,54$; CI [49,83;69,92]; $p = 0,8050$) und gesunden Probanden ($n = 16$; mean \pm SD $61,39 \pm 15,00$; CI [53,40;69,39]) gefunden werden (Abbildung 7C).

Hinsichtlich des prozentualen Anteils von B1-Zellen ließ sich kein signifikanter Unterschied zwischen RRMS-Patienten ($n = 17$; mean \pm SD $1,93 \pm 1,21$; CI [1,31;2,55]; $p = 0,5303$) und gesunden Probanden ($n = 16$; mean \pm SD $2,25 \pm 1,61$; CI [1,39;3,10]) nachweisen (Abbildung 7D).

Die Prozentzahl der Plasmazellen zeigte sich bei RRMS-Patienten ($n = 17$; mean \pm SD, $0,26 \pm 0,22$; CI [0,15;0,38]; $p = 0,3331$) im Vergleich zu gesunden Probanden ($n = 15$; mean \pm SD, $0,19 \pm 0,18$; CI [0,09;0,29]) nicht signifikant verändert (Abbildung 7E).

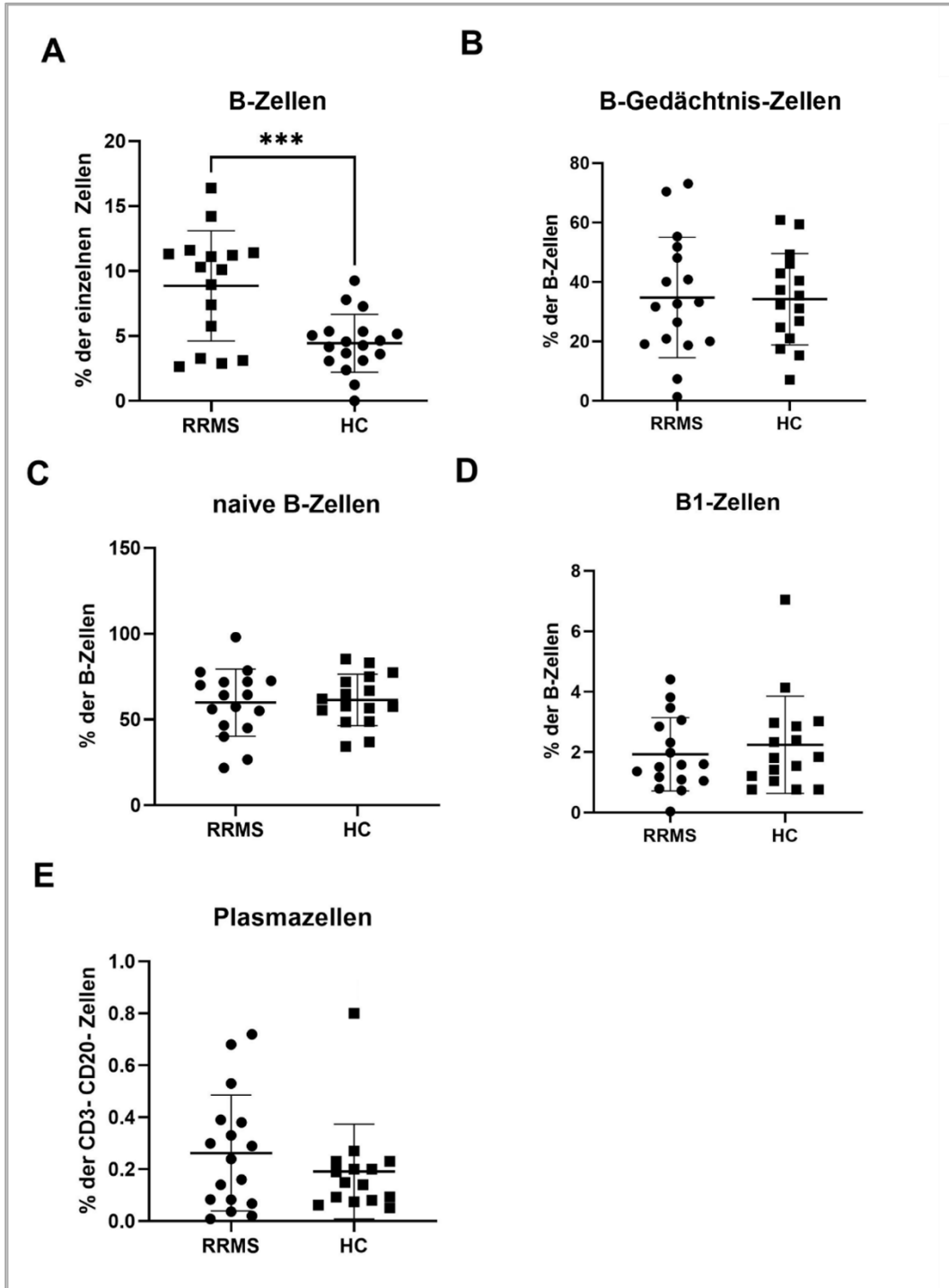


Abbildung 7: Verteilung der B-Zellen sowie der Subpopulationen bei RRMS-Patienten und gesunden Probanden

Erläuterung: (A) Prozentualer Anteil der B-Zellen (B) Prozentualer Anteil der Gedächtniszellen (C) Prozentualer Anteil der naiven B-Zellen (D) Prozentualer Anteil der B1-Zellen (E) Prozentualer Anteil der Plasmazellen

4.1.1.2 Verminderter Anteil von T-Lymphozyten und erhöhter prozentualer Anteil von T_H-Zellen bei RRMS-Patienten

Bei der Untersuchung von T-Lymphozyten im peripheren Blut zeigten sich signifikante Unterschiede ($p = 0,0425$) zwischen RRMS-Erkrankten ($n = 20$; mean \pm SD, $53,17 \pm 12,75$; CI [47,20;59,14]) und gesunden Probanden ($n = 18$; mean \pm SD, $60,38 \pm 7,33$; CI [56,73;64,02]). Dabei war die Prozentzahl peripherer T-Lymphozyten bei Erkrankten signifikant erniedrigt (Abbildung 8A).

Bei den zytotoxischen T-Lymphozyten ließ sich kein signifikanter Unterschied zwischen RRMS-Patienten ($n = 17$; mean \pm SD $18,93 \pm 6,86$; CI [15,40;22,45]; $p = 0,2414$) und gesunden Probanden ($n = 16$; mean \pm SD $21,69 \pm 6,40$; CI [18,28;25,10]) feststellen (Abbildung 8B).

Beim prozentualen Anteil der T_H-Zellen fand sich ein signifikanter Unterschied ($p = 0,0225$) zwischen RRMS-Patienten ($n = 17$; mean \pm SD $75,32 \pm 13,72$; CI [68,26;82,37]) und gesunden Probanden ($n = 16$; mean \pm SD $65,51 \pm 9,12$; CI [60,65;70,37]), wobei hier ein erhöhter prozentualer Anteil der T_H-Zellen bei RRMS-Patienten im peripheren Blut vorlag (Abbildung 8C).

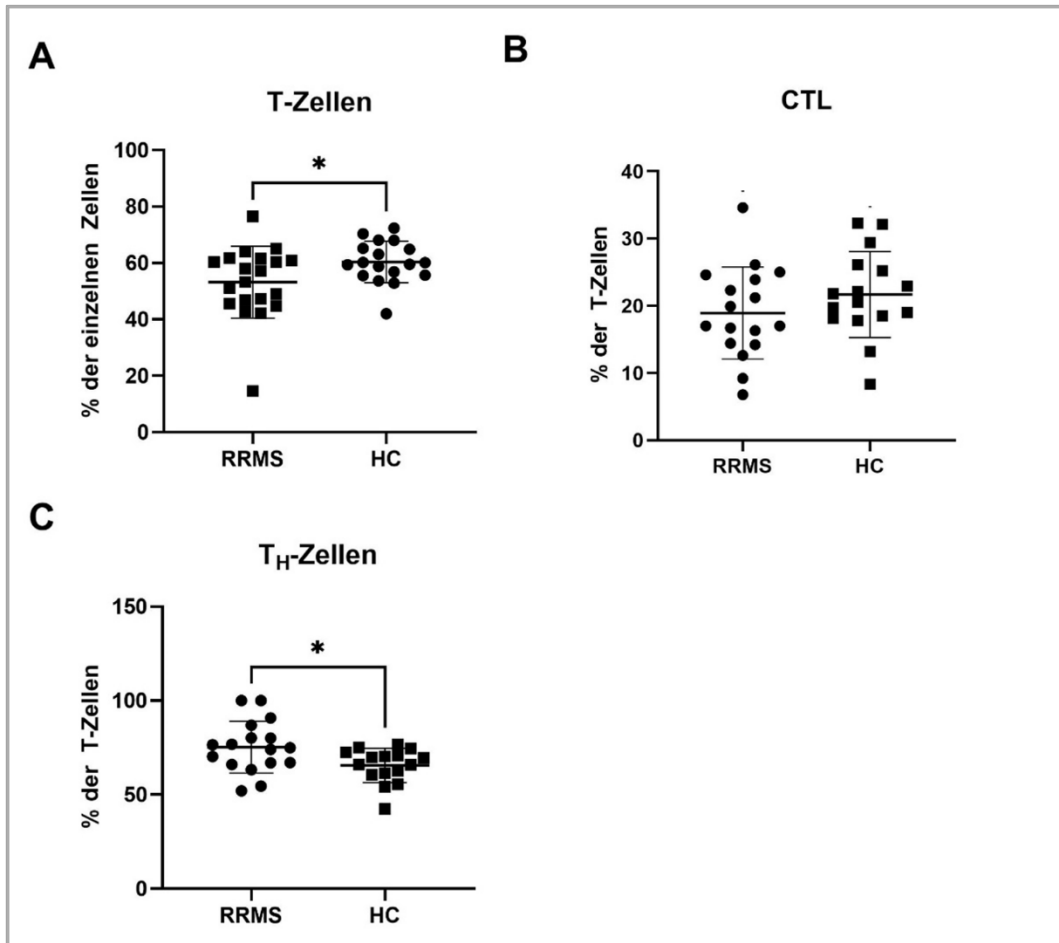


Abbildung 8: Verteilung der T-Zellen und Subpopulationen bei RRMS-Patienten und gesunden Probanden

Erläuterung: (A) Prozentualer Anteil der T-Zellen (B) Prozentualer Anteil der CTL (C) Prozentualer Anteil der TH-Zellen

4.1.1.3 Erniedrigter prozentualer Anteil von CD56^{dim}-NK-Zellen bei RRMS-Patienten

Hinsichtlich der Prozentzahl von NK-Zellen bei Patienten mit schubförmigem Verlauf ($n = 21$; mean \pm SD, $28,04 \pm 10,46$; CI [23,11;33,15]) und gesunden Probanden ($n = 18$; mean \pm SD, $34,73 \pm 12,39$; CI [28,57;40,89]) gab es keine signifikanten Unterschiede ($p = 0,0757$) (Abbildung 9A).

Bei der „dim“-Subpopulationen ließ sich hingegen eine signifikante Erniedrigung bei RRMS-Patienten ($n = 21$; mean \pm SD, $24,95 \pm 10,04$; CI [20,38;29,52]; $p = 0,0488$) im Vergleich zu gesunden Probanden ($n = 18$; mean \pm SD, $32,18 \pm 12,15$; CI [26,14;38,22]) feststellen (Abbildung 9B).

Die „bright“-Population der NK-Zellen zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen RRMS-Patienten ($n = 21$; $\text{mean} \pm \text{SD}$, $3,03 \pm 1,16$; CI [2,50;3,56]) und gesunden Probanden ($n = 18$; $\text{mean} \pm \text{SD}$, $2,59 \pm 0,73$; CI [2,22;2,95]; $p = 0,1695$) (Abbildung 9C).

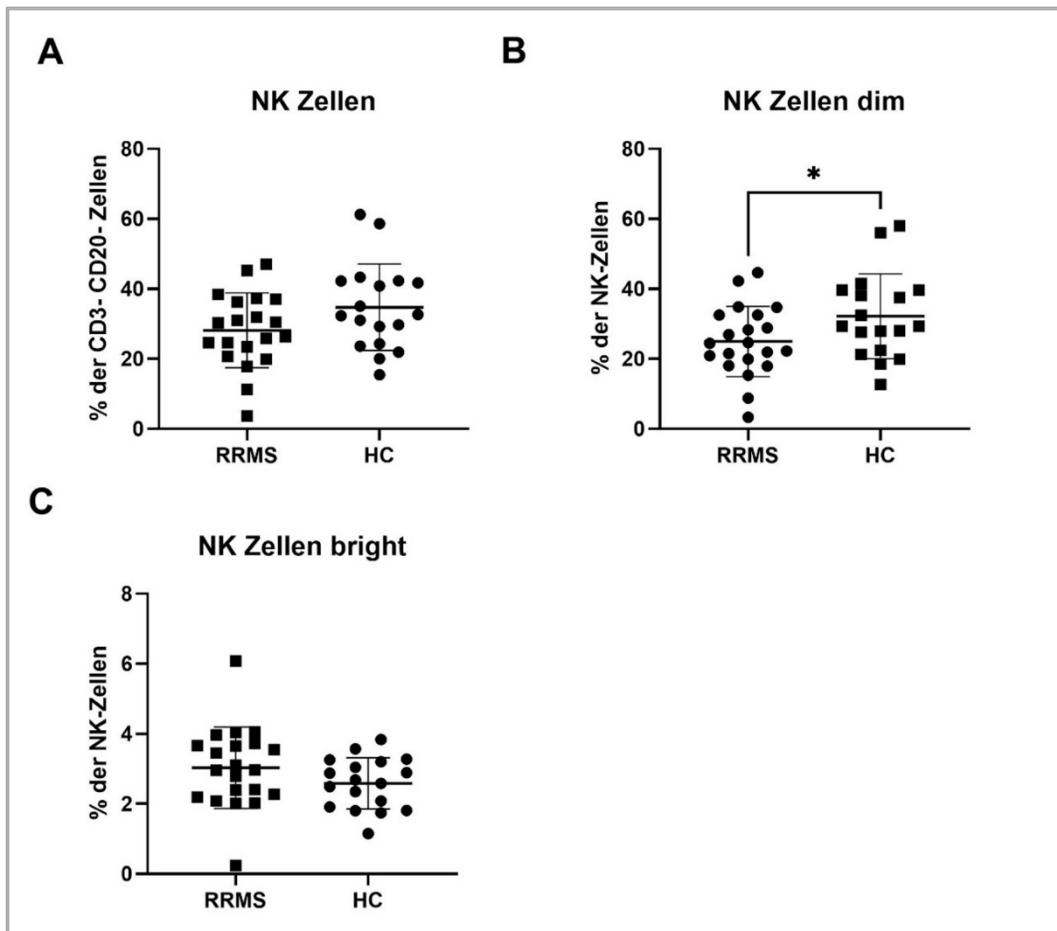


Abbildung 9: Verteilung der NK-Zellen und deren Subpopulationen bei RRMS-Patienten und gesunden Probanden

Erläuterung: (A) Prozentualer Anteil der NK-Zellen (B) Prozentualer Anteil der NK-Zellen dim (C) Prozentualer Anteil der NK-Zellen bright

4.1.1.4 Keine signifikanten Unterschiede beim prozentualen Anteil von Monozyten und deren Subpopulationen

Die Prozentzahl von Monozyten im peripheren Blut zeigte in der durchflusszytometrischen Auswertung keine signifikanten Unterschiede zwischen RRMS-Patienten ($n = 21$; $\text{mean} \pm \text{SD}$, $38,31 \pm 16,67$; CI [30,72;45,89]) und gesunden Probanden ($n = 18$; $\text{mean} \pm \text{SD}$, $46,58 \pm 11,96$; CI [40,63;52,52]; $p = 0,0879$) (Abbildung 10A).

Die „dim“-Population der Monozyten wies auch keine signifikanten Differenzen im Vergleich von RRMS-Patienten ($n = 21$; mean \pm SD, $10,04 \pm 3,44$; CI [8,50;11,61]) und gesunden Probanden ($n = 18$; mean \pm SD, $10,30 \pm 3,62$; $p = 0,8216$; CI [8,50;12,10]) auf (Abbildung 10B).

Die Betrachtung der Prozentzahl von Monozyten mit einem hohen Fluoreszenzsignal („bright“) ergab ebenfalls keinen signifikanten Unterschied zwischen RRMS-Patienten ($n = 21$; mean \pm SD, $28,29 \pm 15,92$; CI [21,04;35,54]) und gesunden Probanden ($n = 18$; mean \pm SD, $36,24 \pm 12,05$; CI [30,25;42,23]; $p = 0,0911$) (Abbildung 10C).

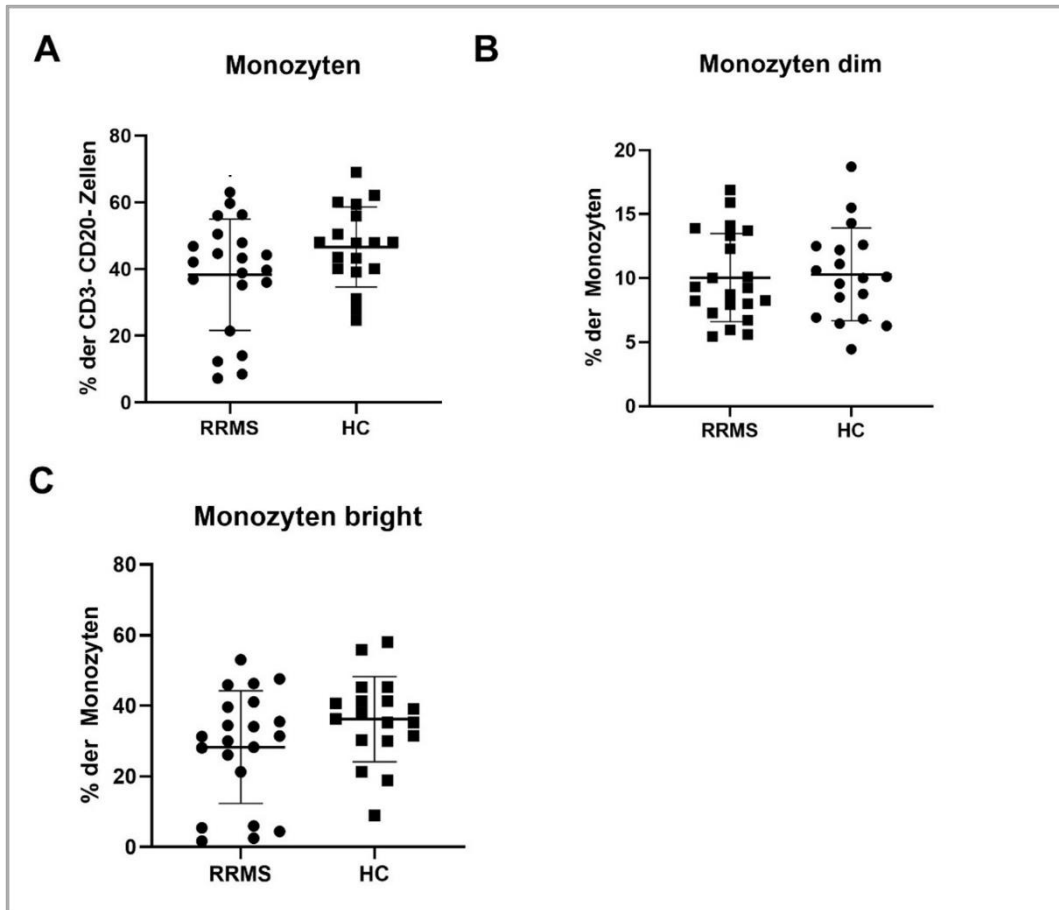


Abbildung 10: Verteilung der Monozyten und deren Subpopulationen bei RRMS-Patienten und gesunden Probanden

Erläuterung: (A) Prozentualer Anteil der Monozyten (B) Prozentualer Anteil der Monozyten dim (C) Prozentualer Anteil der Monozyten bright

4.1.1.5 Keine signifikanten Unterschiede beim prozentualen Anteil der NKLT

Hinsichtlich der Prozentzahl der NKLT ließen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen RRMS-Patienten ($n = 21$; $\text{mean} \pm \text{SD}$, $4,66 \pm 3,94$ CI [2,87;6,46]) und gesunden Probanden ($n = 18$; $\text{mean} \pm \text{SD}$, $7,68 \pm 6,13$; CI [4,64;10,73]; $p = 0,0711$) feststellen (Abbildung 11).

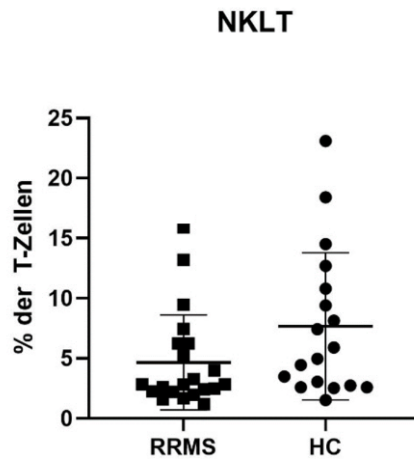


Abbildung 11: Verteilung der NKLT bei RRMS-Patienten und gesunden Probanden

4.1.2 Vergleich der Immunzellen von RRMS-Patienten und Gesunden nach polyklonaler Stimulation

Im folgenden Kapitel sind die Ergebnisse nach polyklonaler Stimulation aufgeführt. Da bei den gesunden Probanden jedoch nur eine sehr geringe Stichprobe ($n=2$) vorlag, weisen die errechneten Werte lediglich eine Tendenz auf.

4.1.2.1 Tendenzielle Erhöhung von B-Lymphozyten bei RRMS-Patienten nach polyklonaler Stimulation

Im Vergleich zwischen RRMS-Patienten ($n = 6$) und gesunden Probanden ($n = 2$) zeigte sich eine tendenzielle Erhöhung der Prozentzahl der B-Lymphozyten bei RRMS-Patienten nach polyklonaler Stimulation (Abbildung 12).

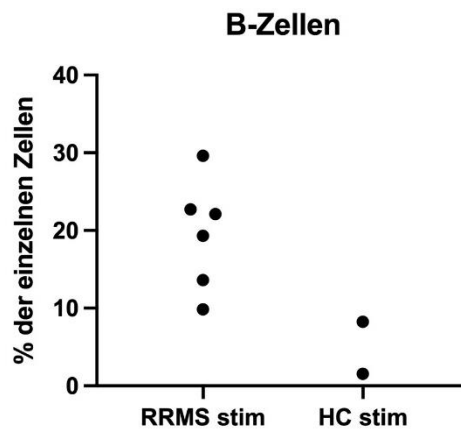


Abbildung 12: Verteilung der B-Zellen bei RRMS-Patienten und gesunden Probanden nach polyklonaler Stimulation

4.1.2.2 **Kein Unterschied bei T-Lymphozyten bei RRMS-Patienten nach polyklonaler Stimulation**

Hinsichtlich des prozentualen Anteils von T-Lymphozyten war kein Unterschied zwischen RRMS-Patienten (n = 10) und gesunden Probanden (n = 2) zu verzeichnen (Abbildung 13).

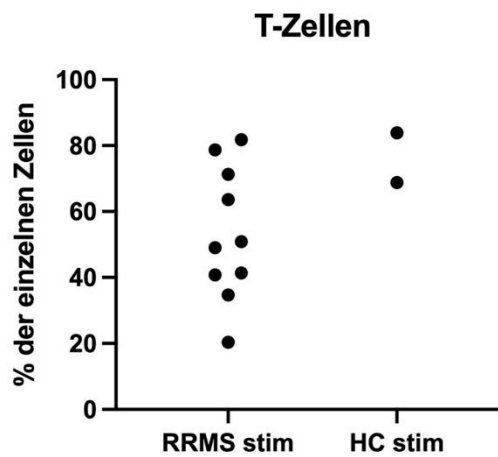


Abbildung 13: Verteilung der T-Zellen bei RRMS-Patienten und gesunden Probanden nach polyklonaler Stimulation

4.1.2.3 **Kein Unterschied bei NK-Zellen bei RRMS-Patienten nach polyklonaler Stimulation**

Es ließen sich keine Unterschiede in der Auswertung der durchflusszytometrischen Daten zwischen dem prozentualen Anteil von NK-Zellen im peripheren Blut von RRMS-Patienten ($n = 10$) und dem von gesunden Probanden ($n = 2$) nachweisen (Abbildung 14).

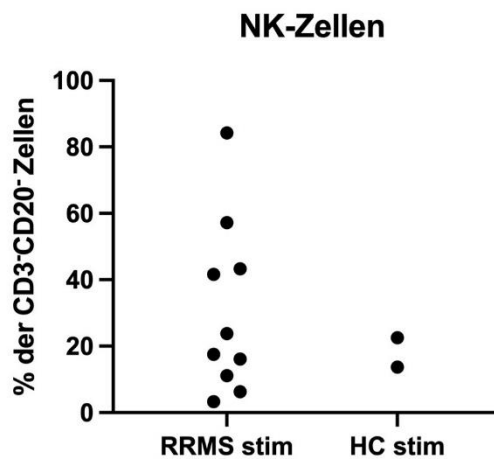


Abbildung 14: Verteilung der NK-Zellen bei RRMS-Patienten und gesunden Probanden nach polyklonaler Stimulation

4.1.2.4 **Kein Unterschied bei Monozyten bei RRMS-Patienten nach polyklonaler Stimulation**

Nach polyklonaler Stimulation war kein Unterschied zwischen der Prozentzahl von Monozyten bei RRMS-Patienten ($n = 10$) gegenüber gesunden Probanden ($n = 2$) vorhanden (Abbildung 15).

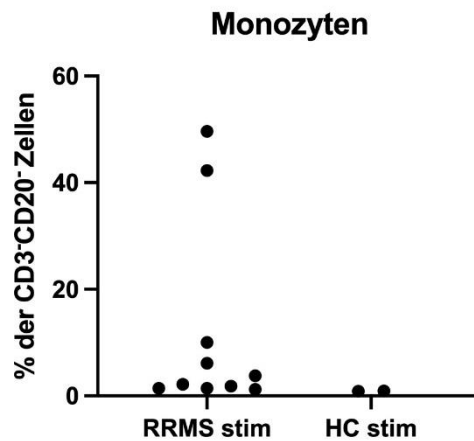


Abbildung 15: Verteilung der Monozyten bei RRMS-Patienten und gesunden Probanden nach polyklonaler Stimulation

4.1.2.5 **Kein Unterschied bei NKLT bei RRMS-Patienten nach polyklonaler Stimulation**

Im Vergleich von RRMS-Patienten (n = 10) und gesunden Probanden (n = 2) zeigte sich bei den NKLT kein Unterschied nach polyklonaler Stimulation (Abbildung 16).

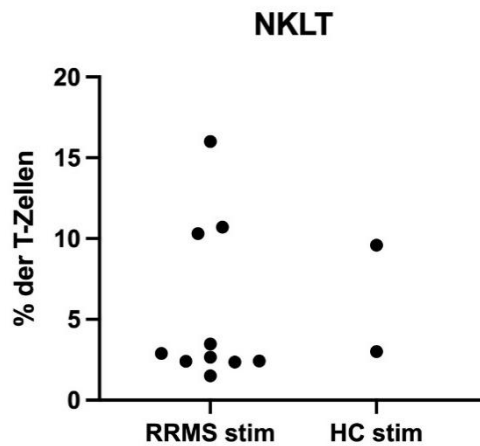


Abbildung 16: Verteilung der NKLT bei RRMS-Patienten und gesunden Probanden nach polyklonaler Stimulation

4.2 CEACAM1-Expression auf Immunzellen bei RRMS-Patienten und gesunden Probanden

Um eine Aussage darüber treffen zu können, ob CEACAM1 als Adhäsionsmolekül auf Immunzellen zu einer Änderung des prozentualen Anteils mancher Immunzellreihen und damit möglicherweise zur Pathogenese der Multiplen Sklerose beiträgt, wurde die CEACAM1-Expression auf Immunzellen bei MS-Patienten mit der von gesunden Probanden verglichen.

4.2.1 CEACAM1-Expression auf B-Lymphozyten

In der durchflusszytometrischen Analyse CEACAM1⁺ B-Lymphozyten zeigten sich keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Prozentzahl bei RRMS-Patienten (n = 16; mean ± SD, 12,56 ± 6,21; CI [9,25;15,86]) gegenüber gesunden Probanden (n = 18; mean ± SD, 11,14 ± 4,41; CI [8,94;13,33]; p = 0,4429) (Abbildung 17A). Auch nach polyklonaler Stimulation fanden sich tendenziell keine Unterschiede beim prozentualen Anteil CEACAM1⁺ B-Zellen zwischen RRMS-Patienten (n = 6) und gesunden Probanden (n = 2) (Abbildung 17B).

Bei den CEACAM1⁺ Gedächtniszellen ließ sich kein signifikanter Unterschied zwischen RRMS-Patienten (n = 17; mean ± SD, 7,00 ± 7,12; CI [3,34;10,67]; p =

0,3242) und gesunden Probanden ($n = 16$; mean \pm SD, $4,90 \pm 4,58$; CI [2,46;7,34]) feststellen (Abbildung 17C).

Bei den CEACAM1⁺ naiven B-Zellen konnte ein signifikanter Unterschied ($p = 0,0146$) zwischen RRMS-Patienten ($n = 17$; mean \pm SD, $1,20 \pm 1,38$; CI [0,49;1,91]) und gesunden Probanden ($n = 16$; mean \pm SD, $0,30 \pm 0,19$; CI [0,20;0,40]) gefunden werden. Dabei zeigte sich die Prozentzahl CEACAM1⁺ naiver B-Zellen bei RRMS-Patienten erhöht (Abbildung 17D).

Hinsichtlich des prozentualen Anteils von CEACAM1⁺ B1-Zellen ließ sich kein signifikanter Unterschied zwischen RRMS-Patienten ($n = 17$; mean \pm SD, $7,01 \pm 4,95$; CI [4,46;9,55]; $p = 0,6033$) und gesunden Probanden ($n = 16$; mean \pm SD, $6,04 \pm 5,62$; CI [3,04;9,03]) nachweisen (Abbildung 17E).

Die Prozentzahl der CEACAM1⁺ Plasmazellen zeigte sich bei RRMS-Patienten ($n = 17$; mean \pm SD, $9,96 \pm 18,84$; CI [0,27;19,64]; $p = 0,0555$) im Vergleich zu gesunden Probanden ($n = 15$; mean \pm SD, $0,24 \pm 0,73$; CI [-0,17;0,64]) nicht signifikant verändert (Abbildung 17F).

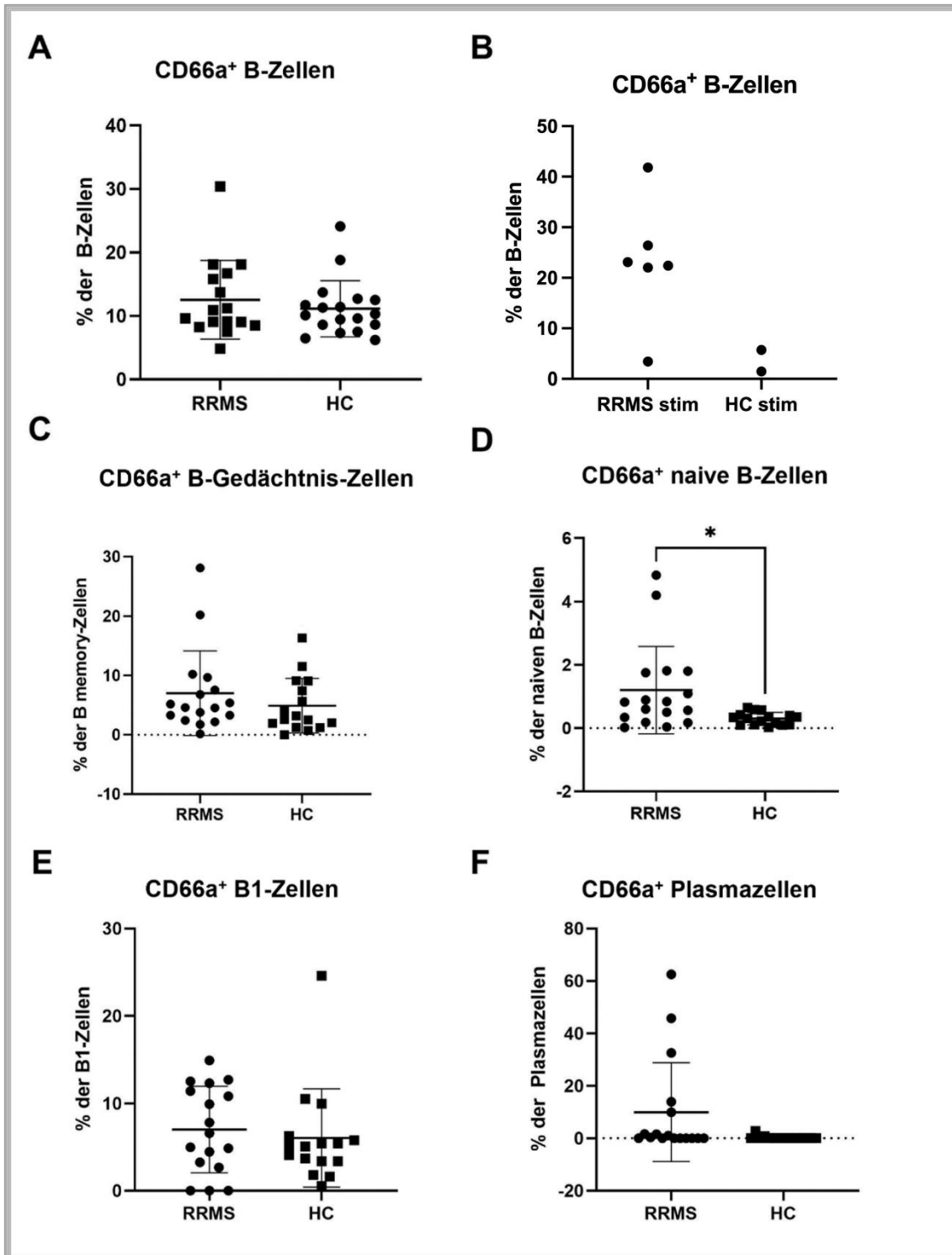


Abbildung 17:

Verteilung der CEACAM1⁺ B-Zellen vor und nach polyklonaler Stimulation sowie deren Subpopulationen bei RRMS-Patienten und gesunden Probanden

Erläuterung: (A) Prozentualer Anteil der CEACAM1⁺ B-Zellen (B) Prozentualer Anteil der CEACAM1⁺ B-Zellen nach polyklonaler Stimulation (C) Prozentualer Anteil der CEACAM1⁺ Gedächtniszellen (D) Prozentualer Anteil der CEACAM1⁺ naiven B-Zellen (E) Prozentualer Anteil der CEACAM1⁺ B1-Zellen (F) Prozentualer Anteil der CEACAM1⁺ Plasmazellen

4.2.2 CEACAM1-Expression auf T-Zellen

Bei der Untersuchung der CEACAM1⁺ T-Lymphozyten im peripheren Blut zeigten sich keine signifikanten Unterschiede ($p = 0,0794$) zwischen RRMS-Erkrankten ($n = 17$; mean \pm SD, $0,39 \pm 0,70$; CI [0,03;0,74]) und gesunden Probanden ($n = 16$; mean \pm SD, $0,07 \pm 0,04$; CI [0,04;0,09]) (Abbildung 18A).

Auch beim prozentualen Anteil der CEACAM1⁺ T_H-Zellen fand sich kein signifikanter Unterschied zwischen RRMS-Patienten ($n = 17$; mean \pm SD $0,34 \pm 0,57$; CI [0,04;0,63]; $p = 0,1058$) und gesunden Probanden ($n = 16$; mean \pm SD $0,09 \pm 0,13$; CI [0,02;0,16]) (Abbildung 18B).

Bei den CEACAM1⁺ CTL ließ sich ebenfalls kein signifikanter Unterschied zwischen RRMS-Patienten ($n = 17$; mean \pm SD $0,61 \pm 1,13$; CI [0,03;1,19]; $p = 0,0790$) und gesunden Probanden ($n = 16$; mean \pm SD $0,09 \pm 1,14$; CI [0,02;1,16]) feststellen (Abbildung 18C).

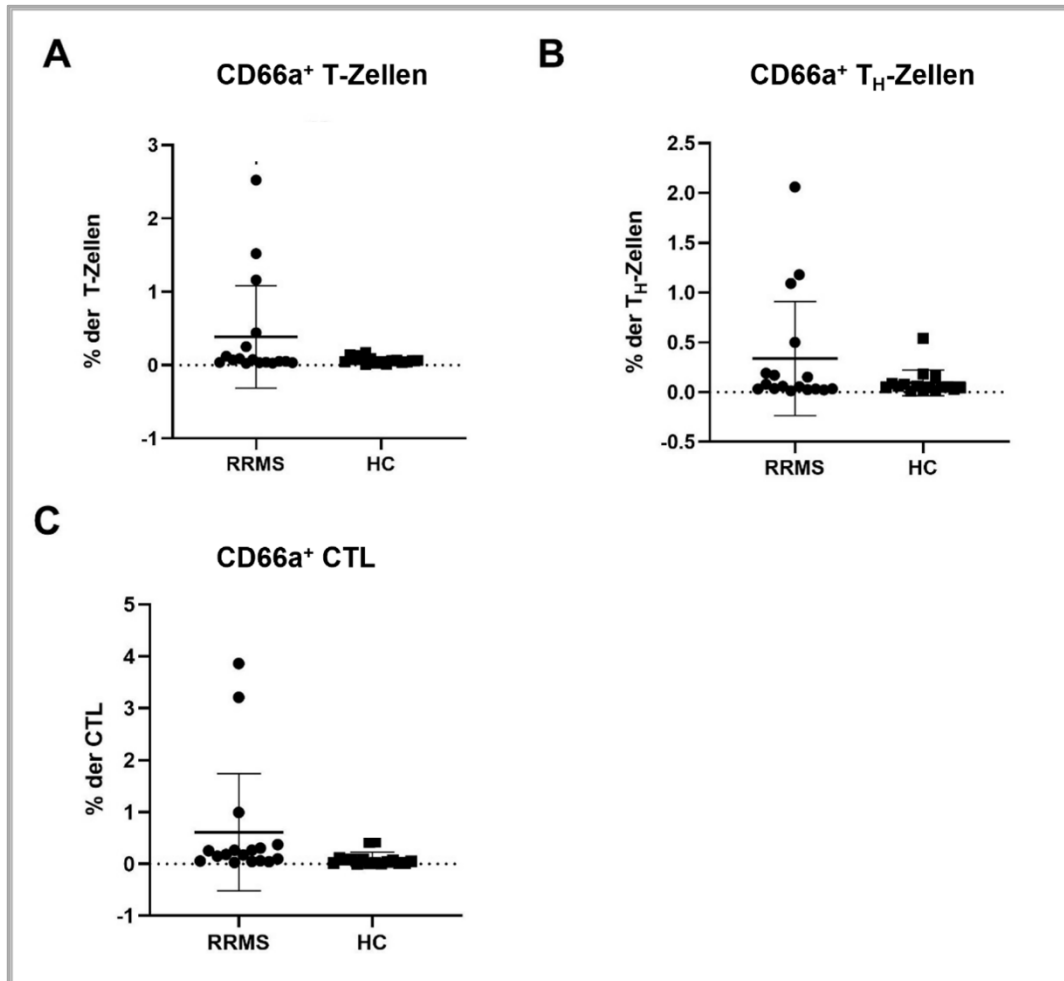


Abbildung 18: Verteilung der CEACAM1+ T-Zellen und deren Subpopulationen bei RRMS-Patienten und gesunden Probanden

Erläuterung: (A) Prozentualer Anteil der CEACAM1+ T-Zellen (B) Prozentualer Anteil der CEACAM1+ TH-Zellen (C) Prozentualer Anteil der CEACAM1+ CTL

4.2.3 CEACAM1-Expression auf NK-Zellen und deren Subpopulationen

Bei der NK-Zellpopulation niedriger Fluoreszenzsignalintensität zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen dem prozentualen Anteil CEACAM1+ NK-dim-Zellen bei Patienten mit schubförmig remittierender MS (n = 21; mean \pm SD, 2,69 \pm 1,74; CI [1,90;3,49]) und gesunden Probanden (n = 18; mean \pm SD, 2,52 \pm 3,49; ; CI [0,78;4,25]; p = 0,8419) (Abbildung 19A).

Die „bright“-NK-Zellpopulation wies keine signifikante Änderung der Prozentzahl bei CEACAM1+ NK-bright-Zellen im Vergleich von RRMS-Patienten (n = 21;

mean \pm SD, $1,03 \pm 0,73$; CI [0,69;1,36]) und gesunden Probanden (n = 18; mean \pm SD, $1,46 \pm 2,36$; CI [0,29;2,64]; p = 0,4228) auf (Abbildung 19B).

Nach polyklonaler Stimulation fand sich tendenziell kein Unterschied hinsichtlich des prozentualen Anteils CEACAM1⁺ NK-Zellen bei RRMS-Patienten (n = 10) und gesunden Probanden (n = 2) (Abbildung 19C).

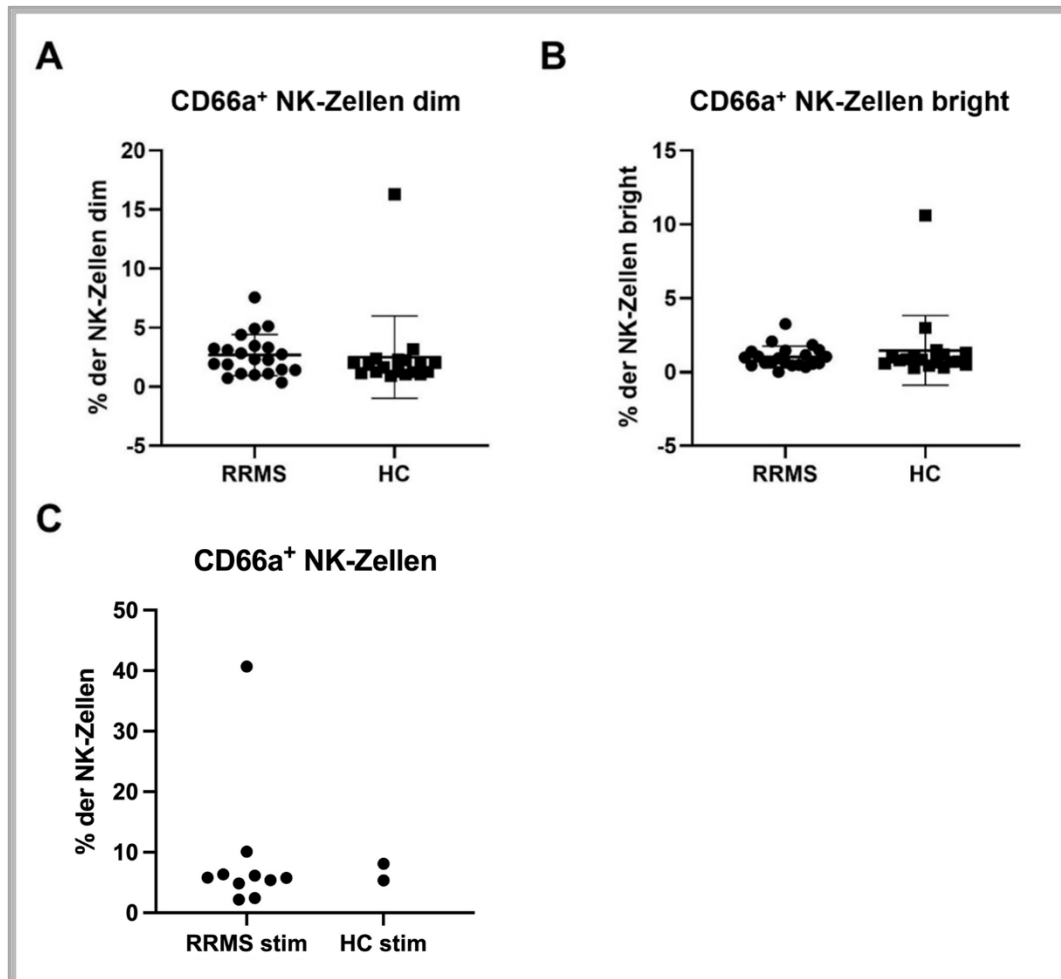


Abbildung 19: Verteilung der CEACAM1⁺ NK-Zellen Subpopulationen sowie der CEACAM1⁺ NK-Zellen nach polyklonaler Stimulation bei RRMS-Patienten und gesunden Probanden

Erläuterung: (A) Prozentualer Anteil der CEACAM1⁺ NK-Zellen dim (B) Prozentualer Anteil der CEACAM1⁺ NK-Zellen bright (C) Prozentualer Anteil der CEACAM1⁺ NK-Zellen nach polyklonaler Stimulation

4.2.4 CEACAM1-Expression auf Monozyten und deren Subpopulationen

Die Prozentzahl CEACAM1⁺ Monozyten mit geringer Fluoreszenzintensität differierte im Vergleich von RRMS-Patienten (n = 21; mean \pm SD, $27,64 \pm 18,56$;

CI [19,19;36,09]) nicht signifikant von der von gesunden Probanden (n = 18; mean \pm SD, 27,97 \pm 17,04; CI [19,49;36,44]; p = 0,9556) (Abbildung 20A).

Bei der „bright“-Subpopulation der Monozyten konnten ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen Patienten mit schubförmig-remittierender MS (n = 21; mean \pm SD, 4,05 \pm 2,93; CI [2,72;5,39]) und gesunden Probanden (n = 18; mean \pm SD, 4,80 \pm 7,57; CI [1,03;8,56]; p = 0,6799) festgestellt werden (Abbildung 20B).

Nach polyklonaler Stimulation fand sich tendenziell ein Unterschied beim prozentualen Anteil CEACAM1⁺ Monozyten von RRMS-Patienten (n = 10) und gesunden Probanden (n = 2). Dabei ließen sich weniger CEACAM1⁺ Monozyten im peripheren Blut von RRMS-Patienten nachweisen als bei gesunden Probanden (Abbildung 20C).

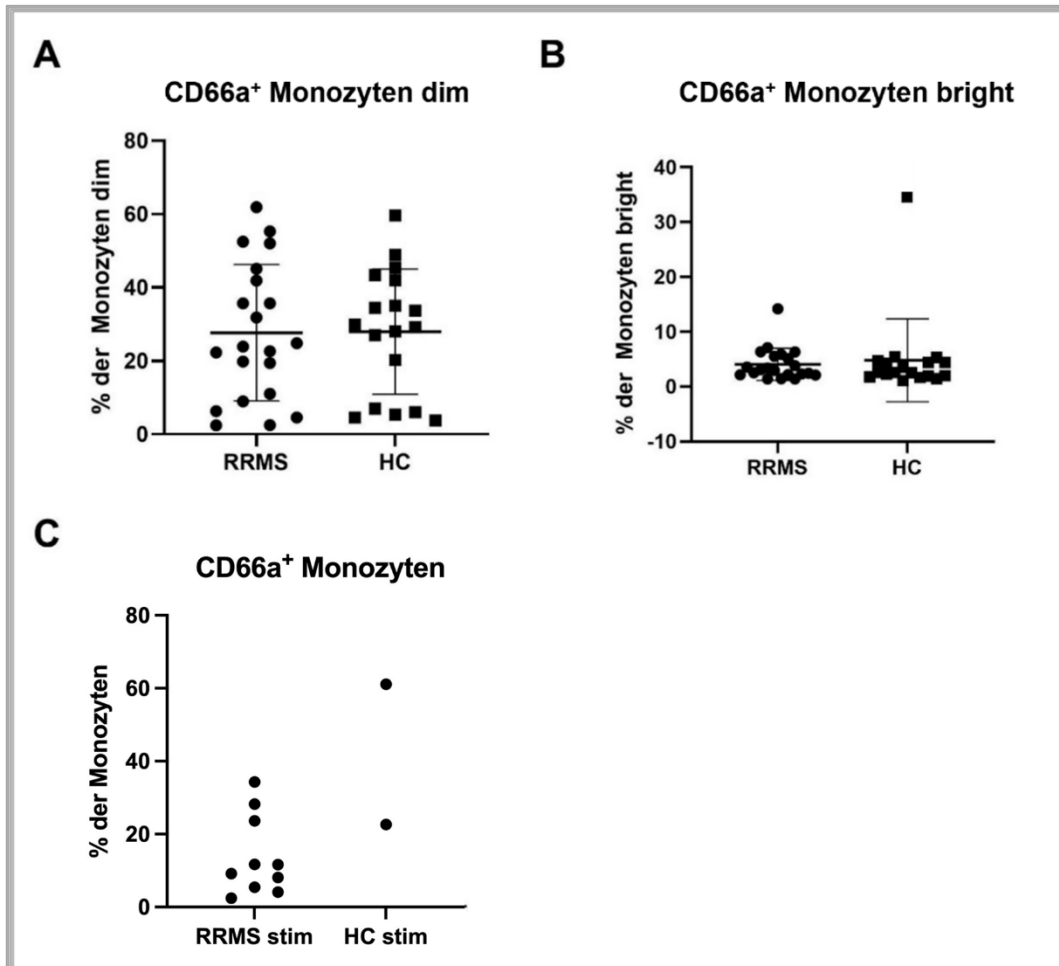


Abbildung 20: Verteilung der CEACAM1⁺ Monozyten Subpopulationen sowie der CEACAM1⁺ Monozyten nach polyklonaler Stimulation bei RRMS-Patienten und gesunden Probanden

Erläuterung: (A) Prozentualer Anteil der CEACAM1⁺ Monozyten dim (B) Prozentualer Anteil der CEACAM1⁺ Monozyten bright (C) Prozentualer Anteil der CEACAM1⁺ Monozyten nach polyklonaler Stimulation

4.2.5 CEACAM1-Expression auf NKLT

Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede beim prozentualen Anteil CEACAM1⁺ NKLT zwischen RRMS-Patienten (n = 21; mean ± SD, 1,52 ± 1,30; CI [0,93;2,12]) und gesunden Probanden (n = 18; mean ± SD, 1,68 ± 2,42; CI [0,47;2,88]; p = 0,7997) (Abbildung 21A).

Auch nach polyklonaler Stimulation ließen sich keine Unterschiede zwischen RRMS-Patienten (n = 10) und gesunden Probanden (n = 2) feststellen (Abbildung 21B).

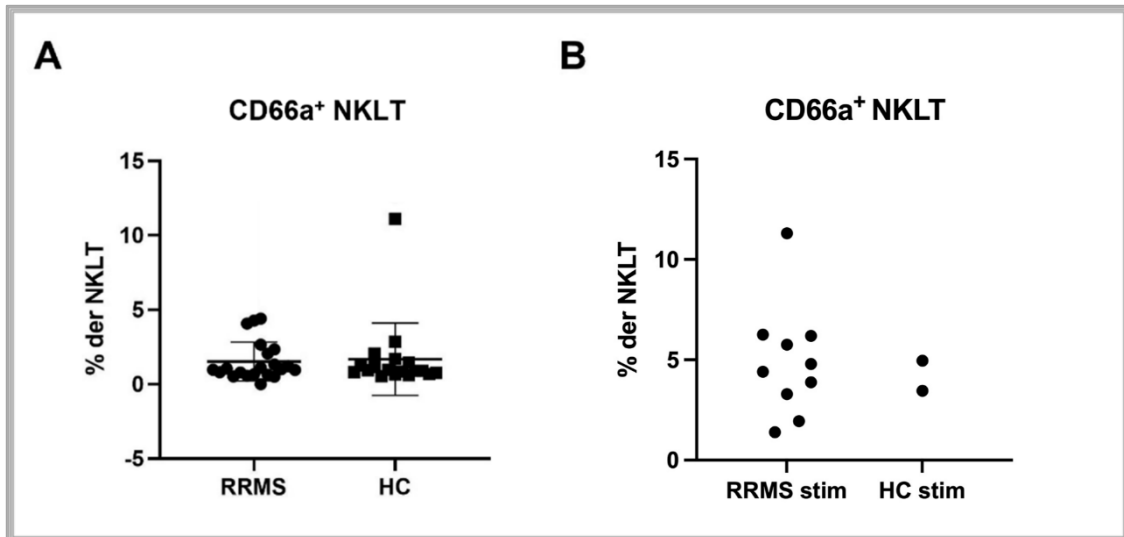


Abbildung 21: Verteilung der CEACAM1⁺ NKLT vor und nach polyklonaler Stimulation bei RRMS-Patienten und gesunden Probanden

Erläuterung: (A) Prozentualer Anteil der CEACAM1⁺ NKLT (B) Prozentualer Anteil der CEACAM1⁺ NKLT nach polyklonaler Stimulation

4.3 Besondere Ergebnisse hinsichtlich Zellpopulationen und CEACAM1-Expression bei anderen MS-Verlaufsformen

Neben den durchflusszytometrischen Daten von Patienten mit schubförmig remittierender MS wurden auch die von Patienten mit anderen MS-Verlaufsformen untersucht. Da diese eine deutlich geringere Inzidenz als die RRMS haben, umfassten die Stichproben eine geringere Anzahl an Teilnehmern als die Messungen mit RRMS-Patienten. Die Ergebnisse sollten eine Tendenz aufweisen und als Ausblick für weiterführende Fragestellungen dienen. Untersucht wurde der prozentuale Anteil von Immunzellen und der CEACAM1-Expression auf Immunzellen bei Patienten im Vergleich zu gesunden Probanden (n = 18) mittels durchflusszytometrischer Analyse peripherer Blutzellen. Dabei umfasste das Teilnehmerspektrum Patienten mit primär progredienter (PPMS, n = 2) und sekundär progredienter MS (SPMS, n = 3) sowie Patienten mit einem Schubereignis (n = 3) und Patienten mit klinisch isoliertem Syndrom (CIS, n = 2). Die statistische Auswertung erfolgte mittels zweiseitigem, ungepaarten T-Test. Es wurden jeweils die Daten der Patienten mit denen der gesunden Kontrollgruppe verglichen. Im Folgenden werden einzelne Ergebnisse gezeigt, die eine mögliche Tendenz aufweisen.

4.3.1 PPMS: B-Zellen, Monozyten, CD14^{+bright}-Monozyten und CD56^{+bright}-NK-Zellen

Hinsichtlich der B-Lymphozyten war eine Tendenz zur Erhöhung der Prozentzahl bei PPMS-Patienten (n = 2) gegenüber den gesunden Probanden (n = 18) zu erkennen (Abbildung 22A).

Beim Vergleich der Monozyten im peripheren Blut zwischen PPMS-Patienten (n = 2) und gesunden Probanden (n = 18) zeigte sich tendenziell ein verminderter prozentualer Anteil bei den Erkrankten (Abbildung 22B).

Ähnlich verhielt es sich mit den Monozyten mit verstärkter Fluoreszenzsignalintensität („bright“). Auch hier schienen die PPMS-Patienten (n = 2) über weniger peripher zirkulierende „bright“-Monozyten zu verfügen als die gesunden Probanden (n = 18) (Abbildung 22C).

Bei der Betrachtung der Prozentzahl der „bright“-Subpopulation von NK-Zellen zeigte sich eine Tendenz zur Erhöhung bei PPMS-Patienten (n = 2) gegenüber gesunden Probanden (n = 18) (Abbildung 22D).

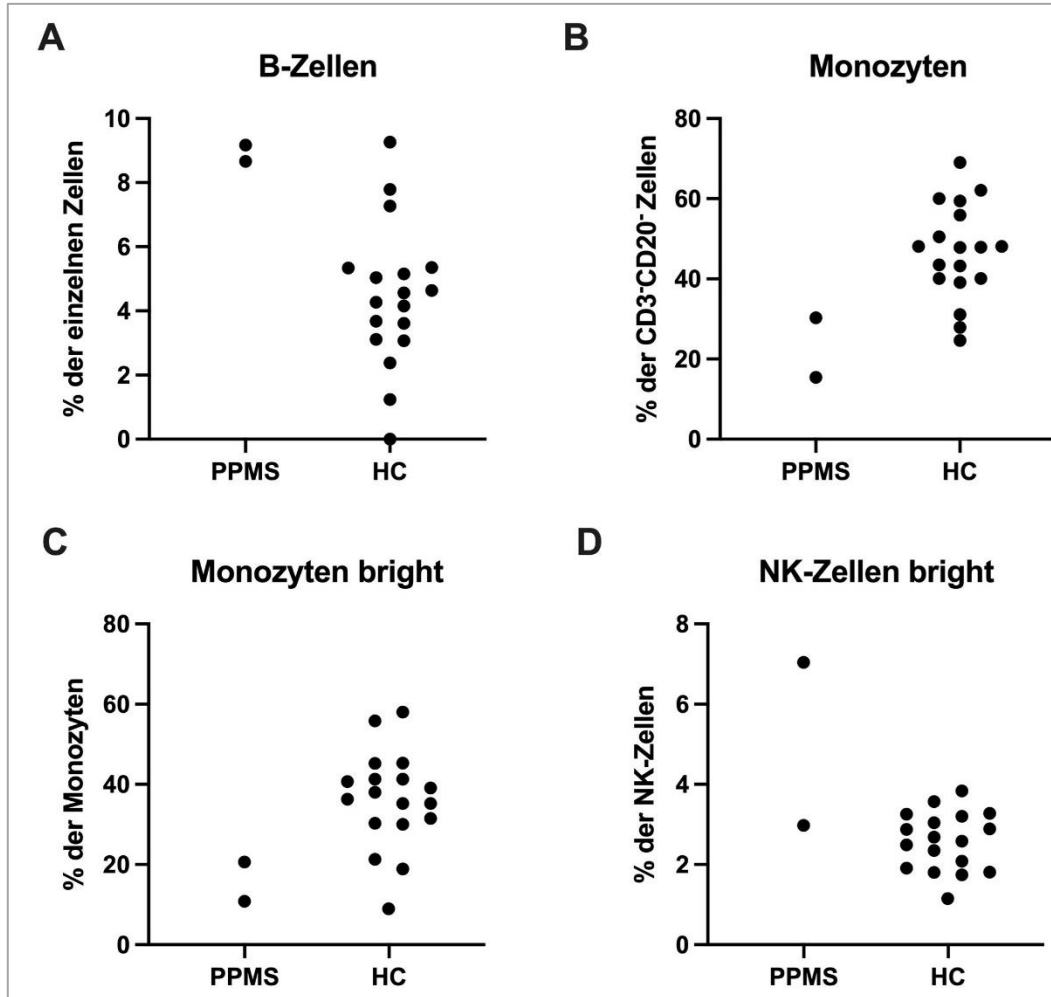


Abbildung 22: Verteilung von ausgewählten Immunzellen bei PPMS-Patienten und gesunden Probanden

Erläuterung: (A) Prozentualer Anteil von B-Zellen (B) Prozentualer Anteil von Monozyten (C) Prozentualer Anteil von Monozyten bright (D) Prozentualer Anteil von NK-Zellen bright

4.3.2 SPMS: B-Zellen, T-Zellen, CD14^{dim}-Monozyten, CD66a⁺CD14^{dim}-Monozyten, CD56^{bright}-NK-Zellen

Bezüglich der B-Lymphozyten im peripheren Blut konnte eine Tendenz zur Erhöhung der Prozentzahl bei SPMS-Patienten (n = 3) gegenüber gesunden Probanden (n = 18) beobachtet werden (Abbildung 23A).

Bei der Betrachtung des prozentualen Anteils bei T-Lymphozyten ließ sich eher eine Minderung bei den SPMS-Patienten (n = 3) im Vergleich zu den gesunden Probanden (n = 18) erkennen (Abbildung 23B).

Hinsichtlich der Prozentzahl von Monozyten geringer Fluoreszenzsignalintensität („dim“) zeigte sich tendenziell ein verminderter Anteil bei SPMS-Patienten (n = 3) gegenüber gesunden Probanden (n = 18) (Abbildung 23C).

Analog dazu ließ sich auch beim prozentualen Anteil CEACAM1⁺ Monozyten der „dim“-Subpopulation eine Minderung bei SPMS-Patienten (n = 3) im Vergleich zu gesunden Probanden (n = 18) erkennen (Abbildung 23D).

Bei den NK-Zellen mit erhöhter Signalintensität („bright“) zeigte sich tendenziell eine erhöhte Prozentzahl bei SPMS-Patienten (n = 3) gegenüber gesunden Probanden (n = 18) (Abbildung 23E).

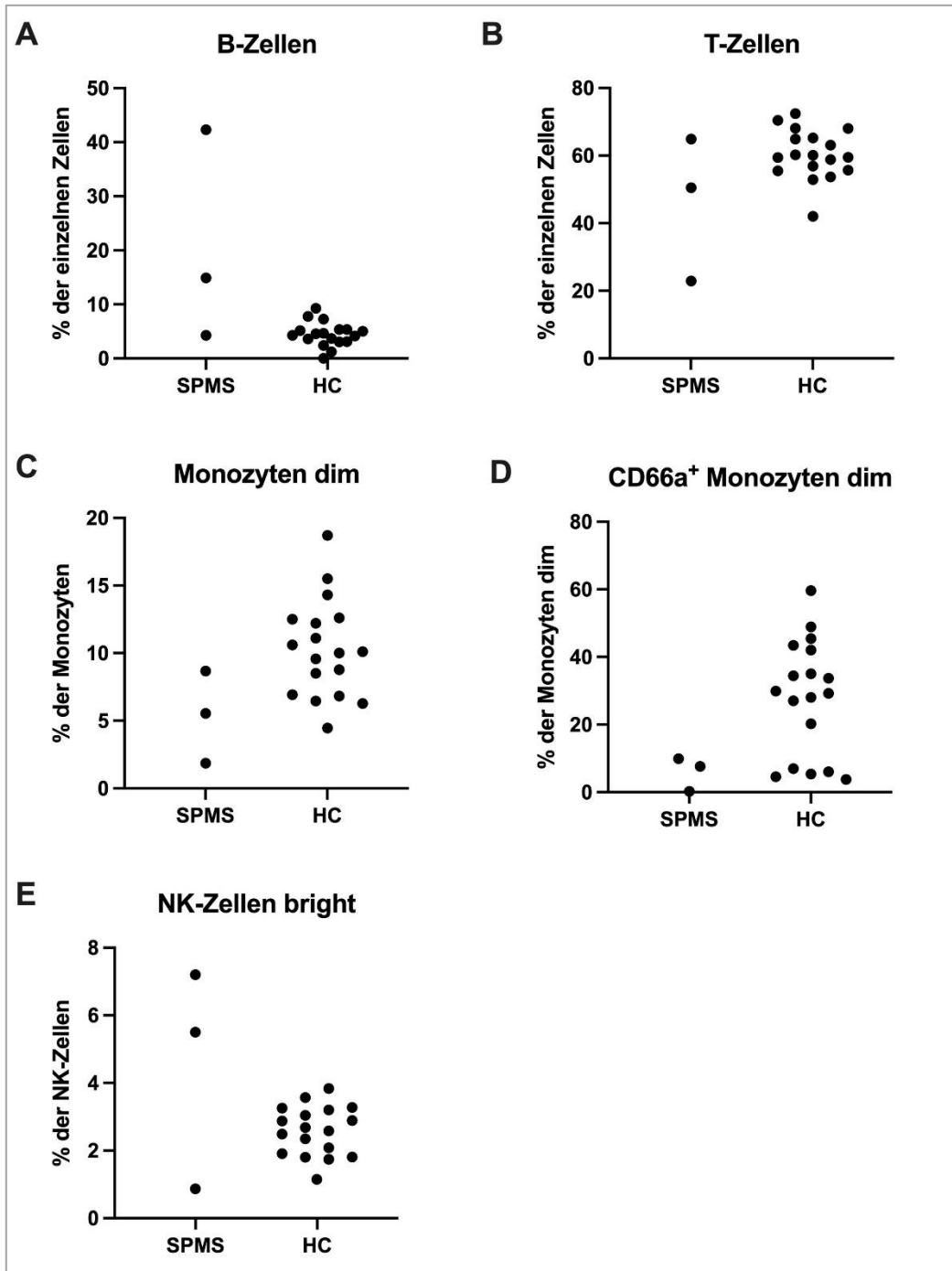


Abbildung 23: Verteilung ausgewählter Immunzellen bei SPMS-Patienten und gesunden Probanden

Erläuterung: (A) Prozentualer Anteil von B-Zellen (B) Prozentualer Anteil von T-Zellen (C) Prozentualer Anteil von Monozyten dim (D) Prozentualer Anteil von CEACAM1⁺ Monozyten dim (E) Prozentualer Anteil von NK-Zellen bright

4.3.3 Schub: CD14^{+dim}-Monozyten, CD56^{+bright}-NK-Zellen und CD56^{+dim}-NK-Zellen, T-Zellen

Beim Vergleich der „dim“ Subpopulation der Monozyten im peripheren Blut zwischen Schub-Patienten (n = 4) und gesunden Probanden (n = 18) zeigte sich tendenziell eine Erhöhung der Prozentzahl bei den Erkrankten (Abbildung 24A).

Hinsichtlich der NK-Zellen mit erhöhter Signalintensität („bright“) war eine Tendenz zur Erhöhung des prozentualen Anteils bei Schub-Patienten (n = 4) gegenüber den gesunden Probanden (n = 18) zu erkennen (Abbildung 24B).

Anders verhielt es sich mit den NK-Zellen mit verminderter Fluoreszenzsignalintensität („dim“). Hier schienen die Schub-Patienten (n = 4) über weniger peripher zirkulierende Zellen zu verfügen als die gesunden Probanden (n = 18) (Abbildung 24C).

Bei der Betrachtung des prozentualen Anteils der T-Zellen zeigte sich eine Tendenz zur Erhöhung bei Schub-Patienten (n = 4) gegenüber gesunden Probanden (n = 18) (Abbildung 24D).

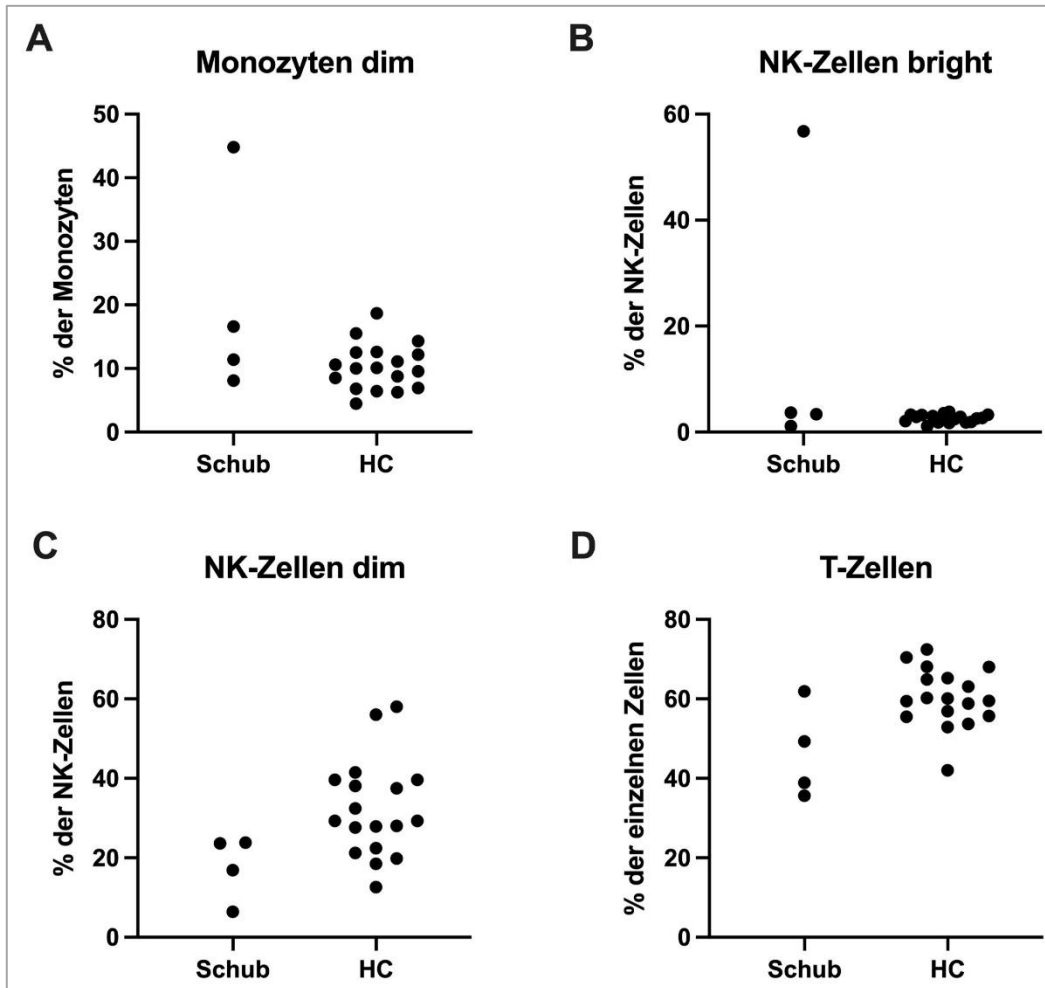


Abbildung 24: Verteilung ausgewählter Immunzellen bei Schub-Patienten und gesunden Probanden

Erläuterung: (A) Prozentualer Anteil der Monozyten dim (B) Prozentualer Anteil der NK-Zellen bright (C) Prozentualer Anteil der NK-Zellen dim (D) Prozentualer Anteil der T-Zellen

4.3.4 CIS: B-Zellen, Monozyten, CD14^{bright}-Monozyten

Bezüglich der B-Lymphozyten im peripheren Blut konnte eine Tendenz zur Prozentzahlerhöhung bei CIS-Patienten (n = 2) gegenüber gesunden Probanden (n = 18) beobachtet werden (Abbildung 25A).

Bei den Monozyten zeigte sich tendenziell ein verminderter prozentualer Anteil bei CIS-Patienten (n = 2) gegenüber gesunden Probanden (n = 18) (Abbildung 25B).

Analog dazu ließ sich auch bei der Prozentzahl der Monozyten der „bright“-Subpopulation eine Erniedrigung bei CIS-Patienten (n = 2) im Vergleich zu gesunden Probanden (n = 18) erkennen (Abbildung 25C).

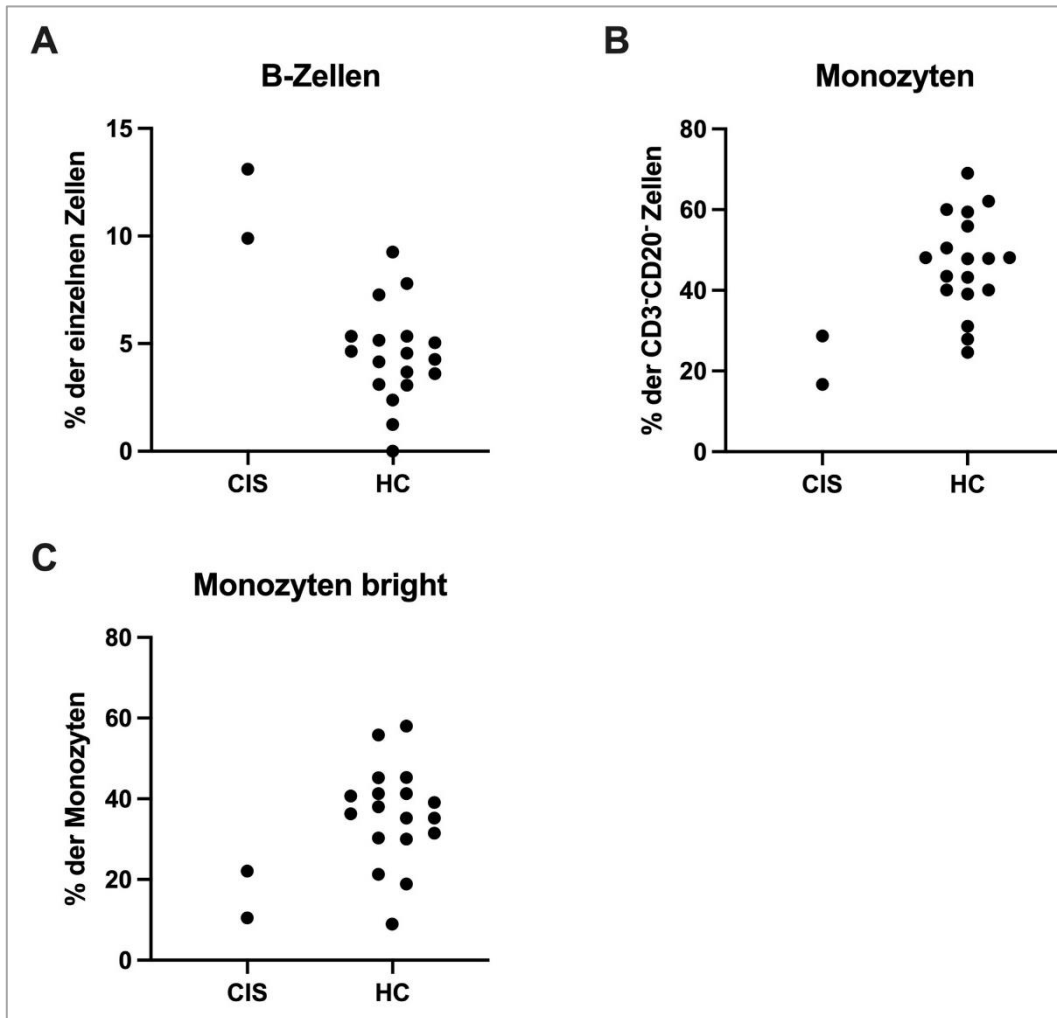


Abbildung 25: Verteilung ausgewählter Immunzellen bei CIS-Patienten und gesunden Probanden

Erläuterung: (A) Prozentualer Anteil der B-Zellen (B) Prozentualer Anteil der Monozyten (C) Prozentualer Anteil der Monozyten bright

4.4 Korrelation der klinischen Daten mit ausgewählten Immunzell-Daten

Um einen möglichen Zusammenhang zwischen den klinischen Daten sowie der erhobenen Immunzell-Daten zu detektieren, erfolgte die Korrelation mithilfe des Spearman-Tests mit GraphPad Prism 9.1.2.

Hierbei ließ sich ein starker positiver Zusammenhang zwischen dem Alter der RRMS-Patienten sowie dem prozentualen Anteil von B-Zellen feststellen ($r_s = 0,5943$, $p = 0,0152$). Auch bei den Gedächtniszellen ließ sich ein starker positiver Zusammenhang zwischen dem Alter der RRMS-Patienten und der Prozentzahl der Zellen finden ($r_s = 0,4914$, $p = 0,0469$).

Einen starken negativen Zusammenhang gab es zwischen dem Alter der RRMS-Patienten sowie dem prozentualen Anteil naiver B-Zellen ($r_s = -0,5393$, $p = 0,0273$).

Die Therapiedauer mit Natalizumab in Monaten bei RRMS-Patienten wies einen starken negativen Zusammenhang mit der Prozentzahl von B-Zellen auf ($r_s = -0,7699$, $p = 0,0195$).

Hinsichtlich CEACAM1-exprimierender Immunzellen und klinischer Parameter ließ sich bei unseren Daten kein Zusammenhang feststellen.

5 Diskussion

Die Pathogenese der MS ist bis heute nicht geklärt. Aufgrund histopathologischer Untersuchungen wird davon ausgegangen, dass sowohl dem humoralen als auch dem zellulären Immunsystem große Bedeutung in der Pathogenese der immunvermittelten Erkrankung zukommt¹³⁰. Dass autoreaktive T-Lymphozyten in den Pathomechanismus involviert sind, ist ebenso bekannt wie die zunehmend in den Fokus der Forschung rückende Rolle von B-Lymphozyten^{192,193}. Unser Ziel war es, die Rolle verschiedener Immunzellen in der MS mit besonderem Hinblick auf die von CEACAM1-exprimierenden Zellen zu untersuchen. Um dies analog zur klinischen Verlaufsform der MS darzustellen, erfolgte die durchflusszytometrische Untersuchung der Immunzellen von MS-Erkrankten sowohl vor als auch nach polyklonaler Stimulation.

5.1 Autoreaktive T-Zellen als zentraler Bestandteil der Pathogenese der MS

In der Pathogenese der MS wird bereits seit langem den T-Zellen eine zentrale Rolle zugesprochen^{24,110}. Passend hierzu ließ sich in unseren durchflusszytometrischen Untersuchungen bei RRMS-Patienten eine Reduktion der Anzahl peripherer T-Zellen im Vergleich zu Gesunden feststellen (4.1.1.2). Dies geht einher mit der Vorstellung, dass autoreaktive T-Zellen bei MS-Erkrankten die Blut-Hirn-Schranke überwinden und ins ZNS immigrieren^{21,131}. Dadurch zeigt sich im peripheren Blut eine verminderte Anzahl der T-Zellen. Nach polyklonaler Stimulation ließ sich bei uns tendenziell kein Unterschied im prozentualen Anteil peripherer T-Zellen zwischen RRMS-Patienten und Gesunden nachweisen (4.1.2.2). Dies hängt möglicherweise mit der geringen Anzahl an Gesunden zusammen. Eine andere Erklärungsmöglichkeit wäre, dass im Rahmen des Schubereignisses auch in der Peripherie die Inflammationsreaktion zu einer Aktivierung der T-Zellen führt und somit relativ gesehen mehr periphere T-Zellen bei RRMS-Patienten zirkulieren, die im Verlauf dann die Blut-Hirn-Schranke passieren würden.

T_H-Zellen tragen in der Pathogenese der MS als autoreaktive Zellen zur Inflammationsreaktion insbesondere im ZNS bei und konnten in der CSF

vermehrt nachgewiesen werden¹⁹⁴. Der prozentuale Anteil von T_H-Zellen im peripheren Blut zeigte sich bei unseren RRMS-Patienten im Vergleich zu gesunden Probanden erhöht (4.1.1.2). Der Großteil der von uns untersuchten RRMS-Patienten stand unter einer Therapie mit Natalizumab. Natalizumab ist ein humanisierter monoklonaler anti- α_4 -Integrin-Antikörper, der darauf abzielt, die Immigration der proinflammatorischen Immunzellen ins ZNS durch Blockade der Bindung von Lymphozyten an vaskuläre Endothelrezeptoren an der Blut-Hirn-Schranke zu verhindern^{195,196}. Dies führt unter anderem zu einer Erhöhung des prozentualen Anteils von T_H-Zellen im peripheren Blut, was sich auch mit unseren Ergebnissen deckt¹⁹⁷. Hinsichtlich der CEACAM1-Expression konnten wir keine Unterschiede zwischen RRMS-Patienten und gesunden Probanden feststellen (4.2.2). Jedoch ließ sich in der Betrachtung der CEACAM1-Expression auf T-Lymphozyten bei SPMS-Patienten ein tendenzielles Defizit feststellen (4.3.2). Dies würde sich mit den Forschungsergebnissen von Piancone et al. (2019) bei PPMS-Patienten decken, die von einer begünstigten Inflammationsreaktion aufgrund des Defizits CEACAM1-exprimierender T-Lymphozyten ausgingen. Möglicherweise kommt es auch bei SPMS-Patienten zu einem Defizit CEACAM1-exprimierender T-Lymphozyten. Da die von uns untersuchte Stichprobe von SPMS-Patienten gering war, konnten wir hierzu keine valide Aussage treffen.

5.2 Unterschiede zwischen bisherigen Forschungsergebnissen und unseren Ergebnissen bei B-Zellen und CEACAM1⁺ B-Zellen

In den vergangenen Jahren wurden den B-Zellen insbesondere durch die Forschungsergebnisse in der Entwicklung von B-Zell-Medikamenten eine größere Bedeutung als bisher vermutet in der Pathogenese der MS zugesprochen¹⁹⁸. Wir konnten bei RRMS-Patienten sowohl vor als auch nach polyklonaler Stimulation eine signifikante Erhöhung von peripheren B-Lymphozyten im Vergleich zu Gesunden feststellen (4.1.1.1, 4.1.2.1). Dies stützt die These, dass in der Pathogenese der MS unter anderem autoreaktive B-Zellen mitverantwortlich sind. Durch eine geminderte Aktivität der peripheren Checkpoints persistieren die autoreaktiven B-Zellen im peripheren Blut.

Hierdurch kann es zu einer Unterdrückung regulatorischer T-Zellen und damit zu einer Proinflammationsreaktion kommen.¹⁹⁹

Ein Großteil der von uns untersuchten RRMS-Patienten stand unter einer Therapie mit Natalizumab. Da diese zu einer Persistenz der Lymphozyten im peripheren Blut führt, deckt sich dies wiederum mit dem von uns beobachteten erhöhten prozentualen Anteil der B-Lymphozyten bei RRMS-Patienten (4.1.1.1).

In der Korrelation des Alters der RRMS-Patienten mit dem prozentualen Anteil von B-Zellen und deren Subsets ließ sich ein stark positiver Zusammenhang bei der Prozentzahl der B-Zellen sowie Gedächtniszellen feststellen (4.4). Dementgegen fand sich ein stark negativer Zusammenhang zwischen dem Alter der RRMS-Patienten sowie dem Anteil der naiven B-Zellen (4.4). Dies lässt sich mit dem chronischen Inflammationsstatus bei RRMS-Patienten erklären. So führt eine chronische Inflammationsreaktion verfrüht zu dem sonst im normalen Alterungsprozess beobachteten Wandel der B-Zelldifferenzierung. Es kommt zu einer Abnahme des prozentualen Anteils naiver B-Zellen und einer Zunahme der Gedächtniszellen und B-Zellen²⁰⁰.

Bei Rovituso et al. konnte eine signifikante Erhöhung von CEACAM1+ B-Zellen im peripheren Blut bei RRMS-Patienten im Vergleich zu gesunden Probanden gefunden werden. Dies ließ sich auch in den B-Zell-Subpopulationen, insbesondere bei B1-Zellen, nachvollziehen.¹⁹¹

Dementgegen ließ sich bei uns kein signifikanter Unterschied bei B-Zellen oder B1-Zellen finden (4.2.1). Da die von Rovituso et al. untersuchten RRMS-Patienten ebenfalls unter Natalizumabtherapie standen, ist dies kein Erklärungsansatz für die diskrepanten Ergebnisse. Möglicherweise liegt die Ursache darin, dass bei uns die Patientenzahl höher war als in den Untersuchungen von Rovituso et al.

5.3 CD56^{dim}-NK-Zellen könnten eine proinflammatorische Rolle in der MS spielen

Im Rahmen der Erforschung neuer MS-Therapien rückten die NK-Zellen ins Interesse der Wissenschaft. In Anbetracht der Gesamtanzahl an NK-Zellen ließen sich bei uns keine signifikanten Unterschiede zwischen MS-Patienten und Gesunden feststellen (4.1.1.3). Wie bei Cooper et al. beschrieben lassen sich bei NK-Zellen jedoch anhand der Fluoreszenzintensität für Oberflächenmoleküle eine zytotoxische CD56^{dim}-Population sowie eine Zytokin-produzierende CD56^{bright}-Population unterscheiden¹⁴⁸. Die CD56^{dim}-Population war bei RRMS-Patienten signifikant erniedrigt im Vergleich zu den Gesundkontrollen (4.1.1.3). Dies würde die These stützen, dass der „dim“-Population der NK-Zellen eine proinflammatorische Funktion zukommt und sie somit ins ZNS immigriert sein könnten.

Zuletzt wurde diskutiert, ob CD56^{bright}-NK-Zellen als Biomarker für bestimmte Therapien in der MS fungieren könnten. Unter einer Therapie mit Interferon- β , Alemtuzumab, Dimethylfumarat sowie Fingolimod ließ sich dabei eine Erhöhung peripherer CD56^{bright}-NK-Zellen beobachten²⁰¹. Bei uns konnte kein signifikanter Unterschied in der Anzahl CD56^{bright}-NK-Zellen bei RRMS-Patienten und Gesunden gefunden werden (4.1.1.3). Allerdings stand der Großteil der von uns untersuchten RRMS-Patienten unter einer Therapie mit Natalizumab, was wiederum erklären könnte, weshalb es zu keinem Anstieg der regulatorischen CD56^{bright}-NK-Zellen kam. Ein anderer Erklärungsansatz könnte sein, dass die regulatorischen CD56^{bright}-NK-Zellen ins ZNS immigriert sein könnten, da ihnen eine hohe Migrationskapazität nachgesagt wird und sie anteilmäßig sowohl bei Gesunden als auch MS-Erkrankten intrathekal stärker vertreten sind als die CD56^{dim}-Population²⁰².

Wie bereits in Studien gezeigt werden konnte, findet sich auf NK-Zellen keine CEACAM-Expression. Nach Stimulation ließ sich jedoch bei Müller et al. nach 3 Tagen bei CD16⁻ CD56⁺ NK-Zellen, die normalerweise überwiegend in der Decidua vorkommen, eine Neuexpression von CEACAM1 auf der Oberfläche

nachweisen. CD16⁺CD56⁺ NK-Zellen, die normalerweise im Blut vorkommen, blieben weiterhin negativ²⁰³.

Bei uns ließ sich weder vor noch nach Stimulation ein signifikanter Unterschied in der CEACAM1-Expression auf NK-Zellen zwischen RRMS-Patienten und gesunden Probanden finden (4.2.3). Jedoch wurde von uns ein anderes Kulturmedium verwendet als bei Müller et al. Außerdem führten wir bei den uns untersuchten NK-Zellen keine Diskriminierung in CD16⁺ oder CD16⁻ durch, sodass möglicherweise ein signifikanter Unterschied in der CEACAM1-Expression hierdurch verschleiert wurde.

5.4 Monozyten als neue Biomarker in der MS?

Was die Rolle der Monozyten in der MS betrifft, gab es zuletzt diskrepante Forschungsergebnisse. Einerseits wurde ihnen eine proinflammatorische Funktion durch Beteiligung an der Aktivierung von T-Lymphozyten sowie Zerstörung der Myelinstruktur durch Aktivierung von Makrophagen zugesprochen^{146,204}. Andererseits sollen sie auch immunmodulatorische Aufgaben wie die Unterdrückung der Aktivierung autologer T-Zellen sowie die Beseitigung von zerebralem Zelldebris inne haben^{204,205}. Ähnlich wie bei den NK-Zellen scheint auch hier die Unterteilung in die einzelnen Subpopulationen eine entscheidende Rolle zu spielen. In der Literatur unterscheidet man aktuell bis zu drei Subpopulationen, wenn man neben CD14 CD16 als Oberflächenmarker hinzuzieht. So wird eine CD14⁺CD16⁺⁺ (nicht-klassische Monozyten), eine CD14⁺⁺CD16⁺ (intermediäre Monozyten) sowie eine CD14⁺⁺CD16⁻ (klassische Monozyten) Subpopulation unterschieden^{206,207}. In unserem Panel war CD16 nicht zusätzlich enthalten, weshalb wir eine Unterteilung in eine CD14^{+bright}- sowie CD14^{+dim}-Population durchführten, wobei CD14^{+bright} am ehesten die intermediären sowie klassischen Monozyten umfasst, wohingegen CD14^{+dim} mit den nicht-klassischen Monozyten vereinbar ist. Dabei scheinen die CD14^{+dim}-Monozyten eine proinflammatorische Rolle inne zu haben, da sie im Vergleich zu der CD14^{+bright}-Population eine große Menge TNF- α produzieren können²⁰⁸. Diese wird ihnen auch in der MS zugesprochen^{209,210}. Jedoch differieren die Forschungsergebnisse, was den prozentualen Anteil der Monozyten im

peripheren Blut von RRMS-Patienten angeht. So haben Gjelstrup et al. eine Expansion der CD14^{+dim}-Monozyten beschrieben, während Waschbisch et al. von einer Reduktion sprachen^{207,209}. Wir konnten dementsgegen sowohl vor als auch nach Stimulation keinen signifikanten Unterschied in der Prozentzahl von Monozyten bei RRMS-Patienten im Vergleich zu gesunden Probanden feststellen (4.1.1.4, 4.1.2.4). Die Subpopulationen CD14^{+bright}- sowie CD14^{+dim}-Monozyten betreffend, konnten ebenfalls keine signifikanten Abweichungen gefunden werden (4.1.1.4). Dies könnte durch die Unterschiede in der Gating-Strategie erklärt werden. Unter Natalizumabtherapie ist ein erhöhter Anteil von Monozyten in der CSF vorbeschrieben²¹¹. Dies könnte durch die von Dallari et al. beschriebene Modulation der Integrinexpression auf Monozyten erklärt werden. Nach 12 Monaten Natalizumabtherapie wurde eine vermehrte Integrinexpression (CD49) auf der Oberfläche peripherer Monozyten gefunden. Begleitend hierzu zeigte sich die Prozentzahl von Monozyten im peripheren Blut der RRMS-Patienten nach 12 Monaten Therapie erniedrigt im Vergleich zur anfänglichen Messung, was die These der vermehrten Migration ins ZNS stützt²¹².

Bei CEACAM1⁺ Monozyten ließ sich bei uns nach Stimulation eine tendenzielle Erniedrigung des prozentualen Anteils bei RRMS-Patienten finden (4.2.4). CEACAM1 wirkt sich protektiv auf Monozyten aus und vermindert die Apoptoserate²¹³. Im Rahmen von Inflammationsreaktionen kommt es zu einer Hochregulierung von CEACAM1-Rezeptoren auf der Oberfläche von Immunzellen^{214,215}. Dies würde wiederum erklären, weshalb wir ein vermindertes Vorkommen CEACAM1⁺ Monozyten feststellen konnten, da davon auszugehen ist, dass die CEACAM1⁺ Monozyten ins ZNS migrieren.

Auch bei den anderen MS-Verlaufsformen ließen sich bei uns tendenziell weniger periphere Monozyten finden als bei Gesunden. Bei den von uns untersuchten CIS- und PPMS-Patienten konnten weniger Monozyten und CD14^{+bright}-Monozyten gefunden werden (4.3.4, 4.3.1). Die SPMS-Patienten wiesen tendenziell weniger CD14^{+dim}-Monozyten und CEACAM1⁺ CD14^{+dim}-Monozyten auf (4.3.2).

In der Zukunft wird zu diskutieren sein, ob die Monozyten eine Rolle als Biomarker in der Therapie der MS spielen könnten²¹⁶.

6 Ausblick

Anhand der letzten Revision der McDonald-Kriterien wurde die Notwendigkeit einer frühen Diagnose der MS mit frühem Therapiebeginn verdeutlicht⁴³. Dies wirft erneut die Frage nach neuen Therapieansätzen sowie neuen Biomarkern auf^{217–219}. Unabhängig von der MRT-Diagnostik sollte weiterhin versucht werden, die Immunzellen im peripheren Blut sowie im CSF mit den unterschiedlichen Verlaufsformen sowie den verschiedenen Krankheitsstadien und dem Therapieansprechen in Zusammenhang zu bringen²²⁰. Wie auch in dieser Arbeit gezeigt, sollte dabei insbesondere den NK-Zellen sowie den Monozyten und den jeweiligen Subpopulationen ein besonderes Augenmerk gewidmet werden. Möglicherweise könnten sich diese als Biomarker für den Verlauf der MS bzw. das Therapieansprechen erweisen^{207,221–224}.

Ein interessanter Aspekt könnte auch die Untersuchung von Immunzellen bei CIS-Patienten sein, da dies möglicherweise Aufschluss darüber geben könnte, welche Veränderung der Immunzellen im frühen Krankheitsstadium eine Rolle spielen.

Anhand unserer Ergebnisse ist CEACAM1 eine eher untergeordnete Rolle in der Pathophysiologie der MS zuzusprechen. Dementgegen ließ sich im Mausmodell eine CEACAM1-Expression auf B-Zellaggregaten im ZNS von Mäusen mit chronischer EAE nachweisen¹⁹¹. Zudem konnte durch Verabreichung eines CEACAM1-Antikörpers eine Reduktion der B-Zellaggregate erzielt werden¹⁹¹. Ergänzend scheint CEACAM1 zunehmend in den Fokus der Forschung hinsichtlich möglicher Therapieansätze in der Immunologie, Onkologie und Infektiologie zu rücken²²⁵. Da von CEACAM1 zwei Isoformen (CEACAM1-S und CEACAM1-L) existieren, wäre die Untersuchung der Expression der CEACAM1-Isoformen auf Immunzellen bei MS-Erkrankten mittels Realtime-PCR ein weiterer interessanter Forschungsansatz.

7 Zusammenfassung

Die MS ist eine chronisch verlaufende, entzündliche Erkrankung des ZNS, die bis heute nicht kurativ behandelt werden kann und deren Pathogenese noch nicht abschließend geklärt ist. Sie zeichnet sich durch das Auftreten neurologischer Ausfallserscheinungen auf und verläuft meist schubförmig. Anhand des klinischen Verlaufs kann man drei Verlaufsformen unterscheiden: die RRMS, PPMS sowie SPMS. Beim CIS handelt es sich um eine Erkrankung, die mit hoher Wahrscheinlichkeit in eine MS übergehen kann, jedoch die Diagnosekriterien nicht vollständig erfüllt. Für die Diagnose der MS müssen die McDonald-Kriterien erfüllt sein, die anhand von MRT-Untersuchungen sowie klinischen Untersuchungen eine Einschätzung des Erkrankungsausmaßes möglich machen. Je nach Verlaufsform und Schwere der Erkrankung kann die MS mithilfe von Immuntherapien behandelt werden, wobei sich durch die Therapie lediglich ein Eindämmen des Progresses bzw. Linderung der Beschwerdesymptomatik erzielen lässt.

Nach dem bisherigen Verständnis der Pathogenese der MS kommt es zu einer Aktivierung peripherer B- und T-Lymphozyten, die als autoreaktive Zellen die Blut-Hirn-Schranke überwinden. Im ZNS angekommen wenden sie sich gegen körpereigene Strukturen, sorgen für eine lokale Inflammationsreaktion unter Ausbildung von Inflammationsherden sowie tertiär lymphatischen Organen und führen so zu einer Degeneration der Myelinscheiden. Konsekutiv kommt es in dem betroffenen Hirnareal zu neurologischen Ausfallserscheinungen, was sich wiederum in den klinischen Symptomen des Patienten niederschlägt.

Ziel dieser Arbeit war es, Veränderungen hinsichtlich des prozentualen Anteils von Immunzellen und deren Subpopulationen mit besonderem Augenmerk auf CEACAM1-exprimierende Immunzellen bei MS-Erkrankten herauszuarbeiten. CEACAM1 ist ein Zelladhäsionsmolekül, das auf verschiedenen Immunzellen vorkommt und das sich als regulierender Co-Rezeptor sowohl aktivierend als auch inhibierend auf die Immunzellen auswirken kann.

Wir untersuchten daher das Blut von RRMS-Patienten (n = 25), PPMS-Patienten (n = 2), SPMS-Patienten (n = 3), Schub-Patienten (n = 2) und CIS-Patienten (n = 2) und verglichen die durchflusszytometrisch erhobenen Daten mit denen von gesunden Probanden (n = 18). Dabei erfolgte die Messung vor und nach polyklonaler Stimulation, um eine mögliche Änderung der Prozentzahl der Immunzellen im Rahmen von Schubereignissen herauszufiltern. Die von uns untersuchten Immunzellen umfassten T-Zellen, CTL, T_H-Zellen, B-Zellen, naive B-Zellen, B1-Zellen, Gedächtniszellen, Plasmazellen, NK-Zellen, CD56^{bright}-NK-Zellen, CD56^{dim}-NK-Zellen, NKLT, Monozyten, CD14^{bright}-Monozyten sowie CD14^{dim}- Monozyten, . Außerdem betrachteten wir den prozentualen Anteil der Immunzellen hinsichtlich der CEACAM1-Expression. Die Statistik wurde dabei mittels GraphPad Prism erhoben. Dabei ließ sich hinsichtlich CEACAM1⁺-Immunzellen lediglich bei naiven B-Zellen ein signifikanter Unterschied herausarbeiten, wobei sich der prozentuale Anteil bei RRMS-Patienten erhöht zeigte. Anhand unserer Ergebnisse scheint CEACAM1 keine zentrale Rolle in der Pathogenese der MS zu spielen. Jedoch zeigten sich insbesondere im Hinblick auf die CEACAM1⁺ B-Zellen und deren Subpopulationen Unterschiede im Vergleich zu bisherigen Forschungsergebnissen, was möglicherweise auf die höhere Patientenanzahl bei uns zurückzuführen ist. Den prozentualen Anteil von Immunzellen bei MS-Erkrankten betreffend ließ sich eine signifikante Erhöhung CD56^{dim}-NK-Zellen bei RRMS-Patienten feststellen. Dies stützt die These, dass sowohl bei den NK-Zellen als auch den Monozyten die „bright“- und „dim“-Subpopulationen unterschiedliche Aufgaben innehaben und die „dim“-Subpopulationen eine proinflammatorische Funktion einnehmen und hierbei auch in der Pathogenese der MS mitwirken. Die von uns untersuchten Stichproben bei den anderen MS-Verlaufsformen (PPMS, SPMS und Schub) sowie bei CIS-Patienten umfassten lediglich eine geringe Patientenanzahl und wiesen daher lediglich eine Tendenz auf. Auch hierbei konnten bei den Subpopulationen der NK-Zellen und Monozyten Veränderungen festgestellt werden . In Zukunft sollte daher hinsichtlich der Entwicklung neuer Biomarker den NK-Zellen und Monozyten ein besonderes Augenmerk gewidmet werden,

um eine frühe Diagnostik sowie verbesserte Therapie der MS möglich zu machen²²⁶.

8 Literaturverzeichnis

1. Hacke, W., Poeck, K. & Wick, W. *Neurologie*. (Springer, 2016).
2. Reynolds, E. R., Ashbaugh, A. D., Hockenberry, B. J. & McGrew, C. A. Multiple sclerosis and exercise: A literature review. *Curr. Sports Med. Rep.* **17**, 31–35 (2018).
3. Deutsches Ärzteblatt: Archiv 'Multiple Sklerose: Auch Kinder sind betroffen' (31.10.2003). Available at: <https://www.aerzteblatt.de/pdf.asp?id=39103>. (Accessed: 28th March 2021)
4. Hoffmann, S. *et al.* Multiple Sklerose: Epidemiologie, Pathophysiologie, Diagnostik und Therapie.
5. Weih, M. *et al.* Data on multiple sclerosis in Germany and their representation in the ambulatory registry NeuroTransData (NTD) network. *Fortschritte der Neurol. Psychiatr.* **88**, 379–385 (2020).
6. Ascherio, A. & Munger, K. L. Environmental risk factors for multiple sclerosis. Part II: Noninfectious factors. *Annals of Neurology* **61**, 504–513 (2007).
7. Ascherio, A., Munger, K. L. & Simon, K. C. Vitamin D and multiple sclerosis. *The Lancet Neurology* **9**, 599–612 (2010).
8. Correale, J., Ysraelit, M. C. & Gaitn, M. I. Immunomodulatory effects of Vitamin D in multiple sclerosis. *Brain* **132**, 1146–1160 (2009).
9. Gale, C. R. & Martyn, C. N. Migrant studies in multiple sclerosis. *Progress in Neurobiology* **47**, 425–448 (1995).
10. Hansen, T. *et al.* Risk for multiple sclerosis in dizygotic and monozygotic twins. *Mult. Scler.* **11**, 500–503 (2005).
11. Thompson, A. J., Baranzini, S. E., Geurts, J., Hemmer, B. & Ciccarelli, O. Multiple sclerosis. *The Lancet* **391**, 1622–1636 (2018).
12. Arneth, B. Multiple Sclerosis and Smoking. *American Journal of Medicine*

- 133**, 783–788 (2020).
13. Ascherio, A. & Munger, K. L. EBV and autoimmunity. in *Epstein Barr Virus* **1**, 365–385 (Springer International Publishing, 2015).
 14. Alfredsson, L. & Olsson, T. Lifestyle and environmental factors in multiple sclerosis. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **9**, (2019).
 15. Handel, A. E. *et al.* An updated meta-analysis of risk of multiple sclerosis following infectious mononucleosis. *PLoS One* **5**, 1–5 (2010).
 16. Constantinescu, C. S., Farooqi, N., O'Brien, K. & Gran, B. Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) as a model for multiple sclerosis (MS). *British Journal of Pharmacology* **164**, 1079–1106 (2011).
 17. Harkiolaki, M. *et al.* T Cell-Mediated Autoimmune Disease Due to Low-Affinity Crossreactivity to Common Microbial Peptides. *Immunity* **30**, 348–357 (2009).
 18. Münz, C., Lünemann, J. D., Getts, M. T. & Miller, S. D. Antiviral immune responses: triggers of or triggered by autoimmunity? *Nat. Rev. Immunol.* **9**, 246 (2009).
 19. JK, O., JL, C., MA, C., MC, D. C. & SD, M. A virus-induced molecular mimicry model of multiple sclerosis. *J. Clin. Invest.* **108**, 311–318 (2001).
 20. Dendrou, C. A., Fugger, L. & Friese, M. A. Immunopathology of multiple sclerosis. *Nature Reviews Immunology* **15**, 545–558 (2015).
 21. Hemmer, B. & Selzer. Update on immunopathogenesis and immunotherapy in multiple sclerosis. *ImmunoTargets Ther.* **2**, 21 (2013).
 22. Garg, N. & Smith, T. W. An update on immunopathogenesis, diagnosis, and treatment of multiple sclerosis. *Brain Behav.* **5**, 362 (2015).
 23. Frohman, E. M., Racke, M. K. & Raine, C. S. Multiple Sclerosis — The Plaque and Its Pathogenesis. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMra052130> **354**, 942–955 (2009).
 24. Baecher-Allan, C., Kaskow, B. J. & Weiner, H. L. Multiple Sclerosis:

- Mechanisms and Immunotherapy. *Neuron* **97**, 742–768 (2018).
25. A, K. *et al.* Cortical demyelination and diffuse white matter injury in multiple sclerosis. *Brain* **128**, 2705–2712 (2005).
 26. PK, S. & S, T. Recent advances in understanding multiple sclerosis. *F1000Research* **8**, (2019).
 27. A, E. *et al.* Progression of regional grey matter atrophy in multiple sclerosis. *Brain* **141**, 1665–1677 (2018).
 28. Lublin, F. D. New Multiple Sclerosis Phenotypic Classification. *Eur. Neurol.* **72**, 1–5 (2014).
 29. Berkovich, R. R. Acute Multiple Sclerosis Relapse. *CONTINUUM Lifelong Learning in Neurology* **22**, 799–814 (2016).
 30. Kalincik, T. Multiple Sclerosis Relapses: Epidemiology, Outcomes and Management. A Systematic Review. *Neuroepidemiology* **44**, 199–214 (2015).
 31. Förster, M. *et al.* Drug Treatment of Clinically Isolated Syndrome. *CNS Drugs 2019 337* **33**, 659–676 (2019).
 32. Inojosa, H., Proschmann, U., Akgün, K. & Ziemssen, T. A focus on secondary progressive multiple sclerosis (SPMS): challenges in diagnosis and definition. *Journal of Neurology* **268**, (2019).
 33. Boyko, A. *et al.* Approaches and challenges in the diagnosis and management of secondary progressive multiple sclerosis: A Central Eastern European perspective from healthcare professionals. *Multiple Sclerosis and Related Disorders* **50**, (2021).
 34. Hemmer, B. Diagnose und Therapie der Multiplen Sklerose, Neuromyelitis-optica-Spektrum-Erkrankungen und MOG-IgG-assoziierten Erkrankungen Entwicklungsstufe: S2k Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie. (2021).
 35. Baldassari, L. E. & Fox, R. J. Therapeutic Advances and Challenges in

- the Treatment of Progressive Multiple Sclerosis. *Drugs* **78**, 1549–1566 (2018).
36. Meyer-Moock, S., Feng, Y. S., Maeurer, M., Dippel, F. W. & Kohlmann, T. Systematic literature review and validity evaluation of the Expanded Disability Status Scale (EDSS) and the Multiple Sclerosis Functional Composite (MSFC) in patients with multiple sclerosis. *BMC Neurol.* **14**, 58 (2014).
 37. Kurtzke, J. F. On the origin of EDSS. *Multiple Sclerosis and Related Disorders* **4**, 95–103 (2015).
 38. Stangel, M. *et al.* The utility of cerebrospinal fluid analysis in patients with multiple sclerosis. *Nat. Rev. Neurol.* **9**, 267–76 (2013).
 39. Krumbholz, M., Derfuss, T., Hohlfeld, R. & Meinl, E. B cells and antibodies in multiple sclerosis pathogenesis and therapy. *Nat. Rev. Neurol.* **8**, 613–623 (2012).
 40. Obermeier, B. *et al.* Matching of oligoclonal immunoglobulin transcriptomes and proteomes of cerebrospinal fluid in multiple sclerosis. *Nat. Med.* **14**, 688–693 (2008).
 41. Jarius, S. *et al.* The MRZ reaction as a highly specific marker of multiple sclerosis: re-evaluation and structured review of the literature. *J. Neurol.* **264**, 453–466 (2017).
 42. Filippi, M. *et al.* Magnetic resonance techniques in multiple sclerosis: The present and the future. *Archives of Neurology* **68**, 1514–1520 (2011).
 43. AJ, T. *et al.* Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria. *Lancet. Neurol.* **17**, 162–173 (2018).
 44. Gelfand, J. M., Cree, B. A. C. & Hauser, S. L. Ocrelizumab and Other CD20+ B-Cell-Depleting Therapies in Multiple Sclerosis. *Neurotherapeutics* **14**, 835–841 (2017).
 45. Syed, Y. Y. Ocrelizumab: A Review in Multiple Sclerosis. *CNS Drugs* **32**,

- 883–890 (2018).
46. Hauser, S. L. *et al.* Ocrelizumab versus Interferon Beta-1a in Relapsing Multiple Sclerosis. *N. Engl. J. Med.* **376**, 221–234 (2017).
 47. Multiple Sklerose: EU-Zulassung für Ofatumumab / DMSG - Multiple Sklerose. Available at: <https://www.dmsg.de/multiple-sklerose-news/ms-therapien/multiple-sklerose-eu-zulassung-fuer-ofatumumab/>. (Accessed: 21st October 2021)
 48. Hawker, K. *et al.* Rituximab in patients with primary progressive multiple sclerosis: Results of a randomized double-blind placebo-controlled multicenter trial. *Ann. Neurol.* **66**, 460–471 (2009).
 49. Hauser, S. L. *et al.* B-Cell Depletion with Rituximab in Relapsing–Remitting Multiple Sclerosis. *N. Engl. J. Med.* **358**, 676–688 (2008).
 50. Dunn, N. *et al.* Rituximab in multiple sclerosis: Frequency and clinical relevance of anti-drug antibodies. *Mult. Scler. J.* 135245851772004 (2017). doi:10.1177/1352458517720044
 51. Ineichen, B. V., Moridi, T., Granberg, T. & Piehl, F. Rituximab treatment for multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis Journal* **26**, 137–152 (2020).
 52. Piehl, F. Current and emerging disease-modulatory therapies and treatment targets for multiple sclerosis. *J. Intern. Med.* joim.13215 (2020). doi:10.1111/joim.13215
 53. Sorensen, P. S. *et al.* Safety and efficacy of ofatumumab in relapsing–remitting multiple sclerosis: A phase 2 study. *Neurology* **82**, 573–581 (2014).
 54. Bar-Or, A. *et al.* Subcutaneous ofatumumab in patients with relapsing–remitting multiple sclerosis: The MIRROR study. *Neurology* **90**, E1805–E1814 (2018).
 55. Hauser, S. L. *et al.* Ofatumumab versus Teriflunomide in Multiple Sclerosis. *N. Engl. J. Med.* **383**, 546–557 (2020).

56. E, F. *et al.* A phase 2 multicenter study of ublituximab, a novel glycoengineered anti-CD20 monoclonal antibody, in patients with relapsing forms of multiple sclerosis. *Mult. Scler.* **27**, 420–429 (2021).
57. A Phase 3, Randomized, Multi-center, Double-blinded, Active-controlled Study to Assess the Efficacy and Safety/Tolerability of Ublituximab (TG-1101; UTX) as Compares to Teriflunomide in Subjects With Relapsing Multiple Sclerosis (RMS) (ULTIMATE 2) - Full Text View - ClinicalTrials.gov. Available at: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03277248>. (Accessed: 21st October 2021)
58. S, R., C, T. & C, G. Anti lingo 1 (opicinumab) a new monoclonal antibody tested in relapsing remitting multiple sclerosis. *Expert Rev. Neurother.* **17**, 1081–1089 (2017).
59. S, M. *et al.* LINGO-1 negatively regulates myelination by oligodendrocytes. *Nat. Neurosci.* **8**, 745–751 (2005).
60. S, M. *et al.* LINGO-1 antagonist promotes spinal cord remyelination and axonal integrity in MOG-induced experimental autoimmune encephalomyelitis. *Nat. Med.* **13**, 1228–1233 (2007).
61. Ahmed, Z., Fulton, D. & Douglas, M. R. Opicinumab: is it a potential treatment for multiple sclerosis? *Ann. Transl. Med.* **8**, 892–892 (2020).
62. D, C. *et al.* Safety and efficacy of opicinumab in patients with relapsing multiple sclerosis (SYNERGY): a randomised, placebo-controlled, phase 2 trial. *Lancet. Neurol.* **18**, 845–856 (2019).
63. CLUSTER OF DIFFERENTIATION (CD) ANTIGENS. in *Immunology Guidebook* 47–124 (Elsevier, 2004). doi:10.1016/b978-012198382-6/50027-3
64. Lüllmann-Rauch, R. & Asan, E. 13 Lymphatische Organe (I). in *Taschenlehrbuch Histologie* (Georg Thieme Verlag, 2019). doi:10.1055/b-0039-166974

65. Milich, D. R. *et al.* Role of B cells in antigen presentation of the hepatitis B core. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 14648–14653 (1997).
66. Molnarfi, N. *et al.* MHC class II-dependent B cell APC function is required for induction of CNS autoimmunity independent of myelin-specific antibodies. *J. Exp. Med.* **210**, 2921–2937 (2013).
67. L, W., Y, F. & Y, C. Regulatory B Cells. *Adv. Exp. Med. Biol.* **1254**, 87–103 (2020).
68. Fillatreau, S. B cells and their cytokine activities implications in human diseases. *Clin. Immunol.* (2017). doi:10.1016/j.clim.2017.07.020
69. B, T. B-cell receptor: from resting state to activate. *Immunology* **136**, 21–27 (2012).
70. W, I. & T, K. Regulation of Plasma Cell Differentiation. *Adv. Exp. Med. Biol.* **1254**, 63–74 (2020).
71. Murphy, K., Weaver, C., Murphy, K. & Weaver, C. Antigenerkennung durch B-Zell- und T-Zell-Rezeptoren. in *Janeway Immunologie* 177–220 (Springer Berlin Heidelberg, 2018). doi:10.1007/978-3-662-56004-4_4
72. Murphy, K., Weaver, C., Murphy, K. & Weaver, C. Die Entwicklung der B- und T-Lymphocyten. in *Janeway Immunologie* 377–440 (Springer Berlin Heidelberg, 2018). doi:10.1007/978-3-662-56004-4_8
73. Y, W., J, L., PD, B. & JY, W. B Cell Development and Maturation. *Adv. Exp. Med. Biol.* **1254**, 1–22 (2020).
74. Lüllmann-Rauch, R. & Asan, E. *Taschenlehrbuch Histologie. Taschenlehrbuch Histologie* (Georg Thieme Verlag, 2019). doi:10.1055/b-006-163361
75. Allman, D. & Pillai, S. Peripheral B cell subsets. *Current Opinion in Immunology* **20**, 149–157 (2008).
76. Wekerle, H. B cells in multiple sclerosis. *Autoimmunity* **50**, 57–60 (2017).
77. Dobson, R., Ramagopalan, S., Davis, A. & Giovannoni, G. Cerebrospinal

- fluid oligoclonal bands in multiple sclerosis and clinically isolated syndromes: A meta-analysis of prevalence, prognosis and effect of latitude. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **84**, 909–914 (2013).
78. Deisenhammer, F., Zetterberg, H., Fitzner, B. & Zettl, U. K. The cerebrospinal fluid in multiple sclerosis. *Frontiers in Immunology* **10**, 726 (2019).
79. Wurth, S. *et al.* Cerebrospinal fluid B cells and disease progression in multiple sclerosis - A longitudinal prospective study. *PLoS One* **12**, e0182462 (2017).
80. Ligocki, A. J. *et al.* A Distinct Class of Antibodies May Be an Indicator of Gray Matter Autoimmunity in Early and Established Relapsing Remitting Multiple Sclerosis Patients. *ASN Neuro* **7**, (2015).
81. Blauth, K. *et al.* Antibodies produced by clonally expanded plasma cells in multiple sclerosis cerebrospinal fluid cause demyelination of spinal cord explants. *Acta Neuropathol.* **130**, 765–781 (2015).
82. Qin, Y. *et al.* Clonal expansion and somatic hypermutation of V(H) genes of B cells from cerebrospinal fluid in multiple sclerosis. *J. Clin. Invest.* **102**, 1045–1050 (1998).
83. Owens, G. P. *et al.* Restricted use of VH4 Germline segments in an acute multiple sclerosis brain. *Ann. Neurol.* **43**, 236–243 (1998).
84. B cell repertoire diversity and clonal expansion in multiple sclerosis brain lesions - PubMed. Available at:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10528220/>. (Accessed: 14th April 2021)
85. Colombo, M. *et al.* Accumulation of Clonally Related B Lymphocytes in the Cerebrospinal Fluid of Multiple Sclerosis Patients. *J. Immunol.* **164**, 2782–2789 (2000).
86. Monson, N. L. *et al.* Receptor revision and atypical mutational characteristics in clonally expanded B cells from the cerebrospinal fluid of recently diagnosed multiple sclerosis patients. *J. Neuroimmunol.* **158**,

- 170–181 (2005).
87. Owens, G. P. *et al.* Single-Cell Repertoire Analysis Demonstrates that Clonal Expansion Is a Prominent Feature of the B Cell Response in Multiple Sclerosis Cerebrospinal Fluid. *J. Immunol.* **171**, 2725–2733 (2003).
 88. Brändle, S. M. *et al.* Distinct oligoclonal band antibodies in multiple sclerosis recognize ubiquitous self-proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **113**, 7864–7869 (2016).
 89. Winger, R. C. & Zamvil, S. S. Antibodies in multiple sclerosis oligoclonal bands target debris. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **113**, 7696–7698 (2016).
 90. Lovato, L. *et al.* Related B cell clones populate the meninges and parenchyma of patients with multiple sclerosis. *Brain* **134**, 534–41 (2011).
 91. Palanichamy, A. *et al.* Immunoglobulin class-switched B cells form an active immune axis between CNS and periphery in multiple sclerosis. *Sci. Transl. Med.* **6**, (2014).
 92. Stern, J. N. H. *et al.* B cells populating the multiple sclerosis brain mature in the draining cervical lymph nodes. *Sci. Transl. Med.* **6**, (2014).
 93. Eggers, E. L. *et al.* Clonal relationships of CSF B cells in treatment-naive multiple sclerosis patients. *JCI insight* **2**, (2017).
 94. Von Büdingen, H. C. *et al.* B cell exchange across the blood-brain barrier in multiple sclerosis. *J. Clin. Invest.* **122**, 4533–4543 (2012).
 95. Nerrant, E. *et al.* Lack of confirmation of anti-inward rectifying potassium channel 4.1 antibodies as reliable markers of multiple sclerosis. *Mult. Scler. J.* **20**, 1699–1703 (2014).
 96. Kuhle, J. *et al.* Lack of Association between Antimyelin Antibodies and Progression to Multiple Sclerosis. *N. Engl. J. Med.* **356**, 371–378 (2007).
 97. Li, R., Patterson, K. R. & Bar-Or, A. Reassessing B cell contributions in

- multiple sclerosis. *Nature Immunology* **19**, 696–707 (2018).
98. Joseph, F. G. *et al.* CSF oligoclonal band status informs prognosis in multiple sclerosis: a case control study of 100 patients. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **80**, 292–6 (2009).
 99. Levine, M. H. *et al.* A B-cell receptor-specific selection step governs immature to mature B cell differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 2743 (2000).
 100. Yurasov, S. *et al.* Defective B cell tolerance checkpoints in systemic lupus erythematosus. *J. Exp. Med.* **201**, 703 (2005).
 101. Allman, D. M., Ferguson, S. E., Lentz, V. M. & Cancro, M. P. Peripheral B cell maturation. II. Heat-stable antigen(hi) splenic B cells are an immature developmental intermediate in the production of long-lived marrow-derived B cells. *J. Immunol.* **151**, (1993).
 102. F, L. *et al.* B cell development in the spleen takes place in discrete steps and is determined by the quality of B cell receptor-derived signals. *J. Exp. Med.* **190**, 75–89 (1999).
 103. Rolink, A. G., Andersson, J. & Melchers, F. Characterization of immature B cells by a novel monoclonal antibody, by turnover and by mitogen reactivity. doi:10.1002/(SICI)1521-4141(199811)28:11
 104. Kinnunen, T. *et al.* Specific peripheral B cell tolerance defects in patients with multiple sclerosis. *J. Clin. Invest.* **123**, 2737–2741 (2013).
 105. Gharibi, T. *et al.* The role of B cells in the immunopathogenesis of multiple sclerosis. *Immunology* **160**, 325–335 (2020).
 106. Barnett, L. G. *et al.* B Cell Antigen Presentation in the Initiation of Follicular Helper T Cell and Germinal Center Differentiation. *J. Immunol.* **192**, 3607–3617 (2014).
 107. Rivera, A., Chen, C. C., Ron, N., Dougherty, J. P. & Ron, Y. Role of B cells as antigen-presenting cells in vivo revisited: Antigen-specific B cells

- are essential for T cell expansion in lymph nodes and for systemic T cell responses to low antigen concentrations. *Int. Immunol.* **13**, 1583–1593 (2001).
108. Pierce, S. K. *et al.* Antigen-Presenting Function of B Lymphocytes. *Immunol. Rev.* **106**, 149–180 (1988).
 109. Yu, X., Graner, M., Kennedy, P. G. E. & Liu, Y. The Role of Antibodies in the Pathogenesis of Multiple Sclerosis. *Front. Neurol.* **11**, 533388 (2020).
 110. Langelaar, J. van, Rijvers, L., Smolders, J. & Luijn, M. M. van. B and T Cells Driving Multiple Sclerosis: Identity, Mechanisms and Potential Triggers. *Front. Immunol.* **11**, (2020).
 111. Genç, K., Dona, D. L. & Reder, A. T. Increased CD80+ B cells in active multiple sclerosis and reversal by interferon β -1b therapy. *J. Clin. Invest.* **99**, 2664–2671 (1997).
 112. Fraussen, J. *et al.* B cells of multiple sclerosis patients induce autoreactive proinflammatory T cell responses. *Clin. Immunol.* **173**, 124–132 (2016).
 113. Milo, R. Therapies for multiple sclerosis targeting B cells. in *Croatian Medical Journal* **60**, 87–98 (Medicinska Naklada Zagreb, 2019).
 114. Bar-Or, A. *et al.* Abnormal B-cell cytokine responses a trigger of T-cell-mediated disease in MS? *Ann. Neurol.* **67**, 452–461 (2010).
 115. Duddy, M. E., Alter, A. & Bar-Or, A. Distinct Profiles of Human B Cell Effector Cytokines: A Role in Immune Regulation? *J. Immunol.* **172**, 3422–3427 (2004).
 116. Li, R. *et al.* Proinflammatory GM-CSF-producing B cells in multiple sclerosis and B cell depletion therapy. *Sci. Transl. Med.* **7**, (2015).
 117. Miyazaki, Y. *et al.* A novel microRNA-132-surtuin-1 axis underlies aberrant B-cell cytokine regulation in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. *PLoS One* **9**, (2014).

118. Serafini, B., Rosicarelli, B., Magliozzi, R., Stigliano, E. & Aloisi, F. Detection of Ectopic B-cell Follicles with Germinal Centers in the Meninges of Patients with Secondary Progressive Multiple Sclerosis. *Brain Pathol.* **14**, 164–174 (2004).
119. Magliozzi, R. *et al.* Meningeal B-cell follicles in secondary progressive multiple sclerosis associate with early onset of disease and severe cortical pathology. *Brain* **130**, 1089–1104 (2006).
120. Lucchinetti, C. F. *et al.* Inflammatory Cortical Demyelination in Early Multiple Sclerosis. *N. Engl. J. Med.* **365**, 2188–2197 (2011).
121. Pikor, N. B., Prat, A., Bar-Or, A. & Gommerman, J. L. Meningeal Tertiary Lymphoid Tissues and Multiple Sclerosis: A Gathering Place for Diverse Types of Immune Cells during CNS Autoimmunity. *Front. Immunol.* **6**, (2016).
122. Kumar, B. V., Connors, T. & Farber, D. L. Human T cell development, localization, and function throughout life. *Immunity* **48**, 202 (2018).
123. Zhu, J. T Helper Cell Differentiation, Heterogeneity, and Plasticity. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **10**, (2018).
124. Kaszubowska, L., Foerster, J., Kwiatkowski, P. & Schetz, D. NKT-like cells reveal higher than T lymphocytes expression of cellular protective proteins HSP70 and SOD2 and comparably increased expression of SIRT1 in the oldest seniors. *Folia Histochem. Cytobiol.* **56**, 231–240 (2018).
125. Torina, A., Guggino, G., La Manna, M. P. & Sireci, G. The janus face of NKT cell function in autoimmunity and infectious diseases. *International Journal of Molecular Sciences* **19**, (2018).
126. Fuss, I. J. *et al.* IL-13R α 2-bearing, type II NKT cells reactive to sulfatide self-antigen populate the mucosa of ulcerative colitis. *Gut* **63**, 1728–1736 (2014).
127. Fuss, I. J. *et al.* Nonclassical CD1d-restricted NK T cells that produce IL-

- 13 characterize an atypical Th2 response in ulcerative colitis. *J. Clin. Invest.* **113**, 1490–1497 (2004).
128. Liao, C. *et al.* Dysregulation of CD1d-restricted type II natural killer T cells leads to spontaneous development of colitis in mice. *Gastroenterology* **142**, (2012).
129. YN, C. *et al.* Numerical and functional deficiencies of natural killer T cells in systemic lupus erythematosus: their deficiency related to disease activity. *Rheumatology (Oxford)*. **50**, 1054–1063 (2011).
130. Selter, R. C. & Hemmer, B. Update on immunopathogenesis and immunotherapy in multiple sclerosis. *ImmunoTargets Ther.* **2**, 21–30 (2013).
131. Hafler, D. A. *et al.* Multiple sclerosis. *Immunological Reviews* **204**, 208–231 (2005).
132. Traugott, U., Reinherz, E. L. & Raine, C. S. Multiple sclerosis. Distribution of T cells, T cell subsets and Ia-positive macrophages in lesions of different ages. *J. Neuroimmunol.* **4**, 201–221 (1983).
133. Hauser, S. L. *et al.* Immunohistochemical analysis of the cellular infiltrate in multiple sclerosis lesions. *Ann. Neurol.* **19**, 578–587 (1986).
134. Miller, S. D. *et al.* Persistent infection with Theiler's virus leads to CNS autoimmunity via epitope spreading. *Nat. Med.* **3**, 1133–1136 (1997).
135. O'Connor, K. C., Bar-Or, A. & Hafler, D. A. The neuroimmunology of multiple sclerosis: Possible roles of T and B lymphocytes in immunopathogenesis. *J. Clin. Immunol.* **21**, 81–92 (2001).
136. H, H., R, G. & HP, H. Th17 Cells in MS and Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *Int. MS J.* **16**, 12–18 (2009).
137. T, M., K, A., U, P., J, S. & T, Z. The role of TH17 cells in multiple sclerosis: Therapeutic implications. *Autoimmun. Rev.* **19**, (2020).
138. J, Y., MS, S., J, S. & T, Y. Targeting Th17 cells in autoimmune diseases.

- Trends Pharmacol. Sci.* **35**, 493–500 (2014).
139. Batoulis, H., Addicks, K. & Kuerten, S. Emerging concepts in autoimmune encephalomyelitis beyond the CD4/TH1 paradigm. *Annals of Anatomy* **192**, 179–193 (2010).
140. Lucchinetti, C. *et al.* Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination. *Ann. Neurol.* **47**, 707–717 (2000).
141. Mishra, M. K. & Wee Yong, V. Myeloid cells-targets of medication in multiple sclerosis. *Nature Reviews Neurology* **12**, 539–551 (2016).
142. ESIRI, M. M. & READING, M. C. MACROPHAGE POPULATIONS ASSOCIATED WITH MULTIPLE SCLEROSIS PLAQUES. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* **13**, 451–465 (1987).
143. B Ajami, J. B. C. K. K. M. F. R. Infiltrating monocytes trigger EAE progression, but do not contribute to the resident microglia pool. *Nat. Neurosci.* **14**, 1142–1149 (2011).
144. MK Mishra, J. W. C. S. M. M. V. Y. Kinetics of proinflammatory monocytes in a model of multiple sclerosis and its perturbation by laquinimod. *Am. J. Pathol.* **181**, 642–651 (2012).
145. IL King, T. D. B. S. Circulating Ly-6C⁺ myeloid precursors migrate to the CNS and play a pathogenic role during autoimmune demyelinating disease. *Blood* **113**, 3190–3197 (2009).
146. Kouwenhoven, M., Teleshova, N., Özenci, V., Press, R. & Link, H. Monocytes in multiple sclerosis: Phenotype and cytokine profile. *J. Neuroimmunol.* **112**, 197–205 (2001).
147. Makhoulouf, K., Weiner, H. L. & Khoury, S. J. Increased percentage of IL-12 + monocytes in the blood correlates with the presence of active MRI lesions in MS. *J. Neuroimmunol.* **119**, 145–149 (2001).
148. Cooper, M. A. *et al.* Human natural killer cells: A unique innate

- immunoregulatory role for the CD56bright subset. *Blood* **97**, 3146–3151 (2001).
149. Laroni, A. *et al.* Dysregulation of regulatory CD56bright NK cells/T cells interactions in multiple sclerosis. *J. Autoimmun.* **72**, 8–18 (2016).
150. Sakuishi, K., Miyake, S. & Yamamura, T. Role of NK cells and invariant NKT cells in multiple sclerosis. *Results Probl. Cell Differ.* **51**, 127–147 (2010).
151. Kastrukoff, L. F. *et al.* A role for natural killer cells in the immunopathogenesis of multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol.* **86**, 123–133 (1998).
152. Bielekova, B. *et al.* Regulatory CD56bright natural killer cells mediate immunomodulatory effects of IL-2R α -targeted therapy (daclizumab) in multiple sclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 5941–5946 (2006).
153. Saraste, M., Irjala, H. & Airas, L. Expansion of CD56Bright natural killer cells in the peripheral blood of multiple sclerosis patients treated with interferon-beta. *Neurol. Sci.* **28**, 121–126 (2007).
154. Gross, C. C. *et al.* Regulatory functions of natural killer cells in multiple sclerosis. *Frontiers in Immunology* **7**, (2016).
155. Han, Z. W. *et al.* The old CEACAMs find their new role in tumor immunotherapy. *Investigational New Drugs* **38**, 1888–1898 (2020).
156. Zheng, J. *et al.* Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 16 interacts with α -tectorin and is mutated in autosomal dominant hearing loss (DFNA4). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 4218–4223 (2011).
157. Gray-Owen, S. D. & Blumberg, R. S. CEACAM1: Contact-dependent control of immunity. *Nature Reviews Immunology* **6**, 433–446 (2006).
158. Tchoupa, A. K., Schuhmacher, T. & Hauck, C. R. Signaling by epithelial members of the CEACAM family - Mucosal docking sites for pathogenic bacteria. *Cell Communication and Signaling* **12**, 27 (2014).

159. Gray-Owen, S. D. & Blumberg, R. S. CEACAM1: contact-dependent control of immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **6**, 443–446 (2006).
160. Beauchemin, N. & Arabzadeh, A. Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecules (CEACAMs) in cancer progression and metastasis. *Cancer and Metastasis Reviews* **32**, 643–671 (2013).
161. Klaile, E. *et al.* The CEACAM1 N-terminal Ig domain mediates cis- and trans-binding and is essential for allosteric rearrangements of CEACAM1 microclusters. *J. Cell Biol.* **187**, 553–567 (2009).
162. Chen, T. *et al.* Biliary glycoprotein (BGP_a, CD66_a, CEACAM1) mediates inhibitory signals. *J. Leukoc. Biol.* **70**, 335–40 (2001).
163. Kammerer, R., Stober, D., Singer, B. B., Öbrink, B. & Reimann, J. Carcinoembryonic Antigen-Related Cell Adhesion Molecule 1 on Murine Dendritic Cells Is a Potent Regulator of T Cell Stimulation. *J. Immunol.* **166**, 6537–6544 (2001).
164. Öbrink, B. CEA adhesion molecules: Multifunctional proteins with signal-regulatory properties. *Curr. Opin. Cell Biol.* **9**, 616–626 (1997).
165. Singer, B. B. *et al.* Carcinoembryonic Antigen-Related Cell Adhesion Molecule 1 Expression and Signaling in Human, Mouse, and Rat Leukocytes: Evidence for Replacement of the Short Cytoplasmic Domain Isoform by Glycosylphosphatidylinositol-Linked Proteins in Human Leukocytes. *J. Immunol.* **168**, 5139–5146 (2002).
166. Stocks, S. C. *et al.* CD66: Role in the regulation of neutrophil effector function. *Eur. J. Immunol.* **26**, 2924–2932 (1996).
167. Skubitz, K. M., Campbell, K. D. & Skubitz, A. P. N. CD66_a, CD66_b, CD66_c, and CD66_d each independently stimulate neutrophils. *J. Leukoc. Biol.* **60**, 106–117 (1996).
168. Kammerer, R. *et al.* Biliary glycoprotein (CD66_a), a cell adhesion molecule of the immunoglobulin superfamily, on human lymphocytes: structure, expression and involvement in T cell activation. *Eur. J.*

- Immunol.* **28**, 3664–3674 (1998).
169. Nagaishi, T. *et al.* SHP1 Phosphatase-Dependent T Cell Inhibition by CEACAM1 Adhesion Molecule Isoforms. *Immunity* **25**, 769–781 (2006).
170. Iijima, H. *et al.* Specific Regulation of T Helper Cell 1-mediated Murine Colitis by CEACAM1. *J. Exp. Med.* **199**, 471–482 (2004).
171. Nagaishi, T. *et al.* SHP1 Phosphatase-Dependent T Cell Inhibition by CEACAM1 Adhesion Molecule Isoforms. *Immunity* **25**, 769–781 (2006).
172. Chen, L. *et al.* The Short Isoform of the CEACAM1 Receptor in Intestinal T Cells Regulates Mucosal Immunity and Homeostasis via Tfh Cell Induction. *Immunity* **37**, 930–946 (2012).
173. Rovituso, D. M. *et al.* CEACAM1 mediates B cell aggregation in central nervous system autoimmunity. *Sci. Rep.* **6**, 29847 (2016).
174. Huang, Y. H. *et al.* CEACAM1 regulates TIM-3-mediated tolerance and exhaustion. *Nature* **517**, 386–390 (2015).
175. Monney, L. *et al.* Th1-specific cell surface protein Tim-3 regulates macrophage activation and severity of an autoimmune disease. *Nature* **415**, 536–541 (2002).
176. Sabatos, C. A. *et al.* Interaction of Tim-3 and Tim-3 ligand regulates T helper type 1 responses and induction of peripheral tolerance. *Nat. Immunol.* **4**, 1102–1110 (2003).
177. Sánchez-Fueyo, A. *et al.* Tim-3 inhibits T helper type 1-mediated auto- and alloimmune responses and promotes immunological tolerance. *Nat. Immunol.* **4**, 1093–1101 (2003).
178. Jones, R. B. *et al.* Tim-3 expression defines a novel population of dysfunctional T cells with highly elevated frequencies in progressive HIV-1 infection. *J. Exp. Med.* **205**, 2763–2779 (2008).
179. Sakuishi, K. *et al.* Targeting Tim-3 and PD-1 pathways to reverse T cell exhaustion and restore anti-tumor immunity. *J. Exp. Med.* **207**, 2187–

- 2194 (2010).
180. Greicius, G., Severinson, E., Beauchemin, N., Öbrink, B. & Singer, B. B. CEACAM1 is a potent regulator of B cell receptor complex-induced activation. *J. Leukoc. Biol.* **74**, 126–134 (2003).
181. Lobo, E. O., Zhang, Z. & Shively, J. E. Pivotal Advance: CEACAM1 is a negative coreceptor for the B cell receptor and promotes CD19-mediated adhesion of B cells in a PI3K-dependent manner. *J. Leukoc. Biol.* **86**, 205–218 (2009).
182. Khairnar, V. *et al.* CEACAM1 induces B-cell survival and is essential for protective antiviral antibody production. *Nat. Commun.* **6**, (2015).
183. Tsugawa, N. *et al.* CEACAM1 specifically suppresses B cell receptor signaling-mediated activation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **535**, 99–105 (2021).
184. Fujita, M. *et al.* Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 modulates experimental autoimmune encephalomyelitis via an iNKT cell-dependent mechanism. *Am. J. Pathol.* **175**, 1116–1123 (2009).
185. Tran, E. H., Prince, E. N. & Owens, T. IFN- γ Shapes Immune Invasion of the Central Nervous System Via Regulation of Chemokines. *J. Immunol.* **164**, 2759–2768 (2000).
186. Komiyama, Y. *et al.* IL-17 Plays an Important Role in the Development of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *J. Immunol.* **177**, 566–573 (2006).
187. Xiao, B. G., Ma, C. G., Xu, L. Y., Link, H. & Lu, C. Z. IL-12/IFN- γ /NO axis plays critical role in development of Th1-mediated experimental autoimmune encephalomyelitis. *Mol. Immunol.* **45**, 1191–1196 (2008).
188. Piancone, F. *et al.* A Deficit of CEACAM-1–Expressing T Lymphocytes Supports Inflammation in Primary Progressive Multiple Sclerosis. *J. Immunol.* **203**, 76–83 (2019).

189. Saresella, M. *et al.* A role for the TIM-3/GAL-9/BAT3 pathway in determining the clinical phenotype of multiple sclerosis. *FASEB J.* **28**, 5000–5009 (2014).
190. Rangachari, M. *et al.* Bat3 promotes T cell responses and autoimmunity by repressing Tim-3-mediated cell death and exhaustion. *Nat. Med.* **18**, 1394–1400 (2012).
191. Rovituso, D. M. *et al.* CEACAM1 mediates B cell aggregation in central nervous system autoimmunity. *Sci. Rep.* **6**, (2016).
192. Dargahi, N. *et al.* Multiple Sclerosis: Immunopathology and Treatment Update. *Brain Sci.* **7**, 78 (2017).
193. von Büdingen, H.-C., Bar-Or, A. & Zamvil, S. S. B cells in multiple sclerosis: connecting the dots. *Curr. Opin. Immunol.* **23**, 713–20 (2011).
194. Kunkl, M., Frasca, S., Amormino, C., Volpe, E. & Tuosto, L. T Helper Cells: The Modulators of Inflammation in Multiple Sclerosis. *Cells* **9**, (2020).
195. Yednock, T. A. *et al.* Prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis by antibodies against $\alpha 4\beta 1$ integrin. *Nature* **356**, 63–66 (1992).
196. Clerico, M. *et al.* Natalizumab in multiple sclerosis: Long-term management. *International Journal of Molecular Sciences* **18**, (2017).
197. J, H. *et al.* Th17 cells: A prognostic marker for MS rebound after natalizumab cessation? *Mult. Scler.* **23**, 114–118 (2017).
198. Hauser, S. L. The Charcot Lecture | Beating MS: A story of B cells, with twists and turns. *Multiple Sclerosis Journal* **21**, 8–21 (2015).
199. Dominguez-Villar, M. *et al.* Specific peripheral B cell tolerance defects in patients with multiple sclerosis. *Nat Med.* **17**, 673–675 (2013).
200. Bulati, M., Caruso, C. & Colonna-Romano, G. From lymphopoiesis to plasma cells differentiation, the age-related modifications of B cell

- compartment are influenced by “inflamm-ageing”. *Ageing Res. Rev.* **36**, 125–136 (2017).
201. Laroni, A. & Uccelli, A. CD56bright Natural Killer Cells: A Possible Biomarker of Different Treatments in Multiple Sclerosis. *J. Clin. Med.* **9**, 1450 (2020).
202. CC, G. *et al.* Impaired NK-mediated regulation of T-cell activity in multiple sclerosis is reconstituted by IL-2 receptor modulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **113**, E2973–E2982 (2016).
203. Möller, M. J., Kammerer, R., Grunert, F. & von Kleist, S. Biliary glycoprotein (BGP) expression on T cells and on a natural-killer-cell sub-population. *Int. J. Cancer* **65**, 740–745 (1996).
204. R, Y. *et al.* Differential roles of microglia and monocytes in the inflamed central nervous system. *J. Exp. Med.* **211**, 1533–1549 (2014).
205. M, M. *et al.* Monocyte-derived HLA-G acts as a strong inhibitor of autologous CD4 T cell activation and is upregulated by interferon-beta in vitro and in vivo: rationale for the therapy of multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol.* **159**, 155–164 (2005).
206. Wong, K. L. *et al.* The three human monocyte subsets: implications for health and disease. *Immunol. Res.* 2012 531 **53**, 41–57 (2012).
207. MC, G. *et al.* Subsets of activated monocytes and markers of inflammation in incipient and progressed multiple sclerosis. *Immunol. Cell Biol.* **96**, 160–174 (2018).
208. KU, B. *et al.* The proinflammatory CD14+CD16+DR++ monocytes are a major source of TNF. *J. Immunol.* **168**, 3536–3542 (2002).
209. A, W. *et al.* Pivotal Role for CD16+ Monocytes in Immune Surveillance of the Central Nervous System. *J. Immunol.* **196**, 1558–1567 (2016).
210. D, C., SA, H., D, A. & AC, L. F. Expansion and preferential activation of the CD14(+)/CD16(+) monocyte subset during multiple sclerosis. *Immunol.*

- Cell Biol.* **92**, 509–517 (2014).
211. Schneider-Hohendorf, T. *et al.* VLA-4 blockade promotes differential routes into human CNS involving PSGL-1 rolling of T cells and MCAM-adhesion of TH17 cells. *J. Exp. Med.* **211**, 1833 (2014).
212. Dallari, S. *et al.* Upregulation of integrin expression on monocytes in multiple sclerosis patients treated with natalizumab. *J. Neuroimmunol.* **287**, 76–79 (2015).
213. Yu, Q. *et al.* CEACAM1 (CD66a) Promotes Human Monocyte Survival via a Phosphatidylinositol 3-Kinase- and AKT-dependent Pathway. *J. Biol. Chem.* **281**, 39179–39193 (2006).
214. Kammerer, R., Hahn, S., Singer, B. B., Luo, J. S. & Von Kleist, S. Biliary glycoprotein (CD66a), a cell adhesion molecule of the immunoglobulin superfamily, on human lymphocytes: Structure, expression and involvement in T cell activation. *Eur. J. Immunol.* (1998).
doi:10.1002/(SICI)1521-4141(199811)28:11<3664::AID-IMMU3664>3.0.CO;2-D
215. Nakajima, A. *et al.* Activation-Induced Expression of Carcinoembryonic Antigen-Cell Adhesion Molecule 1 Regulates Mouse T Lymphocyte Function. *J. Immunol.* **168**, 1028–1035 (2002).
216. B, A. & L, S. Nonclassical monocytes: are they the next therapeutic targets in multiple sclerosis? *Immunol. Cell Biol.* **96**, 125–127 (2018).
217. VK, H., JF, T. & SA, S. Biomarkers of multiple sclerosis: current findings. *Degener. Neurol. Neuromuscul. Dis.* **7**, 19–29 (2017).
218. F, D. A., NA, J. & WJ, B. Disease-modifying therapies for multiple sclerosis. *BMJ* **363**, (2018).
219. WJ, H., D, P. & DA, H. Biomarkers in multiple sclerosis. *Clin. Immunol.* **161**, 51–58 (2015).
220. A, G., M, C., MD, B. & S, M. Clinical, MRI, and CSF markers of disability

- progression in multiple sclerosis. *Dis. Markers* **35**, 687–699 (2013).
221. A, N. *et al.* Flow cytometric analysis of T cell/monocyte ratio in clinically isolated syndrome identifies patients at risk of rapid disease progression. *Mult. Scler.* **22**, 483–493 (2016).
222. MK, M. & VW, Y. Myeloid cells - targets of medication in multiple sclerosis. *Nat. Rev. Neurol.* **12**, 539–551 (2016).
223. HJ, F., TLK, F., HL, P., HM, R. & F, L. Glucocorticoid Therapy of Multiple Sclerosis Patients Induces Anti-inflammatory Polarization and Increased Chemotaxis of Monocytes. *Front. Immunol.* **10**, (2019).
224. CC, H., BI, G., R, B., T, C. & BC, H. The neutrophil-to-lymphocyte and monocyte-to-lymphocyte ratios are independently associated with neurological disability and brain atrophy in multiple sclerosis. *BMC Neurol.* **19**, (2019).
225. Kim, W. M., Huang, Y. H., Gandhi, A. & Blumberg, R. S. CEACAM1 structure and function in immunity and its therapeutic implications. *Seminars in Immunology* **42**, (2019).
226. Lipoprotein (a): Aus kardiologischer Sicht zu wenig beachtet? Available at: [https://www.aerzteblatt.de/archiv/218760/Lipoprotein-\(a\)-Aus-kardiologischer-Sicht-zu-wenig-beachtet](https://www.aerzteblatt.de/archiv/218760/Lipoprotein-(a)-Aus-kardiologischer-Sicht-zu-wenig-beachtet). (Accessed: 29th August 2021)

I. Abkürzungsverzeichnis

APC	Antigen-präsentierende Zelle (<i>antigen presenting cell</i>)
Bzw	beziehungsweise
BCR	B-Zell Rezeptor (<i>B cell receptor</i>)
Beff	Effektor-B-Zelle
Breg	regulatorische B-Zelle
CEACAM	<i>Carcinoembryonic-antigen-related cell adhesion molecule</i>
CI	Konfidenzintervall (<i>confidence interval</i>)
CIS	Klinisch isoliertes Syndrom (<i>clinically isolated syndrome</i>)
CSF	Zerebrospinalflüssigkeit (<i>Cerebrospinal fluid</i>)
CTL	zytotoxische T-Zelle
EAE	Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis
ED	Erstdiagnose
EDSS	<i>expanded disability status scale</i>
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
FBS	fetales Kälberserum (<i>fetal bovine serum</i>)
FMO	<i>fluorescence minus one</i>
FSC	<i>forward scatter</i>
GM-CSF	Granzulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor (<i>granulocyte macrophage colony stimulating factor</i>)
h	Stunden
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
Min	Minuten
	MRT Magnetresonanztomographie
MS	Multiple Sklerose
n	Anzahl
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen (<i>natural killer cells</i>)
NKLT-Zellen	<i>natural killer like t cells</i>
iNKT	invarieante Natürliche Killerzellen (<i>invariant natural killer t cells</i>)
p	P-Wert
PBMC	<i>peripheral blood mononuclear cells</i>
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i>
PPMS	primär progrediente Multiple Sklerose (<i>primary progressive multiple sclerosis</i>)
RRMS	schubförmig remittierende Multiple Sklerose (<i>relapsing-remitting multiple sclerosis</i>)
SD	Standardabweichung (<i>standard deviation</i>)
SPMS	sekundär progrediente Multiple Sklerose (<i>secondary progressive multiple sclerosis</i>)
SSC	<i>sideward scatter</i>
T _H	T-Helfer-Zelle
TIM-3	<i>T-cell immunoglobulin domain and mucin domain-3</i>
TNF- α	Tumornekrose-Faktor α
Teff	Effektor-T-Zelle

Treg
TSLR
u.a.
ZNS

regulatorische T-Zelle
time since last relapse
unter anderem
Zentrales Nervensystem

II. Abbildungsverzeichnisverzeichnis

Abbildung 1: Beispiel für ein Lymphozytengate anhand der Färbung von SAIII250614 am 25.06.2014.....	38
Abbildung 2: Beispiel der Dublettendiskriminierung anhand der Färbung von SAIII250614 am 25.06.2014.....	39
Abbildung 3: Beispiel für die Gatingstrategie der einzelnen Zelllinien.....	40
Abbildung 4: Übersicht über die Gating-Strategie des Panels CEACAM1-exprimierender Immunzellen	41
Abbildung 5: Übersicht über die Gating-Strategie für das Panel CEACAM1-exprimierender Immunzellen nach polyklonaler Stimulation	41
Abbildung 6: Übersicht über die Gating-Strategie für das Panel CEACAM1-exprimierender B- und T-Lymphozyten und deren Subpopulationen	42
Abbildung 7: Verteilung der B-Zellen sowie der Subpopulationen bei RRMS-Patienten und gesunden Probanden	46
Abbildung 8: Verteilung der T-Zellen und Subpopulationen bei RRMS-Patienten und gesunden Probanden	48
Abbildung 9: Verteilung der NK-Zellen und deren Subpopulationen bei RRMS-Patienten und gesunden Probanden	49
Abbildung 10: Verteilung der Monozyten und deren Subpopulationen bei RRMS-Patienten und gesunden Probanden	51
Abbildung 11: Verteilung der NKLT bei RRMS-Patienten und gesunden Probanden.....	52
Abbildung 12: Verteilung der B-Zellen bei RRMS-Patienten und gesunden Probanden nach polyklonaler Stimulation	53
Abbildung 13: Verteilung der T-Zellen bei RRMS-Patienten und gesunden Probanden nach polyklonaler Stimulation	54
Abbildung 14: Verteilung der NK-Zellen bei RRMS-Patienten und gesunden Probanden nach polyklonaler Stimulation	55
Abbildung 15: Verteilung der Monozyten bei RRMS-Patienten und gesunden Probanden nach polyklonaler Stimulation	56
Abbildung 16: Verteilung der NKLT bei RRMS-Patienten und gesunden Probanden nach polyklonaler Stimulation	57

Abbildung 17: Verteilung der CEACAM1 ⁺ B-Zellen vor und nach polyklonaler Stimulation sowie deren Subpopulationen bei RRMS-Patienten und gesunden Probanden.....	59
Abbildung 18: Verteilung der CEACAM1 ⁺ T-Zellen und deren Subpopulationen bei RRMS-Patienten und gesunden Probanden	61
Abbildung 19: Verteilung der CEACAM1 ⁺ NK-Zellen Subpopulationen sowie der CEACAM1 ⁺ NK-Zellen nach polyklonaler Stimulation bei RRMS-Patienten und gesunden Probanden	62
Abbildung 20: Verteilung der CEACAM1 ⁺ Monozyten Subpopulationen sowie der CEACAM1 ⁺ Monozyten nach polyklonaler Stimulation bei RRMS-Patienten und gesunden Probanden	64
Abbildung 21: Verteilung der CEACAM1 ⁺ NKLT vor und nach polyklonaler Stimulation bei RRMS-Patienten und gesunden Probanden	65
Abbildung 22: Verteilung von ausgewählten Immunzellen bei PPMS-Patienten und gesunden Probanden	67
Abbildung 23: Verteilung ausgewählter Immunzellen bei SPMS-Patienten und gesunden Probanden.....	69
Abbildung 24: Verteilung ausgewählter Immunzellen bei Schub-Patienten und gesunden Probanden.....	71
Abbildung 25: Verteilung ausgewählter Immunzellen bei CIS-Patienten und gesunden Probanden.....	72

III. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Erläuterung der Substanzklassen mit ihren Wirkeigenschaften in alphabetischer Reihenfolge.....	12
Tabelle 2: Therapieoptionen der MS entsprechend der aktuellen S2k-Leitlinie von 2021	14
Tabelle 3: Übersicht über die Probanden	29
Tabelle 4: Tabellarische Übersicht über die verwendeten Antikörper	30
Tabelle 5: Übersicht über das Panel CEACAM1-exprimierender Immunzellen sowie ihrer Kontrollfärbungen.....	33
Tabelle 6: Übersicht über das Panel für CEACAM1-exprimierende B- und-T-Lymphozyten sowie die Kontrollfärbungen	34
Tabelle 7: Übersicht über das Panel nach polyklonaler Stimulation sowie die Kontrollfärbungen.....	34
Tabelle 8: Settingkontrolle für die Färbungen vom 24.07.2014 bis 14.08.2014	36

IV. Danksagung

Ich bedanke mich vielmals bei Frau Professor Dr. Stefanie Kürten für die Vermittlung des Themas sowie die Ermöglichung der Anfertigung dieser Dissertation.

Daneben gebührt auch meinem Betreuer Dr. Damiano Rovituro mein Dank für die Geduld bei der Einarbeitung im Labor.

Ganz besonders möchte ich mich bei meiner Familie und meinen Freunden für all die Unterstützung bedanken. Bei meinen Eltern, die mir das Studium überhaupt erst ermöglicht haben und in jeder Lebenssituation für mich da sind. Bei meinen Großeltern für die bedingungslose Liebe und den unerschütterlichen Glauben an mich. Bei meinen Geschwistern für die tiefe Verbundenheit trotz räumlicher Distanz. Bei meinen Ersatzeltern für das Schaffen einer zweiten Heimat. Bei meinen Freunden für die tägliche Motivation und Unterstützung. Und bei Daniel für das Ertragen jeder Laune, das Ermöglichen kurzer Erholungsphasen und den Mut, den Alltag mit mir zu bestreiten.