Aus dem Institut für Medizinische Immunologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Untersuchung der natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) unter Fingolimod-Behandlung

Examination of natural killer cells (NK cells) during Fingolimod treatment

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Svenja Christine Schwichtenberg

Datum der Promotion: 30.11.2023

Inhaltsverzeichnis

Tabellenverzeichnis iii

Abbildungsverzeichnis iv

Abkürzungsverzeichnis v

Zusammenfassung 1

1 Einleitung 3

1.1 Multiple Sklerose 3

1.2 NK-Zellen und ihre Rolle in der MS 4

1.3 Fingolimod und sein Effekt auf NK-Zellen 7

1.4 Ziel der vorliegenden Arbeit und Bedeutung für das Fachgebiet 8

2 Methodik 9

2.1 Studiendesign 9

2.2 Erhebung der klinischen Daten 11

2.3 Erhebung der immunologischen Daten 12

2.3.1 PBMC-Isolation und Kryokonservierung 12

2.3.2 Vorbereitung der durchflusszytometrischen Experimente 13

2.3.3 Auftauen der Zellen 14

2.3.4 Färbung von Oberflächenmolekülen 14

2.4 Analyse der immunologischen Daten 16

2.5 Analyse der klinischen Daten 17

2.6 Statistische Auswertung 17

3 Ergebnisse 19

3.1 Beschreibung der Studienkohorte 19

3.2 Analyse der klinischen Daten 19

3.3 Analyse der immunologischen Daten 22

3.3.1 Manuelle Analyse der immunologischen Daten 22

3.3.2 Automatisierte Analyse der immunologischen Daten unter Verwendung des unsupervidierten Clustering-Algorithmuses FlowSOM 31

3.4 Vergleichende Analysen der klinischen und immunologischen Daten 35

3.4.1 Vergleichende Analyse der MC-Verteilung in Respondern und Non-Respondern 35
3.4.2 Assoziationsanalysen mit bestimmten NK-Zellsubpopulation und verschiedenen klinischen Parametern....36
4 Diskussion....38
4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse....38
4.2 Interpretation und Einbettung der Ergebnisse in den bisherigen Forschungsstand....38
4.3 Limitationen der Studie....44
4.4 Implikationen für die weitere Forschung....45
5 Schlussfolgerungen....47
Literaturverzeichnis....48
Eidesstattliche Versicherung....61
Anteilserklärung an der erfolgten Publikation....62
Auszug aus der Journal Summary List....64
Druckexemplar der Publikation....66
Lebenslauf: Svenja Schwichtenberg....81
Komplette Publikationsliste....83
Danksagung....84

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1. Panel-Design für die 14-Marker-NK-Zell-Phänotypisierung unter Verwendung des CytoFLEX LX Durchflusszytometers (eigene Darstellung) 13
Tabelle 2. Baseline Daten der Studienkohorte (übersetzt und modifiziert nach [110]) 19
Tabelle 3. Klinische Daten der Studienkohorte (übersetzt und modifiziert nach [110]) 21
Tabelle 4. Zusammenfassung der Ergebnisse der manuellen Analyse (übersetzt und modifiziert nach [110]) 30
Tabelle 5. Zusammenfassung der Ergebnisse der automatisierten FlowSOM-Analyse (eigene Darstellung) 34

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1. Rolle der NK-Zellen in der Pathogenese der MS (eigene Darstellung). 6
Abbildung 2. Studiendesign (eigene Darstellung). 10
Abbildung 3. Gating Strategie (übersetzt aus [110]) 15
Abbildung 4. Zunahme des NK-Zellanteils während der Fingolimod-Behandlung (übersetzt und modifiziert nach [110]) 23
Abbildung 5. Veränderung der klassischen NK-Zellsubpopulationen $CD56^{bright}$ und $CD56^{dim}CD16^{+}$ während der Fingolimod-Behandlung (übersetzt und modifiziert nach [110]) 25
Abbildung 6. Veränderung besonders reifer NK-Zellsubpopulationen während der Fingolimod-Behandlung (übersetzt und modifiziert nach [110]) 26
Abbildung 7. Veränderung der Chemokinrezeptor CCR7-exprimierenden $CD56^{dim}$ NK-Zellen während der Fingolimod-Behandlung (übersetzt und modifiziert nach [110]) 27
Abbildung 8. Veränderung des NK-Zellanteils mit aktivierenden Rezeptoren während der Fingolimod-Behandlung (übersetzt und modifiziert nach [110]) 29
Abbildung 9. Unsupervidierte Clustering-Analyse aller $CD56^{+}$ NK-Zellen der Studienkohorte (übersetzt und modifiziert nach [110]) 33
Abbildung 10. Heatmap zur Visualisierung der Marker-Expression der FlowSOM-Metacluster(MC) (modifiziert nach [110]) 33
Abbildung 11. Visualisierung der Metacluster(MC)-Verteilung in der Responder- und Non-Respondergruppe (übersetzt und modifiziert nach [110]) 35

Abkürzungsverzeichnis

A	area / Fläche
ADCC	antibody dependent cell-mediated cytotoxicity / Antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität
AE	adverse event / unerwünschtes Ereignis
Alexa	Alexa Fluor
APC	Allophycocyanin
ARR	annualized relapse rate / jährliche Schubrate
BP	band-pass
BV	Brilliant Violet
CTC	Common Toxicity Criteria
CY	Cyanine
Cy5.5	Cyanin 5.5
DMSO	Dimethylsulfoxid
EAE	experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis
EDSS	Expanded Disability Status Scale
EMA	Europäische Arzneimittel-Agentur
FA	funktionelle Aktivität
FCS	fötales Kälberserum
FMO	fluorescence-minus-one
FSC	forward scatter / Vorwärtsstreulicht
GEE	generalized estimating equation / generalisierte Schätzgleichung
H	hight / Höhe
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N-2-ethansulfonsäure
IFN-γ	Interferon-gamma
ILCs	Innate lymphoid cells / angeborene lymphatische Zellen
KI	Konfidenzintervall
LK	Lymphknoten
MANOVA	multivariate non-parametric repeated-measures analysis of variance / multivariate Varianzanalyse
MC	Metacluster
MFI	mittlere Fluoreszenzintensität
MRT	Magnetresonanztomographie
MS	Multiple Sklerose
MSFC	Multiple Sclerosis Functional Composite
MST	minimal spanning tree

NCR	natural cytotoxicity receptor
NCRC	NeuroCure Clinical Research Center
NEDA	no evidence of disease activity
NK	natürliche Killer
ns	nicht signifikant
PB	peripheral blood / peripheres Blut
PBMCs	periphere mononukleäre Zellen
PBS	phosphatgepufferter Kochsalzlösung
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin-Chlorophyll-Protein-Komplex
PPMS	primär progrediente Multiple Sklerose
RRMS	schubförmig remittierende Multiple Sklerose
S1P	Sphingosin-1-Phosphat
S1PR	Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptor
SAE	serious adverse event / schwerwiegendes unerwünschtes Ereignis
SLO	sekundäre lymphatische Organe
SPMS	sekundär progrediente MS
SSC	side scatter / Seitwärtsstreulicht
STD	Standardabweichung
t-bet	T-box expressed in T cells
TH1-Zellen	T-Helfer-1-Zellen
ZNS	zentrales Nervensystem

Zusammenfassung

Fingolimod (FTY720, Gilenya®), ein funktioneller Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptor (S1PR) Antagonist, ist seit 2011 in der Europäischen Union ein zugelassenes Medikament zur Behandlung der Multiple Sklerose (MS). Es bewirkt das Zurückhalten von $S1PR_1$-exprimierenden Immunzellen im Lymphknoten (LK). U.a. wird der $S1PR_1$-Rezeptor von unreifen natürlichen Killer(NK)-Zellsubpopulationen exprimiert. Für diese Arbeit wurde daher die Annahme, dass die Behandlung mit Fingolimod einen reifen NK-Zellphänotyp fördert, untersucht.

Zur Verifizierung dieser Hypothese wurden Patientinnen und Patienten mit schubförmig remittierender MS (RRMS) im Rahmen einer klinischen Phase IV Interventionsstudie ein Jahr täglich mit 0,5mg Gilenya® behandelt. Klinische sowie immunologische Daten wurden 0, 1, 3, 6 und 12 Monate nach Therapiebeginn erhoben. Als primärer Endpunkt galt das durchflusszytometrisch-bestimmte Verhältnis von unreifen zu reifen NK-Zellen im peripheren Blut (PB) zu Beginn und 12 Monate nach Therapiebeginn. Als sekundäre Endpunkte wurde die Veränderung weiterer NK-Zellsubpopulationen über den gesamten Studienzeitraum untersucht. Klinische sekundäre Endpunkte umfassten das Maß der Krankheitsaktivität, definiert durch die Expanded Disability Status Scale (EDSS) und die jährliche Schubrate (ARR).

Die 17 in die Studie eingeschlossenen Patientinnen und Patienten waren im Mittel 41 Jahre alt. Der NK-Zellanteil nahm während der Studie zu, während andere angeborene lymphatische Zellen („Innate lymphoid cells“, ILCs) abnahmen. Die unreifen $CD56^{bright}$ NK-Zellen zeigten eine Reduktion, wohingegen der Anteil besonders reifer $CD16^{+}$, $CD94^{low}$ und $NKG2A^{-}KIR^{+}$ $CD56^{dim}$ NK-Zellsubpopulationen anstieg. In der automatisierten FlowSOM Analyse wurde die Zunahme eines reifen Metaclusters (MC4) im PB mit einem $CD56^{-}CD16^{++}KIR^{+/-}NKG2A^{-}CD94^{-}CCR7^{+/-}CX_3CR1^{+/-}NKG2C^{-}NKG2D^{+}NKp46^{-}DNAM\text{-}1^{++}CD127^{+}$-Phänotyp identifiziert. Dies entspricht einem reifen, eventuell auch weniger funktionell aktiven Phänotyp. Über den Studienzeitraum wies die Kohorte einen konstanten EDSS auf und die ARR nahm von 0,68 vor Studienbeginn auf 0,47 während der Studie ab. Es konnte keine Korrelation zwischen Therapieansprechen und NK-Zellsubpopulationen festgestellt werden.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigen andere Studien, die ebenfalls eine Fingolimod-assoziierte Zunahme der NK-Zellen und eine Abnahme der $CD56^{bright}$ NK-Zellen im PB beschrieben haben. Darüber hinaus zeigen die Daten der vorliegenden Arbeit eine Zunahme besonders reifer, eventuell auch gealterter und damit weniger funktionell aktiver NK-Zellsubpopulationen an. Auch wenn diese explorativen Ergebnisse in weiteren phänotypischen und funktionellen Studien bestätigt werden müssen, könnte eine Fingolimod-assoziierte Zunahme von gealterten NK-Zellen zu einer verschlechterten Abwehr gegen Tumorzellen und Pathogene beitragen.

Abstract

Fingolimod (FTY720, Gilenya®), a functional Sphingosin-1-Phosphate-Receptor (S1PR) Antagonist, is since 2011 an approved medication for Multiple Sclerosis (MS) in the European union. It acts primary by withholding $S1PR_1$ expressing immune cells within the lymph nodes. Among others, immature natural killer (NK) cells express the $S1PR_1$. For this study the assumption, that Fingolimod treatment promotes a mature NK-cell phenotype, has been investigated.

To verify this hypothesis, patients with relapsing-remitting MS (RRMS) were treated orally with 0.5mg Gilenya® daily as part of a clinical phase IV intervention study. Clinical and immunological data were collected 0, 1, 3, 6 and 12 months after therapy initiation. The primary endpoint was the ratio of immature to mature NK cells in the peripheral blood (PB) at baseline and 12 months after treatment initiation measured with flow cytometry. Secondary endpoints included the alterations of further NK cell subpopulations over the entire study period. Clinical secondary endpoints comprised the degree of disease activity defined by the Expanded Disability Status Scale (EDSS) and the annualized relapse rate (ARR).

The 17 patients included in the study were in average 41 years old. We observed that the NK cell fraction increased during the trail, while the other innate lymphoid cells (ILCs) decreased. Moreover, while immature $CD56^{brigh}$ NK cells diminished, mature $CD16^{+}$, $CD94^{low}$ and $NKG2A^{-}KIR^{+}$ $CD56^{dim}$ NK cell subpopulations increased. The unsupervised FlowSOM analysis revealed the accumulation of a mature metacluster (MC4) in the PB, which displayed a $CD56^{-}CD16^{++}KIR^{+/-}NKG2A^{-}CD94^{-}CCR7^{+/-}CX_3CR1^{+/-}NKG2C^{-}NKG2D^{+}NKp46^{-}DNAM\text{-}1^{++}CD127^{+}$-phenotype. This phenotype represents a mature, probably less functional active population. The EDSS remained stable during the study and the ARR decreased from 0.68 before baseline to 0.47 during the trail. No correlation between treatment response and NK cell populations could be determined.

The results of the present thesis confirm previous reports on an increase of NK cells and a decline of $CD56^{bright}$ NK cells in PB of fingolimod-treated patients. Moreover, the data presented here indicates an increase of mature or even aged and less functional NK cell populations. Even though the results need to be confirmed in lager phenotypic and functional studies, it could be speculated that a fingolimod-associated expansion of aged NK cells might lead to an impaired defense against tumor cells and pathogens.

1 Einleitung

1.1 Multiple Sklerose

Multiple Sklerose (MS) ist eine chronisch-entzündliche, demyelinisierende und im Verlauf zunehmend degenerative Erkrankung des zentralen Nervensystems (ZNS) [1]. Weltweit leiden ca. 2,8 Millionen Menschen an dieser Erkrankung, wobei Frauen doppelt so häufig betroffen sind wie Männer [2].

Auf Grund der multifokalen Lokalisation von entzündlichen, demyelinisierenden ZNS-Läsionen, umfassen die Symptome von MS-Patientinnen und -Patienten diverse neurologische Defizite, wie Sehstörungen, Muskelschwäche, Sensibilitätsstörungen und Fatigue [3]. Um die Diagnose MS anhand der 2017 revidierten Fassung der McDonald Kriterien [4] stellen zu können, muss (I) eine klinische Symptomatik vorliegen bzw. vorgelegen haben, (II) eine räumliche und zeitliche Dissemination von ZNS-Läsionen nachgewiesen werden und (III) andere Ursachen für die klinischen und paraklinischen Befunde ausgeschlossen werden („no better explanation“) [5].

Die MS kann in verschiedene Verlaufsformen unterteilt werden [6, 7]. 85% der Betroffenen erkranken an der schubförmig remittierenden MS („relapsing-remitting“, RRMS). Bei dieser Verlaufsform treten MS-Schübe mit neuen neurologischen Symptomen oder mit einer Verschlechterung bzw. dem Wiederauftreten von Symptomen eines vorherigen demyelinisierenden Ereignisses auf, die sich nach einigen Tagen bis Wochen partiell oder vollständig zurückbilden (Remission) [4]. Wird hingegen von Erkrankungsbeginn an eine Behinderungszunahme festgestellt, wird die Verlaufsform als primär progrediente MS („primary progressive“, PPMS) klassifiziert [4]. In einem Großteil der Fälle geht auch die RRMS innerhalb von mehreren Jahrzehnten in eine progrediente Verlaufsform über [4]. Dieses Erkrankungsstadium wird als sekundär progrediente MS („secondary progressive“, SPMS) bezeichnet [4].

Zur systematischen Erfassung der Krankheitsaktivität werden verschiedene standardisierte Scores und Parameter mit unterschiedlich hoher Reliabilität verwendet [5, 8]. Häufig eingesetzt werden in diesem Zusammenhang die Expanded Disability Status Scale (EDSS) [9], die jährliche Schubrate (annualised relapse rate, ARR) und der MS Functional Composite (MSFC) [10]. Des Weiteren werden gerade in frühen Erkrankungsstadien Surrogatparameter hinzugezogen. Hierzu zählt in erster Linie die Auswertung MS-typischer Veränderungen in der Magnetresonanztomographie (MRT), wie z.B. neue bzw. sich vergrößernde T2-Läsionen, kontrastmittelaufnehmende T1-Läsionen oder sog. „black holes“ in der T1-Gewichtung [5]. Der

verschiedene Parameter kombinierende Endpunkt „kein Hinweis auf Krankheitsaktivität-3“ (“no evidence of disease activity-3“, NEDA-3) ist definiert als Schubfreiheit, keine Behinderungsprogression und keine neuen T2 und/oder Gadolinium-aufnehmenden T1 Läsionen [5, 11]. Bei NEDA-4 wird zusätzlich der Parameter „keine über das normale Maß hinausgehende Hirnatrophie“ ergänzt [12].

Trotz intensiver Forschung ist die genaue Pathogenese der MS weiterhin unklar. Es wird von einer multifaktoriellen Genese mit genetischer Prädisposition, modulierenden Umweltfaktoren und einer Immundysbalance ausgegangen [13]. Die Schlüsselrolle wurde lange Interferon-gamma (IFN-γ) produzierenden $CD4^+$ T-Helfer-1-Zellen (TH1-Zellen) mit einer autoimmunen Aktivität gegen Myelin im ZNS zugeschrieben [3]. Aktuelle Konzepte gehen von einer komplexen multizellulären Krankheitsgenese mit einer Neuroinflammation nicht nur durch die TH1-Zellen, sondern auch durch $CD8^+$ T-Zellen und $CD4^+$ TH17-Zellen, B-Zellen und Zellen des angeborenen Immunsystems sowie im ZNS ortsansässigen Mikroglia und Astrozyten aus [14].

1.2 NK-Zellen und ihre Rolle in der MS

NK-Zellen wurden in den 70er Jahren entdeckt und zunächst als Tumorzellen-lysierende Effektorzellen beschrieben [15]. Sie besitzen die Fähigkeit frühzeitig, ohne vorherige Antigenexposition, nicht-körpereigene oder infizierte körpereigene Zellen zu identifizieren und abzutöten [16]. Außerdem können sie sowohl auf Zellen des angeborenen wie auch auf Zellen des erworbenen Immunsystems regulatorisch einwirken [17, 18]. Humane NK-Zellen werden orientierend an dem Expressionsgrad von CD56 (neurales Zelladhäsionsmolekül-1, NCAM1) traditionell in die zytotoxischen $CD56^{dim}$ NK-Zellen, die 90% der NK-Zellen im peripheren Blut (PB) ausmachen und die regulatorischen $CD56^{bright}$ NK-Zellen, die die restlichen 10% der NK-Zellen im PB darstellen und in sekundären lymphatischen Organen (SLO) dominieren, unterteilt [19, 20].

Neben den NK-Zellen wurden in den letzten 2 Jahrzehnten weitere Immunpopulationen des angeborenen Immunsystems identifiziert, die man mit dem Begriff „angeborene lymphatische Zellen“ („Innate lymphoid cells“, ILCs) als gemeinsame Entität zusammenfasste [21]. ILCs exprimieren keine antigenspezifischen Rezeptoren (CD4, CD8, CD19, CD20) und lassen sich anhand ihres Zytokin-Repertoires sowie der zur Reifung benötigten Transkriptionsfaktoren in drei Gruppen einteilen. NK-Zellen werden der IFN-γ produzierenden ILC-Gruppe 1 zugeordnet, deren Reifung vom Transkriptionsfaktor „T-box expressed in T cells“ (t-bet) abhängt [22, 23].

Die Rolle der NK-Zellen in der MS wurde in zahlreichen murinen und humanen Studien untersucht. Im Mausmodell der MS, der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE), wurden widersprüchliche Ergebnisse zur Rolle der NK-Zellen in der Pathogenese der EAE erhoben. In mehreren Studien konnte nach der Reduktion funktionsfähiger NK-Zellen eine Verschlechterung des EAE-Krankheitsverlaufes beobachtet werden [24-28]. Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen gibt es Untersuchungen, die ein verringertes Ausbrechen oder einen milderen Verlauf der EAE unter diesen Bedingungen berichten [29-33].

Erste humane Studien konnten NK-Zellen in ZNS-Läsionen von MS-Patientinnen und -Patienten nachweisen [34]. Im PB wurde bereits vor mehreren Jahrzehnten eine MS assoziierte Reduktion der NK-Zellzahl sowie eine Reduktion der funktionellen Aktivität (FA) der NK-Zellen beschrieben [35-38]. In einigen Studien konnten diese Befunde allerdings nicht validiert werden [39, 40]. Eine longitudinale Studie von Kastrukoff et al. [41] liefert eine mögliche Erklärung für die differierenden Ergebnisse bezüglich der FA der NK-Zellen: Es konnte gezeigt werden, dass die FA von NK-Zellen zyklisch schwankt und somit je nach Messzeitpunkt auch eine hohe FA gemessen werden konnte. Im Durchschnitt war die FA in dieser Studie jedoch ebenfalls bei MS-Patientinnen und -Patienten signifikant geringer als bei gesunden Kontrollpersonen [41]. Das Auftreten von Läsionen in der MRT-Bildgebung war mit einer Reduktion der FA assoziiert [41]. Weitere Hinweise auf eine reduzierte FA der NK-Zellen während der MS liefert die höhere Expression des inhibierenden Rezeptors KIR2DL5 auf NK-Zellen von MS-Patientinnen und -Patienten [42] sowie die niedrigere IFN-γ Produktion [43]. Ebenso wird der Chemokin-Rezeptor CX_3CR1, der eine Migration in das ZNS vermittelt, weniger auf NK-Zellen von Betroffenen als von Gesunden exprimiert [44]. Es gibt zahlreiche Belege, dass auch bei vielen anderen Autoimmunerkrankungen numerische und funktionelle Defizite der NK-Zellen vorliegen [45]. Diese Erkenntnisse implizieren eine protektive Rolle der NK-Zellen bei autoimmunologischen Prozessen, die im Rahmen der jeweiligen Erkrankung eingeschränkt sind.

Im Bezug auf die MS-Immunpathogenese gibt es Evidenz für die Störung der NK-Zell-vermittelten Regulation von autoreaktiven T-Zellen. So ist z.B. die DNAM-1-CD155 und die CD94/NKG2A-HLA-E Interaktion auf NK- und T-Zellen bei MS-Patientinnen und -Patienten verändert [46, 47]. Während der Remission wird die regulatorische NK-Zell-Aktivität vermutlich wiederhergestellt. So wurde in diesem Krankheitsstadium eine erhöhte Frequenz von $CD95^+$ NK-Zellen beobachtet, die ex-vivo die Aktivierung von autoreaktiven T-Zellen hemmen konnten [48]. (schematische Darstellung der Erkenntnisse aus humanen Studien, siehe Abbildung 1)

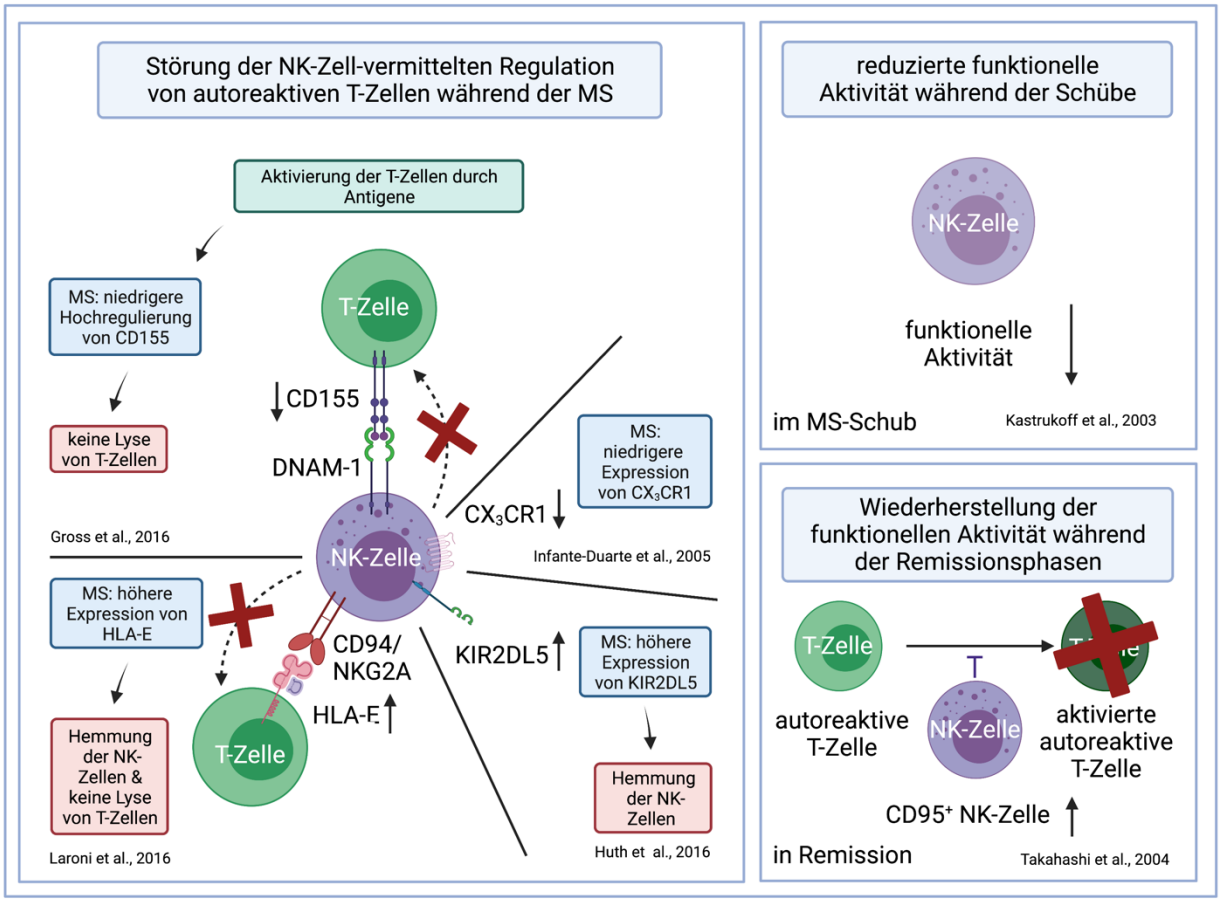

Abbildung 1. Rolle der NK-Zellen in der Pathogenese der MS (eigene Darstellung).

Links sind untersuchte Störungen der NK-Zell vermittelten Regulation von T-Zellen und weitere Veränderungen des NK-Zellphänotyps, die eine geringere funktionelle Aktivität (FA) der NK-Zellen implizieren könnten, dargestellt. Auf der rechten Seite sind mögliche Unterschiede in der FA der NK-Zellen von MS-Patientinnen und -Patienten während eines Schubes (oben) und während der Remission (unten) dargestellt. Abbildung erstellt mit Biorender.

Schwangere MS-Patientinnen erleben i.d.R. eine Reduktion der MS-Krankheitsaktivität, die mit einer Zunahme der CD56^{bright} Population im PB korreliert [49]. Ebenso induzieren einige MS-Medikamente, wie Daclizumab, Interferon-beta, Dimethylfumerat und Alemtuzumab einen Anstieg des CD56^{bright} Anteils im PB [50-58]. Für Daclizumab und Dimethylfumerat gibt es zudem Hinweise, dass die NK-Zell Zytotoxizität gegenüber autoreaktiven T-Zellen durch die Medikamente zunimmt [52, 59]. In zwei Interventionsstudien mit Daclizumab wurde eine Korrelation zwischen dem Anstieg der CD56^{bright} Population und dem Ansprechen auf das Medikament sowie der Anzahl von neuen bzw. vergrößerten KM-aufnehmenden Läsionen festgestellt [50, 53]. Diese Erkenntnisse sprechen dafür, dass insbesondere die CD56^{bright} NK-Zellen eine protektive Rolle in der MS-Pathogenese einnehmen und diese in der MS gestört ist.

Während zu den CD56^{bright} NK-Zellen vergleichsweise viele Erkenntnisse vorliegen, ist die Rolle der CD56^{dim} weitgehend ungeklärt. In einigen Studie wurde ein erhöhter Anteil an CD56^{dim} NK-

Zellen im PB von Betroffenen im Vergleich zu gesunden Kontrollen gemessen [60, 61]. Die $CD56^{dim}$ typische antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität (ADCC), die als Ursache für perivaskuläre Demyelinisierung in ZNS-Läsionen beschrieben wurde [62] und Hinweise auf ihren Beitrag zur Neurodegeneration [63], lassen eine schädliche Rolle der $CD56^{dim}$ NK-Zellen im Krankheitsverlauf vermuten [64]. Zusammenfassend, ist auf Grundlage vieler Studien ein protektiver Stellenwert der $CD56^{bright}$ NK-Zellen in der Pathogenese der MS anzunehmen [47, 49-58, 65]. Wohingegen basierend auf einer begrenzten Studienlage [60, 62] ein ungünstiger Einfluss der $CD56^{dim}$ NK-Zellen auf den Verlauf der MS zu vermuten ist. Um die grobe Einteilung in $CD56^{bright}$ und $CD56^{dim}$ NK-Zellen zu erweitern, sollten in zukünftigen Studien auch subgruppenspezifische und im Verlauf schwankende Effekte bedacht werden.

1.3 Fingolimod und sein Effekt auf NK-Zellen

In der vorliegenden Arbeit wurden die NK-Zellen von MS-Patientinnen und -Patienten, die mit Fingolimod (FTY720, Gilenya®) behandelt wurden, untersucht. Fingolimod wurde 2011 als erstes orales MS-Medikament von der Europäische Arzneimittel-Agentur (EMA) zugelassen [66]. In mehreren großen randomisierten klinischen Studien konnte seine Effektivität im Vergleich zu Placebo bzw. Interferon-β 1a gezeigt werden [67-69]. Fingolimod reduzierte die ARR um 48-54% im Vergleich zu Placebo bzw. Interferon-β 1a [67-69]. Als Wirkmechanismus ist ein funktioneller Antagonismus von vier der fünf Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptoren(S1PR), der $S1PR_{1,3-5}$, beschrieben [70]. Ein körpereigener Ligand des G-Protein-gekoppelten S1PR ist das Lysophospholipid Sphingosin-1-Phosphat (S1P), das die Lymphozytenmigration, -proliferation und -adhäsion moduliert sowie Einfluss auf die Angiogenese, Gefäßstabilität und die Embryogenese hat [71]. $S1PR_1$ ist u.a. ein chemotaktischer Rezeptor, der den Austritt von Immunzellen aus dem lymphatischen System vermittelt [72, 73]. Nach einer Phosphorylierung kann auch Fingolimod an den $S1PR_1$ binden und induziert eine Hyperaktivierung, Internalisierung und den Abbau des Rezeptors [74]. Dies führt zu einer Akkumulation von $S1PR_1$ exprimierenden Zellen in den Lymphknoten (LK) [75] und verhindert die Einwanderung dieser Zellen ins ZNS. Zu den in den LK sequestrierten Zellen zählen naive T-Zellen, zentrale T-Gedächtniszellen (central memory T cells, TCM) sowie B-Gedächtniszellen [76-80]. Regulatorische B- und T-Zellen können jedoch auch unter der Fingolimod-Therapie ungehindert im PB und den SLO zirkulieren [76, 78, 80, 81].

Während die Gesamtzahl der T- und B- Zellen unter der Fingolimod-Therapie abnimmt, steigt der Anteil an NK-Zellen im PB im Vergleich zu unbehandelten, oder mit anderen MS-Medikamenten behandelten Personen und gesunden Kontrollen an [82-84]. Auch in longitudinalen Studien konnte eine Zunahme des NK-Zellanteils im PB von ca. 10% bei Baseline auf über 40-50% unter

der Therapie eruiert werden [81, 85]. Innerhalb der NK-Zellpopulation steigt das $CD56^{bright}/CD56^{dim}$ Verhältnis zugunsten der $CD56^{dim}$ im Verlauf der Fingolimod-Therapie an [84, 86, 87]. In absoluten Zahlen hat Fingolimod hingegen keinen Effekt auf $CD56^{dim}$ NK-Zellen, während $CD56^{bright}$ NK-Zellen abnehmen [88, 89]. Zum Zeitpunkt der Planung dieser Studie waren erst zwei Querschnittsstudien zum Thema NK-Zellen und Fingolimod veröffentlicht [82, 83]. Es fehlten longitudinale klinische Studien und Analysen des NK-Zellphänotyps von Patientinnen und Patienten mit Fingolimod-Therapie.

1.4 Ziel der vorliegenden Arbeit und Bedeutung für das Fachgebiet

Die signifikante Reduktion zirkulierender T- und B-Zellen in die SLO und die daraus resultierende Zunahme des NK-Zellanteils im PB unter einer Fingolimod-Therapie um das mehr als 4-fache [83] macht die detaillierte Untersuchung dieser Immunpopulation interessant. Während auch der Anteil an zirkulierenden $CD56^{bright}$ NK-Zellen signifikant abnimmt, verbleiben die $CD56^{dim}$ NK-Zellen im PB [82]. Die Untersuchung von NK-Zellen unter Fingolimod-Therapie kann somit auch als Forschungsparadigma zum besseren Verständnis der Rolle der $CD56^{dim}$ NK-Zellen in der MS-Pathogenese dienen. Die Studienlage zum Zeitpunkt der Planung des vorliegenden Forschungsprojektes war sehr begrenzt. Zur Validierung der ersten Ergebnisse aus zwei Querschnittsstudien [82, 83] waren weitere Studien mit größeren Kohorten nötig. Ebenso fehlten longitudinale Daten sowie detaillierte phänotypische und funktionelle Studien, die eine genauere Einordnung der Rolle der NK-Zellen auf den Therapieerfolg bzw. das Auftreten von Nebenwirkungen ermöglichen.

In der vorliegenden Arbeit wurde daher die Fragestellung untersucht, ob der S1PR-Modulator Fingolimod NK-Zellen mit einem bestimmten Phänotyp fördert und diese Veränderungen mit dem Therapieansprechen oder den Nebenwirkungen korrelieren. Da während der Reifung der NK-Zellen die Expression des $S1PR_1$-Rezeptors abnimmt [90, 91], ist eine Zunahme besonders reifer NK-Zellen im PB zu vermuten. Entsprechend wurde in dieser Studie von folgender Hypothese ausgegangen: Fingolimod induziert die Zunahme der Frequenz reifer NK-Zellen im PB von MS-Patientinnen und -Patienten. Das Ziel dieser Studie bestand in der Charakterisierung des NK-Zell-Phänotyps von MS-Patientinnen und -Patienten innerhalb von 12 Monaten Fingolimod-Therapie. Diese Arbeit soll hiermit einen Betrag zur Beantwortung folgender Fragen leisten:

- Welche Rolle spielen die NK-Zellen und insbesondere die $CD56^{dim}$ Population während einer Fingolimod-Therapie in der MS-Pathogenese?
- Welche Rolle spielen die NK-Zellen als Surrogatmarker für das Therapieansprechen?
- Welche Rolle spielen die NK-Zellen für den Ausbruch/Verhinderung von Fingolimod-assoziierten Nebenwirkungen?

2 Methodik

2.1 Studiendesign

Um den Effekt von Fingolimod auf NK-Zellen von MS-Patientinnen und -Patienten zu untersuchen, wurde 2013 eine offene klinische Phase IV Interventionsstudie mit Vergleich von Baseline zu verschiedenen Behandlungsphasen geplant. Die Studie (Eudra-CT:2012–000,411-91; NCT 01790269) wurde von der lokalen Ethikkommission (Approval ID: 12/9543-EK) genehmigt und wurde im Einklang mit der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis [92, 93], der aktualisierten Deklaration von Helsinki zu ethischen Grundsätzen für die medizinische Forschung am Menschen [94], der Richtlinie der „international conference on harmonization of good clinical practice“ [95] und dem deutschen Gesetz durchgeführt. Es wurden 18- bis 65-jährige, an RRMS (definiert je nach Diagnosezeitpunkt mit den 2010 bzw. 2017 revidierten McDonald Kriterien [4, 96]) erkrankte Patientinnen und Patienten in die Studie eingeschlossen, bei denen eine Indikation für eine Fingolimod-Therapie vorlag und keine Kontraindikationen entsprechend der Fingolimod-Fachinformation [97] bekannt waren. Weiteres Einschlusskriterium war ein EDSS ≤ 6 [9]. Ausgeschlossen wurden Personen mit MS, die eine immunsuppressive Behandlung in den letzten 3 Monaten vor Studienbeginn mit Natalizumab erhalten hatten. Ein weiteres Ausschlusskriterium war eine Therapie mit anderen Immunsuppressiva außer Prednisolon in den letzten 6 Monaten oder ein Schub innerhalb der 30 Tage vor der Screening-Visite. Die Rekrutierung erfolgte am NeuroCure Clinical Research Center (NCRC) der Charité – Universitätsmedizin Berlin mittels Kontaktierung von Patientinnen und Patienten, die im NCRC behandelt werden, sowie von Personen mit MS, die Interesse an einer klinischen Studie bekundet hatten.

Innerhalb der 12-monatigen Studie wurden die Studienteilnehmerinnen und Studienteilnehmer nach ausführlicher Aufklärung und schriftlicher Einwilligung täglich mit 0,5mg Kapseln Fingolimod (Gilenya®) behandelt. Die erste Einnahme erfolgte 4 Wochen nach einer Screening-Visite im Studiencenter. Hierbei wurden die empfohlenen Sicherheitsvorgaben inkl. 6-stündigem 12-Kanal-EKG-Monitoring und stündlicher Blutdruck- und Herzfrequenzkontrolle eingehalten. Nach Screening und Therapiebeginn folgten vier weitere Visiten, nach 1, 3, 6 und 12 Monaten, sowie ungeplante zusätzliche Visiten bei Wunsch der Patientinnen und Patienten, schwerem Schub oder Auftreten von Nebenwirkungen. Bei jeder Visite wurden eine standardisierte Anamnese und eine klinisch-neurologische Untersuchung von approbierten Studienärztinnen und -ärzten der AG Klinische Neuroimmunologie des NCRC durchgeführt. Zusätzlich erfolgte die Abnahme eines Sicherheits- und Forschungslabors. (Abbildung 2)

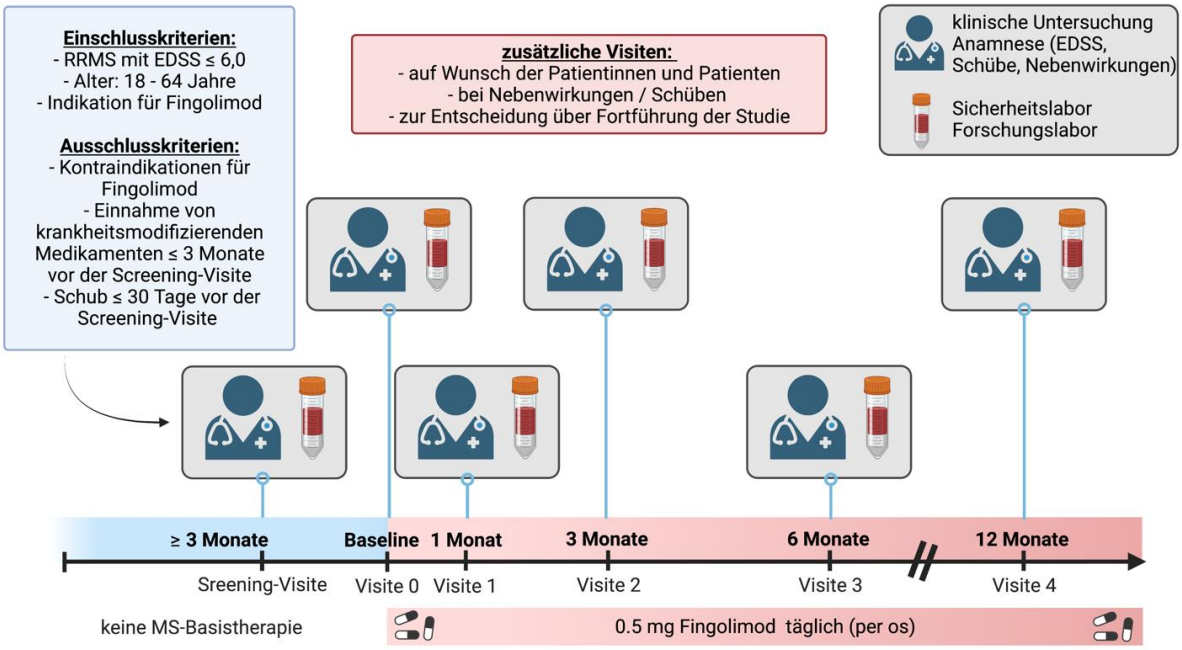

Abbildung 2. Studiendesign (eigene Darstellung).

Die Screening-Visite erfolgte 4 Wochen vor Therapiebeginn und beinhaltete das Eruieren der Ein- und Ausschlusskriterien (links oben aufgelistet). Ab der Baseline-Visite (Visite 0) wurden die Patientinnen und Patienten für ein Jahr täglichen mit 0,5mg Fingolimod (Gilenya®) behandelt. Die weiteren Visiten folgten 1, 3, 6 und 12 Monate nach Therapiebeginn. Zu jeder Visite wurden klinische und immunologische Daten erhoben (siehe rechts oben). Die Indikationen für eine zusätzliche Visite sind mittig aufgeführt. Abbildung erstellt mit Biorender.

Als primärer Endpunkt wurde der Anteil an unreifen NK-Zellen innerhalb der gesamten NK-Zellpopulation vor und 12 Monate nach Fingolimod-Behandlung festgelegt. Die sekundären Endpunkte beinhalteten sowohl immunologische wie klinische Endpunkte.

Die immunologischen sekundären Endpunkte umfassten:

- den NK-Zellanteil innerhalb der gesamten Lymphozytenpopulation zu allen Visiten,
- den Anteil an unreifer NK-Zellen innerhalb der gesamten NK-Zellpopulation zu allen Visiten sowie
- den Anteil an NK-Zellen mit bestimmten aktivierenden oder einen Reifezustand beschreibenden Rezeptoren innerhalb der gesamten NK-Zellpopulation zu allen Visiten.

Zu den klinischen sekundären Endpunkten zählte die ARR verglichen mit der ARR der 24 Monate vor Studienbeginn und der Grad der Behinderung ermittelt anhand des EDSS [9].

In einem weiteren Schritt sollten Veränderungen von NK-Zellpopulationen mit dem klinisch-ermittelten Therapieansprechen, anhand der ARR und der Veränderung des EDSS, korreliert werden.

2.2 Erhebung der klinischen Daten

Zwischen September 2013 und Juli 2018 wurden insgesamt 21 RRMS-Patientinnen und -Patienten am NCRC der Charité – Universitätsmedizin Berlin in die prospektive Studie eingeschlossen. Die Studienkohorte reduzierte sich aufgrund inakzeptabler Risiken bei Reevaluation der Risiko-Nutzen-Bewertung bzw. unzureichender Probenqualität in 5 Fällen:

- 2 Patientinnen und 1 Patient hatten die Fingolimod-Einnahme auf Grund erhöhter Leberenzyme (Toxizitätsgrad ≥ 3 gemäß den „Common Toxicity Criteria“ (CTC) [98]) bzw. Lymphozytopenie (< 0,2/nl) frühzeitig beenden müssen.
- Bei einem Patienten war die Probenqualität aller Visiten unzureichend, sodass er vor Beginn der Analyse ausgeschlossen wurde.
- Bei einem Patienten wurden nur 4 der 5 Zeitpunkte in die Auswertung miteinbezogen, da die Fingolimod-Therapie nach über 6 Monaten (nach Visite 3) auf Grund einer Lymphozytopenie (< 0,2/nl) beendet werden musste.

Insgesamt wurden somit die Daten von 17 Patientinnen und Patienten ausgewertet.

Bei jeder Visite sowie bei zusätzlichen Visiten wurde eine klinisch-neurologische Untersuchung durchgeführt und ein anonymisierter standardisierter Prüfbogen in Papierform mit Angaben zu den klinischen Parametern wie EDSS, Schubverlauf und unerwünschten Ereignissen („adverse events“, AE) ausgefüllt. AEs umfassen negative medizinische Zeichen, die eine Patientin oder ein Patient, die/der ein Prüfprodukt einnimmt in zeitlichen Korrelation zu dieser Einnahme erleiden, ohne das eine kausale Beziehung zu der Einnahme bestehen muss [99]. Ihre Klassifikation in mild, mittelschwer und schwer wurde vor Studienbeginn wie folgt definiert:

- mild: AE wird vom Patienten als mild eingeschätzt.
- mittelschwer: AE wird vom Patienten als störend empfunden und schränkt sie/ihn in ihrer/seiner Alltagsaktivität ein.
- schwer: AE verursacht erhebliche Einschränkungen der Alltagsaktivität der/des Patientin/Patienten.

Als schwerwiegende unerwünschte Ereignisse („serious adverse events“, SAEs) wurden AEs eingeordnet, die zu einer Krankenhauseinweisung, anhaltender Behinderung und/oder dem Tod führten.

Die klinischen Daten wurden anonymisiert und passwort-geschützt in die browserbasierte Forschungsdatenbank REDCap übertragen.

2.3 Erhebung der immunologischen Daten

Zur Erhebung der immunologischen Daten wurden zunächst die peripheren mononukleären Zellen (PBMCs) aus dem heparinisierten Vollblut (Forschungslabor) der Patientinnen und Patienten isoliert und diese zur langfristigen Lagerung kryokonserviert. So konnten, trotz longitudinalem Studiendesign, alle Blutproben einer Person am selben Studientag gemessen werden. Dies sollte einen Bias durch heterogene Bedingungen der durchflusszytometrischen Messungen an unterschiedlichen Experimentiertagen (sog. Bartch-Effekt) verhindern.

Zur Vorbereitung der durchflusszytometrischen Messungen erfolgte (I) das finale Design des Multicolor-Antikörper-Panels, (II) die Bestimmung der optimalen Antikörperkonzentrationen mittels Titrationsexperimenten, (III) die Anpassung der automatisch-erstellten Kompensationsmatrix sowie (IV) die Entwicklung einer Gating-Strategie. Im Anschluss wurden verschiedene Oberflächenmoleküle auf den Immunzellen mit Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern (Markern) markiert und mittels Durchflusszytometrie gemessen.

2.3.1 PBMC-Isolation und Kryokonservierung

Als Forschungslabor wurden 30ml peripher-venöses Vollblut von den Studienpatientinnen und -patienten bei jeder geplanten Visite (0, 1, 3, 6 und 12 Monate nach Therapiebeginn) in ein heparinhaltiges Röhrchen abgenommen. Zunächst wurde das Vollblut im 1:1 Verhältnis mit Phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) versetzt. Die PBMCs wurden dann mittels einer Dichtegradienten-Zentrifugation vom Rest der Blutprobe (Erythrozyten, Granulozyten, Plasma und Thrombozyten) getrennt [100]. Die milchige Interphase mit den PBMCs konnte nach Schichtung von 25ml verdünnten Vollblutes auf 15ml Biocoll-Lösung (Dichte von 1,077g/ml, Biochrom GmbH) und anschließender Zentrifugation (bei 760g für 20 Minuten ohne Dezeleration), leicht entnommen werden [100]. Die Zellen wurden mittels PBS und Waschmedium (RPMI 1640 Medium mit 1% N-2-Hydroxyethylpiperazin-N-2-ethansulfonsäure (HEPES) und 5% fötalem Kälberserum (FCS) weiter aufgereinigt.

Zur Vorbereitung des Einfrierens wurde zunächst der Gefrierbehälter (Mr. Frosty, Thermofisher, Waltham) auf 4°C runtergekühlt und das Einfriermedium (10% Dimethylsulfoxid (DMSO) und 20% FCS in RPMI 1640 Medium mit 1% HEPES) auf Eis platziert. Die Zellzahl der aufgereinigten PBMCs wurde mittels Neubauer Zählkammer abgeschätzt [101]. Jeweils $7{,}5 \times 10^6$ Zellen pro Kryoröhrchen wurden, verdünnt mit Einfriermedium, aliquotiert und danach umgehend in den Gefrierbehälter überführt. Dies war ein zeitkritischer Schritt, da DMSO bei Raumtemperatur zytotoxisch wirkt [102]. In dem Gefrierbehälter erfolgte eine graduierte Abkühlung um 1 °C pro Minute auf zunächst -80°C. Am Folgetag konnten die Proben in Tanks mit flüssigem Stickstoff

(Temperatur ca. -168°C) überführt und dort bis zur Durchführung der durchflusszytometrischen Experimente verwahrt werden.

2.3.2 Vorbereitung der durchflusszytometrischen Experimente

Auf der Grundlage eines Multicolor-Antikörper-Panels aus unserer Arbeitsgruppe [103], welches zur Charakterisierung des NK-Zellphänotyps bei schwangeren MS-Patientinnen unter Verwendung des LSR Fortessa™ Durchflusszytometers (BD Pharmigen, Heidelberg) etabliert wurde, wurde das Panel für das vorliegende Promotionsprojekt weiterentwickelt (Tabelle 1). Hierfür wurde das neuere Durchflusszytometer Cytoflex LX (Beckman Coulter, Brea) genutzt. Aufgrund von Schwierigkeiten mit der Kompensation des antiCD27-Antikörpers wurde dieser für das neue Panel ausgeschlossen. Entsprechend der vorliegenden Fragestellung wurde er durch den Reifegrad-charakterisierenden KIR-Rezeptor [104] ausgetauscht. Des Weiteren wurde Verbesserungspotential beim Viabilitätsfarbstoff gesehen. Ein alternativer Viabilitätsfarbstoff konnte mit dem Laser „nahe UV“ gemessen werden, der eine bessere Diskriminierung zwischen lebenden und toten Zellen versprach. Dies bedingte allerdings die Nutzung eines anderen antiCD16-Antikörpers, der zuvor diesen Detektionskanal belegte. Für die neuen drei Antikörper wurde die passende Konzentration mittels Titrationsexperimenten ermittelt. Hierfür wurden kryokonservierte PBMCs gesunder Kontrollpersonen verwendet und diese nach den in Abschnitt 2.3.3 und 2.3.4 beschriebenen Protokollen aufgetaut und gefärbt.

Tabelle 1. Panel-Design für die 14-Marker-NK-Zell-Phänotypisierung unter Verwendung des CytoFLEX LX Durchflusszytometers (eigene Darstellung)

Laser (nm)	BP Filter[1]	Antikörper	Fluorochrom	Verdünnung
nahe UV (375)	450/45	L/D UV	blau-fluoreszierender Reaktivfarbstoff	1/1000
Violett (405)	450/45	CCR7	BV421	1/25
	525/40	NKG2D	BV510	1/20
	610/20	CX3CR1	BV605	1/50
	660/20	NKp46	BV650	1/100
	763/43	CD127	BV785	1/25
Blau (488)	525/40	NKG2C	Alexa488	1/100
	690/50	DNAM1	PerCP/Cy5.5	1/50
Gelb/Grün (561)	585/42	KIR (KIR2DL1/DS1)	PE	1/40
	610/20	CD56	PE/Dazzle594	1/200
	764/43	NKG2A	PE/CY7	1/100
Rot (640)	660/20	CD94	APC	1/50

712/25	Lineage (CD3, CD19, CD14, CD20)	Alexa700	1/100, 1/100, 1/400, 1/1600
763/43	CD16	APCfire750	1/40

Auf die Laser des Cytoflex LX (nahe UV, Violett, Blau, Gelb/Grün und Rot) wurden die fluoreszenzgekoppelten Antikörper (vollständige Bezeichnungen finden sich der übersichtlichkeitshalber im Abkürzungsverzeichnis) verteilt. Die Verdünnungsverhältnisse ergaben sich aus in unserem Labor durchgeführten Titrationsexperimenten und beziehen sich auf ein Gesamtvolumen von 50µl.

[1] band-pass (BP) Filter

Außerdem wurde vor Messung der Patientinnen-/Patientenproben das neue Panel getestet und eine passende Kompensationsmatrix angelegt. Hierfür wurden ebenfalls kryokonservierte PBMCs gesunder Kontrollpersonen verwendet. Die Kompensationsmatrix dient der Korrektur von spektralen Überlappungen zwischen Fluorochromen, die zu einem Spillover, also falsch-positiven Signalen in einem für ein Fluorochrom nicht charakteristischen Detektionskanal, führen [105]. Die Korrekturen wurde auf Grundlage von Einzelfärbungen in der FlowJo software 10.4 (FlowJo LLC, Ashland) automatisiert berechnet und im Einzelfall unter Berücksichtigung der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) der Positiv- und Negativ-Population manuell optimiert [105]. Der nächste wichtige Schritt zur Verbesserung der Probenqualität und späteren Analyse der immunologischen Teilpopulationen beinhaltete die Etablierung einer Gating-Strategie [106], die der Abbildung 3 zu entnehmen ist.

2.3.3 Auftauen der Zellen

Vor Beginn jedes durchflusszytometrischen Experimentes wurden die entsprechenden Proben aus den flüssigen Stickstoff-Tanks in ein 37 °C warmes Wasserbad überführt und in diesem für 8 Minuten aufgetaut. Danach wurde die Zellsuspension zügig mit einem warmen Auftaumedium (RPMI + 10% FCS) gewaschen, um das DMSO zu entfernen [107, 108]. Im Anschluss wurde die Probe mit PBS gemischt, die Zellzahl mittels Neubauer Zählkammer abgeschätzt und jeweils etwa $1{,}2 \times 10^6$ Zellen in ein Micronic-Röhrchen gegeben.

2.3.4 Färbung von Oberflächenmolekülen

Die mit PBS gemischte Zellsuspension wurde zentrifugiert und der Überstand abgekippt. Danach wurden die Zellen für 5 Minuten mit jeweils 50µl FC blockierendem Reagenz (Miltenyi Biotec, B. Gladbach) inkubiert, um etwaige unspezifische Bindungen von Antikörpern an FC-Rezeptoren zu verhindern [109]. Nach einem Waschschritt wurden die Zellen für 30 Minuten im Dunklen mit „LIVE/DEAD Fixable Dead Cell Stain Kits“ (Thermo Fisher, Waltham) inkubiert. Nach einem erneuten Waschschritt erfolgte die Färbung der Zellen mit verschiedenen Kombinationen von humanen Fluoreszenz-gekoppelten Antikörpern (Hersteller i.d.R. Biolegend, San Diego; Ausnahmen entsprechend gekennzeichnet): anti-CCR7-BV421, anti-NKG2C-AlexaFlour488 (R&D Systems, Minneapolis), anti-DNAM-1-PerCP/Cy5.5, anti-CD158a/h-PE (Miltenyi Biotec, B.

Gladbach), anti-CD56-PE/Dazzle594, anti-NKG2A-PE/Cy7 (Beckman Coulter, Brea), anti-CD94-APC, anti-Lineage(CD3, CD19, CD14, CD20)-Alexa700, anti-CD16-APCfire750, anti-NKG2D-BV510, anti-CX_3CR1-BV605 (BD Biosciences, Heidelberg), anti-NKp46-BV650 und anti-CD127-BV785 [110]. Anti-CCR7-BV421 wurde für 30 Minuten im Dunklen inkubiert, während alle anderen Antikörper für 15 Minuten im Dunklen inkubiert wurden. Nach einem letzten Waschschritt mit FACS-Puffer und Filterung der Zellsuspension mittels eines Filters mit 30µl großen Poren wurden die Zellen in 200µl FACS-Lösung im Durchflusszytometer Cytoflex LX (Beckman Coulter, Brea) gemessen.

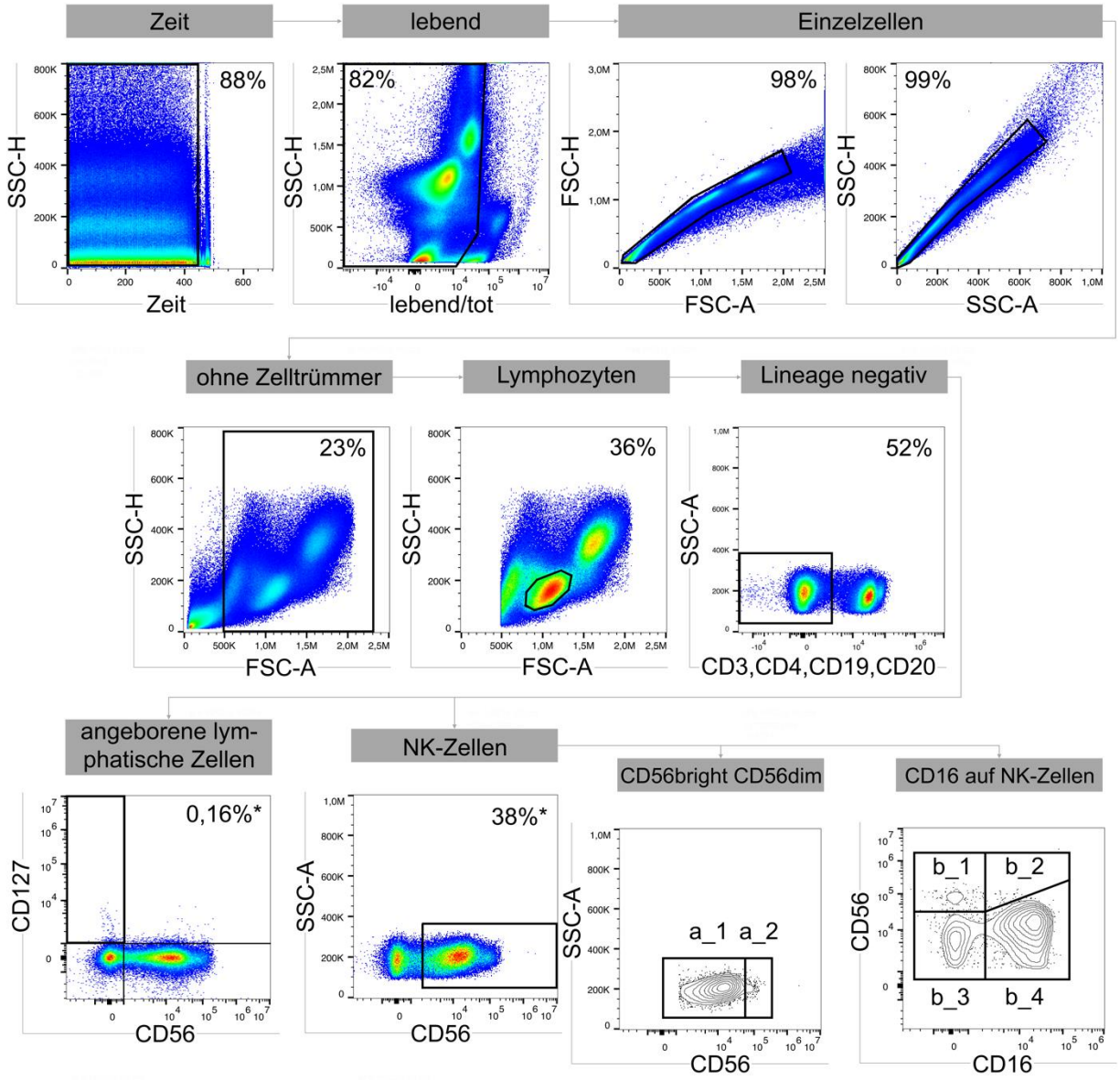

Abbildung 3. Gating Strategie (übersetzt aus [110])

Zunächst erfolgte der Ausschluss von schlechter Flussqualität durch Auftragen von Zeit gegen Seitwärtsstreulicht (SSC = side scatter), dann erfolgte der Ausschluss von toten Zellen und danach die Identifikation von Einzelzellen (Singlets), die sich durch eine lineare Beziehung in der Vorwärtsstreulicht Fläche (FSC-A = forward scatter area) und

Höhe (FSC-H) bzw. in der SSC-A/H auszeichnen. Im nächsten Schritt wurden Zelltrümmer, welche mit ≤ 500.000 auf der FSC-A Scala definiert wurden, ausgeschlossen. Die Lymphozyten konnten im nächsten Gate anhand ihrer typischen Morphologie im SSC-H/FSC-A identifiziert werden. Mit der CD3, CD14, CD19, CD20 Färbung (Lineage) wurden T-, B,- NKT-Zellen und Monozyten aus der Analyse ausgeschlossen. Das ILC-Gate war definiert als Lineage$^-$ und CD56$^-$CD127$^+$ und das NK-Zell-Gate als Lineage$^-$ und CD56$^+$. Eine weitere Aufteilung der NK-Population erfolgte zum einen in CD56^{dim} (a_1) und CD56^{bright} (a_2) und zum anderen in CD56^{bright}CD16$^-$ (b_1), CD56^{bright}CD16$^+$(b_2), CD56^{dim}CD16$^-$ (b_3), und CD56^{dim}CD16$^+$ (b_4). Die Expression weiterer Marker (CCR7, NKG2C, DNAM-1, CD158a/h, NKG2A, CD94, NKG2D, CX3CR, NKp46) wurden sowohl in der CD56^{dim} (a_1) wie in der CD56^{bright} (a_2) Population untersucht.
* Prozentzahlen beziehen sich auf das Lymphozyten-Gate

2.4 Analyse der immunologischen Daten

Die erhobenen durchflusszytometrischen Daten wurden zunächst unverblindet mittels biparametrischen Darstellungen in der FlowJo software 10.4 (FlowJo LLC, Ashland) ausgewertet. Zur Setzung der Analysefenster (sog. Gates) wurden messtag-spezifisch FMO(fluorescence-minus-one)-Kontrollen genutzt, die alle Fluorochrome des Multicolor-Panels bis auf den zu überprüfenden Antikörper enthielten. Das Spreading in einen Detektionskanal konnte so beurteilt und die Fluoreszenz-negativen sicher von Fluoreszenz-positiven Zellen abgegrenzt werden. Waren die Zellpopulationen dennoch nicht klar abgrenzbar, wurde die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) genutzt. Hierbei wurde die MFI der FMO-Kontrolle von der MFI des spezifischen Markers abgezogen (Δ MFI). Vor Beginn der Analysen schlossen wir 13 von insgesamt 84 Datensätzen auf Grund von schlechter Probenqualität (hohe Zahl an toten Zellen oder Zellfragmenten) von der Analyse aus. Somit variierte die Anzahl der ausgewerteten Proben je nach Visite wie folgt: Visite 0: n = 17, Visite 1: n = 15, Visite 2: n = 12, Visite 3: n = 13, Visite 4: n = 14 und ergab insgesamt 71 Visitendaten.

Die hochdimensionalen Datensätze, die mittels Multicolor-Durchflusszytometrie generiert werden, können nur noch begrenzt durch eine manuelles bivariantes Gating erfasst und umfassend analysiert werden [111]. Bioinformatische Ansätze, wie der Clustering-Algorithmus FlowSOM von Cytobank (Beckman Coulter, Brea) bieten neue Möglichkeiten zur Visualisierung und weiterführenden Analyse [112]. FlowSOM wurde daher in der vorliegenden Promotionsarbeit zur Validierung der Ergebnisse des manuellen Gatings sowie zur automatisierten Identifikation weiterer unbekannter Subpopulationen, die eine signifikante Veränderung innerhalb des Therapiezeitraumes zeigten, verwendet. Die bereits kompensierten und manuell bis zur CD56$^+$-NK-Zell-Population vorgegateten Dateien (verwendete Gating-Strategie siehe Abbildung 3) wurden in Cytobank überführt und mit der Arcsin-Funktion transformiert und neu skaliert. Der Import einer FCS-Datei (Visite 0 bei Patientin mit ID-Nummer 005 aus der Respondergruppe) konnte aus technischen Gründen nicht durchgeführt werden. Sodass alle aufgenommenen

Datenpunkte (repräsentieren jeweils eine Zelle) aus insgesamt 70 FCS-Dateien in einem 4-schrittigen Analyseprozess (detailliert beschrieben in [112]) mittels Algorithmen des maschinellen Lernens in einer selbst-organisierten Karte eingeordnet wurden. Zellen mit ähnlichen Eigenschaften wurden hierbei in einem Cluster und mehrere Cluster zu Übergruppen sog. Metaclustern (MC) zusammengefasst. Die Anzahl der Cluster und Metacluster musste vor Beginn der FlowSOM Analyse vom Benutzer spezifiziert werden [113]. Sie sollte so hoch gewählt sein, dass auch seltene Populationen identifiziert werden, ohne durch „overclustering“ homogene Zellgruppen in Untergruppen aufzuteilen [113]. Anhand der empirischen Bewertung mehrerer FlowSOM-Durchläufe desselben Datensatzes mit unterschiedlichen Clusterzahl-Einstellungen wurde in der vorliegenden Studie eine Clusterzahl von 81 und eine MC-Zahl von 15 ermittelt. Mittels der Darstellung der Cluster als Punkte in einem baumartigen Netz, wobei Cluster mit ähnlichen Eigenschaften in räumlicher Nähe zueinander angeordnet sind, konnte der multidimensionale Datensatz in einem zweidimensionalen sog. „minimal spanning tree“ (MST) visualisiert werden. Die Frequenz der MC zu den entsprechenden Visiten wurde im Anschluss exportiert und mittels statistischer Tests untersucht. Mit einem qualitativen Ansatz, der die Frequenz der MC in der Responder- und Non-Responder-Gruppe mittels einer Heatmap visuell darstellt, wurden Unterschiede in den zwei Gruppen analysiert. Auf Grund der kleinen Studienkohorte wurde auf quantitative Vergleiche zwischen beiden Gruppen verzichtet.

2.5 Analyse der klinischen Daten

Da Fingolimod nach etwa zwei Monaten eine konstante Blutkonzentration erreicht [114], wurden nur klinischen Daten ab Visite 2 (3 Monate nach Behandlungsbeginn) berücksichtigt [110]. So wurde die Schubrate von Monat 3 bis Monat 12 (Visite 2 bis 4) mit der Schubrate der 24 Monate vor Studienbeginn verglichen und der Verlauf des Behinderungsgrades mittels des EDSS nach 3 Monaten (Visite 2) und nach 12 Monaten (Visite 4) beschrieben.

Ein Therapieansprechen wurde in dieser Studie definiert als Abnahme der ARR von Monat 3 bis Monat 12 unter Fingolimod-Therapie im Vergleich zur ARR der 24 Monate vor Therapiebeginn und als keinen EDSS Anstieg bzw. eine Abnahme des EDSS vom Monat 3 im Vergleich zum Monat 12 nach Therapiebeginn. Ebenso wurde als Therapieansprechen gewertet, wenn kein EDSS Anstieg zwischen Monat 3 und Monat 12 der Studie auftrat und kein Schub während der Studie und in den 24 Monaten vor Studienbeginn stattgefunden hatte.

2.6 Statistische Auswertung

Zur statistischen Auswertung der Studie wurde eine explorative Datenanalyse vor Beginn der Studie festgelegt. Ziel der explorativen Datenanalyse ist die Generierung neuer Hypothesen in

Fachgebieten, in denen der Forschungsstand gering ist [115]. Analysen zur Modellannahme (z.B. Normalverteilungsannahme) werden in diesem Rahmen nicht durchgeführt und es wird keine Anpassung für multiples Testen vorgenommen [116]. Wichtig ist daher alle statistisch signifikanten Ergebnisse dieser Studie im Rahmen eines explorativen Studiendesigns zu werten und sie in weiteren Studien zu validieren [117].

Die primären und sekundären Endpunkte sowie die MC wurden zunächst mittels deskriptiver Statistik (Frequenz, Median) analysiert. Mit dem Wilcoxon-Test erfolgte die Testung einer gleichartigen Veränderung des Verhältnisses von unreifen NK-Zellen im Vergleich zu allen NK-Zellen zwischen Therapiebeginn und 12 Monaten Fingolimod-Einnahme (primärer Endpunkt). Ebenso wurde dieser Test zur Prüfung der sekundären Endpunkte, also zum Vergleich der Anteile einer Immunpopulation vor und 12 Monate nach Therapiebeginn genutzt. Nur bei signifikanten Werten in diesem Test wurde die Veränderung über die Zeit mittels einer multivariaten Varianzanalyse („multivariate non-parametric repeated-measures analysis of variance“, MANOVA) getestet [118]. War der Vergleich von zwei bestimmten Visiten innerhalb des Studienverlaufes von Interesse, wurde bei signifikanter Varianzanalyse ein post-hoc Wilcoxon-Test zum Vergleich dieser angeschlossen.

Für die Identifizierung von NK-Zellpopulationen, deren Veränderungen als Prädiktoren für klinische Parameter dienen könnten, wurden multivariante Regressionsanalysen durchgeführt. Zur Verwendung kam die Methode der generalisierten Schätzgleichung („Generalized Estimating Equation“, GEE). Es wurden fünf GEE Modelle mit jeweils unterschiedlichen abhängigen klinischen Variablen und denselben unabhängigen (möglicherweise ursächlichen) immunologischen Variablen berechnet. Die drei ausgewählten Immunpopulationen waren die $CD56^{bright}$ NK-Zellen, das MC4 und die $CD56^{dim}CD94^{low}$ Zellen. Getestet wurde, ob ihre prozentuale Veränderung während der Studienzeit mit der Anzahl an Schüben, der Anzahl an Infektionen, der Anzahl an AEs, der EDSS-Progression oder dem Therapieansprechen korrelierten. Da von einer abnehmenden Korrelation über die Zeit ausgegangen wurde, wurde in der Korrelationsmatrix ein autoregressives Model der 1. Ordnung verwendet.

Die statistische Signifikanzgrenze wurde ab einem p-Wert ≤0,05 definiert, wobei die p-Werte als explorativ angesehen werden müssen. Für die statistischen Berechnungen wurde „IBM© SPSS© Statistics“, Version 25, © Copyright 1989, 2016 SPSS Inc. und das „R Project for Statistical Computing“, Version 3.4.0 (2017–04-21) genutzt. GraphPad prism 8.0.0 und BioRender 2021 wurden zur Erstellung der Grafiken verwendet.

3 Ergebnisse

3.1 Beschreibung der Studienkohorte

Die demografischen Daten der 17 inkludierten Patientinnen und Patienten sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

Tabelle 2. Baseline Daten der Studienkohorte (übersetzt und modifiziert nach [110])

demografische Parameter	**Gesamte Kohorte** (n = 17)
Frauen (n (%))	11 (64,7)
Alter (in Jahren, Mittelwert ± STD)	40,8 ±10,0
Intervall vom MS Beginn bis zur Baseline (in Jahren, Mittelwert ± STD)	10,1 ±6,7
Jährliche Schubrate (ARR) der 24 Monate vor Baseline	0,68
EDSS-Score zur Baseline (Median (Spannweite))	2,0 (0,0 – 6,0)
Vorherige MS-Behandlung (n (%))	15 (88,2)
Interferon β (n (%))	4 (23,5)
Glatirameracetat (n (%))	6 (35,3)
Teriflunomid (n (%))	3 (17,6)
Mitoxantron (n (%))	1 (5,9)
Fingolimod (n (%))	1 (5,9)

STD – Standardabweichung; MS – Multiple Sklerose; ARR – annualized relapse rate; EDSS – Expanded Disability Status Scale.

3.2 Analyse der klinischen Daten

Da Fingolimod eine konstante Blutkonzentration nach 2 Monaten erreicht [114], wurde nur der Zeitraum von Visite 2 (nach 3 Monaten Fingolimod-Therapie) bis Beendigung der Studie bei der klinischen Datenauswertung berücksichtigt. Anhand der im Methodenteil (Abschnitt 2.5) genannten Kriterien wurden 41% der Studienkohorte (2 Männer und 5 Frauen) als Non-Responder klassifiziert.

4 Patientinnen und Patienten litten während der Studie an einem oder mehreren Schüben. Daraus ergab sich eine über alle Studienteilnehmerinnen und -teilnehmer gemittelte ARR von 0,47. Der EDSS stieg in 35% der Fälle zwischen Visite 2 (nach 3 Monaten Fingolimod-Therapie) und Beendigung der Studie an. Insgesamt litten 11 Patientinnen und Patienten an einem oder mehreren AEs, die sich zu insgesamt 23 AEs addierten. 78% der AEs wurden als leicht bzw.

mittelschwer eingestuft (Klassifikation der AEs in Abschnitt 2.2 erläutert). Die schweren AEs (n = 4) umfassten in der Responder-Gruppe eine Herpes zoster Infektion und erhöhte Leberenzyme bei derselben Person sowie in der Non-Respondergruppe ebenfalls erhöhte Leberenzyme und eine Exazerbation der MS-Symptomatik während einer Urosepsis. Schwerwiegende unerwünschte Ereignisse („serious adverse events“, SAEs), die zu einer Krankenhauseinweisung, Tod oder anhaltender Behinderung führten, wurden in der Studie nicht beobachtet oder berichtet. 70% (n = 5) der Non-Responder und 40% (n = 4) der Responder erlitten Infektionen während des Studienzeitraumes. Insgesamt wurden 14 Infektionen, jeweils 7 in der Responder und 7 in der Non-Respondergruppe verzeichnet. (Tabelle 3)

Tabelle 3. Klinische Daten der Studienkohorte (übersetzt und modifiziert nach [110])

Klinische Parameter	**Gesamte Kohorte** (n = 17)	**Responder**[1] (n = 10)	**Non-Responder**[1] (n = 7)
Schübe			
Personen mit Schüben zwischen Visite 2 und Studienende (n (%))	4 (23,5)	0 (0,0)	4 (57,1)
1 Schub	2 (11,8)	0 (0,0)	2 (28,6)
2 Schübe	2 (11,8)	0 (0,0)	2 (28,6)
Jährliche Schubrate (ARR)	0,47	0	1,14
EDSS			
Personen mit EDSS Anstieg zwischen Visite 2 und Studienende (n (%))	6 (35,3)	0 (0,0)	6 (85,7)
Veränderung von Visite 2 zu Studienende (Median (range))	0.0 (-1,5 – 1,5)	-0,5 (-1,5 – 0)	0,5 (0,0 – 1,5)
Adverse events (AEs)			
Personen mit AEs zwischen Visite 2 und Studienende (n (%))	11 (64,7)	4 (40,0)	7 (100,0)
Absolute Anzahl an AEs zwischen Visite 2 und Studienende	23	10	13
davon als leichtes oder mittelschweres AE klassifiziert (n (%))	18 (78,3)	8 (80,0)	10 (76,9)
davon als schweres AE klassifiziert (n (%))	4 (17,4)	2 (20,0)	2 (15,4)
davon als SAE klassifiziert (n (%))	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
Infektionen			
Personen mit Infektionen zwischen Visite 2 und Studienende (n (%))	9 (53,0)	4 (40,0)	5 (71,4)
Absolute Anzahl an Infektionen zwischen Visite 2 und Studienende	14	7	7

[1] Responsekriterien finden sich im Abschnitt 2.5.

ARR – annualized relapse rate; EDSS – Expanded Disability Status Scale; AE – adverse events; SAE – serious adverse events.

3.3 Analyse der immunologischen Daten

3.3.1 Manuelle Analyse der immunologischen Daten

In einem ersten Schritt wurden die prozentualen Veränderungen der $CD56^{+}$ NK-Zellpopulation sowie der $CD56^{bright}$ und $CD56^{dim}$ Subpopulationen im PB der 17 MS-Patientinnen und Patienten analysiert. Die genutzte Gatingstrategie ist im Methodenteil (in Abbildung 3) dargestellt. Die Expression der Chemokinrezeptoren, der aktivierenden Rezeptoren und der inhibierenden Rezeptoren wurden in einem zweiten Schritt sowohl auf der $CD56^{bright}$, als auch in der $CD56^{dim}$ Population untersucht. Eine Zusammenfassung der Ergebnisse findet sich am Ende dieses Abschnittes in Tabelle 4. Signifikante Ergebnisse müssen unter der Einschränkung der explorativen Datenanalyse interpretiert werden und bedürfen weiterer Validierung in zukünftigen Studien (siehe Abschnitt 2.6).

3.3.1.1 Zunahme des NK-Zellanteils und Abnahme des Anteils anderer ILCs

Der prozentuale Anteil der $CD56^{+}$ NK-Zellen innerhalb der gesamten Lymphozytenpopulation lag bei Studienbeginn bei 8,74% (Median) und stieg über die Zeit signifikant an (MANOVA $p = 0{,}003$). Nach einem Monat betrug der Anteil an NK-Zellen 28,90% (Wilcoxon-Test $p = 0{,}005$) und nach zwölf Monaten 40,05% (Wilcoxon-Test $p < 0{,}001$). (Abbildung 4)

Zusätzlich zu den NK-Zellen finden sich weitere ILC-Populationen, namentlich die ILC2 und ILC3, im PB [119]. Zur orientierenden Einschätzung ihrer Veränderungen während einer Fingolimod-Therapie wurde der ILC-Marker CD127 verwendet. Bei Therapiebeginn betrug der Anteil an $CD56^{-}CD127^{+}$ Zellen 0,17% (Median) innerhalb der zirkulierenden Lymphozyten und nahmen über die Studiendauer von zwölf Monaten auf 0,12% ab (Wilcoxon-Test $p = 0{,}01$).

3.3.1.2 Zunahme reifer und Abnahme unreifer NK-Zellen

Als primärer Endpunkt war das Verhältnis von unreifen NK-Zellen zu allen NK-Zellen bei Therapiebeginn im Vergleich zu 12 Monaten Studiendauer definiert worden. Die unreife $CD56^{bright}$ Population zeigte eine signifikante Reduktion der medianen Frequenz von 9,30% bei Therapiebeginn auf 3,56% nach 12 Monaten (Wilcoxon-Test $p < 0{,}001$). Diese Abnahme konnte bereits in den vorherigen Zwischenvisiten beobachtet werden (MANOVA $p = 0{,}0000009$). Nach einem Monat war der Anteil an $CD56^{bright}$ NK-Zellen bereits auf 3,83% gesunken (Wilcoxon-Test $p < 0{,}001$). (Abbildung 5A) Der Anteil an reifen $CD16^{+}CD56^{dim}$ NK-Zellen innerhalb der gesamten NK-Zellpopulation nahm signifikant von 59,30% (Median) bei Studienbeginn auf 77,43% nach 12 Monaten Therapie zu (Wilcoxon-Test $p = 0{,}042$). Über die Zeit war diese Veränderung allerdings nicht signifikant. (Abbildung 5B)

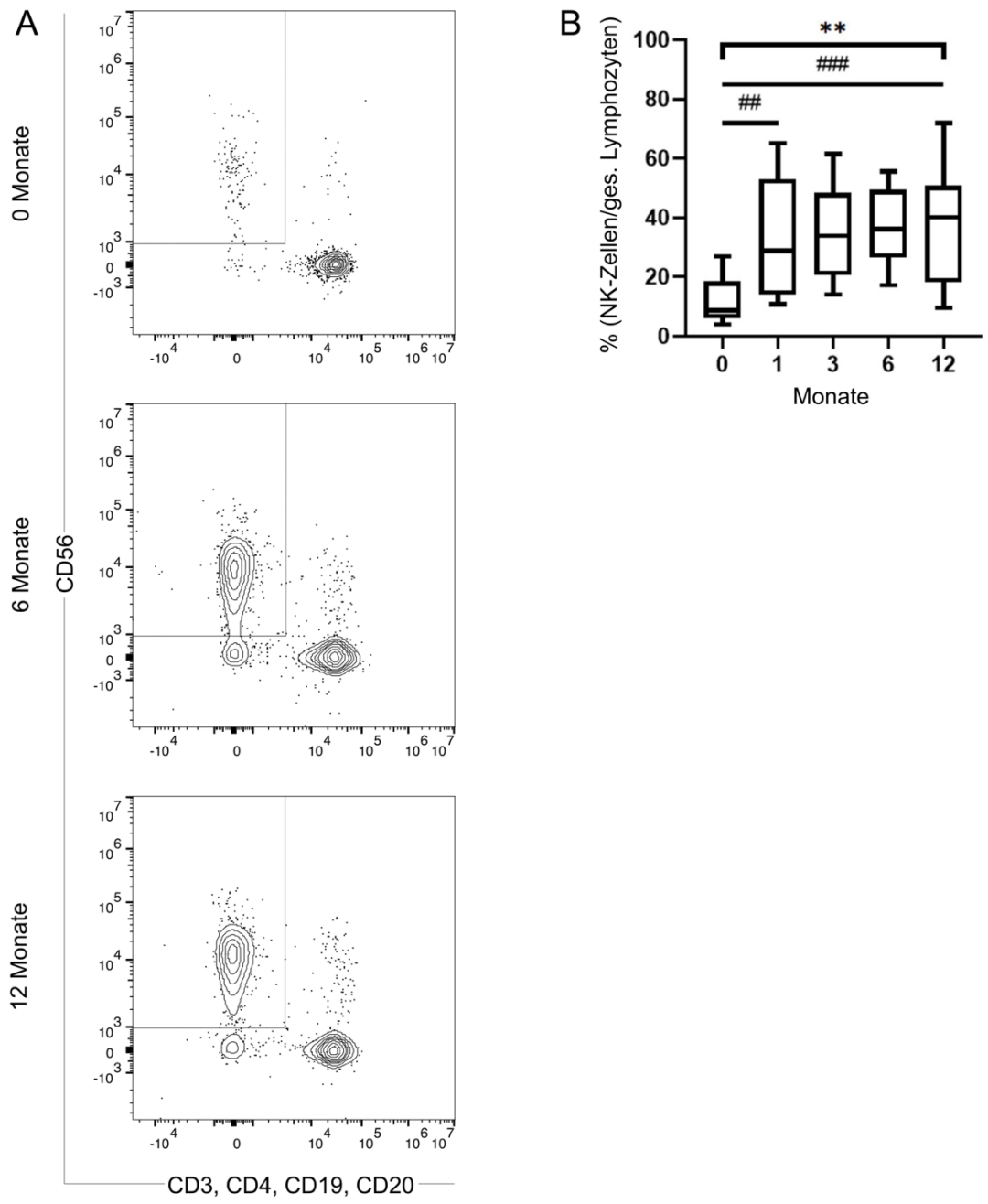

Abbildung 4. Zunahme des NK-Zellanteils während der Fingolimod-Behandlung (übersetzt und modifiziert nach [110])

(A) Auf der linken Seite zeigen repräsentative Konturplots eingerahmt die Lineage$^-$CD56$^+$ NK-Zellpopulationen innerhalb der Lymphozyten zu drei Zeitpunkten während der Studie. **(B)** Rechts werden durch Box-Plots die quantitativen Analysen zu allen Visiten visualisiert. MANOVA *p ≤ 0.05; **p ≤ 0.01; ***p ≤ 0.001; exakter Wilcoxon-Test #p ≤ 0.05; ##p ≤ 0.01; ###p ≤ 0.001.

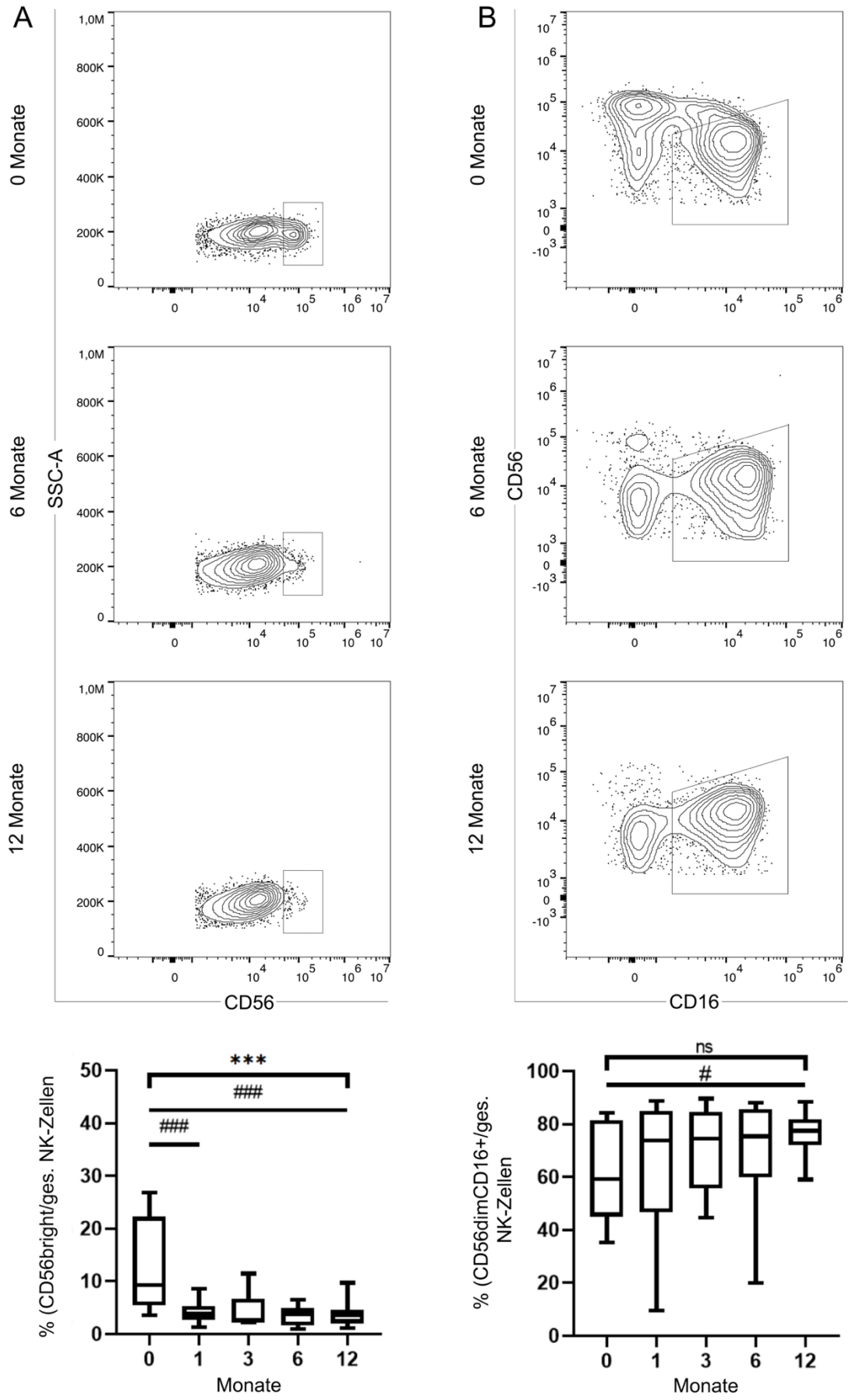
A
B
0 Monate
6 Monate
12 Monate
SSC-A
CD56
CD16
1,0M
800K
600K
400K
200K
0
% (CD56bright/ges. NK-Zellen
% (CD56dimCD16+/ges. NK-Zellen
***
###
###
ns
#
Monate
0
1
3
6
12

Abbildung 5. Veränderung der klassischen NK-Zellsubpopulationen CD56^{bright} und CD56^{dim}CD16^{+} während der Fingolimod-Behandlung (übersetzt und modifiziert nach [110])

Auf der linken Seite zeigen repräsentative Konturplots eingerahmt die CD56^{bright} NK-Zellen **(A)** und auf der rechten Seite die CD56^{dim}CD16^{+} NK-Zellen **(B)** innerhalb der gesamten NK-Zellpopulation zu drei Zeitpunkten während der Studie. In der untersten Zeile werden durch Box-Plots die quantitativen Analysen zu allen Visiten visualisiert. MANOVA *p ≤ 0.05; **p ≤ 0.01; ***p ≤ 0.001, ns – nicht signifikant; exakter Wilcoxon-Test #p ≤ 0.05; ##p ≤ 0.01; ###p ≤ 0.001; SSC-A – side scatter area.

Zwei weitere besonders reife NK-Zellsubpopulation, die CD56^{dim}CD94^{low} Zellen [120] und die CD56^{dim}NKG2A^{-}KIR^{+} Zellen [104], nahmen über die Studiendauer zu. Diese Veränderung war bei der CD56^{dim}CD94^{low} Population (MANOVA p = 0.014) ausgeprägter. Ihre mediane Frequenz lag bei Studienbeginn bei 32,65% und stieg auf 44.60% bei Studienende (Wilcoxon-Test p = 0,008). (Abbildung 6A)

Der Anteil an NKG2A^{-}KIR^{+} NK-Zellen innerhalb der CD56^{dim}-Population stieg nur leicht von 19,30% (Median) bei Beginn der Fingolimod-Einnahme auf 20,85% nach zwölf Monaten Medikamenteneinnahme an (Wilcoxon-Test p = 0.013). (Abbildung 6B)

3.3.1.3 Abnahme von NK-Zellen mit Chemokinrezeptoren

Die Expression der Chemokinrezeptoren CCR7 und CX_3CR1 wurde auf der gesamten NK-Zellpopulation sowie auf den CD56^{bright} und CD56^{dim} Zellen analysiert. Innerhalb der Gruppe der NK-Zellen, sowie innerhalb der CD56^{dim} Population nahm der Anteil an CCR7 bzw. CX_3CR1 positiven Zellen über den Studienzeitraum ab. Die Abnahme der CCR7^{+} CD56^{dim} NK-Zellen über die Zeit ist in Abbildung 7 gezeigt (MANOVA p = 0,0032). Bei Baseline betrug der Anteil an CCR7^{+} Zellen innerhalb der CD56^{dim} Population 5,30% (Median). Nach zwölf Monaten Fingolimod-Therapie lag dieser bei 2,46% (Wilcoxon-Test p = 0,007). Der Anteil an CCR7^{+} und CX_3CR1^{+} Zellen innerhalb der CD56^{bright} Population änderte sich im Durchschnitt nicht.

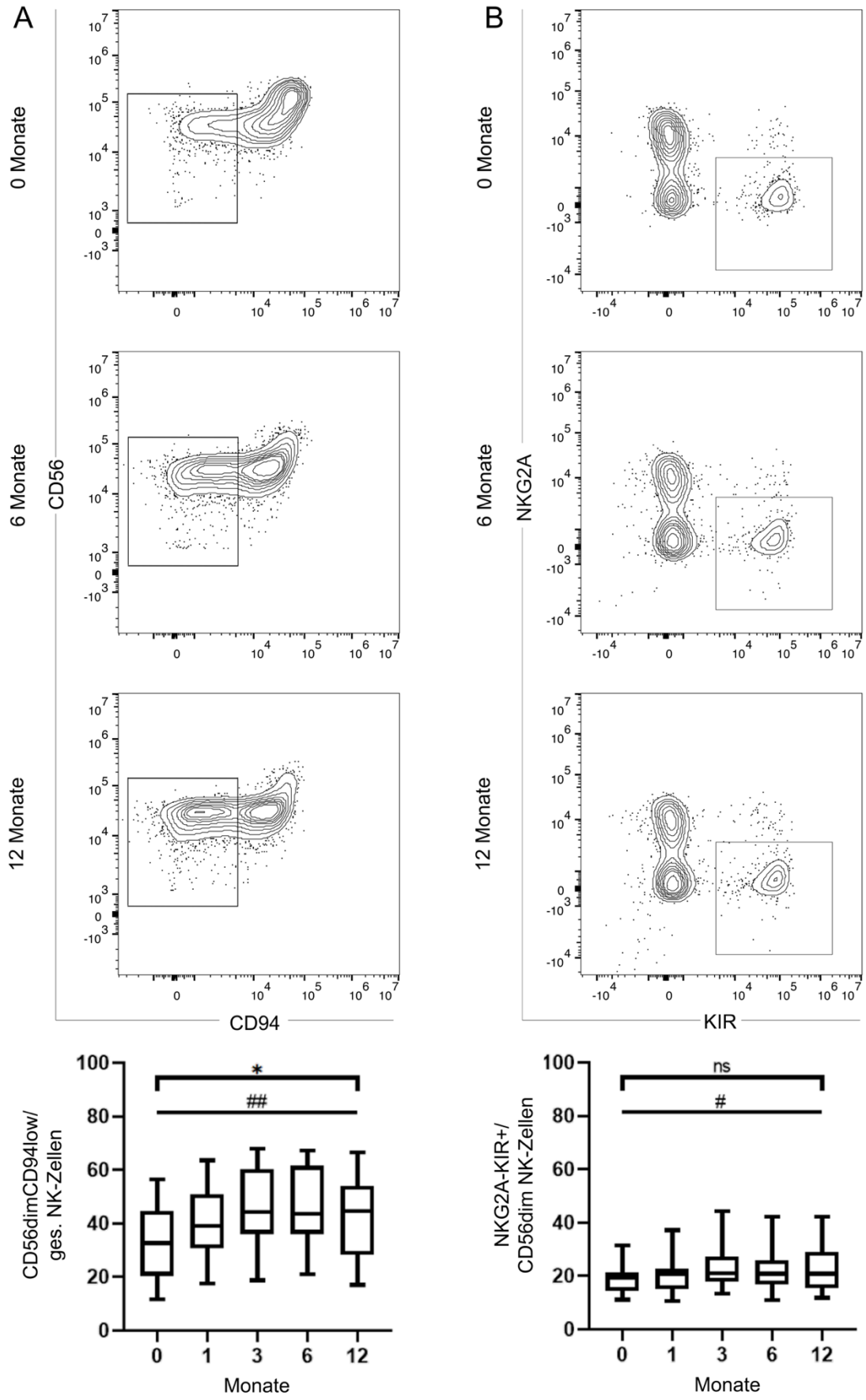

Abbildung 6. Veränderung besonders reifer NK-Zellsubpopulationen während der Fingolimod-Behandlung (übersetzt und modifiziert nach [110])

Auf der linken Seite zeigen repräsentative Konturplots eingerahmt die CD56^{dim}CD94^{low}-Zellen innerhalb der gesamten NK-Zellpopulation **(A)** und auf der rechten Seite die NKG2A^{-}KIR^{+}-Zellen **(B)** innerhalb der CD56^{dim} NK-Zellpopulation zu drei Zeitpunkten während der Studie. In der untersten Zeile werden durch Box-Plots die quantitativen Analysen zu allen Visiten visualisiert. MANOVA *p ≤ 0.05; **p ≤ 0.01; ***p ≤ 0.001, ns – nicht signifikant; exakter Wilcoxon-Test #p ≤ 0.05; ##p ≤ 0.01; ###p ≤ 0.001.

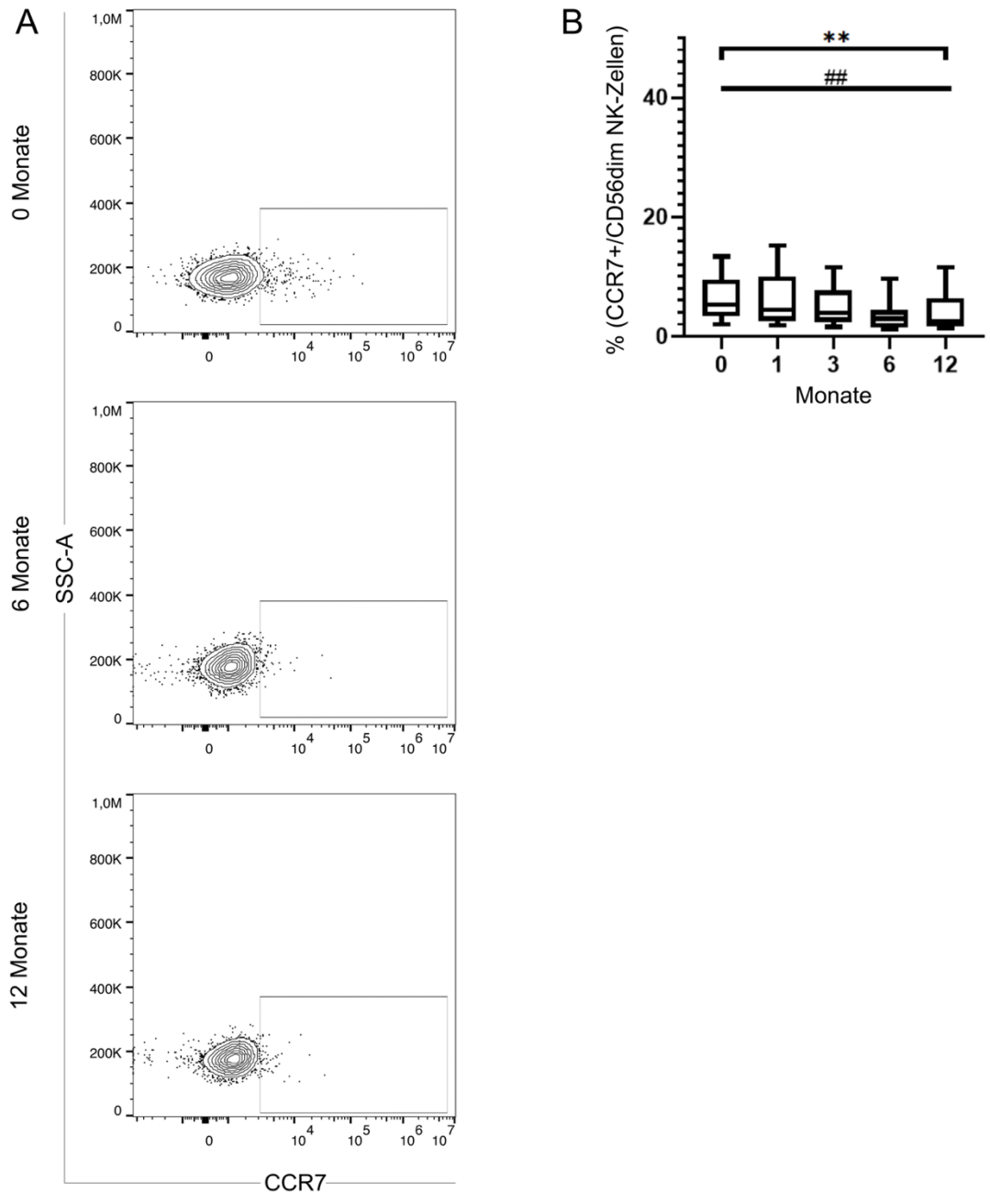

Abbildung 7. Veränderung der Chemokinrezeptor CCR7-exprimierenden CD56^{dim} NK-Zellen während der Fingolimod-Behandlung (übersetzt und modifiziert nach [110])

(A) Auf der linken Seite zeigen repräsentative Konturplots eingerahmt die CCR7^{+}-Zellen innerhalb der CD56^{dim} NK-Zellpopulation zu drei Zeitpunkten während der Studie. **(B)** Rechts werden durch Box-Plots die quantitativen Analysen zu allen Visiten visualisiert. MANOVA *p ≤ 0.05; **p ≤ 0.01; ***p ≤ 0.001; exakter Wilcoxon-Test #p ≤ 0.05; ##p ≤ 0.01; ###p ≤ 0.001; SSC-A – side scatter area.

3.3.1.4 Abnahme von NK-Zellen mit dem inhibierenden Rezeptor NKG2A und Abnahme von NK-Zellen mit den aktivierenden Rezeptoren NKp46 und DNAM-1

CD94 wird als Heterodimer mit verschiedenen Rezeptoren der NKG2-Familie auf der NK-Zelloberfläche exprimiert. Zusammen mit NKG2A wirkt der Rezeptorkomplex inhibierend [121]. Die mediane Frequenz der $CD94^{+}NKG2A^{+}$ Zellen nahm zwischen Baseline und zwölf Monaten Therapie sowohl in der Gruppe der gesamten NK-Zellen von 54,85% auf 48,56% (Wilcoxon-Test $p = 0.004$), als auch in der der $CD56^{bright}$ (Wilcoxon-Test $p = 0{,}002$) und $CD56^{dim}$ (Wilcoxon-Test $p = 0{,}013$) Population ab.

Die im nächsten Schritt analysierten aktivierenden Rezeptoren umfassten NKp46, DNAM-1, NKG2D und CD94-NKG2C. Der Anteil an NKp46 und DNAM-1 positiven NK-Zellen nahm während des Studienzeitraumes ab. Der Anteil an NKG2D und CD94-NKG2C exprimierenden Zellen veränderte sich im Durchschnitt nicht.

Der Anteil an $NKp46^{+}$ Zellen minderte sich nur in der $CD56^{dim}$ Population und nicht in der $CD56^{bright}$ Population. Es wurde eine Abnahme der medianen Frequenz der $NKp46^{+}$ $CD56^{dim}$ Zellen von 18,90% bei Therapiebeginn auf 15,80% nach zwölf Monaten gemessen (Wilcoxon-Test $p = 0{,}007$). (Abbildung 8A)

Der Anteil an $DNAM\text{-}1^{+}$ Zellen zu Therapiebeginn im Vergleich zu nach zwölf Monaten Therapiedauer nahm hingegen sowohl in der $CD56^{bright}$ Population (Wilcoxon-Test $p < 0{,}001$), als auch in der $CD56^{dim}$ Population (Wilcoxon-Test $p = 0.035$) ab. Die Veränderung über die Zeit war nur in der $CD56^{bright}$ und nicht in der $CD56^{dim}$ Population signifikant (MANOVA $p = 0.0036$). (Abbildung 8B)

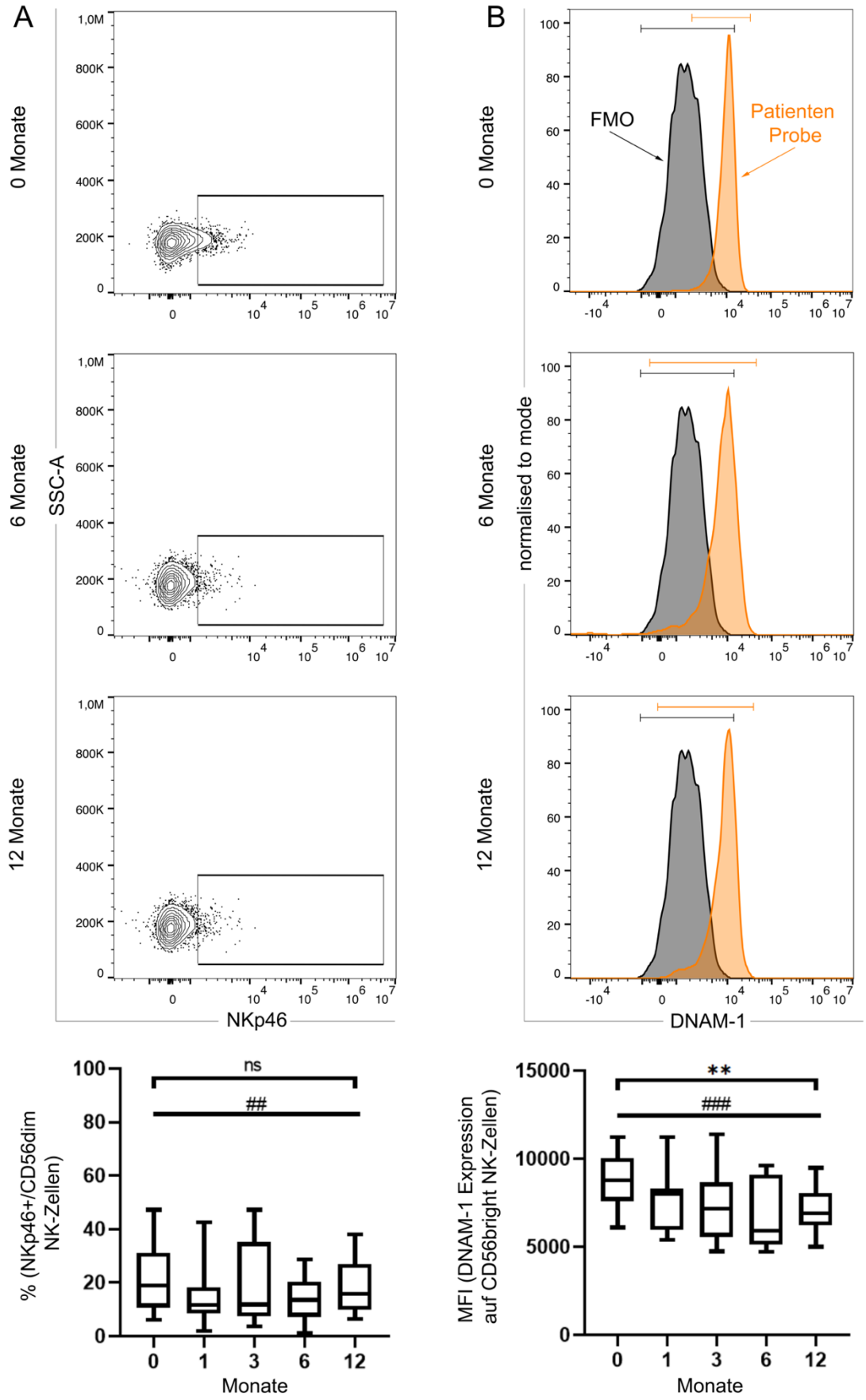

Abbildung 8. Veränderung des NK-Zellanteils mit aktivierenden Rezeptoren während der Fingolimod-Behandlung (übersetzt und modifiziert nach [110])

Auf der linken Seite zeigen repräsentative Konturplots eingerahmt die NKp46^{+}-Zellen innerhalb der CD56^{dim} NK-Zellpopulation **(A)** bzw. auf der rechten Seite ein repräsentatives Histogramm die DNAM-1-Expression auf den CD56^{dim} NK-Zellen **(B)** zu drei Zeitpunkten während der Studie. In der untersten Zeile werden durch Box-Plots die quantitativen Analysen zu allen Visiten visualisiert. MANOVA *p ≤ 0.05; **p ≤ 0.01; ***p ≤ 0.001, ns – nicht signifikant; exakter Wilcoxon-Test #p ≤ 0.05; ##p ≤ 0.01; ###p ≤ 0.001; FMO – fluorescence-minus-one; SSC-A – side scatter area; MFI – mittlere Fluoreszenzintensität.

3.3.1.5 Zusammenfassung zur manuellen Analyse der immunologischen Daten

Tabelle 4. Zusammenfassung der Ergebnisse der manuellen Analyse (übersetzt und modifiziert nach [110])

	CD56^{+}		**CD56^{bright}**		**CD56^{dim}**	
	Effekt	p-Wert	Effekt	p-value	Effekt	p-Wert
Reifemarker						
CD16	–	0.108	↑	**0.049**	–	0.542
CD94	↓	**0.011**	–	0.203	–	0.058
CD94/NKG2A	↓	**0.004**	↓	**0.002**	↓	**0.013**
KIR	↑	**0.007**	↑	**0.091**	↑	**0.019**
Chemokin-rezeptoren						
CCR7	↓	**0.002**	–	0.155	↓	**0.007**
CX_3CR1	↓	**0.031**	–	0.168	↓	0.058
Inhibierende Rezeptoren						
CD94/NKG2A	↓	**0.004**	↓	**0.002**	↓	**0.013**
Aktivierende Rezeptoren						
NKp46	↓	**<0.0001**	–	0.561	↓	**0.007**
DNAM-1	↓	**0.005**	↓	**0.001**	↓	**0.035**
NKG2D	–	0.413	↑	0.067	↑	**0.042**
CD94/NKG2C	–	0.531	–	0.122	–	0.333

Verglichen wurde die medianen Marker-Frequenz in der gesamten NK-Zellpopulation und in der CD56^{bright} sowie CD56^{dim} Population zur Baseline und 12 Monaten nach Behandlungsbeginn. Die Auswertung erfolgte mit dem Wilcoxon-Test. Signifikante Ergebnisse wurden fett dargestellt.

3.3.2 Automatisierte Analyse der immunologischen Daten unter Verwendung des unsupervidierten Clustering-Algorithmuses FlowSOM

NK-Zellen sind eine Immunpopulation, die sich aus vielen heterogenen Subpopulationen mit unterschiedlichen Funktionen und Phänotypen zusammensetzen, die noch nicht vollumfänglich beschrieben und charakterisiert sind [122, 123]. Um Veränderungen von unerwarteten Immunsubpopulationen während der Fingolimod-Therapie zu explorieren, wurden die durchflusszytometrischen Daten durch den unsupervidierten Algorithmus FlowSOM [112] mittels maschinellen Lernens analysiert. Zudem bot diese automatisierte Analyse die Möglichkeit, die Ergebnisse des manuellen Gatings zu validieren.

Zellen mit ähnlichen Eigenschaften (Rezeptorexpression) werden unter der Verwendung von FlowSOM zu Clustern und in Übergruppen den MC zusammengefasst. Diese Cluster werden in Form von Punkten in einem MST dargestellt, wobei Cluster mit ähnlichen Eigenschaften in topografischer Nähe zueinander angeordnet werden. Insgesamt wurden die Daten in 81 Clustern und 15 MC zusammengefasst. Die Größe der Clusterpunkte visualisiert den Anteil an Zellen, die in einem Cluster inkludiert werden.

In Abbildung 9A können mehrere $CD56^{bright}$ Populationen identifiziert werden (orange eingerahmt). Bereits in dieser Abbildung kann eine Reduktion der $CD56^{bright}$ Populationen visuell nachvollzogen werden. Außerdem zeigt die Abbildung, dass die $CD56^{bright}$-MC in drei verschiedenen Ästen des MST lokalisiert sind. Zur Aufschlüsselung dieser Zuordnung ist die Analyse der Expressionslevels der anderen Rezeptoren innerhalb dieser MC entscheidend (siehe hierzu Abbildung 9B &10). Das MC15 wird auf Grund seines hohen NKG2C Expressionsgrads im Ast mit den $NKG2C^{+}$-Populationen dargestellt. Während MC6, 13 und 9 ein entsprechend niedriges NKG2C Expressionslevel aufweisen. MC9 hingegen unterscheidet sich von den anderen $CD56^{birght}$ MC durch eine niedrige Expression des Chemokinrezeptors CCR7. Die Prüfung statistisch signifikanter Veränderungen der MC-Frequenzen zwischen Therapiebeginn und Studienende zeigte bei 5 MC signifikante Ergebnisse. Während MC4 in diesem Zeitraum signifikant zunahm, nahmen MC11 sowie drei weitere MC (MC6, 13 und 15) signifikant ab. MC4 stieg von 29,59% (Median) bei Baseline auf 43,45% bei Studienende an (Wilcoxon $p = 0,01$). Der Anteil des MC11 nahm nur leicht von 5,34% auf 4,90% ab (Wilcoxon $p \leq 0,001$). Bei beiden MC war die Veränderung über alle Visiten allerdings nicht signifikant (MANOVA MC4 $p = 0.12$, MC11 $p = 0.10$). Die anderen drei MC (MC6, 13 und 15), die auf Grund ihrer hohen CD56 Expression zusammengefasst wurden, machten zu Beginn der Studie 11,84% der NK-Zellpopulation aus. Nach einem Monat sank ihr Anteil auf 5,90% und nach zwölf Monaten Therapie auf 4,00% (Wilcoxon $p \leq 0,001$). (Abbildung 9C)

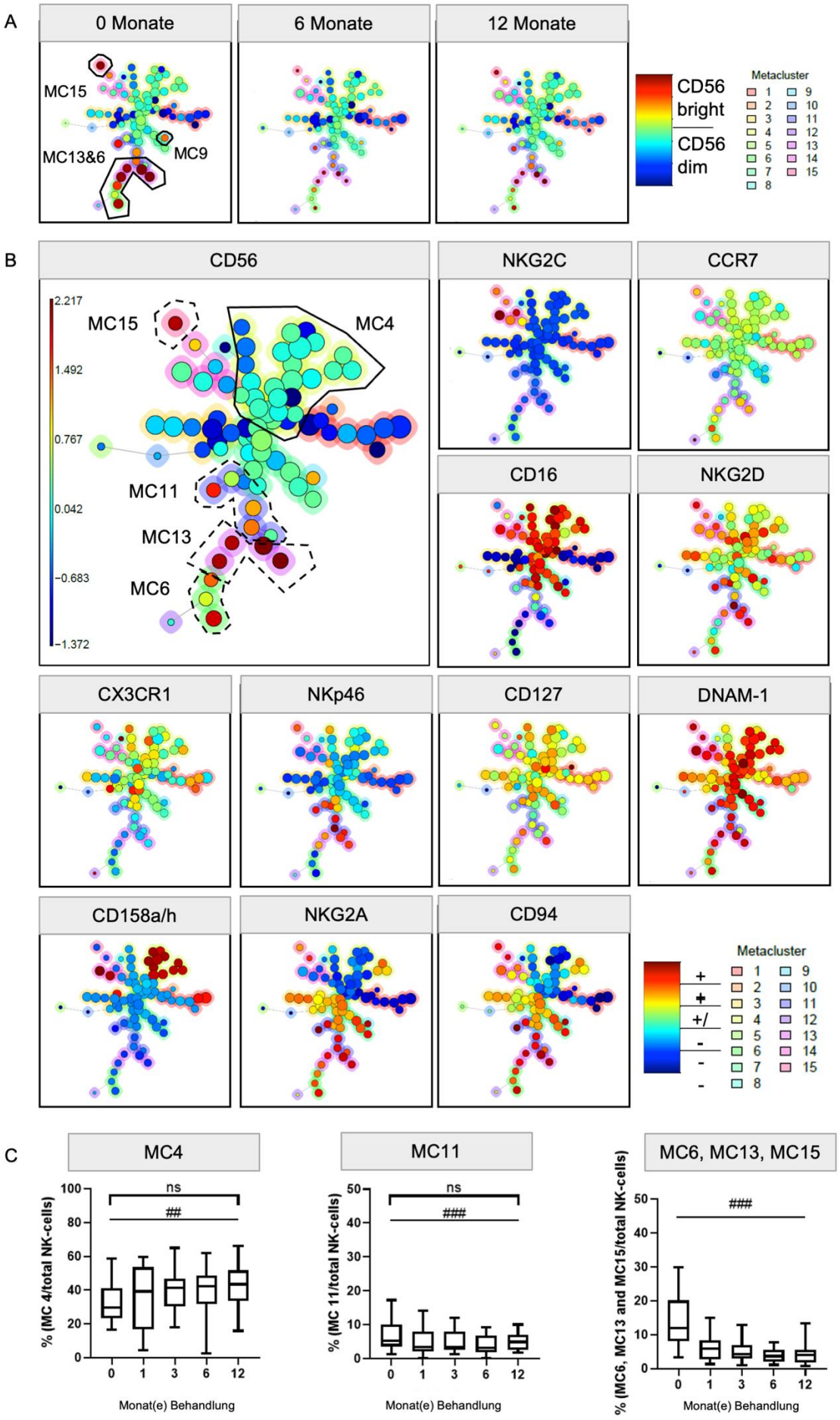
A
0 Monate
6 Monate
12 Monate
MC15
MC13&6
MC9
CD56 bright
CD56 dim
Metacluster
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15
B
CD56
2.217
1.492
0.767
0.042
−0.683
−1.372
MC15
MC4
MC11
MC13
MC6
NKG2C
CCR7
CD16
NKG2D
CX3CR1
NKp46
CD127
DNAM-1
CD158a/h
NKG2A
CD94
+
+
+/
-
-
-
Metacluster
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15
C
MC4
% (MC 4/total NK-cells)
ns
##
Monat(e) Behandlung
MC11
% (MC 11/total NK-cells)
ns
###
Monat(e) Behandlung
MC6, MC13, MC15
% (MC6, MC13 and MC15/total NK-cells)
###
Monat(e) Behandlung

Abbildung 9. Unsupervidierte Clustering-Analyse aller CD56^{+} NK-Zellen der Studienkohorte (übersetzt und modifiziert nach [110])

Die CD56^{+} NK-Zellen von allen Patientinnen und Patienten zu allen Studienzeitpunkten wurden auf der Grundlage ihrer CCR7, NKG2C, DNAM-1, 158a/h, CD56, NKG2A, CD94, CD16, NKG2D, CX3CR1, NKp46, und CD127 Expression unter Verwendung des FlowSOM Algorithmuses in insgesamt 81 Cluster aufgeteilt. Der zur Visualisierung der Clustering-Analyse dienliche minimal-spanning-tree (MST) stellt Cluster mit ähnlichen Eigenschaften im selben Ast dar. Die Farbe der Clusterpunkte visualisiert die mediane Fluoreszenzintensität des jeweiligen Antikörpers (siehe Farblegende) und die Größe repräsentiert die Anzahl an Zellen, die in das jeweilige Cluster integriert wurden. Die Ringfarbe, die jedes Cluster umrahmt, kennzeichnet die Zugehörigkeit zum entsprechenden Metacluster (MC). **A** Einzelne MSTs für verschiedene Visiten der Studie mit Visualisierung der CD56-Expression. MC mit homogener CD56^{bright}-Expression bei Monat 0 eingerahmt. **B** Einzelne MSTs mit Visualisierung der jeweiligen Antikörper-Expression. MC mit signifikanter Frequenzzunahme zwischen Baseline und 12 Monaten Therapie mit durchgezogener Linie und MC mit signifikanter Frequenzabnahme mit gestrichelter Linie markiert. **C** Boxplots zur Visualisierung der quantitativen Analysen von den MC mit signifikanten Veränderungen zwischen Baseline und 12 Monaten Therapie. MANOVA *p ≤ 0.05; **p ≤ 0.01; ***p ≤ 0.001, ns – nicht signifikant; exakter Wilcoxon-Test #p ≤ 0.05; ##p ≤ 0.01; ###p ≤ 0.001; MC – Metacluster

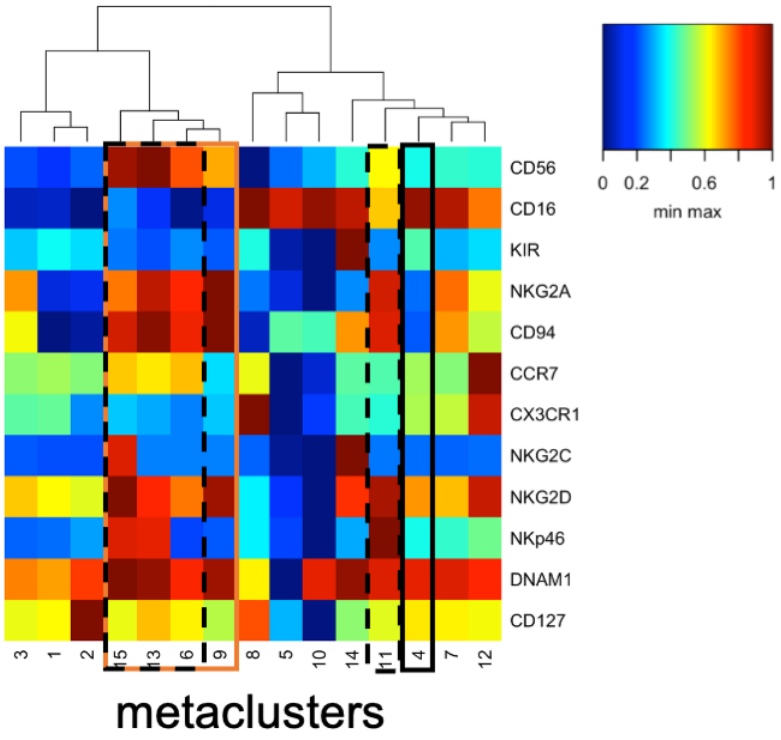

Abbildung 10. Heatmap zur Visualisierung der Marker-Expression der FlowSOM-Metacluster(MC) (modifiziert nach [110])

Darstellung der medianen Fluoreszenzintensität jedes Markers im entsprechenden MC mittels einer von der minimalen zur maximalen Fluoreszenzintensität reichenden Farbskala. Die durchgezogene Linie markiert das MC4, dessen Anteil während des Studienzeitraumes zunahm und die gestrichelte Linie markiert MC, deren Anteil über den Studienzeitraum abgenommen haben (MC 6, 11, 13, 15). In Orange sind die CD56^{bright} MC umrahmt.

Zur Charakterisierung des jeweiligen Phänotyps der in einem MC zusammengefassten Zellen, wurde die mediane Fluoreszenzintensität aller zwölf analysierten NK-Zellrezeptoren für jedes MC mit einer Farbscala vom Minimum (blau) bis Maximum (rot) in einer Heatmap dargestellt (Abbildung 10). MC6, 13 und 15 zeigen einen typischen $CD56^{bright}$ Phänotyp. MC11 kann mit folgendem Phänotyp beschrieben werden: $CD56^{+/-}CD16^{+}KIR^{-}NKG2A^{++}CD94^{++}CCR7^{+/-}CX_3CR1^{+/-}NKG2C^{-}NKG2D^{++}NKp46^{++}DNAM\text{-}1^{++}CD127^{+/-}$. Im Vergleich zu MC6, 13 und 15 weist MC11 eine niedrigere CD56-Expression auf und auch andere typische $CD56^{bright}$-Rezeptoren, wie CCR7, sind in geringerem Ausmaß vertreten [124]. Auf der anderen Seite fehlen dieser Zellpopulation typische Reifemarker, wie KIR und CD16 [124, 125]. Die Abnahme dieses MCs war nicht so stark ausgeprägt, wie die der drei $CD56^{bright}$ MC. MC4 weist hingegen eine niedrige CD56 Expression und eine hohe CD16 Expression auf [126]. Sein Phänotyp ist charakterisiert als: $CD56^{-}CD16^{++}KIR^{+/-}NKG2A^{-}CD94^{-}CCR7^{+/-}CX_3CR1^{+/-}NKG2C^{-}NKG2D^{+}NKp46^{-}DNAM\text{-}1^{++}CD127^{+}$ [110]. Eine Zusammenfassung der signifikanten Ergebnisse der Clustering-Analyse ist in Tabelle 5 dargestellt.

Tabelle 5. Zusammenfassung der Ergebnisse der automatisierten FlowSOM-Analyse (eigene Darstellung)

	Vergl. der MC-Frequenzen zwischen V0 und V4		**Phänotypische Charakteristika der entsprechenden MC**					
	Effekt	**p-Wert**	**CD56-Expression**	**Reife-marker**	**Chemokinre-zeptoren**	**Inhibierende Rezeptoren**	**Aktivierende Rezeptoren**	**CD127-Expression**
MC4	↑	0,010	$CD56^{-}$	$CD16^{++}$ $KIR^{+/-}$ $NKG2A^{-}$ $CD94^{-}$	$CCR7^{+/-}$ $CX_3CR1^{+/-}$	$NKG2A^{-}$	$NKG2C^{-}$ $NKG2D^{+}$ $NKp46^{-}$ $DNAM\text{-}1^{++}$	$CD127^{+}$
MC6	↓	0,002	$CD56^{++}$	$CD16^{--}$ KIR^{-} $NKG2A^{++}$ $CD94^{++}$	$CCR7^{+}$ CX_3CR1^{-}	$NKG2A^{++}$	$NKG2C^{-}$ $NKG2D^{+}$ $NKp46^{--}$ $DNAM\text{-}1^{++}$	$CD127^{+}$
MC11	↓	<0,0001	$CD56^{+/-}$	$CD16^{+}$ KIR^{-} $NKG2A^{++}$ $CD94^{++}$	$CCR7^{+/-}$ $CX_3CR1^{+/-}$	$NKG2A^{++}$	$NKG2C^{-}$ $NKG2D^{++}$ $NKp46^{++}$ $DNAM\text{-}1^{++}$	$CD127^{+/-}$
MC13	↓	<0,0001	$CD56^{++}$	$CD16^{--}$ KIR^{--} $NKG2A^{++}$ $CD94^{++}$	$CCR7^{+}$ CX_3CR1^{-}	$NKG2A^{++}$	$NKG2C^{-}$ $NKG2D^{++}$ $NKp46^{++}$ $DNAM\text{-}1^{++}$	$CD127^{+}$
MC15	↓	0,001	$CD56^{++}$	$CD16^{--}$ KIR^{-} $NKG2A^{++}$ $CD94^{++}$	$CCR7^{+}$ CX_3CR1^{-}	$NKG2A^{++}$	$NKG2C^{-}$ $NKG2D^{+}$ $NKp46^{++}$ $DNAM\text{-}1^{++}$	$CD127^{+/-}$

Links sind die Veränderungen (Effekt) der MC-Frequenzen zwischen Baseline (V0) und 12 Monaten nach Behandlungsbeginn (V4) dargestellt. Es sind nur die signifikanten Ergebnisse (ermittelt mit Wilcoxon-Test) mit dem jeweiligen Signifikanzniveau (p-Wert) aufgeführt. Rechts sind die entsprechenden Phänotypen aufgeschlüsselt. MC – Metacluster.

3.4 Vergleichende Analysen der klinischen und immunologischen Daten

3.4.1 Vergleichende Analyse der MC-Verteilung in Respondern und Non-Respondern

Um Unterschiede in der Verteilung der MC zwischen Respondern und Non-Respondern zu analysieren, ließen wir die Daten beider Gruppen einzeln in dem MST abbilden. Die prozentuale Verteilung der MC von jedem Patienten bzw. jeder Patientin zu Therapiebeginn und nach 6 und 12 Monaten, stellten wir mit einer relativen Farbskala in Abbildung 13 dar. Bei den eingerahmten CD56$^{bright/medium}$ MC (MC6, 9, 13, 15) fiel ein höherer Anteil in der Non-Respondergruppe als in der Respondergruppe bei Therapiebeginn auf. Nach 6 Monaten schienen diese MC einen ähnlichen Anteil in beiden Gruppen auszumachen. Außerdem fiel ein höherer Anteil des CD127^{+} MC2 bei Baseline in der Non-Respondergruppe auf. Nach 6 Monaten glich sich auch die Frequenz des MC2 in der Non-Respondergruppe der Frequenz der Responder an.

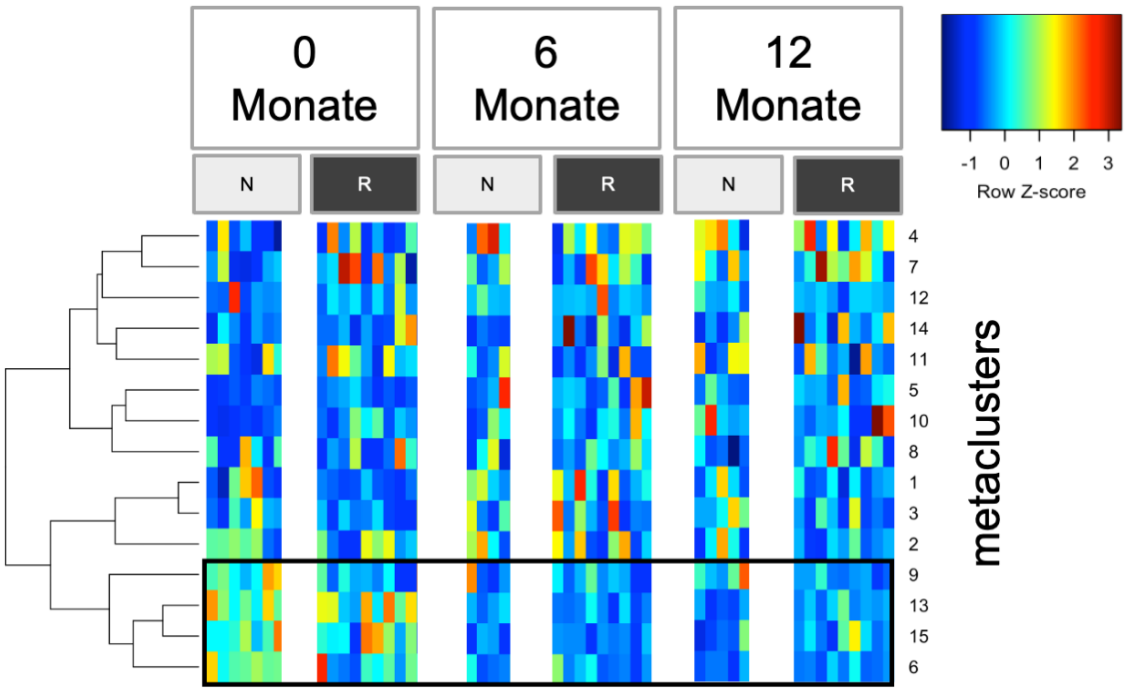

Abbildung 11. Visualisierung der Metacluster(MC)-Verteilung in der Responder- und Non-Respondergruppe (übersetzt und modifiziert nach [110])

Hier wird der prozentualen Anteile eines jeden MC bei Respondern („R“, dunkel grau) und Non-Respondern („N“, hell grau) zu Therapiebeginn und nach 6 und 12 Monaten farbcodiert in einer Heatmap dargestellt. Jede Spalte zeigt die MC-Verteilung einer Person zu einer bestimmten Visite. Zur besseren Vergleichbarkeit der MC-Verteilungen und um Personen-spezifische Spannbreiten zu berücksichtigen, wurde der Z-Score zur Skalierung genutzt (pro Probe über alle Metacluster). Eingerahmt sind die MC mit hoher CD56 Expression.

3.4.2 Assoziationsanalysen mit bestimmten NK-Zellsubpopulation und verschiedenen klinischen Parametern

Zur Identifizierung von NK-Zellpopulationen, deren Veränderungen als Prädiktoren für klinische Parameter dienen könnten, wurden fünf GEE Modelle berechnet. Als potentielle Kandidaten wurden die regulatorischen $CD56^{bright}$ NK-Zellen [20], die reife, zytotoxische $CD56^{dim}CD94^{low}$ Population [120] und das MC4, eine bisher in der Literatur nicht beschriebene Population, die mittels der unsupervidierten Clustering-Analyse identifiziert wurde und die während der Studie zugenommen hatte, ausgewählt.

Zunächst wurde auf eine Assoziation zwischen der Veränderung der 3 Immunpopulationen und dem Risiko für eine Infektion getestet. Eine Zunahme der $CD56^{dim}CD94^{low}$ korrelierte hierbei mit einer geringeren Anzahl an Infektionen (siehe Tabelle 4). Ein Anstieg dieser Population um ein Prozent bedeutete eine Risikoreduktion für eine Infektion um 3,7% (Odds Ratio = 0,963; 95% Konfidenzintervall = 0,939 – 0.988, p = 0,004). Die anderen Immunpopulationen zeigten keinen signifikanten Einfluss auf die Anzahl der Infekte.

Eine Reduktion der $CD56^{bright}$ Population korrelierte signifikant mit einer Zunahme der Schübe. Eine Abnahme der $CD56^{bright}$ NK-Zellen um ein Prozent war mit einer Erhöhung des Schubrisikos um 25,9% assoziiert (Odds Ratio = 0,741; 95% Konfidenzintervall = 0,556 – 0,998, p = 0,041). Bei den anderen Immunpopulationen fanden sich keine signifikanten Korrelationen bezüglich des Schubrisikos (siehe Tabelle 4). Auch zeigten sich keine signifikanten Korrelationen zwischen den drei Immunpopulationen und der Anzahl an Nebenwirkungen, dem EDSS und der Response.

Tabelle 4. Longitudinale Assoziation zwischen klinischen Parametern und drei NK-Zellpopulationen (übersetzt und modifiziert nach [110])

		Koeffizient (95%-KI[1])	**p - Wert**	**Odds Ratio (95%-KI)**
abhängige Variable: Anzahl an Infektionen				
unabhängige Variablen:	Veränderung von $CD56^{bright}$	-0,080 (-0,169 – 0,008)	0,073	0,923 (0,845 – 1,008)
	Veränderung von MC4	-0,010 (-0,040 – 0,020)	0,503	0,990 (0,960 – 1,020)
	Veränderung von $CD56^{dim}CD94^{low}$	**-0,037 (-0,063 – -0,012)**	**0,004**	**0,963 (0,939 – 0,988)**
abhängige Variable: Anzahl an Schüben				
unabhängige Variablen:	Veränderung von $CD56^{bright}$	**-0,300 (-0,587 – 0,012)**	**0,041**	**0,741 (0,556 – 0,988)**
	Veränderung von MC4	0,037 (-0,005 – 0,080)	0,085	1,038 (0,995 – 1,083)
	Veränderung von $CD56^{dim}CD94^{low}$	0,043 (-0,007 – 0,094)	0,093	1,044 (0,993 – 1,099)

Dargestellt sind die Ergebnisse von 2 generalisierten Schätzgleichungen („Generalized Estimating Equation“, GEE). Als unabhängige Variablen wurde die „Anzahl an Infektionen“ in dem einen Modell und die „Anzahl an Schüben“ im anderen Modell verwendet. Die abhängigen Variablen beinhalteten die $CD56^{bright}$-, MC4- und $CD56^{dim}CD94^{low}$-Population in beiden Modellen. Untersucht wurde eine Vorhersage der klinischen Parameter durch die Veränderung der jeweiligen Immunpopulationen. Signifikante Ergebnisse sind fett gedruckt dargestellt.

KI - Konfidenzintervall

4 Diskussion

4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

Fingolimod führt zu einer Abnahme von Zellen des adaptiven Immunsystems im PB und einer damit einhergehenden Zunahme des NK-Zellanteils. Die vorliegende Studie soll diese im PB dominierende NK-Zellpopulation analysieren und mögliche Hinweise auf ihre Rolle im Rahmen der MS-Pathogenese aufdecken. Dafür wurde der NK-Zellphänotyp im PB von 17 RRMS-Patientinnen und -Patienten unter neu-begonnener Fingolimod-Therapie über 12 Monate untersucht und auf Korrelationen mit dem Therapieansprechen oder dem Auftreten bestimmter Nebenwirkungen getestet.

Die Hauptaussagen der Promotionsarbeit sind folgende:

1. Während der Therapie mit Fingolimod nimmt der NK-Zellanteil zu und der Anteil anderer ILCs im PB ab.
2. Die klassischen NK-Zellsubpopulation zeigen unter der Fingolimod-Therapie ein inverses Verhalten mit einer prozentualen Abnahme der unreifen $CD56^{bright}$ Population und einer prozentualen Zunahme der reifen $CD56^{dim}$ Population.
3. Besonders reife NK-Zellsubpopulationen ($CD56^{dim}CD94^{low}$, $CD56^{dim}NKG2A^{-}KIR^{+}$) nehmen ebenfalls während der Therapie mit Fingolimod zu, während NK-Zellen mit der Expression bestimmter funktioneller Rezeptoren (CCR7, CX3CR1, NKG2A, NKp46 und DNAM-1) abnehmen.
4. Nach Beginn der Behandlung mit Fingolimod nimmt der Anteil einer bisher nicht beschriebenen NK-Zellsubpopulation mit folgendem Phänotyp im PB zu: $CD56^{dim}CD16^{++}KIR^{+/-}NKG2A^{-}CD94^{-}CCR7^{+/-}CX_3CR1^{+/-}NKG2C^{-}NKG2D^{+}NKp46^{-}$ $DNAM1^{++}CD127^{+}$ [110].
5. Es ergaben sich Hinweise darauf, dass sich Non-Responder durch eine größere Reduktion der $CD56^{bright}$ Frequenz im PB nach Beginn der Fingolimod-Therapie auszeichnen.
6. NK-Zellsubpopulationen ($CD56^{bright}$ Zellen, $CD56^{dim}CD94^{low}$ Population und MC4) konnten in dieser Studie nicht als Prädiktoren für ein Therapieansprechen dienen.

4.2 Interpretation und Einbettung der Ergebnisse in den bisherigen Forschungsstand

Viele Studien berichten übereinstimmend von einem höheren Anteil an NK-Zellen im PB von MS-Patientinnen und -Patienten mit Fingolimod-Behandlung im Vergleich zu unbehandelten, oder mit anderen MS-Medikamenten behandelten Personen und gesunden Kontrollen [81-85, 127, 128].

Hinsichtlich des longitudinalen Studiendesigns vergleichbare Untersuchungen berichten von 9-11% NK-Zellanteil innerhalb der Lymphozytenpopulation zur Baseline-Visite und einer Zunahme dieses Anteiles auf 41-54% nach 6 bzw. 12 Monaten [81, 85]. Der in diesem Projekt gemessene Lin^-CD56^+ NK-Zellanteil lag mit 8,74% bei Baseline und 40,05% nach 12 Monate somit nicht wesentlich niedriger als die berichteten NK-Zellfrequenzen der zwei oben zitierten Studien und bestätigt die bisher in der Literatur beschriebene Beobachtung (Abbildung 4). In mehreren Untersuchungen wurde außerdem die absolute Zahl der NK-Zellen analysiert, die sich unter der Fingolimod-Therapie nicht änderte oder nur leicht abnahm, während sich die absolute Anzahl der B- und T-Zellen deutlich reduzierte [81, 84, 86, 89, 127-130]. Auf den B- und T-Zellen dominiert der $S1PR_1$, wohingegen NK-Zellen hohe Level an $S1PR_5$ aufweisen [131]. In murinen Studien konnte gezeigt werden, dass $S1PR_5$ zwar wie $S1PR_1$ den Austritt aus den LK vermittelt, allerdings nicht von Fingolimod antagonisiert wird [90, 91].

Im Gegensatz zu den NK-Zellen exprimieren die übrigen ILCs höhere $S1PR_1$ Level [132], sodass eine Reduktion der ILCs unter Fingolimod-Therapie antizipiert werden kann. Diese Hypothese konnte sowohl in unserer Arbeit, sowie übereinstimmend von Eken et al. [132] bestätigt werden. Als Limitation der gewählten Gating-Strategie in der vorliegenden Studie ist anzumerken, dass nicht-klassische $CD127^{dim}$ ILCs und $CD56^+$ ILC3 unberücksichtigt bleiben und auf der anderen Seite Kontamination im ILC-Gate mit anderen $CD127^+$ Zellen (z.B. Basophilen) nicht ausgeschlossen sind [133]. Da das vornehmliche Ziel der vorliegenden Promotionsarbeit eine NK-Zellphänotypisierung war, wurde auf ein differenzierteres ILC-Panel verzichtet.

Als primären Endpunkt dieser Studie wurde 2013 das Verhältnis von unreifen NK-Zellen im Vergleich zur Gesamtpopulation der NK-Zellen definiert. Bereits nach 1 Monat hatte der Anteil unreifer $CD56^{bright}$ Zellen innerhalb der gesamten NK-Zellpopulation deutlich abgenommen und blieb über den Studienverlauf konstant niedrig (Abbildung 5A). Hiermit konnte die in der Einleitung formulierte Hypothese unterstützt werden, sowie die Ergebnisse mehrerer rezenter Studien validiert werden [78, 82, 84, 86, 87, 89]. In einigen Studien wurde gezeigt, dass auch die absolute Zahl der $CD56^{bright}$ NK-Zellen unter Fingolimod-Therapie im PB abnimmt, wohingegen Fingolimod keinen Effekt auf $CD56^{dim}$ NK-Zellen zeigte [88, 89]. Es existieren zwei Erklärungsansätze für den geringen Umverteilungseffekt von Fingolimod auf die $CD56^{dim}$ NK-Zellen:

- Als Population mit niedriger Expression des SLO Homing-Rezeptors CCR7 [134] migrieren $CD56^{dim}$ NK-Zellen wenig zu den LK und können somit auch nicht in diesem Kompartiment zurückgehalten werden [82]. Ein Ansatz der auch zur Erklärung der veränderten Zusammensetzung der T-Zellsubpopulationen im PB nach Fingolimod-Therapie herangezogen wird [79].

- $CD56^{dim}$ NK-Zellen nutzen einen Fingolimod-resistenten Austrittsmechanismus aus den LK mittels $S1PR_5$ [90, 91].

Die unreifen $CD56^{bright}$ NK-Zellen weisen hingegen sowohl höhere CCR7, als auch niedrigere $S1PR_5$ und dafür höhere $S1PR_1$-Level auf und sind daher suszeptibler für die Wirkung von Fingolimod. Die Akkumulation von $CD56^{bright}$ NK-Zellen in den SLO könnte durch die lokale Nähe zu anderen Immunzellen eine verbesserte Interaktion mit T-Zellen und dendritischen Zellen bedingen [135, 136]. Außerdem wird das lymphatische System auf Grund hoher IL-15 und IL-7 Konzentrationen als Ort der NK-Zellreifung diskutiert [137-140]. Eine Fingolimod-Behandlung könnte somit zu einem sicheren Verweilen von $CD56^{bright}$ NK-Zellen im LK führen, die dort regulatorisch tätig sind und als gereifte Zellen ins Blut austreten.

Im Rahmen der vorliegenden Studie wurde eine detaillierte Charakterisierung des NK-Zellphänotyps durchgeführt. Hierdurch ergaben sich neue Hinweise darauf, dass eine Fingolimod-Therapie nicht nur zu einer Veränderung des $CD56^{bright}$/$CD56^{dim}$ Verhältnisses im PB führt, sondern auch, dass sich diese Therapie differenzierter auf die Zusammensetzung der verschiedenen NK-Zellsubpopulationen in Abhängigkeit von ihrem Reifegrad auswirkt. Innerhalb der $CD56^{dim}$ Population nahmen die besonders reifen $CD56^{dim}CD94^{low}$ [120] und $CD56^{dim}NKG2A^{-}KIR^{+}$ NK-Zellen [104] zu (Abbildung 6). Als zugrundliegenden Mechanismus für diese Beobachtung kann die mit der NK-Zellreifung einhergehende Zunahme der $S1PR_5$ Expression postuliert werden. In Übereinstimmung mit dieser Hypothese, wurde in einer humanen Studie ein deutlich höherer $S1PR_5$ Expressionsgrad auf reiferen $CD57^{+}$ $CD56^{dim}$ NK-Zellen, als auf $CD57^{-}$ $CD56^{dim}$ NK-Zellen, die einem früheren $CD56^{dim}$ Entwicklungsstadium entsprechen, gemessen [141].

Der Anteil an NK-Zellen mit der Expression von den Chemokinrezeptoren CCR7 und CX_3CR1 nahm während der Fingolimod-Therapie in der vorliegenden Studie ab. Eine niedrigere Frequenz von $CCR7^{+}$ $CD56^{+}$ NK-Zellen im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen wurde bereits berichtet [82]. Interessanterweise konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass der Anteil an $CCR7^{+}$ $CD56^{dim}$ NK-Zellen während des Studienzeitraumes ebenfalls abnahm (Abbildung 7). Unter physiologischen Konditionen exprimieren ca. 5% der $CD56^{dim}$ Population CCR7 [142]. Auch diese Population besitzt die Fähigkeit an die CCR7-spezifischen Liganden CCL19 und CCL21 zu binden [143], sodass ihre Umverteilung in die SLO unter der Fingolimod-Therapie wahrscheinlich ist. Interessant ist in diesem Zusammenhang eine Arbeit von Jülke et al. [144], die eine $CD62L^{+}$ $CD56^{dim}$ NK-Zellpopulation mit hoher CCR7 Expression als mögliches Zwischenstadium in der NK-Zellreifung zwischen $CD56^{bright}$ und $CD62L^{-}$ $CD56^{dim}$ Zellen beschreiben. Die Abnahme dieser „mittelreifen“ Population passt zur Schlussfolgerung des vorherigen Abschnitts, dass die

Fingolimod-Therapie insgesamt eine Verschiebung hin zu besonders reifen NK-Zellsubpopulationen im PB induziert.

Infante Duarte at al. beobachteten eine niedrigere CX_3CR1-Expression auf NK-Zellen von MS-Patientinnen und -Patienten in den schubfreien als in den aktiven Erkrankungsphasen [44]. Die Abnahme der CX_3CR1^+ NK-Zellen in der vorliegenden Studie könnte somit mit der niedrigeren Schubrate während der Studie im Vergleich zu den Vormonaten zusammenhängen. Im Verlauf der NK-Zelldifferenzierung nimmt die Expression von dem CX_3CR1-Rezeptor zu und ist in hoher Dichte auf besonders reifen $CD57^+$ $CD56^{dim}$ NK-Zellen vorhanden [145, 146]. Die Abnahme von reifen CX_3CR1^+ NK-Zellen unter der Fingolimod-Therapie zeigt somit ein inverses Verhalten im Vergleich zu den anderen reifen NK-Zellpopulationen ($CD56^{dim}CD94^{low}$ und $CD56^{dim}NKG2A^-KIR^+$ NK-Zellen), die während der Therapie zunahmen. Eine Studie von Yang et al. [145] zeigt, dass nur etwa die Hälfte der $CD57^+$ $CD56^{dim}$ NK-Zellen hohe Level an CX_3CR1 exprimieren. Funktionelle Unterschiede bzw. Unterschiede im Reifegrad zwischen $CX3CR1^{high}$ und $CX3CR1^{low}$ $CD57^+$ $CD56^{dim}$ NK-Zellen sind bisher nicht untersucht. In Anbetracht der chemotaktischen und zytotoxischen Funktion von CX_3CR1 [146] wäre eine niedrigere FA in $CX3CR1^{low}$ als in $CX3CR1^{high}$ $CD57^+$ $CD56^{dim}$ NZ-Zellen zu vermuten. Die prozentuale Abnahme von CX_3CR1 während der Fingolimod-Therapie lässt somit eine reduzierte FA in reifen NK-Zellpopulationen vermuten.

Außerdem wurde in dieser Arbeit eine prozentuale Abnahme von NK-Zellen mit bestimmten aktivierenden Rezeptoren (DNAM-1 und NKp46) nach Therapiebeginn gemessen (Abbildung 8). Unter der Annahme, dass auch diese Zellpopulationen in den SLO akkumulieren, könnte ein topografisch enges Zusammenliegen eine verbesserte Regulation u.a. von $CD4^+$ T-Zellen über die DNAM-1/CD155-Interaktion bedingen [46]. Zudem könnte die Abnahme von $DNAM\text{-}1^+$ NK-Zellen im PB unter Fingolimod-Therapie das Vorherrschen von besonders reifen NK-Zellen [147], oder sogar „exhausted“ (überalterten/entkräfteten) NK-Zellen [148] in diesem Kompartiment bedeuten. Sowohl DNAM-1 als auch NKp46 spielen eine wichtige Rolle in der angeborenen Immunität gegenüber viralen Erregern [149-155]. Eine Abnahme von NK-Zellen mit diesen Rezeptoren im PB könnte zu einer verstärkten Suszeptibilität für viral vermittelte Erkrankungen führen. Zudem korreliert der Expressionsgrad an NCRs (natural cytotoxicity receptors), zu deren Rezeptorgruppe auch NKp46 gehört, direkt mit der Fähigkeit dieser NK-Zellen Tumorzellen zu lysieren [156, 157]. Die Reduktion von $NKp46^+$ NK-Zellen in der Peripherie könnte somit zum erhöhten Risiko für bestimmte Krebserkrankungen während der Fingolimod-Therapie beitragen.

Im zweiten Teil dieser Studie wurden die Durchflusszytometrie-Daten mit dem unsupervidierten Clustering-Algorithmus FlowSOM [112] analysiert. Beim visuellen Vergleich der Clustering-

Ergebnisse in sogenannten Minimal-Spanning-Trees (MSTs) konnten die Ergebnisse des manuellen Gatings bezüglich der Abnahme unreifer $CD56^{bright}$ NK-Zellen bestätigt werden (Abbildung 9 A&C). Insgesamt wurden vier MC (MC6, 9, 13 und 15) der $CD56^{bright}$ Population zugeordnet. Im Gegensatz zum MC6, 13 und 15, deren prozentualer Anteil über den Studienzeitraum signifikant abnahm, zeigte das MC9 keine signifikante Veränderung (Abbildung 9 C). Entscheidend hierfür könnte die niedrige CCR7-Expression sein. Außerdem wurde eine NK-Zellsubpopulation intermediären Reifegrades (MC11) mit mittlerer CD56 und CD16 Expression identifiziert, die ebenfalls über den Studienzeitraum signifikant abnahm und eine höhere CCR7-Expression als das MC9 zeigte (Abbildung 10). Nur ein MC nahm signifikant zwischen Therapiebeginn und zwölf Monaten Therapiedauer zu (MC4) (Abbildung 9 C). Es wies im Vergleich zum MC11 einen höheren Expressionsgrad an CD16 und KIR und einen niedrigeren Expressionsgrad an CD56, CD94, NKG2A, und NKG2D auf (Abbildung 10). Die durch den Algorithmus neu identifizierte Population spiegelt zum größten Teil die in der manuellen Analyse untersuchten Veränderungen wider. Übereinstimmend mit der Zunahme des $CD94^{-}$ $NKG2A^{-}$ und $KIR^{+/-}$ MC4 zeigt sich auch mittels manuellen Gatings eine Zunahme der zwei besonders reifen $CD56^{dim}CD94^{low}$ und $CD56^{dim}NKG2A^{-}KIR^{+}$ NK-Zellpopulationen. Ein phänotypisches Merkmal des MC4, das sich in der manuellen Analyse nicht widerspiegelt, ist die hohe Expression von DNAM-1 im MC4. Während das $DNAM\text{-}1^{++}$ MC4 während des Studienzeitraumes zunimmt, zeigte die manuelle Analyse eine signifikante Abnahme von $DNAM\text{-}1^{+}$ $CD56^{dim}$ NK-Zellen. Es ist auffällig, dass die DNAM-1 Expression in den einzelnen $CD56^{dim}$ MC sehr unterschiedlich hoch ausfällt (Abbildung 10). Die manuelle Analyse zeigt die über alle $CD56^{dim}$ MC gemittelte Abnahme von DNAM-1 bei der die Zunahme des MC4 mit einer hohen DNAM-1 Expression nicht ins Gewicht fallen könnte.

Interessanterweise ähnelt der im PB vorherrschende NK-Zell Phänotyp von mit Fingolimod behandelten Patientinnen und Patienten dem von alten Menschen. Mit zunehmendem Alter sinkt der Anteil an $CD56^{bright}$ NK-Zellen sowie der Anteil an $CD94^{+}$ und $NKG2A^{+}$ NK-Zellen, wobei der Anteil von $CD56^{dim}$ und KIR^{+} NK-Zellen steigt [158-162]. Außerdem nimmt während des Alterns die Expression von DNAM-1 und NKp46 ab [161-163]. Die CD16 Expression scheint im Alter nicht stark verändert zu sein [159, 164]. NK-Zellen von alten Menschen weisen im Vergleich zu NK-Zellen von jüngeren Menschen verringerte zytotoxische Eigenschaften auf [162, 165]. Es wird diskutiert, dass dies eine Ursache für das erhöhte Risiko für Infektionen im Alter darstellt [166]. Auch mit Fingolimod therapierte Patientinnen und Patienten haben ein erhöhtes Risiko an gewissen Infektionen zu erkranken, hierunter z.B. Varizella-Zoster-Infektionen [167]. Eine möglicherweise vergleichbare Abnahme der Funktionalität von $CD56^{dim}$ NK-Zellen unter Fingolimod-Therapie wie im Alter könnte somit zu einer erhöhten Suszeptibilität für Infektionen führen, aber zum anderen auch dazu beitragen, dass der potenziell schändliche Effekt der

$CD56^{dim}$ NK-Zellen in der MS-Pathogenese eingedämmt wird. Auf Grund der geringen Menge an Patientenproben waren keine funktionellen Untersuchungen der NK-Zellsubpopulationen in dieser Studie möglich. Dies wäre ein spannender Ansatz für weiterführende Forschung.

Trotz der kleinen Studienteilnehmerzahl und der wenigen klinischen Parameter zur Evaluation des Therapieansprechens sollte in dieser Studie geprüft werden, ob es deutliche Unterschiede in der MC-Zusammensetzung bei Respondern und Non-Respondern zu verschiedenen Zeitpunkten der Studie gab. Hierbei fiel ein höherer Anteil an $CD56^{bright}$ MC (MC6, 9, 13, 15) sowie des $CD127^{+}$ MC2 in der Non-Respondergruppe, als in der Respondergruppe bei Therapiebeginn auf (Abbildung 11). Nach Therapiebeginn fiel ihr Anteil in der Non-Respondergruppe auf ein ähnliches Level wie bei der Respondergruppe ab. Die in der Gruppe der Non-Responder zusammengefassten Patientinnen und Patienten zeigten also eine größere Abnahme der für die MS als protektiv geltenden $CD56^{bright}$ Population [168]. In einer anderen Studie konnten diese Ergebnisse nicht bestätigt werden [87]. Hier wiesen die Responder, definiert durch das Erreichen des NEDA-3 oder NEDA-4 Status, sowohl bei Baseline als auch nach 6 Monaten Fingolimod-Einnahme höhere $CD56^{bright}$ Level auf, als die Non-Responder [87]. Es bedarf weiterer Forschung, um festzustellen, ob es signifikante Unterschiede in der Veränderung der $CD56^{bright}$ Population bei Respondern und Non-Respondern unter der Fingolimod-Therapie gibt. Diese Erkenntnisse sind wichtig, um die pathophysiologischen Implikationen der Abnahme von $CD56^{bright}$ NK-Zellen im PB unter der Fingolimod-Therapie zu verstehen und die potenzielle Verwendung dieser Population als Responsemarker bewerten zu können.

Um longitudinale Korrelationen zwischen bestimmten Immunpopulationen ($CD56^{bright}$, $CD56^{dim}CD94^{low}$, MC4) und klinischen Parametern zu untersuchen, führten wir mehrere GEE Analysen durch. Keine signifikanten Korrelationen zeigte sich zwischen den drei Immunpopulationen und der Anzahl an Nebenwirkungen, dem EDSS und der Response. Eine GEE Analyse zeigte eine Korrelation zwischen einer prozentualen Zunahme der $CD56^{dim}CD94^{low}$ Population und einer Abnahme des Infektionsrisikos (Tabelle 4). Diese Population kann Perforin und Granzym B produzieren und wurde bereits in der Literatur als zytotoxische NK-Zellsubpopulation beschrieben [169]. Auch wenn das MC4 ebenfalls durch eine niedrige CD56- und CD94-Expression charakterisiert ist, konnte für diese Population keine Korrelation zwischen der Anzahl der Infektionen und der prozentualen Veränderung über den Studienzeitraum festgestellt werden. Im Gegensatz zur $CD56^{dim}CD94^{low}$ Population könnte das MC4 also weniger zytotoxisch aktiv sein und weniger effizient vor Infektionen schützen.

In einer weiteren GEE Analyse zeigte sich eine Korrelation zwischen der Abnahme der $CD56^{bright}$ Population im PB und einem erhöhten Schubrisiko und umgekehrt eine Korrelation zwischen

Zunahme der CD56^{bright} Population und einem niedrigeren Schubrisiko (Tabelle 4). Auch eine Schwangerschafts-assoziierte und Daclizumab-assoziierte Zunahme von CD56^{bright} NK-Zellen im PB korreliert mit einer Reduktion der MS-Krankheitsaktivität [168]. In der vorliegenden Arbeit wurde jedoch die Hypothese aufgestellt, dass CD56^{bright} NK-Zellen im LK durch die topografische Nähe zu autoreaktiven Immunzellen besonders effektiv regulatorisch wirken können und hierdurch die MS-Krankheitsaktivität eingedämmt wird. Diese Hypothese lässt sich mit dieser Analyse nicht stützen. Es ist jedoch zu bedenken, dass mittels Regressionsanalysen keine Kausalität, sondern nur Korrelationen untersucht werden.

4.3 Limitationen der Studie

Die wichtigste Limitation der vorliegenden Studie ist sicherlich die niedrige Zahl eingeschlossener Patientinnen und Patienten. Hierdurch ist die Power der präsentierten Statistik niedrig. Außerdem steigt durch den explorative Analyseansatz ohne Korrekturen für multiples Testen die Wahrscheinlichkeit für falsch-positive Ergebnisse. Daher ist die Bestätigung der vorliegenden Ergebnisse in großen unabhängigen Kohorten nötig.

Damit die Versuchsbedingung bei der Färbung und Messung der zu verschiedenen Zeitpunkten in der Studie abgenommenen PBMCs derselben Person möglichst konstant gehalten werden konnten, wurden die Zellen nach der Abnahme kryokonserviert und am selben Tag aufgetaut, gefärbt und gemessen. Eine Veränderung der Rezeptorexpression durch die Kryokonservierung und das anschließende Auftauen ist hierbei nicht auszuschließen [170]. Außerdem war durch die Methodenwahl keine Bestimmung von absoluten Zahlen bezüglich der Immunzellpopulationen möglich. Alle berichteten Werte sind prozentuale Werte, die sich auf die jeweilige „Mutterpopulation“ beziehen. Zu- und Abnahmen können ebenso den Verlust/die Zunahme von Immunpopulationen, wie eine Umverteilung in/aus dem PB hinein/heraus bedeuten.

Eine grundlegende Limitation humaner Studien ist die Untersuchung von Korrelationen, ohne dass Kausalitäten überprüft werden können. Durch die rein phänotypische Analyse in der vorliegenden Arbeit, ohne funktionelle Untersuchungen, sind die in der Diskussion präsentierten Überlegungen bezüglich der Bedeutung des NK-Zellphänotyps für das Therapieansprechen, die Nebenwirkungen und die MS-Pathogenese lediglich Vermutungen, die einer Überprüfung in weiteren Studien bedürfen.

Durch das Baseline zu Therapie vergleichende Studiendesign ist nicht auszuschließen, dass die gemessenen immunologischen Veränderungen lediglich dem Verlauf innerhalb eines Jahres voranschreitender MS entsprechen. Da in anderen Studien mit gesunder Kontrollgruppe bzw.

unbehandelten MS-Patientinnen und -Patienten ähnliche Ergebnisse spezifisch für die mit Fingolimod behandelte Interventionsgruppe erzielt worden sind [82, 83, 87, 88], scheint diese Limitation allerdings nur von geringer Bedeutung zu sein.

4.4 Implikationen für die weitere Forschung

Aus der vorliegenden Studie ergeben sich drei weiterführende Fragestellungen:

Zunächst besteht die Frage, ob die NK-Zellen, die unter Fingolimod-Therapie im PB zurückbleiben, eine reduzierte FA aufweisen. Auch wenn in einer Studie die Zytokinproduktion und die NK-Zell Zytotoxizität in der Fingolimod therapierten Gruppe nicht signifikant im Vergleich zu gesunden Kontrollen reduziert war [82], könnte abgeleitet aus den vorliegenden Ergebnissen, eine reduzierte FA vermutet werden. Da lediglich eine Studie [82] mit kleiner Probandenzahl keine Veränderungen der FA festgestellt hat und Subgruppen-spezifischen Analysen fehlen, sind weitere Studien bezüglich dieser Fragestellung nötig. Bei alten Menschen ist außerdem die Bildung von Perforin in NK-Zell–K562 Zell Kokultur und die Bindung von NK-Zell produziertem Perforin an Zielzellen reduziert [162]. Diese NK-Zellfunktionen wurden noch nicht bei Personen, die mit Fingolimod behandelt wurden, untersucht.

Zweitens ist es eine spannende Frage, wohin die NK-Zellen, die aus dem Blut austreten, migrieren und vor allem ob die veränderte Lokalisation Vorteile für die Ausübung der regulatorischen Funktionen der NK-Zellen zur Folge hat. In vitro reagieren NK-Zellen, die mit Fingolimod behandelt wurden, stärker auf die eine Migration in die LK-vermittelnden Chemokine CCL19 und CCL21, als auf das eine Migration zum Knochenmark vermittelnde CXCL12 [88]. Eine Umverteilung von $CCR7^{+}$ Immunzellen aus dem PB in Richtung LK unter der Fingolimod-Behandlung ist daher breiter wissenschaftlicher Konsens [171]. In den parafollikulären Zonen der LK sind $CD56^{bright}$ NK-Zellen in unmittelbarer Nähe zu dendritischen Zellen und T-Zellen lokalisiert [172]. Eine Fingolimod-assoziierte höhere Wahrscheinlichkeit für direkte Zell-Zell-Kontakte von NK-Zellen und anderen Immunzellen im LK mit einer daraus resultierenden effektiveren Regulation anderer Immunzellen ist bisher nicht untersucht worden.

Eine interessante Überlegung ist außerdem, ob eine vermehrte Migration der NK-Zellen ins ZNS unter Fingolimod-Therapie erfolgt, wie es für regulatorische B-Zellen beschrieben wurde [173]. In einer Studie konnte kein Effekt auf die NK-Zell-Migration zu CX_3CL1, einem zum ZNS führenden Chemokin, eruiert werden [82]. Andere, die Migration zum ZNS vermittelnde Chemokine, wie CCL2 und CXCL10 [174] oder Liganden des CCR5 [175], wurden noch nicht untersucht. Da vor

allem der Anteil der regulatorischen $CD56^{bright}$ NK-Zellen im PB abnimmt, könnten durch eine Umverteilung der $CD56^{bright}$ NK-Zellen ins ZNS protektive Effekte denkbar sein.

Als drittes ist zu bedenken, dass inzwischen mehrere Nachfolgemedikamente zu Fingolimod entwickelt worden sind. Bei Siponimod, Ozanimod und Ponesimod konnte eine Wirksamkeit zur Behandlung der MS bei selektiverer Modulation von nur $S1PR_1$ (Ponesimod) oder $S1PR_1$ und $S1PR_5$ (Siponimod, Ozanimod) nachgewiesen werden [176]. Hier gilt es, die Frage zu beantworten, ob diese S1PR-Modulatoren zu denselben Veränderungen von NK-Zellsubpopulationen im PB führen. Bisher wurde bereits eine, den Fingolimod-Studien ähnelnde, relative Zunahme bzw. eine unveränderte absolute Menge der zirkulierenden NK-Zellen unter der jeweiligen Therapie im Vergleich zu Placebo und Baseline festgestellt [177-180]. Da weiterhin der $S1PR_1$ Rezeptor der Hauptangriffspunkt der neueren S1PR-Modulatoren ist und dieser auf unreifen aber nicht auf reifen NK-Zellen exprimiert wird, ist bei diesen Medikamenten eine ähnliche Veränderung der NK-Zellsubpopulationen im PB wie unter der Fingolimod-Behandlung zu vermuten.

5 Schlussfolgerungen

Das Verständnis über die Auswirkungen, die ein medikamentöser Eingriff in das Immunsystem hat, ist insbesondere vor dem Hintergrund der Entschlüsselung der Wirkmechanismen der Medikamente, der Vorhersage von Therapieansprechen und Nebenwirkungen von zentraler Bedeutung. Die signifikante Reduktion zirkulierender T- und B-Zellen in die SLO und die daraus resultierende Zunahme des NK-Zellanteils im PB unter einer Fingolimod-Therapie um das mehr als 4-fache macht die detaillierte Untersuchung dieser Immunpopulation interessant. Im Rahmen der vorliegenden Studie wurde daher der NK-Zellphänotyp von 17 RRMS-Patientinnen und -Patienten unter neu-begonnener Fingolimod-Therapie über einen Zeitraum von 12 Monaten untersucht.

Während der Therapie zeigte sich eine deutliche Abnahme der $CD56^{bright}$ NK-Zellen im PB. Im Bezug auf die Rolle der NK-Zellen unter Fingolimod-Therapie in der MS-Pathogenese ist ein sicheres Verweilen von unreifen $CD56^{bright}$ NK-Zellen in den LK denkbar, die hier protektive regulatorische Tätigkeit ausüben und als gereifte Zellen ins Blut austreten. Im PB scheinen NK-Zellen mit einem reifen, oder auch „exhausted“ Phänotyp (Abnahme der aktivierenden Rezeptoren DNAM-1 und NKp46) zu dominieren. Dies könnte eine stärkere Suszeptibilität gegenüber viralen Erregern und bestimmten Tumorerkrankungen unter einer Fingolimod-Therapie erklären. Des Weiteren könnte durch die reduzierte FA von $CD56^{dim}$ NK-Zellen, deren potentiell schädlicher Effekt in der MS-Pathogenese eingedämmt werden.

Eine direkte Korrelation zwischen Veränderungen der NK-Zellsubpopulationen und dem Therapieansprechen zeigte sich in dieser Studie nicht. Allerdings konnte eine Abnahme von CX_3CR1^+ NK-Zellen beobachtet werden. Da eine niedrige CX_3CR1-Expression mit einer niedrigen MS-Krankheitsaktivität korreliert [44], könnte die in dieser Studie beobachtete CX_3CR1-Abnahme, die niedrigere Krankheitsaktivität im Vergleich zu den Vormonaten widerspiegeln.

Literaturverzeichnis

1. Dobson R, Giovannoni G. Multiple sclerosis - a review. Eur J Neurol. 2019;26(1):27-40.

2. Walton C, King R, Rechtman L, Kaye W, Leray E, Marrie RA, Robertson N, La Rocca N, Uitdehaag B, van der Mei I, Wallin M, Helme A, Angood Napier C, Rijke N, Baneke P. Rising prevalence of multiple sclerosis worldwide: Insights from the Atlas of MS, third edition. Mult Scler. 2020;26(14):1816-21.

3. Compston A, Coles A. Multiple sclerosis. Lancet. 2008;372(9648):1502-17.

4. Thompson AJ, Banwell BL, Barkhof F, Carroll WM, Coetzee T, Comi G, Correale J, Fazekas F, Filippi M, Freedman MS, Fujihara K, Galetta SL, Hartung HP, Kappos L, Lublin FD, Marrie RA, Miller AE, Miller DH, Montalban X, Mowry EM, Sorensen PS, Tintoré M, Traboulsee AL, Trojano M, Uitdehaag BMJ, Vukusic S, Waubant E, Weinshenker BG, Reingold SC, Cohen JA. Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria. Lancet Neurol. 2018;17(2):162-73.

5. Hemmer B, Bayas A, Berthele A, Faßhauer E, Flachenecker P, Haghikia A, Christoph Heesen HH, Bernhard Hemmer, Thomas Henze, Thomas Korn. Diagnose und Therapie der Multiplen Sklerose, Neuromyelitis-optica-Spektrum- Erkrankungen und MOG-IgG-assoziierten Erkrankungen, S2k-Leitlinie: Deutsche Gesellschaft für Neurologie; 2021; [abgerufen am: 03.03.2022] Online: https://dgn.org/wp-content/uploads/2021/04/030050_LL_Multiple_Sklerose_2021.pdf.

6. Lublin FD, Reingold SC. Defining the clinical course of multiple sclerosis: results of an international survey. Neurology. 1996;46(4):907-11.

7. Lublin FD, Reingold SC, Cohen JA, Cutter GR, Sørensen PS, Thompson AJ, Wolinsky JS, Balcer LJ, Banwell B, Barkhof F, Bebo B, Jr., Calabresi PA, Clanet M, Comi G, Fox RJ, Freedman MS, Goodman AD, Inglese M, Kappos L, Kieseier BC, Lincoln JA, Lubetzki C, Miller AE, Montalban X, O'Connor PW, Petkau J, Pozzilli C, Rudick RA, Sormani MP, Stüve O, Waubant E, Polman CH. Defining the clinical course of multiple sclerosis: the 2013 revisions. Neurology. 2014;83(3):278-86.

8. Inojosa H, Schriefer D, Ziemssen T. Clinical outcome measures in multiple sclerosis: A review. Autoimmun Rev. 2020;19(5):102512.

9. Kurtzke JF. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). Neurology. 1983;33(11):1444-52.

10. Cutter GR, Baier ML, Rudick RA, Cookfair DL, Fischer JS, Petkau J, Syndulko K, Weinshenker BG, Antel JP, Confavreux C, Ellison GW, Lublin F, Miller AE, Rao SM, Reingold S, Thompson A, Willoughby E. Development of a multiple sclerosis functional composite as a clinical trial outcome measure. Brain. 1999;122(5):871-82.

11. Rotstein DL, Healy BC, Malik MT, Chitnis T, Weiner HL. Evaluation of no evidence of disease activity in a 7-year longitudinal multiple sclerosis cohort. JAMA Neurol. 2015;72(2):152-8.

12. Kappos L, De Stefano N, Freedman MS, Cree BAC, Radue E-W, Sprenger T, Sormani MP, Smith T, Häring DA, Piani Meier D, Tomic D. Inclusion of brain volume loss in a revised measure of 'no evidence of disease activity' (NEDA-4) in relapsing–remitting multiple sclerosis. Mult Scler. 2015;22(10):1297-305.

13. Thompson AJ, Baranzini SE, Geurts J, Hemmer B, Ciccarelli O. Multiple sclerosis. Lancet. 2018;391(10130):1622-36.

14. Dendrou CA, Fugger L, Friese MA. Immunopathology of multiple sclerosis. Nat Rev Immunol. 2015;15:545.

15. Kiessling R, Klein E, Pross H, Wigzell H. "Natural" killer cells in the mouse. II. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Characteristics of the killer cell. Eur J Immunol. 1975;5(2):117-21.

16. Vivier E, Tomasello E, Baratin M, Walzer T, Ugolini S. Functions of natural killer cells. Nat Immunol. 2008;9(5):503-10.

17. Schuster IS, Coudert JD, Andoniou CE, Degli-Esposti MA. “Natural Regulators”: NK Cells as Modulators of T Cell Immunity. Front Immunol. 2016;7(235).

18. Ferlazzo G, Morandi B. Cross-Talks between Natural Killer Cells and Distinct Subsets of Dendritic Cells. Front Immunol. 2014;5(159).

19. Lanier LL, Le AM, Civin CI, Loken MR, Phillips JH. The relationship of CD16 (Leu-11) and Leu-19 (NKH-1) antigen expression on human peripheral blood NK cells and cytotoxic T lymphocytes. J Immunol. 1986;136(12):4480-6.

20. Cooper MA, Fehniger TA, Turner SC, Chen KS, Ghaheri BA, Ghayur T, Carson WE, Caligiuri MA. Human natural killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56(bright) subset. Blood. 2001;97(10):3146-51.

21. Spits H, Di Santo JP. The expanding family of innate lymphoid cells: regulators and effectors of immunity and tissue remodeling. Nat Immunol. 2011;12(1):21-7.

22. Spits H, Artis D, Colonna M, Diefenbach A, Di Santo JP, Eberl G, Koyasu S, Locksley RM, McKenzie AN, Mebius RE, Powrie F, Vivier E. Innate lymphoid cells--a proposal for uniform nomenclature. Nat Rev Immunol. 2013;13(2):145-9.

23. Vivier E, Artis D, Colonna M, Diefenbach A, Di Santo JP, Eberl G, Koyasu S, Locksley RM, McKenzie ANJ, Mebius RE, Powrie F, Spits H. Innate Lymphoid Cells: 10 Years On. Cell. 2018;174(5):1054-66.

24. Zhang B, Yamamura T, Kondo T, Fujiwara M, Tabira T. Regulation of experimental autoimmune encephalomyelitis by natural killer (NK) cells. J Exp Med. 1997;186(10):1677-87.

25. Fritz RB, Zhao M-L. Regulation of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis in the C57BL/6J Mouse by NK1.1+, DX5+, αβ+ T Cells. J Immunol. 2001;166(6):4209.

26. Xu W, Fazekas G, Hara H, Tabira T. Mechanism of natural killer (NK) cell regulatory role in experimental autoimmune encephalomyelitis. J Neuroimmunol. 2005;163(1-2):24-30.

27. Huang D, Shi F-D, Jung S, Pien GC, Wang J, Salazar-Mather TP, He TT, Weaver JT, Ljunggren H-G, Biron CA, Littman DR, Ransohoff RM. The neuronal chemokine CX3CL1/fractalkine selectively recruits NK cells that modify experimental autoimmune encephalomyelitis within the central nervous system. FASEB J. 2006;20(7):896-905.

28. Matsumoto Y, Kohyama K, Aikawa Y, Shin T, Kawazoe Y, Suzuki Y, Tanuma N. Role of natural killer cells and TCR gamma delta T cells in acute autoimmune encephalomyelitis. Eur J Immunol. 1998;28(5):1681-8.

29. Shi FD, Takeda K, Akira S, Sarvetnick N, Ljunggren HG. IL-18 directs autoreactive T cells and promotes autodestruction in the central nervous system via induction of IFN-gamma by NK cells. J Immunol. 2000;165(6):3099-104.

30. Bakker ABH, Hoek RM, Cerwenka A, Blom B, Lucian L, McNeil T, Murray R, Phillips JH, Sedgwick JD, Lanier LL. DAP12-Deficient Mice Fail to Develop Autoimmunity Due to Impaired Antigen Priming. Immunity. 2000;13(3):345-53.

31. Vollmer TL, Liu R, Price M, Rhodes S, La Cava A, Shi FD. Differential effects of IL-21 during initiation and progression of autoimmunity against neuroantigen. J Immunol. 2005;174(5):2696-701.

32. Dungan LS, McGuinness NC, Boon L, Lynch MA, Mills KH. Innate IFN-gamma promotes development of experimental autoimmune encephalomyelitis: a role for NK cells and M1 macrophages. Eur J Immunol. 2014;44(10):2903-17.

33. Winkler-Pickett R, Young HA, Cherry JM, Diehl J, Wine J, Back T, Bere WE, Mason AT, Ortaldo JR. In Vivo Regulation of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis by NK Cells: Alteration of Primary Adaptive Responses. J Immunol. 2008;180(7):4495-506.

34. Traugott U. Characterization and distribution of lymphocyte subpopulations in multiple sclerosis plaques versus autoimmune demyelinating lesions. Springer Semin Immunopathol. 1985;8(1):71-95.

35. Benczur M, Petranyl GG, Palffy G, Varga M, Talas M, Kotsy B, Foldes I, Hollan SR. Dysfunction of natural killer cells in multiple sclerosis: a possible pathogenetic factor. Clin Exp Immunol. 1980;39(3):657-62.

36. Neighbour PA, Grayzel AI, Miller AE. Endogenous and interferon-augmented natural killer cell activity of human peripheral blood mononuclear cells in vitro. Studies of patients with multiple sclerosis, systemic lupus erythematosus or rheumatoid arthritis. Clin Exp Immunol. 1982;49(1):11-21.

37. Vranes Z, Poljaković Z, Marusić M. Natural killer cell number and activity in multiple sclerosis. J Neurol Sci. 1989;94(1-3):115-23.

38. Munschauer FE, Hartrich LA, Stewart CC, Jacobs L. Circulating natural killer cells but not cytotoxic T lymphocytes are reduced in patients with active relapsing multiple sclerosis and little clinical disability as compared to controls. J Neuroimmunol. 1995;62(2):177-81.

39. Santoli D, Hall W, Kastrukoff L, Lisak RP, Perussia B, Trinchieri G, Koprowski H. Cytotoxic activity and interferon production by lymphocytes from patients with multiple sclerosis. J Immunol. 1981;126(4):1274-8.

40. Ilonen J, Nurmi T, Reunanen M, Salmi A. NK activity and NK-like non-specific cytolysis after PPD, rubella and measles antigen stimulation in multiple sclerosis. J Neurol Sci. 1987;77(1):77-85.

41. Kastrukoff LF, Morgan NG, Zecchini D, White R, Petkau AJ, Satoh J, Paty DW. A role for natural killer cells in the immunopathogenesis of multiple sclerosis. J Neuroimmunol. 1998;86(2):123-33.

42. Huth TK, Brenu EW, Ramos S, Nguyen T, Broadley S, Staines D, Marshall-Gradisnik S. Pilot Study of Natural Killer Cells in Chronic Fatigue Syndrome/Myalgic Encephalomyelitis and Multiple Sclerosis. Scand J Immunol. 2016;83(1):44-51.

43. Tahrali I, Kucuksezer UC, Altintas A, Uygunoglu U, Akdeniz N, Aktas-Cetin E, Deniz G. Dysfunction of CD3−CD16+CD56dim and CD3−CD16−CD56bright NK cell subsets in RR-MS patients. Clin Immunol. 2018;193:88-97.

44. Infante-Duarte C, Weber A, Kratzschmar J, Prozorovski T, Pikol S, Hamann I, Bellmann-Strobl J, Aktas O, Dorr J, Wuerfel J, Sturzebecher CS, Zipp F. Frequency of blood CX3CR1-positive natural killer cells correlates with disease activity in multiple sclerosis patients. FASEB J. 2005;19(13):1902-4.

45. Yang Y, Day J, Souza-Fonseca Guimaraes F, Wicks IP, Louis C. Natural killer cells in inflammatory autoimmune diseases. Clinical & translational immunology. 2021;10(2):e1250.

46. Gross CC, Schulte-Mecklenbeck A, Runzi A, Kuhlmann T, Posevitz-Fejfar A, Schwab N, Schneider-Hohendorf T, Herich S, Held K, Konjevic M, Hartwig M, Dornmair K, Hohlfeld R, Ziemssen T, Klotz L, Meuth SG, Wiendl H. Impaired NK-mediated regulation of T-cell activity in multiple sclerosis is reconstituted by IL-2 receptor modulation. Proc Natl Acad Sci U S A. 2016;113(21):E2973-82.

47. Laroni A, Armentani E, Kerlero de Rosbo N, Ivaldi F, Marcenaro E, Sivori S, Gandhi R, Weiner HL, Moretta A, Mancardi GL, Uccelli A. Dysregulation of regulatory CD56(bright) NK cells/T cells interactions in multiple sclerosis. J Autoimmun. 2016;72:8-18.

48. Takahashi K, Miyake S, Kondo T, Terao K, Hatakenaka M, Hashimoto S, Yamamura T. Natural killer type 2 bias in remission of multiple sclerosis. J Clin Invest. 2001;107(5):R23-9.

49. Airas L, Saraste M, Rinta S, Elovaara I, Huang YH, Wiendl H, Finnish Multiple S, Pregnancy Study G. Immunoregulatory factors in multiple sclerosis patients during and after pregnancy: relevance of natural killer cells. Clin Exp Immunol. 2008;151(2):235-43.

50. Bielekova B, Catalfamo M, Reichert-Scrivner S, Packer A, Cerna M, Waldmann TA, McFarland H, Henkart PA, Martin R. Regulatory CD56(bright) natural killer cells mediate immunomodulatory effects of IL-2Ralpha-targeted therapy (daclizumab) in multiple sclerosis. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006;103(15):5941-6.

51. Sheridan JP, Zhang Y, Riester K, Tang MT, Efros L, Shi J, Harris J, Vexler V, Elkins JS. Intermediate-affinity interleukin-2 receptor expression predicts CD56(bright) natural killer cell expansion after daclizumab treatment in the CHOICE study of patients with multiple sclerosis. Mult Scler. 2011;17(12):1441-8.

52. Ranganath T, Simpson LJ, Ferreira AM, Seiler C, Vendrame E, Zhao N, Fontenot JD, Holmes S, Blish CA. Characterization of the Impact of Daclizumab Beta on Circulating Natural Killer Cells by Mass Cytometry. Front Immunol. 2020;11:714.

53. Elkins J, Sheridan J, Amaravadi L, Riester K, Selmaj K, Bielekova B, Parr E, Giovannoni G. CD56(bright) natural killer cells and response to daclizumab HYP in relapsing-remitting MS. Neuroimmunol Neuroinflamm. 2015;2(2):e65.

54. Vandenbark AA, Huan J, Agotsch M, La Tocha D, Goelz S, Offner H, Lanker S, Bourdette D. Interferon-beta-1a treatment increases CD56bright natural killer cells and CD4+CD25+ Foxp3 expression in subjects with multiple sclerosis. J Neuroimmunol. 2009;215(1):125-8.

55. Saraste M, Irjala H, Airas L. Expansion of CD56Bright natural killer cells in the peripheral blood of multiple sclerosis patients treated with interferon-beta. Neurol Sci. 2007;28(3):121-6.

56. Montes Diaz G, Fraussen J, Van Wijmeersch B, Hupperts R, Somers V. Dimethyl fumarate induces a persistent change in the composition of the innate and adaptive immune system in multiple sclerosis patients. Sci Rep. 2018;8(1):8194.

57. Medina S, Villarrubia N, Sainz de la Maza S, Lifante J, Costa-Frossard L, Roldán E, Picón C, Álvarez-Cermeño JC, Villar LM. Optimal response to dimethyl fumarate associates in MS with a shift from an inflammatory to a tolerogenic blood cell profile. Mult Scler. 2017;24(10):1317-27.

58. Gross CC, Ahmetspahic D, Ruck T, Schulte-Mecklenbeck A, Schwarte K, Jörgens S, Scheu S, Windhagen S, Graefe B, Melzer N, Klotz L, Arolt V, Wiendl H, Meuth SG, Alferink J. Alemtuzumab treatment alters circulating innate immune cells in multiple sclerosis. Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm. 2016;3(6):e289.

59. Smith MD, Calabresi PA, Bhargava P. Dimethyl fumarate treatment alters NK cell function in multiple sclerosis. Eur J Immunol. 2018;48(2):380-3.

60. Plantone D, Marti A, Frisullo G, Iorio R, Damato V, Nociti V, Patanella AK, Bianco A, Mirabella M, Batocchi AP. Circulating CD56dim NK cells expressing perforin are increased in progressive multiple sclerosis. J Neuroimmunol. 2013;265(1):124-7.

61. Khaksari M, Zarkesh-Esfahani SH, Etemadifar M, Masjedi M, Aliyari R, Rahmati M. Differential Expression of CD16 and CD56 on Natural Killer (NK) Cell Subsets in Multiple Sclerosis and Neuromyelitis Optica. Int J Health Sci. 2015:1-7.

62. Lagumersindez-Denis N, Wrzos C, Mack M, Winkler A, van der Meer F, Reinert MC, Hollasch H, Flach A, Brühl H, Cullen E, Schlumbohm C, Fuchs E, Linington C, Barrantes-Freer A, Metz I, Wegner C, Liebetanz D, Prinz M, Brück W, Stadelmann C, Nessler S. Differential contribution of immune effector mechanisms to cortical demyelination in multiple sclerosis. Acta Neuropathol. 2017;134(1):15-34.

63. Borrego F, Alonso MC, Galiani MD, Carracedo J, Ramirez R, Ostos B, Peña J, Solana R. NK phenotypic markers and IL2 response in NK cells from elderly people. Exp Gerontol. 1999;34(2):253-65.

64. Edwards SC, McGinley AM, McGuinness NC, Mills KHG. γδ T Cells and NK Cells – Distinct Pathogenic Roles as Innate-Like Immune Cells in CNS Autoimmunity. Front Immunol. 2015;6:455.

65. Mimpen M, Muris AH, Rolf L, Gerlach O, Kuhle J, Hupperts R, Smolders J, Damoiseaux J. Prognostic value of natural killer cell/T cell ratios for disease activity in multiple sclerosis. Eur J Neurol. 2021;28(3):901-9.

66. European Medicines Agency. Annex 1: Summary of product characteristics; [abgerufen am: 19.10.2019] Online: https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/gilenya-epar-product-information_en.pdf.

67. Cohen JA, Barkhof F, Comi G, Hartung HP, Khatri BO, Montalban X, Pelletier J, Capra R, Gallo P, Izquierdo G, Tiel-Wilck K, de Vera A, Jin J, Stites T, Wu S, Aradhye S, Kappos L. Oral fingolimod or intramuscular interferon for relapsing multiple sclerosis. N Engl J Med. 2010;362(5):402-15.

68. Kappos L, Radue EW, O'Connor P, Polman C, Hohlfeld R, Calabresi P, Selmaj K, Agoropoulou C, Leyk M, Zhang-Auberson L, Burtin P. A placebo-controlled trial of oral fingolimod in relapsing multiple sclerosis. N Engl J Med. 2010;362(5):387-401.

69. Calabresi PA, Radue E-W, Goodin D, Jeffery D, Rammohan KW, Reder AT, Vollmer T, Agius MA, Kappos L, Stites T, Li B, Cappiello L, von Rosenstiel P, Lublin FD. Safety and efficacy of fingolimod in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis (FREEDOMS II): a double-blind, randomised, placebo-controlled, phase 3 trial. Lancet Neurol. 2014;13(6):545-56.

70. Cohen JA, Chun J. Mechanisms of fingolimod's efficacy and adverse effects in multiple sclerosis. Ann Neurol. 2011;69(5):759-77.

71. Cartier A, Hla T. Sphingosine 1-phosphate: Lipid signaling in pathology and therapy. Science. 2019;366,eaar5551:1-12.

72. Schwab SR, Pereira JP, Matloubian M, Xu Y, Huang Y, Cyster JG. Lymphocyte Sequestration Through S1P Lyase Inhibition and Disruption of S1P Gradients. Science. 2005;309(5741):1735-9.

73. Matloubian M, Lo CG, Cinamon G, Lesneski MJ, Xu Y, Brinkmann V, Allende ML, Proia RL, Cyster JG. Lymphocyte egress from thymus and peripheral lymphoid organs is dependent on S1P receptor 1. Nature. 2004;427(6972):355-60.

74. Oo ML, Thangada S, Wu MT, Liu CH, Macdonald TL, Lynch KR, Lin CY, Hla T. Immunosuppressive and anti-angiogenic sphingosine 1-phosphate receptor-1 agonists induce ubiquitinylation and proteasomal degradation of the receptor. J Biol Chem. 2007;282(12):9082-9.

75. Mandala S, Hajdu R, Bergstrom J, Quackenbush E, Xie J, Milligan J, Thornton R, Shei G-J, Card D, Keohane C, Rosenbach M, Hale J, Lynch CL, Rupprecht K, Parsons W, Rosen H. Alteration of Lymphocyte Trafficking by Sphingosine-1-Phosphate Receptor Agonists. Science. 2002;296(5566):346-9.

76. Blumenfeld S, Staun-Ram E, Miller A. 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;70:40-51.

77. Nakamura M, Matsuoka T, Chihara N, Miyake S, Sato W, Araki M, Okamoto T, Lin Y, Ogawa M, Murata M, Aranami T, Yamamura T. Differential effects of fingolimod on B-cell populations in multiple sclerosis. Mult Scler. 2014;20(10):1371-80.

78. Cellerino M, Ivaldi F, Pardini M, Rotta G, Vila G, Bäcker-Koduah P, Berge T, Laroni A, Lapucci C, Novi G, Boffa G, Sbragia E, Palmeri S, Asseyer S, Høgestøl E, Campi C, Piana M, Inglese M, Paul F, Harbo HF, Villoslada P, Kerlero de Rosbo N, Uccelli A. Impact of treatment on cellular immunophenotype in MS. A cross-sectional study. Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm. 2020;7(3):e693.

79. Mehling M, Brinkmann V, Antel J, Bar-Or A, Goebels N, Vedrine C, Kristofic C, Kuhle J, Lindberg RLP, Kappos L. FTY720 therapy exerts differential effects on T cell subsets in multiple sclerosis. Neurology. 2008;71(16):1261-7.

80. Grützke B, Hucke S, Gross CC, Herold MV, Posevitz-Fejfar A, Wildemann BT, Kieseier BC, Dehmel T, Wiendl H, Klotz L. Fingolimod treatment promotes regulatory phenotype and function of B cells. Ann Clin Transl Neurol. 2015;2(2):119-30.

81. Hjorth M, Dandu N, Mellergård J. Treatment effects of fingolimod in multiple sclerosis: Selective changes in peripheral blood lymphocyte subsets. PLoS One. 2020;15(2):e0228380.

82. Johnson TA, Evans BL, Durafourt BA, Blain M, Lapierre Y, Bar-Or A, Antel JP. Reduction of the peripheral blood CD56(bright) NK lymphocyte subset in FTY720-treated multiple sclerosis patients. J Immunol. 2011;187(1):570-9.

83. Kowarik MC, Pellkofer HL, Cepok S, Korn T, Kümpfel T, Buck D, Hohlfeld R, Berthele A, Hemmer B. Differential effects of fingolimod (FTY720) on immune cells in the CSF and blood of patients with MS. Neurology. 2011;76(14):1214.

84. Caruana P, Lemmert K, Ribbons K, Lea R, Lechner-Scott J. Natural killer cell subpopulations are associated with MRI activity in a relapsing-remitting multiple sclerosis patient cohort from Australia. Mult Scler. 2017;23(11):1479-87.

85. Rudnicka J, Czerwiec M, Grywalska E, Siwicka-Gieroba D, Walankiewicz M, Grafka A, Zgurski M, Surdacka A, Bartosik-Psujek H, Rolinski J. Influence of fingolimod on basic lymphocyte subsets frequencies in the peripheral blood of multiple sclerosis patients - preliminary study. Cent Eur J Immunol. 2015;40(3):354-9.

86. Ghadiri M, Rezk A, Li R, Evans A, Giacomini PS, Barnett MH, Antel J, Bar-Or A. Pre-treatment T-cell subsets associate with fingolimod treatment responsiveness in multiple sclerosis. Sci Rep. 2020;10(1):356.

87. Moreno-Torres I, González-García C, Marconi M, García-Grande A, Rodríguez-Esparragoza L, Elvira V, Ramil E, Campos-Ruíz L, García-Hernández R, Al-Shahrour F, Fustero-Torre C, Sánchez-Sanz A, García-Merino A, Sánchez López AJ. Immunophenotype and Transcriptome Profile of Patients With Multiple Sclerosis Treated With Fingolimod: Setting Up a Model for Prediction of Response in a 2-Year Translational Study. Front Immunol. 2018;9(1693).

88. Mehling M, Burgener AV, Brinkmann V, Bantug GR, Dimeloe S, Hoenger G, Kappos L, Hess C. Tissue Distribution Dynamics of Human NK Cells Inferred from Peripheral Blood Depletion Kinetics after Sphingosine-1-Phosphate Receptor Blockade. Scand J Immunol. 2015;82(5):460-6.

89. Acar NP, Tuncer A, Ozkazanc D, Ozbay FG, Karaosmanoglu B, Goksen S, Sayat G, Taskiran EZ, Esendagli G, Karabudak R. An immunological and transcriptomics approach on differential modulation of NK cells in multiple sclerosis patients under interferon-β1 and fingolimod therapy. J Neuroimmunol. 2020;347:577353.

90. Walzer T, Chiossone L, Chaix J, Calver A, Carozzo C, Garrigue-Antar L, Jacques Y, Baratin M, Tomasello E, Vivier E. Natural killer cell trafficking in vivo requires a dedicated sphingosine 1-phosphate receptor. Nat Immunol. 2007;8(12):1337-44.

91. Jenne CN, Enders A, Rivera R, Watson SR, Bankovich AJ, Pereira JP, Xu Y, Roots CM, Beilke JN, Banerjee A, Reiner SL, Miller SA, Weinmann AS, Goodnow CC, Lanier LL, Cyster JG, Chun J. T-bet-dependent S1P5 expression in NK cells promotes egress from lymph nodes and bone marrow. J Exp Med. 2009;206(11):2469-81.

92. Grüters-Kieslich A. Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis. 2012; [abgerufen am: 24.01.2022] Online: https://www.charite.de/fileadmin/user_upload/portal/charite/presse/publikationen/amtl-mitteilungsblatt/2012/AMB120620_092.pdf.

93. Charité - Universitätsmedizin Berlin. Neufassung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis vom 20.06.2012 (AMB Charité Nr. 092, S. 658) 2018; [abgerufen am: 05.06.2022] Online: https://www.charite.de/fileadmin/user_upload/portal/charite/presse/publikationen/amtl-mitteilungsblatt/2016/AMB_208.pdf.

94. World Medical Association. World Medical Association Declaration of Helsinki: Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects. JAMA. 2013;310(20):2191-4.

95. International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use. Guideline for good clinical practice E6(R2). 2016; [abgerufen am: 24.01.2022] Online: https://database.ich.org/sites/default/files/E6_R2_Addendum.pdf.

96. Polman CH, Reingold SC, Banwell B, Clanet M, Cohen JA, Filippi M, Fujihara K, Havrdova E, Hutchinson M, Kappos L, Lublin FD, Montalban X, O'Connor P, Sandberg-Wollheim M, Thompson AJ, Waubant E, Weinshenker B, Wolinsky JS. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 Revisions to the McDonald criteria. Ann Neurol. 2011;69(2):292-302.

97. Novartis Pharma GmbH. Fingolimod Fachinfo 2022; [abgerufen am: 07.06.2022] Online: https://www.fachinfo.de/pdf/012954.

98. U.S. Department of Health & Human Services. Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE) v5.0 2017; [abgerufen am: 10.04.2022] Online: https://ctep.cancer.gov/protocolDevelopment/electronic_applications/docs/CTCAE_v5_Quick_Reference_5x7.pdf.

99. European Parliament Council of the European Union. Directive 2001/20/EC of the European Parliament and of the Council of 4 April 2001 on the approximation of the laws, regulations and administrative provisions of the Member States relating to the implementation of good clinical practice in the conduct of clinical trials on medicinal products for human use. Official Journal of the European Communities. 2001:34-44.

100. Luttmann W, Bratke K, Küpper M, Myrtek D. Zellseparation. In: Luttmann W, Bratke K, Küpper M, Myrtek D. Der Experimentator: Immunologie. Berlin, Heidelberg: Springer; 2014. S. 53-61.

101. Luttmann W, Bratke K, Küpper M, Myrtek D. Zellseparation. In: Luttmann W, Bratke K, Küpper M, Myrtek D. Der Experimentator: Immunologie. Berlin, Heidelberg: Springer; 2014. S. 59-60.

102. Jang TH, Park SC, Yang JH, Kim JY, Seok JH, Park US, Choi CW, Lee SR, Han J. Cryopreservation and its clinical applications. Integr Med Res. 2017;6(1):12-8.

103. Wisgalla A. Schwangerschaftsbezogene Veränderungen des NK-Zell-Phänotyps bei Multipler Sklerose. Monografie, Charité – Universitätsmedizin Berlin, Berlin. 2022; [abgerufen am: 01.06.2022] Online: https://refubium.fu-berlin.de/bitstream/handle/fub188/33601/Dissertation_Wisgalla_A.pdf?sequence=3.

104. Bjorkstrom NK, Riese P, Heuts F, Andersson S, Fauriat C, Ivarsson MA, Bjorklund AT, Flodstrom-Tullberg M, Michaelsson J, Rottenberg ME, Guzman CA, Ljunggren HG, Malmberg KJ. Expression patterns of NKG2A, KIR, and CD57 define a process of CD56dim NK-cell differentiation uncoupled from NK-cell education. Blood. 2010;116(19):3853-64.

105. Luttmann W, Bratke K, Küpper M, Myrtek D. Durchflusscytometrie. In: Luttmann W, Bratke K, Küpper M, Myrtek D. Der Experimentator: Immunologie. Berlin, Heidelberg: Springer; 2014. S. 89-93.

106. Cossarizza A, Chang HD, Radbruch A, Akdis M, Andra I, Annunziato F, Bacher P, Barnaba V, Battistini L, Bauer WM, Baumgart S, Becher B, Beisker W, Berek C, Blanco A, Borsellino G, Boulais PE, Brinkman RR, Buscher M, Busch DH, Bushnell TP, Cao X, Cavani A, Chattopadhyay PK, Cheng Q, Chow S, Clerici M, Cooke A, Cosma A, Cosmi L, Cumano A, Dang VD, Davies D, De Biasi S, Del Zotto G, Della Bella S, Dellabona P, Deniz G, Dessing M, Diefenbach A, Di Santo J, Dieli F, Dolf A, Donnenberg VS, Dorner T, Ehrhardt GRA, Endl E, Engel P, Engelhardt B, Esser C, Everts B, Dreher A, Falk CS, Fehniger TA, Filby A, Fillatreau S, Follo M, Forster I, Foster J, Foulds GA, Frenette PS, Galbraith D, Garbi N, Garcia-Godoy MD, Geginat J, Ghoreschi K, Gibellini L, Goettlinger C, Goodyear CS, Gori A, Grogan J, Gross M, Grutzkau A, Grummitt D, Hahn J, Hammer Q, Hauser AE, Haviland DL, Hedley D, Herrera G, Herrmann M, Hiepe F, Holland T, Hombrink P, Houston JP, Hoyer BF, Huang B, Hunter CA, Iannone A, Jack HM, Javega B, Jonjic S, Juelke K, Jung S, Kaiser T, Kalina T, Keller B, Khan S, Kienhofer D, Kroneis T, Kunkel D, Kurts C, Kvistborg P, Lannigan J, Lantz O, Larbi A, LeibundGut-Landmann S, Leipold MD, Levings MK, Litwin V, Liu Y, Lohoff M, Lombardi G, Lopez L, Lovett-Racke A, Lubberts E, Ludewig B, Lugli E, Maecker HT, Martrus G, Matarese G, Maueroder C, McGrath M, McInnes I, Mei HE, Melchers F, Melzer S, Mielenz D, Mills K, Mirrer D, Mjosberg J, Moore J, Moran B, Moretta A, Moretta L, Mosmann TR, Muller S, Muller W, Munz C, Multhoff G, Munoz LE, Murphy KM, Nakayama T, Nasi M, Neudorfl C, Nolan J, Nourshargh S, O'Connor JE, Ouyang W, Oxenius A, Palankar R, Panse I, Peterson P, Peth C, Petriz J, Philips D, Pickl W, Piconese S, Pinti M, Pockley AG, Podolska MJ, Pucillo C, Quataert SA, Radstake T, Rajwa B, Rebhahn JA, Recktenwald D, Remmerswaal EBM, Rezvani K, Rico LG, Robinson JP, Romagnani C, Rubartelli A, Ruckert B, Ruland J, Sakaguchi S, Sala-de-Oyanguren F, Samstag Y, Sanderson S, Sawitzki B, Scheffold A, Schiemann M, Schildberg F, Schimisky E, Schmid SA, Schmitt S, Schober K, Schuler T, Schulz AR, Schumacher T, Scotta C, Shankey TV, Shemer A, Simon AK, Spidlen J, Stall AM, Stark R, Stehle C, Stein M, Steinmetz T, Stockinger H, Takahama Y, Tarnok A, Tian Z, Toldi G, Tornack J, Traggiai E, Trotter J, Ulrich H, van der Braber M, van Lier RAW, Veldhoen M, Vento-Asturias S, Vieira P, Voehringer D, Volk HD, von Volkmann K, Waisman A, Walker R, Ward MD, Warnatz K, Warth S, Watson JV, Watzl C, Wegener L, Wiedemann A, Wienands J, Willimsky G, Wing J, Wurst P, Yu L, Yue A, Zhang Q, Zhao Y, Ziegler S, Zimmermann J. Guidelines for the use of flow cytometry and cell sorting in immunological studies. Eur J Immunol. 2017;47(10):1642-3.

107. Ramachandran H, Laux J, Moldovan I, Caspell R, Lehmann PV, Subbramanian RA. Optimal thawing of cryopreserved peripheral blood mononuclear cells for use in high-throughput human immune monitoring studies. Cells. 2012;1(3):313-24.

108. Honge BL, Petersen MS, Olesen R, Moller BK, Erikstrup C. Optimizing recovery of frozen human peripheral blood mononuclear cells for flow cytometry. PLoS One. 2017;12(11):e0187440.

109. Biburger M, Trenkwald I, Nimmerjahn F. Three blocks are not enough--Blocking of the murine IgG receptor FcγRIV is crucial for proper characterization of cells by FACS analysis. Eur J Immunol. 2015;45(9):2694-7.

110. Schwichtenberg SC, Wisgalla A, Schroeder-Castagno M, Alvarez-González C, Schlickeiser S, Siebert N, Bellmann-Strobl J, Wernecke K-D, Paul F, Dörr J, Infante-Duarte C. Fingolimod Therapy in Multiple Sclerosis Leads to the Enrichment of a Subpopulation of Aged NK Cells. Neurotherapeutics. 2021;18(3):1783-97.

111. Saeys Y, Van Gassen S, Lambrecht BN. Computational flow cytometry: helping to make sense of high-dimensional immunology data. Nat Rev Immunol. 2016;16(7):449-62.

112. Van Gassen S, Callebaut B, Van Helden MJ, Lambrecht BN, Demeester P, Dhaene T, Saeys Y. FlowSOM: Using self-organizing maps for visualization and interpretation of cytometry data. Cytometry Part A. 2015;87(7):636-45.

113. Quintelier K, Couckuyt A, Emmaneel A, Aerts J, Saeys Y, Van Gassen S. Analyzing high-dimensional cytometry data using FlowSOM. Nat Protoc. 2021;16(8):3775-801.

114. Wu K, Mercier F, David OJ, Schmouder RL, Looby M. Population pharmacokinetics of fingolimod phosphate in healthy participants. J Clin Pharmacol. 2012;52(7):1054-68.

115. Tukey JW. Exploratory data analysis. 1 ed: London, Pearson; 1977.

116. Forstmeier W, Wagenmakers EJ, Parker TH. Detecting and avoiding likely false-positive findings - a practical guide. Biol Rev Camb Philos Soc. 2017;92(4):1941-68.

117. de Groot AD. The meaning of “significance” for different types of research. Acta Psychol (Amst). 2014;148:188-94.

118. Brunner E, Domhof S, Langer F. Nonparametric Analysis of Longitudinal Data in Factorial Experiments: Wiley; 2002.

119. Hazenberg MD, Spits H. Human innate lymphoid cells. Blood. 2014;124(5):700-9.

120. Yu J, Mao HC, Wei M, Hughes T, Zhang J, Park I-k, Liu S, McClory S, Marcucci G, Trotta R, Caligiuri MA. CD94 surface density identifies a functional intermediary between the CD56bright and CD56dim human NK-cell subsets. Blood. 2010;115(2):274-81.

121. Brooks AG, Posch PE, Scorzelli CJ, Borrego F, Coligan JE. NKG2A Complexed with CD94 Defines a Novel Inhibitory Natural Killer Cell Receptor. J Exp Med. 1997;185(4):795-800.

122. Cooper MA, Fehniger TA, Caligiuri MA. The biology of human natural killer-cell subsets. Trends Immunol. 2001;22(11):633-40.

123. Horowitz A, Strauss-Albee DM, Leipold M, Kubo J, Nemat-Gorgani N, Dogan OC, Dekker CL, Mackey S, Maecker H, Swan GE, Davis MM, Norman PJ, Guethlein LA, Desai M, Parham P, Blish CA. Genetic and Environmental Determinants of Human NK Cell Diversity Revealed by Mass Cytometry. Sci Transl Med. 2013;5(208):208ra145.

124. Angelo LS, Banerjee PP, Monaco-Shawver L, Rosen JB, Makedonas G, Forbes LR, Mace EM, Orange JS. Practical NK cell phenotyping and variability in healthy adults. Immunol Res. 2015;62(3):341-56.

125. Beziat V, Duffy D, Quoc SN, Le Garff-Tavernier M, Decocq J, Combadiere B, Debre P, Vieillard V. CD56brightCD16+ NK cells: a functional intermediate stage of NK cell differentiation. J Immunol. 2011;186(12):6753-61.

126. Montaldo E, Del Zotto G, Della Chiesa M, Mingari MC, Moretta A, De Maria A, Moretta L. Human NK cell receptors/markers: a tool to analyze NK cell development, subsets and function. Cytometry A. 2013;83(8):702-13.

127. Lohmann L, Janoschka C, Schulte-Mecklenbeck A, Klinsing S, Kirstein L, Hanning U, Wirth T, Schneider-Hohendorf T, Schwab N, Gross CC, Eveslage M, Meuth SG, Wiendl H, Klotz L. Immune Cell Profiling During Switching from Natalizumab to Fingolimod Reveals Differential Effects on Systemic Immune-Regulatory Networks and on Trafficking of Non-T Cell Populations into the Cerebrospinal Fluid-Results from the ToFingo Successor Study. Front Immunol. 2018;9:1560.

128. Vaessen LMB, van Besouw NM, Mol WM, Ijzermans JNM, Weimar W. FTY720 treatment of kidney transplant patients: A differential effect on B cells, naïve T cells, memory T cells and NK cells. Transpl Immunol. 2006;15(4):281-8.

129. Kaufmann M, Haase R, Proschmann U, Ziemssen T, Akgün K. Real World Lab Data: Patterns of Lymphocyte Counts in Fingolimod Treated Patients. Front Immunol. 2018;9:2669.

130. Angerer IC, Hecker M, Koczan D, Roch L, Friess J, Rüge A, Fitzner B, Boxberger N, Schröder I, Flechtner K, Thiesen H-J, Winkelmann A, Meister S, Zettl UK. Transcriptome profiling of peripheral blood immune cell populations in multiple sclerosis patients before and during treatment with a sphingosine-1-phosphate receptor modulator. CNS Neurosci Ther. 2018;24(3):193-201.

131. Blaho VA, Hla T. An update on the biology of sphingosine 1-phosphate receptors. J Lipid Res. 2014;55(8):1596-608.

132. Eken A, Yetkin MF, Vural A, Okus FZ, Erdem S, Azizoglu ZB, Haliloglu Y, Cakir M, Turkoglu EM, Kilic O, Kara I, Donmez Altuntas H, Oukka M, Kutuk MS, Mirza M, Canatan H. Fingolimod Alters Tissue Distribution and Cytokine Production of Human and Murine Innate Lymphoid Cells. Front Immunol. 2019;10:217.

133. Trabanelli S, Gomez-Cadena A, Salomé B, Michaud K, Mavilio D, Landis BN, Jandus P, Jandus C. Human innate lymphoid cells (ILCs): Toward a uniform immune-phenotyping. Cytometry B Clin Cytom. 2018;94(3):392-9.

134. Pesce S, Moretta L, Moretta A, Marcenaro E. Human NK Cell Subsets Redistribution in Pathological Conditions: A Role for CCR7 Receptor. Front Immunol. 2016;7:414.

135. Morandi B, Bougras G, Muller WA, Ferlazzo G, Münz C. NK cells of human secondary lymphoid tissues enhance T cell polarization via IFN-gamma secretion. Eur J Immunol. 2006;36(9):2394-400.

136. Bajénoff M, Breart B, Huang AY, Qi H, Cazareth J, Braud VM, Germain RN, Glaichenhaus N. Natural killer cell behavior in lymph nodes revealed by static and real-time imaging. J Exp Med. 2006;203(3):619-31.

137. Scoville SD, Freud AG, Caligiuri MA. Modeling Human Natural Killer Cell Development in the Era of Innate Lymphoid Cells. Front Immunol. 2017;8.

138. Michaud A, Dardari R, Charrier E, Cordeiro P, Herblot S, Duval M. IL-7 enhances survival of human CD56bright NK cells. J Immunother. 2010;33(4):382-90.

139. Iolyeva M, Aebischer D, Proulx ST, Willrodt AH, Ecoiffier T, Häner S, Bouchaud G, Krieg C, Onder L, Ludewig B, Santambrogio L, Boyman O, Chen L, Finke D, Halin C. Interleukin-7 is produced by afferent lymphatic vessels and supports lymphatic drainage. Blood. 2013;122(13):2271-81.

140. Caligiuri MA. Human natural killer cells. Blood. 2008;112(3):461-9.

141. Drouillard A, Mathieu A-L, Marçais A, Belot A, Viel S, Mingueneau M, Guckian K, Walzer T. S1PR5 is essential for human natural killer cell migration toward sphingosine-1 phosphate. J Allergy Clin Immunol. 2018;141(6):2265-8.e1.

142. Berahovich RD, Lai NL, Wei Z, Lanier LL, Schall TJ. Evidence for NK Cell Subsets Based on Chemokine Receptor Expression. J Immunol. 2006;177(11):7833.

143. Marcenaro E, Cantoni C, Pesce S, Prato C, Pende D, Agaugue S, Moretta L, Moretta A. Uptake of CCR7 and acquisition of migratory properties by human KIR+ NK cells interacting with monocyte-derived DC or EBV cell lines: regulation by KIR/HLA-class I interaction. Blood. 2009;114(19):4108-16.

144. Juelke K, Killig M, Luetke-Eversloh M, Parente E, Gruen J, Morandi B, Ferlazzo G, Thiel A, Schmitt-Knosalla I, Romagnani C. CD62L expression identifies a unique subset of polyfunctional CD56dim NK cells. Blood. 2010;116(8):1299-307.

145. Yang C, Siebert JR, Burns R, Gerbec ZJ, Bonacci B, Rymaszewski A, Rau M, Riese MJ, Rao S, Carlson K-S, Routes JM, Verbsky JW, Thakar MS, Malarkannan S. Heterogeneity of human bone marrow and blood natural killer cells defined by single-cell transcriptome. Nat Commun. 2019;10(1):3931.

146. Hamann I, Unterwalder N, Cardona AE, Meisel C, Zipp F, Ransohoff RM, Infante-Duarte C. Analyses of phenotypic and functional characteristics of CX3CR1-expressing natural killer cells. Immunology. 2011;133(1):62-73.

147. Stannard KA, Lemoine S, Waterhouse NJ, Vari F, Chatenoud L, Gandhi MK, Martinet L, Smyth MJ, Guillerey C. Human peripheral blood DNAM-1(neg) NK cells are a terminally differentiated subset with limited effector functions. Blood Adv. 2019;3(11):1681-94.

148. Alvarez M, Simonetta F, Baker J, Pierini A, Wenokur AS, Morrison AR, Murphy WJ, Negrin RS. Regulation of murine NK cell exhaustion through the activation of the DNA damage repair pathway. JCI Insight. 2019;4(14).

149. Nabekura T, Kanaya M, Shibuya A, Fu G, Gascoigne NRJ, Lanier LL. The costimulatory molecule DNAM-1 is essential for optimal differentiation of memory natural killer cells during mouse cytomegalovirus infection. Immunity. 2014;40(2):225-34.

150. Bozzano F, Picciotto A, Costa P, Marras F, Fazio V, Hirsch I, Olive D, Moretta L, De Maria A. Activating NK cell receptor expression/function (NKp30, NKp46, DNAM-1) during chronic viraemic HCV infection is associated with the outcome of combined treatment. Eur J Immunol. 2011;41(10):2905-14.

151. Magri G, Muntasell A, Romo N, Sáez-Borderías A, Pende D, Geraghty DE, Hengel H, Angulo A, Moretta A, López-Botet M. NKp46 and DNAM-1 NK-cell receptors drive the response to human cytomegalovirus-infected myeloid dendritic cells overcoming viral immune evasion strategies. Blood. 2011;117(3):848-56.

152. Arnon TI, Achdout H, Lieberman N, Gazit R, Gonen-Gross T, Katz G, Bar-Ilan A, Bloushtain N, Lev M, Joseph A, Kedar E, Porgador A, Mandelboim O. The mechanisms controlling the recognition of tumor- and virus-infected cells by NKp46. Blood. 2004;103(2):664-72.

153. Mandelboim O, Lieberman N, Lev M, Paul L, Arnon TI, Bushkin Y, Davis DM, Strominger JL, Yewdell JW, Porgador A. Recognition of haemagglutinins on virus-infected cells by NKp46 activates lysis by human NK cells. Nature. 2001;409(6823):1055-60.

154. Jarahian M, Watzl C, Fournier P, Arnold A, Djandji D, Zahedi S, Cerwenka A, Paschen A, Schirrmacher V, Momburg F. Activation of natural killer cells by newcastle disease virus hemagglutinin-neuraminidase. J Virol. 2009;83(16):8108-21.

155. Diab M, Glasner A, Isaacson B, Bar-On Y, Drori Y, Yamin R, Duev-Cohen A, Danziger O, Zamostiano R, Mandelboim M, Jonjic S, Bacharach E, Mandelboim O. NK-cell receptors NKp46 and NCR1 control human metapneumovirus infection. Eur J Immunol. 2017;47(4):692-703.

156. Smyth MJ, Hayakawa Y, Takeda K, Yagita H. New aspects of natural-killer-cell surveillance and therapy of cancer. Nature Reviews Cancer. 2002;2(11):850-61.

157. Gauthier L, Morel A, Anceriz N, Rossi B, Blanchard-Alvarez A, Grondin G, Trichard S, Cesari C, Sapet M, Bosco F, Rispaud-Blanc H, Guillot F, Cornen S, Roussel A, Amigues B, Habif G, Caraguel F, Arrufat S, Remark R, Romagné F, Morel Y, Narni-Mancinelli E, Vivier E. Multifunctional Natural Killer Cell Engagers Targeting NKp46 Trigger Protective Tumor Immunity. Cell. 2019;177(7):1701-13.e16.

158. Lutz CT, Moore MB, Bradley S, Shelton BJ, Lutgendorf SK. Reciprocal age related change in natural killer cell receptors for MHC class I. Mech Ageing Dev. 2005;126(6-7):722-31.

159. Hayhoe RPG, Henson SM, Akbar AN, Palmer DB. Variation of human natural killer cell phenotypes with age: Identification of a unique KLRG1-negative subset. Hum Immunol. 2010;71(7):676-81.

160. Krishnaraj R. Senescence and cytokines modulate the NK cell expression. Mech Ageing Dev. 1997;96(1-3):89-101.

161. Almeida-Oliveira A, Smith-Carvalho M, Porto LC, Cardoso-Oliveira J, Ribeiro AdS, Falcão RR, Abdelhay E, Bouzas LF, Thuler LCS, Ornellas MH, Diamond HR. Age-related changes in natural killer cell receptors from childhood through old age. Hum Immunol. 2011;72(4):319-29.

162. Hazeldine J, Hampson P, Lord JM. Reduced release and binding of perforin at the immunological synapse underlies the age-related decline in natural killer cell cytotoxicity. Aging Cell. 2012;11(5):751-9.

163. Sanchez-Correa B, Gayoso I, Bergua JM, Casado JG, Morgado S, Solana R, Tarazona R. Decreased expression of DNAM-1 on NK cells from acute myeloid leukemia patients. Immunol Cell Biol. 2012;90(1):109-15.

164. Mariani E, Mariani AR, Meneghetti A, Tarozzi A, Cocco L, Facchini A. Age-dependent decreases of NK cell phosphoinositide turnover during spontaneous but not Fc-mediated cytolytic activity. Int Immunol. 1998;10(7):981-9.

165. Facchini A, Mariani E, Mariani AR, Papa S, Vitale M, Manzoli FA. Increased number of circulating Leu 11+ (CD 16) large granular lymphocytes and decreased NK activity during human ageing. Clin Exp Immunol. 1987;68(2):340-7.

166. Hazeldine J, Lord JM. The impact of ageing on natural killer cell function and potential consequences for health in older adults. Ageing Res Rev. 2013;12(4):1069-78.

167. Arvin AM, Wolinsky JS, Kappos L, Morris MI, Reder AT, Tornatore C, Gershon A, Gershon M, Levin MJ, Bezuidenhoudt M, Putzki N. Varicella-zoster virus infections in patients treated with fingolimod: risk assessment and consensus recommendations for management. JAMA Neurol. 2015;72(1):31-9.

168. Laroni A, Uccelli A. CD56bright Natural Killer Cells: A Possible Biomarker of Different Treatments in Multiple Sclerosis. J Clin Med. 2020;9(5).

169. Yu J, Mao HC, Wei M, Hughes T, Zhang J, Park IK, Liu S, McClory S, Marcucci G, Trotta R, Caligiuri MA. CD94 surface density identifies a functional intermediary between the CD56bright and CD56dim human NK-cell subsets. Blood. 2010;115(2):274-81.

170. Lugthart G, van Ostaijen-ten Dam MM, van Tol MJD, Lankester AC, Schilham MW. CD56dimCD16− NK cell phenotype can be induced by cryopreservation. Blood. 2015;125(11):1842-3.

171. Chun J, Hartung HP. Mechanism of action of oral fingolimod (FTY720) in multiple sclerosis. Clin Neuropharmacol. 2010;33(2):91-101.

172. Fehniger TA, Cooper MA, Nuovo GJ, Cella M, Facchetti F, Colonna M, Caligiuri MA. CD56bright natural killer cells are present in human lymph nodes and are activated by T cell–derived IL-2: a potential new link between adaptive and innate immunity. Blood. 2003;101(8):3052-7.

173. Grützke B, Hucke S, Gross CC, Herold MVB, Posevitz-Fejfar A, Wildemann BT, Kieseier BC, Dehmel T, Wiendl H, Klotz L. Fingolimod treatment promotes regulatory phenotype and function of B cells. Ann Clin Transl Neurol. 2015;2(2):119-30.

174. Shi FD, Ljunggren HG, La Cava A, Van Kaer L. Organ-specific features of natural killer cells. Nat Rev Immunol. 2011;11(10):658-71.

175. Thapa M, Kuziel WA, Carr DJJ. Susceptibility of CCR5-deficient mice to genital herpes simplex virus type 2 is linked to NK cell mobilization. J Virol. 2007;81(8):3704-13.

176. McGinley MP, Cohen JA. Sphingosine 1-phosphate receptor modulators in multiple sclerosis and other conditions. Lancet. 2021;398(10306):1184-94.

177. D'Ambrosio D, Steinmann J, Brossard P, Dingemanse J. Differential effects of ponesimod, a selective S1P1 receptor modulator, on blood-circulating human T cell subpopulations. Immunopharmacol Immunotoxicol. 2015;37(1):103-9.

178. Jurcevic S, Juif P-E, Hamid C, Greenlaw R, D'Ambrosio D, Dingemanse J. Effects of multiple-dose ponesimod, a selective S1P(1) receptor modulator, on lymphocyte subsets in healthy humans. Drug Des Devel Ther. 2016;11:123-31.

179. Harris S, Tran JQ, Southworth H, Spencer CM, Cree BAC, Zamvil SS. Effect of the sphingosine-1-phosphate receptor modulator ozanimod on leukocyte subtypes in relapsing MS. Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm. 2020;7(5):e839.

180. Wu Q, Mills EA, Wang Q, Dowling CA, Fisher C, Kirch B, Lundy SK, Fox DA, Mao-Draayer Y, Group AMSS. Siponimod enriches regulatory T and B lymphocytes in secondary progressive multiple sclerosis. JCI insight. 2020;5(3):e134251.

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Svenja Schwichtenberg, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Untersuchung der natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) unter Fingolimod-Behandlung“, „Examination of natural killer cells (NK cells) during Fingolimod treatment“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.
Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilserklärung). Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Erstbetreuer/in, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; www.icmje.og) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum Unterschrift

Anteilserklärung an der erfolgten Publikation

Frau Svenja Schwichtenberg, geb. am 08.06.1996 in Bremerhaven, hatte folgenden Anteil an der Publikation:
Schwichtenberg SC, Wisgalla A, Schroeder-Castagno M, Alvarez-González C, Schlickeiser S, Siebert N, Bellmann-Strobl J, Wernecke KD, Paul F, Dörr J, Infante Duarte C. Fingolimod Therapy in Multiple Sclerosis Leads to the Enrichment of a Subpopulation of Aged NK Cells. Neurotherapeutics. 2021 Jul 9. doi: 10.1007/s13311-021-01078-7. Epub ahead of print. PMID: 34244929.

Frau Schwichtenberg erarbeitete zusammen mit Frau Prof. Infante Duarte und Herrn Dr. Dörr das Konzept des vorliegenden Papers. Die Eintreibung finanzieller Mittel und die Stellung des Ethikantrages sowie Planung der klinischen Studie erfolgten durch die beiden Seniorautoren. Die Prüfprotokolle wurden von den Studienärztinnen und -ärzten im NeuroCure Clinical Research Center (NCRC) ausgefüllt, verantwortlich waren in diesem Zusammenhang Herr Dr. Jan Dörr, Frau Dr. Bellmann-Strobl und Frau Dr. Siebert.

Frau Schwichtenberg wurde von Frau Maja Olszewska in die Erstellung von Projekten in der klinische Online-Verwaltungsplattform REDCap eingeführt. Frau Schwichtenberg ist komplett verantwortlich für die Erstellung des REDCap-Projektes und die Überführung der klinischen Daten aus den Prüfprotokollen in das REDCap Projekt. Frau Schwichtenberg ist hauptverantworlich für die Auswertung der klinischen Daten, aus denen Tabelle 1 und Tabelle 2 der Publikation hervorgingen. Unterstützung erhielt sie von Herrn Dr. Dörr.

Frau Dr. Wisgalla und Frau Prof. Carmen Infante Duarte führten Frau Schwichtenberg an die Methode der Durchflusszytometrie heran. Frau Schwichtenberg konnte bei der Paneletablierung auf ein vorhandenes Konzept von Frau Dr. Wisgalla zurückgreifen. Frau Schwichtenberg passte das Panel, welches für das Fortessa Durchflusszytometer etabliert worden war, für das Cytoflex Durchflusszytometer an und änderte die Zusammensetzung des Panels im Bezug auf die Fragestellung der vorliegenden Studie ab.
Frau Schwichtenberg ist komplett verantwortlich für die Durchführung der durchflusstytometrischen Experimente und hauptverantwortlich für die Auswertung dieser. Technische Hilfe bei konkreten Fragen in Bezug auf die durchflusszytometrischen Experimente erhielt sie von Herrn Matthias Streitz. Frau Schwichtenberg entwickelte in Rücksprache mit Frau Prof. Infante Duarte die Gating-Strategie in Fig. 1, sowie das Konzept zur Auswertung der Daten, die in Fig. 2-4 dargestellt sind. Für die Durchführung der Auswertung in FlowJo zeichnet sich Frau Schwichtenberg komplett verantwortlich.

In die Auswertungssoftware Cytobank wurde Frau Schwichtenberg von Frau Dr. Wisgalla und Herrn Dr. Schlickeiser eingeführt. Frau Schwichtenberg entwickelte selbstständig das Auswertungskonzept und führte die Analysen durch. Herr Dr. Schlickeiser erstellte die Heat maps von Fig. 6.

Das Konzept zur statistischen Auswertung hatte Herr Prof. Wernicke im Studienprotokoll vor Beginn der Studie festgelegt. Die Umsetzung erfolgte mit Ausnahme der GEE-Analysen in vollem Umfang durch Frau Schwichtenberg und wurde im Anschluss von Prof. Wernecke überprüft. Die GEE-Analyse führte Herr Prof. Wernecke durch (Tab. 3). Auswertung und Interpretation erfolgten hauptsächlich durch Frau Schwichtenberg.

Frau Schwichtenberg, Frau Prof. Infante Duarte und Herr Dr. Dörr sind verantwortlich für die Verfassung des Original-Manuskriptes. Frau Schwichtenberg trug hierbei maßgeblich zur Strukturierung und Formulierung des Textes bei. Durch Frau Dr. Wisgalla, Frau Schroeder-Castagno, Herrn Dr. Alvarez-González, Herrn Dr. Schlickeiser, Frau Dr. Siebert, Frau Dr. Bellmann-Strobl, Herrn Prof. Wernecke und Herrn Prof. Paul erfolgte die Korrektur des Manuskriptes. Frau Schwichtenberg, Frau Prof. Infante Duarte und Herr Dr. Jan Dörr sind verantwortlich für die Einarbeitung der Korrekturen und Überarbeitungen im Reviewprozess.

_____

Unterschrift, Datum und Stempel der erstbetreuenden Hochschullehrerin

_____

Unterschrift der Doktorandin

Auszug aus der Journal Summary List

Journal Data Filtered By: **Selected JCR Year: 2019** Selected Editions: SCIE,SSCI
Selected Categories: **"NEUROSCIENCES"** Selected Category Scheme: WoS
Gesamtanzahl: 271 Journale

Rank	Full Journal Title	Total Cites	Journal Impact Factor	Eigenfactor Score
1	NATURE REVIEWS NEUROSCIENCE	42,809	33.654	0.055400
2	NATURE NEUROSCIENCE	62,933	20.071	0.144390
3	BEHAVIORAL AND BRAIN SCIENCES	9,395	17.333	0.008170
4	TRENDS IN COGNITIVE SCIENCES	27,705	15.218	0.036050
5	JOURNAL OF PINEAL RESEARCH	10,537	14.528	0.009430
6	NEURON	95,056	14.415	0.199640
7	ACTA NEUROPATHOLOGICA	21,908	14.251	0.040740
8	TRENDS IN NEUROSCIENCES	20,011	12.891	0.021220
9	Annual Review of Neuroscience	13,215	12.547	0.012740
10	MOLECULAR PSYCHIATRY	22,227	12.384	0.054730
11	Nature Human Behaviour	2,457	12.282	0.014190
12	BIOLOGICAL PSYCHIATRY	44,016	12.095	0.053910
13	BRAIN	53,282	11.337	0.067050
14	SLEEP MEDICINE REVIEWS	8,077	9.613	0.013000
15	Molecular Neurodegeneration	4,933	9.599	0.011840
16	PROGRESS IN NEUROBIOLOGY	12,791	9.371	0.011250
17	FRONTIERS IN NEUROENDOCRINOLOGY	4,491	9.059	0.007050
18	ANNALS OF NEUROLOGY	37,304	9.037	0.044120
19	NEUROSCIENCE AND BIOBEHAVIORAL REVIEWS	28,873	8.330	0.051900
20	Neurology-Neuroimmunology & Neuroinflammation	2,232	7.724	0.008400
21	NEUROPATHOLOGY AND APPLIED NEUROBIOLOGY	3,992	7.500	0.005960

Rank	Full Journal Title	Total Cites	Journal Impact Factor	Eigenfactor Score
22	Neurobiology of Stress	1,055	7.197	0.003840
23	NEUROPSYCHOPHARMACOLOGY	26,281	6.751	0.040680
24	npj Parkinsons Disease	662	6.750	0.002500
25	BRAIN BEHAVIOR AND IMMUNITY	16,285	6.633	0.028560
26	Brain Stimulation	6,537	6.565	0.015580
27	NEUROSCIENTIST	5,188	6.500	0.007220
28	Acta Neuropathologica Communications	4,070	6.270	0.014730
29	CURRENT OPINION IN NEUROBIOLOGY	14,959	6.267	0.028730
30	Alzheimers Research & Therapy	3,876	6.116	0.011650
31	Neurotherapeutics	4,998	6.035	0.009520
32	GLIA	14,220	5.984	0.017250
33	NEUROIMAGE	102,632	5.902	0.125360
34	Annual Review of Vision Science	601	5.897	0.003700
35	Molecular Autism	2,510	5.869	0.007450
36	Journal of Neuroinflammation	13,709	5.793	0.025870
37	Translational Stroke Research	2,274	5.780	0.004520
38	JOURNAL OF CEREBRAL BLOOD FLOW AND METABOLISM	19,492	5.681	0.024230
39	JOURNAL OF NEUROSCIENCE	167,114	5.673	0.181170
40	BRAIN PATHOLOGY	5,308	5.568	0.007020
41	Translational Neurodegeneration	1,030	5.551	0.002790
42	NEURAL NETWORKS	14,065	5.535	0.018910
43	PAIN	37,753	5.483	0.035730

Selected JCR Year: 2019; Selected Categories: "NEUROSCIENCES"

Druckexemplar der Publikation

Neurotherapeutics (2021) 18:1783–1797
https://doi.org/10.1007/s13311-021-01078-7

ORIGINAL ARTICLE

Fingolimod Therapy in Multiple Sclerosis Leads to the Enrichment of a Subpopulation of Aged NK Cells

Svenja C. Schwichtenberg[1] · Anne Wisgalla[1,2] · Maria Schroeder-Castagno[1,3] · Cesar Alvarez-González[1,3] · Stephan Schlickeiser[4] · Nadja Siebert[3,5] · Judith Bellmann-Strobl[3,5] · Klaus-Dieter Wernecke[6] · Friedemann Paul[3,5] · Jan Dörr[3,5,7] · Carmen Infante-Duarte[1,5]

Accepted: 22 April 2021 / Published online: 9 July 2021
© The Author(s) 2021

Abstract
Fingolimod is an approved oral treatment for relapsing–remitting multiple sclerosis (RRMS) that modulates agonistically the sphingosin-1-phosphate receptor (S1PR), inhibiting thereby the egress of lymphocytes from the lymph nodes. In this interventional prospective clinical phase IV trial, we longitudinally investigated the impact of fingolimod on frequencies of NK cell subpopulations by flow cytometry in 17 RRMS patients at baseline and 1, 3, 6, and 12 months after treatment initiation. Clinical outcome was assessed by the Expanded Disability Status Scale (EDSS) and annualized relapse rates (ARR). Over the study period, median EDSS remained stable from month 3 to month 12, and ARR decreased compared to ARR in the 24 months prior treatment. Treatment was paralleled by an increased frequency of circulating NK cells, due primarily to an increase in $CD56^{dim}CD94^{low}$ mature NK cells, while the $CD56^{bright}$ fraction and $CD127^{+}$ innate lymphoid cells (ILCs) decreased over time. An unsupervised clustering algorithm further revealed that a particular fraction of NK cells defined by the expression of $CD56^{dim}CD16^{++}KIR^{+/-}NKG2A^{-}CD94^{-}CCR7^{+/-}CX_3CR1^{+/-}NKG2C^{-}NKG2D^{+}NKp46^{-}DNAM1^{++}CD127^{+}$ increased during treatment. This specific phenotype might reflect a status of aged, fully differentiated, and less functional NK cells. Our study confirms that fingolimod treatment affects both NK cells and ILC. In addition, our study suggests that treatment leads to the enrichment of a specific NK cell subset characterized by an aged phenotype. This might limit the anti-microbial and anti-tumour NK cell activity in fingolimod-treated patients.

Keywords Natural killer (NK) cells · Fingolimod · Multiple sclerosis (MS) · Innate lymphoid cells (ILCs) · Sphingosin-1-phosphate receptor (S1PR)

Jan Dörr and Carmen Infante-Duarte are equally contributing senior authors

✉ Carmen Infante-Duarte
carmen.infante@charite.de

[1] Charité–Universitätsmedizin Berlin, Corporate member of Freie Universität Berlin, Humboldt-Universität Zu Berlin and Berlin Institute of Health, Institute for Medical Immunology, Campus Virchow Klinikum, Augustenburger Platz 1 (Südstr. 2/Föhrer Str. 15), 13353 Berlin, Germany

[2] Charité–Universitätsmedizin Berlin, Corporate member of Freie Universität Berlin, Humboldt-Universität Zu Berlin and Berlin Institute of Health, Institute for "Psychiatrie Und Medizinische Klinik M.S. Psychosomatik,", Campus Benjamin Franklin, Hindenburgdamm 30, 12203 Berlin, Germany

[3] Charité–Universitätsmedizin Berlin, Corporate member of Freie Universität Berlin, Humboldt-Universität Zu Berlin and Berlin Institute of Health, Neurocure Cluster of Excellence, Campus Mitte, Sauerbruchweg 5, 10117 Berlin, Germany

[4] BIH Center for Regenerative Therapies (BCRT), Charité - Universitätsmedizin Berlin, Campus Virchow Klinikum, Föhrer Str. 15, 13353 Berlin, Germany

[5] Experimental and Clinical Research Center, Max Delbrück Center for Molecular Medicine & Charité - Universitätsmedizin Berlin, Robert-Rössle-Straße 10, 13125 Berlin, Germany

[6] Charité - Universitätsmedizin Berlin and CRO SOSTANA GmbH, Wildensteiner Straße 27, 10318 Berlin, Germany

[7] Current Affiliation: Multiple Sclerosis Center, Oberhavel Kliniken, Marwitzer Straße 91, 16761 Hennigsdorf, Germany

Introduction

Multiple sclerosis (MS) is one of the most frequent chronic neurological diseases in young adults in western countries [1]. MS is traditionally considered a primarily demyelinating autoimmune disease [2–4], in which autoreactive $CD4^+$ T cells play a key role in the initiation and maintenance of the chronic inflammation within the central nervous system [5]. This inflammatory process, also supported by B cells and macrophages, eventually leads to demyelination, axonal damage [6] and loss of neurological functions [7].

Fingolimod (Gilenya®) is approved as oral treatment for relapsing–remitting (RR) MS [8, 9]. Its efficacy could be demonstrated in different phase III studies [10–13]. Fingolimod acts by withholding lymphocytes within the lymph nodes through the modulation of the sphingosin-1-phosphate (S1P) receptor [14]. Specifically, fingolimod is an agonist of the $S1P_1$ and $S1P_{3\text{-}5}$ receptors that are expressed on lymphocytes and regulate cell trafficking [14] as well as vascular barrier function [15, 16], angiogenesis [17], and vascular tone [18]. After its binding, it leads to hyperactivation and subsequently internalization of the receptor, which results in an inhibition of lymphocytic egress from the lymph nodes [19–21] and modulation of the profile of circulating immune cells [22]. S1P receptors are also expressed on innate lymphocytes (ILCs), including NK cells [23–25].

Classically, human NK cells are subdivided according to their CD56 expression into $CD56^{bright}$ and $CD56^{dim}$ NK cells [26]. Approximately 90% of the peripheral NK cells in circulation are $CD56^{dim}$, whereas $CD56^{bright}$ NK cells are more abundant in secondary lymphoid tissues and within the cerebrospinal fluid [27–29].

To date, both beneficial and deleterious roles of NK cells have been proposed in MS [30–33]. Reports of the last four decades indicate that MS development is associated with a deficient NK cell activity [34–41]. However, other studies showed a relationship between NK cell action and central nervous system pathology [42–47], indicating that the effect of NK cells on MS may depend on the NK cell type or mode of action.

Treatment-related enrichment of a particular NK cell subset, mostly $CD56^{bright}$, or induction of NK cell activation has been associated with the therapeutic success of numerous MS drugs including interferon-beta, daclizumab, mitoxantrone, glatiramer acetate, or alemtuzumab [36, 48–59].

Effects of fingolimod on NK cells have also been extensively investigated [22, 52, 60–70]. Apart from one study that did not observe any significant effect of fingolimod on NK cells [22], all other cross-sectional studies have shown a relative increase of NK cells compared with other lymphocyte populations. These studies also revealed a decrease of $CD56^{bright}$ in comparison to $CD56^{dim}$ in fingolimod-treated patients compared with an untreated cohort, healthy controls, or patients treated with other medications [60, 61, 64]. Interestingly, although proportions but not absolute numbers of NK cells and $CD56^{dim}$ were affected by fingolimod treatment, significant reduction in $CD56^{bright}$ counts was observed [63, 67, 68, 71]. Longitudinal intra-individual studies corroborated the altered frequencies of NK cells and $CD56^{bright}$ and $CD56^{dim}$ [62, 64, 65, 68, 69]. However, the specific immune profiles of these enriched or depleted subpopulations remain largely undetermined.

In a more recent publication, Eken et al. [25] showed a decrease of all types of ILCs in the peripheral blood of fingolimod-treated patients comparing off and on treatment.

It has been demonstrated that the expression of S1P receptors increases during NK cell maturation [24]. Thus, different NK cell subtypes may respond differently to S1P-receptor agonist such as fingolimod.

Therefore, in this study, we aimed to investigate longitudinally the effects of fingolimod on NK cell homeostasis and maturation/differentiation to define more comprehensively the profile of NK cells enriched under fingolimod therapy. We hypothesized that fingolimod specifically targets certain NK cell subsets and that this effect may be associated with therapeutic benefits.

Methods

Study Design

A post-authorizational investigator-driven, interventional, prospective, open-label, baseline-to-treatment study was designed to evaluate the effects of fingolimod treatment on NK cells in RRMS patients. The study (EudraCT:2012–000,411-91; NCT 01790269) was approved by the responsible ethics committee (Approval ID: 12/9543-EK) and regulative authorities and was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki, the guidelines of the International Conference on Harmonization of Good Clinical Practice, and the applicable German laws. All participants gave informed written consent. Patients were screened and enrolled at the Experimental and Clinical Research Center and the Neurocure Research Center at Charité-Universitätsmedizin Berlin. The main inclusion criteria were RRMS according to the 2010 McDonald criteria [72] with an Expanded Disability Status Scale (EDSS) ≤ 6.0 [73], age 18–64 years, an indication for on-label treatment with fingolimod, and absence of relapse for 30 days prior to screening. Exclusion criteria were mainly related to the

contraindications of fingolimod as indicated in the label. An additional exclusion criterion was the intake of other disease modifying drugs within 6 months (regarding mitoxantrone, azathioprine, or any other immunosuppressive drug except prednisolone) or 3 months (natalizumab) prior to baseline. Detailed inclusion and exclusion criteria are provided as supplementary Table 1.

Effects of fingolimod on NK cell maturation, differentiation, and activation were investigated longitudinally (baseline vs. treatment) by flow cytometry. Blood samples were obtained at baseline visit (visit 0) and 1 month (visit 1), 3 months (visit 2), 6 months (visit 3), and 12 months (visit 4) after treatment initiation. The primary endpoint was the degree of NK cell maturation, defined as the ratio of immature NK cells/total NK cells (percentage) before fingolimod treatment and after 12 months of treatment. Secondary endpoints included NK cell frequency, percentage of immature NK cells/total NK cells, and degree of NK cell activation and maturation at all time points. Clinical secondary endpoints included the number of relapses, the disability profile (determined by the EDSS [73]), and side effects determined by the numbers of adverse events and infections.

Study Drug Application

Fingolimod in 0.5mg capsules was administered orally once daily for a period of 12 months. The treatment phase began at the baseline visit within 4 weeks after the screening visit. Treatment exactly complied with the approved label, dose, application, frequency, and safety monitoring. All regular study visits coincided with the regular treatment monitoring visits, but included larger samples of venous blood (ca. 40 ml).

Sample Collection and Flow Cytometry

Heparinized peripheral blood samples were collected during study visits. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated by density gradient centrifugation (Biochrom GmbH, Germany) according to the manufacturer's instructions as described previously [56], and were then cryopreserved in liquid nitrogen for later analysis. All samples of the same patient (different time points) were processed and analyzed simultaneously.

For the characterization of NK cell subpopulations, defrozen PBMCs were washed and incubated with human Fc fragments (Miltenyi Biotec, Germany) to block unspecific antibody binding, followed by the incubation with anti-CCR7-BV421, anti-NKG2C-AlexaFlour488, anti-DNAM-1/CD226-PerCP/Cy5.5, anti-CD158a/h-PE, anti-CD56-PE/Dazzle594, anti-NKG2A/CD159a-PE/Cy7, anti-CD94-APC, anti-Lin(CD3, CD19, CD14, CD20)-Alexa700, anti-CD16-APCfire750, anti-NKG2D-BV510, anti-CX_3CR1-BV605, anti-NKp46-BV650 and anti-CD127-BV785. Viable cells were identified with "LIVE/DEAD™ Fixable Dead Cell Stain Kits " (Thermofisher). Data were acquired at Cytoflex LX flow cytometer (Beckman Coulter).

Clinical Data Collection and Analysis

As fingolimod shows a steady-state blood concentration only after approximately 2 months of treatment [74], the first 3 months of treatment were not considered when assessing clinical effects. Effect of treatment on relapse rates was therefore evaluated by comparing the annualized rate of relapses during treatment (from month 3 to 12) to the annualized rate in the 24 months prior study.

Relapses were defined as either the occurrence of new neurological symptoms or the recurrence or worsening of previously existent symptoms/signs at least 30 days after the beginning of a previous demyelinating event. The symptoms/signs had to last at least 24 h and had to occur independently of fever or acute infections. The course of MS-related disability determined by EDSS [73] was evaluated by comparing the EDSS from month 3 and month 12.

Treatment response was defined as the absence of EDSS increase from month 3 to month 12 and decrease in ARR when comparing the ARR from month 3 to month 12 on-treatment with the 24 months pre-treatment ARR. Non-response was defined as EDSS increase from month 3 to month 12 and/or stable ARR or increase in ARR when comparing the ARR from month 3 to month 12 on-treatment with the 24-month pre-treatment ARR. If no relapse occurred during the study and 24 months prior to study and the EDSS did not increase from moth 3 to month 12, the patient was considered a responder.

Flow Cytometry Data Analysis and flowSOM-Based Unsupervised Analysis

The flow cytometry data were first analysed unblinded using FlowJo software 10.4 (TreeStar). Thereafter, a multidimensional unsupervised analysis was conducted using Cytobank (www.cytobank.org). Fluorescent minus one (FMO) stainings were used as controls. The applied gating strategy is shown in Fig. 1. From the 84 acquired data points, 13 measurements were excluded during the analysis process due to poor sample quality (very high number of dead cells or debris) or defective acquisition. These samples were excluded before the initiation of the analysis.

Expression of a given marker was determined either by percentage of fluorescence positive cells or by using the mean fluorescence intensity (MFI). In the latter case, a change in the MFI (Δ MFI) was calculated by subtracting the MFI of the FMO-control from the FMI of the specific marker.

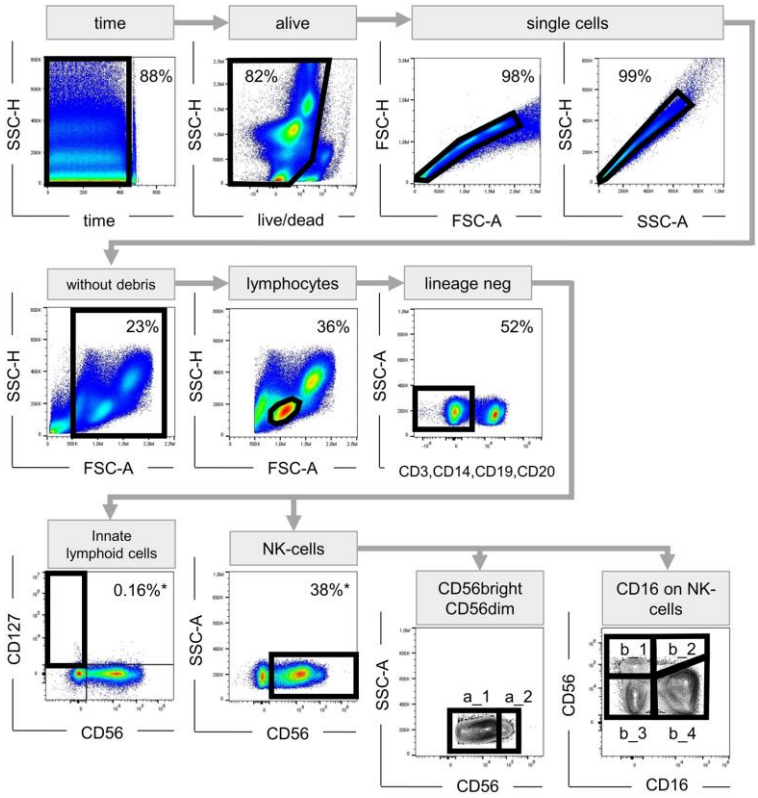

Fig. 1 Gating strategy. Artefacts caused by poor flow were eliminated in a time vs. scatter plot; afterwards, dead cells as well as cell clumps or doublets were excluded; to disregard cell debris, only events > 500,000 on the FSC-A scale were included in further analysis; lymphocyte population was determined by its characteristic morphology in FSC-A vs. SSC-H plot; T, B, NKT cells and monocytes were excluded from the analysis by staining for CD3, CD19, CD14, or CD20, respectively. ILCs were described as lineage-negative, $CD56^{-}CD127^{+}$ cells. NK cells were defined as lineage-negative $CD56^{+}$ cells. The $CD56^{+}$ cells were further discriminated in $CD56^{dim}$ (a_1) and $CD56^{bright}$ (a_2) cells. The expression of the other markers of interest (CCR7, NKG2C, DNAM-1, CD158a/h, NKG2A, CD94, NKG2D, CX_3CR, NKp46) were analysed considering both, all NK cells and the subgroups ($CD56^{dim}$ and $CD56^{bright}$). NK cells were also subcategorized according to CD16 expression in $CD56^{bright}CD16^{-}$ (b_1), $CD56^{bright}CD16^{+}$ (b_2), $CD56^{dim}CD16^{-}$ (b_3), and $CD56^{dim}CD16^{+}$ (b_4). FSC forward scatter, SSC side scatter, -H pulse height, -A pulse area

In addition, to avoid biased analysis based in pre-determined populations, we performed a multidimensional unsupervised analysis using the FlowSOM algorithm [75]. For that, all compensated files were transferred to the Cytobank and scaled in this program. Events (cells) from all included patients and all visits were assigned to a self-organizing map. Events with similar properties were aggregated in one of different 81 clusters. A minimal spanning tree visualized similar clusters in the same branch of this tree. Clusters with similar properties were then further integrated within 15 final metaclusters (MCs). To assess effects of treatment on NK cell clusters, MC percentage at baseline visit and after 12 months of therapy were compared. Next, a qualitative analysis of differences of the MCs in responders and non-responders was conducted.

Statistical Analysis

Data of primary and secondary endpoints and the MCs were analyzed using an exploratory approach and descriptive statistics (frequency of parameters, median). To assess the primary endpoint, status of NK cell maturation (ratio immature NK cells per total NK cells as a percentage) before treatment and after 12 months of treatment was compared. Secondary immunological endpoints (NK cell frequency,

ratio immature NK cells per total NK cells, as well as the frequency of NK cell activation and functional markers) were evaluated for the whole treatment period. Additionally, the frequency of the MCs from the unsupervised clustering analysis was evaluated for all time points. Non-parametric (pairwise exact Wilcoxon) analysis was performed to compare (univariately) immune subsets before treatment and after 12 months of treatment. In order to test for systematic changes over time, markers of special interest with a significant Wilcoxon result were included in a nonparametric analysis of longitudinal data (nonparametric MANOVA) [76]. Univariate post hoc Wilcoxon tests after global testing were used to check for significant differences in certain clinically interesting time points.

Generalized estimating equations (GEE) were applied to test for potential associations between clinical parameters and changes in immunological endpoints over time. Different GEE models were examined with number of infections, number of relapses, and frequency of $CD56^{bright}$, MC4, and $CD56^{dim}CD94^{low}$ cells as independent influencing factors. Based on our previous experiences in neurology [77], we used an autoregressive model of 1st order for the correlation matrix.

Tests should be seen as exploratory data analysis. Therefore, all p-values have to be understood as exploratory ones. For that reason, no adjustments for multiple testing were conducted. Statistical significance was defined as $p < 0.05$. Calculations were performed using IBM© SPSS© Statistics, Version 25, © Copyright 1989, 2016 SPSS Inc., an IBM Company and the R Project for Statistical Computing, Version 3.4.0 (2017–04-21). Figures were generated using GraphPad prism 8.0.0.

Results

Demographic and Clinical Data

Twenty-one patients were screened and included in this study. Three patients terminated fingolimod treatment early due to a significant elevation of liver enzymes (2 patients) or severe lymphocytopenia (1 patient) and therefore dropped out. Another patient developed severe lymphocytopenia (grade 4 toxicity) before the last visit; for this patient, the data of only 4 time points were analyzed. Data of another patient were removed from the analysis because of the poor quality of the frozen blood samples.

The final analysis included therefore 16 patients treated daily for 12 months and one patient treated for 10 months. Demographic baseline data are displayed in Table 1. Females accounted for 65% of the cohort; the mean age at screening was 41 years; the mean MS duration was 10 years. The median EDSS score at treatment start was 2.0. Fifteen (88%) of the 17 patients received previous treatment with other disease-modifying drugs. Based on the response criteria described in "Methods," seven patients (41%; 2 males, 5 females) were classified as non-responders.

Table 1 Demographic characteristics

	n = 17
Age (in years, mean ± SD)	40.8 ± 10.0
Females (n (%))	11 (64.7)
Interval from MS onset to baseline (in years, mean ± SD)	10.1 ± 6.7
Annualized relapse rate (ARR) 24 months before baseline	0.68
EDSS score at baseline (median (range))	2.0 (0.0–6.0)

SD standard deviation

From the patients included in the analysis, 24% (n = 4) suffered from one or more relapses during the study. A total of 18% (n = 3) showed an increase in the ARR calculated from month 3 to month 12 on-treatment compared with the 24-month pre-treatment ARR. Median EDSS remained stable from visit 2 (third month of treatment) to the last visit after 12 months of treatment. In 35% (n = 6), an EDSS increase was observed. Thus, relapses and/or EDSS increase were observed in seven patients that for hypothesis generating analyses were considered as non-responders.

Serious adverse events were reported in three patients, namely elevated liver enzymes, herpes zoster, and urosepsis with subsequent aggravation of MS-symptoms. No serious adverse events resulted in hospitalization, death, or a permanent disability. Fourteen infection-related adverse events were recorded, seven in the responder group, affecting four patients, and seven in the non-responders, that affected five out of the seven patients. Therefore, as shown in Table 2, the number of patients affected by infections was higher in the non-responder group (71%) than in the responder group (40%).

Effects of Fingolimod on Immature/Mature NK Cell Fractions

NK cell markers were analysed according to the gating strategy shown in Fig. 1. The expression of maturation markers was analysed considering all NK cells or the $CD56^{dim}$ and $CD56^{bright}$ fractions separately as displayed in Fig. 1. The following statistical analyses should be seen as exploratory data analysis; therefore, all p-values are to be understood as exploratory ones.

Figure 2A shows that the frequency of circulating $CD56^{+}$ NK cells increased during treatment (MANOVA $p = 0.003$), from 8.74% before treatment to 28.90% after 1 month (Wilcoxon test $p = 0.005$) up to 40.05% at month 12 (Wilcoxon test $p < 0.001$).

Table 2 Clinical outcomes

Relapses	All patients (n = 17)	Responder (n = 10)	Non-responder (n = 7)
Patients with confirmed relapse from visit 2 to treatment termination (n (%))	4 (23.5)	0 (0.0)	4 (57.1)
1 relapse (n(%))	2 (11.8)	0 (0.0)	2 (28.6)
2 relapses (n(%))	2 (11.8)	0 (0.0)	2 (28.6)
Annualized relapse rate (ARR)	0.47	0	1.14
EDSS			
Patients with EDSS increase from visit 2 to treatment termination (n (%))	6 (35.3)	0 (0.0)	6 (85.7)
Change from visit 2 to visit 4 (median (range))	0.0 (− 1.5–1.5)	− 0.5 (− 1.5–0)	0.5 (0.0–1.5)
Infections			
Patients with infections from visit 2 to treatment termination (n (%))	9 (53.0)	4 (40.0)	5 (71.4)
Number of infections from visit 2 to treatment termination	14	7	7

Further, we observed a fingolimod-associated reduction of $CD56^{bright}$ NK cells over time (MANOVA $p = 0.0000009$) from 9.30% at baseline to 3.83% after 1 month (Wilcoxon test $p < 0.001$) and 3.56% after 12 months of treatment (Wilcoxon test $p < 0.001$) (Fig. 2B). However, as shown in Fig. 2C, within the $CD56^{dim}$ population only, the fraction of circulating $CD16^{+}$ $CD56^{dim}$ NK cells increased during treatment from baseline median 59.30 to 77.43% after 12 months of fingolimod intake (Wilcoxon test $p = 0.042$). Additionally, the analysis of ILCs, defined as $CD56^{-}CD127^{+}$ cells, revealed a mild decrease over the treatment period from 0.17 to 0.12% (Wilcoxon test $p = 0.01$) (data not shown).

Further, we focused on the fully mature fractions, that are $CD94^{low}$ [78] and express KIR, but no NKG2A [79, 80]. We observed an increase of fully mature $CD56^{dim}CD94^{low}$ over time (MANOVA $p = 0.014$) (Fig. 3A) from 32.65% at baseline to 44.60% after 12 months of treatment (Wilcoxon test $p = 0.008$). In the same line, $NKG2A^{-}KIR^{+}$ $CD56^{dim}$ NK cells increased slightly from 19.30% at treatment initiation to 20.85% after 12 months of fingolimod intake (Wilcoxon test $p = 0.013$) (Fig. 3B).

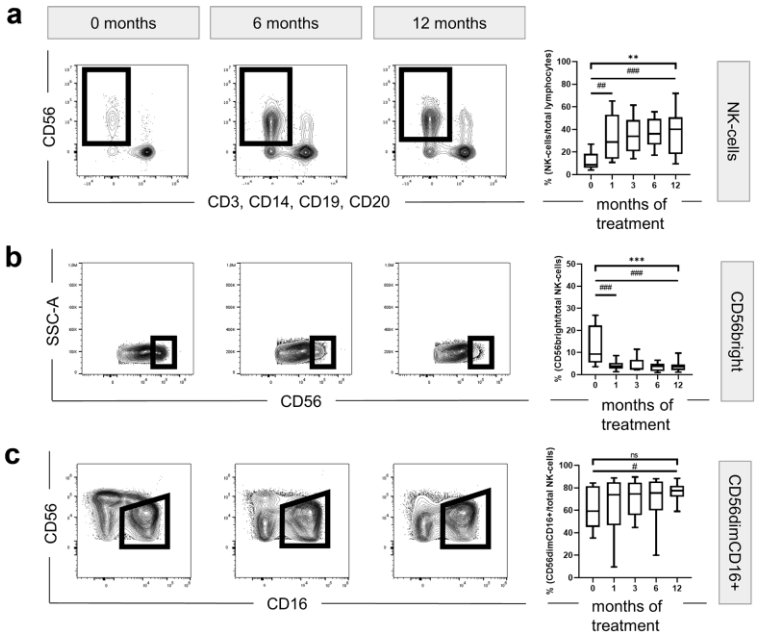

Fig. 2 Effect of fingolimod therapy on the expression of CD56 and CD16. Representative FACS plots displaying fingolimod-induced changes over time in several NK cell populations are depicted on the left-side. Box-and-whisker plots show the corresponding quantification for all patients at all timepoints. **a** Analysis of all NK cells over time. **b** Analysis focusing on $CD56^{bright}$. **c** Analysis of NK cells according to their CD56 and CD16 expression: The $CD56^{dim}CD16^{+}$ population is framed. The corresponding box-and-whisker plot shows changes overtime affecting the $CD56^{dim}CD16^{+}$. MANOVA $*p \leq 0.05$; $**p \leq 0.01$; $***p \leq 0.001$; exact Wilcoxon test $\#p \leq 0.05$; $\#\#p \leq 0.01$; $\#\#\#p \leq 0.001$; SSC side scatter, -A pulse area

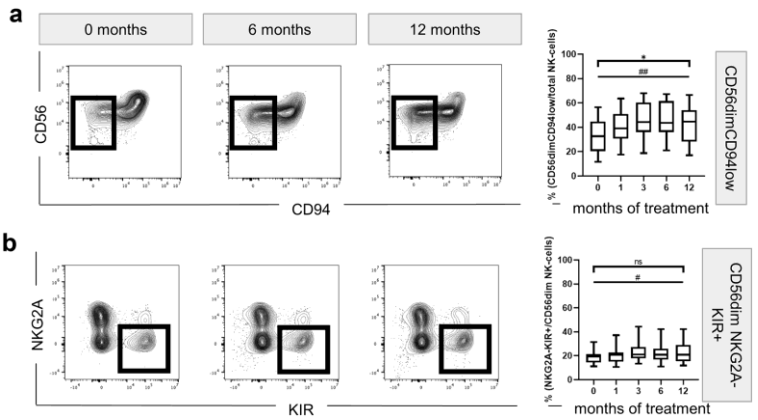

Fig. 3 Effect of fingolimod therapy on NK cell maturation markers. Representative FACS plots and the corresponding quantification are depicted on the left- and right-side, respectively. **a** Frequency of $CD56^{dim}CD94^{low}$ cells from the CD56 fraction. **b** Quantification of the $NKG2A^{-}KIR^{+}$ cells from the $CD56^{dim}$ fraction. MANOVA *$p \leq 0.05$; **$p \leq 0.01$; ***$p \leq 0.001$; exact Wilcoxon test #$p \leq 0.05$; ##$p \leq 0.01$; ### $p \leq 0.001$

Thus, the proportion of highly mature NK cells increased after 1 month of treatment and remained elevated during the treatment period of 12 months (overview supplementary Table 2).

Activation and Chemotactic Capacity of NK Cells Under Fingolimod Treatment

To evaluate the proportion of NK cells with activating or migration-mediating receptors during the treatment with fingolimod, we examined the expression of the chemokine receptors CCR7 and CX_3CR1, as well as the inhibition marker NKG2A and the activation markers NKp46, DNAM-1, NKG2D, and NKG2C.

Fingolimod treated patients showed a decreased proportion of both $CCR7^{+}$ and CX_3CR1^{+} $CD56^{dim}$ NK cells in peripheral blood. As shown in Fig. 4A, the CCR7 expressing $CD56^{dim}$ NK cells decreased from treatment initiation to the later visits (MANOVA $p = 0.0032$). The fraction of $CCR7^{+}$ $CD56^{dim}$ NK cells decreased from 5.30% at baseline to 2.46% after 12 months of treatment (Wilcoxon test $p = 0.007$) (Fig. 4A). We observed a trend in the decrease in fluorescence intensity of CX_3CR1 on $CD56^{dim}$ NK cells ($p = 0.056$) (supplementary Fig. 1B). No change in CCR7 or CX_3CR1 was observed in $CD56^{bright}$ NK cells (supplementary Fig. 1A, 1B).

Furthermore, the proportion of the $CD94^{+}NKG2A^{+}$ NK cells was reduced from 51.60 to 47.60% at the 12-month visit (Wilcoxon test $p = 0.004$). The frequency of $CD94^{+}NKG2A^{+}$ cells also decreased in both $CD56^{dim}$ and $CD56^{bright}$ NK cells after 1 month of treatment and remained low during the entire treatment period (supplementary Fig. 1C).

Next, we analysed changes in the percentage of NK cell activation receptors. While the ratio of $NKp46^{+}$ and $DNAM\text{-}1^{+}$ NK cell subpopulations was consistently reduced after 1 month of fingolimod intake, we observed no significant changes in $NKG2D^{+}$ and $CD94^{+}NKG2C^{+}$ NK cells (supplementary Fig. 1D, 1E, 1F, 1G). The proportion of NKp46 expression only decreased in $CD56^{dim}$ NK cells, while $CD56^{bright}$ NK cells were not affected (supplementary Fig. 1D). While the decrease from baseline (median frequency: 18.90%) to 12 months of treatment (median frequency: 15.80%) was significant (Wilcoxon test $p = 0.007$) in the $CD56^{dim}NKp46^{+}$ cells, no alteration over the entire treatment period was observed (Fig. 4B).

On the other hand, the ratio of DNAM-1 expressing $CD56^{bright}$ decreased during the observation period (MANOVA $p = 0.0036$) (Fig. 4C). In line with these findings, we could also evaluate a significant decrease in the proportion of DNAM-1 in $CD56^{dim}$ NK cells comparing baseline to 12 months (Wilcoxon test $p = 0.035$) (supplementary Fig. 1E).

Thus, fingolimod may affect NK cell function by promoting a reduced fraction of activation receptors expressing NK cells. This was observed for the entire NK cell population and also for the $CD56^{bright}$ and $CD56^{dim}$ fractions (overview supplementary Table 2).

Unsupervised Multidimensional Analysis of the Effect of Fingolimod on NK Cell Subpopulations

To investigate whether a so far undescribed fraction of circulating NK cells increases in fingolimod treated patients, the high-dimensional data set was further explored by means of the unsupervised clustering algorithm FlowSOM. FlowSOM clusters and reduces the dimensionality by displaying the data of all markers and patients in one self-organized map (SOM) [75]. From 83 flow cytometry files of all patients included in this study, which were manually pre-gated for the

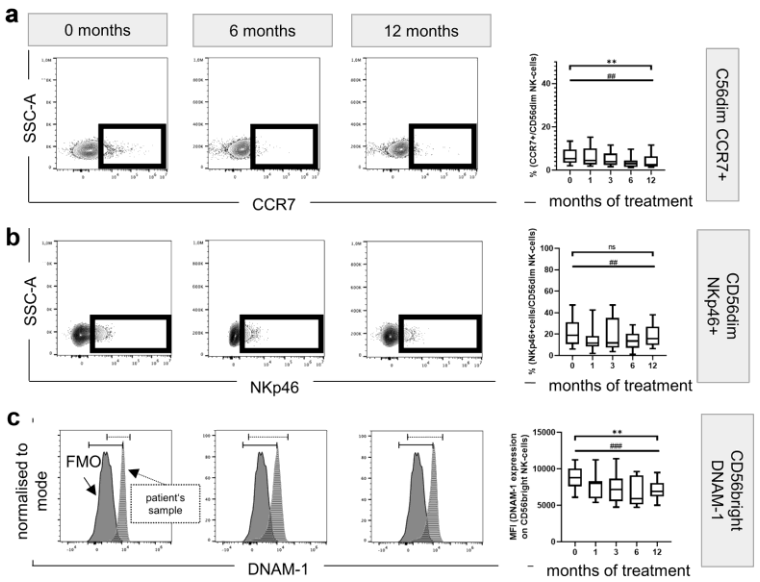

Fig. 4 Effect of fingolimod therapy on NK cell activation and chemotactic responses. Representative FACS plots and a histogram displaying fingolimod-induced changes over time of CCR7 (**a**), NKp46 (**b**), and DNAM-1 (**c**) are depicted on the left-side. Box-and-whisker plots on the right-side show the corresponding quantification for all patients at all time points. MANOVA *p ≤ 0.05; **p ≤ 0.01; ***p ≤ 0.001; exact Wilcoxon test #p ≤ 0.05; ##p ≤ 0.01; ###p ≤ 0.001; SSC side scatter, -A pulse area, FMO fluorescence minus one, MFI median fluorescence intensity

$CD56^+$ NK cell (as shown in Fig. 1), a minimum-spanning tree (MST) was generated. Clusters with cells characterized by similar phenotypes are depicted in the same branch of the tree. Data was merged into a total of 81 clusters and further aggregated into 15 MC. Figure 5A illustrates the MST by displaying the median CD56 signal intensity for each cluster node coded by colour. Cluster size reflects the number of events included in it. Here, $CD56^{bright}$ NK cell cluster (black frame) can be easily identified and showed a decrease over time (Fig. 5A).

The comparison of all MC revealed that three interrelated MC (MC6, 13, and 15) decreased significantly comparing baseline and 12 months of treatment (Wilcoxon test $p = 0.001$). As shown in Fig. 5B, all three MCs are characterized by a high expression of $CD56^{bright}$ (orange or red cluster nodes). While the baseline-frequency of MC6, MC13, and MC15 was 11.84%, it decreased to 5.90% after 1 month and further decreased to 4.00% after 12 months of treatment (Fig. 5C). Unsupervised analyses confirmed our previous results that the proportion of NK cell with bright CD56 expression decreased during treatment.

Further, we identified a significant increase in the frequency of MC4, containing $CD56^{dim}$ expressing NK cells and a decrease in the frequency of MC11, containing NK cells with different levels of CD56 expression (Fig. 5B). The MC4 fraction expanded significantly from a baseline median frequency of 29.59 to 43.45% after 12 months of therapy (Wilcoxon test $p = 0.01$), while the MC11 fraction slightly decreased from median 5.34 to 4.90% (Wilcoxon test $p < 0.001$) (Fig. 5C).

To define the phenotype of cells within a MC, median expression of all analysed markers with a colour spectrum scaled per marker from minimum to maximum fluorescence intensity are depicted in Fig. 6A. While MC4 cells are $CD16^{++}KIR^{+/-}NKG2A^{-}CD94^{-}CCR7^{+/-}CX_3CR1^{+/-}NKG2C^{-}NKG2D^{+}NKp46^{-}DNAM\text{-}1^{++}CD127^{+}$, NK cells of the MC11 are $CD16^{+}KIR^{-}NKG2A^{++}CD94^{++}CCR7^{+/-}CX_3CR1^{+/-}NKG2C^{-}NKG2D^{++}NKp46^{++}DNAM1^{++}CD127^{+/-}$. Thus, in comparison to MC4, MC11-NK cells express lower levels of CD16, KIR, and CD127 and higher levels of NKG2A, CD94, NKG2D, and NKp46 and could be considered as an intermediate mature NK cell population.

Next, data from patients considered as responders and non-responders were mapped to the MST separately. The frequency of the different MCs depicted with a colour scale at baseline, as well as after 6 and 12 months of treatment, is represented in Fig. 6B. We observed a higher frequency of the $CD56^{bright}$ MCs (MC6, 9, 13, 15) and the $CD127^{+}$ MC2 in the non-responders compared to the responders at baseline visit. After treatment initiation, these MCs seem to decrease in both non-responders and responders and converge to same levels.

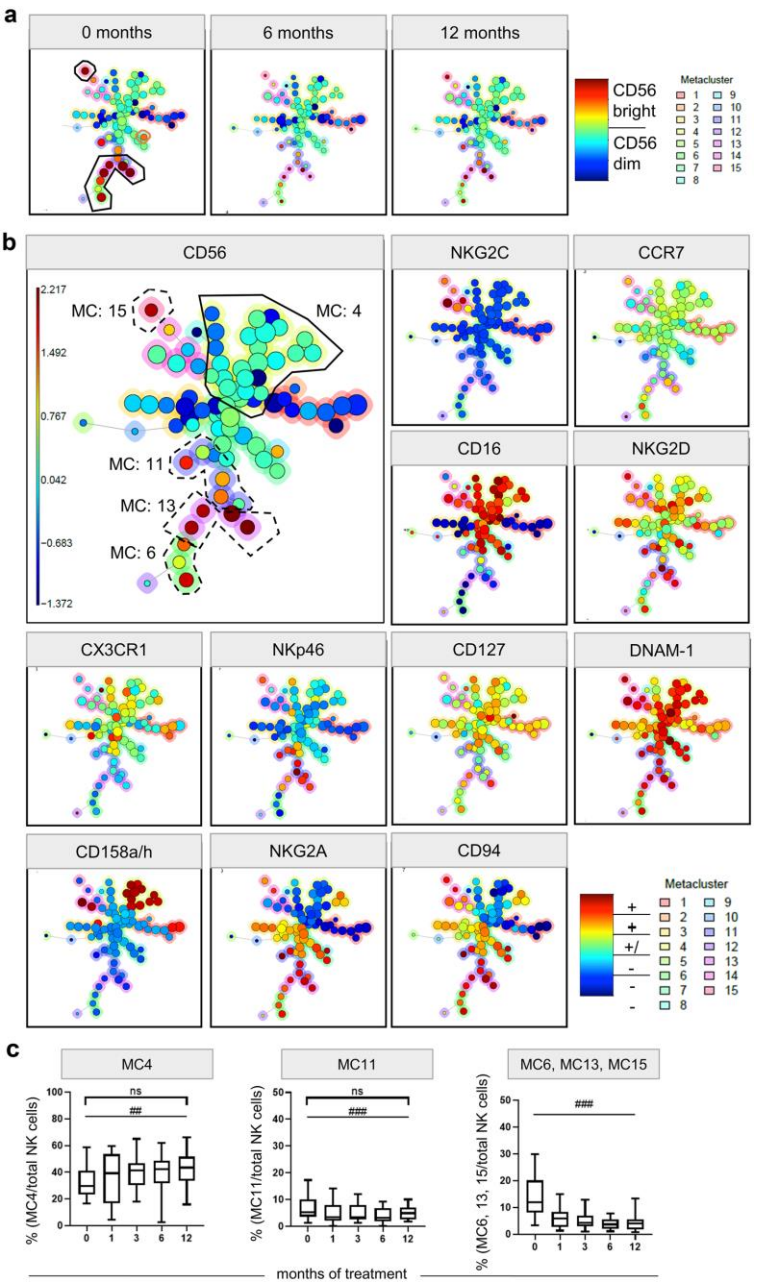

Fig. 5 FlowSOM unsupervised clustering of CD56^{+} NK cells in fingolimod treated patients. The FlowSOM clustering was performed by analysing the expression of CCR7, NKG2C, DNAM-1, 158a/h, CD56, NKG2A, CD94, CD16, NKG2D, CX_3CR1, NKp46, and CD127 on each cell for all samples. Cells with similar characteristics are merged into one cluster, shown as individual nodes in the minimum-spanning tree (MST). Clusters with similar conditions are pictured close to each other. The median fluorescence intensity of each marker is visualized by the colours; red represents high expression, while blue represents low marker expression. The colour around each cluster shows the MC this cluster belongs to. The cluster size represents the number of cells that integrates this cluster. **a** CD56 expression on NK cells at treatment start (0 months) and after 6 and 12 months of treatment. The CD56^{bright} clusters are framed. CD56^{bright} clusters decreased in size, while CD56^{dim} cluster increased from treatment start to 6 and 12 months of treatment. **b** Expression of different markers. The MCs with significant changes are framed. The continuous line encloses the MC that increased, and the dashed line is around the MCs that decreased over the treatment period. **c** Box-and-whisker plot of the percentage of MC4 per total NK cells, MC11 per total NK cells, and the sum of MC6, 13 and 15 (all MC are CD56^{bright}) per total NK cells of all included patients at treatment start (0 months) and 1, 3, 6, and 12 months after treatment. MANOVA *$p \le 0.05$; **$p \le 0.01$; ***$p \le 0.001$; exact Wilcoxon test #$p \le 0.05$; ##$p \le 0.01$; ###$p \le 0.001$; MC metacluster

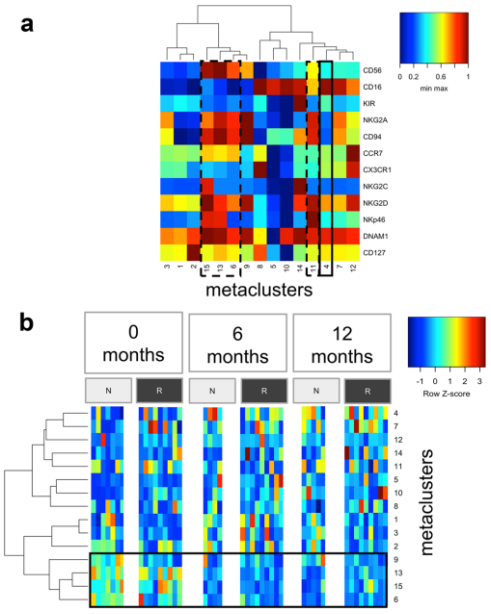

Fig. 6 Heatmaps of the MC. **a** Heatmap of all MCs on the basis of the median expression of 12 markers with a colour spectrum scaled per marker from minimum to maximum fluorescence intensity. The continuous black line encloses the MC4 that increased significantly over time; dashed black lines define the MCs that decreased significantly during the treatment (MC 6, 11, 13, 15). **b** Direct comparison of MC frequencies in responders ("R," dark grey) and non-responders ("N," light grey) in a heatmap for baseline and the visits after 6 and 12 months of treatment. Each column represents the MC frequencies of one patient for one specific timepoint during the therapy. To improve the comparability between the different MCs and accounting for subject-specific ranges, we showed the frequencies with a row z score normalization (per sample across all MCs). $CD56^{bright}$ MCs framed. MC metacluster

Longitudinal Association of Fingolimod-Induced Changes in NK Cell Subpopulations with Clinical Outcome Parameters

Further, we performed a hypothesis-driven analysis, in which three different NK cell subpopulations were investigated as independent variable for associations with clinical endpoints (number of infections, number of relapses, number of adverse events, EDSS, and response) within the 12 months of treatment. The independent variable were $CD56^{bright}$ cells, a regulatory, low cytotoxic NK cell subpopulation [81], $CD56^{dim}CD94^{low}$ cells, a mature subpopulation with low regulatory, but high cytotoxic capacity [78] and MC4 cluster, a yet undescribed NK cell cluster that showed a significant fingolimod-induced increase in the previous unsupervised clustering analysis.

Generalized estimating equation (GEE) analysis revealed interesting initial data. We measured an inverted correlation between changes in $CD56^{dim}CD94^{low}$ and number of infection (Table 3), indicating that an increase in proportion of one percent of this population correlates with a decreased risk for an infections by 3.7% (odds ratio = 0.963; 95% confidence interval = 0.939–0.988, p = 0.004). In addition, a decrease of the $CD56^{bright}$ fraction correlated with a relapse risk increase (decrease by 1% was associated with an increase of the risk for a relapse by 25.9%, odds ratio = 0.741; 95% confidence interval = 0.556–0.998, p = 0.041)]. No significant correlations between the three NK cell populations and number of AEs, EDSS, or response were found.

To summarize, an increase in the fraction of $CD56^{dim}CD94^{low}$ and $CD56^{bright}$ NK cell populations was associated with a reduced number of infections and with a reduced number of relapses, respectively.

Table 3 Longitudinal association of clinical outcome parameters and fingolimod-related NK cell profile

		Coefficient (95% CI)	p-value	Odds ratio (95% CI)
Dependent variable: number of infections				
Independent variable:	Change in $CD56^{bright}$	−0.080 (−0.169–0.008)	0.073	0.923 (0.845–1.008)
	Change in MC4	−0.010 (−0.040–0.020)	0.503	0.990 (0.960–1.020)
	Change in $CD56^{dim}CD94^{low}$	**−0.037 (−0.063 to −0.012)**	**0.004**	**0.963 (0.939–0.988)**
Dependent variable: number of relapses				
Independent variable:	Change in $CD56^{bright}$	**−0.300 (−0.587–0.012)**	**0.041**	**0.741 (0.556–0.988)**
	Change in MC4	0.037 (−0.005–0.080)	0.085	1.038 (0.995–1.083)
	Change in $CD56^{dim}CD94^{low}$	0.043 (−0.007–0.094)	0.093	1.044 (0.993–1.099)

Results for two separate multivariate generalized estimating equation (GEE) analyses, using the "number of infection" or "number of relapses" as dependent variables, respectively. As independent parameters $CD56^{bright}$, MC4 and $CD56^{dim}CD94^{low}$ were used in both models. Analyses were conducted to check for prediction of the clinical parameters by alteration of the immune populations. Values in bold indicate significant correlations

Discussion

This pilot study aimed to determine the effects of 12 months of fingolimod treatment on frequency and phenotype of circulating NK cells in a cohort of MS patients in the context of an exploratory flow cytometry analysis.

We observed an increase of NK cell fraction within the lymphocytes over the treatment period (Fig. 2A), which is consistent with previous reports [60–62, 64, 65, 68, 69]. Hjorth et al. [69] demonstrated a decrease in number of circulating lymphocytes in fingolimod treated patients, while NK cell numbers were not affected. NK cells, contrary to T and B cells, only express low levels of the major fingolimod target $S1P_1$ receptor [23, 24]. Thus, the increase of NK cell frequency observed in our study may result from the decreased number of circulating adaptive lymphocytes that, in contrast to NK cells, are broadly sequestered within the secondary lymphoid tissue during fingolimod treatment [82].

Moreover, our study confirmed that fingolimod reduces the proportion of circulating ILCs [25] and led to a reduced proportion of the circulating immature $CD56^{bright}$ NK cells and an increased proportion of the $CD56^{dim}$ NK cell fraction (Fig. 2B) [60, 63–65, 68]. Our longitudinal study also confirmed that these effects could be observed already after the first month of treatment and were maintained over 1 year of regular fingolimod intake. The decreased frequency of $CD56^{bright}$ and the increased frequency of $CD56^{dim}$ could be explained by their different forms of recirculation. $CD56^{bright}$ may be more susceptible to sequestration within secondary lymphoid tissue (SLT) and $CD56^{dim}$ to exit SLT, because contrary to the $CD56^{dim}$, $CD56^{bright}$ cells express high levels of the homing receptors L-selectin and CCR7 [83, 84] and, in addition, $CD56^{dim}$ cells appear to express high levels of $S1P_5$ receptors, that appear to be resistant to fingolimod effects in vivo [24, 60, 63].

Moreover, we analysed additional phenotypic markers in the peripheral blood that included CD16, CD94, or the KIRs (Fig. 3). Highly mature $CD56^{dim}$ NK cells are characterised by low CD94, low NKG2A, and high KIR levels, and by a low IFN-gamma, but a high granzyme B and perforin production [78, 79]. Here, we showed that over 12 months of treatment, the fraction of $CD56^{dim}CD94^{low}$ was significantly enriched in the circulation, suggesting not only a predomination of mature $CD56^{dim}$ but rather a continuous shift within the $CD56^{dim}$ population towards fully maturation and differentiation. These findings were also in line with a mild increase in the frequency of mature $CD56^{dim}NKG2A^{-}KIR^{+}$ after fingolimod initiation.

Our data further revealed that under fingolimod therapy, NK cells showed an altered functional receptor profile, with a lower percentage in expression of CCR7 and CX_3CR1, the inhibitory receptor NKG2A, as well as the activating receptors NKp46 and DNAM-1 (Fig. 4; supplementary Fig. 1). Effects on CCR7 were already reported in treated patients versus untreated MS patients and healthy donors [60]. $CD56^{bright}$ NK cells are up to 60% positive for CCR7 [83] and represents around 95% of the lymph node NK cells [85], while only 5% of $CD56^{dim}$ NK cells are $CCR7^{+}$ [83]. Our data also confirmed that around 5% of the $CD56^{dim}$ express CCR7 at baseline, and that this small population, with probably an intermediary mature phenotype, seems to be also sequestered within the lymph nodes during treatment.

Further, we observed that the fraction of CX_3CR1^{+} NK cells is also diminished during treatment (supplementary Fig. 1). We previously showed that CX_3CR1 is expressed on mature NK cells [86] and that MS patients have a reduced proportion of circulating CX_3CR1^{+} NK cells, although increased frequency of peripheral CX_3CR1^{+} NK cells correlates with an enhanced MS activity [40]. Since most of the patients of our cohort were stable during the study, the decreasing CX_3CR1 levers might reflect the therapy success.

We also measured a decrease in the frequency of NKp46 and DNAM-1 in peripheral blood. DNAM-1 decrease in fingolimod treated patients might result in a reduced anti-tumour capacity. In MS patients, a reduced ability to kill activated $CD4^{+}$ T-cells via activation of DNAM-1 is described [41]. DNAM-1^{+} NK cells enriched within the SLT may kill even more efficiently those autoreactive T cells [41]. In the context of our study, the decrease of DNAM-1 in the peripheral blood could be explained by the shift of NK cells towards a fully differentiated [87] or even exhausted [88] profile. Both markers, DNAM-1 and NKp46, play an important role in the innate immune response against human cytomegalovirus infected dendritic cells; NKp46 is furthermore involved in recognition and defence of several other viruses [89–92]. A relative reduction of these receptors in the peripheral blood might lead to a higher susceptibility of fingolimod treated patients for viral infections.

Further, using the flow cytometry data combined with an unsupervised clustering, we identified 15 NK cell clusters that changed in frequency during fingolimod therapy and compared these alterations in responders and non-responders. Although the sample size is very limited, we decided to conduct an exploratory analysis based on response to provide a basis for comparison with studies that reported on associations between certain NK cell subtype and clinical outcome. We confirmed a significant reduction in the ratio of $CD56^{bright}$ clusters and an alteration in two specific $CD56^{dim}$ NK cell clusters (MC4, 11) (Fig. 5). During treatment only the fraction of MC4 increased, while MC11 decreased significantly (Fig. 6A). Compared to MC11, MC4 is characterized by a low expression of CD56, CD94, NKG2A, and NKG2D, but a higher expression of CD16 and KIR. These results indicate that MC4 may represent a fully mature or even exhausted cluster predominant in

fingolimod treated patients, while MC11 represents an intermediate mature MC, which decreased with the treatment.

In our GEE analysis, no correlation was observed between MC4 and treatment response or clinical outcomes. However, we did observe an association between an increased frequency of $CD56^{dim}CD94^{low}$ (characteristic for MC4 and MC8) and a lower number of infections. $CD56^{dim}CD94^{low}$ cells are cells with great capacities to produce intracellular perforin and granzyme B [78]. In the same line, decreased $CD56^{bright}$ and $CD56^{dim}CD94^{low}$ frequencies were inversely associated with an increased number of relapses. These results are certainly interesting but need further validation due to small patient numbers in our study.

In our cluster analysis, $CD56^{bright}$ frequency was higher at baseline in patients considered as non-responders compared to those considered as responders. However, after fingolimod-treatment, frequencies of $CD56^{bright}$ and $CD56^{dim}$ were comparable in both groups; thus, the decrease in $CD56^{bright}$ MCs and accordingly the increase in $CD56^{dim}$ fraction were more pronounced in the non-responder patients (Fig. 6). Although these data are preliminary due to the limited sample size, they may indicate that a strong treatment-related reduction of the $CD56^{bright}$ cell fraction is associated with the lack of response. In fingolimod treated patients, high frequency of the $CD56^{bright}$ fraction has been associated with stable magnetic resonance imaging [64] and also with response, using an achieved NEDA(no evidence of disease activity)-3 and NEDA-4 status as response criteria [65]. An association between $CD56^{bright}$ cells and reduced relapse rate has been also observed in MS patients during late pregnancy [93]; and in patients treated with daclizumab, $CD56^{bright}$ increase predicted a reduced number of gadolinium enhancing lesions [54]. Thus, our data may also suggest that an increased fraction of circulation $CD56^{bright}$ could be associated with treatment benefits in MS [64]. $CD56^{bright}$ NK cells that are not reaching the blood are probably captured in the SLT [63]. Accumulation of $CD56^{bright}$ in the SLT could facilitate interactions with T cells and dendritic cells [94, 95]. Moreover, the high IL-7 expression within the SLT may promote NK cell surveillance [96]. It is therefore conceivable that $CD56^{bright}$ can be safely stored within SLT and regulate locally adaptive autoimmune response, or exit the SLT strengthened when needed in the periphery. The latter possibly happens in patients who benefit from fingolimod treatment, as they show a lower decrease of $CD56^{bright}$ cells in the peripheral blood during treatment [64]. Furthermore, SLT is described as a compartment of NK cell maturation [97, 98]. Thus, the arrest of NK cells in SLT might lead to further maturation of these cells.

Our data suggest an increased frequency of fully differentiated or even "exhausted" long-lived NK cells in the circulation of fingolimod-treated MS patients in the peripheral blood. Interestingly, although the limited amount of patient's material did not allow to perform functional tests in vitro, the profile of this NK cell cluster predominant in fingolimod treated patients resembles the phenotype described in elderly healthy people. With age, $CD56^{dim}$ NK cell fraction and the expression of KIR increase [99–102], while the $CD56^{bright}$ fraction and expression of NKG2A and CD94 decrease [101, 103]. In addition, and also in line with our results, a reduction in NKp46 and DNAM-1 has also been observed during age [100, 102, 104], while CD16 expression remains unchanged [103, 105]. This phenotype reflects a NK cell subgroup with diminished NK cytotoxicity that may underline the high risk of infections observed in fingolimod-treated patients and also in elderly people [102, 106, 107]. Furthermore, it is imaginable that an enhanced fraction of "exhausted" $CD56^{dim}$ NK cells may be accompanied by a diminished proportion of detrimental subtypes, contributing to an overall benefit for MS. However, further studies are needed to verify this hypothesis.

The small number of patients included in our study represents an important limitation, which has an impact on the power of our calculations, the balance on the selection of participants, and the detection of small but statistically significant changes. Therefore, the conducted statistic should be understood as exploratory data analysis, and therefore, all p-values should be considered as exploratory ones. Moreover, our study design does not permit to establish causal relationships between changes affecting NK cells and the treatment, since those changes could just reflect the natural MS progression. Another important limitation is that the study lacks an untreated MS control cohort, which, due to ethical reasons, was unfeasible in a 12-months longitudinal study. However, confirming our estimations, other studies comparing effects with cohorts of untreated patients or healthy controls did present similar NK cell alterations exclusively in fingolimod treated patients [60, 61, 63, 65]. On the other side, due to the longitudinal character of our study, samples were frozen after the different visits to permit the simultaneous analysis of all time points of each single patient. This may have advantages in reducing experimental errors, but has the disadvantage that absolute cell accounts cannot be determined. Changes in population's frequency could be due to redistribution rather than depletion or emergence of particular subpopulations.

In conclusion, our study indicates that fingolimod not only affects the balance between $CD56^{dim}$ and $CD56^{bright}$ NK cells, but also seems to promote a shift to elderly NK cell clusters, which are probably less functional. Along with the well-described effects of fingolimod on the adaptive immune response, this impact on the innate response may support the increased risk of tumour development [108] and/or infections observed in fingolimod-treated patients. No association between a certain NK cell subtype and the treatment response could be demonstrated in this pilot study.

Nevertheless, our data suggests an association between the frequency of cytotoxic $CD56^{dim}CD94^{low}$ NK cells and lower infection risk.

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at https://doi.org/10.1007/s13311-021-01078-7.

Acknowledgements We thank Matthias Streitz from the Institute of Medical Immunology and from the Center for Regenerative Therapies (Charité and BIH) and Bibiane Seeger from the Institute of Medical Immunology and ECRC for the technical support.

Required Author Forms Disclosure forms provided by the authors are available with the online version of this article.

Funding Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL. This study was supported by a grant from Novartis Pharma GmbH, Nürnberg, Germany (CFTY720DDE08T).

Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/.

References

1. Compston A, Coles A. Multiple sclerosis. The Lancet 2002;359:1221-1231.
2. Dawson JW. The Histology of Disseminated Sclerosis. Edinb Med J 1916;17:229-241.
3. Lucchinetti C, Brück W, Parisi J, Scheithauer B, Rodriguez M, Lassmann H. Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination. Ann Neurol 2000;47:707-717.
4. Popescu BF, Lucchinetti CF. Pathology of demyelinating diseases. Annu Rev Pathol 2012;7:185-217.
5. Goverman J. Autoimmune T cell responses in the central nervous system. Nat Rev Immunol 2009;9:393-407.
6. Trapp BD, Peterson J, Ransohoff RM, Rudick R, Mörk S, Bö L. Axonal transection in the lesions of multiple sclerosis. N Engl J Med 1998;338:278-285.
7. Sospedra M, Martin R. Immunology of Multiple Sclerosis. Semin Neurol 2016;36:115-127.
8. Signori A, Saccà F, Lanzillo R, et al. Cladribine vs other drugs in MS: Merging randomized trial with real-life data. Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm 2020;7:e878.
9. Diem L, Daponte A, Findling O, et al. Dimethyl fumarate vs fingolimod following different pretreatments. Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm 2020;7:e660.
10. Cohen JA, Barkhof F, Comi G, et al. Oral fingolimod or intramuscular interferon for relapsing multiple sclerosis. N Engl J Med 2010;362:402-415.
11. Calabresi PA, Radue E-W, Goodin D, et al. Safety and efficacy of fingolimod in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis (FREEDOMS II): a double-blind, randomised, placebo-controlled, phase 3 trial. Lancet Neurol 2014;13:545-556.
12. Kappos L, Radue EW, O'Connor P, et al. A placebo-controlled trial of oral fingolimod in relapsing multiple sclerosis. N Engl J Med 2010;362:387-401.
13. Gehr S, Kaiser T, Kreutz R, Ludwig WD, Paul F. Suggestions for improving the design of clinical trials in multiple sclerosis-results of a systematic analysis of completed phase III trials. EPMA J 2019;10:425-436.
14. Matloubian M, Lo CG, Cinamon G, et al. Lymphocyte egress from thymus and peripheral lymphoid organs is dependent on S1P receptor 1. Nature 2004;427:355-360.
15. Gaengel K, Niaudet C, Hagikura K, et al. The sphingosine-1-phosphate receptor S1PR1 restricts sprouting angiogenesis by regulating the interplay between VE-cadherin and VEGFR2. Dev Cell 2012;23:587-599.
16. Jung B, Obinata H, Galvani S, et al. Flow-regulated endothelial S1P receptor-1 signaling sustains vascular development. Dev Cell 2012;23:600-610.
17. Lee MJ, Thangada S, Claffey KP, et al. Vascular endothelial cell adherens junction assembly and morphogenesis induced by sphingosine-1-phosphate. Cell 1999;99:301-312.
18. Igarashi J, Michel T. Sphingosine-1-phosphate and modulation of vascular tone. Cardiovasc Res 2009;82:212-220.
19. Blaho VA, Hla T. An update on the biology of sphingosine 1-phosphate receptors. J Lipid Res 2014;55:1596-1608.
20. EuropeanMedicinesAgency. Annex 1: Summary of product characteristics. In: European Medicines Agency [online]. Available at: https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/gilenya-epar-product-information_en.pdf. Accessed October 30, 2020.
21. Chun J, Hartung HP. Mechanism of action of oral fingolimod (FTY720) in multiple sclerosis. Clin Neuropharmacol 2010;33:91-101.
22. Cellerino M, Ivaldi F, Pardini M, et al. Impact of treatment on cellular immunophenotype in MS. A cross-sectional study Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm 2020;7:e693.
23. Jenne CN, Enders A, Rivera R, et al. T-bet-dependent S1P5 expression in NK cells promotes egress from lymph nodes and bone marrow. J Exp Med 2009;206:2469-2481.
24. Walzer T, Chiossone L, Chaix J, et al. Natural killer cell trafficking in vivo requires a dedicated sphingosine 1-phosphate receptor. Nat Immunol 2007;8:1337-1344.
25. Eken A, Yetkin MF, Vural A, et al. Fingolimod Alters Tissue Distribution and Cytokine Production of Human and Murine Innate Lymphoid Cells. Front Immunol 2019;10:217.
26. Lanier LL, Le AM, Civin CI, Loken MR, Phillips JH. The relationship of CD16 (Leu-11) and Leu-19 (NKH-1) antigen expression on human peripheral blood NK cells and cytotoxic T lymphocytes. J Immunol 1986;136:4480-4486.
27. Shi FD, Ljunggren HG, La Cava A, Van Kaer L. Organ-specific features of natural killer cells. Nat Rev Immunol 2011;11:658-671.
28. Sharma R, Das A. Organ-specific phenotypic and functional features of NK cells in humans. Immunol Res 2014;58:125-131.
29. Hamann I, Dörr J, Glumm R, et al. Characterization of natural killer cells in paired CSF and blood samples during neuroinflammation. J Neuroimmunol 2013;254:165-169.
30. Lünemann JD, Münz C. Do natural killer cells accelerate or prevent autoimmunity in multiple sclerosis? Brain 2008;131:1681-1683.
31. Lünemann A, Lünemann JD, Münz C. Regulatory NK-cell functions in inflammation and autoimmunity. Mol Med 2009;15:352-358.
32. Laroni A. Enhancing natural killer cells is beneficial in multiple sclerosis – Yes. Mult Scler J 2019;25:510-512.

33. Liu Q, Shi FD. Enhancing natural killer cells is beneficial in multiple sclerosis - No. Mult Scler J 2019;25:512-513.
34. Benczur M, Petranyl GG, Palffy G, et al. Dysfunction of natural killer cells in multiple sclerosis: a possible pathogenetic factor. Clin Exp Immunol 1980;39:657-662.
35. Uchida A, Maida EM, Lenzhofer R, Micksche M. Natural killer cell activity in patients with multiple sclerosis: interferon and plasmapheresis. Immunobiology 1982;160:392-402.
36. Hirsch RL, Johnson KP. The effect of recombinant alpha 2-interferon on defective natural killer cell activity in multiple sclerosis. Neurology 1985;35:597-600.
37. Munschauer FE, Hartrich LA, Stewart CC, Jacobs L. Circulating natural killer cells but not cytotoxic T lymphocytes are reduced in patients with active relapsing multiple sclerosis and little clinical disability as compared to controls. J Neuroimmunol 1995;62:177-181.
38. Kastrukoff LF, Morgan NG, Zecchini D, et al. A role for natural killer cells in the immunopathogenesis of multiple sclerosis. J Neuroimmunol 1998;86:123-133.
39. Kastrukoff LF, Lau A, Wee R, Zecchini D, White R, Paty DW. Clinical relapses of multiple sclerosis are associated with 'novel' valleys in natural killer cell functional activity. J Neuroimmunol 2003;145:103-114.
40. Infante-Duarte C, Weber A, Kratzschmar J, et al. Frequency of blood CX3CR1-positive natural killer cells correlates with disease activity in multiple sclerosis patients. FASEB J 2005;19:1902-1904.
41. Gross CC, Schulte-Mecklenbeck A, Runzi A, et al. Impaired NK-mediated regulation of T-cell activity in multiple sclerosis is reconstituted by IL-2 receptor modulation. Proc Natl Acad Sci U S A 2016;113:E2973-2982.
42. Morse RH, Séguin R, McCrea EL, Antel JP. NK cell-mediated lysis of autologous human oligodendrocytes. J Neuroimmunol 2001;116:107-115.
43. Backström E, Chambers BJ, Ho EL, et al. Natural killer cell-mediated lysis of dorsal root ganglia neurons via RAE1/NKG2D interactions. Eur J Immunol 2003;33:92-100.
44. Saikali P, Antel JP, Newcombe J, et al. NKG2D-mediated cytotoxicity toward oligodendrocytes suggests a mechanism for tissue injury in multiple sclerosis. J Neurosci 2007;27:1220-1228.
45. Lagumersindez-Denis N, Wrzos C, Mack M, et al. Differential contribution of immune effector mechanisms to cortical demyelination in multiple sclerosis. Acta Neuropathol 2017;134:15-34.
46. Plantone D, Marti A, Frisullo G, et al. Circulating CD56dim NK cells expressing perforin are increased in progressive multiple sclerosis. J Neuroimmunol 2013;265:124-127.
47. Liu Q, Sanai N, Jin WN, La Cava A, Van Kaer L, Shi FD. Neural stem cells sustain natural killer cells that dictate recovery from brain inflammation. Nat Neurosci 2016;19:243-252.
48. Kastrukoff LF, Morgan NG, Zecchini D, et al. Natural killer cells in relapsing-remitting MS: effect of treatment with interferon beta-1B. Neurology 1999;52:351-359.
49. Saraste M, Irjala H, Airas L. Expansion of CD56Bright natural killer cells in the peripheral blood of multiple sclerosis patients treated with interferon-beta. Neurol Sci 2007;28:121-126.
50. Vandenbark AA, Huan J, Agotsch M, et al. Interferon-beta-1a treatment increases CD56bright natural killer cells and CD4+CD25+ Foxp3 expression in subjects with multiple sclerosis. J Neuroimmunol 2009;215:125-128.
51. Tahrali I, Kucuksezer UC, Akdeniz N, et al. CD3(-)CD56(+) NK cells display an inflammatory profile in RR-MS patients. Immunol Lett 2019;216:63-69.
52. Acar NP, Tuncer A, Ozkazanc D, et al. An immunological and transcriptomics approach on differential modulation of NK cells in multiple sclerosis patients under interferon-β1 and fingolimod therapy. J Neuroimmunol 2020;347:577353.
53. Bielekova B, Catalfamo M, Reichert-Scrivner S, et al. Regulatory CD56(bright) natural killer cells mediate immunomodulatory effects of IL-2Ralpha-targeted therapy (daclizumab) in multiple sclerosis. Proc Natl Acad Sci U S A 2006;103:5941-5946.
54. Sheridan JP, Zhang Y, Riester K, et al. Intermediate-affinity interleukin-2 receptor expression predicts CD56(bright) natural killer cell expansion after daclizumab treatment in the CHOICE study of patients with multiple sclerosis. Mult Scler J 2011;17:1441-1448.
55. Jalosinski M, Karolczak K, Mazurek A, Glabinski A. The effects of methylprednisolone and mitoxantrone on CCL5-induced migration of lymphocytes in multiple sclerosis. Acta Neurol Scand 2008;118:120-125.
56. Chanvillard C, Millward JM, Lozano M, et al. Mitoxantrone induces natural killer cell maturation in patients with secondary progressive multiple sclerosis. PLoS One 2012;7:e39625.
57. Sand KL, Knudsen E, Rolin J, Al-Falahi Y, Maghazachi AA. Modulation of natural killer cell cytotoxicity and cytokine release by the drug glatiramer acetate. Cell Mol Life Sci 2009;66:1446-1456.
58. Al-Falahi Y, Sand KL, Knudsen E, Damaj BB, Rolin J, Maghazachi AA. Splenic natural killer cell activity in two models of experimental neurodegenerative diseases. J Cell Mol Med 2009;13:2693-2703.
59. Gilmore W, Lund BT, Li P, et al. Repopulation of T, B, and NK cells following alemtuzumab treatment in relapsing-remitting multiple sclerosis. J Neuroinflammation 2020;17:189.
60. Johnson TA, Evans BL, Durafourt BA, et al. Reduction of the peripheral blood CD56(bright) NK lymphocyte subset in FTY720-treated multiple sclerosis patients. J Immunol 2011;187:570-579.
61. Kowarik MC, Pellkofer HL, Cepok S, et al. Differential effects of fingolimod (FTY720) on immune cells in the CSF and blood of patients with MS. Neurology 2011;76:1214-1221.
62. Rudnicka J, Czerwiec M, Grywalska E, et al. Influence of fingolimod on basic lymphocyte subsets frequencies in the peripheral blood of multiple sclerosis patients - preliminary study. Cent Eur J Immunol 2015;40:354-359.
63. Mehling M, Burgener A-V, Brinkmann V, et al. Tissue Distribution Dynamics of Human NK Cells Inferred from Peripheral Blood Depletion Kinetics after Sphingosine-1-Phosphate Receptor Blockade. Scand J Immunol 2015;82:460-466.
64. Caruana P, Lemmert K, Ribbons K, Lea R, Lechner-Scott J. Natural killer cell subpopulations are associated with MRI activity in a relapsing-remitting multiple sclerosis patient cohort from Australia. Mult Scler J 2017;23:1479-1487.
65. Moreno-Torres I, González-García C, Marconi M, et al. Immunophenotype and Transcriptome Profile of Patients With Multiple Sclerosis Treated With Fingolimod: Setting Up a Model for Prediction of Response in a 2-Year Translational Study. Front Immunol 2018;9:1693.
66. Lohmann L, Janoschka C, Schulte-Mecklenbeck A, et al. Immune Cell Profiling During Switching from Natalizumab to Fingolimod Reveals Differential Effects on Systemic Immune-Regulatory Networks and on Trafficking of Non-T Cell Populations into the Cerebrospinal Fluid—Results from the ToFingo Successor Study. Front Immunol 2018;9:1560.
67. Kaufmann M, Haase R, Proschmann U, Ziemssen T, Akgün K. Real World Lab Data: Patterns of Lymphocyte Counts in Fingolimod Treated Patients. Front Immunol 2018;9:2669.
68. Ghadiri M, Rezk A, Li R, et al. Pre-treatment T-cell subsets associate with fingolimod treatment responsiveness in multiple sclerosis. Sci Rep 2020;10:356.
69. Hjorth M, Dandu N, Mellergård J. Treatment effects of fingolimod in multiple sclerosis: Selective changes in peripheral blood lymphocyte subsets. PLoS One 2020;15:e0228380.
70. Angerer IC, Hecker M, Koczan D, et al. Transcriptome profiling of peripheral blood immune cell populations in multiple sclerosis

patients before and during treatment with a sphingosine-1-phosphate receptor modulator. CNS Neurosci Ther 2018;24:193-201.
71. Vaessen LMB, van Besouw NM, Mol WM, Ijzermans JNM, Weimar W. FTY720 treatment of kidney transplant patients: A differential effect on B cells, naïve T cells, memory T cells and NK cells. Transpl Immunol 2006;15:281-288.
72. Polman CH, Reingold SC, Banwell B, et al. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 Revisions to the McDonald criteria. Ann Neurol 2011;69:292-302.
73. Kurtzke JF. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). Neurology 1983;33:1444-1452.
74. Wu K, Mercier F, David OJ, Schmouder RL, Looby M. Population pharmacokinetics of fingolimod phosphate in healthy participants. J Clin Pharmacol 2012;52:1054-1068.
75. Van Gassen S, Callebaut B, Van Helden MJ, et al. FlowSOM: Using self-organizing maps for visualization and interpretation of cytometry data. Cytometry A 2015;87:636-645.
76. Brunner E, Domhof S, Langer F. Nonparametric Analysis of Longitudinal Data in Factorial Experiments: Wiley; 2002.
77. Kleiter I, Gahlen A, Borisow N, et al. Neuromyelitis optica: Evaluation of 871 attacks and 1,153 treatment courses. Ann Neurol 2016;79:206-216.
78. Yu J, Mao HC, Wei M, et al. CD94 surface density identifies a functional intermediary between the CD56bright and CD56dim human NK-cell subsets. Blood 2010;115:274-281.
79. Björkström NK, Riese P, Heuts F, et al. Expression patterns of NKG2A, KIR, and CD57 define a process of CD56dim NK-cell differentiation uncoupled from NK-cell education. Blood 2010;116:3853-3864.
80. Cossarizza A, Chang HD, Radbruch A, et al. Guidelines for the use of flow cytometry and cell sorting in immunological studies. Eur J Immunol 2017;47:1584-1797.
81. Cooper MA, Fehniger TA, Turner SC, et al. Human natural killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56(bright) subset. Blood 2001;97:3146-3151.
82. Chiba K, Yanagawa Y, Masubuchi Y, et al. FTY720, a novel immunosuppressant, induces sequestration of circulating mature lymphocytes by acceleration of lymphocyte homing in rats. I. FTY720 selectively decreases the number of circulating mature lymphocytes by acceleration of lymphocyte homing. J Immunol 1998;160:5037–5044.
83. Berahovich RD, Lai NL, Wei Z, Lanier LL, Schall TJ. Evidence for NK Cell Subsets Based on Chemokine Receptor Expression. J Immunol 2006;177:7833-7840.
84. Campbell JJ, Qin S, Unutmaz D, et al. Unique subpopulations of CD56+ NK and NK-T peripheral blood lymphocytes identified by chemokine receptor expression repertoire. J Immunol 2001;166:6477-6482.
85. Fehniger TA, Cooper MA, Nuovo GJ, et al. CD56bright natural killer cells are present in human lymph nodes and are activated by T cell–derived IL-2: a potential new link between adaptive and innate immunity. Blood 2003;101:3052-3057.
86. Hamann I, Unterwalder N, Cardona AE, et al. Analyses of phenotypic and functional characteristics of CX3CR1-expressing natural killer cells. Immunology 2011;133:62-73.
87. Stannard KA, Lemoine S, Waterhouse NJ, et al. Human peripheral blood DNAM-1(neg) NK cells are a terminally differentiated subset with limited effector functions. Blood Adv 2019;3:1681-1694.
88. Alvarez M, Simonetta F, Baker J, et al. Regulation of murine NK cell exhaustion through the activation of the DNA damage repair pathway. JCI Insight 2019;4:e127729.
89. Arnon TI, Achdout H, Lieberman N, et al. The mechanisms controlling the recognition of tumor- and virus-infected cells by NKp46. Blood 2004;103:664-672.
90. Mandelboim O, Lieberman N, Lev M, et al. Recognition of haemagglutinins on virus-infected cells by NKp46 activates lysis by human NK cells. Nature 2001;409:1055-1060.
91. Jarahian M, Watzl C, Fournier P, et al. Activation of natural killer cells by newcastle disease virus hemagglutinin-neuraminidase. J Virol 2009;83:8108-8121.
92. Diab M, Glasner A, Isaacson B, et al. NK-cell receptors NKp46 and NCR1 control human metapneumovirus infection. Eur J Immunol 2017;47:692-703.
93. Airas L, Saraste M, Rinta S, et al. Immunoregulatory factors in multiple sclerosis patients during and after pregnancy: relevance of natural killer cells. Clin Exp Immunol 2008;151:235-243.
94. Morandi B, Bougras G, Muller WA, Ferlazzo G, Münz C. NK cells of human secondary lymphoid tissues enhance T cell polarization via IFN-gamma secretion. Eur J Immunol 2006;36:2394-2400.
95. Bajénoff M, Breart B, Huang AY, et al. Natural killer cell behavior in lymph nodes revealed by static and real-time imaging. J Exp Med 2006;203:619-631.
96. Michaud A, Dardari R, Charrier E, Cordeiro P, Herblot S, Duval M. IL-7 enhances survival of human CD56bright NK cells. J Immunother 2010;33:382-390.
97. Freud AG, Keller KA, Scoville SD, et al. NKp80 Defines a Critical Step during Human Natural Killer Cell Development. Cell Rep 2016;16:379-391.
98. Freud AG, Becknell B, Roychowdhury S, et al. A Human CD34(+) Subset Resides in Lymph Nodes and Differentiates into CD56brightNatural Killer Cells. Immunity 2005;22:295-304.
99. Krishnaraj R. Senescence and cytokines modulate the NK cell expression. Mech Ageing Dev 1997;96:89-101.
100. Almeida-Oliveira A, Smith-Carvalho M, Porto LC, et al. Age-related changes in natural killer cell receptors from childhood through old age. Hum Immunol 2011;72:319-329.
101. Lutz CT, Moore MB, Bradley S, Shelton BJ, Lutgendorf SK. Reciprocal age related change in natural killer cell receptors for MHC class I. Mech Ageing Dev 2005;126:722-731.
102. Hazeldine J, Hampson P, Lord JM. Reduced release and binding of perforin at the immunological synapse underlies the age-related decline in natural killer cell cytotoxicity. Aging Cell 2012;11:751-759.
103. Hayhoe RPG, Henson SM, Akbar AN, Palmer DB. Variation of human natural killer cell phenotypes with age: Identification of a unique KLRG1-negative subset. Hum Immunol 2010;71:676-681.
104. Sanchez-Correa B, Gayoso I, Bergua JM, et al. Decreased expression of DNAM-1 on NK cells from acute myeloid leukemia patients. Immunol Cell Biol 2012;90:109-115.
105. Mariani E, Mariani AR, Meneghetti A, Tarozzi A, Cocco L, Facchini A. Age-dependent decreases of NK cell phosphoinositide turnover during spontaneous but not Fc-mediated cytolytic activity. Int Immunol 1998;10:981-989.
106. Facchini A, Mariani E, Mariani AR, Papa S, Vitale M, Manzoli FA. Increased number of circulating Leu 11+ (CD 16) large granular lymphocytes and decreased NK activity during human ageing. Clin Exp Immunol 1987;68:340-347.
107. Levy SM, Herberman RB, Lee J, et al. Persistently low natural killer cell activity, age, and environmental stress as predictors of infectious morbidity. Life Sci 1991;48:107-116.
108. Cohen JA, Tenenbaum N, Bhatt A, Zhang Y, Kappos L. Extended treatment with fingolimod for relapsing multiple sclerosis: the 14-year LONGTERMS study results. Ther Adv Neurol Disord 2019;12:1-16.

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Reproduced with permission from Springer Nature

Lebenslauf: Svenja Christine Schwichtenberg

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht

Komplette Publikationsliste

Schwichtenberg SC, Wisgalla A, Schroeder-Castagno M, Alvarez-González C, Schlickeiser S, Siebert N, Bellmann-Strobl J, Wernecke K-D, Paul F, Dörr J, Infante-Duarte C. Fingolimod Therapy in Multiple Sclerosis Leads to the Enrichment of a Subpopulation of Aged NK Cells. Neurotherapeutics. 2021;18(3):1783-97.

Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle von Herzen bei allen Menschen bedanken, ohne die das Erstellen dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Mein Dank gilt Prof. Carmen Infante Duarte, die mir während der gesamten Promotion unterstützend zur Seite stand. Zeitnahe Korrekturen von Texten, kurzfristige Treffen zur Vorbereitung auf Vorträge oder vor weiteren Experimenten, sowie die Förderung des Besuchs von Fortbildungen und Kongressen, sind nur einige ihrer unterstützenden Tätigkeiten, die ich sehr zu schätzen weiß.

Ebenso bin ich Dr. Jan Dörr und Prof. Friedemann Paul für ihre inhaltliche Unterstützung zu großem Dank verpflichtet. Beim gesamten Team am NeuroCure Clinical Research Center (NCRC), und bei Dr. Nadja Siebert und Dr. Judith Bellmann-Strobl im Besonderen, möchte ich mich für die praktische Durchführung der Erhebung der klinischen Daten bedanken.

Bei Prof. Klaus Wernecke bedanke ich mich für die spannenden Telefonate und den interessanten Austausch bezüglich statistischer Themen.

Besonders möchte ich auch Anne Wisgalla für die viele Zeit danken, in der sie mir Labormethoden zeigte und mir Denkanstöße für die nächsten Schritte des Projektes gab. Auch danke ich Daniel Brunotte-Strecker, Rafaela Vieira Da Silva, Maria Eugenia Schröder Castagno, César Alvarez González und allen Gruppenmitgliedern der AG Infante Duarte für die vielen produktiven Ideen bezüglich des Projektes, der angenehmen gemeinsamen Zeit im Labor und den schönen Mittagpausen.

Bei Natalie Asselborn, Bibiane Seeger und Maja Olszewska bedanke ich mich für technische sowie laborbezogene Unterstützung. Ein besonderer Dank gilt Matthias Streitz für die Hilfe im Bezug auf durchflusszytometrische Fragen und Stephan Schlickeiser für die Hilfe im Bezug auf die Nutzung von Cytobank.

Mein ganz persönlicher Dank gilt meinen Eltern, Geschwistern und meinem Freund sowie guten Freunden für die vielen aufbauenden und motivierenden Worte und konstruktiven Ratschläge.

Schließlich möchte ich auch allen Patientinnen und Patienten danken, die in die Teilnahme dieser Studie eingewilligt haben.