

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

Vorstand: Prof. Dr. med. Süleyman Ergün

**Der Effekt von Fingolimod auf die B-Zell-Distribution und -Aggregation in
einem chronischen Mausmodell der Multiplen Sklerose**

Inauguraldissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Kathrin Bail

aus Bamberg

Würzburg, Juni 2019

Referentin: Prof. Dr. med. Stefanie Kürten

Korreferent/in: Prof. Dr. med. Martina Prelog

Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 04.04.2022

Die Promovendin ist Ärztin.

Teilergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden veröffentlicht in

**Bail K, Notz Q, Rovituso DM, Schampel A, Wunsch M, Koeniger T, Schropp V, ...
Kuerten S (2017). *Differential effects of FTY720 on the B cell compartment in a mouse
model of multiple sclerosis*. J neuroinflammation 14(1), 148.**

Die Publikation basiert auf den Ergebnissen dieser Dissertation. Mein Eigenanteil an der Publikation bezieht sich auf die Erhebung aller Daten der chronischen Mauskohorten, die Durchführung der Durchflusszytometrieexperimente sowie des B-Zell-Aggregations-Assays. Der Manuskriptentwurf wurde in Zusammenarbeit mit Quirin Notz geschrieben, mit dem ich die Erstautorenschaft für die oben genannte Publikation teile.

Abstract

Background

Multiple sclerosis (MS) has remained a partially understood autoimmune disease of the central nervous system (CNS). Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) triggered in animals is commonly used to study the pathogenesis of MS and to establish therapeutic agents. MP4-induced EAE represents a murine model of MS that allows targeted research on B cells, which have been a much-discussed protagonist in MS pathogenesis. This study investigates the effect of the S1P₁ receptor modulator FTY720 (fingolimod) on the autoreactive B cell response as well as on the B cell distribution both in the periphery and the CNS.

Methods

Oral FTY720 application for a duration of 30 days was initiated in MP4-immunized mice 50 days after EAE onset. After immunization, clinical symptoms were monitored daily. The MP4-specific B cell and antibody response were studied using ELISPOT and ELISA. The distribution of peripheral B and T cells in the blood as well as B cell subsets in the spleen was evaluated by flow cytometry. The formation of B cell aggregates in the CNS and their development into tertiary lymphoid organs (TLOs) was studied by histology and immunohistochemistry.

Results

In this study, FTY720 did not significantly alter clinical EAE. Peripheral T cell numbers in the blood appeared to be significantly reduced after FTY720 treatment while the percentage of B cells were only slightly diminished. Evaluation of the B cell subsets in the spleen revealed a significantly higher percentage of B220⁺ B cells in FTY720-treated mice, whereas other B cell subtypes remained unaffected. Furthermore, there was no effect on already developed B cell aggregates in the CNS after FTY720

application, however treatment seemed to affect the evolution of B cell aggregates into TLOs.

Conclusions

This study implies differential effects of FTY720 treatment on the B cell compartment in a chronic B cell-dependent model of MS.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Multiple Sklerose	1
1.1.1. Ätiologie.....	1
1.1.2. Klinischer Verlauf.....	3
1.1.3. Pathogenese und Pathologie	4
1.1.4. Pathogenetische Rolle der B-Zellen	6
1.2. Tertiär lymphatische Organe	7
1.3. EAE als Tiermodell der MS	8
1.3.1. MP4-EAE-Modell	9
1.3.2. Lymphatisches Gewebe in der EAE.....	10
1.4. Fingolimod	11
1.4.1. Wirkungsmechanismus	12
1.4.2. Effekte in der Behandlung der MS.....	13
1.5. Versuchsaufbau und Zielsetzung	14
2. Material und Methoden	15
2.1. Mäuse	15
2.2. Induktion und klinische Evaluation der EAE	16
2.3. Kohorteneinteilung und Medikamentenapplikation	16
2.4. Gewebsentnahme	18
2.5. B cell enzyme-linked immunospot assay (ELISpot)	18
2.6. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)	19
2.7. Durchflusszytometrie der CD4⁺-T- und CD19⁺-B-Zellen aus dem peripheren Blut	19
2.8. Durchflusszytometrie der B-Zell-Subsets aus der Milz	21
2.9. Immunhistochemische Analyse	22
2.10. Statistische Auswertung	24
3. Ergebnisse	25
3.1. Entwicklung des klinischen Verlaufs	25
3.2. Auswirkung von Fingolimod auf die B-Zell-Funktion und Antikörperproduktion	26
3.3. Kontrolle des Therapieerfolgs mittels Durchflusszytometrie	28

3.4. Effekte von Fingolimod auf die Migration von B-Zell-Subsets aus sekundär lymphatischen Organen	29
3.5. Immunhistochemische Auswertung.....	31
4. Diskussion	34
5. Zusammenfassung.....	41
6. Literaturverzeichnis	43
7. Abbildungsverzeichnis.....	50
8. Tabellenverzeichnis.....	50
Danksagung	
Lebenslauf	

Abkürzungsverzeichnis

B6	C57BL/6
BAF312	Siponimod
BHS	Blut-Hirn-Schranke
CCR7	Chemokin-Rezeptor 7
CD	Cluster of Differentiation
CXCL13	Chemokin Ligand 13
DAB	Diaminobenzidin
EAE	Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis
EBV	Epstein-Barr-Virus
EDSS	Expanded Disability Status Scale
EKG	Elektrokardiogramm
FBS	Fetales Kälberserum
FDZ	Follikulär dendritische Zelle
FDC-SP	Von follikulär dendritischen Zellen sezerniertes Protein
FMO	Fluorescent minus one
FTY720	Fingolimod
FVS	Fixable Viability Stain
HE	Hämatoxylin und Eosin
HEV	Hochendotheliale Venole
HIV	Humanes Immunodefizienz Virus
HLA	Humanes Leukozytenantigen

IFA	Inkomplettes Freund-Adjuvans
IFN- β	Interferon- β
IFN- γ	Interferon- γ
Ig	Immunglobulin
IVC	Individuell ventilierte Käfige
KFA	Komplettes Freund-Adjuvans
KG	Körpergewicht
LFA-1	Lymphozyten Funktion-assoziiertes Antigen 1
LPS	Lipopolysaccharid
MBP	Basisches Myelinprotein
MOG	Myelin Oligodendrozyten Glykoprotein
MP4	MBP-PLP Fusionsprotein
MRT	Magnetresonanztomographie
MS	Multiple Sklerose
MSFC	Multiple Sclerosis Functional Composite
NK-Zellen	Natürliche Killer-Zellen
OKB	Oligoklonale Banden
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PFA	Paraformaldehyd
PLO	Primär lymphatisches Organ
PLP	Proteolipid Protein
PNAd	Peripheral node addressin
PPMS	Primär-progrediente MS

RRMS	Schubförmig-remittierende MS
S1P	Sphingosin-1-Phosphat
S1PR	Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptor
S1P ₁₋₅ R	Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptor Subtypen 1-5
SLO	Sekundär lymphatisches Organ
SPMS	Sekundär progrediente MS
TLO	Tertiär lymphatisches Organ
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
ZNS	Zentrales Nervensystem

1. Einleitung

1.1. Multiple Sklerose

Die Multiple Sklerose (MS) ist als entzündliche Erkrankung des zentralen Nervensystems (ZNS) definiert, die zur Demyelinisierung und Zerstörung von Neuronen führt [1]. Sie tritt als schubförmig oder chronisch progredient verlaufende Krankheit auf und ist u. a. durch einseitigen Visusverlust, Schwäche der Extremitäten, Ataxie oder Parästhesien gekennzeichnet [2]. Nach derzeitigem Erkenntnisstand ist hierfür eine noch nicht vollständig verstandene Autoimmunreaktion ursächlich. In der Bundesrepublik Deutschland sind rund 200 000 bis 220 000 Patienten an der *Enzephalomyelitis disseminata* erkrankt und sie tritt hierzulande mit einer Prävalenz von 0,3% sowie einer Inzidenz von 13 : 100 000 Einwohnern auf [3]. Die Erkrankung manifestiert sich in der überwiegenden Zahl der Fälle zwischen dem 20. und 40. Lebensjahr und ist somit von enormer sozioökonomischer Bedeutung. Wie bei vielen anderen Autoimmunerkrankungen herrscht auch bei der MS eine Gynäkotropie vor, sodass aktuell eine Geschlechterrate von 2,3:1 (Frauen : Männer) vorliegt [2, 3]. Weiterhin ist eine geographisch bedingte Prävalenz beschrieben, die zu den Polen jeweils zunimmt, während MS-Erkrankungen um den Äquator selten auftreten [4]. Die Regionen mit dem höchsten Risiko sind Nord-, Zentral- und Osteuropa sowie die nördlichen Abschnitte von Amerika und Neuseeland [5, 6].

1.1.1. Ätiologie

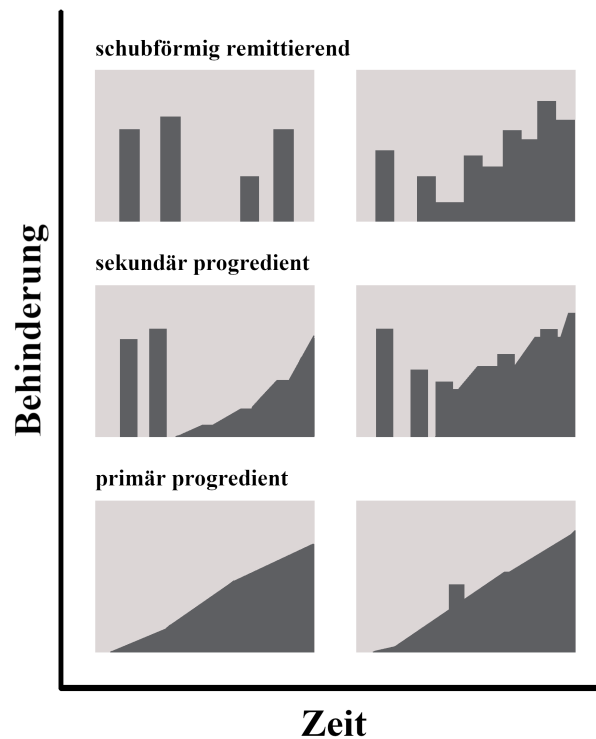
Obwohl die Erkrankung erstmals vor etwas mehr als 150 Jahren von Jean-Martin Charcot als *sclérose en plaques* beschrieben wurde [7], ist die Ätiologie der MS bis heute ungeklärt. Inzwischen gilt eine genetische Prädisposition als gesichert, jedoch handelt es sich hierbei vielmehr um ein polygenes Geschehen als um einen monogenetischen Erbgang [3, 5, 6]. Diese Überlegung wird beispielsweise durch die Konkordanzrate von 31% bei eineiigen Zwillingen gestützt, während das Erkrankungsrisiko bei einem betroffenen Verwandten ersten Grades 5% beträgt. Genetische Untersuchungen konnten lediglich DNA-Sequenzen mit einer erhöhten

Wahrscheinlichkeit für den Krankheitsausbruch feststellen, die jedoch nicht mit völliger Sicherheit kausal mit der MS verknüpft werden können. Als Beispiele für diese Funde sind v. a. die Gene des *human leucocyte antigen*-Komplexes (HLA) und insbesondere das HLA-DRB1*1501-Allel zu nennen, das mittlerweile als Hauptrisikofaktor gilt [5, 6]. Zusätzlich werden verschiedene Hypothesen diskutiert, u. a. Einflüsse aus der Umwelt als auslösende Faktoren. Diese Annahme basiert zum einen auf Migrationsstudien, die zeigten, dass die Exposition gegenüber pathogenen Umweltfaktoren vor dem 15. Lebensjahr für eine spätere Manifestation der MS entscheidend ist, während Migranten, die nach dem 15. Lebensjahr in ein Hochrisikogebiet, wie Europa oder Kanada, auswanderten, ihr vorheriges Erkrankungsrisiko beibehielten [3]. Eine prominente Hypothese bleibt weiterhin der Einfluss von humanpathogenen Viren, insbesondere des Epstein-Barr-Virus (EBV), das zur infektiösen Mononukleose führt. Die nahezu hundertprozentige Seropositivität unter MS-Patienten, eine erhöhte Erkrankungswahrscheinlichkeit nach durchstandener klinisch apparter infektiöser Mononukleose und eine intrathekale Antikörperproduktion gegen EBV-assoziierte Proteine stützen diese Theorie [8]. Ferner gilt Vitamin D als ein weiterer möglicher Akteur in der Ätiologie der MS. In Studien konnten diverse immunmodulatorische Effekte von Vitamin D u. a. auf regulatorische T-Zellen und Zytokine nachgewiesen werden, die zu der These führten, dass ein Mangel zu einem erhöhten Risiko für MS beiträgt [9]. Zusätzlich stehen die oben genannte geographische Prävalenz und damit die Exposition gegenüber Sonnenlicht unvermeidlich im Zusammenhang mit Vitamin D. Untersuchungen zeigten eine Abhängigkeit zwischen dem Vitamin D-Spiegel im Blut und der Erkrankungswahrscheinlichkeit: In verschiedenen Populationen konnte ein niedriger Serum-Vitamin-D-Spiegel mit einem deutlich erhöhten Erkrankungspotenzial für die MS assoziiert werden [3, 9]. Weitere Theorien beschäftigen sich mit dem möglichen Einfluss von Nikotinkonsum. In Studien zeigte sich zwar nur eine leichte Assoziation zwischen dem Tabakkonsum und der MS, allerdings ließ sich in Metaanalysen eine dosisabhängige Wirkung nachweisen, da das Erkrankungsrisiko mit der Anzahl der gerauchten Zigaretten anstieg [10]. Die Auswirkung der Ernährung mit Einbezug des enterischen Nervensystems und ein möglicher Zusammenhang mit Adipositas sind ebenfalls in den letzten Jahren in den Fokus der Forschung gerückt [11-13].

Zusammenfassend wird nach aktuellem Wissenstand von einem Zusammenspiel aus genetischer Prädisposition und multiplen Umwelteinflüssen ausgegangen.

1.1.2. Klinischer Verlauf

Der klinische Verlauf der MS beginnt in der überwiegenden Zahl der Fälle mit der schubförmig-remittierenden Form (RRMS), welche vor allem durch die Inflammation im ZNS gekennzeichnet ist. Ein Schub gilt als das plötzliche Auftreten von vorher nicht präsent gewesenen neurologischen Defiziten, die über 24 Stunden (h) persistieren und nicht im Rahmen von Infekten oder durch eine Änderung der Körpertemperatur erklärt werden können [14]. Weiterhin muss ein Mindestabstand von 30 Tagen zum letzten Schubereignis bestehen. Ein Abklingen der Symptome ist innerhalb von sechs bis acht Wochen zu erwarten, jedoch verläuft die Krankheit in ungefähr 40% der Fälle progredient [5]. Mit zunehmender Schubrate wird eine vollständige Remission nicht mehr erreicht und die Neurodegeneration überholt die inflammatorische Komponente. Dieses Stadium ist als sekundär-progrediente MS (SPMS) definiert. Bei etwa 10% aller MS-Patienten ist die Erkrankung von Beginn an durch einen ständig fortschreitenden Verlauf mit oder ohne aufgesetzte Schübe gekennzeichnet und wird als primär-progrediente MS (PPMS) bezeichnet. Die hier entstehenden neurodegenerativen Schäden werden nicht ausreichend durch remyelinisierende Prozesse regeneriert und die chronisch-inflammatorische Komponente erscheint aggressiver als in der RRMS [15]. Die klinischen Verlaufsarten der MS sind in Abbildung 1 schematisch aufgezeigt.



(Eigene Darstellung in Anlehnung an Stangel 2018, S. 12)

Abbildung 1: Krankheitsverläufe der MS

Die häufigste Manifestation der MS als schubförmig remittierender Krankheitsprozess (RRMS) ist durch Schubereignisse mit anschließend vollständiger oder partieller Remission gekennzeichnet. Aus diesem Krankheitsverlauf ist ein Übergang in die sekundär progrediente verlaufende MS (SPMS) möglich, hierbei überwiegt die Neurodegeneration und es folgt eine fortschreitende Zunahme der Behinderung, die mit oder ohne aufgesetzte Schübe ablaufen kann. Etwa 10% aller MS-Patienten leiden seit dem Krankheitsbeginn an einem primär progredienten Verlauf (PPMS), der selten aufgesetzte Schübe aufweist.

1.1.3. Pathogenese und Pathologie

Für die pathogenetische Entstehung der MS gibt es zwei Theorien, die den Ursprung der Krankheit entweder innerhalb oder außerhalb des ZNS festlegen (*inside-out-* bzw. *outside-in-Hypothese*) [16]. Da Letztere die vorherrschende wissenschaftliche Meinung widerspiegelt und aufgrund von Tiermodellen hinreichend erforscht wurde, wird sie im

Folgenden näher erörtert. Den Ausgangspunkt bilden antigenpräsentierende Zellen im Blut oder in sekundär lymphatischen Organen, die autoreaktive CD4⁺-T-Zellen aktivieren [17, 18]. Für diese lymphozytäre Aktivierung werden verschiedene Hypothesen diskutiert [1, 17]: Durch molekulare Mimikry könnten T-Zellen auf körpereigene Antigene kreuzreagieren und somit Myelinscheidenproteine als ihr Angriffsziel identifizieren. Eine zweite Möglichkeit wird im Bystander-Effekt beschrieben. Hier erfolgt die Aktivierung von autoreaktiven Lymphozyten über ein unspezifisches inflammatorisches Milieu, das zum Beispiel während entzündlichen Erkrankungen herrscht. Diese Theorien schließen sich gegenseitig jedoch nicht aus, weshalb ein Zusammenspiel durchaus denkbar ist. Beide münden in die Transmigration von autoreaktiven, aktivierten CD4⁺-T-Zellen, Makrophagen und B-Zellen über die Blut-Hirn-Schranke (BHS) in das ZNS [3]. An dieser Stelle sind insbesondere IL-17-produzierende CD4⁺-T-Zellen, sogenannte T_H17-Zellen, erwähnenswert. Diese erleichtern die Transmigration durch die Schädigung der BHS und sind in den inflammatorischen Herden des ZNS in großer Zahl nachweisbar [19]. Jedoch spielt auch das angeborene Immunsystem eine elementare Rolle in der Pathogenese der MS. So werden von Mastzellen und natürliche Killer-Zellen (NK-Zellen) sezernierte proinflammatorische Zytokine, wie Interferon- γ (IFN- γ) und Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), benötigt, um Mikroglia und Astrozyten im ZNS zu aktivieren und weitere Immunzellen, insbesondere CD8⁺-T-, B- und Mastzellen, aus dem peripheren Blut zu rekrutieren [17, 19]. Autoreaktive CD4⁺-T-Zellen werden, nachdem sie ins ZNS transmigriert sind, durch Gewebsmakrophagen sowie Astrozyten erneut erregt und reagieren dann insbesondere auf die Myelinscheidenproteine basisches Myelinprotein (MBP), Proteolipid Protein (PLP) und Myelin Oligodendrozyten Glykoprotein (MOG) als Zielantigene [1]. Während die Rekrutierung und Aktivierung des Immunsystems hauptsächlich durch CD4⁺-T-Zellen dirigiert wird, ist ein Zusammenspiel von direkter und Antikörper-vermittelter Komplementaktivierung und Phagozytose sowie zytotoxische CD8⁺-T-Zellen für die Demyelinisierung und axonale Schädigung ursächlich [6, 18]. Pathologisch führt dies im gesamten ZNS zu perivaskulären demyelinisierten, inflammatorischen Läsionen, die von einem parenchymalem Ödem umgeben sind, die insbesondere in der weißen Substanz in der Magnetresonanztomographie (MRT) prominent [2, 19]. Während akute MS-Herde

bildmorphologisch diffus erscheinen, sind chronische schärfer vom umliegenden Parenchym abgrenzbar [20]. Hypertrophierende Astrozyten versuchen im Krankheitsverlauf die axonalen Schäden zu beheben und es kommt dadurch sekundär zur narbigen Gliose [19, 20]. In einigen Läsionen kann es durch Rekrutierung von oligodendrozytären Progenitorzellen zur partiellen Remyelinisierung kommen [21].

1.1.4. Pathogenetische Rolle der B-Zellen

Die MS wurde primär als T-Zell-vermittelte Krankheit verstanden. In den letzten Jahren ist die Rolle der B-Zelle in der Pathogenese jedoch in den Fokus der Forschung gerückt. Dies liegt zum einen am Therapieerfolg mit B-Zell-depletierenden monoklonalen Antikörpern, wie Rituximab und dessen Nachfolger Ocrelizumab, die beide selektiv auf CD20⁺-B-Zellen abzielen. Es konnte anhand von Patienten mit RRMS gezeigt werden, dass bereits ein Zyklus mit Rituximab in der MRT nachweisbare Gadolinium-aufnehmende Läsionen im Vergleich zur Kontrollgruppe reduziert und den klinischen Verlauf positiv beeinflusst [22, 23]. Der humanisierte monoklonale Antikörper Ocrelizumab bindet ebenfalls an das B-Zell-Oberflächenprotein CD20, allerdings nutzt er ein anderes Epitop als sein Vorgänger Rituximab. Ocrelizumab erwies sich ebenfalls äußerst wirksam in der Behandlung der RRMS: Sowohl eine Reduktion der aktiven inflammatorischen Läsionen im MRT, als auch eine reduzierte Rückfallrate im Vergleich zur Behandlung mit IFN- β führten zur Zulassung in der Behandlung der RRMS [24]. Darüber hinaus gelang mit Ocrelizumab ein Durchbruch in der Behandlung der PPMS, für die zuvor keine krankheitsbeeinflussenden Medikamente zur Verfügung standen. Der humanisierte Antikörper erzielte eine Retardation des Krankheitsprogresses und wirkte im Vergleich zur Placebo-kontrollierten Gruppe protektiv gegen Hirnatrophie [25]. Ein weiteres therapeutisches Mittel für MS-Patienten ist die Plasmapherese, die bei Steroid-refraktären Schubereignissen eingesetzt wird [14, 26] und sich insbesondere bei Patienten mit durch Komplement- und Ig-Ablagerungen verursachter Demyelinisierung effektiv zeigte [27]. Diese Läsionsart ist gleichzeitig die am häufigsten gefundene Form bei MS-Patienten [28]. Als weiterer immunologischer Anhaltspunkt können B-Zellen im peripheren Blut von erkrankten Individuen aufgezählt werden, die auf ZNS-Antigene reagierten und in gesunden Kontrollen nicht

nachweisbar waren [29]. Darüber hinaus fanden sich klonal selektionierte Plasmazellen, die Antikörper gegen Myelinscheidenproteine produzierten im Liquor von MS-Patienten [30]. In diesem Zusammenhang sind auch oligoklonalen Banden (OKB) zu nennen. Diese sind Ausdruck einer intrathekalen Ig-Synthese durch Plasmazellen und bei über 95% aller MS-Patienten nachweisbar [31-33]. Sie sind auch heute noch ein diagnostischer und prognostisch bedeutsamer Marker [14]. In der Zusammenschau der oben genannten Aspekte ist die Rolle der B-Zelle in der Pathogenese der MS zentraler als früher vermutet und wird daher auch vermehrt in der Erforschung von Therapieoptionen bedacht [34-36].

1.2. Tertiär lymphatische Organe

Primär lymphatische Organe (PLOs), wie Knochenmark und Thymus, sowie sekundär lymphatische Organe (SLOs), die sich aus Milz, Lymphknoten und den Peyer Plaques zusammensetzen, sind etablierte und erforschte Bestandteile des Immunsystems. Das restliche lymphatische System, also Lymphgefäße und deren Zusammenflüsse, wurde als tertiär lymphatisches Gewebe beschrieben, das im Normalfall kaum Merkmale von lymphatischen Organen aufweist [37]. Durch chronisch-inflammatorische Prozesse im Körper können sich diese lymphatischen Charakteristika jedoch ausbilden und werden dann als tertiär lymphatische Organe (TLOs) bezeichnet [37-39]. Zunächst konnten die TLOs v. a. mit Autoimmunerkrankungen, wie beispielsweise der rheumatoiden Arthritis [40-42], dem Sjörgen-Syndrom [43, 44] und der Hashimoto-Thyreoiditis [45, 46] assoziiert werden. Bereits 1978 gelang erstmals der histopathologische Nachweis von lymphoidem Gewebe und perivaskulären Ansammlungen von Plasmazellen, Makrophagen und Lymphozyten bei wenigen MS-erkrankten Personen [47]. Jedoch führte der Nachweis von meningealem Lymphknoten-artigem Gewebe zunächst in einem Mausmodell der RRMS [48] über 20 Jahre später zur Entdeckung von Follikeln in den Meningen von Patienten mit SPMS [49]. Die hierfür von Serafini *et al.* immunhistochemisch untersuchten *post mortem* Präparate zeigten dichte Ansammlungen von B-, T- und Plasmazellen, sowie von follikulär dendritischen Zellen (FDZ) und CXCL13, das als Chemoattraktant für B-Lymphozyten fungiert. Diese ektopen lymphatischen Follikel fanden sich in direkter Nachbarschaft zu

inflammatorisch veränderten Blutgefäßen und wiesen die Aspekte eines folliculären Keimzentrums auf, u. a. proliferierende B-Zellen und ein Netzwerk aus FDZ. Jedoch konnte hierbei kein Marker für hochendotheliale Venolen (HEV) als wichtiges Charakteristikum von SLOs nachgewiesen werden. Diese in wenigen Individuen gezeigten Befunde konnten in einer größeren Anzahl an ZNS-Präparaten von SPMS-Patienten nachgewiesen und in dieser Studie mit dem klinischen Verlauf sowie dem Grad an Gewebsdegeneration in Verbindung gebracht werden [50, 51]. Die Patientengruppe mit Follikel-Nachweis zeichnete sich durch einen frühen Krankheitsbeginn sowie einen hohen Behinderungsgrad zu Beginn der MS aus und wies pathologisch im Vergleich zur Kontrollgruppe eine schwergradige Gewebsdestruktion auf. Diese und weitere Befunde stärkten zum einen die Bedeutung der B-Zelle in der Immunpathogenese der MS und stellen zum anderen einen potenziellen Therapieansatzpunkt dar [52, 53].

1.3. EAE als Tiermodell der MS

Bereits 1947 konnte gezeigt werden, dass bei Rhesusaffen durch die Verabreichung von ZNS-Antigenen in Kombination mit komplettem Freund-Adjuvans (KFA) eine akute demyelinisierende Enzephalomyelitis aktiv ausgelöst werden kann [54]. Die Weiterentwicklung dieser Erkenntnis führte zur Etablierung der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE) bei kleineren Nagetieren, wie Meerschweinchen [55, 56] und Mäusen [57]. Darüber hinaus konnte durch die Zugabe von Pertussis-Antigen zu der Kombination aus ZNS-Antigen und KFA eine rapide Beschleunigung des Krankheitsprozesses erreicht werden [58]. Mausmodelle der EAE wurden aufgrund ihrer Praktikabilität weiter erforscht, wodurch heute insbesondere MOG, MBP und PLP als auslösende Antigene etabliert sind [59, 60]. Diese EAE-Formen spielen seitdem eine zentrale Rolle im Verständnis der Immunpathogenese der MS [61]. So konnte der grundlegende Einfluss von T-Lymphozyten in der Erkrankung durch den Transfer von Antigen-spezifischen T-Zellen aus aktiv immunisierten in gesunde Tiere demonstriert werden [62, 63]. Jedoch war es nicht nur möglich, die pathogenetischen Mechanismen der MS anhand von EAE-Modellen zu erforschen. Wertvolle Erkenntnisse in Bezug auf mögliche therapeutische Optionen für MS-

Patienten sind der Erprobung in Mausmodellen zu verdanken [64-67]. An dieser Stelle ist insbesondere Natalizumab (Handelsname TYSABRI®; Biogen), ein monoklonaler Antikörper gegen das Zelladhäsionsmolekül Integrin- α_4 , zu nennen, das den Sprung von der Erprobung im Tiermodell in die Behandlung der MS schaffte und als eines der ersten Medikamente im Jahr 2006 in Deutschland die Zulassung für die Therapie von hochaktiven Verläufen der RRMS erhielt [68-70]. Allerdings bestehen hinsichtlich der Tiermodelle auch Limitationen. Zum einen wird die EAE künstlich durch die Immunisierung gegen ein bekanntes Antigen provoziert, während das auslösende Agens der MS unbekannt bleibt [71]. Des Weiteren ist aufgrund der unterschiedlichen Verlaufsarten nicht jedes EAE-Modell zur Erforschung aller Aspekte der MS geeignet [66, 72]. Insbesondere die Rolle der B-Zelle in der Pathogenese der Erkrankung ist in den bisher etablierten Modellen nicht ausreichend untersucht worden [73].

1.3.1. MP4-EAE-Modell

MBP stellt ungefähr 30-40% aller Myelinscheidenproteine dar, während PLP mit 50% den größten Anteil bildet [1]. Obwohl beide Antigene in einigen Mausmodellen durch aktive Immunisierung zur EAE geführt haben, blieben häufigere Mausstämme, wie C57BL/6-Mäuse (B6), gegenüber beiden resistent [74, 75]. Da *Knock-out*- oder *Knock-in*-Stämme häufig aus dem B6-Hintergrund generiert werden, ist diese Mausart von besonderem wissenschaftlichen Interesse. Somit war es ein Novum, als Kürten *et al.* 2006 erfolgreich ein Fusionsprotein aus MBP und PLP, genannt MP4, zur Induktion einer B- und CD8⁺-T-Zell-abhängigen EAE in der B6-Maus einsetzten [76]. Durch ein Protokoll bestehend aus dem MP4-Protein, KFA und Pertussis-Toxin konnte ein Krankheitsbeginn nach spätestens zwei Wochen mit einem chronischen Verlauf sowie einer inflammatorisch-demyelinisierenden Histopathologie erzielt werden. Das Alleinstellungsmerkmal ist jedoch eine nicht nur von CD4⁺-T-Zellen, sondern insbesondere von CD8⁺-T- und v. a. B-Zellen vermittelte Pathogenese. Ein Vergleich mit der MOG:35-55-EAE zeigte eine unterschiedliche Topographie der inflammatorischen Herde sowie eine chronische Demyelinisierung in der MP4-EAE und es konnte ein Zusammenhang zwischen der Läsionsgröße und -anzahl mit dem klinischen Schweregrad hergestellt werden [77]. Insgesamt stellt das MP4-EAE-Modell

eine bedeutungsvolle Chance für weitere therapeutische Evaluationen und für die Erforschung der pathogenetischen Bedeutung der B-Zelle dar.

1.3.2. *Lymphatisches Gewebe in der EAE*

Die Detektion oben genannter TLOs und deren potenzielle Funktion in der Pathogenese der MS sowie als denkbarer therapeutische Angriffspunkt führte zur Erforschung dieser Strukturen in der EAE. B-Lymphozyten nehmen eine elementare Rolle bei der Verarbeitung und Präsentation von Antigenen gegenüber T-Zellen ein und waren weiterhin als zentraler Bestandteil in tertiär lymphatischen Geweben von MS-Patienten nachweisbar [49]. Eine gravierende Problematik lag allerdings zunächst in der limitierten Verfügbarkeit von B-Zell-abhängigen EAE-Modellen begründet. Eine PLP-induzierte EAE in SJL-Mäusen stellte das erste Mausmodell dar, in dem TLOs, wenn auch nur in einer geringen Anzahl, detektiert werden konnten [48, 78]. Im Standard-Protokoll der MOG:35-55-EAE gibt es noch keine sicheren Beweise für die Ausbildung von ektopem follikulären Gewebe, jedoch konnten durch den Transfer von MOG-spezifischen T_H17-Zellen in gesunde B6 TLOs in hoher Frequenz nachgewiesen werden [53, 79]. TLOs konnten ferner im chronischen Verlauf des B-Zell-abhängigen MP4-Modells der EAE nach einer Krankheitsdauer von 30-57 Tagen (d) ermittelt werden [80]. Kürten *et al.* diskutierten einen potenziellen Einfluss dieser Strukturen auf den Krankheitsverlauf sowie die damit verbundenen inflammatorischen Prozesse im ZNS. Eine zentrale Funktion von TLOs könnte T-Zell-, aber auch B-Zell-Priming auf Antigene des ZNS sein. Diese These wird durch Funde von Kürten *et al.* gestützt, die sowohl MP4- als auch MOG-spezifische T-Zellen aus dem ZNS isolierten, während peripheres Priming durch den fehlen den Nachweis von MOG-spezifischen T-Lymphozyten aus SLOs ausgeschlossen werden konnte [80]. Auch bei B-Lymphozyten konnte ein ähnliches Phänomen beobachtet werden: Im MP4-EAE-Modell wurden ZNS-ansässige B-Zellen detektiert, die auf MOG und Bestandteile des neuronalen Zytoskeletts reagierten [81]. Diese Antigene weisen keine strukturelle Ähnlichkeit zum für die Immunisierung genutzten MP4 auf, weshalb diese B-Zell-Spezifität im Rahmen des *epitope spreading* gesehen werden kann. Dieser Prozess wird als Ausbildung einer Immunreaktion auf Epitope definiert, die sich strukturell vom primären Antigen

unterscheiden, welches die initiale Immunantwort und damit die zugrundeliegende Erkrankung auslöste [82-84]. Wie bereits erörtert sind T_H17-Zellen ein einflussreicher Mediator in der Pathogenese der MS. Ihre Bedeutung in der EAE zeigte sich nicht nur durch die Auslösung der B-Zell-Aggregatbildung im ZNS durch deren Transfer in gesunde Mäuse. Darüber hinaus exprimierten diese T_H17-Zellen bestimmte Marker, die sonst mit folliculären T-Helfer-Zellen in Keimzentren von SLOs assoziiert sind [79]. Ob TLOs an der Reifung und Differenzierung von regulatorischen B- und T-Zellen beteiligt sind, ist weiterhin Gegenstand der Forschung.

1.4. Fingolimod

Als Fingolimod (FTY720, Handelsname Gilenya®; Novartis) 2011 in der EU zur Behandlung der RRMS zugelassen wurde, stellte dies einen erheblichen Fortschritt in der MS-Therapie dar. Die bis zu diesem Zeitpunkt verfügbaren Medikamente, wie Interferon- β und der monoklonale Antikörper Natalizumab, zeichneten sich nicht nur durch eine für die Patienten unangenehme Verabreichungsart aus, da Ersteres subkutan oder sogar intramuskulär und Letzteres als intravenöse Infusion appliziert werden muss. Darüber hinaus verfügen beide Medikamente über ein ungünstiges Nebenwirkungsprofil. Unter der Interferon- β -Therapie treten gehäuft Reaktionen an der Einstichstelle auf und Patienten leiden unter grippeartigen Symptomen. Zudem gibt es auch Berichte über Transaminasenerhöhungen, depressive Symptome und Zytopenien [85, 86]. Natalizumab kann zu Infusionsreaktionen führen, jedoch ist das Medikament durch die Gefahr der progressiven multifokalen Leukenzephalopathie (PML), einer schwerwiegenden, teils letalen demyelinisierenden Erkrankung, welche durch das humane JC-Virus ausgelöst wird, in seinem therapeutischen Einsatz limitiert [69, 87]. Vor diesem Hintergrund ist ersichtlich, dass FTY720 einen großen Fortschritt in der Behandlung der RRMS darstellte. Ein erstmals oral verfügbares Medikament, das ein vergleichsweise mildes Nebenwirkungsspektrum aufweist, hat gute Voraussetzungen für eine hervorragende Patientencompliance, weshalb es als Erstlinientherapeutikum eingesetzt wird [14]. Unter der zugelassenen täglichen Dosierung von 0,5 mg traten bei erstmaliger Applikation insbesondere bradykarde Herzrhythmusstörungen und im weiteren Verlauf asymptomatische und reversible Transaminasenerhöhungen,

leichtgradige Blutdruckerhöhung sowie sehr selten Makulaödeme auf [88, 89]. Deshalb sollte die Einnahme der ersten Tablette Fingolimod unter klinischer Überwachung inklusive eines EKG erfolgen sowie augenärztliche Kontrolluntersuchungen vor und innerhalb von vier bis fünf Monaten nach Therapiebeginn eingehalten werden [14]. Auch chronisch-infektiöse Grunderkrankungen sollten nach aktueller Leitlinie vor der Initiierung ausgeschlossen werden. Hierzu gehören v.a. Tuberkulose, virale Hepatitiden und HIV. Eine MRT der Neuroachse gehört ebenfalls zu den Vorbereitungen vor der Fingolimod-Vergabe, um einerseits die korrekte Indikationsstellung zu bestätigen und um andererseits einen Ausgangsbefund im Falle eines Krankheitsprogresses zu besitzen.

1.4.1. *Wirkungsmechanismus*

Als Teil der adaptiven Immunabwehr müssen T- und B-Zellen ausgehend von SLOs und dem Lymphgefäßsystem in die Peripherie zirkulieren, um körperfremde Antigene aufzuspüren [90, 91]. Jedoch sind insbesondere naive T-Zellen auf die Antigen-Präsentation durch dendritische Zellen in Lymphknoten und der Milz angewiesen, wodurch erst die Aktivierung, Proliferation und Differenzierung in Effektor-T-Zellen erfolgt. Diese migrieren dann vereinfacht dargestellt zu inflammatorischen Stellen im Körper oder entwickeln sich zu SLO-ständigen Gedächtnis-T-Zellen. Die pathogenetische *outside-in*-Hypothese (s. Kapitel 1.1.3) geht von einer Aktivierung der Lymphozyten in der Peripherie aus, woraufhin die Zellen ins ZNS einwandern und dort auf Antigene, beispielsweise der Myelinscheide, reagieren. Deshalb besteht ein möglicher therapeutischer Interventionspunkt in der Unterbindung der Rezirkulation von Immunzellen aus den SLOs. Sphingosin-1-Phosphat (S1P) ist ein Lysophospholipid, das eine Vielzahl von physiologischen Prozessen, wie Zellproliferation und -differenzierung sowie Zell-Zell-Adhärenz, reguliert [92, 93]. Es vermittelt seine jeweiligen Effekte über die Bindung an fünf Subtypen von G-Proteinkoppelten S1P-Rezeptoren (S1PR) [91, 94]. Von besonderem Interesse ist hierbei der v. a. auf ruhenden Lymphozyten vorhandene S1P₁-Rezeptor (S1P₁R), der durch die Bindung von S1P zum Austritt der Immunzellen aus den SLOs führt [91, 95, 96]. In diesen Vorgang greift Fingolimod ein. FTY720 wirkt als funktioneller S1P₁R-Antagonist, indem der Rezeptor nach der Bindung internalisiert und abgebaut wird [97,

98]. Dadurch konnte in humanen Studien gezeigt werden, dass insbesondere naive, Gedächtnis-T- sowie T_H17-Zellen in den SLOs zurückgehalten werden und dadurch nicht ins ZNS einwandern können [99-102]. Nach der Behandlung mit FTY720 wurden im Blut von MS-Patienten auch Veränderungen der B-Zell-Subsets festgestellt: Es zeigte sich eine höhere Anzahl an naiven und regulatorischen B-Zellen, welche gleichzeitig in einem aktivierten Zustand waren und proinflammatorische Zytokine sezernierten [103, 104]. Somit erklärt sich die immunmodulatorische Wirkung von FTY720 durch die verminderte Anzahl an v. a. T- und in geringerem Maße auch B-Zellen im peripheren Blut, die dann über die BHS in das ZNS einwandern können.

1.4.2. Effekte in der Behandlung der MS

Die FREEDOMS-Forschungsgruppe konnte in einer zweijährigen doppelblinden, randomisierten Studie zeigen, dass Fingolimod bei Patienten mit RRMS im Vergleich zur Placebo-Kontrollgruppe die Rückfallrate, im Sinne eines neuen Schubereignisses, deutlich reduzierte [89]. Ferner konnte das Fortschreiten der Krankheit, gemessen am *Expanded Disability Status Scale* (EDSS) und *Multiple Sclerosis Functional Composite* (MSFC), bei FTY720-behandelten Patienten verlangsamt, sowie die in der MRT nachweisbaren Läsionen unter der Behandlung signifikant verringert werden. Somit war die Wirksamkeit von Fingolimod in der Therapie der RRMS etabliert und konnte nun mit weiteren Medikamenten, die bereits für dieses Krankheitsbild zugelassen waren, hinsichtlich der Effektivität verglichen werden. Dies erfolgte mit intramuskulär appliziertem Interferon- β in der TRANSFORMS-Studie [88]. Diese einjährige doppelblinde, randomisierte Studie bestätigte die überlegene Wirksamkeit von Fingolimod in Bezug auf die jährliche Rückfallrate und Krankheitsläsionen in der MRT. Allerdings erwies sich Interferon- β in seinem Einfluss auf den Krankheitsprogress gleichwertig mit FTY720. Die Weiterverfolgung dieser Studie über viereinhalb Jahre attestierte einen andauernden Effekt von Fingolimod bei fortgesetzter Verabreichung [105]. Aufgrund dieser positiven Ergebnisse in der Behandlung der RRMS wurde FTY720 als therapeutische Option für die PPMS erprobt [106], für die es bis zur Zulassung von Ocrelizumab kaum wirksame Medikamente gab [25, 107, 108]. Jedoch erfüllte Fingolimod nicht die Erwartungen: Weder das Fortschreiten der Krankheit

konnte gebremst werden, noch hatte das Medikament einen Einfluss auf die Hirnatrophie [106] und schied somit als Behandlungsoption für die PPMS aus. Jedoch ist Fingolimod aufgrund der oralen Verfügbarkeit und der nachgewiesenen Wirksamkeit in der RRMS weiterhin Teil der therapeutischen Leitlinie für diese Verlaufsart der MS [14].

1.5. Versuchsaufbau und Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war es, die Auswirkungen von FTY720 insbesondere hinsichtlich der Autoantikörper-Produktion der B-Zellen, die periphere B-Zell-Subset-Verteilung sowie die Bildung von B-Zell-Aggregaten im ZNS in einem chronischen Mausmodell der MS zu evaluieren. Dazu wurde die B-Zell-abhängige MP4-EAE in weiblichen B6-Mäusen induziert und nach einer Krankheitsdauer von 50 Tagen die Behandlung mit Fingolimod initiiert, welche für weitere 30 Tage fortgeführt wurde (s. Abbildung 2). Die Kontrollgruppe erhielt in diesem Zeitraum die Vehikellösung. Die Untersuchungsparameter wurden anhand der klinischen Symptomatik, der ELISpot- und ELISA-Methodik, und durch durchflusszytometrische sowie immunhistochemische Untersuchungen erhoben und vor dem Hintergrund der aktuellen Forschungsergebnisse interpretiert. Die Rolle der B-Zelle in der Pathogenese der MS und deren Signifikanz in der Therapie konnten in Studien der letzten Jahre, u. a. durch die herausragende Wirksamkeit von B-Zell-depletierenden Antikörpern, wie Rituximab und Ocrelizumab, belegt werden, weshalb sie auch in dieser Studie im Mittelpunkt steht. Insbesondere die Bildung von lymphatisch-follikulärem Gewebe im ZNS mit B-Lymphozyten als zentralem Bestandteil und deren pathologischem Nachweis bei SPMS-Erkrankten stärkt zum einen die Bedeutung der B-Zellen und wirft zum anderen die Frage auf, inwiefern diese Strukturen potenziell die pathogenetischen Prozesse in der EAE, aber auch in der MS beeinflussen. Vor diesem Hintergrund ermöglichte diese Studie die Erforschung gewisser Teilaspekte der Effekte von Fingolimod in einem chronischen B-Zell-abhängigen EAE-Modell.

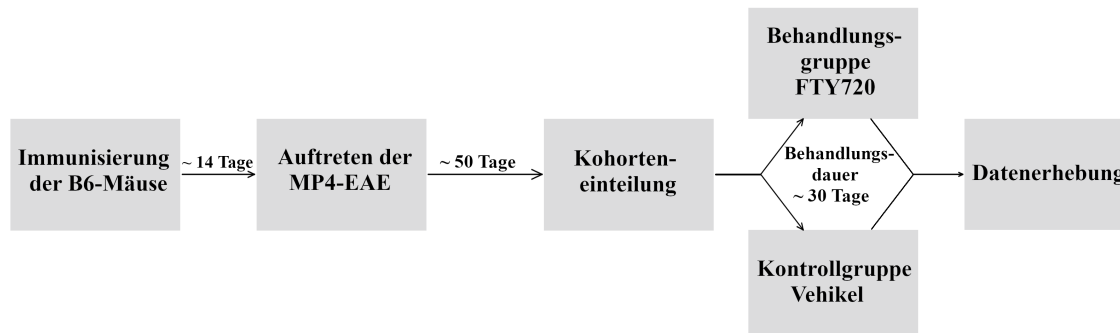


Abbildung 2: Studiendesign

Vereinfachte Darstellung der Studienabfolge. Nach der Immunsisierung der Mäuse trat nach einer Inkubationsdauer von etwa 14 Tagen die MP4-EAE auf. Daraufhin wurden die klinischen Symptome der Mäuse täglich anhand des EAE-Scores eingeordnet und überwacht. Nach einer Krankheitsdauer von ca. 50 Tagen wurden die erkrankten Tiere unter Berücksichtigung der Krankheitsintensität der mit FTY720-behandelte Gruppe respektive der Vehikel-Kontrollgruppe zugeteilt. An die etwa 30-tägige Behandlungsdauer schlossen sich die Experimente zur Datenerhebung an.

2. Material und Methoden

2.1. Mäuse

Für die Experimente wurden ausschließlich weibliche B6 Mäuse verwendet, die zum Zeitpunkt des Erwerbs sechs Wochen alt waren. Der Verkauf erfolgte durch Envigo (Niederlande). Die Mäuse wurden im Tierstall des Zentrums für Zahn-, Mund- und Kiefergesundheit der Universität Würzburg unter speziellen pathogenfreien Bedingungen in individuell ventilierten Käfigen untergebracht und mit pathogenfreiem Standardnagetierfutter (Altromin Spezialfutter GmbH & Co. KG, Lage, Deutschland) sowie autoklaviertem Wasser versorgt. Sobald die Mäuse Lähmungserscheinungen zeigten, wurden Futter und Wasser ebenerdig angeboten. Ein künstlicher Tag-Nacht-

Rhythmus wurde durch 12-stündige Hell- und Dunkelphasen simuliert. Die Tierexperimente entsprechen den Vorgaben des Tierschutzgesetzes sowie den „*Principles of laboratory animal care*“ (NIH Publikation Nummer 86–23, überarbeitete Version von 1985). Die Tierversuche erfolgten nach einem von der deutschen Regierung von Unterfranken genehmigten Protokoll (Genehmigungsnummer 55.2-2531.01-91/14).

2.2. Induktion und klinische Evaluation der EAE

MP4, als Fusionsprotein aus MBP und PLP, wurde von Alexion Pharmaceuticals, Inc. (Cheshire, CT, USA) synthetisiert. Inkomplettes Freund-Adjuvans (IFA) wurde durch eine Mischung von Mannitol Monooleat (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) und Paraffinöl (EMScience, Gibbstown, NJ, USA) in einem Verhältnis von 1:9 hergestellt. Durch Zugabe von *Mycobacterium tuberculosis* H37 RA (Difco Laboratories, Franklin Lakes, NJ, USA) in einer Konzentration von 5 mg/ml erfolgte die Herstellung von KFA. Die subkutane Immunisierungslösung, bestehend aus 200 µg MP4 gelöst in 200 µl KFA, wurde den Mäusen in beide Flanken appliziert. Am Tag der Immunisierung sowie 48 h danach erfolgte zusätzlich die intraperitoneale Verabreichung von 200 ng Pertussis-Toxin (List Biological Laboratories, Hornby, ONT, Kanada). Das klinische Assessment des Krankheitsprogresses wurde entsprechend der standardisierten EAE-Gradeinteilung vorgenommen: (0) keine Krankheitszeichen, (1) Parese des Schwanzes, (2) Parese der Hinterläufe, (3) Plegie der Hinterläufe, (4) Tetraplegie, (5) Tod. Mäuse, deren Reaktionen sich klinisch zwischen zwei der oben genannten Schweregrade bewegten, wurden in 0,5-Schritten bewertet.

2.3. Kohorteneinteilung und Medikamentenapplikation

Die Einteilung von insgesamt $n = 28$ MP4-immunisierten Mäusen in die Test- und die Kontrollgruppe erfolgte nach Auftreten der klinischen Symptome der EAE. Die Separation der Tiere in die jeweiligen Gruppen wurde anhand der Scores vor dem Behandlungsbeginn vollzogen, sodass die gemittelten Score-Werte der beiden Gruppen sich nicht signifikant voneinander unterschieden ($p = 0,831$). Die Behandlung sowohl

der Test- als auch der Kontrollgruppe begann $55,29 \pm 1,13$ Tage nach Auftreten der ersten Krankheitssymptome und erfolgte über eine Gesamtdauer von $29,57 \pm 0,33$ Tagen. Mäuse erhielten in der Testgruppe ($n = 14$) eine tägliche Dosis von 1 mg/kg Körpergewicht (KG) FTY720 (Sigma-Aldrich), die in 25% Ethanol gelöst und mit *Aqua dest.* verdünnt wurde. Diese Dosierung zeigte in diversen EAE-Modellen eine protektive sowie teilweise kurative Wirkung und garantierte somit eine ausreichende Effektivität in diesem Protokoll [109, 110]. In der Kontrollgruppe ($n = 14$) wurde nur die Vehikellösung appliziert. In beiden Gruppen wurden zur selben Tageszeit 20 μ l der jeweiligen Lösung durch Pipettieren oral verabreicht. Da beide Lösungen Ethanol beinhalteten, wurden histologische Analysen des Lebergewebes zum Ausschluss hepatotoxischer Nebenwirkungen in beiden Gruppen durchgeführt. Diese blieben jedoch ohne Zeichen von Inflammation oder Hinweise auf einen fibrotischen Umbau (s. Abbildung 3).

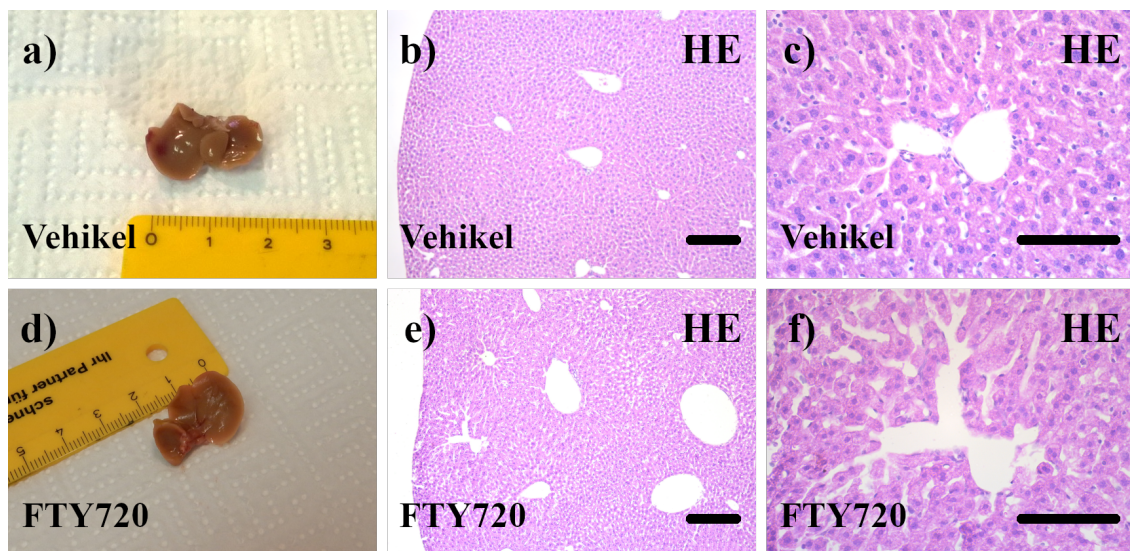


Abbildung 3: Analyse des Lebergewebes

Darstellung der Auswirkungen der Ethanolapplikation auf die Leber. a) Makroskopische Abbildung der Leber einer Maus, die die Vehikellösung für 30 Tage erhalten hatte. b) HE-gefärbter histologischer Schnitt der Leber in 10-facher Vergrößerung. c) HE-gefärbter histologischer Schnitt der Leber in 40-facher Vergrößerung. d) Makroskopische Abbildung der Leber einer Maus, die FTY720 für 30 Tage erhalten hatte. e) HE-gefärbter histologischer Schnitt der Leber in 10-facher Vergrößerung. f) HE-gefärbter histologischer Schnitt der Leber in 40-facher Vergrößerung. Balken repräsentieren 200 μ m in b)

und e), sowie 100 µm in c) und f). Insgesamt wurden repräsentative Schnitte in HE-Färbung von $n = 12$ FTY720- sowie von $n = 10$ Vehikel-behandelten Mäusen auf Zeichen von Inflammation oder fibrotischem Umbau untersucht.

2.4. Gewebsentnahme

Peripheres Blut aus der Schwanzvene wurde für die Durchflusszytometrie-Experimente entnommen. Anschließend erfolgte die Euthanasie der Tiere mittels CO₂ sowie deren Präparation. Zunächst wurde Blut aus der unteren Hohlvene für ELISA-Messungen und ein inguinaler Lymphknoten zur Durchführung des ELISpots gewonnen. Ferner erfolgte die Präparation und Entnahme der Milz zur durchflusszytometrischen Analyse der B-Zell-Subsets. Danach wurden die Tiere mit 4-prozentigem Paraformaldehyd (AppliChem, St. Louis, MO, USA) perfundiert und im weiteren Verlauf die Kleinhirne und der kontralaterale inguinale Lymphknoten entnommen.

2.5. B cell enzyme-linked immunospot assay (ELISpot)

Die verwendeten MultiScreen®HTS 96-Well-Platten (Merck Millipore, Darmstadt, Germany) wurden mit 10 µg/ml MP4 (Alexion Pharmaceuticals, Inc.), 15 µg/ml Anti-Maus IgG (MabTech, Nacka Strand, Schweden) respektive mit sterilem PBS (Sigma-Aldrich) als Negativkontrolle beschichtet und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Platten mit sterilem fetalem Kälberserum (Gibco Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) in sterilem PBS bei Raumtemperatur für 2 h geblockt. Die vor der Fixation entnommenen murinen inguinalen Lymphknoten ($n = 10$) wurden mechanisch zerrieben und durch ein 70 µm Zellsieb (Corning Inc., Corning, NJ, USA) filtriert. Nachfolgend wurden die Zellen zweimalig mit komplettem RPMI-1640 Medium (Gibco) gewaschen und in HL-1 Medium (Lonza, Basel, Schweiz) versetzt mit 1% L-Glutamin (Sigma-Aldrich) und 1% Penicillin/Streptomycin (Sigma-Aldrich) resuspendiert. Die Suspension wurde in einer Konzentration von 1×10^6 Zellen/Well auf die Platten aufgetragen und bei 37° C sowie 7% CO₂ für 24 h inkubiert. Biotinyliertes Ziegen anti-Maus IgG (Dako, Glostrup, Dänemark) fungierte als Zweitantikörper in einer Verdünnung von 1:2000 gelöst in 0,5% FBS/PBS mit 0,025% Tween. Nach einer Inkubation bei einer Temperatur von 4° C über Nacht wurden die

Platten gewaschen und mit dem alkalische Phosphatase-Avidin-Konjugat (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) in einer Verdünnung von 1:800 in 0,5% FBS/PBS für 2 h versetzt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde das Vector Blue Substrat (Vector) zur Entwicklung verwendet. Die Evaluation und Zählung der Spots erfolgte an einem ImmunoSpot Series 6 UV Gerät (CTL-Europe, Bonn, Deutschland).

2.5. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Die verwendeten Nunclon-Delta-Surface-Platten (Nalge Nunc International, Rochester, NY, USA) wurden mit 3 µg/ml in PBS gelöstem MP4 (Alexion Pharmaceuticals, Inc.) beschichtet und bei einer Temperatur von 4° C über Nacht inkubiert und anschließend mit PBS versetzt mit 0,05% Tween gewaschen. Im nächsten Schritt wurden die Platten mit 1% Milchpulver gelöst in 0,05% PBS sowie versetzt mit 0,05% Tween für 2 h bei Raumtemperatur geblockt. Die durch Zentrifugation gewonnenen Mausseren ($n = 10$) wurden in 1% Milchpulver in einer Verdünnung von 1:1000 auf die Platte aufgebracht und bei einer Temperatur von 4° C über Nacht inkubiert. Reines 1% Milchpulver agierte als Negativkontrolle. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Platten erneut gewaschen und biotinyliertes anti-Maus IgG (eBioscience, San Diego, CA, USA) in einer Verdünnung von 1:800 in 0,1% Milchpulver aufgetragen und über Nacht bei einer Temperatur von 4° C belassen. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem Avidin-Meerrettichperoxidase-Konjugat (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) in einer Verdünnung von 1:1000 in 0,1% Milchpulver bei Raumtemperatur für 2 h. Die Entwicklung fand mittels Tetramethylbenzidin (eBioscience) statt und wurde durch Zugabe von 0,16 M Salzsäure beendet. Die Auswertung erfolgte an einem Victor 3 1420 Multilabel Counter (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA) mittels Wallac 1420 Software, Version 3.00, Revision 5 und bei einer Wellenlänge von 450 nm.

2.6. Durchflusszytometrie der CD4⁺-T- und CD19⁺-B-Zellen aus dem peripheren Blut

Proben aus dem Schwanzvenenblut von $n = 14$ Mäusen wurden nach der Entnahme mit 40 µl Heparin versetzt und einer Erythrozytolyse mittels eines Ammoniumchlorid-

basierten Blutzell-Lysepuffers unterzogen. Anschließend wurden die Zellproben gewaschen und mit BD Horizon™ Fixable Viability Stain 450 (BD Biosciences) bei einer Temperatur von 4° C für 30 min inkubiert. Im nächsten Schritt erfolgte die Färbung mittels anti-CD4- (BD Biosciences; s. Tabelle 1) und anti-CD19-Antikörpern (BioLegend, San Diego, CA, USA; s. Tabelle 1) bei einer Temperatur von 4 °C für 30 min. Die gefärbten Zellen wurden an einem FACS Canto II (BD Biosciences) bei einer Durchflussrate von 2000 Ereignissen pro Sekunde analysiert. Bei jeder Einzelprobe wurde eine Ereigniszahl von 50000 oder 100 000 erreicht. Die aufgezeichneten Daten wurden mittels FlowJo Software (Tree Star, Inc., Ashland, OR, USA), Version 10.0.6, wie nachfolgend beschrieben ausgewertet: Tote Zellen wurden exkludiert, bevor mittels *single gate* auf dem FSC-H/FSC-A-Profil die weißen Blutzellen identifiziert werden konnten. Monozyten wurden vor der weiteren Charakterisierung entfernt. Mittels eines CD4/CD19-Gatings konnten T-Zellen als CD4⁺CD19⁻ und B-Zellen als CD4⁻CD19⁺ charakterisiert werden. Die Gating-Strategie wurde zunächst identisch für alle Proben gesetzt und anschließend individuell unter Einbezug der ungefärbten Proben angepasst.

Tabelle 1: Verwendete Antikörper für die Durchflusszytometrie

Antikörper	Wirtstier	Fluorochrom	Klon	Hersteller
Anti-Maus CD4 (monoklonal)	Ratte	PerCP-Cy™ 5.5	RM4-5	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
Anti-Maus CD5 (monoklonal)	Ratte	PerCP	53-7.3	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
Anti-Maus CD19 (monoklonal)	Ratte	APC	6D5	BioLegend, San Diego, CA, USA
Anti-Maus CD23 (monoklonal)	Ratte	Alexa Fluor® 647	B3B4	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
Anti-Maus CD43 (monoklonal)	Ratte	PE-Cy™7	S7	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
Anti-Maus CD45R/B220 (monoklonal)	Ratte	BV510	RA3-6B2	BD Biosciences, San Jose, CA, USA

Anti-Maus CD73 (monoklonal)	Ratte	PE	TY/23	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
Anti-Maus CD80 (monoklonal)	Hamster	BV421	16- 10A1	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
Anti-Maus CD138 (monoklonal)	Ratte	BB515	281-2	BD Biosciences, San Jose, CA, USA

2.7. Durchflusszytometrie der B-Zell-Subsets aus der Milz

Die durch Präparation gewonnenen murinen Milzen ($n = 17$) wurden mechanisch zerrieben, durch ein 70 μm Zellsieb (Corning Inc.) filtriert und mittels eines Ammoniumchlorid-basierten Lysepuffers einer Erythrozytolyse unterzogen. Anschließend wurden die Zellen gewaschen und mit BD Horizon™ Fixable Viability Stain 780 (BD Biosciences) bei einer Temperatur von 4° C für 30 min inkubiert. Im nächsten Schritt erfolgte die Färbung mittels folgender anti-Maus-Antikörper (alle BD Biosciences; s. Tabelle 1) bei einer Temperatur von 4° C für 30 min: anti-CD5, anti-CD23, anti-CD43, anti-CD73, anti-CD80, anti-CD138, anti-B220/CD45R. Die gefärbten Zellen wurden an einem FACS Canto™ II (BD Biosciences) mit einer Durchflussrate von 2000 Ereignissen pro Sekunde analysiert. Bei jeder Einzelprobe wurde eine Ereigniszahl von 50000 oder 100 000 erreicht. Die aufgezeichneten Daten wurden mittels FlowJo Software (Tree Star, Inc.), Version 10.0.6, wie nachfolgend beschrieben ausgewertet: Tote Zellen wurden exkludiert, bevor mittels *single gate* auf dem FSC-H/FSC-A-Profil die weißen Blutzellen identifiziert werden konnten. B220⁺ B-Zell-Subsets wurden in naive B-Zellen (CD43⁻CD73⁻CD80⁻CD138⁻), regulatorische B-Zellen (CD5⁺CD23^{+/-}CD43⁻), B1a-Zellen (CD5⁺CD23⁻CD43⁺), B1b-Zellen (CD5⁻CD23⁻CD43⁺), und Gedächtnis-B-Zellen (CD5⁻CD23⁻CD73⁺CD80⁺CD138^{+/-}) differenziert. Plasma-Zellen (CD73⁻CD80⁻CD138⁺B220⁻) wurden mittels B220/CD138-Gate charakterisiert. Die Gating-Strategie wurde zunächst identisch für alle Proben gesetzt und anschließend individuell unter Einbezug der ungefärbten Proben sowie der *fluorescent minus one* (FMO; für CD73, CD80, CD128) angepasst.

2.8. Immunhistochemische Analyse

Die Paraffin-fixierten inguinalen Lymphknoten ($n = 20$) agierten als Kontrollgewebe und wurden jeweils in 39 Serienschritte mit einer Dicke von je 5 μm aufgeteilt. Die Kleinhirne ($n = 20$) wurden in 84 Serienschritte mit einer Dicke von je 5 μm aufgezogen. Anschließend wurde jede achte Serie immunhistochemisch mit anti-B220- sowie anti-CD3-Antikörpern gefärbt, um auf das Vorhandensein von entzündlichen Infiltraten zu testen. Im Falle des Nachweises von B-Zell-Aggregaten wurden die entsprechend nachfolgenden Schnitte für die weitere Charakterisierung mit anti-CXCL13- (R&D Systems, Minneapolis, MA, USA; s. Tabelle 2), anti-FDC-SP- (Bioss, Woburn, MA, USA; s. Tabelle 2), anti-Ig- (Dako; s. Tabelle 2) und anti-PNAd-Antikörpern (BD Biosciences; s. Tabelle 2) angefärbt. Für die DAB-Entwicklung wurden die in Paraffin eingebetteten Schnitte in einer absteigenden Alkoholreihe entparaffiniert, um einen endogenen Peroxidaseblock durch Wasserstoffperoxid anzuschließen. Im nächsten Schritt wurde mithilfe von Citratpuffer eine saure Demaskierung der Oberflächenepitope erreicht und daraufhin die endogenen Proteine bei einer Temperatur von 4° C für 2 h blockiert. Die Erstantikörper wurden bei einer Temperatur von 4° C über Nacht inkubiert, um am nächsten Tag nach mehrmaligem Waschen die biotinylierten Sekundärantikörper anti-Kaninchen-, anti-Ratte- oder anti-Ziege-IgG (Vector Laboratories) in einer Verdünnung von 1:250 in PBS aufzubringen und bei Raumtemperatur für eine Stunde einwirken zu lassen. Für die Entwicklung von CD3 sowie FDC-SP wurden die Schnitte zusätzlich einem Kaninchen-Peroxidase-anti-Peroxidase-Komplex (rb-PAP, Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, USA) in einer Verdünnung von 1:250 bei Raumtemperatur für 30 min ausgesetzt. Die finale Färbungsentwicklung erfolgte mittels eines Meerrettichperoxidase-basierten VECTASTAIN ABC Kits (Vector Laboratories) und einer Lösung aus DAB (Sigma-Aldrich), Nickelsulfat, 10% Glukose, Ammoniumchlorid sowie Glukose-Oxidase (Sigma-Aldrich). Die Entwicklungsreaktion wurde unter einem Mikroskop kontrolliert und durch den mehrmaligen Waschvorgang in PBS gestoppt. Für die CD3-/B220-Doppelfärbung wurden die Schnitte anschließend erneut bei Raumtemperatur für 1 h geblockt und mit dem zweiten Erstantikörper anti-B220 bei einer Temperatur von 4° C über Nacht inkubiert. Am folgenden Tag wurde nach mehrmaligem Waschen der Zweitantikörper Ziegen-anti-Kaninchen (Vector Laboratories) in einer Verdünnung von

1:250 bei Raumtemperatur für 1 h aufgebracht. Die Entwicklung erfolgte in diesem Fall mit einem Streptavidin-alkalische-Phosphatase-Komplex (Vector Laboratories) und dem Vector Blue Substrat Kit (Vector Laboratories). Die final eingedeckten Schnitte wurden mittels eines DM 2000 LED Mikroskops (Leica, Wetzlar, Deutschland) ausgewertet. B-Zell-Aggregate zeichneten sich durch die Anwesenheit von mindestens einem der nachfolgenden Marker für lymphatisches Gewebe aus: CXCL13, FDC-SP, Ig oder PNAd. Die Aggregate wurden dabei weiter differenziert in low-grade (ein Marker nachweisbar), mid-grade (zwei oder drei Marker nachweisbar) und high-grade (alle Marker nachweisbar) und in Aggregate ohne lymphatische Charakteristika (kein Marker nachweisbar). Um die Fläche des Kleinhirnmarks quantifizieren zu können, wurden entsprechende Schnitte in HE-Färbung angefertigt und mittels ImageJ (National Institutes of Health, USA), Version 1.50b, vermessen.

Tabelle 2: Verwendete Antikörper für die Immunhistochemie

Primärantikörper	Wirtstier	Verdünnung	Klon	Hersteller
Anti-Maus CD3 (monoklonal)	Kaninchen	1:100	SP7	Abcam, Cambridge, MA, USA
Anti-Maus CD45R/B220 (monoklonal)	Ratte	1:500	RA3- 6B2	eBiosciences, San Diego, CA, USA
Anti-Maus CXCL13/BLC/BCA- 1 (polyklonal)	Ziege	1:80	entfällt	R&D Systems, Minneapolis, MA, USA
Anti-Maus FDC-SP (polyklonal)	Kaninchen	1:500	entfällt	Bioss, Woburn, MA, USA
Anti-Maus Ig, biotinyliert (polyklonal)	Ziege	1:1000	entfällt	Dako, Glostrup, Dänemark
Anti-Maus PNAd	Ratte	1:200	MECA-	BD Biosciences,

(monoklonal)			79	San Jose, CA, USA
Sekundärantikörper	Wirtstier	Verdünnung	Klon	Hersteller
Anti-Kaninchen IgG, biotinyliert	Ziege	1:250	entfällt	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA
Anti-Ratte IgG, biotinyliert	Ziege	1:250	entfällt	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA
Anti-Ziege IgG, biotinyliert	Kaninchen	1:250	entfällt	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA

2.9. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mithilfe von GraphPadPrism 6 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA). Zur Untersuchung von signifikanten Differenzen zwischen den Test- und Kontrollgruppen wurde der Wilcoxon-Mann-Whitney-Test eingesetzt. Eine statistische Signifikanz wurde bei $p \leq 0,05$ festgelegt. In den Grafiken sind statistische Signifikanzen weiterhin in drei Grade eingeteilt: * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$ und *** $p \leq 0,001$. Mittelwerte \pm Standardfehler sind im Text angegeben beziehungsweise in den Grafiken ablesbar.

3. Ergebnisse

3.1. Entwicklung des klinischen Verlaufs

Die Evaluation der klinischen Symptomatik der EAE erfolgte nach der Immunisierung täglich. Die Tiere zeigten im Durchschnitt $15,25 \pm 1,05$ Tage nach der MP4-Verabreichung erste Krankheitssymptome. Der durchschnittliche Krankheitsgrad lag zum Beginn der Erkrankung in der FTY720-Gruppe bei $2,89 \pm 0,23$, in der Vehikel-Gruppe bei $3,04 \pm 0,14$ ($p = 0,839$). Zum Zeitpunkt des Behandlungsbeginns zeigten die Mäuse nach standardisierter EAE-Gradeinteilung eine Krankheitsaktivität von $2,32 \pm 0,23$ in der FTY720-behandelten Gruppe und einen Mittelwert von $2,32 \pm 0,17$ in der Vehikel-Kontrollgruppe ($p = 0,831$). Die Mäuse erhielten über den Behandlungszeitraum von $29,57 \pm 0,33$ Tagen die tägliche FTY720- beziehungsweise Vehikel-Lösung oral. In diesem Versuchsaufbau führte die FTY720-Applikation jedoch nicht zu signifikanten Unterschieden in den EAE-Gradeinteilungen des klinischen Verlaufs (s. Abbildung 4), was sich auch im durchschnittlichen finalen Krankheitsgrad widerspiegelte: FTY720-Gruppe $2,25 \pm 0,22$, Vehikel-Gruppe $2,32 \pm 0,21$ ($p = 0,880$). Zur Veranschaulichung wurde jeweils ein Tier aus jeder Gruppe mit charakteristischem Krankheitsverlauf ausgewählt und in Abbildung 4 aufgezeigt.

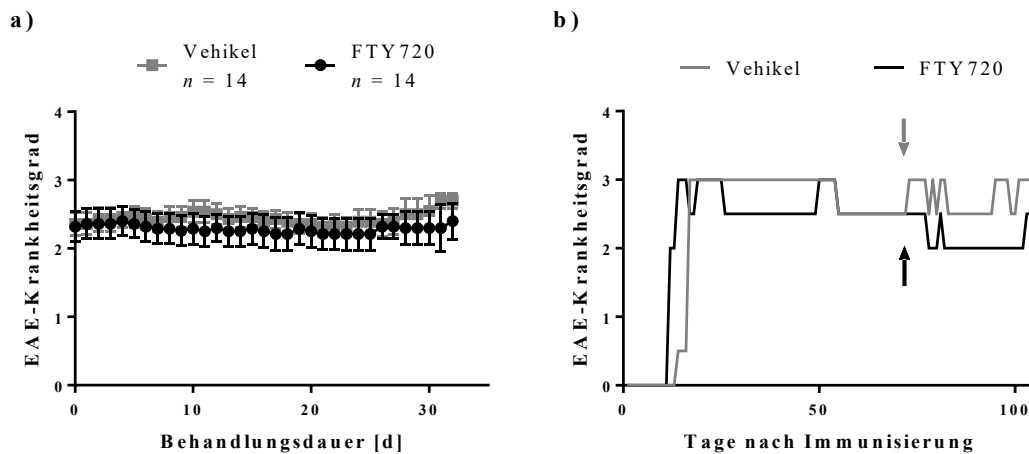


Abbildung 4: Score-Evaluation

Abbildung 4 zeigt die Evaluation des EAE-Krankheitsgrades im chronischen Krankheitsverlauf. In a) sind dabei die EAE-Scores der FTY720-Gruppe im Vergleich zu den Vehikel-Tieren während der Behandlungsdauer aufgetragen. b) zeigt den charakteristischen Verlauf von jeweils einem Tier aus der FTY720- sowie der Vehikel-behandelten Gruppe nach der Immunisierung. Die Pfeile markieren den Behandlungsbeginn.

3.2. Auswirkung von Fingolimod auf die B-Zell-Funktion und Antikörperproduktion

Die Evaluation hinsichtlich der Beeinflussung der zellulär-immunologischen Funktionen der B-Zellen durch die Behandlung mit dem immunmodulatorischen FTY720 erfolgte mittels ELISpots. Hierbei wurden zum einen die MP4-spezifischen IgG-Antikörper untersucht, um eine adäquate Immunisierungsreaktion nachzuweisen. Zu diesem Zwecke wurden nicht-fixierte inguinale Lymphknoten der FTY720- ($n = 10$) und der Vehikel-behandelten Mäuse ($n = 10$) analysiert. Dabei ließen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den FTY720-behandelten und den Vehikel-behandelten Tieren nachweisen ($p = 0,200$; s. Abbildung 5): FTY720 $2,51 \pm 1,03$ Spots/ 10^6 Zellen, Vehikel $0,98 \pm 0,39$ Spots/ 10^6 Zellen. Zum anderen wurde der Gesamtanteil des von den B-Zellen sezernierten IgG untersucht (FTY720 $n = 7$, Vehikel $n = 9$). Die hierbei erzielten Ergebnisse zeigten ebenfalls keine signifikanten Differenzen zwischen den Gruppen ($p = 0,900$; s. Abbildung 5): FTY720 $313,60 \pm$

87,97 Spots/ 10^6 Zellen, Vehikel $316,60 \pm 73,69$ Spots/ 10^6 Zellen. Darüber hinaus wurde die humorale Immunantwort mittels ELISA evaluiert. Hierfür wurden MP4-spezifische IgG-Antikörper aus den murinen Seren nachgewiesen, welche in der FTY720- ($n = 10$) und Vehikel-Gruppe ($n = 10$) nicht signifikant variierten ($p = 0,430$; s. Abbildung 6): FTY720 $2,49 \pm 0,49$ Absorption [450 nm], Vehikel $2,43 \pm 0,37$ Absorption [450 nm].

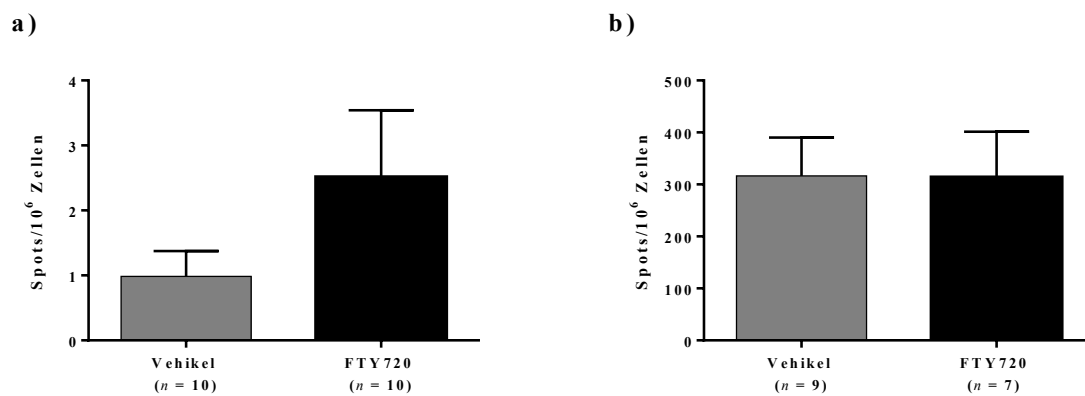


Abbildung 5: ELISpot-Auswertung MP4-spezifischer B-Zellen

a) stellt die MP4-spezifischen IgG-Antikörper von B-Zellen dar, die aus den inguinalen Lymphknoten der immunisierten Mäuse gewonnen wurden. In b) ist die zelluläre Immunantwort mittels von B-Zellen sezernierten IgG abgebildet.

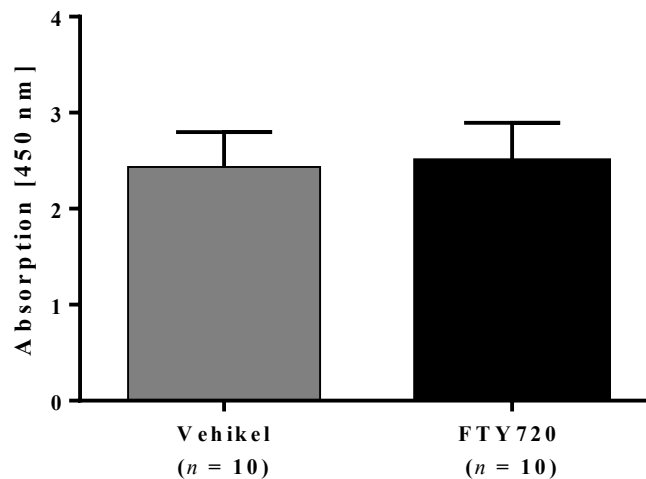


Abbildung 6: Evaluation der humoralen Immunantwort mittels ELISA

Darstellung der MP4-spezifischen IgG-Antikörper, die in den Seren sowohl der FTY720- als auch der Vehikel-behandelten Tiere nachgewiesen und mithilfe von ELISA untersucht wurden.

3.3. Kontrolle des Therapieerfolgs mittels Durchflusszytometrie

Die immunmodulatorische Wirkung von FTY720 führt zu einer deutlichen Reduktion von Lymphozyten und dabei insbesondere von T-Zellen im peripheren Blut. Um dies in unserem Versuchsaufbau zu untersuchen, wurden am Ende der Behandlungsdauer Leukozyten aus dem peripheren Blut von FTY720- ($n = 6$) und Vehikel-behandelten Mäusen ($n = 8$) mittels Durchflusszytometrie analysiert. Hierfür erfolgte die Markierung der weißen Blutzellen mit fluoreszenzmarkierten-Antikörpern gegen CD4 und CD19, wodurch eine Charakterisierung in CD4⁺-T- und CD19⁺-B-Zellen gelang. Die Behandlung mit FTY720 führte zu einer statistisch signifikanten Reduktion der CD4⁺-T-Zellen im peripheren Blut der Tiere ($p = 0,0007$; FTY720 $2,56\% \pm 0,60$ und Vehikel $28,68\% \pm 1,88$; s. Abbildung 7). Im Vergleich dazu blieb der prozentuale Anteil an CD19⁺-B-Zellen durch die Behandlung mit FTY720 statistisch unbeeinträchtigt ($p = 0,180$; FTY720 $23,33\% \pm 3,35$ und Vehikel $28,85\% \pm 2,45$; s. Abbildung 7).

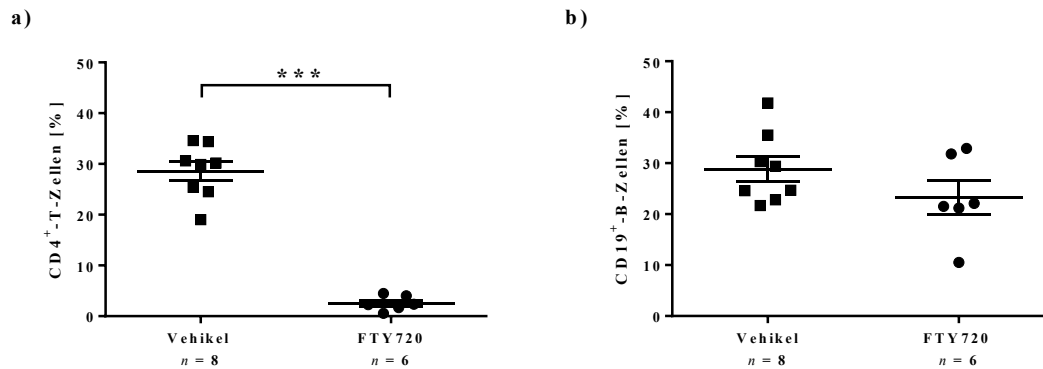


Abbildung 7: Durchflusszytometrische Untersuchung von T- und B-Zellen aus dem peripheren Blut unter der Behandlung mit FTY720

Zellen wurden aus dem peripheren Schwanzvenenblut von immunisierten, FTY720- respektive Vehikel-behandelten Tieren mittels Durchflusszytometrie als CD4⁺-T- und CD19⁺-B-Zellen charakterisiert. Darstellung der CD4⁺-T-Zellen in a) mit einer signifikanten Reduktion der Zellzahl unter Behandlung mit FTY720 im Vergleich zur Vehikel-Gruppe ($p = 0,0007$). Bei CD19⁺-B-Zellen blieb dieser Effekt allerdings aus.

3.4. Effekte von Fingolimod auf die Migration von B-Zell-Subsets aus sekundär lymphatischen Organen

Um eine detaillierte Untersuchung der potenziellen Auswirkungen von FTY720 auf B-Zellen untersuchen zu können, wurden Lymphozyten aus der Milz von Fingolimod- ($n = 10$) und Vehikel-behandelten Tieren ($n = 7$) mittels Durchflusszytometrie untersucht. Über die Anfärbung mit fluoreszenzmarkierten-Antikörpern gelang zunächst die Charakterisierung von Plasmazellen und B220⁺-B-Zellen, die in fünf weitere Subsets differenziert wurden: Gedächtnis-B-Zellen, B1a-Zellen, B1b-Zellen, regulatorische und naive B-Zellen (s. Abbildung 8). In der Auswertung der prozentualen Verteilung unter Therapie mit FTY720 zeigten sich lediglich die B220⁺-B-Zellen im Vergleich zur Vehikel-Gruppe signifikant erhöht ($p = 0,033$; s. Abbildung 8). FTY720-behandelte Mäuse hatten dabei $34,13\% \pm 3,04$ B220⁺-B-Zellen, während sich dieser Anteil bei Tieren, denen Vehikel appliziert wurde, auf $23,63\% \pm 2,70$ reduzierte. Die anderen Subsets blieben ohne signifikante Unterschiede.

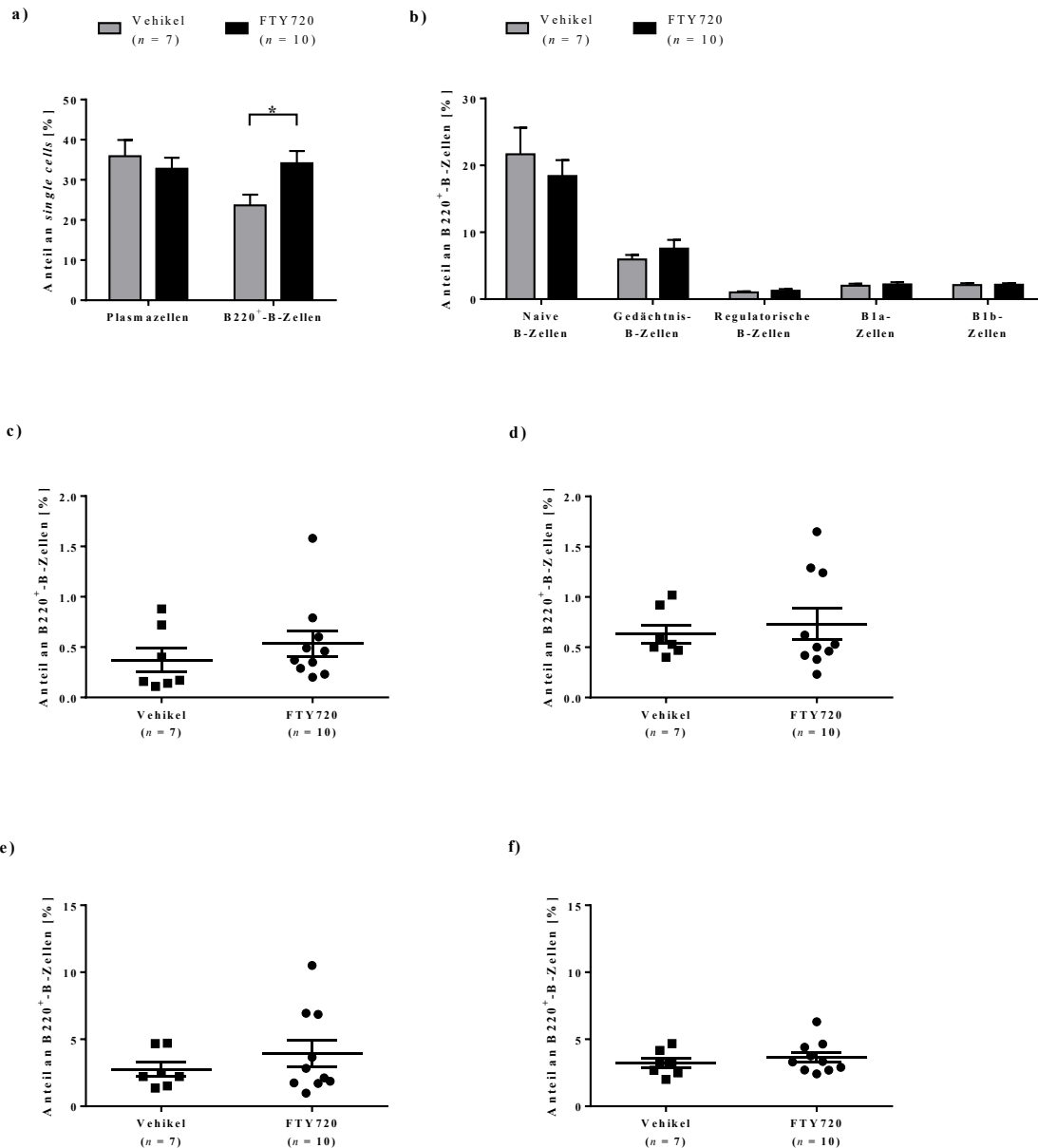


Abbildung 8: Durchflusszytometrische Untersuchung von B-Zell-Subsets in der Milz

Milzen von MP4-immunisierten Mäusen wurden nach der Behandlung mit FTY720 beziehungsweise Vehikel entnommen und mittels Durchflusszytometrie untersucht. Hierbei konnten sechs spezifische B-Zell-Subtypen charakterisiert werden. Wie in a) abgebildet, zeigte sich der Anteil an B220⁺-B-Zellen in den Milzen von FTY720-behandelten Tieren signifikant erhöht im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die weiteren untersuchten Subtypen sind in b) abgebildet und waren nicht signifikant gegenüber den Vehikel-behandelten Tieren verändert. c) zeigt CD23⁺-regulatorische B-Zellen, d) CD23⁻ regulatorische B-Zellen, e) CD138⁺-Gedächtnis-B-Zellen und f) CD138⁻-Gedächtnis-B-Zellen.

3.5. Immunhistochemische Auswertung

Die histologische Auswertung erfolgte zunächst mithilfe einer immunhistochemischen CD3/B220-Doppelfärbung, um die Kleinhirne auf das Vorhandensein von CD3⁺-T-Zellen sowie B220⁺-B-Zellen zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurden zerebelläre Schnitte von $n = 10$ FTY720- und $n = 10$ Vehikel-behandelten Tieren verwendet. Detektierte Ansammlungen von CD3⁺-T-Zellen oder B220⁺-B-Zellen im Kleinhirnparenchym wurden ferner eingeteilt in non-B-Zell-Infiltrate, diffuse Infiltrate und B-Zell-Aggregate (s. Abbildung 9). Non-B-Zell-Infiltrate sind durch eine lockere perivaskuläre Ansammlung von CD3⁺-T-Zellen charakterisiert, während bei einem diffusen Infiltrat zusätzlich B220⁺-B-Zellen vorhanden sind. Ein B-Zell-Aggregat wurde als dicht gepackter, kompartimentalisierter perivaskulärer Verbund aus beiden Zellarten mit einem Mindestanteil von 30% B220⁺-B-Zellen definiert. Um eine interindividuelle Vergleichbarkeit herzustellen, wurde die Kleinhirnparenchym-Fläche in HE-gefärbten Schnitten ausgemessen und die Anzahl an Infiltraten bzw. Aggregaten darauf bezogen. In der Auswertung zeigte sich keine statistische Signifikanz zwischen FTY720- und Vehikel-behandelten Mäusen in Bezug auf die Gesamtinfiltratanzahl ($p = 0,075$) sowie bei Betrachtung der diffusen Infiltrate ($p = 0,123$) und der B-Zell-Aggregate ($p = 0,978$; s. Abbildung 10). Jedoch war die Anzahl an Non-B-Zell-Infiltraten bei FTY720-behandelten Tieren signifikant reduziert im Vergleich zur Vehikel-Gruppe ($p = 0,007$). Ferner wurden B-Zell-Aggregate weiter dahingehend differenziert, ob Anzeichen für eine lymphatische Neogenese vorhanden waren oder nicht. Diese Charakterisierung erfolgte anhand von vier Markern: Expression von CXCL13 als Chemoattraktant, Anwesenheit von FDZ über den Nachweis von FDC-SP, Plasma-Zellen (Ig⁺) sowie PNA^{d+} HEV (s. Abbildung 11). Alle ermittelten B-Zell-Aggregate in der Vehikel-Gruppe zeigten mindestens einen Marker als Hinweis für lymphatische Neogenese. Weiterhin konnte ein high-grade Aggregat identifiziert werden. FTY720-behandelte Mäuse wiesen eine höhere Anzahl an low-grade Aggregaten auf, während high-grade Aggregate nicht nachweisbar waren. Ferner fand sich in der Fingolimod-behandelten Gruppe ein B-Zell-Aggregat ohne Anzeichen für lymphatische Neogenese. Statistisch signifikant zeigten sich die mid-grade B-Zell-Aggregate, die in der FTY720-Gruppe deutlich reduziert waren im Vergleich zu Vehikel-behandelten Tieren ($p = 0,04$; s. Abbildung 12). Die Aufschlüsselung der

Verteilung der Marker für lymphatische Neogenese zeigte, dass PNAd nur in einem high-grade Aggregat eines Vehikel-Tiers exprimiert wurde, während Ig, FDC-SP und CXCL13 in beiden Gruppen gleichartig verteilt waren (s. Abbildung 12).

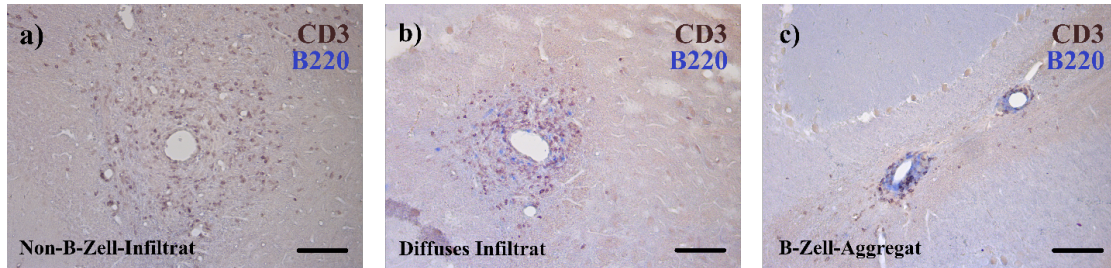


Abbildung 9: Übersicht über Non-B-Zell-Infiltrate, diffuse Infiltrate und B-Zell-Aggregate

Die Abbildung zeigt immunhistochemisch doppelgefärbte Schnitte der Markregion in Kleinhirnen von MP4-immunisierten Mäusen. Abgebildet sind perivaskuläre zelluläre Ansammlungen: In a) sind nur CD3⁺-T-Zellen, in b) B220⁺-B-Zellen und CD3⁺-T-Zellen und in c) dicht gepackte B220⁺-B-Zellen, die mind. ein Drittel des Aggregats ausmachen, sowie CD3⁺-T-Zellen zu sehen. Die Balken entsprechen jeweils 100µm.

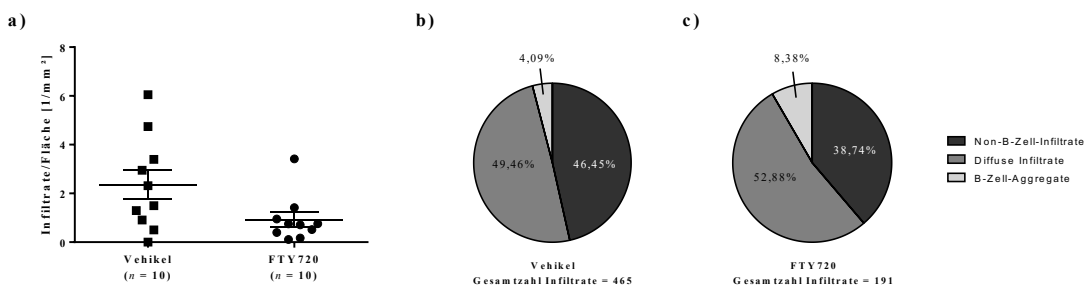


Abbildung 10: Auswertung der Infiltrate und B-Zell-Aggregate

Immunhistochemisch gefärbte Schnitte von Kleinhirnen von MP4-immunisierten Mäusen wurden hinsichtlich des Vorhandenseins von Infiltraten (Non-B-Zell- und diffuse Infiltrate sowie B-Zell-Aggregate) evaluiert. Hierbei ließ sich keine Signifikanz zwischen der FTY720- und der Vehikel-Gruppe hinsichtlich aller Infiltrate bezogen auf die untersuchte Fläche nachweisen, wie in a) ablesbar ist. c) zeigt, dass Non-B-Zell-Infiltrate hingegen bei FTY720-behandelten Mäusen im Vergleich zur Vehikel-Gruppe (abgebildet in b)) signifikant reduziert waren ($p = 0,007$). Diffuse Infiltrate und B-Zell-Aggregate blieben ohne signifikante Unterschiede.

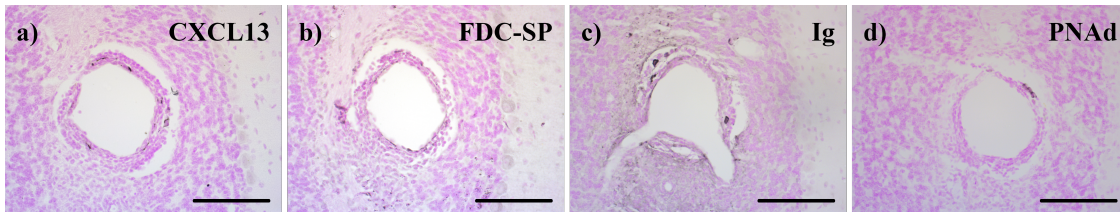


Abbildung 11: Übersicht über die TLO-Marker

Die Abbildung zeigt immunhistochemisch gefärbte Schnitte des Kleinhirnparenchyms von MP4-immunisierten Mäusen. Abgebildet in a)-d) sind B-Zell-Aggregate, die mithilfe von CXCL13, FDC-SP, Ig und PNA weiter charakterisiert wurden. Die Balken repräsentieren jeweils 100 μm.

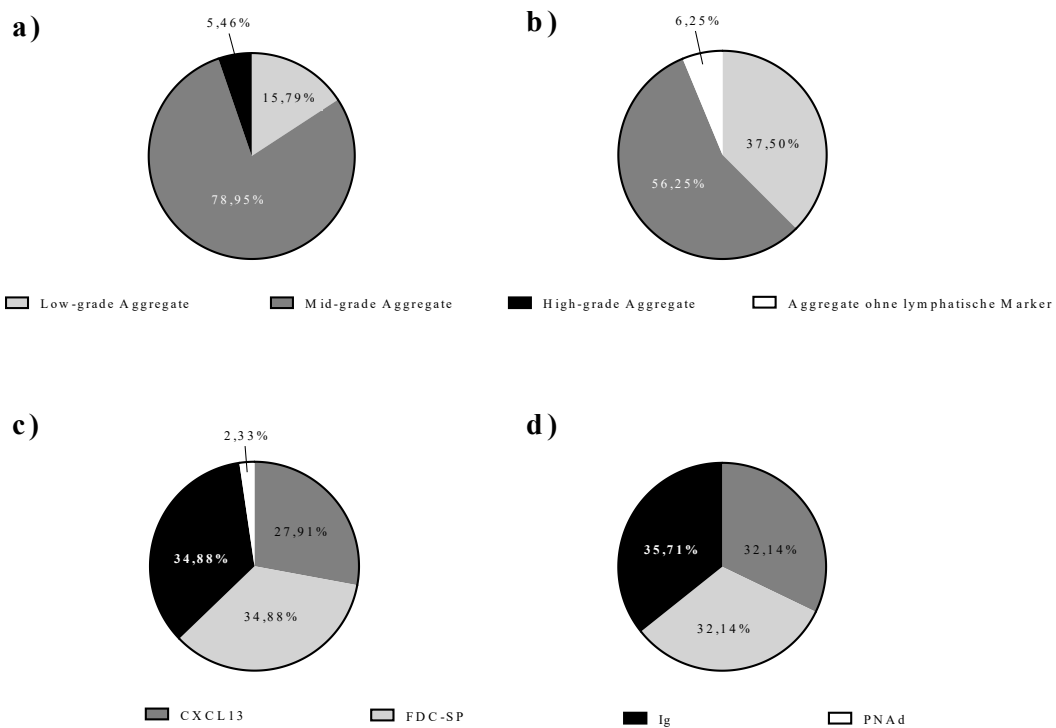


Abbildung 12: Auswertung der TLO-Marker

Detektierte B-Zell-Aggregate wurden ferner anhand der oben definierten TLO-Marker als low-grade, mid-grade und high-grade Aggregate charakterisiert. Die Auswertung zeigte in der FTY720-behandelten Gruppe, dargestellt in b), ein B-Zell-Aggregat, das keine TLO-Marker präsentierte, sowie einen hohen

Anteil an low-grade Aggregaten im Vergleich zur Vehikel-Gruppe, abgebildet in a). Ferner ließ sich bei den Vehikel-behandelten Mäusen ein high-grade Aggregat, mit Expression aller vier TLO-Marker, identifizieren. Signifikant zeigten sich die mid-grade Aggregate, die bei FTY720-behandelten Tieren im Vergleich zur Vehikel-Gruppe reduziert waren. In c) ist die Verteilung der TLO-Marker in der Vehikel-Gruppe, in d) in der FTY720-behandelten Kohorte aufgezeigt. Hierbei zeigten sich keine signifikanten Differenzen. Da sich nur in der Vehikel-Gruppe ein high-grade Aggregat nachweisen ließ, ist der Marker PNAd dort repräsentiert.

4. Diskussion

Die Zielsetzung der durchgeführten Studie lag in der Evaluation der Auswirkungen von Fingolimod auf die B-Zell- und Antikörper-Antwort im MP4-EAE-Modell. Die Analyse fokussierte sich insbesondere auf die Veränderungen der B-Zell-Subsets in den SLOs und der B-Zell-Aggregate im ZNS sowie die MP4-spezifische zelluläre und humorale Immunantwort.

Fingolimod ist ein funktioneller S1P₁R-Antagonist und aktuell als oral verfügbares Medikament zur Behandlung der RRMS zugelassen. Es entwickelt seine primäre Wirkung nach vorherrschender Lehrmeinung durch die Internalisierung und den Abbau des Oberflächenrezeptors, wodurch der Austritt insbesondere von T-, aber auch von B-Zellen aus den SLOs reduziert wird [95, 96, 102, 111]. Dadurch gelangt eine geringere Anzahl an autoreaktiven Lymphozyten über die BHS ins ZNS, was eine Minimierung der inflammatorischen Aktivität und Myelinscheidendegeneration zur Folge hat [101, 112]. Veränderungen von T-Lymphozyten unter der Behandlung mit Fingolimod sind umfassend erforscht [99, 102, 113, 114], während das Wissen in Bezug auf B-Zellen lückenhaft ist. Aktuelle Entwicklungen der therapeutischen Möglichkeiten stärken jedoch erneut die potente Rolle der B-Lymphozyten in der Pathogenese der MS [25, 36, 108], weshalb die Auswirkungen von FTY720 auf diese Zellgruppe von maßgeblichem Interesse ist. Darüber hinaus konnten B-Zell-Aggregate und ihre Entwicklung in TLOs in Patienten mit SPMS nachgewiesen und ein möglicher Zusammenhang mit einem schwerwiegenden Krankheitsverlauf hergestellt werden [49, 50]. Zusammenfassend

sind grundlegende Studien über das Verhalten und die Verteilung von B-Zellen unter Fingolimod-Behandlung von größter Bedeutung.

Diese Studie nutzte das B-Zell- und Antikörper-abhängige MP4-EAE-Modell, um zunächst die Effekte von FTY720 auf die periphere B-Zell-Funktion zu evaluieren. Hierbei zeigten sich sowohl in der MP4-spezifischen als auch der Gesamt-IgG-Produktion keine Unterschiede zwischen behandelten Mäusen und der Kontrollgruppe. Dies spricht für eine unbeeinträchtigte humorale spezifische und generelle Immunantwort und stimmt mit den Ergebnissen von Pinschewer *et al.* überein, die eine gleichwertige Antikörperproduktion in einem Virus-induzierten B6-Mausmodell zwischen der FTY720-behandelten und der Kontrollgruppe nachweisen konnten [115]. Darüber hinaus überprüften sie das immunologische Gedächtnis in Form von Gedächtnis-B-Zellen und Plasmazellen: Sowohl die Langzeit-Produktion von spezifischem IgG, als auch die Boosterung bei erneuter Antigen-Exposition zeigten zwischen den Gruppen keine Unterschiede. Auch zelluläre Funktionen, wie Aktivierung, Proliferation und weitere Effektormechanismen blieben unter Fingolimod unbeeinträchtigt [116]. Dies könnte auch Teilaspekte der ambivalenten Ergebnisse der Anwendung von FTY720 bei Patienten mit Nierentransplantaten erklären. Einerseits war die Kombination mit Ciclosporin notwendig, um einen ausreichenden Schutz vor der Organabstoßung zu erreichen. Andererseits zeigten sich im Vergleich zum Standardprotokoll eine reduzierte Nierenfunktion und aufgrund der notwendigen hohen Dosierung von Fingolimod entsprechend gravierende Nebenwirkungen, wie Makulaödeme [117-120]. Da nach soliden Organtransplantationen eine lebenslange Immunsuppression notwendig ist, werden Medikamente mit mildereren Nebenwirkungen bevorzugt. Darüber hinaus konnte in Einzelfällen sogar eine erhöhte Wahrscheinlichkeit für eine humoral-vermittelte Abstoßung der Niere gezeigt werden [120, 121], weshalb insgesamt vom Einsatz von FTY720 in organtransplantierten Patienten Abstand genommen wurde.

Da in humanen Studien eine ausgeprägte Zurückhaltung insbesondere von T-Zellen, aber auch B-Zellen in den SLOs und damit eine signifikante Reduktion dieser Zellgruppe im peripheren Blut von Patienten beschrieben worden war [122-124], wurde dies mittels Durchflusszytometrie im MP4-Mausmodell überprüft. CD4⁺-T-Zellen im peripheren Schwanzvenenblut zeigten sich bei FTY720-behandelten Tieren im

Vergleich zur Vehikel-Kontrollgruppe in diesem Versuchsaufbau signifikant reduziert, was in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von MS-Patienten ist [122, 123]. In diesen humanen Studien konnte derselbe Effekt auf B-Zellen verzeichnet werden, jedoch zeigten sich die CD19⁺-B-Zellen unter der Therapie mit Fingolimod in den murinen Versuchen dieser Studie nicht erheblich verringert und damit konträr zu oben genannten Ergebnissen. Matloubian *et al.* stellte fest, dass bei B6-Mäusen der Austritt von CD19⁺-B-Zellen aus den SLOs einer geringeren Abhängigkeit vom S1P₁R unterliegt als der von T-Zellen [111]. Auch bei Ratten konnte dieser Effekt nachgewiesen werden und es lag ebenso ein höherer zytotoxischer Effekt von FTY720 auf T-Zellen als auf B-Zellen *in vitro* sowie *in vivo* vor [125, 126].

Allerdings wurden auch Veränderungen der Verteilung von unterschiedlichen Subtypen der B-Zellen durch die Behandlung mit Fingolimod im Blut von MS-Patienten beschrieben [103, 104, 123]. Da die Zellzahlen im peripheren Blut von B6-Mäusen nicht ausreichend sind, um ein breites Panel an B-Zell-Subsets zu analysieren, fokussierten wir uns auf die Milz als SLO. In der Durchflusszytometrie zeigten sich hierbei die B220⁺-B-Zellen in der Milz signifikant in der FTY720-behandelten Gruppe erhöht. Möglicherweise war dieser Effekt im peripheren Blut aufgrund der begrenzten Zellzahlen nicht ausreichend nachweisbar gewesen. Die weiteren Subtypen, wie regulatorische, naive und Gedächtnis-B-Zellen, blieben in der chronischen Kohorte unbeeinflusst. Jedoch konnte bei Mäusen, die auf dem Höhepunkt der MP4-EAE Fingolimod verabreicht bekommen hatten, gezeigt werden, dass insbesondere B220⁺CD43⁻CD73⁻CD80⁻CD138⁻ naive B-Zellen in der Milz vermindert und regulatorische B-Zellen vermehrt vorhanden waren [127]. Diese Ergebnisse entsprechen den Resultaten von Claes *et al.*, die einen erhöhten Anteil an CD19⁺IgD⁺CD27⁺ naiven B-Zellen [123], sowie denen von Grützke *et al.*, die eine erhöhte Fraktion von CD38⁺CD27⁻CD24⁺CD5⁺-regulatorischen B-Zellen im peripheren Blut von MS-Patienten unter der Behandlung mit Fingolimod verzeichnen konnten [104]. Letztere exprimieren L-Selectin, CCR7 und LFA-1, welche für die Sesshaftigkeit von Zellen in Lymphknoten und Milz benötigt werden [128], in einer geringeren Dichte als naive und Gedächtnis-B-Lymphozyten und sind daher unempfindlicher für die Fingolimod-vermittelte Sequestrierung im SLO [104]. Der Shift zu einer erhöhten Anzahl an IL-10-produzierenden regulatorischen B-Zellen im peripheren Blut führte bei Mäusen mit

EAE zur Remission [129] und ist daher ein möglicher weiterer protektiver immunmodulatorischer Mechanismus von FTY720. Und tatsächlich führte die Applikation von Fingolimod bei Tieren, die proportional auch mehr CD23-regulatorische B-Zellen im peripheren Blut aufwiesen und auf dem Höhepunkt der EAE-Symptomatik im MP4-Modell waren, zu einer deutlichen klinischen Besserung [127]. Diese Zellpopulation war bei Mäusen, die FTY720 nach einer Krankheitsdauer von etwa 50 Tagen erhielten, allerdings wiederum nicht signifikant verändert. Es könnte sich möglicherweise um regulatorische B-Lymphozyten handeln, die dauerhaft in der Marginalzone von Keimzentren ansässig sind. Diese werden in einem inflammatorischen Milieu oder durch die Applikation von KFA zur Proliferation und Sekretion von IL-10 angeregt [130], weshalb sie im akuten Verlauf der MP4-EAE vermehrt vorzufinden sind.

Die Mechanismen, die für den Austritt von T-Zellen aus SLOs benötigt werden, sind mittlerweile ausreichend bekannt, während die einzelnen Schritte, die B-Zellen absolvieren, noch unzureichend verstanden sind [92, 131]. Sinha *et al.* postulierten, dass die S1P-vermittelte Chemotaxis eine untergeordnete Rolle für das Verlassen von B-Lymphozyten aus den SLOs spielt [132]. Vielmehr sei es ein komplexes Zusammenspiel aus S1P₁R, S1P₃R und dem vorherrschenden inflammatorischen Milieu im SLO, das den Austritt von B-Lymphozyten steuert und reguliert. Dies stellt einen möglichen Grund für das verminderte Ansprechen von B-Zellen in diesem Modell auf die Wirkung von Fingolimod dar. Darüber hinaus kann die Synthese von S1P durch entzündliche Reize erhöht und somit die S1P₁-vermittelte Wirkung verstärkt werden, wodurch mehr Lymphozyten die SLOs verlassen können [133, 134]. Auch die Expression des S1P₁R kann durch inflammatorische Einflüsse aus dem Umfeld dirigiert werden, allerdings war dies bisher nur für T-Zellen nachweisbar [135, 136]. Ergebnisse von B6-Mäusen unter der Behandlung mit FTY720 bezüglich des Vorhandenseins des S1P₁R auf der Zelloberfläche von T- sowie B-Lymphozyten zeigten in der Durchflusszytometrie zwar keine signifikanten Unterschiede zwischen Zellen aus dem peripheren Blut oder Lymphknoten [127]. Allerdings war der Anteil an S1P₁⁺-CD4⁺-T- und insbesondere S1P₁⁺-CD19⁺-B-Zellen im peripheren Blut deutlich erhöht, was mit den Befunden von Matloubian *et al.* übereinstimmt [111].

Ein weiterer Grund für einige Diskrepanzen zwischen den hier vorgestellten Ergebnissen in der chronischen Kohorte und denen von oben beschriebenen Studien liegt womöglich in der Charakterisierung der B-Zell-Subsets begründet. Einerseits besitzen murine B-Zellen andere Oberflächenmarker als humane, die zur Identifizierung der verschiedenen Subtypen eingesetzt werden können. Andererseits erfolgte die Charakterisierung in den Experimenten der hier beschriebenen Studie durch ein detaillierteres Panel an Oberflächenmarkern. Bis zu diesem Zeitpunkt und zum aktuellen Wissensstand ist diese Studie die erste, die umfangreich die B-Zell-Subtypen-Verteilung in der Milz in einer B-Zell-abhängigen EAE unter der Behandlung mit Fingolimod untersuchte.

In der hier dargestellten Studie wurden die klinischen Auswirkungen der zentralen Schäden infolge der Demyelinisierung anhand des EAE-Scores ermittelt. Hierbei zeigte sich keine signifikante Besserung der Symptome unter der Behandlung mit FTY720 nach der Krankheitsdauer von etwa 50 Tagen, während hingegen Mäuse, die Fingolimod in der akuten Erkrankungsphase erhalten hatten, einen deutlich milderen Krankheitsverlauf aufwiesen [127]. Dies lässt einerseits die Interpretation zu, dass Fingolimod bereits entstandene Schäden im ZNS der Mäuse nicht mehr ausreichend beeinflussen oder gar rückgängig machen kann. Allerdings sei an diesem Punkt auf die Limitationen der EAE-Gradeinteilung hingewiesen, die nur die motorische Komponente der Symptome abfragt und weitere potenzielle Krankheitszeichen des sensorischen oder visuellen Systems außer Acht lässt.

Die Hypothese, dass Fingolimod die im ZNS entstandenen Schäden in diesem Modell nicht ungeschehen machen kann, bestätigte sich in der Immunhistologie der murinen Kleinhirne. Die Gesamtanzahl an Infiltraten, bezogen auf die ausgewertete Fläche, zeigte sich unter der Behandlung mit Fingolimod nach 50 Tagen Krankheitsdauer nicht signifikant verändert. Diffuse Infiltrate blieben ebenfalls unbeeinträchtigt, allerdings war die Zahl an Non-B-Zell-Infiltraten unter FTY720 deutlich reduziert. Dies spiegelt sich in den verminderten CD4⁺-T-Zellen im peripheren Blut unter der Behandlung wieder. Anders verhielt es sich bei den Mäusen, die FTY720 auf dem Höhepunkt der MP4-EAE erhielten: Die Gesamtzahl der Infiltrate, bezogen auf die Kleinhirnmarkfläche, sowie die der diffusen und Non-B-Zell-Infiltrate zeigten sich in der behandelten Kohorte signifikant vermindert [127]. Dies unterstützt die Theorie, dass

der zentrale Wirkmechanismus von Fingolimod durch die Sequestrierung von Lymphozyten in den SLOs erfolgt und dadurch die Einwanderung von autoreaktiven Immunzellen ins ZNS unterbunden wird [89, 112]. Im Kontrast dazu steht die geringe Wirksamkeit von FTY720 auf die B-Zell-haltigen Infiltrate in der chronischen MP4-EAE. Ebenfalls ähnliche Ergebnisse zeigten sich bei der Untersuchung der Peripherie: Die durchflusszytometrischen Ergebnisse wiesen keine Auswirkung von FTY720 auf die CD19⁺-B-Zellen nach und obwohl die Gesamtheit der B220⁺-B-Lymphozyten in der Milz unter der Therapie mit Fingolimod größer war, blieben die untersuchten Subsets unbeeinträchtigt.

Um die B-Zell-Aggregate weiter zu charakterisieren, wurden sie hinsichtlich des Vorhandenseins von lymphatischen Markern untersucht, um eine Evolution in TLOs zu ermitteln. In der chronischen Kohorte konnte unter der Behandlung mit FTY720 eine größere Anzahl an low-grade und eine signifikante Reduktion an mid-grade Aggregaten verzeichnet werden. In Verbindung mit der Abwesenheit von high-grade Aggregaten und der Detektion eines Aggregates ohne lymphatische Marker weist dies auf einen möglichen hemmenden Effekt von Fingolimod auf die Evolution in lymphatisch-follikuläres Gewebe und die Ausbildung von TLOs hin, welche bei SPMS-Patienten mit einem klinisch gravierenderen Verlauf assoziiert werden konnten [50]. Wie oben bereits beschrieben, führte die Applikation von FTY720 im akuten Krankheitsstadium zur effektiven Sequestrierung von T- und B-Zellen in den SLOs. Hiermit erklärt sich auch die signifikante Reduktion aller Infiltrate, bezogen auf die ausgewertete Fläche, sowie der diffusen und Non-B-Zell-Infiltrate in diesem Studienaufbau [127]. Darüber hinaus konnten keine B-Zell-Aggregate in der mit Fingolimod behandelten Kohorte nachgewiesen werden.

Ein Diskussionspunkt bleibt weiterhin, ob TLOs anhaltenden Zustrom von Lymphozyten aus der Peripherie benötigen, um ihre lymphatische Struktur aufrechtzuerhalten, oder ob sie nach ihrer Formation vollständig autark agieren können. Für den lymphozytären Nachschub aus dem peripheren Blut ist die Überwindung der BHS ein entscheidender Schritt, in den viele Medikamente, wie beispielsweise Natalizumab, eingreifen. Natalizumab ist ein monoklonaler Antikörper, der die Adhäsion und damit die Transmigration insbesondere von T-Lymphozyten unterbindet [69]. Da dieses Medikament jedoch die PML als potenzielle letale Nebenwirkung

auslösen kann, besteht ein hohes Interesse an weiteren Medikamenten für die Behandlung der MS, die mögliche protektive Auswirkungen auf die BHS zeigen. Direkte Effekte von FTY720 auf die BHS sind umstritten, allerdings konnten diese bisher nur *in vitro* [137, 138] oder in Tiermodellen [139, 140] untersucht werden und ergaben widersprüchliche Ergebnisse. Die hier präsentierten Befunde sprechen allerdings eher für TLOs als inerte Strukturen, die nicht auf einen konstanten Zustrom von Immunzellen aus der Peripherie angewiesen sind. Einmal etabliert, scheinen sie sich selbst aufrechtzuerhalten. Falls dies ebenfalls in humanen Studien bestätigt werden kann, sind weitere Forschungen bezüglich der pathogenetischen Rolle von TLOs in der Aufrechterhaltung der MS erforderlich.

Fingolimod kann die BHS überwinden und liegt im ZNS als aktiver Metabolit vor, der an all seine S1P-Rezeptor-Subtypen binden kann, die von zentralnervösen Zellen exprimiert werden [141]. Wirkmechanismen von FTY720, die unabhängig von der Sequestrierung von peripheren Lymphozyten sind, waren daher Bestandteil verschiedener Studien [140, 142-145]. S1P₁ und S1P₃ sind insbesondere auf der Oberfläche von Astrozyten zu finden, welche für die regenerative Gliose nach einer inflammatorischen Läsion zuständig sind [1, 143]. In einigen Tiermodellen konnte durch die Therapie mit Fingolimod nicht nur eine reduzierte Neuroinflammation, sondern darüber hinaus eine potenzielle Verbesserung der Gewebsintegrität im ZNS aufgezeigt werden [140, 142]. *In vitro* und *in vivo* konnte nachgewiesen werden, dass die S1P-vermittelte Neurodegeneration durch Astrozyten durch den funktionellen S1P-Rezeptoren-Antagonisten FTY720 unterbunden werden und damit neuroprotektive Effekte vermitteln kann [143]. Aufgrund dieser Befunde und der Tatsache, dass für die PPMS bis vor der Etablierung von Ocrelizumab keine wirksame Therapieoption zur Verfügung stand, wurde FTY720 in der Behandlung dieser wissenschaftlich erprobt [106]. Die erzielten Ergebnisse erfüllten jedoch nicht die Erwartungen: Fingolimod limitierte zwar die inflammatorische Aktivität in PPMS-Patienten, jedoch konnten keine protektiven Auswirkungen auf die Gehirnatrophie und die rapide fortschreitende Krankheitsprogression belegt werden. Potenzielle Auswirkungen in der SPMS wurden bis zu diesem Zeitpunkt nicht untersucht.

Siponimod (BAF312) stellt eine zukünftige Therapieoption für die SPMS dar. Dabei handelt es sich, wie bei FTY720, um einen funktionellen S1P-Rezeptor-Antagonisten,

der allerdings im Gegensatz zu seinem Vorgänger selektiv auf die Rezeptoren S1P₁ sowie S1P₅ wirkt [146]. Vorteilig bei BAF312 ist die Reduktion der durch S1P₃-vermittelten kardialen Nebenwirkungen. Die Testung von Siponimod als Medikament in der Behandlung der RRMS erbrachte vielversprechende Ergebnisse [147], allerdings war die Suche nach einer therapeutischen Option für die SPMS von größerer Bedeutung. Kappos *et al.* konnten in einer randomisierten, doppelblinden Placebo-kontrollierten Studie zeigen, dass Siponimod bei Patienten mit SPMS einen antiinflammatorischen Effekt, aber darüber hinaus auch neuroprotektive und damit anti-degenerative Wirkungen entfaltet [148]. Eine verminderte Krankheitsprogression innerhalb von drei Monaten, eine Abnahme der aktiven Gadolinium-aufnehmenden ZNS-Läsionen und die Protektion vor neuen Entzündungsherden in der weißen Substanz sowie die Minderung der Hirnatrophie im Vergleich zur Placebo-Gruppe sind allesamt Merkmale einer vielfältigen Beeinflussung der MS durch BAF312. Das Medikament wurde bereits in den Vereinigten Staaten von Amerika und von der europäischen Arzneimittelagentur zugelassen und wird aller Voraussicht nach Ende 2019 in Deutschland von Novartis auf den Markt gebracht [149]. Damit steht erstmals ein funktioneller S1P-Rezeptor-Antagonist als therapeutische Option für die Behandlung der SPMS zur Verfügung, die nachweislich den Krankheitsprogress positiv beeinflussen kann.

5. Zusammenfassung

Diese Studie benutzte das MP4-Modell als B-Zell- und Antikörper-abhängige Form der EAE, um potenzielle Effekte von FTY720 auf die periphere B-Zell-Distribution und die zentrale B-Zell-Aggregation im chronischen Verlauf der Erkrankung zu erforschen. Es konnte gezeigt werden, dass unter der Therapie mit Fingolimod insbesondere CD4⁺-T-Zellen effektiv in den SLOs zurückgehalten werden, ebenso wie B220⁺-B-Zellen. Dabei blieben essenzielle zelluläre Funktionen, wie die humorale Immunantwort der B-Lymphozyten, unbeeinträchtigt. Durch die Behandlung mit FTY720 konnte, gemessen am EAE-Score, im chronischen Krankheitsverlauf keine Verbesserung der

Symptomatik ermittelt werden, was sich auch in der Gesamtanzahl der zellulären Infiltrate im ZNS widerspiegelte, die durch das Medikament nicht reduziert wurden. Dicht gepackte perivaskuläre Zellansammlungen aus überwiegend B220⁺-B-Zellen sowie CD3⁺-T-Zellen wurden als B-Zell-Aggregate definiert und anhand von Markern, die als Hinweis für eine lymphatische Gewebsevolution sprechen, als TLOs charakterisiert. Zwar konnte Fingolimod bereits etablierte B-Zell-Aggregate mit lymphatischen Merkmalen nicht auflösen, jedoch schien es die Entwicklung in TLOs zu inhibieren. Diese Studie konzentrierte sich insbesondere auf die inflammatorische Komponente der MP4-EAE, während die degenerativen Pathomechanismen nicht unter der Behandlung von Fingolimod erforscht wurden. Siponimod, als nachfolgender funktioneller SIP-Rezeptor-Antagonist, zeigte in Studien einen beachtlichen Effekt in der Behandlung der SPMS. Dessen Wirkungen auf B-Zellen und insbesondere auf B-Zell-Aggregate sowie TLOs werden in Zukunft noch zu ermitteln sein.

6. Literaturverzeichnis

1. Sospedra, M. and R. Martin, *Immunology of multiple sclerosis*. Annu Rev Immunol, 2005. **23**: p. 683-747.
2. Reich, D.S., C.F. Lucchinetti, and P.A. Calabresi, *Multiple Sclerosis*. N Engl J Med, 2018. **378**(2): p. 169-180.
3. Stangel, M., et al., *Multiple Sklerose und andere autoimmune ZNS-Erkrankungen*, in *Autoimmunerkrankungen in der Neurologie*. 2018, Springer Verlag. p. 1-103.
4. Leray, E., et al., *Epidemiology of multiple sclerosis*. Rev Neurol (Paris), 2016. **172**(1): p. 3-13.
5. Masuhr, K.F., F. Masuhr, and M. Neumann, *Multiple Sklerose*, in *Duale Reihe Neurologie*. 2013, Thieme Verlag. p. 295-304.
6. Noseworthy, J.H., et al., *Multiple sclerosis*. N Engl J Med, 2000. **343**(13): p. 938-52.
7. Clanet, M., *Jean-Martin Charcot. 1825 to 1893*. Int MS J, 2008. **15**(2): p. 59-61.
8. Pohl, D., *Epstein-Barr virus and multiple sclerosis*. J Neurol Sci, 2009. **286**(1-2): p. 62-4.
9. Pierrot-Deseilligny, C. and J.C. Souberbielle, *Vitamin D and multiple sclerosis: An update*. Mult Scler Relat Disord, 2017. **14**: p. 35-45.
10. Poorolajal, J., et al., *Effect of smoking on multiple sclerosis: a meta-analysis*. J Public Health (Oxf), 2017. **39**(2): p. 312-320.
11. Van Dyken, P. and B. Lacoste, *Impact of Metabolic Syndrome on Neuroinflammation and the Blood-Brain Barrier*. Front Neurosci, 2018. **12**: p. 930.
12. Wunsch, M., et al., *The enteric nervous system is a potential autoimmune target in multiple sclerosis*. Acta Neuropathol, 2017. **134**(2): p. 281-295.
13. Sharif, K., H. Amital, and Y. Shoenfeld, *The role of dietary sodium in autoimmune diseases: The salty truth*. Autoimmun Rev, 2018. **17**(11): p. 1069-1073.
14. Gold, R., B. Hemmer, and H. Wiendl, *Diagnose und Therapie der Multiplen Sklerose*, in *Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie*. 2012, AWMF.
15. Campbell, G. and D. Mahad, *Neurodegeneration in Progressive Multiple Sclerosis*. Cold Spring Harb Perspect Med, 2018. **8**(10).
16. Stys, P.K., et al., *Will the real multiple sclerosis please stand up?* Neuroscience, 2012.
17. Hemmer, B., M. Kerschensteiner, and T. Korn, *Role of the innate and adaptive immune responses in the course of multiple sclerosis*. The Lancet Neurology, 2015. **14**(4): p. 406-419.
18. Loma, I. and R. Heyman, *Multiple Sclerosis: Pathogenesis and Treatment*. Current Neuropharmacology, 2011. **9**.
19. Wu, G.F. and E. Alvarez, *The immunopathophysiology of multiple sclerosis*. Neurol Clin, 2011. **29**(2): p. 257-78.
20. Lassmann, H., *Multiple Sclerosis Pathology*. Cold Spring Harb Perspect Med, 2018. **8**(3).
21. Prineas, J.W., et al., *Multiple sclerosis. Pathology of recurrent lesions*. Brain, 1993. **116** (Pt 3): p. 681-93.
22. Hauser, S.L. and C.H. Smith, *B-Cell Depletion with Rituximab in Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis (HERMES)*. N Engl J Med, 2008. **358**: p. 676-88.
23. Salzer, J., et al., *Rituximab in multiple sclerosis: A retrospective observational study on safety and efficacy*. Neurology, 2016. **87**(20): p. 2074-2081.
24. Hauser, S.L., et al., *Ocrelizumab versus Interferon Beta-1a in Relapsing Multiple Sclerosis*. N Engl J Med, 2017. **376**(3): p. 221-234.
25. Montalban, X., et al., *Ocrelizumab versus Placebo in Primary Progressive Multiple Sclerosis*. N Engl J Med, 2017. **376**(3): p. 209-220.
26. Meca-Lallana, J.E., et al., *Plasma exchange for steroid-refractory relapses in multiple sclerosis: an observational, MRI pilot study*. Clin Ther, 2013. **35**(4): p. 474-85.

27. Keegan, M., et al., *Relation between humoral pathological changes in multiple sclerosis and response to therapeutic plasma exchange*. *Lancet*, 2005. **366**(9485): p. 579-82.
28. Lucchinetti, C., *Pathological heterogeneity of idiopathic central nervous system inflammatory demyelinating disorders*. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2008. **318**: p. 19-43.
29. Kuerten, S., et al., *Identification of a B cell-dependent subpopulation of multiple sclerosis by measurements of brain-reactive B cells in the blood*. *Clin Immunol*, 2014. **152**(1-2): p. 20-4.
30. von Budingen, H.C., et al., *Clonally expanded plasma cells in the cerebrospinal fluid of MS patients produce myelin-specific antibodies*. *Eur J Immunol*, 2008. **38**(7): p. 2014-23.
31. Meinl, E., M. Krumbholz, and R. Hohlfeld, *B lineage cells in the inflammatory central nervous system environment: migration, maintenance, local antibody production, and therapeutic modulation*. *Ann Neurol*, 2006. **59**(6): p. 880-92.
32. Stangel, M., et al., *The utility of cerebrospinal fluid analysis in patients with multiple sclerosis*. *Nat Rev Neurol*, 2013. **9**(5): p. 267-76.
33. Brandle, S.M., et al., *Distinct oligoclonal band antibodies in multiple sclerosis recognize ubiquitous self-proteins*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2016. **113**(28): p. 7864-9.
34. Greenfield, A.L. and S.L. Hauser, *B-cell Therapy for Multiple Sclerosis: Entering an era*. *Ann Neurol*, 2018. **83**(1): p. 13-26.
35. Sabatino, J.J., Jr., S.S. Zamvil, and S.L. Hauser, *B-Cell Therapies in Multiple Sclerosis*. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2018.
36. Rahmzadeh, R., et al., *B cells in multiple sclerosis therapy-A comprehensive review*. *Acta Neurol Scand*, 2018. **137**(6): p. 544-556.
37. Picker, L.J. and E.C. Butcher, *Physiological and molecular mechanisms of lymphocyte homing*. *Annu Rev Immunol*, 1992. **10**: p. 561-91.
38. Weyand, C.M., P.J. Kurtin, and J.J. Goronzy, *Ectopic Lymphoid Organogenesis A Fast Track for Autoimmunity*. *AJP*, 2001. **159**(3): p. 787-91.
39. Hjelmstrom, P., *Lymphoid neogenesis: de novo formation of lymphoid tissue in chronic inflammation through expression of homing chemokines*. *J Leukoc Biol*, 2001. **69**(3): p. 331-9.
40. van Dinther-Janssen, A.C., et al., *Dendritic cells and high endothelial venules in the rheumatoid synovial membrane*. *J Rheumatol*, 1990. **17**(1): p. 11-7.
41. Kim, H.J., et al., *Plasma cell development in synovial germinal centers in patients with rheumatoid and reactive arthritis*. *J Immunol*, 1999. **162**(5): p. 3053-62.
42. Krenn, V., et al., *Histopathology and molecular pathology of synovial B-lymphocytes in rheumatoid arthritis*. *Histol Histopathol*, 2000. **15**(3): p. 791-8.
43. Aziz, K.E., P.J. McCluskey, and D. Wakefield, *Characterisation of follicular dendritic cells in labial salivary glands of patients with primary Sjogren syndrome: comparison with tonsillar lymphoid follicles*. *Ann Rheum Dis*, 1997. **56**(2): p. 140-3.
44. Xanthou, G., et al., *CD4 cytotoxic and dendritic cells in the immunopathologic lesion of Sjogren's syndrome*. *Clin Exp Immunol*, 1999. **118**(1): p. 154-63.
45. Soederstroem, N. and A. Bioerklund, *Organization of the invading lymphoid tissue in human lymphoid thyroiditis*. *Scand J Immunol*, 1974. **3**(3): p. 295-301.
46. Kabel, P.J., et al., *High endothelial venules present in lymphoid cell accumulations in thyroids affected by autoimmune disease: a study in men and BB rats of functional activity and development*. *J Clin Endocrinol Metab*, 1989. **68**(4): p. 744-51.
47. Prineas, J.W., *Multiple sclerosis: presence of lymphatic capillaries and lymphoid tissue in the brain and spinal cord*. *Science*, 1979. **203**(4385): p. 1123-5.
48. Magliozzi, R., et al., *Intracerebral expression of CXCL13 and BAFF is accompanied by formation of lymphoid follicle-like structures in the meninges of mice with relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis*. *J Neuroimmunol*, 2004. **148**(1-2): p. 11-23.

49. Serafini, B., R. Magliozzi, and F. Aloisi, *Detection of Ectopic B-cell Follicles with Germinal Centers in the Meninges of Patients with Secondary Progressive Multiple Sclerosis*. *Brain Pathology*, 2004. **14**: p. 164-74.
50. Magliozzi, R., et al., *Meningeal B-cell follicles in secondary progressive multiple sclerosis associate with early onset of disease and severe cortical pathology*. *Brain*, 2007. **130**(4): p. 1089-104.
51. Howell, O.W., et al., *Meningeal inflammation is widespread and linked to cortical pathology in multiple sclerosis*. *Brain*, 2011. **134**(Pt 9): p. 2755-71.
52. Lehmann-Horn, K., et al., *B cell repertoire expansion occurs in meningeal ectopic lymphoid tissue*. *JCI Insight*, 2016. **1**(20): p. e87234.
53. Mitsdoerffer, M. and A. Peters, *Tertiary Lymphoid Organs in Central Nervous System Autoimmunity*. *Front Immunol*, 2016. **7**(451).
54. Kabat, E.A., A. Wolf, and A.E. Bezer, *The Rapid Production of Acute Disseminated Encephalomyelitis in Rhesus Monkeys by Injection of Heterologous and Homologous Brain Tissue with Adjuvants*. *J Exp Med*, 1947. **85**(1): p. 117-30.
55. Freund, J., E.R. Stern, and T.M. Pisani, *Isoallergic encephalomyelitis and radiculitis in guinea pigs after one injection of brain and Mycobacteria in water-in-oil emulsion*. *J Immunol*, 1947. **57**(2): p. 179-94.
56. Kopeloff, L.M. and N. Kopeloff, *Neurologic manifestations in laboratory animals produced by organ (adjuvant) emulsions*. *J Immunol*, 1947. **57**(3): p. 229-37.
57. Olitsky, P.K. and R.H. Yager, *Experimental disseminated encephalomyelitis in white mice*. *J Exp Med*, 1949. **90**(3): p. 213-24.
58. Munoz, J.J., C.C. Bernard, and I.R. Mackay, *Elicitation of experimental allergic encephalomyelitis (EAE) in mice with the aid of pertussigen*. *Cell Immunol*, 1984. **83**(1): p. 92-100.
59. Johns, T.G., et al., *Myelin oligodendrocyte glycoprotein induces a demyelinating encephalomyelitis resembling multiple sclerosis*. *J Immunol*, 1995. **154**(10): p. 5536-41.
60. Wekerle, H., et al., *Animal models*. *Ann Neurol*, 1994. **36**: p. S47-53.
61. Martin, R. and H.F. McFarland, *Immunological aspects of experimental allergic encephalomyelitis and multiple sclerosis*. *Crit Rev Clin Lab Sci*, 1995. **32**(2): p. 121-82.
62. Pettinelli, C.B. and D.E. McFarlin, *Adoptive transfer of experimental allergic encephalomyelitis in SJL/J mice after in vitro activation of lymph node cells by myelin basic protein: requirement for Lyt 1+ 2- T lymphocytes*. *J Immunol*, 1981. **127**(4): p. 1420-3.
63. McRae, B.L., et al., *Induction of active and adoptive relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) using an encephalitogenic epitope of proteolipid protein*. *J Neuroimmunol*, 1992. **38**(3): p. 229-40.
64. Farooqi, N., B. Gran, and C.S. Constantinescu, *Are current disease-modifying therapeutics in multiple sclerosis justified on the basis of studies in experimental autoimmune encephalomyelitis?* *J Neurochem*, 2010. **115**(4): p. 829-44.
65. Lim, S.Y. and C.S. Constantinescu, *Current and future disease-modifying therapies in multiple sclerosis*. *Int J Clin Pract*, 2010. **64**(5): p. 637-50.
66. Constantinescu, C.S., et al., *Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) as a model for multiple sclerosis (MS)*. *Br J Pharmacol*, 2011. **164**(4): p. 1079-106.
67. Steinman, L., *Assessment of animal models for MS and demyelinating disease in the design of rational therapy*. *Neuron*, 1999. **24**(3): p. 511-4.
68. Yednock, T.A., et al., *Prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis by antibodies against alpha 4 beta 1 integrin*. *Nature*, 1992. **356**(6364): p. 63-6.
69. Steinman, L., *Blocking adhesion molecules as therapy for multiple sclerosis: natalizumab*. *Nat Rev Drug Discov*, 2005. **4**(6): p. 510-8.
70. Steinman, L., *The discovery of natalizumab, a potent therapeutic for multiple sclerosis*. *J Cell Biol*, 2012. **199**(3): p. 413-6.

71. Lavi, E. and C.S. Constantinescu, *Part A - Experimental autoimmune (allergic) Encephalomyelitis (EAE)*, in *Experimental models of multiple sclerosis*. 2005, Springer: New York, NY. p. 1-576.
72. Mix, E., et al., *Animal models of multiple sclerosis--potentials and limitations*. Prog Neurobiol, 2010. **92**(3): p. 386-404.
73. Batoulis, H., et al., *Experimental autoimmune encephalomyelitis--achievements and prospective advances*. APMIS, 2011. **119**(12): p. 819-30.
74. Gasser, D.L., A. Goldner-Sauve, and W.F. Hickey, *Genetic control of resistance to clinical EAE accompanied by histological symptoms*. Immunogenetics, 1990. **31**(5-6): p. 377-82.
75. Fritz, R.B. and M.L. Zhao, *Active and passive experimental autoimmune encephalomyelitis in strain 129/J (H-2b) mice*. J Neurosci Res, 1996. **45**(4): p. 471-4.
76. Kuerten, S., et al., *MBP-PLP fusion protein-induced EAE in C57BL/6 mice*. J Neuroimmunol, 2006. **177**(1-2): p. 99-111.
77. Kuerten, S., et al., *MP4- and MOG:35-55-induced EAE in C57BL/6 mice differentially targets brain, spinal cord and cerebellum*. Neuroimmunology, 2007. **189**(1-2): p. 31-40.
78. Columba-Cabezas, S., et al., *Suppression of established experimental autoimmune encephalomyelitis and formation of meningeal lymphoid follicles by lymphotoxin beta receptor-Ig fusion protein*. J Neuroimmunol, 2006. **179**(1-2): p. 76-86.
79. Peters, A., et al., *Th17 cells induce ectopic lymphoid follicles in central nervous system tissue inflammation*. Immunity, 2011. **35**(6): p. 986-96.
80. Kuerten, S., et al., *Tertiary lymphoid organ development coincides with determinant spreading of the myelin-specific T cell response*. Acta Neuropathol, 2012. **124**(6): p. 861-73.
81. Batoulis, H., et al., *Central nervous system infiltrates are characterized by features of ongoing B cell-related immune activity in MP4-induced experimental autoimmune encephalomyelitis*. Clin Immunol, 2015. **158**(1): p. 47-58.
82. Vanderlugt, C.L. and S.D. Miller, *Epitope spreading in immune-mediated diseases: implications for immunotherapy*. Nat Rev Immunol, 2002. **2**(2): p. 85-95.
83. Lavi, E. and C.S. Constantinescu, *Epitope Spreading in EAE*, in *Experimental models of multiple sclerosis*. 2005, Springer: New York, NY. p. xiii, 901 p.
84. Voskuhl, R.R., et al., *Epitope spreading occurs in active but not passive EAE induced by myelin basic protein*. J Neuroimmunol, 1996. **70**(2): p. 103-11.
85. Rice, G.P., et al., *Interferon in relapsing-remitting multiple sclerosis*. Cochrane Database Syst Rev, 2001(4).
86. Patti, F., et al., *Effects of immunomodulatory treatment with subcutaneous interferon beta-1a on cognitive decline in mildly disabled patients with relapsing-remitting multiple sclerosis*. Mult Scler, 2010. **16**(1): p. 68-77.
87. Focosi, D., et al., *Progressive multifocal leukoencephalopathy: what's new?* Neuroscientist, 2010. **16**(3): p. 308-23.
88. Cohen, J.A., et al., *Oral fingolimod or intramuscular interferon for relapsing multiple sclerosis (TRANSFORMS)*. N Engl J Med, 2010. **362**(5): p. 402-15.
89. Kappos, L., *A Placebo-Controlled Trial of Oral Fingolimod in Relapsing Multiple Sclerosis (FREEDOMS)*. N Engl J Med, 2010. **362**(5): p. 387-401.
90. Janeway, C., *Immunobiology 5 : the immune system in health and disease / Charles A. Janeway, Jr. ... [et al.]*. 5 ed. 2001, New York, NY: Garland Pub.
91. Cohen, J.A. and J. Chun, *Mechanisms of fingolimod's efficacy and adverse effects in multiple sclerosis*. Ann Neurol, 2011. **69**(5): p. 759-77.
92. Cyster, J.G. and S.R. Schwab, *Sphingosine-1-phosphate and lymphocyte egress from lymphoid organs*. Annu Rev Immunol, 2012. **30**: p. 69-94.
93. Hla, T. and V. Brinkmann, *Sphingosine 1-phosphate (S1P): Physiology and the effects of S1P receptor modulation*. Neurology, 2011. **76**(8 Suppl 3): p. S3-8.

94. Cuvillier, O., *Sphingosine 1-phosphate receptors: from biology to physiopathology*. Med Sci (Paris), 2012. **28**(11): p. 951-7.
95. Mandala, S., et al., *Alteration of lymphocyte trafficking by sphingosine-1-phosphate receptor agonists*. Science, 2002. **296**(5566): p. 346-9.
96. Brinkmann, V., J.G. Cyster, and T. Hla, *FTY720: sphingosine 1-phosphate receptor-1 in the control of lymphocyte egress and endothelial barrier function*. Am J Transplant, 2004. **4**(7): p. 1019-25.
97. Brinkmann, V., et al., *Fingolimod (FTY720): discovery and development of an oral drug to treat multiple sclerosis*. Nat Rev Drug Discov, 2010. **9**(11): p. 883-97.
98. Chun, J. and H.P. Hartung, *Mechanism of action of oral fingolimod (FTY720) in multiple sclerosis*. Clin Neuropharmacol, 2010. **33**(2): p. 91-101.
99. Mehling, M., et al., *FTY720 therapy exerts differential effects on T cell subsets in multiple sclerosis*. Neurology, 2008. **71**(16): p. 1261-7.
100. Mehling, M., et al., *Th17 central memory T cells are reduced by FTY720 in patients with multiple sclerosis*. Neurology, 2010. **75**(5): p. 403-10.
101. Massberg, S. and U.H. von Andrian, *Fingolimod and sphingosine-1-phosphate--modifiers of lymphocyte migration*. N Engl J Med, 2006. **355**(11): p. 1088-91.
102. Hofmann, M., V. Brinkmann, and H.G. Zerwes, *FTY720 preferentially depletes naive T cells from peripheral and lymphoid organs*. Int Immunopharmacol, 2006. **6**(13-14): p. 1902-10.
103. Blumenfeld, S., E. Staun-Ram, and A. Miller, *Fingolimod therapy modulates circulating B cell composition, increases B regulatory subsets and production of IL-10 and TGFbeta in patients with Multiple Sclerosis*. J Autoimmun, 2016. **70**: p. 40-51.
104. Grutzke, B., et al., *Fingolimod treatment promotes regulatory phenotype and function of B cells*. Ann Clin Transl Neurol, 2015. **2**(2): p. 119-30.
105. Cohen, J.A., et al., *Long-term (up to 4.5 years) treatment with fingolimod in multiple sclerosis: results from the extension of the randomised TRANSFORMS study*. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 2016. **87**(5): p. 468-75.
106. Lublin, F., et al., *Oral fingolimod in primary progressive multiple sclerosis (INFORMS): a phase 3, randomised, double-blind, placebo-controlled trial*. Lancet, 2016. **387**(10023): p. 1075-1084.
107. Feng, J.J. and D. Ontaneda, *Treating primary-progressive multiple sclerosis: potential of ocrelizumab and review of B-cell therapies*. Degener Neurol Neuromuscul Dis, 2017. **7**: p. 31-45.
108. Ciotti, J.R. and A.H. Cross, *Disease-Modifying Treatment in Progressive Multiple Sclerosis*. Curr Treat Options Neurol, 2018. **20**(5): p. 12.
109. Fujino, M., et al., *Amelioration of experimental autoimmune encephalomyelitis in Lewis rats by FTY720 treatment*. J Pharmacol Exp Ther, 2003. **305**(1): p. 70-7.
110. Kataoka, H., et al., *FTY720, sphingosine 1-phosphate receptor modulator, ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis by inhibition of T cell infiltration*. Cell Mol Immunol, 2005. **2**(6): p. 439-48.
111. Matloubian, M., *Lymphocyte egress from thymus and peripheral lymphoid organs is dependent on SIP receptor 1*. Nature, 2004. **427**.
112. Brinkmann, V., *FTY720 (fingolimod) in Multiple Sclerosis: therapeutic effects in the immune and the central nervous system*. Br J Pharmacol, 2009. **158**(5): p. 1173-82.
113. Morris, M.A., et al., *Transient T cell accumulation in lymph nodes and sustained lymphopenia in mice treated with FTY720*. Eur J Immunol, 2005. **35**(12): p. 3570-80.
114. Metzler, B., et al., *Modulation of T cell homeostasis and alloreactivity under continuous FTY720 exposure*. Int Immunol, 2008. **20**(5): p. 633-44.
115. Pinschewer, D.D., et al., *FTY720 Immunosuppression Impairs Effector T Cell Peripheral Homing Without Affecting Induction, Expansion, and Memory*. The Journal of Immunology, 2000. **164**(11): p. 5761-5770.

116. Brinkmann, V., et al., *FTY720 alters lymphocyte homing and protects allografts without inducing general immunosuppression*. *Transplant Proc*, 2001. **33**(1-2): p. 530-1.
117. Gholamnezhadjafari, R., et al., *Effect of FTY720 (fingolimod) on graft survival in renal transplant recipients: a systematic review protocol*. *BMJ Open*, 2016. **6**(4): p. e010114.
118. Tedesco-Silva, H., et al., *Randomized controlled trial of FTY720 versus MMF in de novo renal transplantation*. *Transplantation*, 2006. **82**(12): p. 1689-97.
119. Budde, K., et al., *FTY720 (fingolimod) in renal transplantation*. *Clin Transplant*, 2006. **20 Suppl 17**: p. 17-24.
120. Salvadori, M., et al., *FTY720 versus MMF with cyclosporine in de novo renal transplantation: a 1-year, randomized controlled trial in Europe and Australasia*. *Am J Transplant*, 2006. **6**(12): p. 2912-21.
121. Tedesco-Silva, H., et al., *FTY720 and everolimus in de novo renal transplant patients at risk for delayed graft function: results of an exploratory one-yr multicenter study*. *Clin Transplant*, 2009. **23**(5): p. 589-99.
122. Kowarik, M.C., *Differential effects of fingolimod (FTY720) on immune cells in the CSF and blood of patients with MS*. *Neurology*, 2011. **76**: p. 1214-21.
123. Claes, N., et al., *Compositional changes of B and T cell subtypes during fingolimod treatment in multiple sclerosis patients: a 12-month follow-up study*. *PLoS One*, 2014. **9**(10): p. e111115.
124. Nakamura, M., et al., *Differential effects of fingolimod on B-cell populations in multiple sclerosis*. *Mult Scler*, 2014. **20**(10): p. 1371-80.
125. Nagahara, Y., M. Ikekita, and T. Shinomiya, *T cell selective apoptosis by a novel immunosuppressant, FTY720, is closely regulated with Bcl-2*. *Br J Pharmacol*, 2002. **137**(7): p. 953-62.
126. Nagahara, Y., et al., *Evidence that FTY720 induces T cell apoptosis in vivo*. *Immunopharmacology*, 2000. **48**(1): p. 75-85.
127. Bail, K., et al., *Differential effects of FTY720 on the B cell compartment in a mouse model of multiple sclerosis*. *J Neuroinflammation*, 2017. **14**(1): p. 148.
128. von Andrian, U.H. and T.R. Mempel, *Homing and cellular traffic in lymph nodes*. *Nat Rev Immunol*, 2003. **3**(11): p. 867-78.
129. Fillatreau, S., et al., *B cells regulate autoimmunity by provision of IL-10*. *Nat Immunol*, 2002. **3**(10): p. 944-50.
130. Gray, M., et al., *Apoptotic cells protect mice from autoimmune inflammation by the induction of regulatory B cells*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007. **104**(35): p. 14080-5.
131. Schwab, S.R. and J.G. Cyster, *Finding a way out: lymphocyte egress from lymphoid organs*. *Nat Immunol*, 2007. **8**(12): p. 1295-301.
132. Sinha, R.K., et al., *B lymphocytes exit lymph nodes through cortical lymphatic sinusoids by a mechanism independent of sphingosine-1-phosphate-mediated chemotaxis*. *Immunity*, 2009. **30**(3): p. 434-46.
133. Jung, I.D., et al., *Sphingosine kinase inhibitor suppresses a Th1 polarization via the inhibition of immunostimulatory activity in murine bone marrow-derived dendritic cells*. *Int Immunol*, 2007. **19**(4): p. 411-26.
134. Hammad, S.M., et al., *Dual and distinct roles for sphingosine kinase 1 and sphingosine 1 phosphate in the response to inflammatory stimuli in RAW macrophages*. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, 2008. **85**(3-4): p. 107-14.
135. Debes, G.F., et al., *Chemokine receptor CCR7 required for T lymphocyte exit from peripheral tissues*. *Nat Immunol*, 2005. **6**(9): p. 889-94.
136. Brown, M.N., et al., *Chemoattractant receptors and lymphocyte egress from extralymphoid tissue: changing requirements during the course of inflammation*. *J Immunol*, 2010. **185**(8): p. 4873-82.
137. Nishihara, H., et al., *Fingolimod prevents blood-brain barrier disruption induced by the sera from patients with multiple sclerosis*. *PLoS One*, 2015. **10**(3): p. e0121488.

138. Schuhmann, M.K., et al., *Fingolimod (FTY720-P) Does Not Stabilize the Blood-Brain Barrier under Inflammatory Conditions in an in Vitro Model*. *Int J Mol Sci*, 2015. **16**(12): p. 29454-66.
139. Balatoni, B., et al., *FTY720 sustains and restores neuronal function in the DA rat model of MOG-induced experimental autoimmune encephalomyelitis*. *Brain Res Bull*, 2007. **74**(5): p. 307-16.
140. Foster, C.A., et al., *FTY720 rescue therapy in the dark agouti rat model of experimental autoimmune encephalomyelitis: expression of central nervous system genes and reversal of blood-brain-barrier damage*. *Brain Pathol*, 2009. **19**(2): p. 254-66.
141. Miron, V.E., et al., *Fingolimod (FTY720) enhances remyelination following demyelination of organotypic cerebellar slices*. *Am J Pathol*, 2010. **176**(6): p. 2682-94.
142. Choi, J.W., et al., *FTY720 (fingolimod) efficacy in an animal model of multiple sclerosis requires astrocyte sphingosine 1-phosphate receptor 1 (SIP1) modulation*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011. **108**(2): p. 751-6.
143. Colombo, E., et al., *Fingolimod may support neuroprotection via blockade of astrocyte nitric oxide*. *Ann Neurol*, 2014. **76**(3): p. 325-37.
144. Groves, A., Y. Kihara, and J. Chun, *Fingolimod: direct CNS effects of sphingosine 1-phosphate (SIP) receptor modulation and implications in multiple sclerosis therapy*. *J Neurol Sci*, 2013. **328**(1-2): p. 9-18.
145. Hunter, S.F., J.D. Bowen, and A.T. Reder, *The Direct Effects of Fingolimod in the Central Nervous System: Implications for Relapsing Multiple Sclerosis*. *CNS Drugs*, 2016. **30**(2): p. 135-47.
146. Gergely, P., et al., *The selective sphingosine 1-phosphate receptor modulator BAF312 redirects lymphocyte distribution and has species-specific effects on heart rate*. *Br J Pharmacol*, 2012. **167**(5): p. 1035-47.
147. Selmaj, K., et al., *Siponimod for patients with relapsing-remitting multiple sclerosis (BOLD): an adaptive, dose-ranging, randomised, phase 2 study*. *Lancet Neurol*, 2013. **12**(8): p. 756-67.
148. Kappos, L., et al., *Siponimod versus placebo in secondary progressive multiple sclerosis (EXPAND): a double-blind, randomised, phase 3 study*. *Lancet*, 2018. **391**(10127): p. 1263-1273.
149. Novartis. *Novartis announces FDA and EMA filing acceptance of siponimod, the first and only drug shown to meaningfully delay disability progression in typical SPMS patients*. 2018 [cited 2019 15.02.2019].

7. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Krankheitsverläufe der MS.....	4
Abbildung 2: Studiendesign.....	15
Abbildung 3: Analyse des Lebergewebes.....	17
Abbildung 4: Score-Evaluation.....	26
Abbildung 5: ELISpot-Auswertung MP4-spezifischer B-Zellen.....	27
Abbildung 6: Evaluation der humoralen Immunantwort mittels ELISA.....	28
Abbildung 7: Durchflusszytometrische Untersuchung von T- und B-Zellen aus dem peripheren Blut unter der Behandlung mit FTY720.....	29
Abbildung 8: Durchflusszytometrische Untersuchung von B-Zell-Subsets in der Milz.....	30
Abbildung 9: Übersicht über Non-B-Zell-Infiltrate, diffuse Infiltrate und B-Zell-Aggregate.....	32
Abbildung 10: Auswertung der Infiltrate und B-Zell-Aggregate.....	32
Abbildung 11: Übersicht über die TLO-Marker.....	33
Abbildung 12: Auswertung der TLO-Marker.....	33

8. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Antikörper für die Durchflusszytometrie.....	20
Tabelle 2: Verwendete Antikörper für die Immunhistochemie.....	23

Danksagung

Diese Seite wird aus datenschutzrechtlichen Gründen nicht angezeigt.