

Masterarbeit

Untersuchung von B-Zell-vermittelten  
Veränderungen in humanen *in vitro*  
Astrozytenkulturen bei Multipler Sklerose

*Zur Erlangung des akademischen Grades*

*Master of Science (M.Sc.)*

*An der Freien Universität Berlin*

Tess Kühl

Erstellt am Experimental and Clinical Research Center der Charité Campus Buch

Im Fachbereich Biologie, Chemie und Pharmazie

Institut für Biologie

Eingereicht in Berlin am 08.11.2023

Erstgutachter: PD Dr. Volker Siffrin

Neuroimmunologie am Experimental and Clinical Research Center

Lindenberger Weg 80 in 13125 Berlin

Zweitgutachter: Prof. Dr. Peter Robin Hiesinger

Neurogenetik an der Freien Universität Berlin

Königin-Luise-Straße 1-3 in 14195 Berlin



## **Selbstständigkeitserklärung**

Ich versichere hiermit, die Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und diese als solche kenntlich gemacht zu haben.

Berlin, den 08.11.2023

# Inhaltsverzeichnis

|   |           |
|---|-----------|
| Eidesstattliche Erklärung   | I         |
| Inhaltsverzeichnis  | II        |
| Abbildungsverzeichnis   | V         |
| Tabellenverzeichnis   | V         |
| Abkürzungsverzeichnis   | VI        |
| Zusammenfassung   | IX        |
| <b>1. Einleitung</b>  | <b>1</b>  |
| 1.1 Überblick über die Hintergründe und den Verlauf der Multiplen Sklerose (MS) | 1         |
| 1.1.2 Pathomechanismen der MS   | 2         |
| 1.1.3 Verlaufsformen  | 3         |
| 1.1.4 Rolle der Zytokine in MS  | 3         |
| 1.1.4.1 Interleukin-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )                                   | 4         |
| 1.1.4.2 Interleukin-6 (IL-6)  | 4         |
| 1.1.4.3 Interleukin-10 (IL-10)  | 5         |
| 1.1.4.4 Tumornekrosefaktor- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )                           | 6         |
| 1.1.4.5 Lymphotoxin- $\alpha$ (LT- $\alpha$ / TNF- $\beta$ )                    | 6         |
| 1.2 Definition und Funktionen von B-Zellen                                      | 7         |
| 1.2.1 Bedeutung der B-Zellen in der Pathophysiologie von MS                     | 8         |
| 1.3 Rolle der Astrozyten im zentralen Nervensystem (ZNS)                        | 10        |
| 1.3.1 Einfluss von Astrozyten auf die Entzündungsreaktionen bei MS              | 11        |
| 1.4 Therapiemöglichkeiten der MS  | 12        |
| 1.4.1 Immunmodulatoren  | 12        |
| 1.4.1.1 Glatirameracetat (Copaxone <sup>®</sup> )                               | 12        |
| 1.4.1.2 Beta-Interferone  | 13        |
| 1.4.2 Immunsuppressiva  | 13        |
| 1.4.2.1 Natalizumab (Tysabri <sup>®</sup> )                                     | 13        |
| <b>2. Zielsetzung</b>   | <b>14</b> |
| <b>3. Material und Methoden</b>   | <b>15</b> |
| 3.1 Material  | 15        |
| 3.1.1 Geräte  | 15        |
| 3.1.2 Verbrauchsmaterialien   | 15        |
| 3.1.3 Chemikalien und Reagenzien  | 16        |

|  |           |
|--|-----------|
| 3.1.4 Puffer und Kulturmedien  | 16        |
| 3.1.5 Kommerziell erhältliche Kits   | 18        |
| 3.1.6 Antikörper   | 19        |
| 3.1.7 Software   | 19        |
| 3.2 Methoden   | 20        |
| 3.2.1 Humane Periphere Mononukleäre Blutzellen (PBMNCs)  | 20        |
| 3.2.1.1 Isolierung von PBMNCs aus humanem Vollblut   | 20        |
| 3.2.2 B-Zellisolation aus PBMNCs   | 21        |
| 3.2.2.1 Expansion der B-Zellen   | 22        |
| 3.2.3 Astrozyten   | 23        |
| 3.2.4 Inkubation der Astrozyten mit B-Zellüberständen  | 23        |
| 3.2.5 Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) der B-Zellüberstände   | 23        |
| 3.2.6 Immunofluoreszenzfärbung und Mikroskopie   | 25        |
| 3.2.7 Bildauswertung   | 26        |
| 3.2.8 Zelllyse für die Gensequenzierung  | 27        |
| 3.2.9 Gensequenzierung   | 28        |
| 3.2.10 Statistische Auswertung   | 28        |
| <b>4. Ergebnisse</b>   | <b>29</b> |
| 4.1 Isolation, Aktivierung und Expansion der B-Zellen  | 29        |
| 4.2 Zytokinsekretion von B-Zellen  | 33        |
| 4.3 Einfluss von B-Zell-Überständen auf die Reaktivität und Morphologie der Astrozyten   | 35        |
| 4.4 Korrelationen von B-Zell-Zytokinsekretionen und der Expression von C3, Nestin und GFAP in Astrozyten   | 36        |
| 4.5 Veränderungen der Genexpression in Astrozyten nach Inkubation mit B-Zellüberständen  | 38        |
| <b>5. Diskussion</b>   | <b>44</b> |
| 5.1 Interpretation der Ergebnisse im Kontext vorhandener Literatur   | 44        |
| 5.1.1 Veränderungen der B-Zellanteile im peripheren Blut   | 44        |
| 5.1.2 Signifikante Unterschiede der Zytokinkonzentrationen in B-Zellüberständen von MS-Patienten bei verschiedenen Immun-Therapien und Expression der Epitope für Reaktivitätsmarker C3, Nestin und GFAP in mit B-Zellüberständen inkubierten Astrozyten | 44        |
| 5.1.3 Differentielle Genexpression in mit unterschiedlichen B-Zellüberständen behandelten Astrozyten   | 46        |
| 5.2 Stärken und Limitationen der durchgeführten Arbeit   | 47        |
| 5.3 Ausblick auf weiterführende Forschungsbereiche und klinische Anwendungen   | 48        |
| <b>Danksagung</b>  | <b>50</b> |
| <b>Referenzen</b>  | <b>51</b> |
| <b>Anhang</b>  | <b>66</b> |

## Abbildungsverzeichnis

|  |    |
|--|----|
| Abbildung 1: a) Prozentuale Anteile der gewonnenen B-Zellen und der PBMNCs nach BZI .....  | 30 |
| Abbildung 2: B-Zellkultur einer gesunden Kontrolle zu verschiedenen Zeitpunkten.....   | 31 |
| Abbildung 3: B-Zellkultur eines mit Tysabri® behandelten Patienten zu verschiedenen Zeitpunkten....  | 32 |
| Abbildung 4: B-Zellkultur eines mit IFN-β behandelten Patienten zu verschiedenen Zeitpunkten .....   | 32 |
| Abbildung 5: Zytokinkonzentrationen aus Überständen aktivierter B-Zellen .....   | 34 |
| Abbildung 6: Expression der Epitope der Reaktivitätsmarker C3, Nestin und GFAP in Astrozyten .....   | 36 |
| Abbildung 7: Signifikante Korrelationen der Zytokinsekretionen von IL-10, IL-1β und TNF-α.....   | 37 |
| Abbildung 8: Signifikante Korrelationen der Zytokinsekretionen von IL-6 und IL-1β aus B-Zellüberständen von MS-Patienten mit milder Krankheitsaktivität und der Epitop-Expression der Reaktivitätsmarker C3 und GFAP in Astrozyten.....          | 37 |
| Abbildung 9: Signifikante Korrelationen zwischen Zytokinsekretionen von IL-10 und IL-1β aus B-Zellüberständen von MS-Patienten mit hoher Krankheitsaktivität und der Epitop-Expression der Reaktivitätsmarker Nestin und GFAP in Astrozyten..... | 38 |
| Abbildung 10: Differentielle Genexpression von Astrozyten nach Inkubation mit B-Zellüberständen ...  | 39 |
| Abbildung 11: Heatmap der Top 50 regulierten Gene in Astrozyten nach Inkubation .....  | 40 |
| Abbildung 12: Heatmap der Top 50 regulierten Gene in Astrozyten nach Inkubation mit B-Zellüberständen gesunder Kontrollprobanden bzw. MS-Patienten.....  | 40 |
| Abbildung 13: Heatmap der Top 10 regulierten Gene in Astrozyten nach Inkubation von mit IFN-β behandelten MS Patienten stammenden B-Zellüberständen und gesunden Kontrollprobanden.....  | 41 |
| Abbildung 14: Heatmap der Top 10 regulierten Gene in Astrozyten nach Inkubation von mit Tysabri® behandelten MS Patienten stammenden B-Zellüberständen und gesunden Kontrollprobanden.....   | 42 |
| Abbildung 15: Heatmap der Top 10 regulierten Gene in Astrozyten nach Inkubation von mit Copaxone® behandelten MS Patienten stammenden B-Zellüberständen und gesunden Kontrollprobanden.....  | 43 |

## Tabellenverzeichnis

|   |    |
|---|----|
| Tabelle 1: Tabelle 1: Verdünnungen der Proben und der Standards mit ELISPOT für ELISA-Messungen | 25 |
| Tabelle 2: Anteile der B-Zellen von PBMNCs verschiedener Probanden/ Patienten .....             | 29 |

# Abkürzungsverzeichnis

|  |  |
|--|--|
| °C                                     | Grad Celsius   |
| BSA                                    | Rinder Serum Albumin (engl. <i>bovine serum albumin</i> )                        |
| BZM                                    | B-Zell-Medium  |
| C3                                     | Komplementfaktor C3  |
| cDNA                                   | komplementäre DNA (engl. <i>complementary DNA</i> )                              |
| CO <sub>2</sub>                        | Kohlenstoffdioxid  |
| DAPI                                   | 4',6-Diamidin-2-phenylindol  |
| DMEM                                   | Dulbecco's Modified Eagle's Medium   |
| DMSO                                   | Dimethylsulfoxid   |
| DNA                                    | Desoxyribonukleinsäure (engl. <i>deoxyribonucleic acid</i> )                     |
| DPBS <sup>++</sup> /DPBS <sup>--</sup> | Dulbecco's Phosphatgepufferte Salzlösung mit/ ohne Calcium- und Magnesiumchlorid |
| EDTA                                   | Ethylendiamintetraessigsäure   |
| EGF                                    | Epidermaler Wachstumsfaktor (engl. <i>epidermal growth factor</i> )              |
| FACS                                   | <i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i>                                       |
| FCS                                    | Fetales Kälberserum (engl. <i>fetal calf serum</i> )                             |
| FGF                                    | Fibroblasten-Wachstumsfaktor (engl. <i>fibroblast growth factor</i> )            |
| G                                      | Beschleunigung   |
| g                                      | Gramm  |
| GAPDH                                  | Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase   |
| GFAP                                   | Saures Gliafaserprotein (engl. <i>glial fibrillary acidic protein</i> )          |
| Glut                                   | Glutamat   |
| h                                      | Stunde (engl. <i>hour</i> )  |
| HEPES                                  | 2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperaziny)-ethansulfonsäure                            |

|              |   |
|--------------|---|
| hNSC         | Humane Neuronale Stammzellen (engl. <i>human neural stem cells</i> )  |
| IFN- $\beta$ | Interferon- $\beta$   |
| IL-10        | Interleukin-10  |
| IL-1 $\beta$ | Interleukin-1 $\beta$   |
| L-Glutamin   | L-Glutaminsäure-5-amid  |
| LT- $\alpha$ | Lymphotoxin- $\alpha$ / Tumornekrosefaktor- $\beta$   |
| M            | Molar   |
| MACS         | <i>Magnetic Activated Cell Sorting</i>  |
| MAP-2        | Mikrotubuli-assoziiertes Protein 2  |
| mg           | Milligramm  |
| min          | Minute  |
| ml           | Milliliter  |
| mRNA         | Boten-RNA (engl. <i>messenger-RNA</i> )   |
| MS           | Multiple Sklerose   |
| n            | Anzahl der Stichproben  |
| ng           | Nanogramm   |
| nm           | Nanometer   |
| OD           | Optische Dichte   |
| PBMNCs       | Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (engl. <i>peripheral blood mononuclear cell</i> )                     |
| Pen/Strep    | Penicillin/Streptomycin   |
| PFA          | Paraformaldehyd   |
| qPCR         | Echtzeit-quantitative Polymerasekettenreaktion (engl. <i>Real Time Quantitative Polymerase chain reaction</i> ) |
| RNA          | Ribonukleinsäure (engl. <i>ribonucleic acid</i> )   |
| rpm          | Umdrehungen pro Minute (engl. <i>rounds per minute</i> )  |

|               |                              |
|---------------|------------------------------|
| RT            | Raumtemperatur               |
| TNF- $\alpha$ | Tumornekrosefaktor- $\alpha$ |
| $\mu$ l       | Mikroliter                   |
| $\mu$ M       | Mikromolar                   |

## Zusammenfassung

Die Pathophysiologie der Multiplen Sklerose basiert auf zahlreichen zellulären und humoralen Mechanismen, welche unter anderem T- und B-Lymphozyten, Mikroglia und Astrozyten sowie eine Vielzahl pro- und anti-inflammatorischer Zytokine, wie IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und IL-10, umfassen. Bei diesen Mechanismen handelt es sich sowohl um periphere als auch unmittelbar das ZNS betreffende Akteure und Mediatoren, welche in einem wechselseitigen Austausch zueinanderstehen. Die zugrundeliegenden Prinzipien dieser Wechselwirkung sind teilweise bekannt; gleichzeitig gibt es bedeutende Unklarheiten in Bezug auf die Verbindungen und Zusammenhänge, welche hinter den Pathomechanismen der MS stehen. So ist in jüngerer Zeit unter anderem die bislang unterschätzte Rolle der B-Lymphozyten in den Fokus der MS-Forschung gerückt. Es gilt, den Einfluss von B-Zellen auf die Pathophysiologie dieser Autoimmunerkrankung zu untersuchen und auf mögliche Korrelationen zur neuroimmunologischen Relevanz, u.a. ihre Wirkung auf Astrozyten, zu prüfen. In dieser Arbeit wurden dafür elf MS-Patienten mit unterschiedlichen Krankheitsverläufen (5x mild ; 6x hochaktiv) und unter Anwendung verschiedener immunmodifizierender Therapien (3x IFN- $\beta$  ; 2x Copaxone<sup>®</sup> ; 6x Tysabri<sup>®</sup>) sowie die passenden gesunden Kontrollprobanden rekrutiert. Mittels MACS wurden ihre B-Zellen aus den zuvor aus Vollblut gewonnenen PBMCs isoliert und für 48h inkubiert. Anschließend wurde ein Teil dieser Überstände erneut für 48h auf *in vitro* Astrozytenkulturen gegeben, um auf Epitop- und mRNA-Ebene einen möglichen Einfluss auf ihre Reaktivität zu untersuchen. Die restlichen B-Zellüberstände wurden für Zytokin-Konzentrationsmessungen mittels ELISA verwendet, um zu überprüfen, ob die Überstände der MS-Patienten im Vergleich zu jenen der gesunden Kontrollen Veränderungen in der Zytokinkonzentration aufweisen. Es konnten signifikante Zytokin-Hochregulationen von TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und IL-10 in B-Zellüberständen von mit Copaxone<sup>®</sup> behandelten Patienten detektiert werden. Parallel dazu konnte eine signifikant höhere Epitop-Expression des Reaktivitätsmarkers C3 in Astrozyten, welche mit von mit Copaxone<sup>®</sup> behandelten MS-Patienten stammenden B-Zellüberständen inkubiert wurden, beobachtet werden. Darüber hinaus konnten keine signifikanten Veränderungen der Epitop-Expressionen von Nestin und GFAP bzw. der Zytokinkonzentrationen in den anderen Patientengruppen (IFN- $\beta$  und Tysabri<sup>®</sup>) festgestellt werden.

Die Ergebnisse sprechen dafür, dass B-Lymphozyten von MS-Patienten eine erhöhte Zytokinsekretion sowie eine verstärkte Expression des Reaktivitätsmarker Komplementfaktor C3 bewirken können. Dieser reaktive Astrozytenphänotyp spiegelt sich auch auf der mRNA-Ebene wider: Hier konnte eine Hochregulation von mit Zellschädigung assoziierten Genen in mit B-Zellüberständen von MS-Patienten behandelten Astrozyten detektiert werden. Es lässt sich vermuten, dass der Erfolg der B-Lymphozyten-Depletion in der MS nicht nur auf der direkten Verhinderung der (Auto-) Antikörperproduktion basiert,

sondern, dass auf diese Weise auch ihr Beitrag als - u.a. zytokinproduzierende Zellen - zur Neuroinflammation, unterbunden wird.

## Abstract

The pathophysiology of multiple sclerosis is based on numerous cellular and humoral mechanisms, which include T and B lymphocytes, microglia, and astrocytes, as well as a variety of pro- and anti-inflammatory cytokines, such as IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , and IL-10. These mechanisms are both peripheral and directly CNS-related players and mediators that are in reciprocal exchange with each other. The underlying principles of these interactions are partially known; at the same time, there are significant uncertainties regarding the connections and interrelationships that lie behind the pathomechanisms of MS. Among other things, the previously underestimated role of B lymphocytes has recently become the focus of MS research. The aim is to investigate the influence of B cells on the pathophysiology of this autoimmune disease and to look for possible correlations to neuroimmunological relevance, including their effect on astrocytes. In this work, eleven MS patients with different disease courses (5x benign ; 6x highly active) and using different immunomodifying therapies (3x IFN- $\beta$  ; 2x Copaxone<sup>®</sup> ; 6x Tysabri<sup>®</sup>) as well as the matched healthy control subjects were recruited for this purpose. By MACS, their B cells were isolated from PBMCs previously obtained from whole blood and incubated for 48h. Subsequently, a portion of these supernatants was added to in vitro astrocyte cultures for 48h to investigate a possible influence on their reactivity at the epitope and mRNA level. The remaining B cell supernatants were used for cytokine concentration measurements by ELISA to check whether the supernatants from the MS patients showed changes in cytokine concentration compared with those from healthy controls. Significant cytokine upregulations of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-10 were detected in B cell supernatants from Copaxone<sup>®</sup> treated patients. In parallel, significantly higher epitope expression of reactivity marker C3 was observed in astrocytes incubated with B cell supernatants derived from MS patients treated with Copaxone<sup>®</sup>. In addition, no significant changes in epitope expressions of nestin and GFAP or cytokine concentrations were detected in the other patient groups (IFN- $\beta$  and Tysabri<sup>®</sup>). The results suggest that B lymphocytes from MS patients can cause increased cytokine secretion as well as increased expression of the reactivity marker complement factor C3. This reactive astrocyte phenotype is also reflected at the mRNA level, where upregulation of cell damage-associated genes could be detected in astrocytes treated with B cell supernatants from MS patients. It can be assumed that the success of B lymphocyte depletion in MS is not only based on the direct inhibition of (auto)antibody production, but maybe also on the prevention of their contribution to neuroinflammation as cytokine-producing cells.

# 1. Einleitung

## 1.1 Überblick über die Hintergründe und den Verlauf der Multiplen Sklerose (MS)

„There are 2.9 million people living with MS worldwide.“ So steht es auf der Startseite des *Atlas of MS* (1). Während die Zahl der weltweit an MS erkrankten Menschen im Jahr 2013 bei etwa 2,3 Millionen lag, stieg sie innerhalb der vergangenen zehn Jahre um 26,1% auf 2,9 Millionen an (1,2). Mögliche Gründe dafür sind auf der einen Seite das globale Wachstum, aber auch die besseren Diagnosemöglichkeiten durch die 2017 überarbeiteten McDonald-Kriterien (3–5). Die Multiple Sklerose (MS) ist eine Autoimmunerkrankung, die das zentrale Nervensystem (ZNS) betrifft und sich in einer Vielzahl neurologischer Symptome, u.a. Seh- und Sensibilitätsstörungen sowie Lähmungen widerspiegelt. Diese Symptomatik kann sich durch einen schubförmig remittierenden (*Relapsing Remitting MS, RRMS*) oder andauernden bzw. progredienten Verlauf (*Primary / Secondary Progressive MS, PPMS/SPMS*) auszeichnen (5). MS stellt eine der häufigsten chronisch-entzündlichen Erkrankungen des ZNS dar und betrifft vorwiegend junge Erwachsene (1,6). Frauen sind dabei etwa doppelt so häufig betroffen wie Männer (1,7,8). Trotz intensiver Forschung konnte die genaue Ursache der MS bis heute nicht vollends geklärt werden. Es werden ethnische und familiäre Zusammenhänge beobachtet; dennoch konnten Migrationsstudien zeigen, dass neben dieser genetischen Prädisposition auch zahlreiche Umweltfaktoren und-veränderungen wie Rauchen, Vitamin-D Mangel sowie eine Infektion mit dem Epstein-Barr Virus (EBV) die Anfälligkeit für MS deutlich erhöhen können (6,9–18). Bei letzterer kann das Risiko, an MS zu erkranken etwa 15 bis 30 mal höher sein als bei Menschen, die sich nie mit EBV infiziert haben (15,19). Auf immunologischer Ebene lässt sich festhalten, dass lange Zeit ein besonderes Augenmerk auf aktivierten T-Lymphozyten lag, die die Blut-Hirn-Schranke (BBB, *engl. blood brain barrier*) passieren und so zur Neuroinflammation im ZNS beitragen können. Jedoch gibt es zunehmend Hinweise auf einen signifikanten Einfluss von B-Lymphozyten sowie Zellen des angeborenen Immunsystems auf die Erkrankung (7,20). Therapien, wie die B-Zell-Depletion, konnten signifikante Verbesserungen für den akuten Verlauf der MS zeigen (21–24).

Die aktuellen Erkenntnisse sprechen somit dafür, dass eine Kombination aus genetischen, immunologischen und Umweltfaktoren entscheidend für die Entstehung und den Verlauf der Krankheit ist (20).

### 1.1.2 Pathomechanismen der MS

Im Folgenden werden einige der wichtigsten Mechanismen, die an der Pathogenese der MS beteiligt sind, exemplarisch dargestellt.

- (a) Autoimmunreaktion: Bei der MS greifen autoreaktive Immunzellen direkt das Myelin im ZNS bzw. die Oligodendrozyten an, was in der Folge zur Entzündung und Schädigung des Myelins (Demyelinisierung) führt und sich klinisch durch charakteristische Läsionen und Narben in den betroffenen Bereichen des ZNS zeigt (25–28). Diese können sowohl in der weißen als auch in der grauen Substanz auftreten (29,30).
- (b) Neuroinflammation: Entzündliche Prozesse spielen eine zentrale Rolle in der MS. Aktivierte Zellen des Immunsystems, insbesondere T- und B-Lymphozyten, sekretieren u.a. proinflammatorische Chemokine und Zytokine, die eine verstärkte autoimmun-vermittelte Entzündungsreaktion und eine weitere Schädigung des Myelins sowie der Neurone begünstigen (31,32).
- (c) Schädigung der Blut-Hirn-Schranke (BBB): Die BBB dient als anatomische und physiologische Barriere zwischen Blut und dem ZNS. Sie reguliert physiologisch den Eintritt von löslichen Substanzen aus dem Blutkreislauf in das Gehirn, ebenso wie die Permeabilität für Immunzellen (33,34). Diese ist unter physiologischen Bedingungen stark eingeschränkt, um die Homöostase im ZNS aufrechtzuerhalten (35). Bei der MS kann es zu einer Störung der BBB kommen, was zu einer erhöhten Durchlässigkeit für proinflammatorische sowie zytotoxische Mediatoren und dadurch zu einer erleichterten Migration der Immunzellen in das ZNS führt, wo die Neuroinflammation weiterhin verstärkt wird (35,36).
- (d) Aktivierung von Gliazellen: Astrozyten und Mikroglia sind essenziell für eine Regulierung der Immunantwort sowie für die Erhaltung eines physiologischen Milieus im ZNS. Bei der MS werden diese Gliazellen in einen aktivierten, reaktiven Zustand versetzt und können so ebenfalls durch die Sekretion proinflammatorischer Zytokine zur Neuroinflammation und Gewebeschädigung beitragen (37,38).
- (e) Neurodegeneration: Die unter anderem durch die Neuroinflammation bedingte Schädigung des Myelins kann im progressiven Verlauf zur axonalen Schädigung (7,39) und damit verbundener progressiver neuronaler Dysfunktion sowie zu dem Verlust von Nervengewebe und damit einhergehenden, anhaltenden neurologischen und kognitiven Beeinträchtigungen führen (32,40).

Es ist hervorzuheben, dass die genannten Mechanismen nicht scharf voneinander abgegrenzt werden können, sondern fließend ineinander übergehen und sich gegenseitig begünstigen, sodass man sie als eine selbst-replizierende feedback loop sehen kann.

### 1.1.3 Verlaufsformen

MS wird häufig als „Krankheit mit den 1000 Gesichtern“ bezeichnet. Dies ist darauf zurückzuführen, dass sowohl die Symptomatik als auch der Therapieerfolg der Betroffenen stark variieren (1,41). Die Erkrankung kann- wie in 1.1. erwähnt – basierend auf dem klinischen Verlauf in drei Subtypen eingeteilt werden. In den meisten Fällen (85-90%) handelt es sich dabei um die schubförmig-remittierende MS (RRMS) (42). Sie zeichnet sich durch akute symptomatische Episoden aus (*relapses*), die von stabilen Phasen unterschiedlicher Dauer (*remissions*) durchsetzt sind (42). In diesen Phasen können sich die Symptome teilweise bis vollständig zurückbilden (43). Etwa 25% der von RRMS betroffenen Patienten entwickeln nach circa zehn Jahren eine (sekundär) progressive Form der MS (SPMS); nach 20 Jahren sind es circa zwei Drittel der Betroffenen (43). Der Übergang zur SPMS ist klinisch nicht genau festgelegt und vollzieht sich graduell (43). Charakterisiert ist sie durch eine stetige Verschlechterung der neurologischen Funktionen.

Die primäre progrediente Form (PPMS) betrifft 10-15% der an MS erkrankten Personen (42). Sie ist – wie die SPMS- durch eine sukzessive Verschlechterung der neurologischen Fähigkeiten gekennzeichnet, jedoch setzt diese von Beginn an ein und ist unabhängig von akuten, symptomatischen Schüben (42,44). Allgemein lässt sich festhalten, dass MS als „Two-Stage Disease“, also „2-Phasen-Erkrankung“ gesehen werden kann (45). Dabei ist die Neuroinflammation im ZNS die eine und die-degeneration die zweite Phase. Während vor allem bei der RRMS die aktiven inflammatorischen Läsionen im ZNS im Vordergrund stehen, überwiegt die neurodegenerative Komponente bei den progredienten Verlaufsformen (7,45,46). Entgegen der Annahme, dass die Neurodegeneration sekundär auf die -inflammation folgt, konnte gezeigt werden, dass neurodegenerative Prozesse auch in frühen Phasen der MS auftreten, was ein Hinweis darauf sein könnte, dass es sich möglicherweise um von der Neuroinflammation und Demyelinisierung unabhängige Pathomechanismen handelt (31,43,47).

### 1.1.4 Rolle der Zytokine in MS

Zytokine sind kleine (15-20 kDa), lösliche Proteine, die als wesentliche Regulatoren der Immunantwort und der Koordination von Entzündungsprozessen dienen. Darüber hinaus sind sie als Signalmoleküle unter anderem für das Zellwachstum und die -differenzierung, Angiogenese, Hämatopoese und an neuronalen Vorgängen sowie für die Erhaltung der Homöostase von essenzieller Bedeutung (48–50). Sie werden von nahezu allen kernhaltigen Zellen des Körpers sekretiert und ermöglichen eine autokrine oder interzelluläre (para- oder endokrine) Kommunikation über rezeptorvermittelte Signalkaskaden (49,51). Aufgrund struktureller Ähnlichkeiten und Spezifitäten der Rezeptoren können Zytokine in distinkte Zytokinfamilien eingeteilt werden (52). Verschiedene Zytokine können einen verstärkenden,

mindernden oder antagonistischen Effekt auf ein und denselben biologischen Prozess haben (53). Klinisch auffällige - sowohl erhöhte als auch verminderte - Zytokinlevel können Indikatoren für verschiedenste (chronische) Erkrankungen darstellen und unterstreichen damit ihre physiologische Relevanz (53).

#### 1.1.4.1 Interleukin-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )

Interleukin-1 $\beta$  ist ein proinflammatorisches Zytokin der IL-1 Familie, welches vor allem von Immunzellen wie Monozyten und Makrophagen sezerniert wird (54–56). Es wird nach Kontakt mit Pathogen- oder Schaden-assoziierten molekularen Mustern (*PAMPs / DAMPs, pathogen / damage associated molecular patterns*) über *pattern-recognition receptors (PRRs)* als inaktive Vorstufe (pro-IL-1 $\beta$ ) produziert und erst nach einem erneuten Kontakt mit diesen durch Caspase-1 zur aktiven Form des IL-1 $\beta$  modifiziert und folgend sezerniert (55,57). Diese Prozessierung geschieht durch das Inflammasom. Dabei handelt es sich um einen Multiproteinkomplex, bestehend aus einem PRR, welcher inflammatorische Signale detektieren kann; einem Adapterprotein, welches eine Caspase-Rekrutierungs- und Aktivierungsdomäne (ASC) aufweist und einer Caspase, welche letztlich das pro-IL-1 $\beta$  zur aktiven Form modifizieren kann (55,58,59). IL-1 $\beta$  kann sowohl auf angeborene als auch erworbene Immunantworten wirken, indem es die T-Zell-Reifung als auch die B-Zell-Proliferation beeinflusst (60). Darüber hinaus scheinen verschiedene Zytokine der IL-1 Familie (IL-1, IL-18, IL-33) für neuroinflammatorische Erkrankungen des ZNS von Bedeutung zu sein (56,61). Ferner konnte gezeigt werden, dass proinflammatorische Astrozyten bei Infektionen durch die Überexpression von IL-1 zu einem Ungleichgewicht der Neurogenese führen können (56,62).

#### 1.1.4.2 Interleukin-6 (IL-6)

Bei Interleukin-6 handelt es sich um ein Zytokin, welches überwiegend als proinflammatorisch betrachtet wird (63). Es gehört zur IL-6 Familie und wurde erstmalig als *B-cell stimulatory factor 2* (BSF-2) kloniert, welcher die Immunglobulinproduktion in B-Zellen induziert (64,65). Da IL-6 unter anderem ebenfalls eine signifikante Rolle in der Hämatopoese, Inflammation, bei Immunreaktionen und im Gehirn spielt, lässt sich dessen pleiotroper Effekt auf verschiedene biologische Prozesse im Körper erkennen (65–68). Nachdem die Zellen das Zytokin sezerniert haben, bindet es an den IL-6 Rezeptor (IL-6R). Daraufhin bindet der entstandene Komplex an ein weiteres Rezeptorprotein (Glykoprotein 130 kDa, gp130) und initiiert dadurch die intrazelluläre Signalkaskade (65). Geschieht dies über einen membrangebundenen Rezeptor (mIL-6R), handelt es sich um den klassischen Signalweg. Erfolgt die Bindung hingegen durch einen löslichen IL-6R (sIL-6R), handelt es sich um den Trans-Signalweg (68,69).

Während gp130 nur in membrangebundener Form vorliegen und von allen Körperzellen exprimiert werden kann, findet sich mL-6R nur auf wenigen Zelltypen, wie Hepatozyten und Leukozyten. Da IL-6 nur an IL-6R, nicht aber an gp130 binden kann, deutet dies darauf hin, dass nur distinkte Zellen direkt durch IL-6 stimuliert werden können (63,65,68,69). IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  können Transkriptionsfaktoren zur IL-6 Produktion aktivieren und durch eine *feed-forward loop* dessen Amplifikation verstärken (68,70). Unter physiologischen Bedingungen wird die IL-6 Expression sowohl transkriptionell als auch posttranskriptionell streng reguliert, da die übermäßige Produktion zu inflammatorischen Erkrankungen führen kann (69,71,72). Für die systemisch inflammatorischen Zytokine IL-1 $\beta$ , IL-6 und TNF- $\alpha$  konnten stark erhöhte Level in chronisch-entzündlichen Erkrankungen beobachtet werden (60,69,72–74). Ferner scheinen sie an der Initiation von inflammatorischen Reaktionen im Gehirn und dessen Fortdauer beteiligt zu sein (61,70,73–75).

#### 1.1.4.3 Interleukin-10 (IL-10)

Interleukin-10 ist ein zentraler Mediator bei anti-inflammatorischen Prozessen der angeborenen sowie erworbenen Immunantwort (76). Es wurde zunächst als ein von T<sub>H</sub>2-Zellen produziertes Zytokin beschrieben, welches die Zytokinproduktion von T<sub>H</sub>1-Zellen inhibiert (77). Außerdem wird es unter anderem von Eosinophilen, Makrophagen, Monozyten, Neutrophilen, CD8<sup>+</sup> T-Zellen, B-Zellen sowie Mikroglia produziert (78–81). PBMNCs von unbehandelten MS-Patienten scheinen ein vermindertes IL-10 Level zu sezernieren (82). IL-10 übt seine Wirkung über den gleichnamigen Rezeptor (IL-10R) aus, welcher sich aus der hauptsächlich auf Leukozyten vorhandenen Untereinheit IL-10R $\alpha$  und der ubiquitär exprimierten Untereinheit IL-10R $\beta$  zusammensetzt (76,78). Die durch IL-10 induzierte intrazelluläre Signalkaskade führt durch die Aktivierung des Transkriptionsfaktors STAT3 zur Transkription und Expression der anti-inflammatorischen Genprodukte (78,83). Diese sind für die Homöostase in verschiedenen Geweben von essenzieller Bedeutung, da sie während einer Infektion oder Entzündungsreaktion eine übermäßige Immunantwort supprimieren und eine physiologische Umgebung aufrechterhalten können (76,78,84). Ebenso kann IL-10 die Produktion proinflammatorischer Zytokine durch Mikroglia im ZNS inhibieren und damit eine übermäßige Inflammation der Astrozyten verringern sowie diese zur Produktion des ebenfalls anti-inflammatorischen *Transforming growth factor*  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) stimulieren (81,85–87). Ferner wurde IL-10 mit einem erhöhten Überleben der Neurone nach Schädigungen und der Regulierung der Neurogenese in Verbindung gebracht (78,88,89). Da sowohl Astrozyten und Mikroglia als auch Neurone IL-10R bzw. IL-10 exprimieren bzw. sezernieren, machen diese Beobachtungen die wichtige Rolle des IL-10- nicht nur für die unmittelbare Immunreaktion, sondern auch für die interzelluläre Kommunikation- im ZNS deutlich (78,81,86).

#### 1.1.4.4 Tumornekrosefaktor- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )

Tumornekrosefaktor- $\alpha$  ist ein potentes proinflammatorisches Zytokin der TNF-Superfamilie, welches durch seine pleiotropen Eigenschaften eine Vielfalt physiologischer, immunologischer sowie neurologischer Prozesse moduliert (90–94). Namensgebend war dessen Eigenschaft, den Rückgang bzw. die Nekrose von Tumoren zu induzieren (95,96). Es wird hauptsächlich von aktivierten Makrophagen, natürlichen Killerzellen und Lymphozyten sezerniert (97,98). Neuroimmunologisch stellen auch Astrozyten, Mikroglia und Neurone eine Quelle für TNF- $\alpha$  im ZNS dar (61,75,99). TNF- $\alpha$  existiert in membrangebundener sowie löslicher Form und übt seine Wirkung durch die TNF-Rezeptoren TNFR1 und TNFR2 aus (97,100). Während TNFR1 in allen Geweben zu finden ist, wird TNFR2 hauptsächlich von Immunzellen exprimiert (97). Die durch die TNF-Rezeptoren vermittelten intrazellulären Signalkaskaden können verschiedene Reaktionen zur Folge haben: Inflammation, Immunabwehr gegen Pathogene, Apoptose sowie die Proliferation und das Überleben der Zielzelle (97,101). Dieses breite Reaktionsspektrum kann den pleiotropen Effekt von TNF- $\alpha$  und dessen Relevanz für eine funktionierende Immunreaktion deutlich machen. Kommt es jedoch zu einer übermäßigen TNF- $\alpha$  Produktion, kann dies schädliche Wirkungen zur Folge haben und eine Hauptkomponente für die Pathogenese verschiedener Autoimmunerkrankungen, wie chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen (97,102,103) oder rheumatoider Arthritis (97,104) sein. Auch für Autoimmunerkrankungen des ZNS, wie MS (105–107), spielt TNF- $\alpha$  eine wichtige Rolle: TNF- $\alpha$  scheint die Permeabilität der BBB zu erhöhen, sodass periphere Immunzellen leichter in das ZNS gelangen und wiederum weitere Entzündungsmediatoren rekrutieren können (90,108,109). Zuvor physiologisch funktionierende Astrozyten, Mikroglia und Neurone können durch diesen Stress aktiviert werden und beginnen, selbst abnorme Mengen TNF- $\alpha$  zu produzieren und unterstützen damit fortwährend die Infiltration weiterer Leukozyten (90,107,110).

#### 1.1.4.5 Lymphotoxin- $\alpha$ (LT- $\alpha$ / TNF- $\beta$ )

Lymphotoxin- $\alpha$  bzw. Tumornekrosefaktor- $\beta$  gehört, so wie TNF- $\alpha$ , zur TNF-Superfamilie. Es besitzt ähnliche inflammatorische Eigenschaften wie TNF- $\alpha$  und wurde erstmals als ein von aktivierten Lymphozyten produziertes Zytokin, welches Tumorzellen abtötet, beschrieben (107,111,112). Durch die Bestimmung der Aminosäuresequenzen und der Beobachtung, dass TNF- $\alpha$  und LT- $\alpha$  mit hoher Affinität an die gleichen Rezeptoren binden, konnte gezeigt werden, dass es sich bei ihnen um homologe Proteine handelt (112–114). Darüber hinaus kann LT- $\alpha$  mit schwächerer Affinität ebenfalls an HVEM (*herpes virus entry mediator*) binden (115,116). LT- $\alpha$  wird unter anderem von  $T_{H1}$ -Zellen,  $CD8^+$  Zellen sowie natürlichen Killerzellen und B-Lymphozyten sezerniert und spielt bei der Entwicklung und Funktion des Immunsystems und der lymphatischen Organe eine wichtige Rolle (116,117). Außerdem hat es durch die regulatorischen Eigenschaften eine signifikante Bedeutung für inflammatorische Prozesse sowie

Autoimmunreaktionen (116,118–121). Trotz der genannten Gemeinsamkeiten von TNF- $\alpha$  und LT- $\alpha$ , werden auch deutliche Unterschiede beschrieben: In T-Lymphozyten konnte für TNF- $\alpha$  eine hohe Baseline-Transkriptionsrate beschrieben werden, welche sich durch die Aktivierung der T-Zellen noch weiter verstärkt. Die Halbwertszeit von TNF- $\alpha$  liegt bei circa 30 min. Im Gegensatz dazu, konnte unter physiologischen Umständen keine mRNA von LT- $\alpha$  detektiert werden. Diese wurde erst nach der Aktivierung der T-Lymphozyten messbar; stieg jedoch auch dann nicht auf das Niveau von TNF- $\alpha$ . Die Halbwertszeit von LT- $\alpha$  liegt mit 5,5h etwa elfmal höher als die von TNF- $\alpha$  und kann damit als stabiler betrachtet werden (121,122). Diese Erkenntnisse zeigen, auch wenn beide Zytokine Ähnlichkeiten in der Primärstruktur besitzen und um die gleichen Rezeptoren kompetetieren, distinkte Unterschiede in ihrer molekularen Regulation, sogar innerhalb derselben Zelle (121,123).

## 1.2 Definition und Funktionen von B-Zellen

B-Lymphozyten sind zusammen mit den T-Zellen ein grundlegender Teil der erworbenen Immunabwehr. Die Vorläufer beider Populationen haben ihren Ursprung im Knochenmark. Während T-Zellen zur weiteren Entwicklung in den Thymus wandern, verbleiben die B-Lymphozyten dafür im Knochenmark. Danach migrieren sie als unreife B-Zellen, welche ausschließlich IgM-Rezeptoren exprimieren, in die sekundären lymphatischen Organe, wo sie sich zu reifen B-Zellen entwickeln. Als reife B-Zellen exprimieren sie neben IgM- auch IgD-Immunglobuline auf ihrer Oberfläche. B-Lymphozyten sind die einzigen Zellen des Körpers, welche Antikörper produzieren können, und sind daher die wesentlichen Vermittler der humoralen Immunantwort. Um eine adäquate Immunantwort über ihre Rezeptoren (BCR, *b cell receptor*) vermitteln zu können, müssen B-Zellen eine Vielzahl verschiedener BCRs exprimieren können. Nur dann ist es ihnen möglich, effektiv verschiedene Antigene zu detektieren und zu binden. Um dieses breite Repertoire zu gewährleisten, durchlaufen B-Lymphozyten mehrere Entwicklungsstadien, in welchen die variablen genetischen Segmente der BCRs unterschiedlich angeordnet und verknüpft werden (V-(D)-J-Rekombination). Die B-Zelle exprimiert dann eine Vielzahl eines hochspezifischen BCRs bzw. membrangebundenen Antikörpers auf ihrer Oberfläche. Wenn dieser das spezifische Antigen bindet, wird die B-Zelle aktiviert und der BCR-Antigen-Komplex wird mittels Endozytose von ihr aufgenommen und in seine Peptide zerlegt. Die B-Zelle präsentiert dann das entsprechende Antigen über MHC-II auf ihrer Oberfläche, an welches T<sub>H</sub>-Zellen ebenfalls über ihren Rezeptor (TCR, *t cell receptor*) sowie über CD40L an CD40R binden können, was die Aktivierung der B-Zelle verstärkt. Dadurch kommt es zur Proliferation der B-Zellen. Darüber hinaus findet hierbei die somatische Hypermutation statt, bei welcher durch das Einsetzen zufälliger Punktmutationen in der V-Region für eine noch stärkere Affinität für das entsprechende Antigen selektiert wird. Diese Zellen durchlaufen einen *class switch* ihres BCR zu IgA, IgE oder IgG. Danach differenzieren sie zu Antikörper-

sezernierenden Plasmazellen oder langlebigen B-Gedächtniszellen. Plasmazellen sezernieren den hochaffinen Antikörper und können so die Antigene selbst durch das Blocken ihrer Bindungsstellen neutralisieren oder durch Opsonierung fremde Antigene für Makrophagen oder Granulozyten markieren, um die Phagozytose zu erleichtern. Ferner können Antikörper die Komplementkaskade initiieren und so das angeborene Immunsystem aktivieren. B-Gedächtniszellen hingegen können ein gleiches Antigen bei einem erneuten Kontakt schneller erkennen und somit eine schnellere und effizientere Immunreaktion initiieren (124,125).

### 1.2.1 Bedeutung der B-Zellen in der Pathophysiologie von MS

Im Gegensatz zur früheren Annahme, dass T-Zellen die zentrale Rolle für die Entstehung und den Verlauf der MS spielen, ist sich die Wissenschaft heutzutage einig, dass B-Zellen einen ebenso wesentlichen Faktor für die Pathophysiologie und die Immunregulation bei MS darstellen (126). Bei über 90% der RRMS-Patienten sind oligoklonale Banden (OKB) im Liquor vorzufinden (127–129). Dabei handelt es sich um Ansammlungen verschiedener Immunglobuline. Dieses übermäßige Vorkommen von Antikörpern im ZNS ist ein klassisches diagnostisches Merkmal für die MS und zeigt erste Hinweise auf ein Mitwirken der B-Zellen an der Erkrankung (129). Ferner wurden gegen das Myelin sowie gegen Neurone und Astrozyten gerichtete Autoantikörper in ZNS-Läsionen gefunden (129–131). Eine damit verbundene Aktivierung des Komplementsystems, welche zur weiteren Schädigung der Zellen beitragen kann, konnte ebenfalls gezeigt werden (131). Außerdem können aus dem Liquor von MS-Patienten stammende Plasmazellen Autoantikörper sezernieren, welche Astrozyten in Explantatkulturen aktivieren können (131).

Es ist jedoch unklar, ob die zugrundeliegenden B-Zellen erst im ZNS reifen oder als in der Peripherie gereifte B-Zellen ins ZNS migrieren. In molekularen Analysen der variablen Immunglobulin-Region von B-Zellen konnte gezeigt werden, dass es sich bei ihnen um Klone handelt, welche sowohl im ZNS als auch in der Peripherie zu finden sind, was für einen bidirektionalen Austausch zwischen dem ZNS und dem peripheren Blut spricht (129,132,133). Mögliche Wege für diesen bidirektionalen Transport ist neben der Blut-Hirn-Schranke (BBB) die Blut-Liquor-Schranke (BLB, *blood liquor barrier*). Beide dienen als selektive Barriere zwischen dem peripheren Blut und dem ZNS. Während die BBB durch ihre morphologische Struktur definiert wird, wird die BLB durch ihre Funktion definiert; sie beschreibt das Verhältnis der Proteinkonzentration zwischen Blut und Liquor (134). Periphere Immunzellen sind auch unter physiologischen Bedingungen zur Immunüberwachung in geringer Zahl im ZNS vorzufinden. Der Eintritt ins ZNS ist jedoch streng reguliert und besteht aus mehreren Schritten, welche durch verschiedene Mediatoren vermittelt werden müssen. Unter anderem sind Integrine sowie

Adhäsionsmoleküle wie ICAM1 und ICAM2 zur Extravasation nötig. Diese sind bei MS-Patienten stark erhöht und könnten dazu beitragen, den Eintritt von peripheren Leukozyten ins ZNS zu erleichtern (129,135–137). Eine weitere Beobachtung, die diese These festigt, ist, dass das Zelladhäsionsmolekül ALCAM (*activated leukocyte cell adhesion molecule*) die B-Zell Migration über die BBB ins ZNS unterstützt und im peripheren Blut und Läsionen im Gehirn von MS-Patienten ebenfalls in erhöhter Konzentration vorliegt (136,138).

B-Lymphozyten sind neben ihrer Rolle als Antikörper-produzierende Zellen außerdem an der Antigenpräsentation für T-Zellen und ihrer Aktivierung im ZNS beteiligt (129,139). Es konnte gezeigt werden, dass B-Gedächtniszellen T-Zellen Neuro-Antigene präsentieren, die gegen Bestandteile des Myelins oder direkt gegen Neurone und Astrozyten gerichtet sind und so zur Neuroinflammation und -degeneration beitragen können (129,130,140–142).

Darüber hinaus sind B-Zellen an der Produktion pro- und anti-inflammatorischer Zytokine, wie IL-6 und TNF- $\alpha$  bzw. IL-10 und IL-35, im ZNS beteiligt (129,143–145). Analysen von Zytokinprofilen zeigen, dass innerhalb der B-Zell-Population naive B-Zellen die Hauptquelle für IL-10 sind und B-Gedächtniszellen hauptsächlich TNF- $\alpha$  und LT- $\alpha$  sezernieren (129,146). Letztere finden sich im Vergleich zu naiven B-Zellen vorwiegend im ZNS von MS-Patienten und könnten ein Faktor für das überwiegend proinflammatorische Zytokinprofil sein (129,133,146,147). Mikroglia und Astrozyten stellen eine weitere Zytokinquelle im ZNS dar: während der Neuroinflammation können sie unter anderem IL-6 und BAFF (*B cell activating factor*) produzieren, welche essenziell für die Aktivierung, Differenzierung und das Überleben von B-Zellen sind und in erhöhten Konzentrationen im Liquor von MS-Patienten gefunden werden konnten (129,148,149).

Der Erfolg von anti-CD20 (B-Lymphozytenantigen) Therapien bzw. der B-Zell Depletion zeigt deutlich, dass B-Zellen eine signifikante Rolle bei der Pathogenese und für die Fortdauer von MS-Schüben spielen (138,150–153). Auch wenn mit Hilfe der anti-CD20 Therapien die Krankheitsaktivität und die Zahl der *relapses* bei RRMS-Patienten erheblich abnehmen können, konnten Piccio *et al.* in labormedizinischen Untersuchungen zeigen, dass die IgG-Konzentration und die Zahl der oligoklonalen Banden im Liquor nach Rituximab-Behandlungen bestehen bleiben, während die Zahl der B-Zellen signifikant abgenommen hat bzw. nicht mehr detektiert werden konnte (138,154). Dies scheint dafür zu sprechen, dass B-Zellen nicht ausschließlich durch ihre Rolle als (Auto-)Antikörper-produzierende Zellen an der Erkrankung beteiligt sind, sondern auch durch Antikörper-unabhängige Mechanismen, wie der Produktion proinflammatorischer Zytokine, zur Entstehung und Fortdauer von MS beitragen (138).

### 1.3 Rolle der Astrozyten im zentralen Nervensystem (ZNS)

Gliazellen sind im Gehirn zu einem mindestens gleichen Teil wie Neurone zu finden (155–159). Neben Mikroglia und Oligodendrozyten sind Astrozyten der dritte Gliazelltyp im ZNS. Ursprünglich wurden sie als sternförmige Zellen beschrieben, jedoch besitzen sie sehr unterschiedliche Morphologien und sind auch darüber hinaus eine generell heterogene Zellpopulation (155,160). So definiert Kettenmann Astrozyten als „die Zellpopulation im Gehirn, die übrig bleibt, wenn man Neurone, Oligodendrozyten und Mikroglia abzieht“ (155). Astrozyten spielen eine Reihe wichtiger Rollen unter physiologischen sowie pathologischen Bedingungen. Sie sind die Glykogenspeicher des ZNS und versorgen die Neurone mit Metaboliten (155,161,162). Ferner fungieren sie als eine Art Puffer für Neurone, indem sie die extrazelluläre Kaliumkonzentration kontrollieren sowie überschüssiges, neurotoxisches Glutamat aufnehmen können (155). Darüber hinaus sind sie ein wesentlicher Bestandteil der BBB und das Verbindungselement für Blutgefäße und Neurone in der neurovaskulären Einheit (155,161). Sie sind in der Lage, Calciumsignale zu integrieren und so mit Axonen und Synapsen kommunizieren zu können (155,161). Es wird geschätzt, dass ein Astrozyt im Hippocampus oder Kortex mit 300- 600 Dendriten und bis zu 100 000 Synapsen assoziiert ist (161,163,164). Außerdem konnte gezeigt werden, dass Neurone ohne Astrozyten weniger Synapsen ausbilden (155,165). Dies macht die Bedeutung der Astrozyten für die Bildung und Stabilität der neuronalen Netzwerke deutlich. Astrozyten exprimieren zudem selbst verschiedene Neurotransmitterrezeptoren und können so auf neuronale Aktivität reagieren und wiederum selbst Neuro- bzw. Gliotransmitter, wie Glutamat oder GABA (*gamma-Aminobutyric acid*) sezernieren (155,166). Auch wenn bzw. gerade, weil Astrozyten eine Vielzahl physiologischer Funktionen erfüllen, stellen genau diese auch eine Vielzahl potenzieller Angriffspunkte für pathologische Mechanismen dar. Entstehen beispielsweise durch akute Traumata, Infektionen oder chronische Erkrankungen neuroinflammatorische Bedingungen, so lässt sich oft eine Veränderung der Morphologie der Astrozyten, die sogenannte Astroglie, beobachten (155,161,167). Dabei werden die Astrozyten hypertroph und befinden sich in einem reaktiven Zustand. Dieser Mechanismus kann von reversiblen Veränderungen der Morphologie und Genexpression bis hin zu einem chronischen Zustand und damit verbundener Narbenbildung reichen (161). Die Astroglie geht oft mit einer Hochregulation von GFAP (*Glial fibrillary acidic protein*) einher, welches als Biomarker für reaktive Astrozyten genutzt werden kann (155,161,168). Jedoch kann die Expression von GFAP auch von Astrozyten im gesunden ZNS dynamisch reguliert werden und korreliert nicht immer mit dem Grad der Astrozytenreaktivität (161,169). Des Weiteren können Astrozyten eine Vielzahl von Chemokinen und Wachstumsfaktoren sezernieren und gelten zusammen mit den Mikroglia als Hauptquelle für Zytokine, wie IL-1, IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$  und LT- $\alpha$ , im ZNS (37,61,155,170,171). Dadurch sind sie ebenfalls in der Lage, an der Modulation von Immunantworten im Gehirn mitzuwirken (61,75). Kommt es jedoch zu einer starken Unter- oder Überexpression der Astrozyten, kann dies zu neurodegenerativen Erkrankungen, wie der MS, beitragen

(61,172).

### 1.3.1 Einfluss von Astrozyten auf die Entzündungsreaktionen bei MS

Astrozyten scheinen eine multifunktionale Rolle für die Pathomechanismen in der MS zu spielen und können sowohl auf Neurone als auch auf Oligodendrozyten wirken (161,173). In ZNS-Läsionen lassen sich neben dem Verlust von Oligodendrozyten, der Demyelinisierung und Schädigung der Axone auch reaktive Astrozyten finden (174). Diese können je nach Art der Läsion (akut, inaktiv, aktiv, chronisch aktiv) verschiedene Phänotypen und Expressionsmuster aufweisen (173). Sogenannte uni- oder multinukleäre, hypertrophe Gemistozyten mit einer hohen GFAP-Expression oder Creutzfeld-Peters-Zellen, bei welchen es sich um große Astrozyten handelt, die eine Vielzahl kleiner Kernfragmente enthalten, konnten in Läsionen gefunden werden (161,174–176). Ferner konnte eine dichotome Reaktion der Astrozyten auf Schädigungen des ZNS beobachtet werden: Eine „milde“ Astrogliose bzw. „Aktivierung“ der Astrozyten ist vor allem während Reparaturmechanismen, wie der Remyelinisierung, im ZNS zu finden und dient primär dessen Schutz (173,177). Eine „starke“ Astrogliose bzw. reaktive Astrozyten scheinen diese Reparaturmechanismen eher zu verhindern und tragen zur Narbenbildung bei (173,177). Trotz der damit verbundenen Verminderung der Neuro-Regeneration, ist hervorzuheben, dass durch diesen Mechanismus gleichzeitig die Ausbreitung der Läsionen und eine sekundäre Schädigung der Neurone limitiert werden kann (173,177). Die sogenannte Emperipolese, also die Aufnahme eines Zelltyps (z.B. Lymphozyten) durch andere Zellen, konnte ebenfalls in Astrozyten beobachtet werden (161,178). Im Unterschied zur Phagozytose bleibt die aufgenommene Zelle bei der Emperipolese unversehrt. Ihre genaue Funktion für die Pathogenese der MS ist bislang jedoch unklar (161). Ein weiteres Merkmal für reaktive Astrozyten ist die verstärkte Sekretion neurotoxischer und proinflammatorischer Moleküle, wie Stickstoffmonoxid, IL-6 und GM-CSF (173,179,180). Letztere können durch die parallele Aktivierung der Mikroglia die Neuroinflammation weiter verstärken (173,180). Neben der entzündungsfördernden Komponente können reaktive Astrozyten darüber hinaus aufgrund ihrer eigenen Schädigung ihre physiologischen Funktionen nicht mehr adäquat erfüllen. So können sie beispielsweise Glutamat nicht in erforderlicher Menge aufnehmen, was zur Exzitotoxizität der Neurone führen kann (173,181,182). Ferner können sie ihre Pufferfunktion zur Kalium-Homöostase verlieren sowie eine Störung der BBB und eine damit erhöhte Permeabilität für periphere Immunzellen fördern (173). Diese Vielzahl inflammatorischer Prozesse generiert, wie anfangs erwähnt, eine in sich geschlossene *Feedback loop*, welche die vielen verschiedenen Pathomechanismen der MS vereint.

## 1.4 Therapiemöglichkeiten der MS

Trotz intensiver Forschungen ist der genaue Ursprung der MS bislang ungeklärt. Dennoch sind, wie oben genannt, einige potenzielle Pathomechanismen bekannt, an welchen verschiedene medikamentöse Therapieansätze angewandt werden können. Je nach Verlaufsform der Krankheit sind unterschiedliche Therapien möglich: Es wird je nach Schubfrequenz bzw. Symptomatik zwischen der verlaufsmodifizierenden, akuten und symptomatischen Therapie unterschieden (5,183). Bei letzterer handelt es sich um vielfältige Therapiemöglichkeiten, welche bereits bestehende Symptome bessern sollen. So können beispielsweise Symptome wie Fatigue oder kognitive Störungen einerseits durch nicht-medikamentöse Therapien, wie regelmäßiger körperlicher Belastung oder neuropsychologischem Funktionstraining, behandelt werden (5,184). Darüber hinaus umfasst die symptomatische Therapie auch medikamentöse Behandlungen, die unter anderem bei Symptomen wie Mobilitätsstörungen/ Spasmen (z.B. Fampridin, Baclofen und Cannabinoide) oder epileptischen Anfällen (z.B. Carbamazepin und Valproinsäure), eingesetzt werden (5,184).

Im Vergleich dazu kommt die akute Therapie bei einem aktuellen Schub zum Einsatz und wird typischerweise mittels Kortison-Stoß-Therapie verabreicht. Sollte sich hier keine Wirkung zeigen, besteht die Möglichkeit einer Plasmapherese (Blutwäsche), welche der Entfernung entzündungsfördernder Substanzen aus dem Blutkreislauf dient (5,185).

Im Gegensatz zur akuten Schubtherapie ist die verlaufsmodifizierende Therapie zur langfristigen Behandlung der MS geeignet. Sie soll die Schubfrequenz verringern sowie die aktiven Läsionen im ZNS und das Fortschreiten der Erkrankung eingrenzen (5,186). Die Therapie beruht auf zwei grundlegenden Mechanismen: der Immunmodulation und der Immunsuppression (5,186). Je nach Ausmaß bzw. Grad der Erkrankung wird die Therapie auf den Patienten abgestimmt.

### 1.4.1 Immunmodulatoren

Immunmodulatoren wirken, wie der Name sagt, modulierend bzw. regulierend auf das Immunsystem. Das heißt, dass die verschiedenen Mechanismen und Immunantworten möglichst gezielt modifiziert und in ein Gleichgewicht gebracht werden sollen, sodass die Autoimmunität limitiert wird. Dabei wird das Immunsystem allerdings nicht geschwächt bzw. supprimiert, sondern lediglich angepasst (186).

#### 1.4.1.1 Glatirameracetat (Copaxone®)

Glatirameracetat (GA) wird bei einer milden bis moderaten Form der schubförmig-remittierenden MS eingesetzt (5,186). Es ist ein aus vier Aminosäuren bestehendes, synthetisch hergestelltes

Eiweißmolekül, das Ähnlichkeit mit Komponenten des Myelins besitzt (5,187). Es kann die Anzahl der Schübe und Inflammationen im ZNS vermindern, jedoch ist der genaue Wirkmechanismus bislang ungeklärt (5). Es werden verschiedene Wirkweisen, wie eine Unterdrückung der autoreaktiven T-Zell-Aktivierung, oder dem Schaffen eines Gleichgewichts von pro- und anti-inflammatorischen Zytokinen diskutiert (5). Für PPMS hingegen konnten sich keine positiven Effekte für eine Verminderung der Progression finden (5,188).

#### 1.4.1.2 Beta-Interferone

Beta-Interferone kommen, wie GA, bei einem milden bis moderaten Verlauf der RRMS zum Einsatz. Ausgewählte Präparate können ebenfalls bei der SPMS verabreicht werden, falls weiterhin Schübe auftreten (5). Für eine Wirksamkeit bei PPMS liegen bislang keine zuverlässigen Belege vor (5). Interferone können durch ihre Funktion als Zytokin regulierend in die durch sie vermittelten Immunreaktionen eingreifen. Typ-I-Interferone besitzen neben der immunmodulierenden Wirkung ferner antivirale und antiproliferative Eigenschaften (5). Jedoch ist auch hier die genaue Wirkweise nicht vollständig geklärt (5).

#### 1.4.2 Immunsuppressiva

Immunsuppressiva können auch als eine Art Immunmodulatoren gelten, da sie ebenfalls modifizierend in das Immunsystem eingreifen. Allerdings dienen sie speziell dessen Unterdrückung und können als eine milde Form der Chemotherapie betrachtet werden (186). Dabei werden Immunzellen in ihrer Funktion supprimiert, um die pathologischen Effekte auf das ZNS zu verringern. Sie können relativ unspezifisch auf das gesamte Immunsystem wirken oder aber spezifisch gegen distinkte Komponenten gerichtet sein (5,186).

##### 1.4.2.1 Natalizumab (Tysabri®)

Bei Natalizumab handelt es sich um einen monoklonalen IgG4-Antikörper, welcher zur Behandlung von RRMS-Patienten mit einer hohen Krankheitsaktivität eingesetzt wird (5). Natalizumab bindet an das Oberflächenprotein  $\alpha 4\beta 1$ -Integrin, das insbesondere von Lymphozyten exprimiert wird. Dadurch wird die normalerweise stattfindende Bindung von VCAM1 an  $\alpha 4\beta 1$ -Integrin geblockt, sodass der Schlüsselmechanismus der Adhäsion und Einwanderung der Lymphozyten über die BBB ins ZNS, verhindert wird (5,189).

## 2. Zielsetzung

Bei der Multiplen Sklerose standen lange Zeit die T-Zellen als zelluläre Vermittler der Pathophysiologie im Fokus der Forschung. Daneben sind die Astrogliose, die Aktivierung von Mikroglia und das Ungleichgewicht von Zytokinsekretionen und -verhältnissen, zentrale Merkmale der Autoimmunerkrankung. Die Rolle der B-Zellen in der MS wurde eher als untergeordnet betrachtet und meist auf ihre Fähigkeit, (Auto-) Antikörper zu produzieren, reduziert (190). In den letzten Jahren zeigten jedoch immer mehr Studien, insbesondere die Erfolge der B-Zell-Depletion, dass die Relevanz von B-Lymphozyten für die MS, auch wenn ihre genaue Rolle noch nicht vollständig verstanden ist, deutlich unterschätzt wurde (23,190–192).

Ziel der Arbeit ist es, herauszufinden, ob B-Zellen von MS-Patienten mit unterschiedlichen Krankheitsverläufen (mild bzw. hochaktiv) und unter der Anwendung verschiedener immunmodifizierender Therapien (IFN- $\beta$ , Copaxone<sup>®</sup>, Tysabri<sup>®</sup>) unterschiedliche Zytokinprofile aufweisen. Dafür werden die Konzentrationen (primär) proinflammatorischer Zytokine IL-6, IL-1b, TNF- $\alpha$  und LT- $\alpha$  und das anti-inflammatorische IL-10 mittels ELISA betrachtet. Ferner soll überprüft werden, ob diese B-Zellüberstände einen reaktiven Astrozytenphänotyp induzieren können. Für die Beurteilung werden die Expressionen von Epitopen, welche als Reaktivitätsmarker dienen (C3, Nestin und GFAP) sowie die Genexpressionsmuster der behandelten Astrozyten analysiert.

## 3. Material und Methoden

### 3.1 Material

#### 3.1.1 Geräte

|  |  |
|--|--|
| Absaughilfe (VACUBOY)  | INTEGRA Biosciences™, Zizers, CH           |
| Elektrische Pipettierhilfe   | Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA |
| Fluoreszenzmikroskop (DMI16000B)   | Leica, Wetzlar                             |
| Gefrierschrank (-20°C)   | Liebherr, Bulle, CH                        |
| Gefrierschrank (-80°C) (MDF-U73V)  | Sanyo, Osaka, JP                           |
| Inkubator (CellXpert® C170)  | Eppendorf, Hamburg                         |
| Inverses Mikroskop (Eclipse TS100)   | Nikon, Minato, JP                          |
| Kühlschrank (4°C)  | Liebherr, Bulle, CH                        |
| MACS® MultiStand   | Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach    |
| Mikrotiterplatten-Gerät (SPECTRAFluor Plus)  | TECAN, Männedorf, CH                       |
| Neubauer-Zählkammer  | Carl Roth, Karlsruhe                       |
| Orbitalschüttler (PMS-1000)  | Grant Instruments, Shepreth, UK            |
| Pipetten (Research plus™)<br>(10µl, 20 µl, 200µl, 1000µl, 8-Kanal-Pipette 300<br>µl) | Eppendorf, Hamburg                         |
| QuadroMACS™ Separator  | Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach    |
| Sterilwerkbank (HERASAFE 2025)   | Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA |
| Stickstofftank (-150°C) (CryoPlus 2)   | Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA |
| Vortexmischer (Vortex Genie 2™)  | Bender & Hobein AG, Zürich, CH             |
| Wasserbad (GFL 1002)   | Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel   |
| Zentrifuge (ROTANTA 460 R)   | Hettich, Tuttlingen                        |

#### 3.1.2 Verbrauchsmaterialien

|   |  |
|---|--|
| Deckgläser (18x18)                        | Bellco, Vineland, NJ, USA                  |
| Eppendorf-Reaktionsgefäße (1,5ml und 2ml) | Eppendorf, Hamburg                         |
| Heparinröhrchen (5ml)                     | Greiner Bio-One, Kremsmünster, AUT         |
| Kryoröhrchen                              | Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA |
| LS Säulen                                 | Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach    |

|   |   |
|---|---|
| MultiWell-Platten (24- und 96-Well)             | Corning, Corning, NY, USA               |
| Nitrilhandschuhe                                | B. Braun, Melsungen                     |
| Parafilm®                                       | Amcors, Victoria, AUS                   |
| Pasteurpipetten aus Glas                        | Corning, Corning, NY, USA               |
| Pipettenspitzen (10µl, 20 µl, 200µl und 1000µl) | Sarstedt, Nümbrecht                     |
| Pre-Separation Filter (30 µm)                   | Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach |
| Serologische Pipetten (5ml, 10ml und 25ml)      | Corning, Corning, NY, USA               |
| Verschlussfolie für 96-Well-Platten             | Applied Biosystems®, Waltham, MA, USA   |
| Zentrifugenröhrchen, konisch (15ml und 50ml)    | Sarstedt, Nümbrecht                     |

### 3.1.3 Chemikalien und Reagenzien

|   |   |
|---|---|
| 2-Mercaptoethanol                                 | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA         |
| 2N H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (Schwefelsäure) | Carl Roth, Karlsruhe                      |
| BSA   | ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA |
| EDTA  | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA         |
| Ethanol   | Carl Roth, Karlsruhe                      |
| Lymphoprep™                                       | STEMCELL Technologies, Vancouver, CAN     |
| Penicillin/ Streptomycin                          | Gibco®, Waltham, MA, USA                  |
| Triton-X  | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA         |
| TWEEN® 20   | Merck, Darmstadt                          |

### 3.1.4 Puffer und Kulturmedien

|                        |   |
|------------------------|---|
| AB Serum               | Merck, Darmstadt                          |
| BamBanker™             | NIPPON Genetics Europe GmbH, Düren        |
| CNTF                   | Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach   |
| DMEM                   | ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA |
| FCS                    | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA         |
| GlutaMAX™-I Supplement | ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA |
| L-Glutamin             | Merck, Darmstadt                          |
| HEPES                  | ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA |
| N-2                    | ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA |
| PBS <sup>++</sup>      | ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA |

|   |   |
|---|---|
| PBS <sup>-</sup>                        | ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA |
| RPMI 1640                               | Gibco®, Waltham, MA, USA                  |
| StemMACS™ HSC Expansion Media XF, human | Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach   |

### PBMNC-Medium

| <u>Mischungskomponente</u> | <u>Stammkonzentration</u> | <u>Kulturkonzentration</u> |
|----------------------------|---------------------------|----------------------------|
| AB Serum                   | 100%                      | 2%                         |
| Hepes                      | 1M                        | 1%                         |
| L-Glutamin                 | 1x                        | 1%                         |
| Penicillin/Streptomycin    | 100%                      | 1%                         |
| RPMI 1640                  | 1x                        | 1x                         |

### B-Zell-Isolationspuffer

| <u>Mischungskomponente</u> | <u>Stammkonzentration</u> | <u>Kulturkonzentration</u> |
|----------------------------|---------------------------|----------------------------|
| BSA                        | 5%                        | 0,5%                       |
| EDTA                       | 100%                      | 2 mM                       |
| PBS                        | 1x                        | 1x                         |

### B-Zell-Expansionsmedium

| <u>Mischungskomponente</u> | <u>Stammkonzentration</u> | <u>Kulturkonzentration</u> |
|----------------------------|---------------------------|----------------------------|
| AB-Serum                   | 100%                      | 5%                         |
| CD40L                      | 0,5 mg/ml                 | 0,5 mg/ml                  |
| Crosslinking Antibody      | 1x                        | 1x                         |
| IL-4                       | 5x10 <sup>6</sup> IU/mg   | 10.000 IU/ml               |
| Penicillin/Streptomycin    | 100%                      | 1%                         |
| Stem MACS                  | 1x                        | 1x                         |

## Astrozyten-Medium

| <u>Mischungskomponente</u> | <u>Stammkonzentration</u> | <u>Kulturkonzentration</u> |
|----------------------------|---------------------------|----------------------------|
| D-MEM                      | 1x                        | 1x                         |
| GlutaMAX™-I Supplement     | 200mM                     | 2mM                        |
| N-2                        | 50x                       | 1%                         |
| Penicillin/Streptomycin    | 100%                      | 1%                         |
| FCS                        | 100%                      | 1%                         |
| CNTF                       | 50 µg/ml                  | 20 ng/ml                   |

## ELISA-Waschpuffer

| <u>Mischungskomponente</u> | <u>Stammkonzentration</u> | <u>Kulturkonzentration</u> |
|----------------------------|---------------------------|----------------------------|
| PBS <sup>-</sup>           | 1x                        | 1x                         |
| Tween™-20                  | 100%                      | 0,05%                      |

### 3.1.5 Kommerziell erhältliche Kits

| <u>Kit</u>   | <u>Hersteller</u>                       |
|--|---|
| B Cell Expansion Kit, human                              | Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach |
| DuoSet® Ancillary Reagent Kit 2                          | R&D Systems™, Minneapolis, MN, USA      |
| DuoSet® ELISA Human Lymphotoxin- $\alpha$ / TNF- $\beta$ | R&D Systems™, Minneapolis, MN, USA      |
| Human IL-1 beta Uncoated ELISA                           | Invitrogen, Carlsbad, CA, USA           |
| Human IL-6 Uncoated ELISA                                | Invitrogen, Carlsbad, CA, USA           |
| Human IL-10 Uncoated ELISA                               | Invitrogen, Carlsbad, CA, USA           |
| Human TNF alpha Uncoated ELISA                           | Invitrogen, Carlsbad, CA, USA           |
| Memory B Cell Isolation Kit, human                       | Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach |

### 3.1.6 Antikörper

| <u>Primärantikörper</u>                | <u>Verdünnung</u> | <u>Hersteller</u>                            |
|--|-------------------|--|
| hC3; Maus-Anti;<br>polyclonal          | 1:250             | Agilent, Santa Clara, CA, USA                |
| hGFAP; Maus-Anti;<br>polyclonal        | 1:250             | Agilent, Santa Clara, CA, USA                |
| hNestin; Kaninchen-Anti;<br>polyclonal | 1:250             | Santa Cruz Biotechnology, Dallas,<br>TX, USA |
| <u>Sekundärantikörper</u>              | <u>Verdünnung</u> | <u>Hersteller</u>                            |
| Alexa 488 Anti-Maus                    | 1:1000            | Invitrogen, Carlsbad, CA, USA                |
| Alexa 594 Anti-Kaninchen               | 1:1000            | Invitrogen, Carlsbad, CA, USA                |

### 3.1.7 Software

| <u>Software</u>                      | <u>Version</u> |
|--------------------------------------|----------------|
| Excel (Microsoft Office 365 ProPlus) | 2019           |
| <i>GraphPad Prism</i>                | 8.3.0          |
| ImageJ (Fiji)                        | 1.52t          |
| Magellan 6                           | 6.0.0          |
| R                                    | 4.3.1          |

## 3.2 Methoden

Alle Zellarbeiten wurden unter sterilen Bedingungen an einer Sterilwerkbank durchgeführt. Die verwendeten Materialien wurden vor ihrer Nutzung für 20 min. bei 121°C und 2 bar autoklaviert oder steril filtriert, sofern sie vom Hersteller nicht steril geliefert wurden. Die Zellkulturen wurden im Inkubator bei 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % Luftfeuchtigkeit kultiviert.

### 3.2.1 Humane Periphere Mononukleäre Blutzellen (PBMNCs)

Zur Durchführung der Experimente werden humane Periphere Mononukleäre Blutzellen (PBMNCs) von Patienten mit schubförmig-remittierender MS und entsprechenden gesunden Kontrollen genutzt. Die MS-Patienten werden zwischen milder (benign) und hoher (severe) Krankheitsaktivität unterschieden. Jene mit einer milden Aktivität werden mit Beta-Interferonen oder Glatirameracetat (Copaxone®) behandelt, wohingegen jene mit einer hohen Krankheitsaktivität Natalizumab (Tysabri®) verabreicht bekommen. Die gesunden Kontrollen sind auf die Patienten abgestimmt und stimmen in Alter (+/- 4 Jahre) und Geschlecht (alle weiblich) überein.

#### 3.2.1.1 Isolierung von PBMNCs aus humanem Vollblut

Um die B-Zellen aus dem Blut zu isolieren, muss in einem ersten Schritt das Blut mittels Dichtegradientenzentrifugation in seine verschiedenen Komponenten aufgetrennt werden. Aus den daraus entstandenen Schichten müssen anschließend die peripheren mononuklearen Blutzellen (engl.: *Peripheral Blood Mononuclear Cell, PBMNC*) abgenommen werden, um daraus in einem nächsten Schritt gezielt die B-Zellen für die folgenden Versuche zu isolieren.

Das Vollblut aus je drei Heparinröhrchen (á 5 ml) wird in ein 50 ml Falcon-Röhrchen überführt und mit PBS<sup>-</sup> auf 50 ml aufgefüllt. In zwei weitere Falcon-Röhrchen werden je 15 ml Lymphoprep vorgelegt, welches als Zellseparationsmedium dient. Darauf werden vorsichtig je 25 ml der zuvor angesetzten Blut/PBS Suspension geschichtet, sodass sich die Suspension nicht mit dem Lymphoprep vermischt. Es folgt die Dichtegradientenzentrifugation für 40 min. ohne Bremse bei 764 G und Raumtemperatur. Danach wird die Plasmaschicht bis zum Lymphozyten- bzw. PBMNC-Ring mit einer 10 ml-Pipette abgenommen und verworfen. Der PBMNC-Ring wird abgenommen und je zwei Ringe werden in ein neues Falcon-Röhrchen überführt. Dieses wird mit PBS<sup>-</sup> auf 50 ml aufgefüllt und für 20 min. bei 561 G und Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Falcon-Röhrchen mit 30 ml PBS<sup>-</sup> aufgefüllt und erneut für 15 min. bei 389 G und Raumtemperatur zentrifugiert. Danach folgt ein letzter Waschschrift mit 10 ml PBS<sup>-</sup> für 12 min. bei 250 G und Zimmertemperatur. Diese Waschschrift,

dienen der Entfernung des Zellseparationsmediums. Während der letzten Zentrifugation werden die Zellen mittels Neubauer-Zählkammer gezählt. Der Überstand wird verworfen und die Zellen in *Bambanker*-Medium aufgenommen, in welchem sie à  $5 \times 10^6 - 10^7$  Zellen/ ml bei  $-80^\circ\text{C}$  eingefroren werden. Die Langzeitlagerung erfolgt bei  $-150^\circ\text{C}$  im Stickstofftank.

### 3.2.2 B-Zellisolation aus PBMNCs

Um an die B-Zellen der Patienten und gesunden Kontrollprobanden zu gelangen, müssen diese aus den zuvor gewonnenen PBMNCs isoliert werden. Dies geschieht mittels magnetischer Zellseparation bzw. *Magnetic Activated Cell Sorting (MACS)*. Die B-Zellen werden anschließend zur Aktivierung und Expansion für 48h kultiviert. Für die optimalen Bedingungen der B-Zellkultur wurden vorab einige Vorversuche zur Etablierung dieser unternommen (s. Anhang). Das Prinzip des MACS basiert auf einer Antigen-Antikörper-Interaktion. Dabei werden die gewünschten Zellen über Antikörper-konjugierte Magnetpartikel (MicroBeads®) in einer Zellsuspension markiert und anschließend durch eine in einem starken Magnetfeld befindlichen Säule gegeben. Die mit den MicroBeads® markierten Zellen verbleiben in der Säule, während sich die restlichen, unmarkierten Zellen im Durchfluss befinden. Handelt es sich bei den markierten Zellen auch gleichzeitig um jene, welche für die folgenden Versuche benötigt werden, spricht man von einer positiven Selektion. Dient die Markierung jedoch dem Herausfiltern nicht benötigter Zellen, wird dies als negative Selektion bezeichnet. In diesem Fall werden demzufolge die unmarkierten Zellen aus dem Durchfluss für weitere Untersuchungen verwendet (negative Selektion).

Die B-Zell-Isolation erfolgt mit dem *Memory B Cell Isolation Kit* der Firma *Miltenyi Biotec*.

Die kryokonservierten PBMNCs werden in einem  $37^\circ\text{C}$  warmen Wasserbad zügig aufgetaut. Anschließend werden die Zellen aus den Kryoröhrchen in ein 15 ml Falcon-Röhrchen überführt und 5 ml PBMNC-Medium tropfenweise dazugegeben. Das Röhrchen wird vorsichtig geschwenkt, um das Medium gleichmäßig zu verteilen. Danach wird die Zellsuspension für 8 min. bei  $4^\circ\text{C}$  und 300 G zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen. Die Zellen (bis  $10^8$ ) werden in 400  $\mu\text{l}$  kaltem Puffer resuspendiert und anschließend durch einen 30  $\mu\text{m}$  Nylonfilter in ein neues Falcon-Röhrchen gegeben, damit möglichst keine Cluster vorhanden sind.

Im nächsten Schritt werden 100  $\mu\text{l}$  *B Cell Biotin-Antibody Cocktail* zur Zellsuspension hinzugegeben und für 10 min. auf Eis inkubiert. Durch diesen Schritt werden die non-B-Zellen, z.B. T-Zellen, natürliche Killerzellen, Monozyten, dendritische Zellen, Granulozyten, Thrombozyten und erythroide Zellen indirekt durch Biotin-konjugierte Antikörper markiert (CD2, CD14, CD16, CD36, CD43, CD235a). Danach werden 300  $\mu\text{l}$  Puffer sowie 200  $\mu\text{l}$  *Anti-Biotin MicroBeads* dazugegeben, die Zellsuspension resuspendiert und für weitere 15 min. auf Eis inkubiert. Dadurch binden die zuvor markierten Zellen an die magnetischen

anti-Biotin monoklonalen Antikörper-konjugierten *MicroBeads*.

Die Zellen werden mit 10 ml Puffer gewaschen und erneut zentrifugiert, der Überstand wird verworfen und die Zellen in 1000 µl frischem Puffer aufgenommen.

Eine MACS LD-Säule wird im magnetischen Feld des MACS Separators platziert und mit 2 ml Puffer gespült. Anschließend wird die Zellsuspension auf die Säule gegeben und in einem Falcon-Röhrchen aufgefangen. Nachdem die Suspension durch die Säule gelaufen ist, wird die Säule noch zweimal mit 1 ml Puffer gewaschen, um möglichst viele Zellen zu gewinnen. In dieser Fraktion befinden sich die unmarkierten B-Zellen.

Die durch magnetische *MicroBeads* markierten non-B-Zellen sind separiert von den B-Zellen in der Säule verblieben. Um diese zu erhalten, wird die Säule aus dem magnetischen Feld genommen, auf ein neues Falcon-Röhrchen überführt und 3 ml Puffer darauf gegeben. Direkt danach wird die Flüssigkeit mit einem Druckstempel durch die Säule gepresst, um die darin befindlichen non-B-Zellen herauszuwaschen. Diese werden anschließend gezählt. Die entsprechenden Anteile der B-Zellen und PBMNCs sind Tabelle 2 zu entnehmen.

#### 3.2.2.1 Expansion der B-Zellen

Die Expansion dient der Aktivierung der B-Zellen. Durch IL-4 und CD40L/ *crosslinking antibody* werden diese stimuliert und beginnen zu expandieren und Cluster zu bilden. Im aktivierten Zustand sekretieren B-Zellen verschiedene Zytokine, welche im Anschluss mittels ELISA gemessen und auf die Astrozyten gegeben werden.

Die Expansion der B-Zellen wird mit dem *B Cell Expansion Kit* der Firma *Miltenyi Biotec* durchgeführt. Die zuvor isolierten B-Zellen werden mittels Neubauer-Zählkammer gezählt und anschließend zentrifugiert; der Überstand wird verworfen. Danach werden die Zellen in frisch angesetztem Expansionsmedium aufgenommen und je 200.000 B-Zellen / *Well* in einer 96-*Well*-Platte ausgesät (entspricht  $10^6$  Zellen/ml). Das Medium enthält IL-4 sowie CD40L / *crosslinking antibody*, welche die B-Zellen aktivieren und ihre Expansion bewirken.

Die Zellen werden für insgesamt 48h im Inkubator kultiviert und zu den Zeitpunkten 2h, 24h und 48h werden mikroskopische Aufnahmen gemacht. Nach 48h wird der Überstand für die folgenden Versuche entnommen und bis zur Weiterverwendung bei -80°C gelagert.

### 3.2.3 Astrozyten

Für die Durchführung der Versuche werden h9-*derived* humane neurale Stammzellen (hNSC) genutzt, welche zuvor mit einem in jener Arbeitsgruppe etablierten 4-wöchigen Protokoll zu Astrozyten differenziert wurden (193).

### 3.2.4 Inkubation der Astrozyten mit B-Zellüberständen

Um zu überprüfen, ob die Zellüberstände der aktivierten B-Zellen einen Einfluss auf die Reaktivität der kultivierten Astrozyten haben, wird ein Teil der zuvor entnommenen Überstände auf die Astrozyten gegeben und für 48h inkubiert. Anschließend werden die Astrozyten für die folgende RNA-Isolation bzw. Immunofluoreszenzfärbung benötigt. Die Volumina der Überstände wurden so gewählt, dass B-Zellen und Astrozyten in einem Verhältnis von 1:1 stehen.

Auf die Astrozyten in der 24er-*Well* Platte werden in jedes *Well* 150µl des Überstands gegeben und mit 50µl BZM ergänzt, sodass sich ein Gesamtvolumen von 200µl ergibt. Die Menge von 150µl des B-Zellüberstands entspricht der Menge der Astrozyten in jedem *Well* (120.000).

Für die Astrozyten in der 16-*Well* Platte werden 31,25µl B-Zellüberstand in jedes *Well* gegeben. Dieser wird mit 8,75µl BZM ergänzt, sodass sich ein Gesamtvolumen von 40µl ergibt. Auch hier entspricht die Menge von 31,25µl des Überstands der Menge der Astrozyten pro *Well* (25.000).

Als Kontrolle werden die Astrozyten einerseits in ihrem Kultivierungsmedium (ADM) kultiviert. Auf eine weitere Kontrollgruppe wird B-Zellmedium, in welchem sich jedoch keine B-Zellen befanden, gegeben, um einen möglichen Effekt durch das B-Zellmedium per se feststellen zu können.

Die Astrozyten werden danach für 48h inkubiert. Anschließend werden sie für die Immunofluoreszenzfärbung (16-*Well* Platte) fixiert bzw. zur RNA-Isolation für die Gensequenzierung (24er-*Well* Platte) lysiert.

### 3.2.5 Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) der B-Zellüberstände

Die restlichen Überstände der B-Zellkulturen (48h) werden für die Bestimmung der Zytokinkonzentrationen verwendet. Beim Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) handelt es sich um ein immunologisches Nachweisverfahren, was auf der Interaktion zwischen Antigenen und Antikörpern basiert (194). In dieser Arbeit werden indirekte Sandwich-ELISAs zur

Konzentrationsbestimmung der Zytokine verwendet. Das Prinzip beruht auf einem *capture antibody*, welcher sich am Boden einer Mikrotiterplatte befindet. Dieser soll die entsprechenden Proteine (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$  und LT- $\alpha$ ) aus den Proben (B-Zellüberstände) detektieren und über einen weiteren Antikörper (*detection antibody*), welcher an ein Biotin-Enzym-Protein-Komplex (*horseradish peroxidase, HRP und Avidin bzw. Streptavidin*) gekoppelt ist, durch eine Farbreaktion nachweisen. Diese wird in einem Photometer gemessen und ausgewertet. Dabei lässt sich allgemein festhalten: Je stärker der Farbumschlag, desto höher die Konzentration des Proteins in der Probe.

Für die ELISA-Messungen werden die *Human Uncoated ELISA Kits* (IL1- $\beta$ , IL-6, IL-10 und TNF- $\alpha$ ) der Firma *Invitrogen* bzw. das *DuoSet<sup>®</sup> Human Lymphotoxin- $\alpha$*  der Firma *R&D Systems* verwendet. Die Versuche werden gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt. Für alle Schritte (bis auf die Probenauftragung) wird dafür eine 8-Kanal-Pipette zur effizienteren Durchführung genutzt und alle Inkubationen finden für eine gleichmäßige Verteilung der Agenzien auf einem Orbitalschüttler statt. Nach jedem letzten Waschschrift wird die Platte kopfüber auf Zellstofftüchern abgeklopft, um die überschüssige Pufferlösung zu entfernen.

Im ersten Schritt werden die *Wells* der Mikrotiterplatte (*Corning<sup>™</sup> Costar<sup>™</sup> 9018 ELISA plate, 96-Well*) mit je 100  $\mu$ l des zuvor angesetzten *capture antibody* in *coating buffer* (1:250) beschichtet. Die Platte wird mit einer Verschlussfolie beklebt und bei 4°C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wird die Platte zunächst 3x mit 250 $\mu$ l Waschpuffer gewaschen. Anschließend werden je 200 $\mu$ l ELISPOT in jedes *Well* gegeben und für 1h bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Dieses enthält FCS und dient der Blockierung unspezifischer Bindungen, um Hintergrundsignale und falsch-positive Messwerte zu minimieren. Während der Inkubationszeit werden die Proben und der Standard auf Eis aufgetaut und die Proben mit ELISPOT verdünnt (s. Tab.1), da je nach Zytokin die Messwerte zu hoch ausfallen können, sodass diese nicht mehr mess- bzw. auswertbar sind. Danach erfolgt eine 1:2 Verdünnungsreihe für den Standard in insgesamt 7 Stufen (Top-Standard bis 0; wobei 0 = ELISPOT). Bei diesem handelt es sich um das rekombinante Zytokin in bekannter Konzentration, mit welchem eine Standardkurve zur Kalibrierung erstellt werden kann. Durch diese Standardkurve lassen sich die Zytokinkonzentrationen in den Proben am Ende errechnen.

Nach dem Blockierungsschritt wird die Platte 1x mit 250 $\mu$ l Waschpuffer gewaschen. Für die Doppelbestimmungen werden die Proben und die Standard-Verdünnungsreihe à 100 $\mu$ l auf die Platte aufgetragen. Für den *Blank* wird reines B-Zellmedium verwendet. Der *Blank* wird bei der Auswertung von den Messwerten der Proben subtrahiert, um das Hintergrundsignal zu verringern. Die Proben werden für 2h bei RT inkubiert. In dieser Zeit binden die Zytokine aus den Proben (und dem Standard) an den am Boden der Mikrotiterplatte befindlichen *capture antibody*. Danach wird die Platte mitsamt der nicht gebundenen Proteine in 4 Waschschriften à 250 $\mu$ l ausgewaschen. Anschließend werden je 100 $\mu$ l des zuvor in *coating buffer* verdünnten *detection antibody* (1:250) in die *Wells* gegeben und für

1h bei RT inkubiert. Es folgen 4 weitere Waschschrte. Das Zytokin befindet sich nun zwischen *capture* und *detection antibody*. Dieser Schritt ist namensgebend für den Sandwich-ELISA. Als nächstes wird das biotinylierte HRP-Avidin- (für IL-1 $\beta$ , IL-10) bzw. HRP-Streptavidin-Konjugat (für IL-6, TNF- $\alpha$ , LT- $\alpha$ ) 1:250 bzw. 1:100 in ELISPOT verdünnt und je 100 $\mu$ l auf die *Wells* pipettiert. Die Inkubation erfolgt für 30 min. bei RT. In diesen Schritt bindet das (Strept-)Avidin über Biotin an den *detection antibody*. Das daran gekoppelte Enzym HRP dient im darauffolgenden Schritt als Katalysator der Farbreaktion. Nach der Inkubation wird die Platte ein letztes Mal 6-fach gewaschen. Anschließend werden je 100 $\mu$ l des Chromogens Tetramethylbenzidin (TMB) in die *Wells* gegeben und die Platte für 15 min. inkubiert. Wie beschrieben, dient HRP als Katalysator, um das Substrat TMB zu oxidieren. Das Ergebnis ist ein blaues Reaktionsprodukt, welches bei 650nm gemessen werden kann. Eine höhere Sensitivität kann durch eine Säurezugabe erzielt werden (195). Dafür werden im letzten Schritt in jedes *Well* 100  $\mu$ l 2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> gegeben und die Farbreaktion wird damit gestoppt. Beim Endprodukt handelt es sich um eine gelbe Lösung, welche direkt im Anschluss bei 450nm im Photometer (SPECTRAFluor Plus, TECAN) gemessen wird. Die Intensität der Farbe ist direkt proportional zur Konzentration des Zytokins in der Probe. Mithilfe der Standardkurve werden nun die einzelnen Konzentrationen aller Proben bestimmt.

Tabelle 1: Tabelle 1: Verdünnungen der Proben und der Standards mit ELISPOT für die ELISA-Messungen.

| <u>Zytokin</u> | <u>Verdünnungen</u>    |
|----------------|------------------------|
| IL-1 $\beta$   | 1:4                    |
| IL-6           | 1:40                   |
| IL-10          | 1:2                    |
| TNF- $\alpha$  | 1:2                    |
| LT- $\alpha$   | 1:4                    |
| Standards      | 1:2 (Verdünnungsreihe) |

### 3.2.6 Immunofluoreszenzfärbung und Mikroskopie

Mithilfe der Immunofluoreszenzfärbung können Proteine durch an Fluorochrome gekoppelte Antikörper sichtbar gemacht werden. In dieser Arbeit dient sie dem quantitativen Nachweis ausgewählter Zell- und Reaktionsmarker, welche anschließend mittels Bildauswertung bestimmt werden. Dafür werden das Intermediärfilament Nestin (*neuroepithelial stem cell protein*) sowie die Reaktionsmarker GFAP (saures Gliafaserprotein, *glial fibrillary acidic protein*) und der Komplementfaktor C3 verwendet. Ferner kann

überprüft werden, ob morphologische Veränderungen nach der Behandlung mit den B-Zellüberständen zu verzeichnen sind.

Zunächst müssen die Überstände der Astrozyten abgenommen werden. Danach werden die 16er-*Wells* vorsichtig mit je 100ul PBS<sup>++</sup> gewaschen und anschließend für 10 min. bei RT mit 100µl 4%-iger Paraformaldehydlösung (PFA) fixiert. Durch diesen Schritt werden Proteine reversibel vernetzt und enzymatische Reaktionen in den Zellen unterbunden. Danach wird das PFA abgenommen und die *Wells* werden erneut mit je 100µl PBS<sup>++</sup> gewaschen. Sollten sie nicht direkt zur Färbung weiterverwendet werden, können sie mit je 150µl PBS<sup>++</sup> eingedeckt und bei 4°C im Kühlschrank gelagert werden.

Anschließend werden je 50µl 0,1%iger Triton-X100-Lösung in jedes *Well* der 16-Well Platte gegeben und für 5 min. bei RT inkubiert. Das Detergens permeabilisiert die Zellmembran und ermöglicht den im nächsten Schritt zugegebenen Antikörpern, die intrazellulären Antigene (C3, GFAP, Nestin) binden zu können. Nach der Inkubation werden die *Wells* mit je 150µl PBS<sup>++</sup> gewaschen. Danach werden die Primärantikörper (siehe 3.1.6) 1:250 in 1% BSA/PBS<sup>++</sup>-Puffer verdünnt und je 50µl der Antikörper-Lösung in jedes *Well* gegeben und für 1h bei RT inkubiert. Das BSA wird der Lösung zur Absättigung unspezifischer Verbindungen hinzugefügt. Als nächstes folgt ein doppelter Waschschrift mit je 150µl PBS<sup>++</sup>. Die folgenden Schritte sollten im Dunkeln durchgeführt werden, um die Intensität der Fluorochrome möglichst zu erhalten. Die Sekundärantikörper werden 1:1000 ebenfalls in 1% BSA/-PBS<sup>++</sup>-Puffer verdünnt und je 50µl in jedes *Well* gegeben. Die Inkubation erfolgt erneut für 1h bei RT. Der Sekundärantikörper ist spezifisch gegen den Primärantikörper gerichtet, welcher aus einem bestimmten Wirt (hier: Kaninchen bzw. Maus) gewonnen wurde. Durch diese Interaktion bindet der Sekundärantikörper direkt an den Primärantikörper und konjugiert diesen mit dem Fluorochrom, welches durch Licht angeregt und mittels Fluoreszenz unter dem Mikroskop sichtbar gemacht werden kann. Nach der Inkubation folgt die Kernfärbung mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI). Dafür wird DAPI 1:3000 mit PBS<sup>++</sup> verdünnt und à 50µl in jedes *Well* gegeben und für 10 min. bei RT inkubiert. Zum Schluss werden die Kammern mit PBS<sup>++</sup> gewaschen und anschließend mithilfe einer Pinzette entfernt. Im letzten Schritt wird der Objektträger mit einem Tropfen *mounting medium* pro *Well* unter einem Deckglässchen eingedeckt und für mindestens 24h bei 4°C im Kühlschrank gelagert. Danach kann er für die Fluoreszenzmikroskopie verwendet werden.

### 3.2.7 Bildauswertung

Von jedem *Well* werden 10 zufällige Aufnahmen gemacht und anschließend wird eine Bildauswertung durchgeführt. Die Bildauswertung erfolgt mithilfe von Excel und des Programmes *ImageJ (Fiji)* in der Version 1.52t.

Jedes Bild wird unter denselben Mikroskopeinstellungen (Belichtungszeit, Lichtstärke, Vergrößerung) aufgenommen und besteht aus drei Einzelbildern: DAPI (UV-Kanal), GFAP oder C3 (grüner Kanal, Alexa 488) und Nestin (roter Kanal, Alexa 594). Für die Bildanalyse wird jedes Bild in die einzelnen Kanäle aufgeteilt und in jeweils ein Binärbild umgewandelt. Danach kann die Epitopfläche unter Verwendung eines überprüften Schwellenwerts ermittelt werden.

Dafür werden zunächst alle Zellkerne, welche mit DAPI gefärbt sind, durch die Festlegung eines geeigneten Schwellenwerts sowie einer definierten Größe der Partikel, automatisiert gezählt. Um festzustellen, wie hoch der jeweilige Anteil des Intermediärfilaments Nestin ist, wird dessen Fläche gemessen und durch die Anzahl der Kerne geteilt. Um Rückschlüsse auf die Reaktivität, der mit den unterschiedlichen B-Zellüberständen behandelten Astrozyten ziehen zu können, werden anschließend die Flächen der Reaktionsmarker C3 und GFAP bestimmt und ebenfalls durch die Anzahl der Kerne geteilt. Damit lässt sich die Epitopfläche pro Zelle ermitteln. Je größer die Fläche von C3 bzw. GFAP im Verhältnis zur Anzahl der Kerne, als desto höher wird die Reaktivität der Astrozyten interpretiert.

### 3.2.8 Zellyse für die Gensequenzierung

Die Zellyse dient der Isolation der RNA. Dafür müssen die Zellen mithilfe von chemischen Agenzien und mechanischer Einwirkung aufgeschlossen werden. Der verwendete *Lysis Puffer* enthält Detergenzien bzw. Tenside, welche die Zell- und Kernmembran der Astrozyten angreifen und schädigen. Das hinzugefügte 2-Mercaptoethanol reduziert Proteine, indem es zur Zerstörung der Disulfidbrücken führt und letztlich dessen Denaturierung bewirkt. Dies ist zum einen für die Extraktion der RNA nötig, andererseits werden RNasen inaktiviert, sodass die RNA nicht weiter abgebaut werden kann. Durch den *Cell Lysis Buffer* werden gleichzeitig physiologische Bedingungen für diese aufrechterhalten, damit das Zielprodukt nicht zerstört wird.

Für die Durchführung wird dem *Cell Lysis Buffer* des *Quick-RNA™ Microprep Kits* der Firma *Zymo Research* zunächst 1% 2-Mercaptoethanol hinzugefügt. Anschließend werden der Überstand entfernt und je 250ul *Lysis Buffer* in jedes 24er *Well* auf die Astrozyten gegeben. Die Suspension wird so lange auf- und abpipettiert, bis die Viskosität abnimmt und keine Schlieren mehr zu sehen sind.

Anschließend werden die Lysate in separate 1,5ml-Eppendorfgefäße überführt und bei -80°C im Gefrierschrank gelagert, bis sie für die Gensequenzierung verwendet werden.

### 3.2.9 Gensequenzierung

Die Qualitätskontrolle, Probenvorbereitung und Sequenzierung der zuvor isolierten RNA wurden an der Genomics Plattform (MDC-BIMSB Berlin) durchgeführt. Für die Erstellung der mRNA-*libraries* wurde *TruSeq RNA Library Prep (Illumina)* verwendet. Die Single-read 50-bp-Sequenzierung wurde auf der *NovaSeq S4-Plattform (Illumina)* durchgeführt. Zur Qualitätsprüfung der Rohdaten wurde *FastQC* genutzt. Die gefilterten Reads wurden mit *Salmon* an das menschliche Referenztranskriptom hg38 angeglichen. Die Datenanalyse wurde mit dem *R (limma* Paket) durchgeführt.

### 3.2.10 Statistische Auswertung

Die Daten werden als Mittelwert mit ihrer Standardabweichung gezeigt. Die statistische Auswertung sowie die Erstellung der Grafiken erfolgen mit der Software *GraphPad Prism* in der Version 8.3.0. Nach Testung auf Normalverteilung wird für ungepaarte, parametrische Daten der t-Test und für ungepaarte, nicht parametrische Daten der Mann-Whitney-U Test zur Überprüfung von Signifikanzen angewandt. Zur Testung auf Korrelationen wird der Spearman-Rangkorrelationskoeffizient genutzt. Das Signifikanzniveau  $\alpha$  liegt bei 0,05 bzw. 5%.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Isolation, Aktivierung und Expansion der B-Zellen

Durch die B-Zell-Isolation (BZI) konnten unterschiedliche B-Zell-Anteile in gesunden Probanden (HC) und MS-Patienten festgestellt werden. Die Anteile der gewonnenen B-Zellen unterscheiden sich zum Teil stark zwischen den gesunden Kontrollen und Patienten; jedoch gibt es auch innerhalb der jeweiligen Gruppen eine hohe Varianz (Tab.2). Der durchschnittliche Anteil der gewonnenen B-Zellen liegt in mit Tysabri® behandelten Patienten mit 11,72% signifikant höher als jener der gesunden Kontrollen (3,5%) sowie der Patienten mit einem milden Verlauf (5,99%; Beta-Interferon bzw. Copaxone®) (Abb. 1a). Die mittleren B-Zell-Anteile von mit Beta-Interferon bzw. Copaxone® behandelten Patienten sind im Vergleich zu den gesunden Kontrollprobanden erhöht, unterscheiden sich jedoch nicht signifikant von ihnen.

Die durchschnittlichen Anteile der nach der BZI gezählten PBMNCs („Rest“) unterscheiden sich nicht signifikant zwischen den verschiedenen Gruppen (40,15% vs. 53,37% vs. 41,45%) (Abb. 1b).

Tabelle 2: Anteile der B-Zellen von PBMNCs verschiedener Probanden/ Patienten. Rest: restliche PBMNCs nach B-Zell-Isolation im Vergleich zur jeweiligen Gesamt-PBMNC-Zahl (100%).

| Patient (Pat.) /<br>Kontrolle (HC) | Alter<br>(Jahre) | Verlauf | Therapie | B-Zellen (%) | Rest (%) |
|------------------------------------|------------------|---------|----------|--------------|----------|
| HC3                                | 59               | gesund  | -        | 1,33         | 20,27    |
| HC5                                | 45               | gesund  | -        | 1,33         | 17,7     |
| HC6                                | 52               | gesund  | -        | 4,73         | 84,93    |
| HC10                               | 45               | gesund  | -        | 2,7          | 56,76    |
| HC13                               | 26               | gesund  | -        | 6,07         | 58,93    |
| HC14                               | 40               | gesund  | -        | 5,49         | 24,05    |
| HC15                               | 36               | gesund  | -        | 3,03         | 18,45    |
| Mean HC                            | 43,3             | gesund  | -        | 3,5          | 40,15    |
| Pat.2                              | 57               | severe  | Tysabri® | 13,7         | 80,55    |
| Pat.4                              | 48               | severe  | Tysabri® | 5,41         | 35,88    |
| Pat.5                              | 28               | severe  | Tysabri® | 5,65         | 19,4     |
| Pat.7                              | 41               | severe  | Tysabri® | 17,46        | 78,31    |
| Pat.9                              | 32               | severe  | Tysabri® | 12,12        | 42,5     |
| Pat.12                             | 38               | severe  | Tysabri® | 16           | 63,5     |

|             |      |        |                                    |       |       |
|-------------|------|--------|------------------------------------|-------|-------|
| Mean severe | 40,7 | severe | Tysabri®                           | 11,72 | 53,37 |
| Pat.3       | 41   | benign | Beta-Interferon                    | 11,96 | 45,74 |
| Pat.6       | 42   | benign | Copaxone®                          | 6     | 36,87 |
| Pat.8       | 46   | benign | Copaxone®                          | 5,18  | 67,5  |
| Pat.11      | 47   | benign | Beta-Interferon                    | 4     | 32,17 |
| Pat.13      | 35   | benign | Beta-Interferon                    | 2,8   | 25    |
| Mean benign | 41,5 | benign | 3x Beta-Interferon<br>2x Copaxone® | 5,99  | 41,45 |

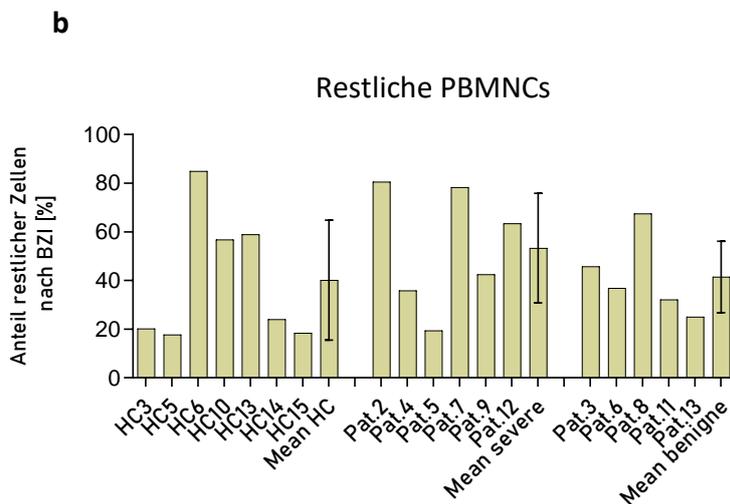
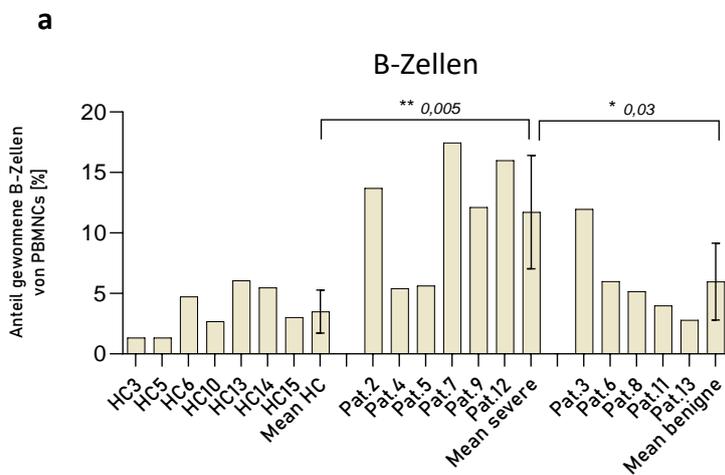


Abbildung 1: a) Prozentuale Anteile der gewonnenen B-Zellen der gesunden Kontrollen (HC) sowie der Patienten (severe und benign). b) Prozentuale Anteile der PBMCs nach BZl von gesunden Kontrollen (HC) und Patienten.

## Aktivierung und Expansion

Um die Aktivierung bzw. Expansion der B-Zellen im Verlauf der 48h beurteilen und den bestmöglichen Zeitpunkt zur Entnahme der Überstände feststellen zu können, wurden zu den Zeitpunkten 2h, 24h und 48h mikroskopische Aufnahmen der B-Zellkulturen gemacht.

2h nach der Zellaussaat ist in allen Kulturen ein dichter, gleichmäßiger Zellrasen zu erkennen (Abb. 2, 3, 4 a). Innerhalb von 24h bilden sich erste Cluster, welche für eine erfolgreiche Aktivierung der B-Zellen sprechen. Eine optisch deutliche Abgrenzung der Cluster sowie ihre verstärkte Expansion lassen sich nach 48h in allen Zellkulturen feststellen und unterscheiden sich optisch nicht zwischen den gesunden Kontrollen und den Patienten (Abb. 2, 3, 4 c), sodass dies – übereinstimmend mit den Ergebnissen der Zytokinmessungen – als optimaler Zeitpunkt für die Entnahme der Überstände für die weiteren Versuche gewählt wurde (s. Anhang).

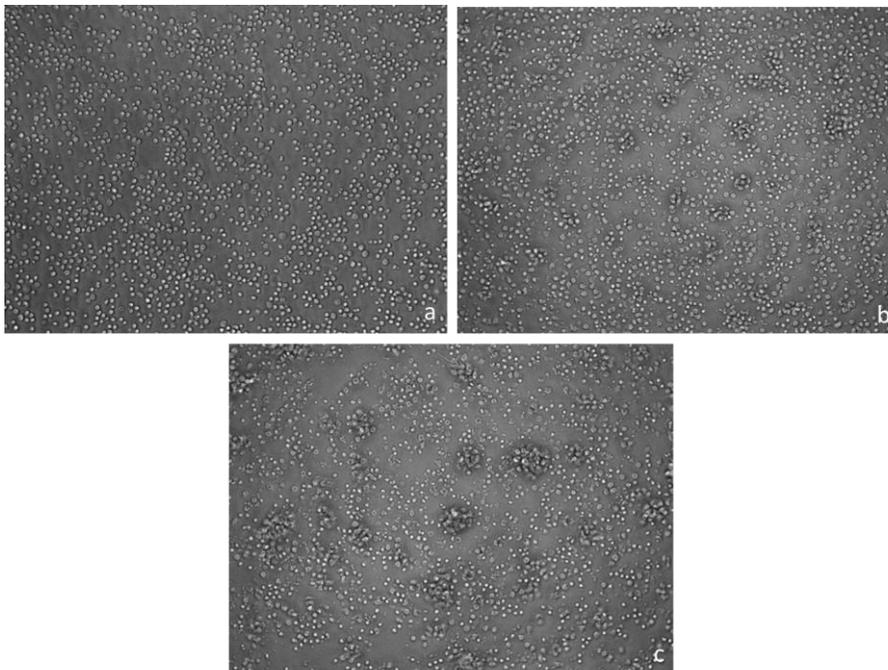


Abbildung 2: B-Zellkultur einer gesunden Kontrolle zu verschiedenen Zeitpunkten (a 2h; b 24h; c 48h).

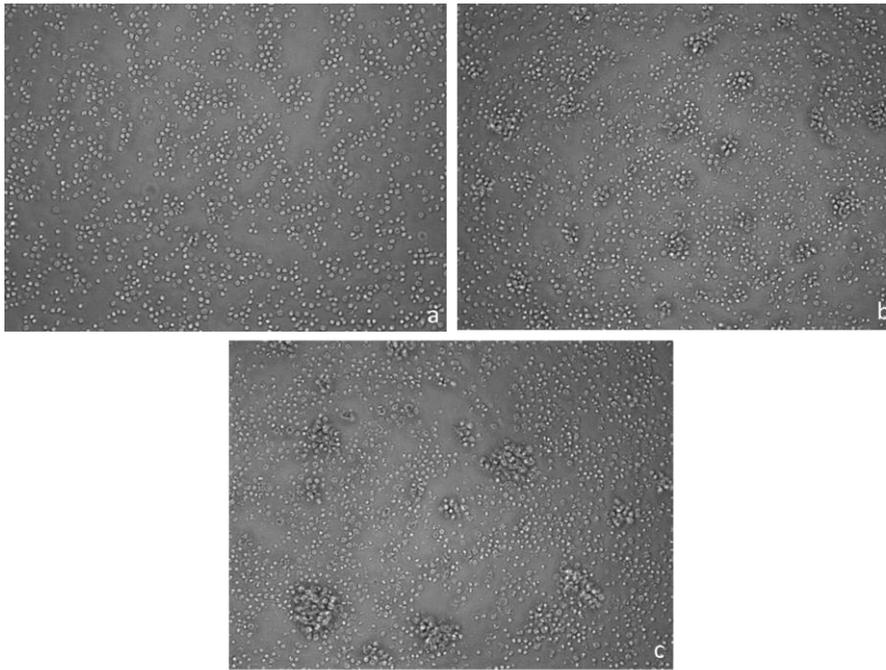


Abbildung 3: B-Zellkultur eines mit Tysabri® behandelten Patienten zu verschiedenen Zeitpunkten (a 2h; b 24h; c 48h).

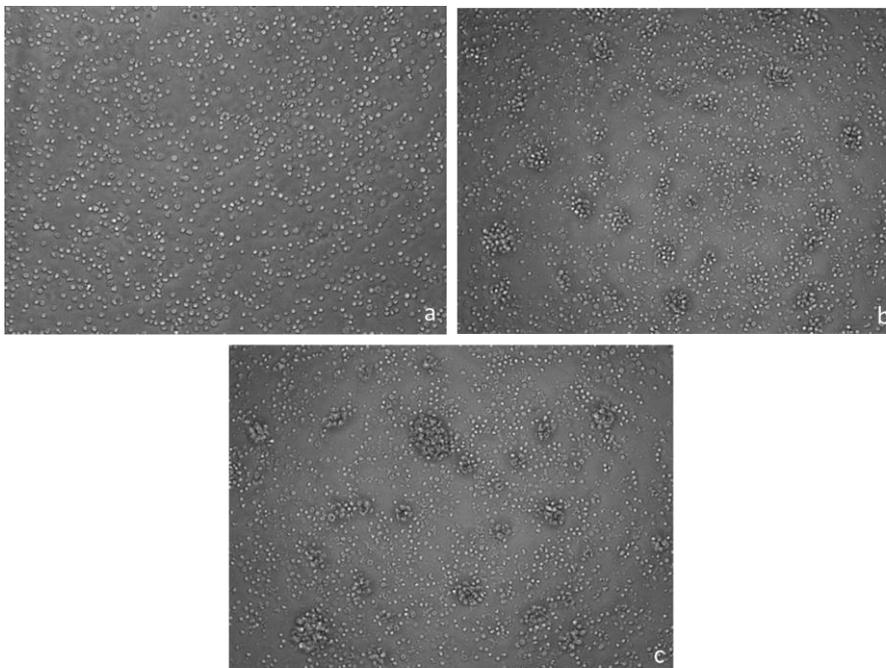


Abbildung 4: B-Zellkultur eines mit Beta-Interferon behandelten Patienten zu verschiedenen Zeitpunkten (a 2h; b 24h; c 48h).

## 4.2 Zytokinsekretion von B-Zellen

Die Zytokinsekretionen (IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und LT- $\alpha$ ) werden mithilfe des Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) gemessen, um feststellen zu können, wie hoch ihre jeweiligen Konzentrationen in den verschiedenen Gruppen (HC, Beta-Interferon, Copaxone<sup>®</sup> und Tysabri<sup>®</sup>) sind.

### IL-6

Die durchschnittliche IL-6 Konzentration in den gesunden Kontrollen liegt bei 820,59 pg/ml. Diese verhält sich ähnlich bei den mit Tysabri<sup>®</sup> behandelten Patienten (871,37 pg/ml). Bei den mit Copaxone<sup>®</sup> behandelten Patienten liegt die IL-6 Konzentration mit 941,42 pg/ml etwas höher, jedoch ist diese Erhöhung nicht signifikant. Im Gegensatz dazu, zeigen die mit IFN- $\beta$  behandelten Patienten als einzige Gruppe eine niedrigere IL-6 Konzentration (377,08 pg/ml) (Abb.5).

### IL-10

Die durchschnittlichen IL-10 Konzentrationen der Kontrollgruppe und der mit Beta-Interferonen behandelten Patienten liegen mit 48,94 pg/ml bzw. 47,54 pg/ml nah beieinander. Im Vergleich dazu sind die Konzentrationen bei Patienten mit einem hochaktiven Verlauf (Tysabri<sup>®</sup>) sowie bei den mit Copaxone<sup>®</sup> behandelten Patienten erhöht (75,8 pg/ml und 217,48 pg/ml), wobei eine signifikante Konzentrationserhöhung zwischen letzteren und der Kontrollgruppe gemessen werden konnte (Abb.5).

### TNF- $\alpha$

Die durchschnittliche TNF- $\alpha$  Konzentration der Kontrollgruppe beträgt 59,4 pg/ml. Im Vergleich dazu liegt die der mit Beta-Interferonen behandelten Patienten signifikant niedriger: mit 25,35 pg/ml entspricht sie weniger als der Hälfte jener der gesunden Kontrollen (Abb.5). Die mittlere TNF- $\alpha$  Konzentration der mit Copaxone<sup>®</sup> behandelten Patienten liegt mit 114,09 pg/ml hingegen fast doppelt so hoch, wie die der Kontrollgruppe und signifikant höher als jene der mit Beta-Interferonen behandelten Patienten (Abb.5). Einen weiteren signifikanten Unterschied gibt es zwischen den mit Copaxone<sup>®</sup> behandelten Patienten und jenen mit einem hochaktiven Verlauf (Tysabri<sup>®</sup>). Die mittlere TNF- $\alpha$  Konzentration der mit Tysabri<sup>®</sup> behandelten Patienten entspricht einer 2,4-fach niedrigeren Konzentration im Vergleich zu den mit Copaxone<sup>®</sup> behandelten Personen (47,8 pg/ml vs. 114,09 pg/ml). Zwischen den durchschnittlichen TNF- $\alpha$  Konzentrationen der Kontrollgruppe und jenen der Patienten mit einem aktiven Verlauf (Tysabri<sup>®</sup>) konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

## IL-1 $\beta$

Die mittlere IL-1 $\beta$  Konzentration der gesunden Kontrollen beträgt 28,9 pg/ml. Jene der mit Beta-Interferonen behandelten Patienten ist im Vergleich dazu erhöht (50,25 pg/ml), jedoch handelt es sich um keinen signifikanten Unterschied. Ebenso konnte bei den mit Tysabri<sup>®</sup> behandelten Patienten keine signifikante Veränderung in Bezug auf die Kontrollgruppe festgestellt werden. Im Gegensatz dazu zeigt sich bei den mit Copaxone<sup>®</sup> behandelten Patienten eine signifikant bis hochsignifikant höhere IL-1 $\beta$  Konzentration (134,47 pg/ml) im Vergleich zu allen anderen drei Gruppen (Abb. 5).

## LT- $\alpha$

Die durchschnittliche LT- $\alpha$  Konzentration in der Kontrollgruppe beträgt 99 pg/ml. Jene der mit Beta-Interferonen sowie Copaxone<sup>®</sup> behandelten Patienten liegen mit 51,15 pg/ml bzw. 64,16 pg/ml unter jener der gesunden Kontrollen; dennoch handelt es sich um keinen signifikanten Unterschied. Die mittlere LT- $\alpha$  Konzentration der mit Tysabri<sup>®</sup> behandelten Patienten ist mit 105,26 pg/ml im Vergleich zu den anderen Gruppen erhöht, dennoch können - aufgrund der hohen Varianz innerhalb der jeweiligen Gruppen- auch hier keine signifikanten Veränderungen festgestellt werden (Abb.5).

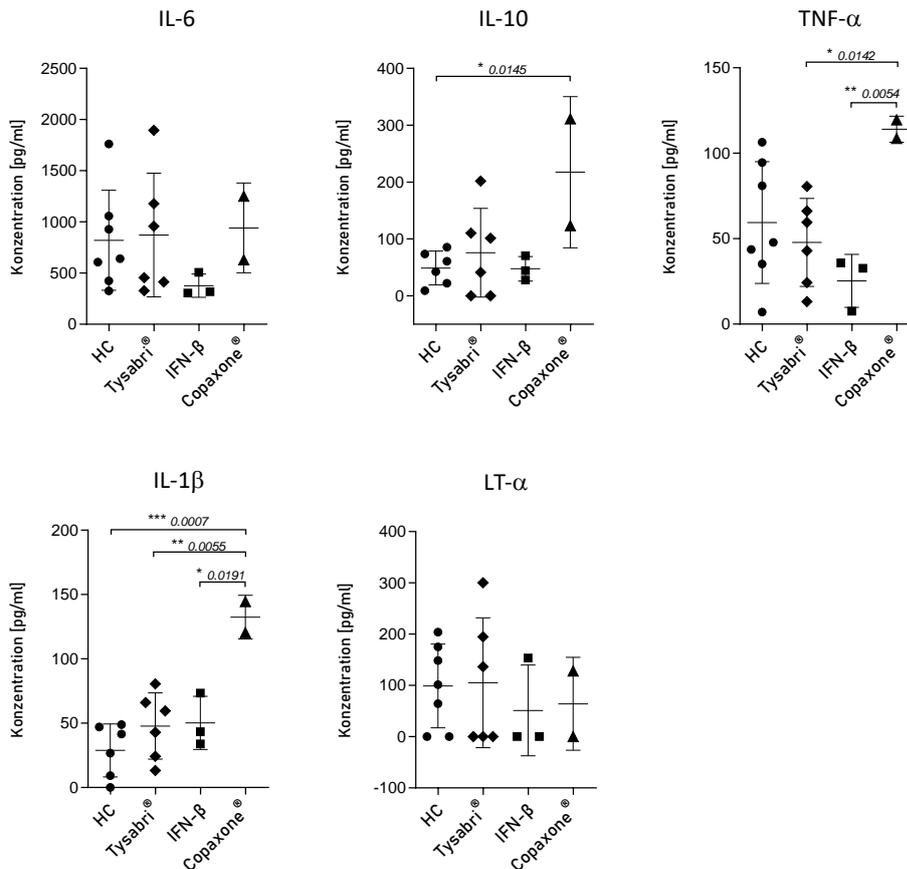


Abbildung 5: Zytokinkonzentrationen aus Überständen aktivierter B-Zellen von mit Tysabri<sup>®</sup>, IFN- $\beta$  oder Copaxone<sup>®</sup> behandelten MS-Patienten und gesunden Kontrollen.

### 4.3 Einfluss von B-Zell-Überständen auf die Reaktivität und Morphologie der Astrozyten

Um zu untersuchen, ob die Überstände der B-Zellen und die darin enthaltenen Zytokine und Mediatoren von gesunden Kontrollprobanden und MS-Patienten mit unterschiedlicher Krankheitsaktivität einen Einfluss auf die Reaktivität und die Morphologie der Astrozyten haben, wurden die B-Zellüberstände für 48h auf die Astrozyten gegeben. Anschließend wurde eine Immunofluoreszenzfärbung der Astrozytenkulturen für die Epitope der Reaktivitätsmarker C3, GFAP und Nestin durchgeführt und mittels Bildanalyse ausgewertet. Dafür wurde zunächst die Anzahl der Zellkerne bestimmt und anschließend die Fläche der Astrozyten, welche mit dem jeweiligen Marker assoziiert sind, ermittelt.

#### C3

Die C3-Expression ist im Vergleich zur Kontrollgruppe (HC: 100%) in allen Astrozytenkulturen von mit MS-Patienten stammenden B-Zellüberständen erhöht (Tysabri®: 117%; IFN-β: 120%; Copaxone®: 163%). Dabei zeigt sich die stärkste Erhöhung bei jenen Astrozyten, welche mit B-Zellüberständen von Copaxone®-Patienten behandelt wurden. Die C3-Expression hat sich hier signifikant um 63% gegenüber der Kontrollgruppe und um 43% gegenüber der Tysabri®-Gruppe gesteigert (Abb. 6).

#### Nestin

Die Nestin-Expression hingegen zeigt keine signifikanten Veränderungen in den Astrozyten, welche mit B-Zellüberständen von mit Tysabri®, IFN-β oder Copaxone® behandelten MS-Patienten inkubiert wurden. Zwar konnten auch hier leichte Erhöhungen des Nestin-Epitops im Vergleich zur Kontrollgruppe beobachtet werden (HC: 100%; Tysabri®: 120%; IFN-β: 113%; Copaxone®: 114%), jedoch ist gleichzeitig eine große Varianz innerhalb der Tysabri®- und IFN-β-Gruppe vorhanden (Abb.6).

#### GFAP

Die GFAP Epitop-Expression in Astrozyten, welche mit B-Zellüberständen von mit IFN-β behandelten MS-Patienten inkubiert wurden, zeigen ein gleiches GFAP-Level, wie jene der gesunden Kontrollen (HC: 100%; IFN-β: 100%). Im Vergleich dazu sind die GFAP-Level in Astrozyten von mit B-Zellüberständen von mit Tysabri® und Copaxone® behandelten MS-Patienten erhöht (Tysabri®: 123%; Copaxone®: 128%), jedoch handelt es sich dabei um keine statistisch messbaren Signifikanzen (Abb. 6).

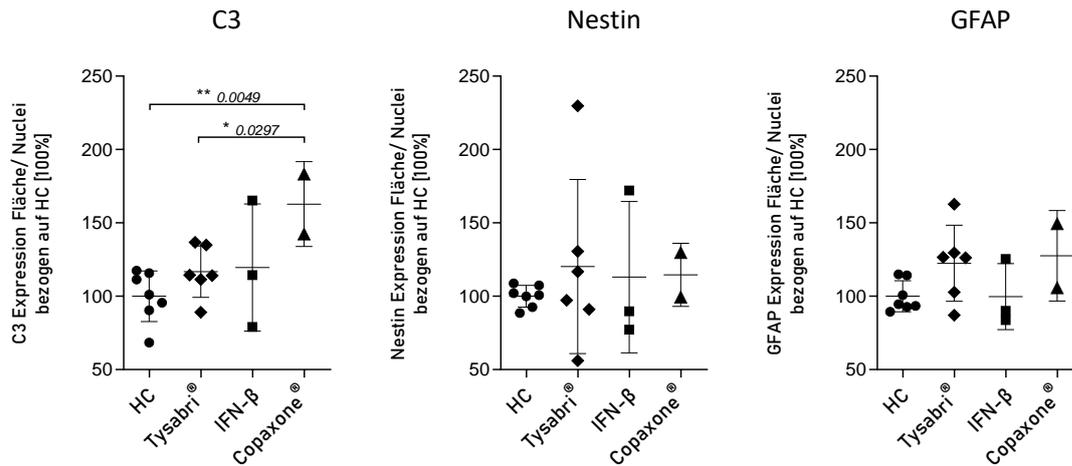


Abbildung 6: Expression der Epitope der Reaktivitätsmarker C3, Nestin und GFAP in Astrozyten. Die Astrozyten wurden zuvor 48h mit Überständen aktivierter B-Zellen von mit Tysabri®, IFN-β oder Copaxone® behandelten MS-Patienten und gesunden Kontrollen inkubiert.

#### 4.4 Korrelationen von B-Zell-Zytokinsekretionen und der Expression von C3, Nestin und GFAP in Astrozyten

Es konnten signifikante Korrelationen zwischen den Sekretionen der Zytokine IL-10, IL-1β und TNF-α für alle MS-Patienten (hohe und milde Krankheitsaktivität) beobachtet werden: Steigt die IL-10 Konzentration, zeigen sich ebenfalls die erhöhte Werte für IL-1β und TNF-α. Außerdem korreliert eine höhere IL-1β Konzentration mit einer stärkeren TNF-α Konzentration (Abb. 7). Für Patienten mit einer milden Krankheitsaktivität (IFN-β und Copaxone®) konnte darüber hinaus eine positive Korrelation zwischen den Konzentrationen von IL-1β und IL-6 beobachtet werden (Abb. 8). Außerdem geht eine höhere C3-Expression mit einer erhöhten Epitop-Expression des Reaktivitätsmarkers GFAP in Astrozyten einher.

Für Patienten mit hoher Krankheitsaktivität (Tysabri®) konnte hingegen beobachtet werden, dass eine höhere IL-10 Konzentration mit einer geringeren GFAP- und Nestin-Expression in Astrozyten korreliert. Dieser negative Zusammenhang zeigt sich ebenfalls für die Korrelation zwischen Nestin und IL-1β (Abb.9).

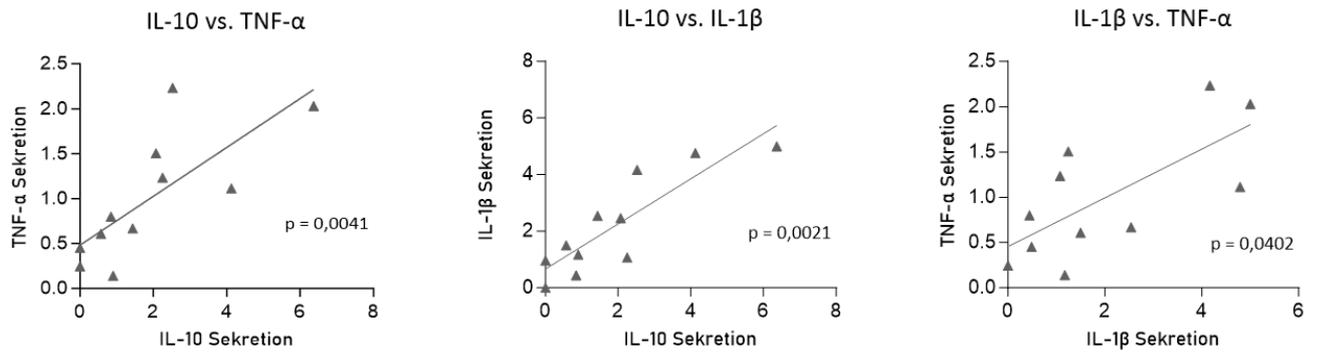


Abbildung 7: Signifikante Korrelationen der Zytokinsekretionen von IL-10, IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  aus B-Zellüberständen von MS-Patienten mit hoher und milder Krankheitsaktivität.

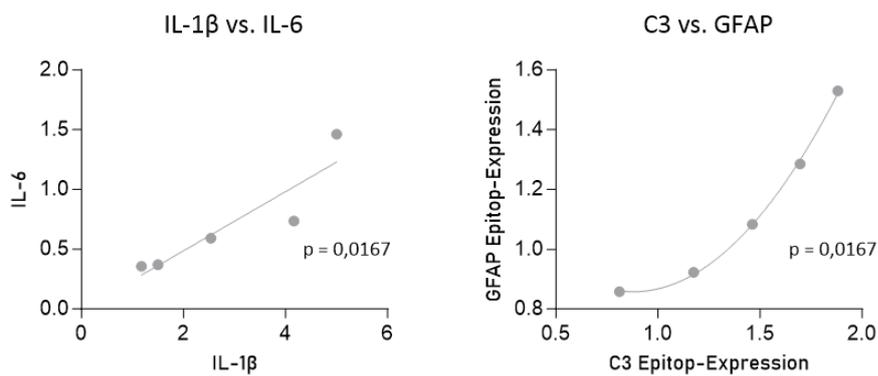


Abbildung 8: Signifikante Korrelationen der Zytokinsekretionen von IL-6 und IL-1 $\beta$  aus B-Zellüberständen von MS-Patienten mit milder Krankheitsaktivität und der Epitop-Expression der Reaktivitätsmarker C3 und GFAP in Astrozyten, welche mit jenen B-Zellüberständen inkubiert wurden.

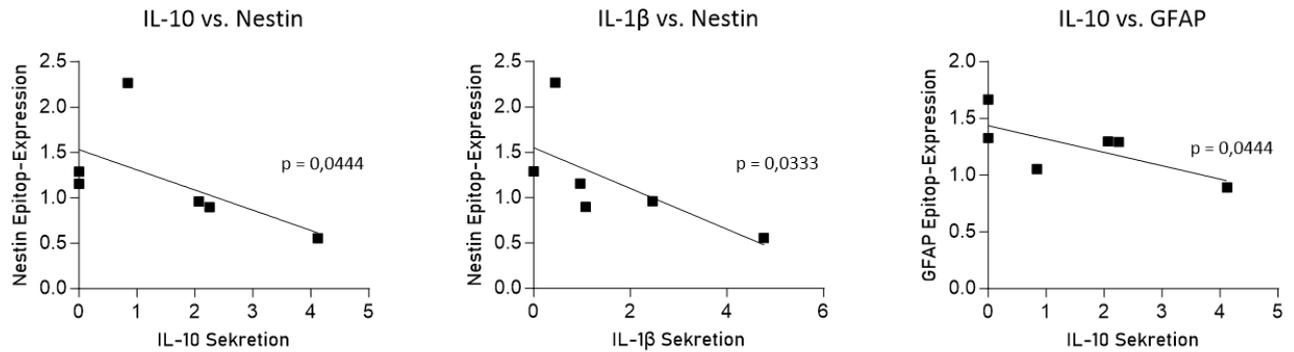


Abbildung 9: Signifikante Korrelationen zwischen Zytokinsekretionen von IL-10 und IL-1 $\beta$  aus B-Zellüberständen von MS-Patienten mit hoher Krankheitsaktivität und der Epitop-Expression der Reaktivitätsmarker Nestin und GFAP in Astrozyten, welche mit jenen B-Zellüberständen inkubiert wurden.

#### 4.5 Veränderungen der Genexpression in Astrozyten nach Inkubation mit B-Zellüberständen

Um zu beurteilen, ob Unterschiede hinsichtlich der Genexpressionsmuster in den mit B-Zellüberständen behandelten Astrozyten vorliegen, wurde eine RNA-Sequenzierung durchgeführt. Dafür wurde die RNA von Astrozyten, welche für 48h mit B-Zellüberständen von MS-Patienten (Therapie mit Tysabri<sup>®</sup>, IFN- $\beta$  bzw. Copaxone<sup>®</sup>), gesunden Kontrollprobanden (HC) oder Astrozyten- bzw. B-Zell-Medium (Kontrolle bzw. Mediumkontrolle) inkubiert wurden, untersucht. Die Behandlungen mit Kulturmedien dienten dabei als Kontrollen.

Es konnten differentielle Genexpressionen (*engl. differentially expressed genes, DEGs*) zwischen Astrozyten, welche mit Astrozyten-Medium (Kontrolle), und jenen, welche mit B-Zellüberständen der Patienten bzw. Probanden behandelt wurden, beobachtet werden (Kontrolle vs. MS-Patienten: 731 up und 1334 down; Kontrolle vs. HC: 858 up und 969 down) (Abb.10). Jedoch sind ebenfalls DEGs zwischen den mit Astrozyten-Medium behandelten Astrozyten und Astrozyten, welche mit B-Zell-Medium inkubiert wurden, zu verzeichnen (Kontrolle vs. Mediumkontrolle: 307 up und 477 down). Vergleicht man die DEGs der Patienten bzw. Probanden mit jenen Astrozyten, welche mit B-Zell-Medium behandelt wurden, sind deutlich weniger Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle festzustellen (Mediumkontrolle vs. Patienten: 23 up und 18 down; Mediumkontrolle vs. HC: 23 up und 18 down). Es konnten keine signifikant differentiell exprimierte Gene in den mit B-Zellüberständen inkubierten Astrozyten zwischen den MS-Patienten und den gesunden Kontrollprobanden gefunden werden (Abb. 10).

Die Top 50 signifikant regulierten Gene aller Proben sind in der Heatmap in Abbildung 11 aufgetragen. Daraus geht deutlich hervor, dass die Astrozyten, welche mit dem üblichen Astrozyten-Medium

(Kontrolle) inkubiert wurden, eine distinkte, gemeinsame Gruppe bilden. Auch jene Astrozyten, welche mit reinem B-Zell-Medium behandelt wurden (Mediumkontrolle), formen eine gemeinsame Gruppe. Die anderen beiden Gruppen bestehen sowohl aus gesunden Kontrollprobanden als auch aus MS-Patienten, sodass die DEGs der Probanden und Patienten nicht scharf voneinander abgegrenzt werden können, bzw. sich hinsichtlich ihrer Genexpressionsmuster nicht eindeutig unterscheiden.

Betrachtet man jene Expressionsmuster der MS-Patienten und der dazugehörigen gesunden Kontrollprobanden etwas genauer, so lassen sich dennoch unterschiedliche Hoch- als auch Herunterregulierungen zwischen den verschiedenen Gruppen beobachten (Abb. 12). Dabei ähneln sich die Genexpressionsmuster der Astrozyten der mit IFN- $\beta$  bzw. Tysabri<sup>®</sup> behandelten Patienten. Gleiches gilt für jene der gesunden Kontrollprobanden und der mit Copaxone<sup>®</sup> behandelten Patienten. Jedoch ist zu betonen, dass es sich hierbei um nicht-signifikante Unterschiede handelt.

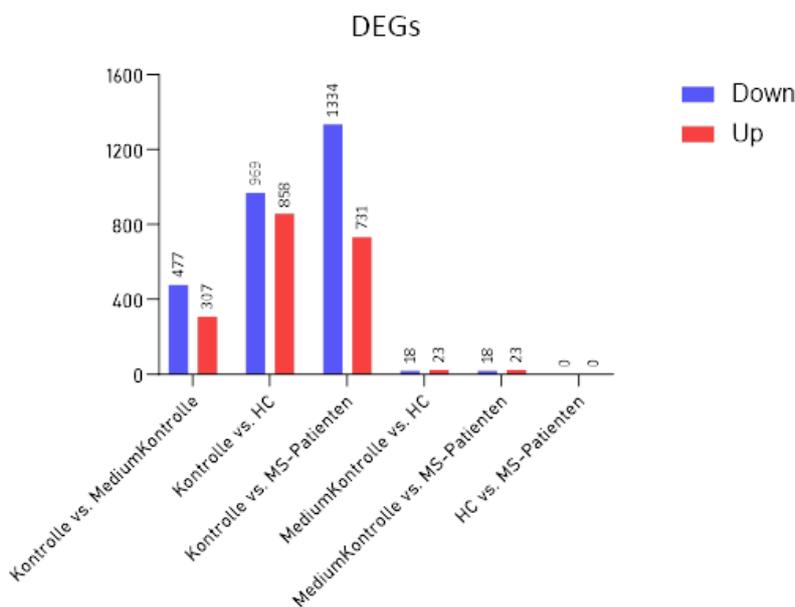


Abbildung 10: Differentielle Genexpression (engl. differentially expressed genes, DEGs) von Astrozyten, welche mit B-Zellüberständen von MS-Patienten (Therapie mit Tysabri<sup>®</sup>, IFN- $\beta$  bzw. Copaxone<sup>®</sup>), gesunden Kontrollprobanden (HC) oder Astrozyten- bzw. B-Zell-Medium (Kontrolle bzw. Mediumkontrolle) für 48h inkubiert wurden.

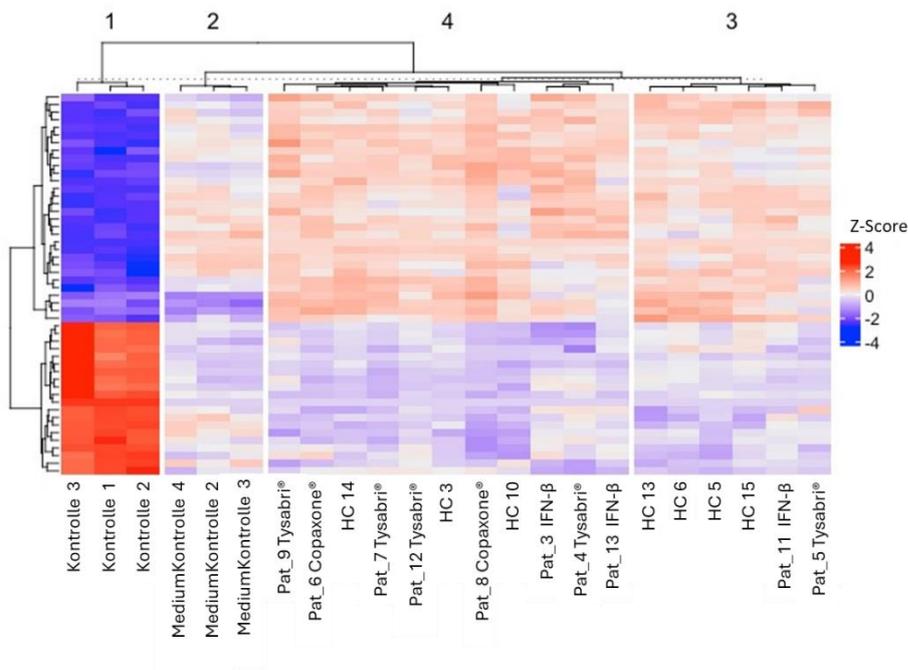


Abbildung 11: Heatmap der Top 50 regulierten Gene in Astrozyten nach Inkubation mit Astrozyten- bzw. B-Zell-Medium oder B-Zellüberständen gesunder Kontrollprobanden und MS-Patienten.

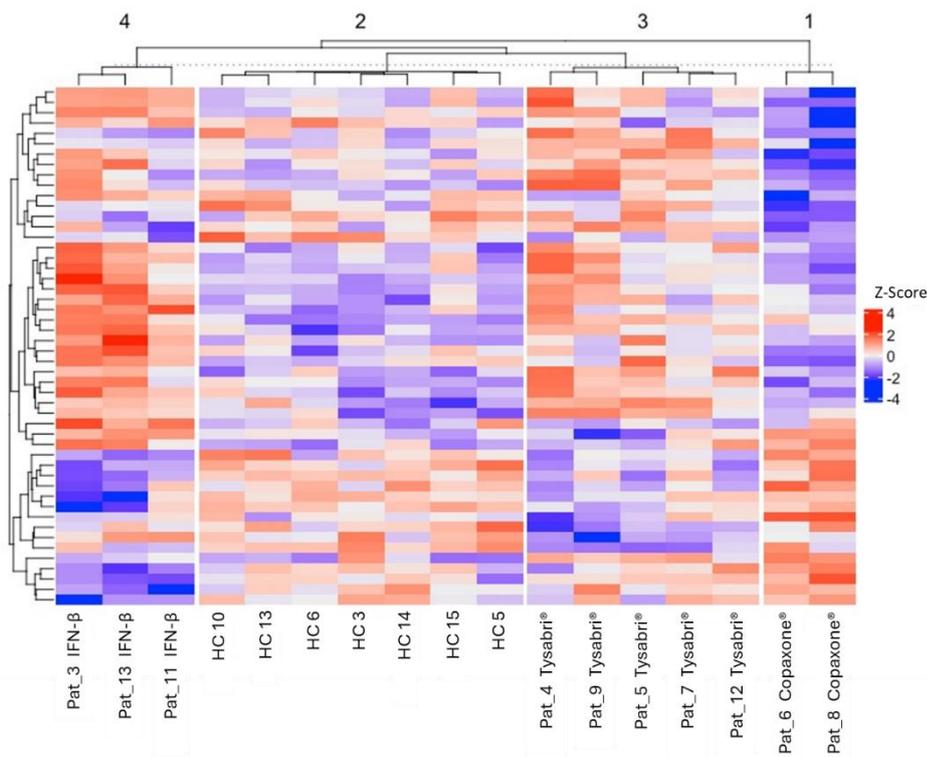


Abbildung 12: Heatmap der Top 50 regulierten Gene in Astrozyten nach Inkubation mit B-Zellüberständen gesunder Kontrollprobanden bzw. MS-Patienten (Therapie mit Tysabri®, IFN-β bzw. Copaxone®).

## Vergleich der Genexpressionsmuster von Astrozyten nach Inkubation mit B-Zellüberständen von HC vs. mit IFN-β behandelten MS-Patienten

Astrozyten, welche mit von mit IFN-β behandelten MS Patienten stammenden B-Zellüberständen inkubiert wurden, zeigen eine verstärkte Genexpression von CREG2 (Abb. 13). Dieses Protein ist in der Zellproliferation und-differenzierung involviert und wird ausschließlich im Gehirn exprimiert (196). Es wird angenommen, dass es eine wichtige Rolle für die Entwicklung und die Aufrechterhaltung der Physiologie spielt (197). Des Weiteren wird in jenen Astrozyten eine erhöhte Genexpression des Transkriptionsfaktors ZNF69 beobachtet, welcher mit einer negativen Regulation der Transkription durch die RNA-Polymerase II assoziiert wird (198).

Im Gegensatz dazu zeigen Astrozyten, welche mit von mit IFN-β behandelten MS Patienten stammenden B-Zellüberständen inkubiert wurden, eine verminderte Genexpression von RELB von GAL (Abb. 13). Bei Relb handelt es sich um eine Untereinheit des Transkriptionsfaktors NF-κB, welche die spezifische Bindung der RNA-Polymerase II an die DNA ermöglicht. Darüber hinaus ist Relb ein wichtiger Bestandteil der Immunantwort, indem es u.a. an der Differenzierung von Lymphozyten sowie an der negativen Regulation der IFN-β-Produktion beteiligt ist (199). Gal hingegen ist ein endokrines Neuropeptid, welches sowohl im zentralen als auch peripheren Nervensystem an einer Vielzahl regulatorischer Funktionen mitwirkt und so zur physiologischen Homöostase beiträgt (200).

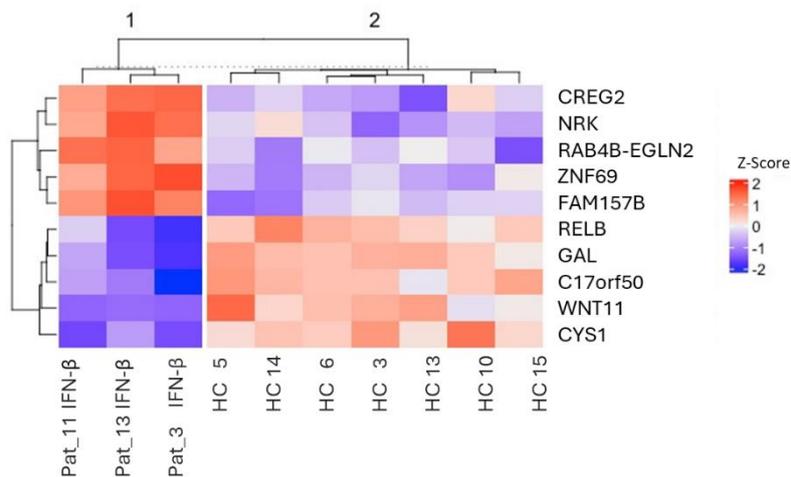


Abbildung 13: Heatmap der Top 10 regulierten Gene in Astrozyten nach Inkubation von mit IFN-β behandelten MS Patienten stammenden B-Zellüberständen und gesunden Kontrollprobanden.

## Vergleich der Genexpressionsmuster von Astrozyten nach Inkubation mit B-Zellüberständen von HC vs. mit Tysabri® behandelten MS-Patienten

Es konnten Hochregulierungen der Gene CCNE1, ZNF154 sowie MOBP in Astrozyten beobachtet werden, welche mit von Tysabri® behandelten Patienten stammenden B-Zellüberständen inkubiert wurden (Abb. 14). Die Funktionen von CCNE1 und ZNF154 umfassen die Regulation des Zellzyklus sowie - als Transkriptionsfaktor - das Zellwachstum und die -differenzierung (201,202). Im Gegensatz dazu lässt sich eine verminderte Genexpression von ATG9B in jenen Astrozyten erkennen. ATG9B spielt durch die Beteiligung am Signalweg der Autophagie eine wichtige Rolle im Metabolismus (203).

Auffallend ist zudem die verstärkte Genexpression von MOBP in Astrozyten, welche mit von Tysabri® behandelten Patienten stammenden B-Zellüberständen inkubiert wurden. *Myelin Associated Oligodendrocyte Basic Protein* (MOBP) ist ein Strukturbestandteil der Myelinscheide – dessen Schädigung ein zentrales Merkmal in der MS darstellt - eine Rolle für ihre Verdichtung und/ oder Stabilisierung spielt (204) (Abb. 14).

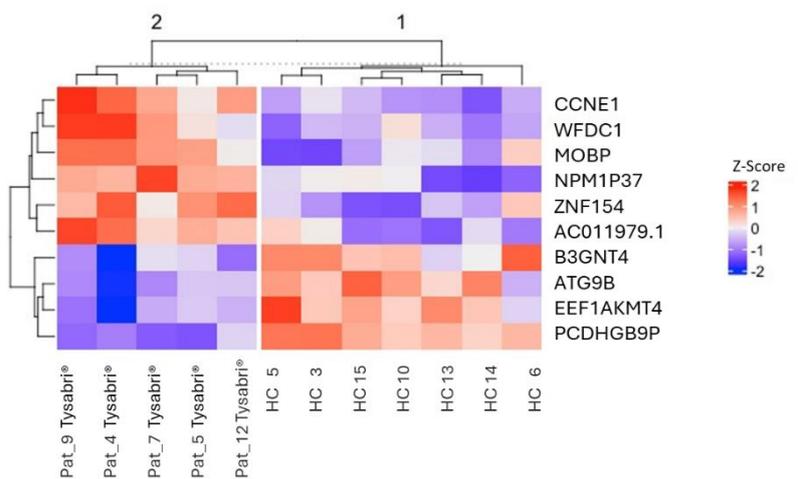


Abbildung 14: Heatmap der Top 10 regulierten Gene in Astrozyten nach Inkubation von mit Tysabri® behandelten MS Patienten stammenden B-Zellüberständen und gesunden Kontrollprobanden.

## Vergleich der Genexpressionsmuster von Astrozyten nach Inkubation mit B-Zellüberständen von HC vs. mit Copaxone® behandelten MS-Patienten

Während die Astrozyten, welche von mit Tysabri bzw. IFN- $\beta$  behandelten Patienten stammenden B-Zellüberständen inkubiert wurden, ein heterogenes Genexpressionsprofil (Top 10 regulierte Gene, Abb. 13, Abb. 14) zeigen, in welchem sich zu ähnlichen Anteilen sowohl Hoch- als auch Herunterregulationen finden, zeigen im Gegensatz dazu jene Astrozyten, welche mit Überständen von Copaxone-Patienten behandelt wurden, lediglich eine Hochregulation (Abb. 15). Dabei handelt es sich um HPCA, ein ZNS spezifisches calciumbindendes Protein, von welchem vermutet wird, dass es an der Regulation von spannungsabhängigen Calciumkanälen mitwirkt (205). Dem gegenüber stehen die verminderten Expressionen von KCNE2 und KCNA7, zwei spannungsgesteuerten Kaliumkanälen, welche ebenfalls eine wichtige Rolle für die Entstehung und Weiterleitung des Aktionspotentials bzw. der Freisetzung von Neurotransmittern spielen (206,207). Darüber hinaus sind auch hier Unterschiede in der Genexpression von Transkriptionsfaktoren der Zinkfinger-Familie (ZNF726, ZNF534) zu beobachten (Abb. 15).

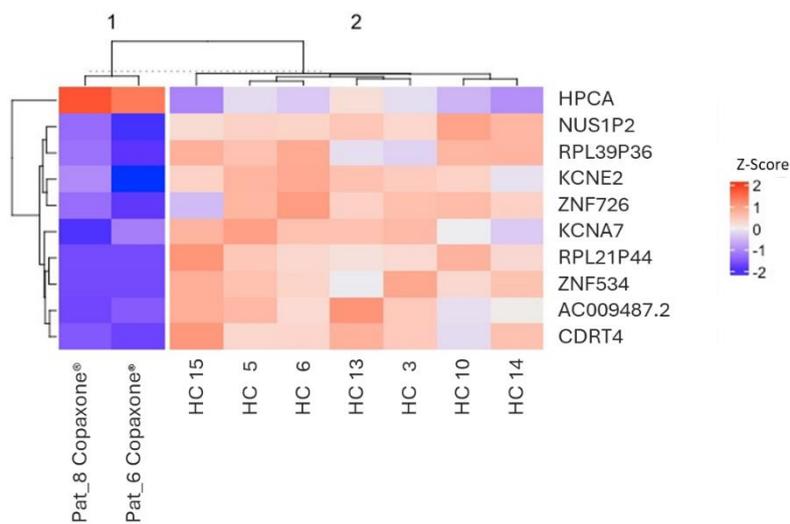


Abbildung 15: Heatmap der Top 10 regulierten Gene in Astrozyten nach Inkubation von mit Copaxone® behandelten MS Patienten stammenden B-Zellüberständen und gesunden Kontrollprobanden.

## 5. Diskussion

### 5.1 Interpretation der Ergebnisse im Kontext vorhandener Literatur

#### 5.1.1 Veränderungen der B-Zellanteile im peripheren Blut

Die B-Zellen im peripheren Blut sind in mit Tysabri® behandelten Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe sowie zu mit Beta-Interferonen bzw. Copaxone® behandelten Patienten signifikant erhöht. Dieser Effekt kann durch den Wirkmechanismus von Tysabri® (Natalizumab) erklärt werden: Natalizumab wird eingesetzt, um die Adhäsion und Einwanderung von Lymphozyten durch die BBB zu verhindern. Dabei handelt es sich um einen monoklonalen Antikörper, welcher gegen das  $\alpha$ 4-Integrin gerichtet ist und damit die Migration der Lymphozyten ins ZNS minimiert. Gleichzeitig werden durch das Blocken jedoch B-Gedächtniszellen, welche normalerweise über  $\alpha$ 4-Integrin in der Milz gebunden sind, freigesetzt, sodass dies eine erhöhte Konzentration von B-Zellen im peripheren Blut zur Folge hat (5,189,208–212).

Für die mit Beta-Interferonen bzw. Copaxone® behandelten Patienten konnte keine signifikante Veränderung der B-Zellzahl festgestellt werden. Diese Beobachtung ist konsistent mit den Daten von Traub et al. (2019) und Kemmerer et al. (2020): auch hier konnte kein Einfluss auf die Zahl der B-Zellen der mit Copaxone® bzw. Beta-Interferone behandelten Patienten verzeichnet werden (211,212).

#### 5.1.2 Signifikante Unterschiede der Zytokinkonzentrationen in B-Zellüberständen von MS-Patienten bei verschiedenen Immun-Therapien und Expression der Epitope für Reaktivitätsmarker C3, Nestin und GFAP in mit B-Zellüberständen inkubierten Astrozyten

Es konnten insgesamt sechs signifikante Veränderungen der Zytokinkonzentrationen bei MS-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollprobanden beobachtet werden. Diese Veränderungen konnten lediglich bei den mit Copaxone® behandelten Patienten detektiert werden. Ferner handelt es sich dabei ausschließlich um signifikant höhere Level der proinflammatorischen Zytokine TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  und des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10.

Diese Ergebnisse sind teilweise konsistent mit den Daten von Ireland et al. (2014) und Häusler et al. (2020): So wurden auch hier signifikant erhöhte IL-10 Level in B-Zellen von mit Glatirameracetat (GA, Copaxone®) behandelten MS-Patienten beobachtet (213,214). Gleiches gilt für B-Zellen von unbehandelten MS-Patienten, welche *in vitro* mit GA inkubiert wurden (215). Eine Durchflusszytometrie

konnte ferner bestätigen, dass GA keinen Einfluss auf die Zahl der IL-10 produzierenden B-Zellen nimmt, sondern auf dessen Fähigkeit, Zytokine zu sezernieren (190,213). Im Vergleich zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit, wurden in den Arbeiten von Ireland et al. (2014) und Häusler et al. (2020) darüber hinaus signifikant reduzierte Konzentrationen von IL-6, LT- $\alpha$  und TNF- $\alpha$  in (zumindest) einem Teil von mit GA behandelten MS-Patienten stammenden B-Zellen gefunden, was in direktem Gegensatz zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit steht: Hier konnten keinerlei signifikante Verminderungen der Konzentrationen bei mit Copaxone<sup>®</sup> behandelten MS-Patienten im Vergleich zu den gesunden Kontrollen festgestellt werden. Vielmehr wurden sogar signifikant höhere TNF- $\alpha$  Level bei mit GA behandelten Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe und den mit Tysabri<sup>®</sup> behandelten Patienten detektiert. Gleichzeitig muss jedoch auch betont werden, dass in dieser Arbeit nur eine geringe Stichprobenanzahl (n=2) von mit Copaxone<sup>®</sup> behandelten Patienten betrachtet werden konnte und diesbezüglich nur begrenzt Hypothesen formuliert werden können.

Die signifikante Verstärkung der IL-1 $\beta$ -Sekretion von B-Zellen unter Copaxone<sup>®</sup>-Behandlung im Vergleich zu allen anderen Gruppen (HC, IFN- $\beta$  und Tysabri<sup>®</sup>), steht jener von mit MS-Patienten isolierten mit GA inkubierten Monozyten gegenüber: Burger et al. (2009) konnten einen anti-inflammatorischen Einfluss von GA auf die Zytokinproduktion von isolierten humanen Monozyten feststellen, indem gezeigt werden konnte, dass GA keine IL-1 $\beta$ -Sekretion induziert (216). Ein ähnliches Ergebnis wurde 2011 von Ramgolam et al. veröffentlicht: Hier konnte eine signifikante Reduzierung der IL-1 $\beta$  Sekretion von B-Zellen aus IFN- $\beta$  behandelten MS-Patienten beobachtet werden (217). Auch diesbezüglich konnte in dieser Arbeit keine signifikante Verminderung festgestellt werden. Dennoch muss auch an dieser Stelle betont werden, dass dies mit der geringen Stichprobenmenge (n=3) zu begründen sein kann.

Die Epitop-Expression der Reaktivitätsmarker in mit B-Zellüberständen behandelten Astrozyten betreffend ist hervorzuheben, dass auch hier eine signifikant stärkere C3-Expression in jenen Astrozyten, welche mit von Copaxone<sup>®</sup> behandelten Patienten stammenden B-Zellüberständen inkubiert wurden, zu beobachten ist. Bei dieser Veränderung handelt es sich um eine signifikante Verstärkung in der Copaxone<sup>®</sup>-Gruppe gegenüber den gesunden Kontrollen als auch der mit Tysabri<sup>®</sup> behandelten MS-Patienten. Die Hochregulation von C3 ist ein typischer Indikator für eine Astroglieose in neuroinflammatorischen und-degenerativen Erkrankungen, wie Morbus Alzheimer, Morbus Parkinson oder der Multiplen Sklerose. Bei der akuten schubförmig-remittierenden MS ist dieser C3-positive, reaktive Astrozytenphänotyp häufig mit GFAP-positiven Astrozyten assoziiert und konnte insbesondere in demyelinisierenden Läsionen des ZNS gefunden werden (38). Dies könnte dazu beitragen, dass in jenen Plaques – in welchen sich auch unmyelinisierte Axone und Oligodendrozyten-Vorläuferzellen finden – eine Remyelinisierung verhindert und die Degeneration unterstützt wird (38). Für GFAP konnten in dieser Arbeit hingegen keine signifikanten Veränderungen in der Epitopexpression gefunden werden. Dies könnte einerseits aus dem geringen Stichprobenumfang resultieren. Möglicherweise hängt diese

Beobachtung aber auch damit zusammen, dass GFAP gegebenenfalls als alleiniger Marker zur adäquaten Bestimmung der Reaktivität der in dieser Arbeit verwandten Astrozyten nicht vollends ausreicht, da – je nach Astrozytenyp – die Betrachtung weiterer Marker (wie beispielsweise C3) sinnvoll sein kann (38,218).

Es lässt sich also zusammenfassend festhalten, dass die B-Zellüberstände der mit Copaxone® behandelten MS-Patienten sowohl erhöhte Konzentrationen des anti-inflammatorischen IL-10 als auch der proinflammatorischen Zytokine IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  aufweisen als auch parallel dazu eine verstärkte Expression des Reaktivitätsmarkers C3 in mit jenen Überständen behandelten Astrozyten.

### 5.1.3 Differentielle Genexpression in mit unterschiedlichen B-Zellüberständen behandelten Astrozyten

Es konnten allgemein keine signifikant unterschiedlich exprimierten Gene in Astrozyten, welche mit B-Zellüberständen von MS-Patienten und gesunden Kontrollen inkubiert wurden, detektiert werden. Der einzig signifikante Unterschied konnte beim Vergleich von unbehandelten Astrozyten (Inkubation mit Astrozyten-Medium) mit Astrozyten, welche mit B-Zellüberständen von MS-Patienten und Kontrollprobanden inkubiert wurden, beobachtet werden. Auch die Inkubation mit reinem B-Zellmedium (ohne das vorige Vorhandensein von B-Zellen) allein konnte einen Effekt auf die Genexpression der Astrozyten zeigen. Dies ist mit dem im B-Zellmedium enthaltenen Serum zu begründen, da dieses per se zur Aktivierung der Astrozyten beitragen kann (219,220). Die Zugabe des Serums ist allerdings zwingend notwendig für das Überleben der B-Lymphozytenkultur. In den weiteren Genexpressionsanalysen wurde sich daher auf den Vergleich von MS-Patienten und gesunden Kontrollprobanden konzentriert. Diese wurden dafür in ihre verschiedenen Therapieformen (IFN- $\beta$ , Copaxone® und Tysabri®) unterteilt und separat mit den gesunden Kontrollprobanden verglichen. Dabei konnten in allen Patientengruppen unterschiedlich exprimierte Gene verschiedener Zinkfingerproteine gefunden werden (ZNF69, ZNF154, ZNF534, ZNF726). Zinkfingerproteine fungieren in erster Linie als (DNA-bindende) Transkriptionsfaktoren und sind u.a. an der Regulierung der Immunantwort beteiligt (221). Des Weiteren konnten differentiell exprimierte Gene von Proteinen, welche am Zellzyklus und der -proliferation bzw. -differenzierung beteiligt sind, gefunden werden. Zu nennen ist an dieser Stelle u.a. Cyclin E (CCNE1), welches essenziell an der Regulation der G1- und S-Phase des Zellzyklus mitwirkt (201,222). Unter physiologischen Bedingungen wird die CCNE1-Expression transkriptionell streng reguliert; eine übermäßige Expression wird mit der Tumorgenese in Verbindung gebracht (222). Bei CREG2 und RELB hingegen handelt es sich um Proteine, welche an der Zellproliferation sowie an der

-differenzierung beteiligt sind. Während CREG2 spezifisch im limbischen System exprimiert wird, wirkt RELB als Untereinheit des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B – welches einen typischen Signalweg in der Neuroinflammation darstellt – an der Immunantwort mit, indem es u.a. die Differenzierung von Lymphozyten unterstützt (197,199,223). Proinflammatorische Stimuli, wie IL-1 $\beta$ , führen u.a. zu einer verstärkten Expression von RELB in Astrozyten bei EAE-Mäusen (223,224). Jedoch konnte auch eine verminderte Expression von RELB bei humanen *in vitro* Astrozyten, welche immunmodifizierend mit Isosorbid Dimethylfumarat (IDMF) behandelt wurden, gefunden werden (223,225). Eine Verminderung wurde auch in der vorliegenden Arbeit bei den mit IFN- $\beta$  behandelten MS-Patienten beobachtet. Ferner konnte in Astrozyten von mit Tysabri® behandelten Patienten eine verstärkte Expression des neurospezifischen Proteins MOBP gezeigt werden. MOBP ist ein zentraler Bestandteil der Myelinscheide und trägt zu ihrer Stabilisierung bei (204). Ihre Schädigung hingegen ist, wie in der Einleitung erklärt, ein zentrales Merkmal der Multiplen Sklerose. Daneben wurde in den mit Copaxone® behandelten Patienten eine verminderte Expression der spannungsgesteuerten Kaliumkanäle KCNE2 und KCNA7 beobachtet, wohingegen in derselben Patientengruppe eine verstärkte Expression des calciumbindenden Proteins HPCA gefunden werden konnte. Calciumionen wirken im neurobiologischen Kontext an einem breiten Aufgabenspektrum, wie der Regulation von Aktionspotenzialen und der Neurotransmitterfreisetzung sowie an der intrazellulären Kommunikation, mit, und sind von essenzieller Bedeutung für ein funktionierendes Nervensystem. Eine Überexpression von Ca<sup>2+</sup> hingegen kann pathologische Konsequenzen, wie den neuronalen Zelltod zur Folge haben (124).

Es bleibt allerdings hervorzuheben, dass es sich bei den genannten Veränderungen um keine signifikanten Unterschiede in der Genexpression handelt. Es scheint, als wären die individuellen Unterschiede in der Reaktion auf B-Zellüberstände von Person zu Person stärker ausgeprägt zu sein als die tatsächlichen Unterschiede in der Reaktion zwischen MS-Patienten und gesunden Probanden. An dieser Stelle könnte möglicherweise durch einen größeren Stichprobenumfang – und eine damit eventuell einhergehende kleinere Varianz – Abhilfe geschaffen werden. Damit wäre unter Umständen außerdem denkbar, dass sich – falls vorhanden – signifikante Unterschiede zwischen gesunden Probanden und MS-Patienten herauskristallisieren lassen.

## 5.2 Stärken und Limitationen der durchgeführten Arbeit

Zunächst ist zu erwähnen, dass es sich bei der vorliegenden Arbeit um eine erste Annäherung an die komplexe, multidimensionale Thematik der Beziehungen und Verflechtungen von B-Zellen und Astrozyten im Kontext der Multiplen Sklerose handelt. Die Rekrutierung der Patienten basierte ursprünglich auf ihrer Krankheitsaktivität (mild vs. hochaktiv). Während der Arbeiten und Analysen wurde jedoch deutlich, dass sich die Proben der Patienten mit einem milden Krankheitsverlauf je nach

Therapieform (IFN- $\beta$  oder Copaxone<sup>®</sup>) zum Teil deutlich unterscheiden, sodass bei der Gruppeneinteilung eine weitere Differenzierung zwischen IFN- $\beta$  und Copaxone<sup>®</sup> gemacht wurde. Dadurch verkleinerte sich jene Gruppe von ursprünglich 5 Patienten mit einem milden Verlauf für mit IFN- $\beta$  Behandelte auf 3 bzw. für mit Copaxone<sup>®</sup> Behandelte auf 2 Patienten. Hier ist hervorzuheben, dass die Rekrutierung weiterer Patienten zur Vergrößerung des Stichprobenumfangs für eine adäquate statistische Auswertung und Interpretation der Ergebnisse zukünftig vonnöten ist. Ein anderer Kritikpunkt ist das Vorhandensein von Serum im B-Zellmedium, welches per se einen Einfluss auf die Aktivierung der Astrozyten hat und die Genexpressionsanalyse erschwert. Für die angemessene Durchführung dieser Arbeit musste vorab zunächst jedoch eine zeitaufwendige Etablierung des B-Zell-Protokolls für die tatsächlichen Versuche mit den Patientenproben erfolgen. Im Rahmen dieser Masterarbeit war es zeitlich leider nicht möglich, darüber hinaus eine alternative, serumfreie Variante der Umsetzung zu etablieren.

Außerdem könnte in einem ausgedehnteren Zeitrahmen eine Untersuchung der Zusammensetzung der einzelnen B-Zellpopulationen (CD19<sup>+</sup>, CD27<sup>+</sup>) mittels Durchflusszytometrie (FACS) einen relevanten Aufschluss geben. In dieser Arbeit konnten die einzelnen B-Zell-Subtypen aufgrund von mangelndem zur Verfügung stehenden Zellmaterials sowie angesichts des zeitlichen Rahmens nicht untersucht werden. Hier stand die erfolgreiche Etablierung der B-Zellkultur im Vordergrund (s. Anhang).

Zusammenfassend muss dennoch betont werden, dass die Daten der vorliegenden Arbeit auf mRNA- und Proteinebene einen grundsätzlichen Effekt der B-Zellüberstände von MS-Patienten vs. gesunden Kontrollen auf die Astrozyten zeigen konnten und dies einen ersten Anfangspunkt für weitere, intensive Forschung darstellen kann.

### 5.3 Ausblick auf weiterführende Forschungsbereiche und klinische Anwendungen

Die unter 5.2 erwähnten Kritikpunkte sollten im Rahmen eines längeren Forschungszeitraums umsetzbar sein. Die etablierten Versuchsabläufe können dabei als Basis für weitere, umfassende Forschungsarbeiten zum Einsatz kommen und beispielsweise die Konzentration auf eine mögliche Etablierung einer serumfreien B-Zellkultur erleichtern.

Die Ergebnisse dieser Arbeit machen die unterschiedlichen Einflüsse verschiedener immunmodifizierender Therapien bei divergenten Krankheitsverläufen in der Multiplen Sklerose auf B-Zell-Ebene deutlich. So können die individuellen Zytokinsekretionsprofile möglicherweise zur Abstimmung auf eine zu bevorzugende, spezifische Therapieform beitragen. Des Weiteren zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit unterschiedliche Hoch- und Herunterregulierungen der Genexpressionen in Astrozyten, welche mit B-Zellüberständen von MS-Patienten behandelt wurden im Vergleich zu jenen, welche mit Überständen von gesunden Kontrollprobanden inkubiert wurden. Je nach Therapieform

handelt es sich um unterschiedlich exprimierte Gene, welche für Proteine, die u.a. die Regulation des Zellzyklus oder die Bestandteile der Myelinscheide umfassen, sowie als Transkriptionsfaktoren fungieren, codieren.

Alles in allem konnte gezeigt werden, dass die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit die Annahme der pathophysiologischen Relevanz von B-Zellen im Kontext der Multiplen Sklerose unterstützen und dies einen vielversprechenden Forschungsansatz für weitere, tiefgreifende Arbeiten – wie der Untersuchung von zugrundeliegenden Pathomechanismen – in der Grundlagenforschung der MS darstellt.

## Danksagung

Zuallererst möchte ich mich herzlich bei Dr. Volker Siffrin bedanken, der mir die Forschung an einem persönlichen Thema in seiner Arbeitsgruppe ermöglicht und mich während der Durchführung stets mit Ratschlägen unterstützt hat.

Außerdem danke ich Prof. Dr. Peter Robin Hiesinger, der sich bereit erklärte, die Zweitbegutachtung meiner Arbeit zu übernehmen.

Ferner gilt mein Dank Dr. Marlen Alisch, die mich über den gesamten Zeitraum bei der Umsetzung der Labor- und Analysearbeiten geduldig unterstützt und eingearbeitet hat.

Ein besonderes Dankeschön gilt auch für Jana Engelmann und Andrea Behm, die mir während meiner Laborarbeiten stets mit Rat und Tat zur Seite standen.

Ein weiterer Dank geht an Dr. Jessy Chen für die zahlreichen Blutentnahmen der Patienten.

Vor allem aber möchte ich mich bei der gesamten Arbeitsgruppe für die erneute herzliche Aufnahme in ihr Team bedanken. Ich habe mich während des gesamten Zeitraums äußerst wohl, sehr willkommen und immer unterstützt gefühlt.

## Referenzen

1. Number of people with MS | Atlas of MS [Internet]. [cited 2023 May 23]. Available from: <https://www.atlasofms.org/map/global/epidemiology/number-of-people-with-ms#about>
2. Walton C, King R, Rechtman L, Kaye W, Leray E, Marrie RA, et al. Rising prevalence of multiple sclerosis worldwide: Insights from the Atlas of MS, third edition. *Mult Scler*. 2020 Dec;26(14):1816–21.
3. Thompson AJ, Banwell BL, Barkhof F, Carroll WM, Coetzee T, Comi G, et al. Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria. *The Lancet Neurology*. 2018 Feb 1;17(2):162–73.
4. Schwenkenbecher P, Wurster U, Konen FF, Gingele S, Sühs KW, Wattjes MP, et al. Impact of the McDonald Criteria 2017 on Early Diagnosis of Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis. *Frontiers in Neurology* [Internet]. 2019 [cited 2023 May 24];10. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fneur.2019.00188>
5. DGN One | Leitlinie Details [Internet]. [cited 2023 Jul 8]. Available from: <https://dgn.org/leitlinie/diagnose-und-therapie-der-multiplen-sklerose-neuromyelitis-optica-spektrum-erkrankungen-und-mog-igg-assoziierten-erkrankungen>
6. Hollenbach JA, Oksenberg JR. The Immunogenetics of Multiple Sclerosis: A Comprehensive Review. *J Autoimmun*. 2015 Nov;64:13–25.
7. Dobson R, Giovannoni G. Multiple sclerosis – a review. *European Journal of Neurology*. 2019;26(1):27–40.
8. Voskuhl RR, Sawalha AH, Itoh Y. Sex chromosome contributions to sex differences in multiple sclerosis susceptibility and progression. *Mult Scler*. 2018 Jan;24(1):22–31.
9. Moutsianas L, Jostins L, Beecham AH, Dilthey AT, Xifara DK, Ban M, et al. Class II HLA interactions modulate genetic risk for multiple sclerosis. *Nat Genet*. 2015 Oct;47(10):1107–13.
10. Ramagopalan SV, Dobson R, Meier UC, Giovannoni G. Multiple sclerosis: risk factors, prodromes, and potential causal pathways. *Lancet Neurol*. 2010 Jul;9(7):727–39.
11. Hernán MA, Olek MJ, Ascherio A. Cigarette smoking and incidence of multiple sclerosis. *Am J Epidemiol*. 2001 Jul 1;154(1):69–74.
12. Salzer J, Hallmans G, Nyström M, Stenlund H, Wadell G, Sundström P. Vitamin D as a protective factor in multiple sclerosis. *Neurology*. 2012 Nov 20;79(21):2140–5.
13. Simpson S, Taylor B, Blizzard L, Ponsonby AL, Pittas F, Tremlett H, et al. Higher 25-hydroxyvitamin D is associated with lower relapse risk in multiple sclerosis. *Ann Neurol*. 2010 Aug;68(2):193–203.
14. Simpson S, Wang W, Otahal P, Blizzard L, van der Mei IAF, Taylor BV. Latitude continues to be significantly associated with the prevalence of multiple sclerosis: an updated meta-analysis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2019 Nov;90(11):1193–200.
15. Ascherio A, Munger KL. Environmental risk factors for multiple sclerosis. Part I: the role of infection. *Ann Neurol*. 2007 Apr;61(4):288–99.

16. Simon KC, O'Reilly EJ, Munger KL, Finerty S, Morgan AJ, Ascherio A. Epstein-Barr virus neutralizing antibody levels and risk of multiple sclerosis. *Mult Scler*. 2012 Aug;18(8):1185–7.
17. Kurtzke JF, Beebe GW, Norman JE. Epidemiology of multiple sclerosis in US veterans: III. Migration and the risk of MS. *Neurology*. 1985 May;35(5):672–8.
18. Gale CR, Martyn CN. Migrant studies in multiple sclerosis. *Progress in Neurobiology*. 1995 Nov 1;47(4):425–48.
19. Ascherio A. Environmental factors in multiple sclerosis. *Expert Rev Neurother*. 2013 Dec;13(12 Suppl):3–9.
20. Yamout BI, Alroughani R. Multiple Sclerosis. *Semin Neurol*. 2018 Apr;38(02):212–25.
21. Jakimovski D, Weinstock-Guttman B, Ramanathan M, Kolb C, Hojnacki D, Minagar A, et al. Ocrelizumab: a B-cell depleting therapy for multiple sclerosis. *Expert Opin Biol Ther*. 2017 Sep;17(9):1163–72.
22. Myhr KM, Torkildsen Ø, Lossius A, Bø L, Holmøy T. B cell depletion in the treatment of multiple sclerosis. *Expert Opin Biol Ther*. 2019 Mar;19(3):261–71.
23. Gelfand JM, Cree BAC, Hauser SL. Ocrelizumab and Other CD20+ B-Cell-Depleting Therapies in Multiple Sclerosis. *Neurotherapeutics*. 2017 Oct;14(4):835–41.
24. Greenfield AL, Hauser SL. B-cell Therapy for Multiple Sclerosis: Entering an era. *Ann Neurol*. 2018 Jan;83(1):13–26.
25. Prineas JW, Graham JS. Multiple sclerosis: Capping of surface immunoglobulin G on macrophages engaged in myelin breakdown. *Annals of Neurology*. 1981;10(2):149–58.
26. 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 Jun;47(6):707–17.
27. Prineas JW, Kwon EE, Cho ES, Sharer LR, Barnett MH, Oleszak EL, et al. Immunopathology of secondary-progressive multiple sclerosis. *Ann Neurol*. 2001 Nov;50(5):646–57.
28. Lassmann H. Multiple Sclerosis Pathology. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2018 Mar;8(3):a028936.
29. Charcot JM. Leçons sur les maladies du système nerveux faites a la salpêtrière. V. Adrien Delahaye; 1877. 530 p.
30. Brownell B, Hughes JT. The distribution of plaques in the cerebrum in multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1962 Nov;25(4):315–20.
31. Frischer JM, Bramow S, Dal-Bianco A, Lucchinetti CF, Rauschka H, Schmidbauer M, et al. The relation between inflammation and neurodegeneration in multiple sclerosis brains. *Brain*. 2009 May;132(Pt 5):1175–89.
32. Galic MA, Riazi K, Pittman QJ. Cytokines and brain excitability. *Front Neuroendocrinol*. 2012 Jan;33(1):116–25.

33. Bechmann I, Galea I, Perry VH. What is the blood-brain barrier (not)? *Trends Immunol.* 2007 Jan;28(1):5–11.
34. Dotiwala AK, McCausland C, Samra NS. Anatomy, Head and Neck, Blood Brain Barrier. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2020 [cited 2020 Apr 15]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK519556/>
35. Obermeier B, Daneman R, Ransohoff RM. Development, maintenance and disruption of the blood-brain barrier. *Nat Med.* 2013 Dec;19(12):1584–96.
36. Correale J, Villa A. The blood-brain-barrier in multiple sclerosis: functional roles and therapeutic targeting. *Autoimmunity.* 2007 Mar;40(2):148–60.
37. Hanisch UK. Microglia as a source and target of cytokines. *Glia.* 2002 Nov;40(2):140–55.
38. Liddel SA, Guttenplan KA, Clarke LE, Bennett FC, Bohlen CJ, Schirmer L, et al. Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. *Nature.* 2017 Jan 26;541(7638):481–7.
39. 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 Jan 29;338(5):278–85.
40. Ransohoff RM. How neuroinflammation contributes to neurodegeneration. *Science.* 2016 Aug 19;353(6301):777–83.
41. Was ist MS? [Internet]. [cited 2023 May 22]. Available from: <https://www.dmsg.de/multiple-sklerose/was-ist-ms>
42. Iwanowski P, Losy J. Immunological differences between classical phenotypes of multiple sclerosis. *Journal of the Neurological Sciences.* 2015 Feb 15;349(1):10–4.
43. Maier S, Barcutean L, Andone S, Manu D, Sarmasan E, Bajko Z, et al. Recent Progress in the Identification of Early Transition Biomarkers from Relapsing-Remitting to Progressive Multiple Sclerosis. *Int J Mol Sci.* 2023 Feb 22;24(5):4375.
44. Confavreux C, Vukusic S, Moreau T, Adeleine P. Relapses and Progression of Disability in Multiple Sclerosis. *New England Journal of Medicine.* 2000 Nov 16;343(20):1430–8.
45. Leray E, Yaouanq J, Le Page E, Coustans M, Laplaud D, Oger J, et al. Evidence for a two-stage disability progression in multiple sclerosis. *Brain.* 2010 Jul;133(Pt 7):1900–13.
46. Lassmann H. Pathology and disease mechanisms in different stages of multiple sclerosis. *Journal of the Neurological Sciences.* 2013 Oct 15;333(1):1–4.
47. Trapp BD, Nave KA. Multiple sclerosis: an immune or neurodegenerative disorder? *Annu Rev Neurosci.* 2008;31:247–69.
48. Bartfai T, Schultzberg M. Cytokines in neuronal cell types. *Neurochem Int.* 1993 May;22(5):435–44.
49. Oppenheim JJ. Cytokines: past, present, and future. *Int J Hematol.* 2001 Jul;74(1):3–8.
50. Roeb E, Rose-John S. Zytokine: Biologie und therapeutische Relevanz. *Dtsch Med Wochenschr.* 1996;121(24):803–9.

51. Bedeutung von Zytokinbestimmungen in der umweltmedizinischen Praxis. Bundesgesundheitsbl - Gesundheitsforsch - Gesundheitsschutz. 2004 Jan 1;47(1):73–9.
52. Rose-John S. Interleukin-6 Family Cytokines. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2018 Feb;10(2):a028415.
53. Liu C, Chu D, Kalantar-Zadeh K, George J, Young HA, Liu G. Cytokines: From Clinical Significance to Quantification. Adv Sci (Weinh). 2021 Jun 10;8(15):2004433.
54. Dinarello CA. Biologic basis for interleukin-1 in disease. Blood. 1996 Mar 15;87(6):2095–147.
55. Lopez-Castejon G, Brough D. Understanding the mechanism of IL-1 $\beta$  secretion. Cytokine Growth Factor Rev. 2011 Aug;22(4):189–95.
56. Mantovani A, Dinarello CA, Molgora M, Garlanda C. IL-1 and related cytokines in innate and adaptive immunity in health and disease. Immunity. 2019 Apr 16;50(4):778–95.
57. Brough D, Rothwell NJ. Caspase-1-dependent processing of pro-interleukin-1 $\beta$  is cytosolic and precedes cell death. J Cell Sci. 2007 Mar 1;120(Pt 5):772–81.
58. Mariathasan S, Newton K, Monack DM, Vucic D, French DM, Lee WP, et al. Differential activation of the inflammasome by caspase-1 adaptors ASC and Ipaf. Nature. 2004 Jul;430(6996):213–8.
59. Schroder K, Tschopp J. The Inflammasomes. Cell. 2010 Mar 19;140(6):821–32.
60. Gupta P, Barthwal MK. IL-1  $\beta$  genesis: the art of regulating the regulator. Cell Mol Immunol. 2018 Nov;15(11):998–1000.
61. Singhal G, Jaehne EJ, Corrigan F, Toben C, Baune BT. Inflammasomes in neuroinflammation and changes in brain function: a focused review. Front Neurosci. 2014 Oct 7;8:315.
62. Garber C, Vasek MJ, Vollmer LL, Sun T, Jiang X, Klein RS. Astrocytes decrease adult neurogenesis during virus-induced memory dysfunction via interleukin-1. Nat Immunol. 2018 Feb;19(2):151–61.
63. Kishimoto T. INTERLEUKIN-6: From Basic Science to Medicine—40 Years in Immunology. Annual Review of Immunology. 2005;23(1):1–21.
64. Kishimoto T. Factors affecting B-cell growth and differentiation. Annu Rev Immunol. 1985;3:133–57.
65. Tanaka T, Narazaki M, Kishimoto T. Interleukin (IL-6) Immunotherapy. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2018 Aug;10(8):a028456.
66. Akira S, Taga T, Kishimoto T. Interleukin-6 in biology and medicine. Adv Immunol. 1993;54:1–78.
67. Rothaug M, Becker-Pauly C, Rose-John S. The role of interleukin-6 signaling in nervous tissue. Biochim Biophys Acta. 2016 Jun;1863(6 Pt A):1218–27.
68. Rose-John S. Interleukin-6 signalling in health and disease. F1000Res. 2020 Aug 20;9:F1000 Faculty Rev-1013.
69. Kang S, Tanaka T, Narazaki M, Kishimoto T. Targeting Interleukin-6 Signaling in Clinic. Immunity. 2019 Apr 16;50(4):1007–23.

70. Tanaka T, Narazaki M, Kishimoto T. IL-6 in Inflammation, Immunity, and Disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2014 Oct;6(10):a016295.
71. Akira S, Kishimoto T. IL-6 and NF-IL6 in Acute-Phase Response and Viral Infection. *Immunological Reviews.* 1992;127(1):25–50.
72. Anderson P. Post-transcriptional control of cytokine production. *Nat Immunol.* 2008 Apr;9(4):353–9.
73. Cacquevel M, Lebeurrier N, Chéenne S, Vivien D. Cytokines in neuroinflammation and Alzheimer’s disease. *Curr Drug Targets.* 2004 Aug;5(6):529–34.
74. Dilger RN, Johnson RW. Aging, microglial cell priming, and the discordant central inflammatory response to signals from the peripheral immune system. *J Leukoc Biol.* 2008 Oct;84(4):932–9.
75. Dong Y, Benveniste EN. Immune function of astrocytes. *Glia.* 2001 Nov;36(2):180–90.
76. Ouyang W, O’Garra A. IL-10 Family Cytokines IL-10 and IL-22: from Basic Science to Clinical Translation. *Immunity.* 2019 Apr 16;50(4):871–91.
77. Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J Exp Med.* 1989 Dec 1;170(6):2081–95.
78. Saraiva M, Vieira P, O’Garra A. Biology and therapeutic potential of interleukin-10. *J Exp Med.* 2019 Oct 14;217(1):e20190418.
79. Saraiva M, O’Garra A. The regulation of IL-10 production by immune cells. *Nat Rev Immunol.* 2010 Mar;10(3):170–81.
80. Gabryšová L, Howes A, Saraiva M, O’Garra A. The regulation of IL-10 expression. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2014;380:157–90.
81. Lobo-Silva D, Carriche GM, Castro AG, Roque S, Saraiva M. Balancing the immune response in the brain: IL-10 and its regulation. *J Neuroinflammation.* 2016 Nov 24;13:297.
82. Ozenci V, Kouwenhoven M, Huang YM, Xiao B, Kivisäkk P, Fredrikson S, et al. Multiple sclerosis: levels of interleukin-10-secreting blood mononuclear cells are low in untreated patients but augmented during interferon-beta-1b treatment. *Scand J Immunol.* 1999 May;49(5):554–61.
83. Hutchins AP, Diez D, Miranda-Saavedra D. The IL-10/STAT3-mediated anti-inflammatory response: recent developments and future challenges. *Brief Funct Genomics.* 2013 Nov;12(6):489–98.
84. Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O’Garra A. Interleukin-10 and the Interleukin-10 Receptor. *Annual Review of Immunology.* 2001;19(1):683–765.
85. Balasingam V, Yong VW. Attenuation of astroglial reactivity by interleukin-10. *J Neurosci.* 1996 May 1;16(9):2945–55.
86. Ledebøer A, Brevé JJP, Wierinckx A, van der Jagt S, Bristow AF, Leysen JE, et al. Expression and regulation of interleukin-10 and interleukin-10 receptor in rat astroglial and microglial cells. *Eur J Neurosci.* 2002 Oct;16(7):1175–85.

87. Norden DM, Fenn AM, Dugan A, Godbout JP. TGF $\beta$  produced by IL-10 redirected astrocytes attenuates microglial activation. *Glia*. 2014 Jun;62(6):881–95.
88. Zhou Z, Peng X, Insolera R, Fink DJ, Mata M. Interleukin-10 provides direct trophic support to neurons. *J Neurochem*. 2009 Sep;110(5):1617–27.
89. Perez-Asensio FJ, Perpiñá U, Planas AM, Pozas E. Interleukin-10 regulates progenitor differentiation and modulates neurogenesis in adult brain. *J Cell Sci*. 2013 Sep 15;126(Pt 18):4208–19.
90. Perry SW, Dewhurst S, Bellizzi MJ, Gelbard HA. Tumor necrosis factor-alpha in normal and diseased brain: Conflicting effects via intraneuronal receptor crosstalk? *J Neurovirol*. 2002 Dec;8(6):611–24.
91. Idriss HT, Naismith JH. TNF $\alpha$  and the TNF receptor superfamily: Structure-function relationship(s). *Microscopy Research and Technique*. 2000;50(3):184–95.
92. Krueger JM, Fang J, Taishi P, Chen Z, Kushikata T, Gardi J. Sleep. A physiologic role for IL-1 beta and TNF-alpha. *Ann N Y Acad Sci*. 1998 Sep 29;856:148–59.
93. Wride MA, Sanders EJ. Potential roles for tumour necrosis factor alpha during embryonic development. *Anat Embryol (Berl)*. 1995 Jan;191(1):1–10.
94. Fiers W. Tumor necrosis factor. Characterization at the molecular, cellular and in vivo level. *FEBS Lett*. 1991 Jul 22;285(2):199–212.
95. Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, Green S, Fiore N, Williamson B. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1975 Sep;72(9):3666–70.
96. You K, Gu H, Yuan Z, Xu X. Tumor Necrosis Factor Alpha Signaling and Organogenesis. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* [Internet]. 2021 [cited 2023 Jun 14];9. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcell.2021.727075>
97. Jang D in, Lee AH, Shin HY, Song HR, Park JH, Kang TB, et al. The Role of Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF- $\alpha$ ) in Autoimmune Disease and Current TNF- $\alpha$  Inhibitors in Therapeutics. *Int J Mol Sci*. 2021 Mar 8;22(5):2719.
98. Horiuchi T, Mitoma H, Harashima S ichi, Tsukamoto H, Shimoda T. Transmembrane TNF- $\alpha$ : structure, function and interaction with anti-TNF agents. *Rheumatology (Oxford)*. 2010 Jul;49(7):1215–28.
99. Breder CD, Tsujimoto M, Terano Y, Scott DW, Saper CB. Distribution and characterization of tumor necrosis factor- $\alpha$ -like immunoreactivity in the murine central nervous system. *Journal of Comparative Neurology*. 1993;337(4):543–67.
100. Vandenabeele P, Declercq W, Beyaert R, Fiers W. Two tumour necrosis factor receptors: structure and function. *Trends in Cell Biology*. 1995 Oct 1;5(10):392–9.
101. Brenner D, Blaser H, Mak TW. Regulation of tumour necrosis factor signalling: live or let die. *Nat Rev Immunol*. 2015 Jun;15(6):362–74.
102. Sands BE, Kaplan GG. The role of TNFalpha in ulcerative colitis. *J Clin Pharmacol*. 2007 Aug;47(8):930–41.

103. Levin AD, Wildenberg ME, van den Brink GR. Mechanism of Action of Anti-TNF Therapy in Inflammatory Bowel Disease. *J Crohns Colitis*. 2016 Aug;10(8):989–97.
104. Izquierdo E, Cañete JD, Celis R, Del Rey MJ, Usategui A, Marsal S, et al. Synovial fibroblast hyperplasia in rheumatoid arthritis: clinicopathologic correlations and partial reversal by anti-tumor necrosis factor therapy. *Arthritis Rheum*. 2011 Sep;63(9):2575–83.
105. Raine CS. Multiple sclerosis: TNF revisited, with promise. *Nat Med*. 1995 Mar;1(3):211–4.
106. Raine CS. The Norton Lecture: a review of the oligodendrocyte in the multiple sclerosis lesion Presented at the Albert Einstein College of Medicine, Bronx, NY, on February 3, 1997 in honor of the retirement of Dr. William T. Norton, a pioneer neurochemist in the myelin/oligodendrocyte arena.1. *Journal of Neuroimmunology*. 1997 Aug 1;77(2):135–52.
107. Angeles Muñoz-Fernández M, Fresno M. The role of tumour necrosis factor, interleukin 6, interferon- $\gamma$  and inducible nitric oxide synthase in the development and pathology of the nervous system. *Progress in Neurobiology*. 1998 Oct 1;56(3):307–40.
108. Pan W, Zadina JE, Harlan RE, Weber JT, Banks WA, Kastin AJ. Tumor necrosis factor-alpha: a neuromodulator in the CNS. *Neurosci Biobehav Rev*. 1997 Sep;21(5):603–13.
109. Shrikant P, Il Yup Chung, Ballestas ME, Benveniste EN. Regulation of intercellular adhesion molecule-1 gene expression by tumor necrosis factor- $\alpha$ , interleukin-1 $\beta$ , and interferon- $\gamma$  in astrocytes. *Journal of Neuroimmunology*. 1994 May 1;51(2):209–20.
110. Akassoglou K, Probert L, Kontogeorgos G, Kollias G. Astrocyte-specific but not neuron-specific transmembrane TNF triggers inflammation and degeneration in the central nervous system of transgenic mice. *The Journal of Immunology*. 1997 Jan 1;158(1):438–45.
111. Williams TW, Granger GA. Lymphocyte in vitro Cytotoxicity: Lymphotoxins of Several Mammalian Species. *Nature*. 1968 Sep;219(5158):1076–7.
112. Aggarwal BB. Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol*. 2003 Sep;3(9):745–56.
113. Aggarwal BB, Kohr WJ, Hass PE, Moffat B, Spencer SA, Henzel WJ, et al. Human tumor necrosis factor. Production, purification, and characterization. *J Biol Chem*. 1985 Feb 25;260(4):2345–54.
114. Aggarwal BB, Eessalu TE, Hass PE. Characterization of receptors for human tumour necrosis factor and their regulation by  $\gamma$ -interferon. *Nature*. 1985 Dec;318(6047):665–7.
115. Mauri DN, Ebner R, Montgomery RI, Kochel KD, Cheung TC, Yu GL, et al. LIGHT, a new member of the TNF superfamily, and lymphotoxin alpha are ligands for herpesvirus entry mediator. *Immunity*. 1998 Jan;8(1):21–30.
116. Calmon-Hamaty F, Combe B, Hahne M, Morel J. Lymphotoxin  $\alpha$  revisited: general features and implications in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2011;13(4):232.
117. Ware CF. Network communications: lymphotoxins, LIGHT, and TNF. *Annu Rev Immunol*. 2005;23:787–819.
118. Suen WE, Bergman CM, Hjelmström P, Ruddle NH. A Critical Role for Lymphotoxin in Experimental Allergic Encephalomyelitis. *Journal of Experimental Medicine*. 1997 Oct 20;186(8):1233–40.

119. Pimentel-Muiños FX, Muñoz-Fernández MA, Fresno M. Control of T lymphocyte activation and IL-2 receptor expression by endogenously secreted lymphokines. *The Journal of Immunology*. 1994 Jun 15;152(12):5714–22.
120. Körner H, Goodsall AL, Lemckert FA, Scallon BJ, Ghayeb J, Ford AL, et al. Unimpaired autoreactive T-cell traffic within the central nervous system during tumor necrosis factor receptor-mediated inhibition of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1995 Nov 21;92(24):11066–70.
121. Ruddle NH. Tumor necrosis factor (TNF- $\alpha$ ) and lymphotoxin (TNF- $\beta$ ). *Current Opinion in Immunology*. 1992 Jun 1;4(3):327–32.
122. English BK, Weaver WM, Wilson CB. Differential regulation of lymphotoxin and tumor necrosis factor genes in human T lymphocytes. *J Biol Chem*. 1991 Apr 15;266(11):7108–13.
123. Ferreri NR, Sarr T, Askenase PW, Ruddle NH. Molecular regulation of tumor necrosis factor-alpha and lymphotoxin production in T cells. Inhibition by prostaglandin E2. *J Biol Chem*. 1992 May 5;267(13):9443–9.
124. Murphy KM. *Janeway Immunologie / Kenneth Murphy, Casey Weaver ; mit Beiträgen von Allan Mowat, Leslie Berg und David Chaplin ; aus dem Englischen übersetzt von Lothar Seidler*. 9. Auflage. Berlin: Springer Spektrum; 2018. (Lehrbuch).
125. Bröker B, Schütt C, Fleischer B. *Grundwissen Immunologie*. 4. Aufl. 2019. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg;
126. Arneth BM. Impact of B cells to the pathophysiology of multiple sclerosis. *Journal of Neuroinflammation*. 2019 Jun 25;16(1):128.
127. Freedman MS, Thompson EJ, Deisenhammer F, Giovannoni G, Grimsley G, Keir G, et al. Recommended Standard of Cerebrospinal Fluid Analysis in the Diagnosis of Multiple Sclerosis: A Consensus Statement. *Archives of Neurology*. 2005 Jun 1;62(6):865–70.
128. Siritho S, Freedman MS. The prognostic significance of cerebrospinal fluid in multiple sclerosis. *Journal of the Neurological Sciences*. 2009 Apr 15;279(1):21–5.
129. Michel L, Touil H, Pikor NB, Gommerman JL, Prat A, Bar-Or A. B Cells in the Multiple Sclerosis Central Nervous System: Trafficking and Contribution to CNS-Compartmentalized Inflammation. *Front Immunol [Internet]*. 2015 Dec 24 [cited 2023 Jun 28];6. Available from: <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fimmu.2015.00636/abstract>
130. Genain CP, Cannella B, Hauser SL, Raine CS. Identification of autoantibodies associated with myelin damage in multiple sclerosis. *Nat Med*. 1999 Feb;5(2):170–5.
131. Blauth K, Soltys J, Matschulat A, Reiter CR, Ritchie A, Baird NL, et al. Antibodies produced by clonally expanded plasma cells in multiple sclerosis cerebrospinal fluid cause demyelination of spinal cord explants. *Acta Neuropathol*. 2015 Dec 1;130(6):765–81.
132. Büdingen HC von, Kuo TC, Sirota M, Belle CJ van, Apeltsin L, Glanville J, et al. B cell exchange across the blood-brain barrier in multiple sclerosis. *J Clin Invest*. 2012 Dec 3;122(12):4533–43.
133. Palanichamy A, Apeltsin L, Kuo TC, Sirota M, Wang S, Pitts SJ, et al. Immunoglobulin class-switched B cells form an active immune axis between CNS and periphery in multiple sclerosis. *Science Translational Medicine*. 2014 Aug 6;6(248):248ra106–248ra106.

134. 2 Blut-Hirn-Schranke und Blut-Liquor-Schrankenfunktion [Internet]. 2006th ed. Neurologische Labordiagnostik. Thieme Verlag; 2006 [cited 2023 Jun 29]. Available from: <https://www.thieme-connect.de/products/ebooks/lookinside/10.1055/b-0034-24929>
135. Ifergan I, Kebir H, Alvarez JI, Marceau G, Bernard M, Bourbonnière L, et al. Central nervous system recruitment of effector memory CD8+ T lymphocytes during neuroinflammation is dependent on  $\alpha 4$  integrin. *Brain*. 2011 Dec 1;134(12):3560–77.
136. Cayrol R, Wosik K, Berard JL, Dodelet-Devillers A, Ifergan I, Kebir H, et al. Activated leukocyte cell adhesion molecule promotes leukocyte trafficking into the central nervous system. *Nat Immunol*. 2008 Feb;9(2):137–45.
137. Alvarez JI, Cayrol R, Prat A. Disruption of central nervous system barriers in multiple sclerosis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*. 2011 Feb 1;1812(2):252–64.
138. Michel L, Grasmuck C, Charabati M, Lécuyer MA, Zandee S, Dhaeze T, et al. Activated leukocyte cell adhesion molecule regulates B lymphocyte migration across central nervous system barriers. *Science Translational Medicine*. 2019 Nov 13;11(518):eaaw0475.
139. Pöllinger B, Krishnamoorthy G, Berer K, Lassmann H, Bösl MR, Dunn R, et al. Spontaneous relapsing-remitting EAE in the SJL/J mouse: MOG-reactive transgenic T cells recruit endogenous MOG-specific B cells. *Journal of Experimental Medicine*. 2009 Jun 1;206(6):1303–16.
140. Harp CT, Lovett-Racke AE, Racke MK, Frohman EM, Monson NL. Impact of myelin-specific antigen presenting B cells on T cell activation in multiple sclerosis. *Clinical Immunology*. 2008 Sep 1;128(3):382–91.
141. Harp CT, Ireland S, Davis LS, Remington G, Cassidy B, Cravens PD, et al. Memory B cells from a subset of treatment-naïve relapsing-remitting multiple sclerosis patients elicit CD4+ T-cell proliferation and IFN- $\gamma$  production in response to myelin basic protein and myelin oligodendrocyte glycoprotein. *European Journal of Immunology*. 2010;40(10):2942–56.
142. Ligocki AJ, Rivas JR, Rounds WH, Guzman AA, Li M, Spadaro M, et al. A Distinct Class of Antibodies May Be an Indicator of Gray Matter Autoimmunity in Early and Established Relapsing Remitting Multiple Sclerosis Patients. *ASN Neuro*. 2015 Oct 1;7(5):1759091415609613.
143. Duddy ME, Alter A, Bar-Or A. Distinct Profiles of Human B Cell Effector Cytokines: A Role in Immune Regulation?1. *The Journal of Immunology*. 2004 Mar 15;172(6):3422–7.
144. Barr TA, Shen P, Brown S, Lampropoulou V, Roch T, Lawrie S, et al. B cell depletion therapy ameliorates autoimmune disease through ablation of IL-6–producing B cells. *Journal of Experimental Medicine*. 2012 Apr 30;209(5):1001–10.
145. Dang VD, Hilgenberg E, Ries S, Shen P, Fillatreau S. From the regulatory functions of B cells to the identification of cytokine-producing plasma cell subsets. *Current Opinion in Immunology*. 2014 Jun 1;28:77–83.
146. Duddy M, Niino M, Adatia F, Hebert S, Freedman M, Atkins H, et al. Distinct Effector Cytokine Profiles of Memory and Naive Human B Cell Subsets and Implication in Multiple Sclerosis. *The Journal of Immunology*. 2007 May 15;178(10):6092–9.
147. Bar-Or A, Fawaz L, Fan B, Darlington PJ, Rieger A, Ghorayeb C, et al. Abnormal B-cell cytokine responses a trigger of T-cell–mediated disease in MS? *Annals of Neurology*. 2010;67(4):452–61.

148. Khan AW, Farooq M, Hwang MJ, Haseeb M, Choi S. Autoimmune Neuroinflammatory Diseases: Role of Interleukins. *Int J Mol Sci.* 2023 Apr 27;24(9):7960.
149. Ragheb S, Li Y, Simon K, VanHaerents S, Galimberti D, De Riz M, et al. Multiple sclerosis: BAFF and CXCL13 in cerebrospinal fluid. *Mult Scler.* 2011 Jul 1;17(7):819–29.
150. Hauser SL, Cree BAC. Treatment of Multiple Sclerosis: A Review. *Am J Med.* 2020 Dec;133(12):1380-1390.e2.
151. Hauser SL, Waubant E, Arnold DL, Vollmer T, Antel J, Fox RJ, et al. B-cell depletion with rituximab in relapsing-remitting multiple sclerosis. *N Engl J Med.* 2008 Feb 14;358(7):676–88.
152. Hauser SL, Bar-Or A, Comi G, Giovannoni G, Hartung HP, Hemmer B, et al. Ocrelizumab versus Interferon Beta-1a in Relapsing Multiple Sclerosis. *N Engl J Med.* 2017 Jan 19;376(3):221–34.
153. Margoni M, Preziosa P, Filippi M, Rocca MA. Anti-CD20 therapies for multiple sclerosis: current status and future perspectives. *J Neurol.* 2022;269(3):1316–34.
154. Piccio L, Naismith RT, Trinkaus K, Klein RS, Parks BJ, Lyons JA, et al. Changes in B- and T-Lymphocyte and Chemokine Levels With Rituximab Treatment in Multiple Sclerosis. *Archives of Neurology.* 2010 Jun 1;67(6):707–14.
155. Kettenmann H, Verkhratsky A. Neuroglia, der lebende Nervenkit. *Fortschr Neurol Psychiatr.* 2011 Oct;79(10):588–97.
156. Kettenmann H, Ransom BR, Kettenmann H, Ransom BR, editors. *Neuroglia. Third Edition, Third Edition.* Oxford, New York: Oxford University Press; 2013. 864 p.
157. Verkhratsky A, Butt A. *Glial Neurobiology: A Textbook.* John Wiley & Sons; 2007. 232 p.
158. via medici: leichter lernen - mehr verstehen [Internet]. [cited 2023 Jul 3]. Gliazellen. Available from: <https://viamedici.thieme.de/lernmodul/546328/530399/gliazellen>
159. Communications E. Duale Reihe Biochemie [Internet]. [cited 2023 Jul 3]. Available from: [https://eref.thieme.de/ebooks/cs\\_18124224#/ebook\\_cs\\_18124224\\_cs18346](https://eref.thieme.de/ebooks/cs_18124224#/ebook_cs_18124224_cs18346)
160. Matyash V, Kettenmann H. Heterogeneity in astrocyte morphology and physiology. *Brain Res Rev.* 2010 May;63(1–2):2–10.
161. Sofroniew MV, Vinters HV. Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol.* 2010;119(1):7–35.
162. Brown AM, Ransom BR. Astrocyte glycogen and brain energy metabolism. *Glia.* 2007 Sep;55(12):1263–71.
163. Ogata K, Kosaka T. Structural and quantitative analysis of astrocytes in the mouse hippocampus. *Neuroscience.* 2002;113(1):221–33.
164. Halassa MM, Fellin T, Takano H, Dong JH, Haydon PG. Synaptic Islands Defined by the Territory of a Single Astrocyte. *J Neurosci.* 2007 Jun 13;27(24):6473–7.
165. Eroglu C, Barres BA. Regulation of synaptic connectivity by glia. *Nature.* 2010 Nov 11;468(7321):223–31.

166. Parpura V, Zorec R. Gliotransmission: Exocytotic release from astrocytes. *Brain Res Rev.* 2010 May;63(1–2):83–92.
167. Chen Y, Swanson RA. Astrocytes and brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2003 Feb;23(2):137–49.
168. Eng LF, Ghirnikar RS, Lee YL. Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969–2000). *Neurochem Res.* 2000 Oct;25(9–10):1439–51.
169. Escartin C, Galea E, Lakatos A, O’Callaghan JP, Petzold GC, Serrano-Pozo A, et al. Reactive astrocyte nomenclature, definitions, and future directions. *Nat Neurosci.* 2021 Mar;24(3):312–25.
170. Rothwell NJ, Luheshi G, Toulmond S. Cytokines and their receptors in the central nervous system: Physiology, pharmacology, and pathology. *Pharmacology & Therapeutics.* 1996 Jan 1;69(2):85–95.
171. Heneka MT, Rodríguez JJ, Verkhratsky A. Neuroglia in neurodegeneration. *Brain Res Rev.* 2010 May;63(1–2):189–211.
172. Bush TG, Puvanachandra N, Horner CH, Polito A, Ostenfeld T, Svendsen CN, et al. Leukocyte infiltration, neuronal degeneration, and neurite outgrowth after ablation of scar-forming, reactive astrocytes in adult transgenic mice. *Neuron.* 1999 Jun;23(2):297–308.
173. Barmpagiannos K, Theotokis P, Petratos S, Pagnin M, Einstein O, Kesidou E, et al. The Diversity of Astrocyte Activation during Multiple Sclerosis: Potential Cellular Targets for Novel Disease Modifying Therapeutics. *Healthcare (Basel).* 2023 May 29;11(11):1585.
174. Popescu BFG, Lucchinetti CF. Pathology of demyelinating diseases. *Annu Rev Pathol.* 2012;7:185–217.
175. Nishie M, Mori F, Ogawa M, Sannohe S, Tanno K, Kurahashi K, et al. Multinucleated astrocytes in old demyelinated plaques in a patient with multiple sclerosis. *Neuropathology.* 2004 Sep;24(3):248–53.
176. Kuhlmann T, Lassmann H, Brück W. Diagnosis of inflammatory demyelination in biopsy specimens: a practical approach. *Acta Neuropathol.* 2008 Mar;115(3):275–87.
177. Gaudet AD, Fonken LK. Glial Cells Shape Pathology and Repair After Spinal Cord Injury. *Neurotherapeutics.* 2018 Jul;15(3):554–77.
178. Furer M, Hartloper V, Wilkins J, Nath A. Lymphocyte emperipolesis in human glial cells. *Cell Adhes Commun.* 1993 Dec;1(3):223–37.
179. Linnerbauer M, Wheeler MA, Quintana FJ. Astrocyte crosstalk in CNS inflammation. *Neuron.* 2020 Nov 25;108(4):608–22.
180. Wheeler MA, Jaronen M, Covacu R, Zandee SEJ, Scalisi G, Rothhammer V, et al. Environmental control of astrocyte pathogenic activities in CNS inflammation. *Cell.* 2019 Jan 24;176(3):581–596.e18.
181. Bezzi P, Domercq M, Brambilla L, Galli R, Schols D, De Clercq E, et al. CXCR4-activated astrocyte glutamate release via TNF $\alpha$ : amplification by microglia triggers neurotoxicity. *Nat Neurosci.* 2001 Jul;4(7):702–10.

182. Vercellino M, Merola A, Piacentino C, Votta B, Capello E, Mancardi GL, et al. Altered glutamate reuptake in relapsing-remitting and secondary progressive multiple sclerosis cortex: correlation with microglia infiltration, demyelination, and neuronal and synaptic damage. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2007 Aug;66(8):732–9.
183. Multiple Sklerose (MS) behandeln [Internet]. [cited 2023 Jul 9]. Available from: <https://www.dmsg.de/multiple-sklerose/ms-behandeln>
184. Symptomatische Therapie [Internet]. [cited 2023 Jul 9]. Available from: <https://www.dmsg.de/multiple-sklerose/ms-behandeln/therapiesaeulen/symptomatische-therapie>
185. Schubtherapie [Internet]. [cited 2023 Jul 9]. Available from: <https://www.dmsg.de/multiple-sklerose/ms-behandeln/therapiesaeulen/schubtherapie>
186. Verlaufmodifizierende Therapie [Internet]. [cited 2023 Jul 9]. Available from: <https://www.dmsg.de/multiple-sklerose/ms-behandeln/therapiesaeulen/verlaufmodifizierende-therapie>
187. Glatirameracetat (Copaxone®, Clift®) [Internet]. [cited 2023 Jul 9]. Available from: <https://www.dmsg.de/multiple-sklerose/ms-behandeln/medikamente-versteckt/glatirameracetat-copaxoner-cliftr>
188. Wolinsky JS, Narayana PA, O'Connor P, Coyle PK, Ford C, Johnson K, et al. Glatiramer acetate in primary progressive multiple sclerosis: results of a multinational, multicenter, double-blind, placebo-controlled trial. *Ann Neurol*. 2007 Jan;61(1):14–24.
189. Natalizumab (Tysabri®) [Internet]. [cited 2023 Jul 10]. Available from: <https://www.dmsg.de/multiple-sklerose/ms-behandeln/medikamente-versteckt/natalizumab-tysabrir>
190. Claes N, Fraussen J, Stinissen P, Hupperts R, Somers V. B Cells Are Multifunctional Players in Multiple Sclerosis Pathogenesis: Insights from Therapeutic Interventions. *Front Immunol*. 2015 Dec 21;6:642.
191. Cencioni MT, Mattoscio M, Magliozzi R, Bar-Or A, Muraro PA. B cells in multiple sclerosis - from targeted depletion to immune reconstitution therapies. *Nat Rev Neurol*. 2021 Jul;17(7):399–414.
192. Hauser SL, Bar-Or A, Comi G, Giovannoni G, Hartung HP, Hemmer B, et al. Ocrelizumab versus Interferon Beta-1a in Relapsing Multiple Sclerosis. *N Engl J Med*. 2017 Jan 19;376(3):221–34.
193. Alisch M, Kerkering J, Crowley T, Rosiewicz K, Paul F, Siffrin V. Identification of the gliogenic state of human neural stem cells to optimize in vitro astrocyte differentiation. *J Neurosci Methods*. 2021 Sep 1;361:109284.
194. Shankar G, Cohen DA. Enhanced cytokine detection by a novel cell culture-based ELISA. *J Immunoassay*. 1997 Nov;18(4):371–88.
195. TMB/E Einzelreagenz, blaue Farbe, Meerrettichperoxidase-Substrat (löslich) 500 ml TMB/E Single Reagent, Blue color, Horseradish Peroxidase Substrate (soluble) for ELISA. | Sigma-Aldrich [Internet]. [cited 2023 Jul 21]. Available from: <http://www.sigmaaldrich.com/>

196. Ghobrial G, Araujo L, Jinwala F, Li S, Lee LY. The Structure and Biological Function of CREG. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* [Internet]. 2018 [cited 2023 Oct 25];6. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcell.2018.00136>
197. Kunita R, Otomo A, Ikeda JE. Identification and characterization of novel members of the CREG family, putative secreted glycoproteins expressed specifically in brain. *Genomics*. 2002 Nov;80(5):456–60.
198. ZNF69 zinc finger protein 69 [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI [Internet]. [cited 2023 Nov 8]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/7620#summary>
199. RELB RELB proto-oncogene, NF-kB subunit [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI [Internet]. [cited 2023 Nov 8]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5971#summary>
200. GAL galanin and GMAP prepropeptide [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI [Internet]. [cited 2023 Nov 8]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/51083#summary>
201. CCNE1 cyclin E1 [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI [Internet]. [cited 2023 Nov 8]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/898#summary>
202. ZNF154 zinc finger protein 154 [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI [Internet]. [cited 2023 Nov 8]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/7710#summary>
203. ATG9B autophagy related 9B [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI [Internet]. [cited 2023 Nov 8]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/285973#summary>
204. MOBP myelin associated oligodendrocyte basic protein [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI [Internet]. [cited 2023 Nov 8]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/4336#summary>
205. Helassa N, Antonyuk SV, Lian LY, Haynes LP, Burgoyne RD. Biophysical and functional characterization of hippocalcin mutants responsible for human dystonia. *Hum Mol Genet*. 2017 Jul 1;26(13):2426–35.
206. KCNE2 potassium voltage-gated channel subfamily E regulatory subunit 2 [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI [Internet]. [cited 2023 Nov 8]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/9992#summary>
207. KCNA7 potassium voltage-gated channel subfamily A member 7 [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI [Internet]. [cited 2023 Nov 8]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3743#summary>
208. Kowarik MC, Astling D, Lepennetier G, Ritchie A, Hemmer B, Owens GP, et al. Differential Effects of Fingolimod and Natalizumab on B Cell Repertoires in Multiple Sclerosis Patients. *Neurotherapeutics*. 2021 Jan;18(1):364–77.
209. A Randomized, Placebo-Controlled Trial of Natalizumab for Relapsing Multiple Sclerosis | *NEJM* [Internet]. [cited 2023 Aug 28]. Available from: <https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMoa044397>
210. Lu TT, Cyster JG. Integrin-Mediated Long-Term B Cell Retention in the Splenic Marginal Zone. *Science*. 2002 Jul 19;297(5580):409–12.

211. Traub JW, Pellkofer HL, Grondey K, Seeger I, Rowold C, Brück W, et al. Natalizumab promotes activation and pro-inflammatory differentiation of peripheral B cells in multiple sclerosis patients. *J Neuroinflammation*. 2019 Nov 16;16:228.
212. Kemmerer CL, Pernpeintner V, Ruschil C, Abdelhak A, Scholl M, Ziemann U, et al. Differential effects of disease modifying drugs on peripheral blood B cell subsets: A cross sectional study in multiple sclerosis patients treated with interferon- $\beta$ , glatiramer acetate, dimethyl fumarate, fingolimod or natalizumab. *PLoS One*. 2020 Jul 27;15(7):e0235449.
213. Ireland SJ, Guzman AA, O'Brien DE, Hughes S, Greenberg B, Flores A, et al. The Effect of Glatiramer Acetate Therapy on Functional Properties of B Cells From Patients With Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis. *JAMA Neurol*. 2014 Nov;71(11):1421–8.
214. Häusler D, Hajiyeva Z, Traub JW, Zamvil SS, Lalive PH, Brück W, et al. Glatiramer acetate immune modulates B-cell antigen presentation in treatment of MS. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm*. 2020 May;7(3):e698.
215. Sean Selva LJJ. B Cell Receptor Recognition of Glatiramer Acetate is Required for Efficacy through Antigen Presentation and Cytokine Production. *J Clin Cell Immunol* [Internet]. 2014 [cited 2023 Oct 25];05(01). Available from: <https://www.omicsonline.org/open-access/b-cell-receptor-recognition-glatiramer-acetate-required-antigen-presentation-2155-9899.1000185.php?aid=22597>
216. Burger D, Molnarfi N, Weber MS, Brandt KJ, Benkhoucha M, Gruaz L, et al. Glatiramer acetate increases IL-1 receptor antagonist but decreases T cell-induced IL-1 $\beta$  in human monocytes and multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Mar 17;106(11):4355–9.
217. Ramgolam VS, Sha Y, Marcus KL, Choudhary N, Troiani L, Chopra M, et al. B Cells as a Therapeutic Target for IFN- $\beta$  in Relapsing–Remitting Multiple Sclerosis. *The Journal of Immunology*. 2011 Apr 1;186(7):4518–26.
218. Liddel SA, Barres BA. Reactive Astrocytes: Production, Function, and Therapeutic Potential. *Immunity*. 2017 Jun 20;46(6):957–67.
219. Foo LC, Allen NJ, Bushong EA, Ventura PB, Chung WS, Zhou L, et al. Development of a Method for the Purification and Culture of Rodent Astrocytes. *Neuron*. 2011 Sep 8;71(5):799–811.
220. Prah J, Winters A, Chaudhari K, Hersh J, Liu R, Yang SH. A novel serum free primary astrocyte culture method that mimic quiescent astrocyte phenotype. *Journal of Neuroscience Methods*. 2019 May 15;320:50–63.
221. Rakhra G, Rakhra G. Zinc finger proteins: insights into the transcriptional and post transcriptional regulation of immune response. *Mol Biol Rep*. 2021;48(7):5735–43.
222. Mazumder S, DuPree EL, Almasan A. A dual role of cyclin E in cell proliferation and apoptosis may provide a target for cancer therapy. *Curr Cancer Drug Targets*. 2004 Feb;4(1):65–75.
223. Mockenhaupt K, Gonsiewski A, Kordula T. RelB and Neuroinflammation. *Cells*. 2021 Jun 27;10(7):1609.
224. Mayo L, Trauger SA, Blain M, Nadeau M, Patel B, Alvarez JI, et al. Regulation of astrocyte activation by glycolipids drives chronic CNS inflammation. *Nat Med*. 2014 Oct;20(10):1147–56.

225. Swindell WR, Bojanowski K, Chaudhuri RK. A novel fumarate, isosorbide di-(methyl fumarate) (IDMF), replicates astrocyte transcriptome responses to dimethyl fumarate (DMF) but specifically down-regulates genes linked to a reactive phenotype. *Biochem Biophys Res Commun.* 2020 Nov 12;532(3):475–81.

## Anhang

Vorversuche zur Etablierung der B-Zellkultur: Isolation, Aktivierung und Expansion der B-Zellen

Um eine möglichst adäquate B-Zellkultur für die Hauptversuche zu gewährleisten, wurden vorab einige Vorversuche zur Etablierung der optimalen Bedingungen für die Isolation, die Zelldichte und der Kultivierungsdauer, durchgeführt.

### B-Zell-Isolation

Gemäß Herstellerprotokoll erfolgt nach dem Depletionsschritt der B-Zell-Isolation darüber hinaus im letzten Schritt eine positive Selektion für CD27<sup>+</sup> B-Zellen. Dafür wird die B-Zellpopulation zentrifugiert, der Überstand wird verworfen und das Pellet in 100 µl Puffer resuspendiert. Anschließend werden 100 µl CD27<sup>+</sup> MicroBeads hinzugegeben, die Zellen darin resuspendiert und für 15 min. auf Eis inkubiert. Nun sind die B-Gedächtniszellen markiert. Danach werden sie in 10 ml Puffer gewaschen und erneut zentrifugiert. Im letzten Schritt werden die Zellen in 500 µl frischem Puffer aufgenommen. Durch die CD27<sup>+</sup> *Beads* findet eine positive Selektion der CD27<sup>+</sup> (also Gedächtnis-) B-Zellen statt, sodass diese im nächsten Schritt von den naiven B-Zellen getrennt werden können. Dafür wird eine MACS MS-Säule im magnetischen Feld des MACS Separators platziert und mit 500 µl Puffer gespült. Anschließend wird die gesamte Zellsuspension auf die Säule gegeben und mittels Falcon-Röhrchen gesammelt. Die Säule wird danach 3x mit 500 µl Puffer gespült, sodass sich möglichst viele Zellen ergeben. Bei der erhaltenen Population handelt es sich um die nicht-markierten naiven B-Zellen. Um die markierten CD27<sup>+</sup> Zellen aus der Säule zu erhalten, wird diese aus dem magnetischen Feld genommen und auf ein neues Falcon-Röhrchen gesetzt. Im letzten Schritt werden 1 ml Puffer auf die Säule gegeben und die B-Gedächtniszellen gesammelt. Anschließend können die Zellen gezählt und für die Zellkultur verwendet werden.

Die entsprechenden Anteile der jeweiligen Zelltypen aus den Vorversuchen (BZI-1 bis BZI-6) sind Tabelle A1 zu entnehmen.

Tab. A1: (Vorversuche) Anteile der naiven und CD27<sup>+</sup> B-Zellen von PBMNCs verschiedener Probanden. Rest: restliche PBMNCs nach Auftauen und B-Zell-Isolation im Vergleich zur jeweiligen Gesamt-PBMNC-Zahl (100%).

| B-Zell-Isolation # | Naive (%) | CD27 <sup>+</sup> (%) | Rest (%) |
|--------------------|-----------|-----------------------|----------|
| BZI-1              | 1,6       | 1,1                   | 19,82    |
| BZI-2              | 1,4       | 0,65                  | 21,2     |
| BZI-3              | 2,15      | 1,4                   | 66,5     |

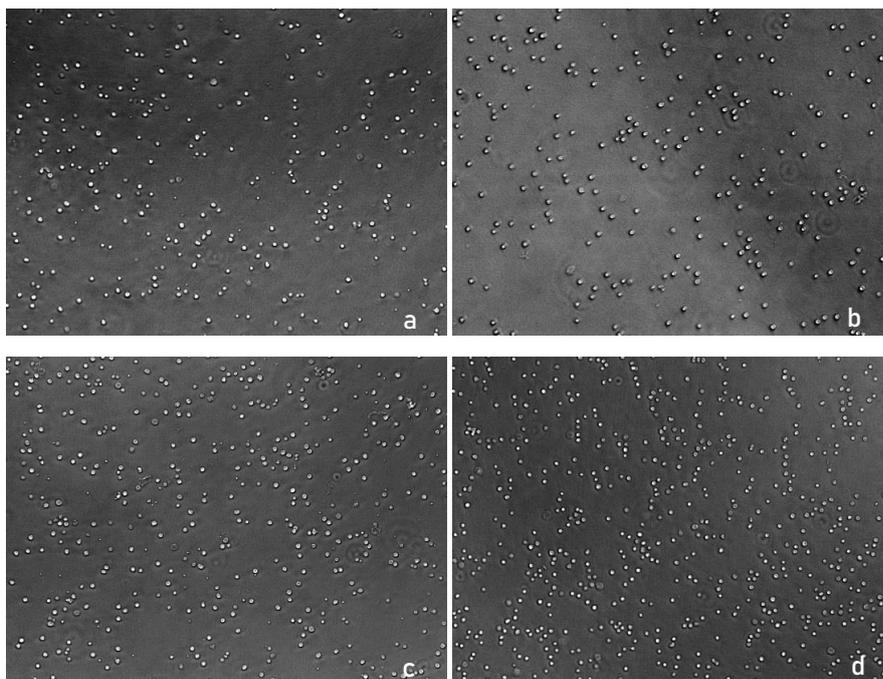
|            |     |      |       |
|------------|-----|------|-------|
| BZI-4      | 3,5 | 2,15 | 40    |
| BZI-5      | 1,5 | 0,75 | 47,5  |
| BZI-6      | 1,9 | 0,48 | 22,67 |
| Mittelwert | 2,0 | 1,09 | 36,28 |

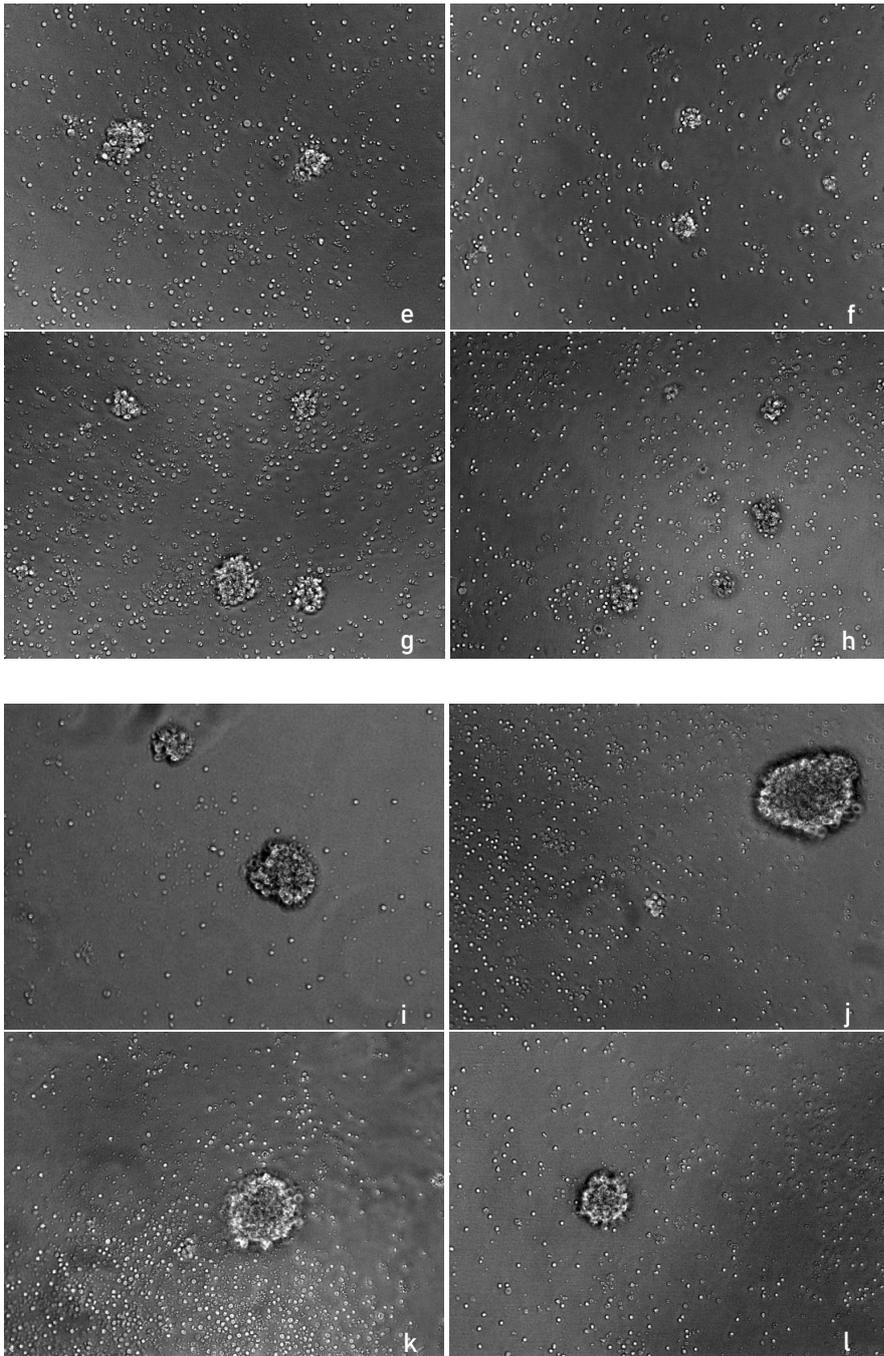
### Dichte und Kultivierungsdauer

Laut Herstellerangaben können die B-Zellen in einer hohen ( $10^6$  B-Zellen/ ml) oder einer geringen (150 000 Zellen/ ml) Kultur-dichte ausgesät werden. Ist eine stärkere Expansion der Zellen gewünscht, wird eine geringe Dichte empfohlen. So soll eine bis zu zehnfach stärkere Expansion der Zellen erzielt werden können. Die B-Zellen werden insgesamt 14 Tage lang kultiviert. Nach Tag 7 und Tag 10 findet eine erneute Stimulation bzw. Aktivierung mit IL-4 und CD40L / *crosslinking antibody* statt.

Um eine optimale Expansion und Aktivierung der Zellen zu gewährleisten, werden vorab verschiedene Kombinationen von Zelldichte und Kultivierungsdauer getestet.

Zunächst wird sich etwa an den Empfehlungen des Herstellers orientiert. Da aufgrund der Auftrennung von naiven und CD27<sup>+</sup> B-Zellen jeweils nicht genügend Zellen für eine hohe Dichte ( $10^6$ ) gewonnen werden konnten (Tab. A1), wird stattdessen mit einer mittleren Zelldichte (500 000 Zellen/ ml) gearbeitet. Für eine geringere Zelldichte wird diese halbiert, sodass sich für diese Kondition eine Dichte von 250 000 Zellen/ ml ergibt (Abb. A1 a-d).





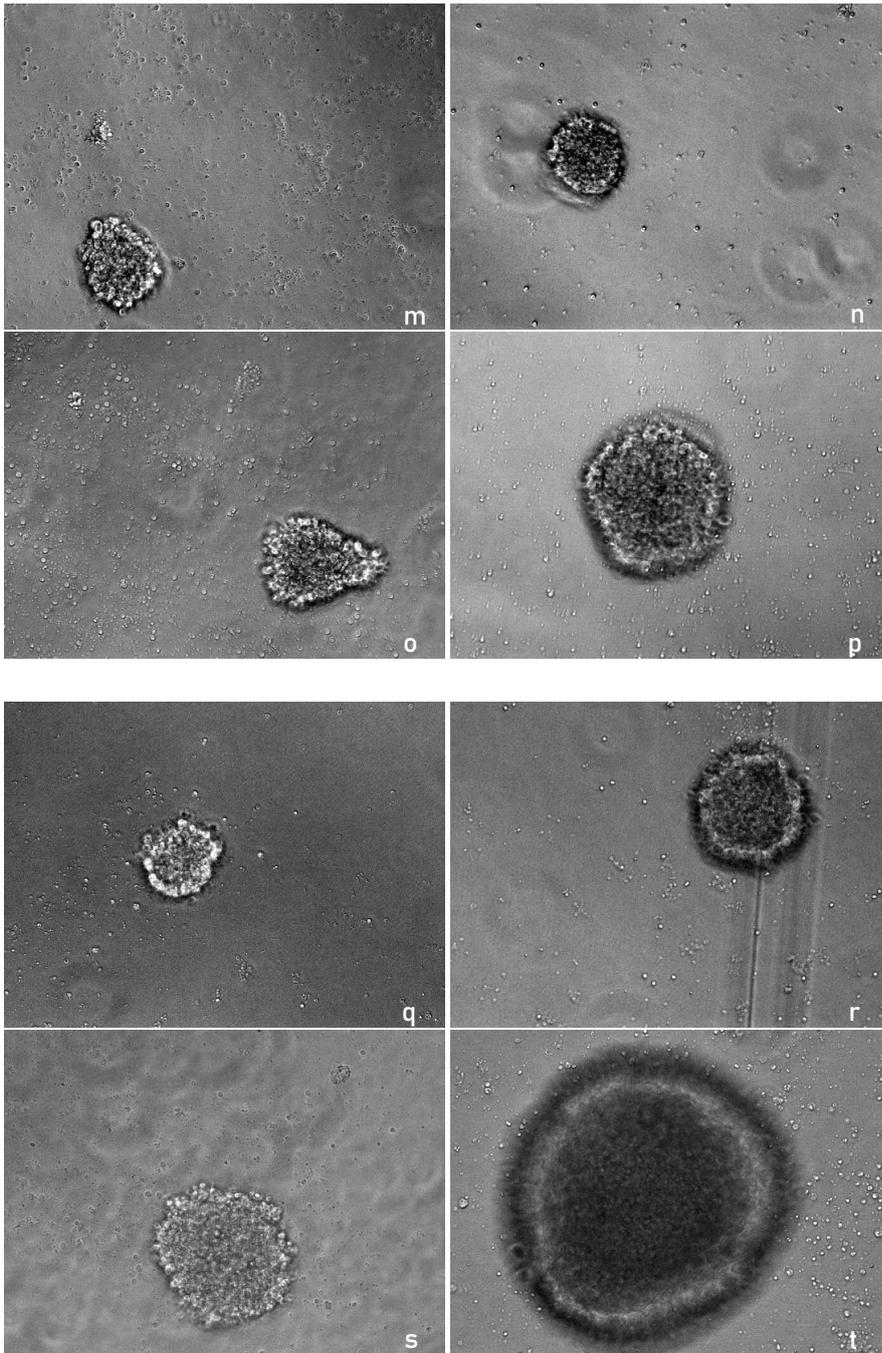


Abb. A1: B-Zellkulturen zu verschiedenen Zeitpunkten (Tag 0 a-d; Tag 3 e-h; Tag 7 i-l; Tag 10 m-p; Tag 14 q-t) und in unterschiedlichen Startdichten ( $CD27^+$  50 000 Zellen/ Well a, e, i, m, q; naive 50 000 Zellen/ Well b, f, j, n, r;  $CD27^+$  100 000/ Well c, g, k, o, s; naive 100 000/ Well d, h, l, p, t).

Ab Tag 7 lassen sich in allen Kulturen (mittel und niedrig bzw.  $CD27^+$  und naive) mikroskopisch kaum Cluster, welche die erfolgreiche Aktivierung der B-Zellen widerspiegeln, feststellen (Abb. A1 i-p). Nach Ende der empfohlenen Kultivierungsdauer von 14 Tagen hat sich diese Beobachtung verstärkt. Die Zahl der Cluster hat sich weiterhin nicht verändert, allerdings sind diese im Durchmesser gewachsen und haben sich vergrößert (Abb. A1 q-t).

Um zu testen, ob eine größere Zellzahl die Aktivierung verstärkt, werden beide B-Zell-Subtypen- naive und CD27<sup>+</sup>- gepoolt. Dafür wird die B-Zell-Isolation vor dem letzten Schritt der positiven Selektion für CD27<sup>+</sup> beendet. Durch das Zusammenfassen der B-Zellen können nun größere Zellzahlen erreicht und demnach eine hohe Zelldichte von 10<sup>6</sup> Zellen/ ml für die Kultur ausgesät werden.

Die entsprechenden Anteile der gepoolten B-Zellen aus den Vorversuchen (BZI-8 bis BZI-14) sind Tabelle A2 zu entnehmen.

Da sich in BZI-1 bis BZI-6 an Tag 3 mikroskopisch die meisten Cluster erkennen lassen (Abb. A1 e-h), wird vom Protokoll und der Empfehlung des Herstellers abgewichen: Die Zellen werden in einer hohen Dichte (10<sup>6</sup> Zellen/ ml) ausgesät und an Tag 0-2 unter dem Mikroskop beurteilt (Abb. A2 a-c).

Diese Konditionen (48h, 10<sup>6</sup> Zellen/ ml) werden für die Hauptversuche genutzt.

Tab. A2: (Vorversuche) Anteile der gepoolten B-Zellen von PBMCs verschiedener Probanden. Rest: restliche PBMCs nach Auftauen und B-Zell-Isolation im Vergleich zur jeweiligen Gesamt-PBMC-Zahl (100%).

| B-Zell-Isolation # | B-Zellen (%) | Rest (%)   |
|--------------------|--------------|------------|
| BZI-8              | 1,52631579   | 38,6842105 |
| BZI-9              | 1,94444444   | 21,25      |
| BZI-10             | 1,6          | 13,25      |
| BZI-11             | 4,79166667   | 52,0833333 |
| BZI-12             | 4,44444444   | 49,3333333 |
| BZI-13             | 8,90909091   | 51,8181818 |
| BZI-14             | 3,49206349   | 43,3333333 |
| Mittelwert         | 3,81543225   | 38,536056  |

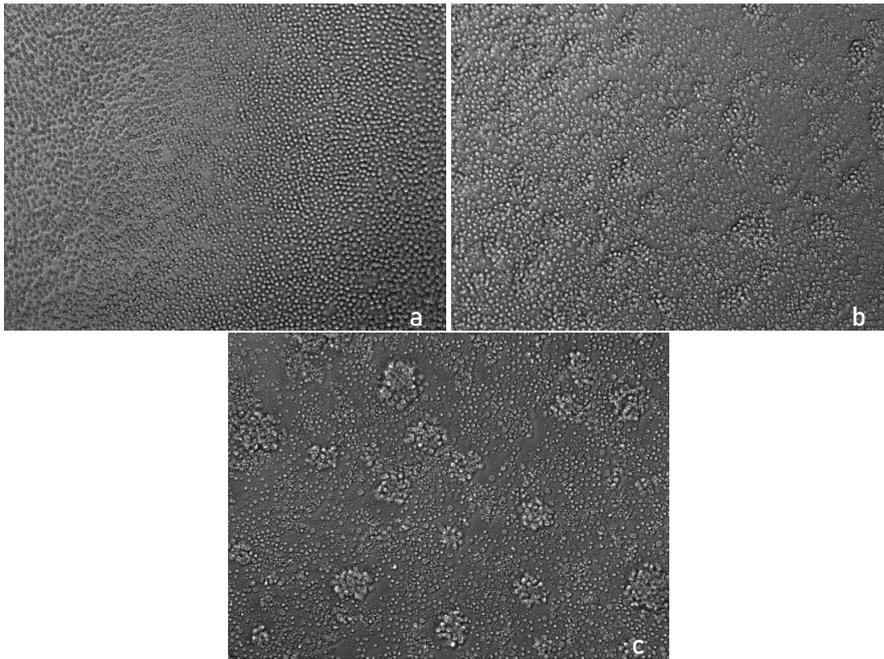


Abb. A2: B-Zellkultur in hoher Dichte ( $10^6$  Zellen/ ml) zu verschiedenen Zeitpunkten (a 2h; b 24h; c 48h).

## ELISA

### a ) Unterteilung in naive und B-Gedächtniszellen

Darüber hinaus wurden parallel ELISA-Untersuchungen durchgeführt, um den Verlauf Zytokinproduktion zu beobachten und den optimalen Zeitpunkt zur Entnahme der Überstände festzustellen. Diese Versuche wurden zunächst mit den Überständen von Tag 7, Tag 10 und Tag 14 durchgeführt und zwischen jenen der naiven B-Zellen und denen der  $CD27^+$  B-Zellen unterschieden. Alle Konzentrationen (pg/ml) beziehen sich auf je 10 000 Zellen.

Für IL-6 lässt sich in den Überständen der naiven B-Zellen die stärkste Konzentration an Tag 7 in Höhe von 185,4 pg/ml pro 10 000 Zellen messen. Diese nimmt an Tag 10 etwa um ein Drittel ab (61,2 pg/ml) und halbiert sich an Tag 14 nochmals (32,1 pg/ml) (Abb.3 a).

In den Überständen der  $CD27^+$  B-Zellen wird ebenfalls an Tag 7 die höchste Konzentration gemessen. Allerdings ist diese im Vergleich zu jener der naiven B-Zellen um knapp 80% reduziert (33,3 pg/ml). Für Tag 10 und Tag 14 lassen sich nur noch schwache Konzentrationen in Höhe von 8,6 pg/ml bzw. 5,9 pg/ml messen (Abb. A3 b).

Für IL-1 $\beta$ , IL-10 und TNF- $\alpha$  lassen sich an Tag 7, 10 und 14 sowohl in den Überständen der naiven B-Zellen als auch in jenen der  $CD27^+$  B-Zellen mittels ELISA keine Zytokine detektieren.

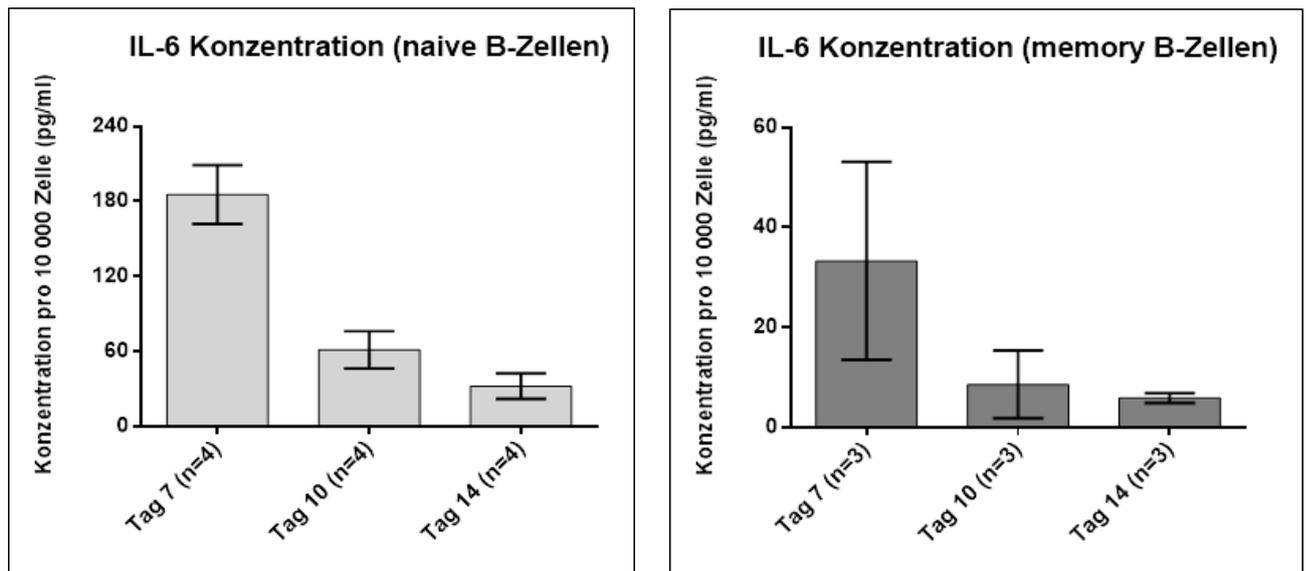


Abbildung A3: IL-6 Konzentrationen an Tag 7, Tag 10 und Tag 14 pro 10.000 Zellen (pg/ml) von naiven B-Zellen und CD27<sup>+</sup> B-Zellen.

## b) Gepoolte B-Zellen

Die Überstände der gepoolten B-Zellen (naive und CD27<sup>+</sup> zusammengefasst) werden an Tag 1, Tag 2 und Tag 3 entnommen und ihre Zytokinkonzentrationen mittels ELISA bestimmt. Alle Konzentrationen (pg/ml) beziehen sich auf je 10 000 Zellen.

Für IL-6 lässt sich eine Konzentration von 85,6 pg/ml an Tag 1 feststellen. Diese steigt an Tag 2 und Tag 3 auf ähnliche Werte um 39% bzw. 42% auf 119,1 pg/ml bzw. 121,5 pg/ml (Abb. A4).

Die Konzentrationen der anderen drei Zytokine (IL-1 $\beta$ , IL-10 und TNF- $\alpha$ ) sind um ein 10- bis 100-faches niedriger als jene von IL-6.

Die Konzentrationen von IL-1 $\beta$  sind an allen drei aufeinanderfolgenden Tagen nahezu identisch, am letzten Tag ist diese minimal reduziert (12,6 pg/ml vs. 11,4 pg/ml) (Abb. A4). Im Vergleich zu IL-6 sind die Konzentrationen von IL-1 $\beta$  etwa um ein 10-faches niedriger.

Ein ähnlicher Verlauf über den Zeitraum von drei Tagen ist bei IL-10 zu beobachten, jedoch in etwas reduzierter Konzentration: An Tag 1 und Tag 2 ist die Konzentration identisch (8,4 pg/ml vs. 8,2 pg/ml) und an Tag 3 leicht vermindert (7,3 pg/ml) (Abb. A4).

Für TNF- $\alpha$  lässt sich an Tag 1 eine Konzentration von 7,2 pg/ml detektieren. Diese nimmt an Tag 2 deutlich ab und sinkt auf 1,2 pg/ml. Dies ist eine ca. 100- bzw. 10-fach niedrigere Konzentration als jene von IL-6 bzw. IL-1 $\beta$  zum gleichen Zeitpunkt. An Tag 3 lassen sich für TNF- $\alpha$  keine Zytokinkonzentrationen messen (Abb. A4).

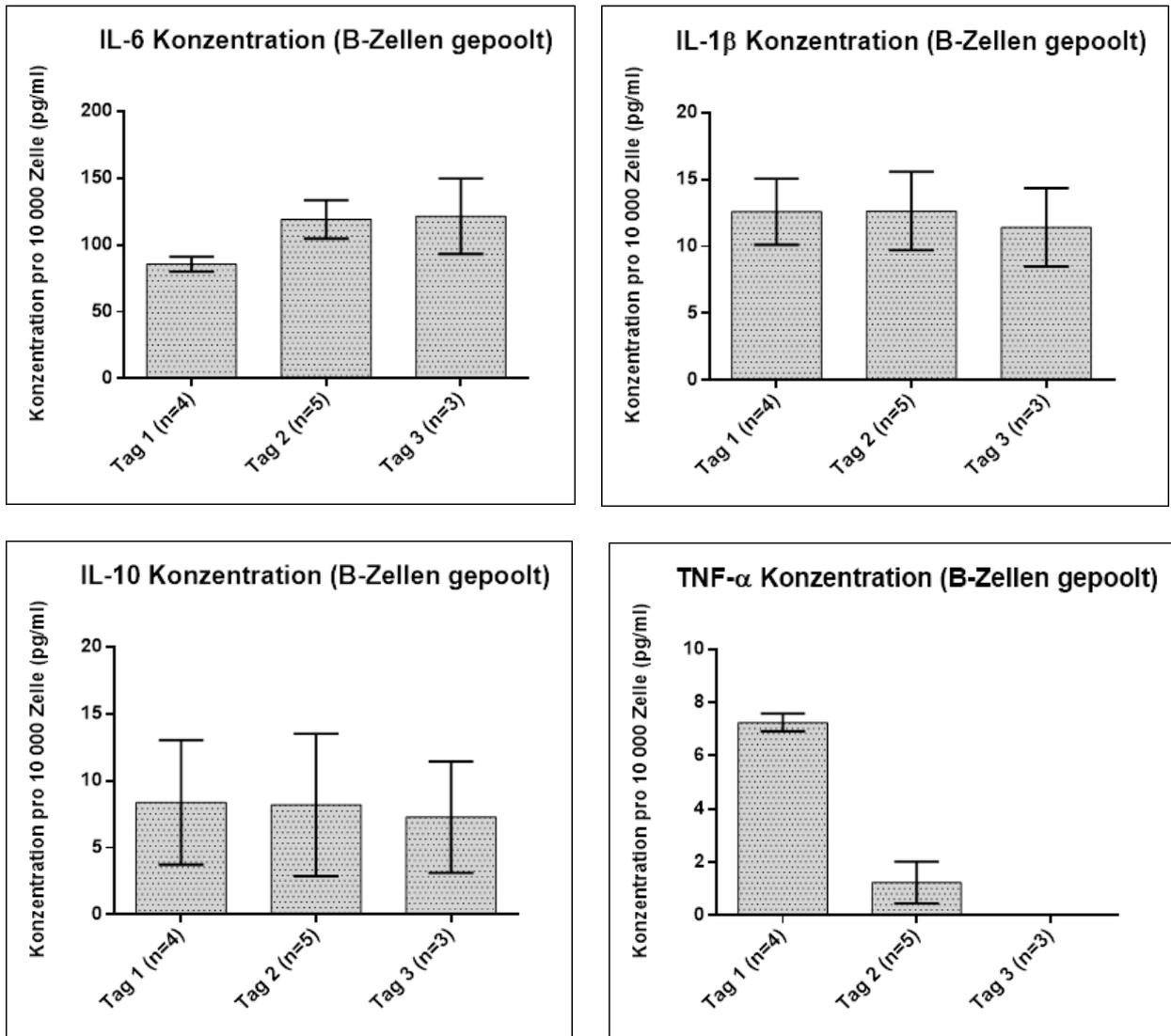


Abb. A4: Zytokinkonzentrationen zu verschiedenen Zeitpunkten (Tag 1, Tag 2 und Tag 3).

### Fazit

Aufgrund der mikroskopischen Beurteilungen und den Messungen der Zytokinkonzentrationen mittels ELISA aus den Vorversuchen lässt sich das Fazit ziehen, für die Durchführung der Hauptversuche gepoolte B-Zellen ( $10^6$  Zellen/ ml) zu verwenden und ihre Überstände nach 48h zu entnehmen. Diese Bedingungen scheinen die bestmögliche Grundlage für die Realisierung dieser Arbeit zu sein.