

Aus dem Lehrstuhl der Neurologie  
der Fakultät der Medizin  
der Universität Regensburg  
Komm. Direktor Prof. Dr. Ralf Linker

„Immunologische Untersuchungen zur Wirkung von Alemtuzumab auf die  
adaptive Immunität bei Patienten mit Multipler Sklerose“

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin

der  
Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Clara Hilger

Im Jahr  
2020



Aus dem Lehrstuhl der Neurologie  
der Fakultät der Medizin  
der Universität Regensburg  
Komm. Direktor Prof. Dr. Ralf Linker

„Immunologische Untersuchungen zur Wirkung von Alemtuzumab auf die  
adaptive Immunität bei Patienten mit Multipler Sklerose“

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin

der  
Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Clara Hilger

Im Jahr  
2020

Dekan:

Prof. Dr. Dirk Hellwig

1. Berichterstatter

Prof. Dr. Dr. med. Robert Weißert

2. Berichterstatter

Prof. Dr. Edward K. Geissler

Tag der mündlichen Prüfung:

28.05.2020

## Inhalt

1	Einleitung.....	5
1.1	Definition, Klassifikation und Klinik.....	5
1.2	Epidemiologie.....	6
1.3	Ätiologie .....	6
1.3.1	Genetische Faktoren .....	6
1.3.2	Umweltfaktoren .....	7
1.4	Pathologie und Pathophysiologie.....	11
1.5	Immunpathogenese .....	13
1.5.1	Die Rolle der CD4+ T-Lymphozyten.....	14
1.5.2	Die Rolle der CD8+ T-Lymphozyten.....	15
1.5.3	Die Rolle der B-Lymphozyten .....	15
1.6	Therapiemöglichkeiten bei MS.....	16
1.6.1	Therapie der schubförmigen MS bei milden und moderaten Verläufen .....	17
1.6.2	Therapie der schubförmigen MS bei (hoch)aktiven Verlaufsformen.....	17
1.6.3	Alemtuzumab .....	20
2	Fragestellung der Arbeit.....	24
3	Material .....	24
3.1	Labormaterialien .....	24
3.2	Überblick über die Patienten .....	28
4	Methodik.....	28
4.1	Bestimmung des kleinen Blutbilds und Differentialblutbilds.....	28
4.2	Durchflusszytometrie zur Bestimmung des Immunstatus im peripheren Blut.....	29
4.3	Vorbereitung der PBMC für den ELISpot-Assay .....	30
4.3.1	Isolieren der PBMC.....	30
4.3.2	Einfrieren .....	31
4.3.3	Auftauen.....	31
4.4	ELISpot-Assay.....	32
4.5	Durchflusszytometrie der gefrorenen PBMC-Proben .....	34
4.6	Auswertung des klinischen Verlaufs.....	34
4.7	Auswertung der MRT-Befunde.....	35
4.8	Auswertung der Befunde der Neurophysiologie.....	35
5	Ergebnisse .....	35
5.1	Einfluss des Einfrierens der PBMC auf die Zellzusammensetzung .....	36
5.2	Einfluss von Alemtuzumab auf die Zahl der Zellen des kleinen Blutbilds .....	37
5.3	Einfluss von Alemtuzumab auf die Zahl der Zellen des Differentialblutbilds.....	38

5.4	Einfluss von Alemtuzumab auf die Anteile der Zellen des Differentialblutbilds.....	40
5.5	Einfluss von Alemtuzumab auf die Zellzahlen des Immunstatus der Lymphozyten .....	42
5.6	Einfluss von Alemtuzumab auf die Anteile der Zellen im Immunstatus der Lymphozyten ..	44
5.7	Einfluss von Alemtuzumab auf die zelluläre Reaktivität .....	47
5.7.1	Veränderung der Zahl IFN- $\gamma$ sezernierender Zellen .....	47
5.7.2	Veränderung der Zahl IFN- $\gamma$ sezernierender Zellen in Relation zu $2 \cdot 10^5$ anwesenden CD4+ Lymphozyten.....	52
5.8	Einfluss von Alemtuzumab auf den klinischen Verlauf .....	57
5.8.1	Patient 01 .....	57
5.8.2	Patient 02 .....	58
5.8.3	Patient 03 .....	58
5.8.4	Patient 04 .....	59
5.8.5	Patientin 05 .....	60
5.9	Einfluss von Alemtuzumab auf die radiologisch gemessene Krankheitsaktivität .....	61
5.9.1	Patient 01 .....	61
5.9.2	Patient 02 .....	62
5.9.3	Patient 03 .....	62
5.9.4	Patient 04 .....	63
5.9.5	Patientin 05 .....	63
5.10	Einfluss von Alemtuzumab auf Ergebnisse der Neurophysiologie .....	64
5.10.1	Patient 01 .....	64
5.10.2	Patient 02 .....	65
5.10.3	Patient 03 .....	65
5.10.4	Patient 04 .....	66
6	Diskussion.....	66
6.1	Depletion .....	66
6.1.1	Aktionsmechanismen der Depletion.....	66
6.1.2	Mögliche Korrelation zwischen CD52-Expression und Ausmaß der Depletion.....	67
6.1.3	Geringere Beeinträchtigung von Zellen des angeborenen Immunsystems .....	68
6.1.4	Geringere Depletion in lymphatischen Organen.....	70
6.2	Rekonstruktion der B- und T-Lymphozyten .....	70
6.2.1	Rekonstruktion der B-Lymphozyten.....	71
6.2.2	Rekonstruktion der T-Lymphozyten.....	72
6.3	Einfluss von Alemtuzumab auf die zelluläre Reaktivität .....	74
6.4	Bedeutung der als Stimuli verwendeten Peptide.....	76

6.5	Veränderung der klinischen und radiologisch gemessenen Krankheitsaktivität durch Alemtuzumab und Verträglichkeit .....	79
6.6	Veränderung neurophysiologischer Parameter durch Alemtuzumab .....	81
6.7	Zusammenfassung.....	81

## 1 Einleitung

### 1.1 Definition, Klassifikation und Klinik

Die Multiple Sklerose (MS) ist eine chronisch entzündliche Autoimmunerkrankung des zentralen Nervensystems (ZNS), die zu Demyelinisierung, in geringerem Ausmaß aber auch zu axonalem Schaden führt und durch typische Läsionen in der weißen und grauen Substanz gekennzeichnet ist (Lassmann et al. 2007). Sie beginnt meist im jungen Erwachsenenalter und verursacht vielfältige neurologische Defizite bei den Betroffenen. Dabei kann es sowohl zu Sensibilitätsstörungen und Schmerzen, aber auch zu motorischen Ausfällen wie Lähmungen und Koordinationsstörungen kommen. Sexuelle Funktionsstörungen, Blasen- und Darmentleerungsstörungen kommen ebenfalls vor. Kognitive Beeinträchtigungen und die Fatigue, schnelle geistige und körperliche Erschöpfung, machen das Krankheitsbild noch komplexer (Compston and Coles 2008).

Bei der MS werden mehrere Verlaufsformen unterschieden. 85% der Patienten\* haben zu Beginn der Erkrankung einen schubförmigen Verlauf (relapsing-remitting MS, RRMS), der durch Episoden neurologischer Defizite gekennzeichnet ist. Zumindest zu Beginn der Erkrankung bildet sich die Schubsymptomatik bei vielen Patienten teilweise oder sogar völlig zurück. In den meisten Fällen geht die Erkrankung im Laufe der Zeit allerdings in eine sekundär chronisch progrediente Verlaufsform (secondary progressive MS, SPMS) über, welche durch langsam zunehmende Behinderung gekennzeichnet ist. Schübe treten dann typischerweise nicht mehr auf. Bei den übrigen 15% der Patienten manifestiert sich die MS von Anfang an in einer chronisch progredienten Form (primary progressive MS, PPMS) (Compston and Coles 2008). Die Unterscheidung der verschiedenen Verlaufsformen der MS ist von großer Bedeutung, da die meisten momentan zur Verfügung stehenden Therapeutika zwar Einfluss auf die Krankheitsaktivität der schubförmigen MS haben, aber bei chronisch progredientem Verlauf nur in begrenztem Maße effektiv sind (Lassmann et al. 2007).

\*Aus Gründen der besseren Lesbarkeit wurde in der Arbeit bei Personenbezeichnungen die männliche Form gewählt. Sofern nicht explizit anders angegeben, beziehen sich die Angaben auf Angehörige beider Geschlechter.

## 1.2 Epidemiologie

Die globale Verteilung der MS ist ungleich, aber nicht zufällig. Weltweit geht man von mehr als zwei Millionen MS-Patienten aus (Browne et al. 2014), wobei die Prävalenz insgesamt einem Breitengradabhängigen Gradienten zu folgen scheint, mit geringem Erkrankungsrisiko nahe am Äquator und zunehmender Häufigkeit in Richtung der Pole (Simpson et al. 2011). In Deutschland, das zu den Ländern mit dem größten Erkrankungsrisiko zählt, wurde 2008 eine Prävalenz von 149 pro 100 000 Einwohnern angegeben (Weltgesundheitsorganisation 2008).

Frauen sind durchschnittlich doppelt so häufig betroffen wie Männer. Auffällig ist auch ein erhöhtes Vorkommen in der kaukasischen Bevölkerung gegenüber anderen Ethnien sowie eine höhere Inzidenz und Prävalenz in Ländern mit hohem durchschnittlichem Einkommen (Weltgesundheitsorganisation 2008).

## 1.3 Ätiologie

### 1.3.1 Genetische Faktoren

Das Risiko, an MS zu erkranken, ist in der Verwandtschaft von betroffenen Patienten gegenüber der normalen Bevölkerung erhöht. Monozygote Zwillinge von MS-Patienten haben dabei mit 25-30% das höchste Risiko (Ebers et al. 1986; Sadovnick et al. 1993). Laut einer Metaanalyse von drei großen Studien erkranken andere Geschwister mit einer Wahrscheinlichkeit von 3%, während das Erkrankungsrisiko der Eltern und Kinder von Betroffenen bei 2% liegt und Verwandte zweiten und dritten Grades ein kleineres Risiko zeigen (Compston 1999). Die Erkrankungswahrscheinlichkeit von Adoptivgeschwistern ist hingegen mit dem der umgebenden Bevölkerung vergleichbar (Ebers et al. 1995).

Das erhöhte Risiko in der Verwandtschaft von betroffenen Patienten legt den Einfluss von genetischen Faktoren nahe. Ein monogener Erbgang konnte in Stammbäumen nicht nachgewiesen werden. Vielmehr wird in der Krankheitsentwicklung der Einfluss von vielen Genen vermutet (Beecham et al. 2013), sodass die MS zu den komplex genetischen Erkrankungen gezählt wird.

Für das größte genetische Risiko sind offenbar Variationen in Genen des humanen Leukozytenantigen-Systems (HLA-Systems), insbesondere im HLA-DRB1-Lokus, verantwortlich. Diese Gene kodieren für Moleküle des Haupthistokompatibilitätskomplexes (Major Histocompatibility Complex (MHC)) der Klasse II, welche über die Präsentation von verschiedenen Antigenen das



Immunsystem beeinflussen können. Das HLA-DRB1\*1501-Allel und der mit ihm assoziierte Haplotyp DRB1\*1501-DQB1\*0602 oder DR2 gehen in den meisten Bevölkerungsgruppen mit einem erhöhten Erkrankungsrisiko einher (Barcellos et al. 2003). Homozygote Träger haben im Vergleich zu heterozygoten Trägern ein besonders hohes Erkrankungsrisiko und sind zudem häufiger von schwereren Verlaufsformen betroffen (Barcellos et al. 2003). Der Mechanismus, der in Anwesenheit dieses Allels zur Krankheitsentwicklung führt, ist bislang zwar nicht vollständig geklärt, möglicherweise spielen jedoch strukturelle Veränderungen im MHC-Molekül eine Rolle, welche die Präsentation von Autoantigenen wie Myelin-Basisches Protein (MBP) erleichtern.

In Anwesenheit des DR\*15-Allels kann das HLA-DRB1\*08-Allel die Erkrankungswahrscheinlichkeit weiterhin erhöhen, HLA-DRB1\*14 Positivität gilt hingegen als ein protektiver Faktor (Barcellos et al. 2006). Neben den genannten Allelen sind auch einige andere Variationen in HLA-Genen von Bedeutung, wobei abhängig von der Bevölkerungsgruppe unterschiedliche Allele als besondere Risikofaktoren für MS gelten (Didonna and Oksenberg 2015).

Dass der HLA-Lokus nicht allein für die genetische Suszeptibilität verantwortlich ist, sondern auch andere nicht daran gekoppelte Determinanten existieren müssen, wurde bereits 1987 gezeigt (Risch 1987), jedoch blieben andere Risikoallele über lange Zeit unentdeckt (Sawcer et al. 2005). Durch genomweite Assoziationsstudien konnten jedoch bis jetzt insgesamt 110 andere Einzelnukleotid-Polymorphismen identifiziert werden, die das MS-Risiko ebenfalls, wenn auch in geringerem Maße, erhöhen (Beecham et al. 2013). Auffällig dabei war, dass überproportional viele Veränderungen in Genen gefunden wurden, welche an der Regulation des Immunsystems beteiligt sind, was die Theorie der autoimmunen Genese der MS weiter unterstützt. Beispiele hierfür sind Polymorphismen in den Genen des IL-2- und des IL-7-Rezeptors (Hafler et al. 2007).

### 1.3.2 Umweltfaktoren

Auch wenn ein bestimmter genetischer Hintergrund das Risiko für MS deutlich erhöht, scheinen genetische Faktoren nicht allein für die Entwicklung der Krankheit verantwortlich zu sein. Vielmehr wird eine komplexe Interaktion zwischen genetischen Variationen und verschiedenen Umweltfaktoren in der Krankheitsentstehung vermutet. Dafür spricht die Tatsache, dass monozygote Zwillinge trotz identischen Erbguts

häufig diskordant für MS sind (Sadovnick et al. 1993). Für einen Einfluss der Umgebung sprechen außerdem die Ergebnisse einer Migrationsstudie, die aufzeigen, dass Migranten, welche vor dem 15. Lebensjahr von einem Hochrisikogebiet in ein Gebiet mit niedriger MS-Prävalenz ziehen, das niedrigere Erkrankungsrisiko ihrer neuen Heimat annehmen (Dean and Kurtzke 1971). Auch der rasche Anstieg der Inzidenz und Prävalenz der Erkrankung in den letzten Jahrzehnten (Melcon et al. 2014) macht genetische Faktoren als alleinige Ursache unwahrscheinlich.

Umweltfaktoren, die möglicherweise das MS-Risiko erhöhen und im Folgenden genauer besprochen werden, sind ein Mangel an Vitamin D, Infektionen beispielsweise mit Epstein-Barr-Virus und das Zigarettenrauchen. Auch vermehrte Hygiene könnte zu einem erhöhten Risiko führen (Conradi et al. 2011; Leibowitz et al. 1966). Dadurch ließe sich eventuell auch die höhere Inzidenz der MS in Bevölkerungsgruppen mit höherem sozioökonomischen Status erklären (Kurtzke and Page 1997). Ein Einfluss des Alkoholkonsums auf das MS Risiko wurde dagegen nicht nachgewiesen (Massa et al. 2013).

#### 1.3.2.1 *Vitamin D Mangel*

Die Ergebnisse von mehreren Studien legen nahe, dass Vitamin D einen gewissen Schutz vor der Entwicklung einer MS bietet. Da die Exposition zu Sonnenlicht die Hauptquelle für Vitamin D darstellt, könnte dadurch z.T. auch die geringere Prävalenz der Erkrankung in Gebieten nahe am Äquator (Simpson et al. 2011) erklärt werden. Eine negative Korrelation zwischen Sonnenlichtexposition und MS Risiko wurde auch beim Vergleich der MS Prävalenz in verschiedenen Regionen Australiens festgestellt (van der Mei et al. 2001). Auch wenn Hinweise darauf existieren, dass Sonnenlicht ebenfalls über Vitamin D unabhängige Mechanismen das Erkrankungsrisiko senken kann (Becklund et al. 2010), gilt eine schützende Funktion von Vitamin D als erwiesen. Denn sowohl hohe Konzentrationen an Vitamin D im Serum (Munger et al. 2006) als auch die Einnahme von Vitamin D Präparaten (Munger et al. 2004) sind mit einem geringeren Erkrankungsrisiko assoziiert. Ferner konnte durch Supplementierung von 1,25-(OH)<sub>2</sub> Vitamin D<sub>3</sub> oder Vitamin D<sub>3</sub> eine Reduktion der Krankheitsaktivität in experimenteller Autoimmunenzephalomyelitis (EAE), dem Tierversuch der MS, erreicht werden (Lemire and Archer 1991; Spach and Hayes 2005).

Auch genetische Analysen deuteten auf eine schützende Funktion von Vitamin D hin. Genvariationen, die zu einem Funktionsverlust der 1-alpha-Hydroxylase führen und

somit die Umwandlung des Vitamins in seine aktive Form verhindern, gehen mit einem deutlich erhöhten Risiko für MS einher (Ramagopalan et al. 2011).

Die schützende Wirkung von Vitamin D wird auf seine Rolle in der Regulation des Immunsystems und in der Reduktion von Entzündungsprozessen zurückgeführt. Denn 1,25-(OH)<sub>2</sub> Vitamin D<sub>3</sub> führt zu einer Veränderung des Immunzellrepertoires mit anteilmäßig weniger CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten. Die Zahl an IL-6 und IL-17 produzierenden Zellen sinkt, während die Anzahl der Zellen mit immunsuppressiven Eigenschaften wie regulatorischen T-Zellen und IL-10 produzierenden Zellen steigt (Correale et al. 2009).

Diese schützenden Eigenschaften von Vitamin D sind nicht nur in der Prävention der MS von Bedeutung, sondern auch in der Beeinflussung des Krankheitsverlaufs. Eine Supplementierung des Vitamins gilt bei MS-Patienten als sinnvoll, da die Konzentration von 1,25-(OH)<sub>2</sub> Vitamin D<sub>3</sub> bei Patienten, die gerade einen Schub erlitten, gering war im Vergleich zu Patienten in Remission (Correale et al. 2009). Hohe Vitamin D Konzentrationen im Serum scheinen insgesamt die Schubrate bei MS-Patienten zu reduzieren (Mowry et al. 2010; Simpson et al. 2010).

#### 1.3.2.2 *Infektionen*

Als weitere Risikofaktor für die Entwicklung einer MS gelten einige virale Infektionen. Unter anderem wird ein potentieller Einfluss des Humanen Herpes Virus 6, dessen Expression in MS-Läsionen nachgewiesen wurde (Challoner et al. 1995), diskutiert. Die meisten Hinweise gibt es jedoch auf eine pathogenetische Rolle des Epstein-Barr-Virus (EBV).

Auch wenn der EBV selbst in MS-Läsionen nicht nachgewiesen wurde (Hilton et al. 1994), legen Ergebnisse mehrerer Studien (Martyn et al. 1993; Operskalski et al. 1989) einen Einfluss des EBV auf das MS-Risiko nahe. Laut einer Meta-Analyse von mehreren Studien zur Assoziation zwischen EBV und MS ist dabei das Alter zum Zeitpunkt der EBV-Infektion von Bedeutung. Denn während das MS-Risiko von Personen, die seronegativ für EBV sind, also noch nie infiziert wurden, sehr niedrig ist, findet man ein erhöhtes Risiko nach einer EBV-Infektion in früher Kindheit, jedoch das höchste Risiko nach einer EBV-Infektion im frühen Erwachsenenalter, die oft als infektiöse Mononukleose manifest wird (Thacker et al. 2006). Die Tatsache, dass das Alter bei der Infektion von Bedeutung ist, könnte eventuell auch das kleinere

Erkrankungsrisiko von Probanden mit geringfügig jüngeren Geschwistern (Ponsonby et al. 2005) erklären, die möglicherweise schon in jüngerem Alter dem Virus ausgesetzt sind.

Die Erhöhung des Erkrankungsrisikos durch eine EBV-Infektion wird unter anderem dadurch erklärt, dass strukturelle Ähnlichkeiten zwischen viralen Antigenen und MBP existieren (Lang et al. 2002). Aufgrund dieser sogenannten molekularen Mimicry können auf MBP sensibilisierte autoreaktive T-Zellen im Rahmen einer Kreuzreaktion auch EBV-Peptide erkennen, sodass sie in der Folge aktiviert werden und später im zentralen Nervensystem (ZNS) eine Entzündungsreaktion initiieren.

### 1.3.2.3 *Rauchen*

Schon seit mehreren Jahrzehnten wird ein Einfluss des Rauchens auf MS in Erwägung gezogen (Wingerchuk 2012), wobei mittlerweile auch die Ergebnisse großer Studien und Metaanalysen eine Assoziation zwischen dem Zigarettenrauchen und einem erhöhten Erkrankungsrisiko nahelegen (Handel et al. 2011; Hernán et al. 2001). Dabei scheint die kumulative Dosis der gerauchten Zigaretten von Bedeutung zu sein, denn sowohl die Intensität als auch die Dauer des Rauchens tragen unabhängig voneinander zur Risikoerhöhung bei (Hedstrom et al. 2013). Insgesamt haben Raucher ein 1,5-fach erhöhtes Erkrankungsrisiko im Vergleich zu Nichtrauchern (Hedstrom et al. 2013). Das Ausmaß der Risikoerhöhung scheint dabei abhängig vom genetischen Hintergrund zu sein, denn insbesondere bei Trägern des HLA DRB1\*15-Allels wird durch das Rauchen das Erkrankungsrisiko erhöht (Hedström et al. 2011). Solche Interaktionen mit genetischen Faktoren können mittlerweile sogar auch für das Passivrauchen angenommen werden (Hedström et al. 2014).

Nicht nur das Risiko, sondern auch der Krankheitsverlauf der MS wird durch das Rauchen beeinflusst. Mehreren Studien deuten darauf hin, dass sich durch das Rauchen das Risiko der Entwicklung einer sekundär chronisch progredienten MS aus einer schubförmigen MS erhöht (Handel et al. 2011; Hernán et al. 2005). Außerdem scheint Rauchen innerhalb der chronisch progredienten Verlaufsformen das Fortschreiten der Behinderung zu beschleunigen (Wingerchuk 2012). Hier wurden sowohl eine Fall-Kontroll-Studie als auch eine Kohortenstudie durchgeführt. Mit der Fall-Kontroll-Studie sollte der Einfluss des Rauchens auf das MS-Risiko, mit der Kohortenstudie der Einfluss des Rauchens auf den Krankheitsverlauf untersucht werden.

Die Ergebnisse zeigen, dass durch Rauchen das MS-Risiko erhöht ist und deuten darauf hin, dass durch Rauchen das Risiko einer Konversion von der schubförmigen in die sekundär chronisch progrediente Verlaufsform erhöht wird (Hernán et al. 2005; Wingerchuk 2012).

Die Mechanismen, über die Rauchen zur MS-Risiko-Erhöhung beiträgt, sind noch nicht vollständig geklärt. Im EAE-Modell konnte allerdings gezeigt werden, dass myelinspezifische T-Zellen in der Lunge präsent sind, nach lokaler Stimulation proliferierten und letztendlich im ZNS zu einer Entzündungsreaktion führen (Odoardi et al. 2012). Diese Ergebnisse lassen an eine Bedeutung der chronischen Irritation der Lunge durch das Rauchen denken. Aber auch neurotoxische Effekte und eine Zunahme der Häufigkeit von respiratorischen Infekten, die durch das Rauchen verursacht wird, könnten eine Rolle spielen (Ascherio and Munger 2007).

#### 1.4 Pathologie und Pathophysiologie

Charakteristisch für die MS ist das Vorkommen von demyelinisierenden Läsionen im ZNS, wobei sich diese hinsichtlich morphologischer Kennzeichen in einerseits akute, aktive und andererseits chronische, inaktive Läsionen unterteilen lassen. Während letztere häufiger bei primär oder sekundär chronisch progredienter MS vorkommen, sind akute, aktive Läsionen eher typisch für die schubförmig verlaufende Erkrankung (Popescu and Lucchinetti 2012).

Akute, aktive Läsionen sind gekennzeichnet durch starke Demyelinisierung und massive Infiltration von T- und B-Lymphozyten sowie von Makrophagen, welche Myelin-Abbauprodukte enthalten. Der axonale Schaden ist in aktiven Läsionen eher schwach ausgeprägt, aber dennoch vorhanden. Typisch für die akuten, aktiven Läsionen ist auch eine früh einsetzende Remyelinisierung durch reife Oligodendrozyten inmitten der demyelinisierten Umgebung. Im Gegensatz dazu zeigen sich chronische, inaktive Läsionen hypozellulär. Makrophagen, Mikroglia und Lymphozyten sind hier deutlich seltener zu erkennen. Der axonale Schaden tritt hier mehr in den Vordergrund und die Remyelinisierung ist insuffizient. Sogenannte schwelende Läsionen nehmen eine Art Mittelstellung zwischen den bisher genannten Läsionen ein. Dabei handelt es sich um scharf begrenzte demyelinisierte Läsionen mit einem hypozellulären Zentrum, aber einer hohen Zahl an Makrophagen und Mikroglia in der Peripherie (Popescu and Lucchinetti 2012).

Während chronische Läsionen sich unter morphologischen Gesichtspunkten meist ähneln, konnten Lucchinetti et al. innerhalb der aktiven Läsionen der frühen schubförmig verlaufenden MS vier verschiedene Subtypen identifizieren, die im Folgenden beschrieben werden (Popescu and Lucchinetti 2012). Dabei waren die Läsionsarten zwar interindividuell verschieden, intraindividuell jedoch gleich. Die Heterogenität lässt deshalb unterschiedliche pathogenetische Faktoren vermuten, sodass individuelle Therapieansätze sinnvoll wären. Läsionen vom Subtyp I sind durch Infiltrationen von T-Lymphozyten und Makrophagen gekennzeichnet. Antikörper- und Komplementablagerungen finden sich hier nicht, wodurch sie sich von den Läsionen des Subtyp II abgrenzen. Diese weisen neben Zellinfiltraten nämlich auch Immunglobulin- und Komplementablagerungen auf. Das Angriffsziel dieser Immunglobuline wurde bisher noch nicht identifiziert. Dennoch sprechen vor allem Patienten mit dieser Läsionsart gut auf eine Plasmapheresebehandlung an (Keegan et al. 2005), was eine pathogenetische Wirkung der vorhandenen Antikörper nahelegt. Typ-III-Läsionen sind durch apoptotischen Untergang von Oligodendrozyten charakterisiert. Metabolischer Stress der Oligodendrozyten wird hier als mögliche Läsionsursache vermutet. Typ-IV-Läsionen wurden nur sehr selten bei primär chronisch progredienter MS gefunden. Hier kam es zu einem nicht-apoptotischen Untergang von Oligodendrozyten in der periläsionalen weißen Substanz (Popescu and Lucchinetti 2012).

Auch wenn MS lange Zeit als Erkrankung der weißen Substanz angesehen wurde, fanden Studiengruppen der Pathologie heraus, dass auch die graue Substanz von Läsionen betroffen ist. Hinsichtlich ihrer Ausdehnung lassen sich drei Typen kortikaler Läsionen unterscheiden. Während manche Läsionen komplett innerhalb des Kortex lokalisiert sind, entstehen andere im Grenzbereich zwischen der grauen und weißen Substanz. Kortikale Läsionen der dritten Gruppe hingegen reichen von der Hirnoberfläche in den Kortex hinein (Peterson et al. 2001). Läsionen in der grauen Substanz werden als pathologisches Korrelat für den irreversiblen Behinderungsfortschritt bei chronisch progredienten Verlaufsformen verantwortlich gemacht (Kutzelnigg et al. 2005). Sie kommen allerdings nicht nur bei primär und sekundär chronisch progredienter MS, sondern auch in frühen Stadien mit schubförmigem Verlauf vor (Lucchinetti et al. 2011).

## 1.5 Immunpathogenese

In der Immunpathogenese der MS wird ein autoimmuner Ursprung vermutet. Die multiplen Läsionen scheinen dadurch zu entstehen, dass autoreaktive Zellen Bestandteile des ZNS angreifen und in der Folge zu Demyelinisierung und in geringem Ausmaß auch zu axonalem Schaden führen (Weissert 2013). Welche Autoantigene in der Pathogenese der MS den primären Angriffspunkt der Immunzellen darstellen, ist bislang noch nicht geklärt. Im Zentrum der Forschung stehen unter anderem einige myelinische Proteine wie Myelin-Basisches Protein (MBP), Proteolipidprotein (PLP) und myelinisches Oligodendrozytenglykoprotein (MOG) (Riedhammer and Weissert 2015).

Der Entstehung autoimmuner Erkrankungen wird physiologischerweise während der Entwicklung im Thymus vorgebeugt. Dort werden den reifenden Thymozyten verschiedene Autoantigene auf MHC-Molekülen präsentiert. Diejenigen Thymozyten, welche diese Antigene mit zu hoher Affinität binden, werden als autoreaktive Zellen erkannt und im Rahmen der negativen Selektion in die Apoptose getrieben. Bei Versagen dieser zentralen Toleranz können solche autoreaktiven Zellen jedoch der negativen Selektion entkommen und in die Peripherie gelangen (Riedhammer and Weissert 2015). Eine Autoimmunerkrankung wie MS kann die Folge sein.

Zur Manifestation der Erkrankung kommt es dann, wenn naive autoreaktive CD4+ T-Lymphozyten in der Peripherie aktiviert werden. Die Mechanismen, welche zu dieser peripheren Aktivierung führen, sind noch nicht abschließend geklärt, doch mehrere Hypothesen bestehen. Diskutiert wird u.a. eine Aktivierung im Rahmen von Infektionen. Infektiöse Triggerfaktoren könnten aufgrund struktureller Ähnlichkeiten zu myelinischen Proteinen von autoreaktiven Zellen im Rahmen einer Kreuzreaktion erkannt werden, woraufhin diese Zellen aktiviert werden (Riedhammer and Weissert 2015). Dieser Mechanismus, der als molekulare Mimicry bezeichnet wird, wurde schon früher als bedeutsam in der Pathogenese angesehen (Weissert et al. 1998). Aber auch unabhängig von strukturellen Ähnlichkeiten könnten infektiöse Faktoren zur Initiierung der Entzündung beitragen, indem sie über eine allgemeine Aktivierung des Immunsystems im Sinne einer Bystander Reaktion zum Verlust der Selbsttoleranz führen (Haring et al. 2002). Nach einer anderen Hypothese könnte die Aktivierung autoreaktiver T-Lymphozyten unabhängig von Infektionen zustande kommen, dadurch, dass diese mit Myelinfragmenten in Kontakt kommen, die von

antigenpräsentierenden Zellen in den zervikalen Lymphknoten präsentiert werden (Vos et al. 2002).

Nachdem autoreaktive T-Zellen in der Peripherie aktiviert wurden, können sie in das ZNS migrieren, wo sie durch an MHC-Moleküle gebundene ZNS-spezifische Antigene erneut aktiviert werden. Daraufhin veranlassen sie eine Entzündungsreaktion. Durch das Zusammenspiel von verschiedenen Zellspezifitäten kommt es dann zur Entstehung der typischen Läsionen mit Demyelinisierung und axonalem Schaden. Im Rahmen des sog. Epitope Spreading breitet sich die Immunantwort dann auch auf andere Antigene aus, die ursprünglich noch keine Angriffsziele der Immunzellen darstellten (Selter and Hemmer 2013).

Bei der Entstehung der Krankheit sind verschiedene Zellspezifitäten beteiligt. Von zentraler Bedeutung scheinen die CD4+ T-Lymphozyten zu sein (Sawcer et al. 2011). Sie regulieren und beeinflussen die Aktivität anderer Immunzellen. Allerdings scheinen sie nicht allein für die Erkrankung verantwortlich zu sein. Vielmehr wird ein komplexes Zusammenspiel von Zellen des adaptiven und des angeborenen Immunsystems verantwortlich gemacht, bei dem auch CD8+ T-Lymphozyten, B-Lymphozyten, NK-Zellen und Mikroglia zum Gewebeschaden beitragen (Weissert 2013).

#### 1.5.1 Die Rolle der CD4+ T-Lymphozyten

CD4+ T-Lymphozyten scheinen die zentrale Rolle in der Immunpathogenese der MS einzunehmen, da das größte genetische Erkrankungsrisiko mit bestimmten Allelen einhergeht, welche für MHC-Klasse-II-Moleküle kodieren (Sawcer et al. 2011). Die CD4+ Lymphozyten initiieren die Entzündungsreaktion, indem sie durch Sekretion von Zytokinen und Immunmediatoren Makrophagen und andere Immunzellen in das ZNS rekrutieren (Selter and Hemmer 2013).

Eine naive CD4+ T-Lymphozyt kann sich in Anwesenheit verschiedener Zytokine zu unterschiedlichen Subtypen von T-Helfer-Zellen entwickeln, wobei die Bedeutung der einzelnen Subtypen in der Pathogenese noch nicht vollständig geklärt ist (Riedhammer and Weissert 2015). Insgesamt wird den IFN- $\gamma$  produzierenden TH1-Zellen die größte Bedeutung zugesprochen. Sie werden für die Initiierung der Entzündungsreaktion verantwortlich gemacht (Lowther et al. 2013; O'Connor et al. 2008) und machen bei MS-Patienten einen höheren Anteil im CD4+ Repertoire aus als bei gesunden Kontrollpersonen (Nakajima et al. 2004). Außerdem legen Untersuchungen von PLP-



und MBP-spezifischen Zelllinien eine pathogene Funktion der TH1-Zellen nahe. Denn T-Lymphozyten, die von MS-Patienten isoliert wurden, zeigten eine signifikant höhere TH1-Zytokinproduktion als diejenigen von gesunden Kontrollpersonen (Tejada-Simon et al. 2001) und laut einer Studie, in der das Muster der Zytokinsekretion durch autoreaktive PLP-spezifische T-Zellen im zeitlichen Verlauf untersucht wurde, zeigte sich während der aktiven Phase eine Veränderung des Zytokinmusters zugunsten von IFN- $\gamma$  (Correale et al. 1995). Dennoch existieren auch Hinweise auf eine pathogenetische Funktion der TH17-Zellen (Fletcher et al. 2010), wobei ihnen der Zugang zum ZNS womöglich nur durch die TH1-Zellen ermöglicht wird (O'Connor et al. 2008). Den regulatorischen T-Lymphozyten dagegen wird eher eine protektive Funktion zugesprochen. Bei MS-Patienten sind sie möglicherweise in ihrer Funktion beeinträchtigt (Fletcher et al. 2010).

#### 1.5.2 Die Rolle der CD8+ T-Lymphozyten

Eine Rolle der CD8+ Lymphozyten in der Pathogenese der MS wurde lange Zeit vernachlässigt, da das größte genetische Risiko mit Allelen, die für MHC-II-Moleküle kodieren, assoziiert ist (Sawcer et al. 2011). Allerdings sind CD8+ T-Lymphozyten sogar in höherer Zahl in MS-Läsionen zu finden als CD4+ T-Zellen (Babbe et al. 2000), was auch für sie eine pathogenetische Rolle nahelegt. Aufgrund ihrer Reaktivität auf MHC-I gebundene Peptide, welche im Gegensatz zu MHC-II gebundenen Peptiden auch auf Oligodendrozyten, Astrozyten und Neuronen exprimiert werden, könnten sie auf direktem Wege ZNS-spezifische Zellen schädigen (Neumann 2002). Auf der anderen Seite existieren auch regulatorische CD8+ Lymphozyten, welche durch Inhibierung von autoreaktiven CD4+ Lymphozyten den Krankheitsverlauf positiv beeinflussen können (Correale and Villa 2010).

#### 1.5.3 Die Rolle der B-Lymphozyten

Auch wenn den T-Lymphozyten die zentrale Rolle in der Immunpathogenese zugesprochen wird, scheinen auch die B-Lymphozyten von Bedeutung zu sein.

Diese könnten auf unterschiedliche Weise zur Entstehung von MS-Läsionen beitragen. Einerseits können sie die zellvermittelte Immunantwort beeinflussen, indem sie proinflammatorische Zytokine sezernieren. In ihrer Funktion als antigenpräsentierende Zellen können sie außerdem Antigene internalisieren und in prozessierter Form auf MHC-II-Molekülen den T-Zellen präsentieren. Andererseits bewirken sie durch die Produktion von Antikörpern eine humorale Immunantwort (Duddy and Bar-Or 2006;

Riedhammer and Weissert 2015). Die von ihnen produzierten Immunglobuline könnten auch pathogenetisch wirken, denn vor allem diejenigen Patienten, in deren Läsionen Immunglobulinablagerungen zu finden sind, sprechen gut auf eine Plasmapheresetherapie an (Keegan et al. 2005).

Für eine pathogenetische Rolle von B-Zellen sprechen auch die Erfolge von Behandlungen mit Rituximab oder Ocrelizumab bei MS-Patienten. Dabei handelt es sich um Anti-CD20-Antikörper, die zu einer Depletion von B-Zellen führen und bei MS-Patienten sowohl die Anzahl an Kontrastmittel aufnehmenden Läsionen als auch die Schubrate reduzieren konnten (Hauser et al. 2008; Kappos et al. 2011).

### 1.6 Therapiemöglichkeiten bei MS

In der Behandlung der MS wird die Akuttherapie eines Schubes von der über einen längeren Zeitraum durchgeführten verlaufsmodifizierenden Therapie unterschieden. Eine parallel durchgeführte symptomatische Therapie kann daneben spezifisch einzelne Beschwerden lindern (Garg and Smith 2015).

Ein akuter Schub kann beispielsweise durch intravenöse Verabreichung von Methylprednisolon oder durch Plasmapherese behandelt werden (Berkovich 2013). Auf die verlaufsmodifizierenden Medikamente, die zum größten Teil in den letzten beiden Jahrzehnten entwickelt wurden, wird nun etwas genauer eingegangen. Ihr Ziel ist es, die Schubrate und -schwere zu reduzieren und die Krankheitsprogression zu verzögern. Auf dem Markt stehen dabei mehrere Medikamentengruppen zur Verfügung, die auf unterschiedliche Weise die Überreaktivität des Immunsystems dämpfen. Während sie den Verlauf bei der schubförmigen MS meist günstig beeinflussen, war ihre Wirkung auf chronisch progrediente Formen jedoch meist sehr begrenzt (Weissert 2013). Für die primär chronisch progrediente MS kann Ocrelizumab eingesetzt werden, welches als Anti-CD20-Antikörper zu einer Depletion der B-Lymphozyten führt (Flynn and Gerriets 2019). Verglichen mit der Einnahme eines Placebos ging seine Anwendung in einer Phase III Studie mit einem geringeren Prozentsatz an klinisch oder radiologisch gemessener Krankheitsprogression bei PPMS-Patienten einher (Montalban et al. 2017). Bei der schubförmig verlaufenden MS stehen hingegen mehrere Medikamentengruppen zur verlaufsmodifizierenden Therapie zur Verfügung, welche im Folgenden genauer beschrieben werden. Grundsätzlich wird dabei die Therapie bei milden und moderaten Verlaufsformen von

derjenigen bei hochaktiven Verlaufsformen unterschieden (Deutsche Gesellschaft für Neurologie 2014).

#### 1.6.1 Therapie der schubförmigen MS bei milden und moderaten Verläufen

Medikamente der ersten Wahl zur Behandlung von milden oder moderaten Verlaufsformen der MS sind Interferon- $\beta$ -Präparate, Glatirameracetat, Dimethylfumarat und Teriflunomid (Deutsche Gesellschaft für Neurologie 2014).

Interferon- $\beta$  wirkt antiviral, immunmodulierend und antiproliferativ. Es war das erste Medikament, das sich effektiv darin zeigte, den Verlauf der MS günstig zu beeinflussen (Reder and Feng 2014). 1996 kam Glatirameracetat auf den Markt. In seinem Aufbau aus vier verschiedenen Aminosäuren ähnelt es dem MBP. Sein Wirkmechanismus ist noch nicht endgültig geklärt. In Diskussion stehen die Beeinflussung der Differenzierung von CD4+ T-Lymphozyten und der Zytokinsekretion sowie die Modulation der Antigenpräsentation durch Zellen des angeborenen Immunsystems. Aber auch direkte neuroprotektive und remyelinisierende Eigenschaften könnten zur Minderung der Krankheitsaktivität durch Glatirameracetat beitragen (Lalive et al. 2011). Als Dihydro-Orotat-Dehydrogenase-Inhibitor wirkt Teriflunomid, welches 2013 für die Behandlung der schubförmigen MS zugelassen wurde. Es hemmt die Pyrimidinsynthese in B- und T-Lymphozyten und somit deren Proliferation, sodass die Inflammation im ZNS gesenkt wird. Andere sich schnell teilende Zellen wie hämatopoetische Zelllinien dagegen bleiben unbeeinträchtigt (Oh and O'Connor 2013). 2014 wurde Dimethylfumarat für die Behandlung der MS zugelassen. Es war schon lange vorher aus der Behandlung der Psoriasis bekannt und entfaltet seine Wirkung durch Verschiebung der Zytokinproduktion in Richtung eines TH2-Profiles. Außerdem hat es schützende Eigenschaften auf Gliazellen, Oligodendrozyten und Neurone (Bomprezzi 2015).

#### 1.6.2 Therapie der schubförmigen MS bei (hoch)aktiven Verlaufsformen

Bei Patienten mit hoher Krankheitsaktivität wurden in den vergangenen Jahren Alemtuzumab, Natalizumab und Fingolimod als Erstlinientherapeutika eingesetzt (Deutsche Gesellschaft für Neurologie 2014). Als neuere Medikamente stehen nun auch oral verabreichtes Cladribin oder das bereits genannte Ocrelizumab zur Verfügung. Diese Medikamente zeigen sich sehr effektiv in der Beeinflussung des Krankheitsverlaufs, haben jedoch kein so günstiges Nebenwirkungsprofil wie diejenigen Medikamente, welche bei milden oder moderaten Verlaufsformen die

Erstlinientherapeutika darstellen. Außerdem ist ihre langfristige Sicherheit noch nicht geklärt. Insbesondere zu Alemtuzumab erschienen im Verlauf Berichte zu schwerwiegenden Nebenwirkungen, sodass dieses seit April 2019 nicht mehr zu den Medikamenten der ersten Wahl bei hochaktiven Verlaufsformen gezählt wird. Die Indikation für Alemtuzumab steht jetzt nur noch bei Erwachsenen, bei denen zuvor eine vollständige und adäquate Behandlung mit mindestens zwei anderen verlaufsmodifizierenden Therapien versagt hat oder bei denen alle anderen verlaufsmodifizierenden Therapien kontraindiziert sind (Sanofi-Aventis Deutschland GmbH 2019). Die Wirkungsweise von Alemtuzumab wird in einem eigenen Kapitel dargestellt, da dessen Wirkungsmechanismen in der Dissertationsarbeit untersucht wurden. Hingegen erfolgt hier ein Überblick über die anderen bei hochaktiven Verlaufsformen zur Anwendung kommenden Therapeutika.

Natalizumab ist ein monoklonaler Antikörper, der die  $\alpha$ -Kette des  $\alpha 4\beta 1$ -Integrins auf Lymphozyten und Monozyten blockiert. Dadurch wird die Interaktion zwischen diesen Zellen und den vaskulären endothelialen Zellen der Blut-Hirn-Schranke gestört, sodass die Lymphozyten nicht in das ZNS migrieren können (Ransohoff 2007). Natalizumab zeigte sich sehr effektiv in der Behandlung der schubförmigen MS und konnte im Vergleich zu einem Placebo die Zahl an neuen gadoliniumaufnehmenden Läsionen im MRT nach 2 Jahren sogar um 92% reduzieren (Polman et al. 2006). Leider ist seine Anwendung mit einem erhöhten Risiko für die Entwicklung einer progressiven multifokalen Leukenzephalopathie (PML) verbunden, einer schwerwiegenden opportunistischen Infektion der Oligodendrozyten im ZNS, die durch Reaktivierung des JC-Virus zustande kommt und oft letal endet (Weissert 2011). Insbesondere bei positivem JC-Antikörperstatus steigt das Risiko (Bloomgren et al. 2012), weshalb dieser während einer Natalizumab-Behandlung regelmäßig überprüft werden sollte.

Als erstes orales Medikament für die Behandlung der RRMS wurde Fingolimod 2010 zugelassen. Es wirkt als Modulator des Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptors auf Lymphozyten, welche auf diese Weise im sekundären lymphatischen Gewebe zurückgehalten werden. Auch ein direkter Einfluss auf Oligodendrozyten wird diskutiert (Pelletier and Hafler 2012). Auch Fingolimod zeigte sich in der Behandlung der schubförmigen MS hinsichtlich klinischer und radiologischer Parameter effektiv. Das langfristige Sicherheitsprofil kann bis jetzt allerdings noch nicht endgültig abgeschätzt

werden. Die bisher beobachteten Nebenwirkungen umfassten unter anderem das Vorkommen von Bradykardien, atrioventrikulären Leitungsblöcken und Makulaödemen (Kappos et al. 2010).

Als erste orale Kurzzeittherapie wurde in Europa 2017 Cladribin für die Therapie hochaktiver Verlaufsformen der RRMS zugelassen. Dabei handelt es sich um ein Prodrug, welches nach Aufnahme in die Lymphozyten zum aktiven Metaboliten 2-Chlorodesoxy-Adenosin-5'-Triphosphat phosphoryliert wird. Dieses stört als Nukleosidanalogen die DNA-Synthese und -Reparatur und führt so zur Apoptose und zum Untergang sowohl von sich teilenden als auch von ruhenden Lymphozyten. Durch seine Fähigkeit zur Passage der Blut-Hirn-Schranke könnte Cladribin seinen therapeutischen Effekt auch auf Lymphozyten im zentralen Nervensystem entfalten (Boyko and Boyko 2018). In einer Phase III Studie führte Cladribin zu einer signifikanten Reduktion der Schubrate. Auch hinsichtlich des Risikos für die Krankheitsprogression zeigte es Wirkung (Giovannoni et al. 2010).

Ocrelizumab entfaltet seine Wirkung über Beeinflussung des humoralen Immunsystems. Als CD20-Antikörper führt er vor allem über antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität zu einer effektiven Depletion zirkulierender B-Lymphozyten (Milo 2019). Neben seiner Anwendung bei PPMS zeigt es auch gute Wirkung bei schubförmiger MS. In zwei Phase III Studien führte Ocrelizumab verglichen mit Interferon Beta-1a sogar zu einer Reduktion der jährlichen Schubrate um 46% bzw. 47%. Auch hinsichtlich der Progression im Behinderungsgrad und der Entwicklung der Zahl an Gadoliniumaufnehmenden Läsionen zeigte Ocrelizumab eine bessere Wirkung (Hauser et al. 2017).

Mitoxantron, welches wie Alemtuzumab zu den Medikamenten der zweiten Wahl gezählt wird, führt zu Strangbrüchen der Desoxyribonukleinsäure (DNS) und verhindert deren Reparatur, sodass Lymphozyten in ihrer Proliferation gestört werden. Mitoxantron wirkt allerdings kardiotoxisch und erhöht das Risiko für eine Leukämie. Es sollte deswegen nur bei Versagen anderer Therapiealternativen und dringender Indikation verabreicht werden (Fox 2006).

### 1.6.3 Alemtuzumab

#### 1.6.3.1 *Herstellung*

Alemtuzumab richtet sich gegen das Oberflächenmolekül CD52, ein glykosylphosphatidylinositolgebundenes Glykoprotein (Xia et al. 1993), das und unter anderem auf B- und T-Lymphozyten exprimiert wird (Rao et al. 2012). Als monoklonaler Antikörper basierte seine Entwicklung auf dem Prinzip der Hybridom-Technik, welche 1975 von Köhler und Milstein beschrieben wurde. Diese lässt durch Fusionierung von antikörperproduzierenden B-Lymphozyten mit Zellen einer Myelomzelllinie sogenannte Hybridzellen entstehen, welche dauerhaft bestehen bleiben und Antikörper von vorher festgesetzter Spezifität produzieren können (Köhler and Milstein 1975). In der Folge wurde in der Abteilung der Pathologie der Universität Cambridge ein monoklonaler Ratten-Antikörper entwickelt, der sich gegen Lymphozyten richtete und unter dem Namen Campath 1 bekannt wurde (Hale et al. 1983). Für das ursprüngliche Ziel der Eliminierung von T-Lymphozyten vor Knochenmarkstransplantationen galt dieser als vielversprechend, da er im Gegensatz zu vorher entwickelten Antikörpern humanes Komplement fixierte und außerdem spezifisch auf Lymphozyten reagierte, während andere hämatopoietische Zellen unbeeinträchtigt blieben (Hale et al. 1983). Eine humanisierte Form des Antikörpers, Campath-1H, wurde bis 1988 von der gleichen Arbeitsgruppe entwickelt (Waldmann and Hale 2005). Alemtuzumab ist der internationale Freiname dieser humanisierten Form.

#### 1.6.3.2 *Zulassung von Alemtuzumab in der MS-Therapie*

Bevor Alemtuzumab zur Behandlung der schubförmigen MS im Jahr 2014 zugelassen wurde, war es bereits als Immunsuppressivum nach Transplantationen (Hanaway et al. 2011; Kaufman et al. 2006) aber auch zur Behandlung lymphoproliferativer Erkrankungen (Keating et al. 2002) herangezogen worden. Auch in der Behandlung rheumatologischer Erkrankungen wie Morbus Behçet (Lockwood et al. 2003) und Rheumatoider Arthritis (Weinblatt et al. 1995) fand Alemtuzumab bereits Anwendung.

Die ersten Untersuchungen zu Alemtuzumab in der Therapie der MS begannen ebenfalls schon in den 90er Jahren des vergangenen Jahrhunderts. Nachdem sich in einer Pilotstudie erste Hinweise ergaben, dass durch den Antikörper die Zunahme der Läsionslast im MRT reduziert werden könnte (Moreau et al. 1994), wurde die Stabilisierung der Krankheitsaktivität bei Patienten mit schubförmiger MS durch Alemtuzumab zwischen 2002 und 2009 in drei großen Studien beschrieben. Die

Ergebnisse dieser Studien führten zur Zulassung von Alemtuzumab für die schubförmige MS. Dabei wurde in einer Phase II Studie die Wirkung einer Alemtuzumab-Therapie mit der Wirkung einer Interferon- $\beta$ -1a-Therapie bei Patienten mit kürzlich diagnostizierter RRMS über drei Jahre hinweg verglichen. Beurteilt wurde der Therapieerfolg vorwiegend durch die Zunahme des Behinderungsgrades, gemessen auf der Expanded Disability Status Scale (EDSS), und durch die Schubrate. Hinsichtlich beider Kriterien zeigte sich die Alemtuzumab-Behandlung der Interferon- $\beta$ -1a Therapie überlegen (Coles et al. 2008). Auch in zwei folgenden Phase III Studien hatte Alemtuzumab positiven Einfluss auf den Krankheitsverlauf. Diese beiden Studien unterschieden sich in der Auswahl der Studienteilnehmer. Während die CARE-MS I Studie die Wirkung auf Patienten untersuchte, welche vorher noch keine andere verlaufsmodifizierende Therapie erhalten hatten, wurden in die CARE-MS II Studie Patienten aufgenommen, die unter vorheriger Therapie mit Interferon- $\beta$ -1a oder Glatirameracetat nicht schubfrei blieben. Nur in der CARE-MS II Studie wurde eine signifikante Verzögerung der Krankheitsprogression durch Alemtuzumab im Vergleich zu Interferon- $\beta$ -1a nachgewiesen, in der CARE-MS I Studie war der Unterschied zwischen den Behandlungsgruppen nicht signifikant. Hinsichtlich der Reduktion der Schubrate erwies sich Alemtuzumab aber in beiden Phase III Studien gegenüber dem Interferon- $\beta$ -1a als überlegen (Cohen et al. 2012; Coles et al. 2012a). Laut einer Follow-Up Studie der CAMMS223 blieb die Effektivität von Alemtuzumab hinsichtlich klinischer Gesichtspunkte länger bestehen, denn über fünf Jahre hinweg reduzierte Alemtuzumab das Risiko eines Behinderungsfortschritts um 72% und die Schubrate um 69% im Vergleich zur Interferon- $\beta$ -1a (Coles et al. 2012b). Zu den sekundären Endpunkten in diesen Studien gehörte unter anderem die Anzahl der kontrastmittelaufnehmenden Läsionen und die Veränderung des Gehirnvolumens. Auch hinsichtlich dieser radiologischen Parameter zeigte sich Alemtuzumab dem Interferon- $\beta$ -1a überlegen.

#### *1.6.3.3 Überblick über die Funktionsweise*

Zur Behandlung der MS wird Alemtuzumab intravenös in zwei Zyklen verabreicht, erst in fünf aufeinanderfolgenden Tagen, ein Jahr später in drei aufeinanderfolgenden Tagen jeweils in einer Dosis von 12mg pro Tag (Alemtuzumab prescribing information 2014). Die Depletion von CD52+ Lymphozyten innerhalb weniger Tage nach Applikation von Alemtuzumab wird für die kurzfristigen Effekte des Antikörpers verantwortlich gemacht. Hämatopoetische Vorläuferzellen bleiben dagegen

weitgehend unbeeinträchtigt (Gilleece and Dexter 1993) und ermöglichen somit eine erneute Rekonstruktion des depletierten Zellpools. B- und T-Lymphozyten und ihre jeweiligen Untergruppen brauchen dafür jedoch unterschiedlich lange. Dadurch kommt es zu Veränderungen im Lymphozytenpool, die einen wichtigen Beitrag leisten zu der lang andauernden Unterdrückung der Krankheitsaktivität (Ruck et al. 2015).

#### 1.6.3.4 Nebenwirkungen

Den Vorzügen von Alemtuzumab hinsichtlich der Effektivität in der Behandlung der MS stehen einige z.T. schwerwiegende Nebenwirkungen gegenüber. Ob langfristig durch Alemtuzumab die Wahrscheinlichkeit für die Entwicklung von Malignomen steigt, muss noch geklärt werden. Glücklicherweise wurden jedoch weder in der Phase II noch in den beiden Phase III Studien eine signifikant höhere Rate an Malignomen unter den Patienten, die mit Alemtuzumab behandelt wurden, nachgewiesen (Coles 2013).

Allerdings kam es in der Folge der Alemtuzumab induzierten Lymphopenie zu einer beträchtlichen Anzahl an sekundären Autoimmunerkrankungen. Diese betrafen vorwiegend die Schilddrüse, in selteneren Fällen aber auch die Nieren oder die thrombozytische Funktion. Auch infusionsassoziierte Reaktionen und Infektionen werden häufig beobachtet. Diese häufigen Nebenwirkungen werden im Folgenden genauer besprochen. Im Verlauf wurde zudem von weiteren schwerwiegenden Nebenwirkungen wie kardiovaskulären Ereignissen, neu diagnostizierter Autoimmunhepatitis und hämophagozytischer Lymphohistiozytose berichtet, was 2019 auch zu einer Einschränkung des Anwendungsbereichs von Alemtuzumab führte (Sanofi-Aventis Deutschland GmbH 2019).

##### 1.6.3.4.1 Infusionsassoziierte Reaktionen

Infusionsassoziierte Reaktionen wurden in den Phase II und III Studien bei jeweils mindestens 90% der Patienten beobachtet, wobei der Anteil der Patienten mit Reaktionen, die als schwerwiegend eingestuft wurden zwischen 1% und 3% lag (Cohen et al. 2012; Coles et al. 2008; Coles et al. 2012a). In späteren Infusionszyklen schienen sie sich im Vergleich zur ersten Applikation in der Häufigkeit etwas zu reduzieren, blieben in der resultierenden Symptomatik jedoch gleich (Coles et al. 2012b). Sie werden definiert als Symptome, die innerhalb von 24 Stunden nach der intravenösen Applikation auftreten und umfassen u.a. Kopfschmerzen, Hautausschläge, Übelkeit und Fieber. Für sie wird unter anderem eine Freisetzung von Zytokinen verantwortlich



gemacht, die durch eine Kreuzreaktion mit dem Oberflächenmolekül CD16 der NK-Zellen verursacht wird (Wing et al. 1996). Durch prophylaktische Gabe von Kortikosteroiden, Antipyretika und Antihistaminika können sie abgeschwächt werden.

#### 1.6.3.4.2 Infektionen

Infektionen wurden sowohl in der Phase II als auch in beiden Phase III Studien in der Alemtuzumab-Gruppe häufiger beobachtet als bei denjenigen Patienten, die mit Interferon- $\beta$ -1a behandelt wurden. Die meisten Infektionen wurden als mild bis moderat eingestuft und umfassten Infektionen der oberen Atemwege, der Harnwege und orale Herpes simplex Virus Typ I Infektionen. Lebensbedrohliche Infektionen kamen aber nicht vor (Cohen et al. 2012; Coles et al. 2008; Coles et al. 2012a). Infektionen, die als schwerwiegend betrachtet wurden, kamen bei 7% der Patienten der Follow-Up Studie von CAMMS223 vor (Coles et al. 2012b).

#### 1.6.3.4.3 Sekundäre Autoimmunerkrankungen

Die sekundäre Autoimmunität wird als eine bedeutsame Nebenwirkung von Alemtuzumab angesehen. In einer Studie, in der MS-Patienten nach Alemtuzumab im Median über 34,4 Monate hinsichtlich der Entwicklung von sekundären Autoimmunerkrankungen überwacht wurden, entwickelten 15,7% eine Autoimmunität der Schilddrüse und insgesamt waren 22,17% von einer sekundären Autoimmunität betroffen (Cossburn et al. 2011). Im fünf Jahres Follow-Up der CAMMS223 Studie wurden Erkrankungen der Schilddrüse sogar bei 30% der Patienten nach Alemtuzumab nachgewiesen (Coles et al. 2012b). Einzelne Patienten erkrankten an einer hämolytischen Anämie, autoimmunen Neutropenie oder an einem Goodpasture Syndrom. Besonders gefürchtet sind Störungen der thrombozytischen Funktion, die bei 1% der Patienten auftreten und bei einem Teilnehmer der Phase II Studie sogar zum Tod führten (Cohen et al. 2012; Coles et al. 2008; Coles et al. 2012a). Routinemäßige Untersuchungen zur Früherkennung von Komplikationen sind deshalb äußerst wichtig, damit schwerwiegende Nebenwirkungen frühzeitig erkannt und sinnvoll therapiert werden können. Diese sollten vor allem in den ersten Jahren nach Beginn der Therapie engmaschig erfolgen, da die Inzidenz der Autoimmunerkrankungen in dieser Zeit am größten ist. Cossburn et al. stellten ein Maximum zwischen Monat 18 und 24 nach Beginn der Therapie fest (Cossburn et al. 2011) und in der Follow-Up-Phase der CAMMS223 Studie wurde dieses im dritten Jahr angegeben (Coles et al. 2012b). Nach Überschreiten von fünf Jahren hingegen wurden

keine neuen Autoimmunerkrankungen mehr diagnostiziert (Cossburn et al. 2011), was auf eine zeitliche Begrenzung der möglichen Entstehung von Autoimmunerkrankungen hindeuten könnte.

## 2 Fragestellung der Arbeit

Während eine positive Beeinflussung des Krankheitsverlaufs der MS durch Alemtuzumab in mehreren Studien gezeigt wurde, sind die genauen Wirkungsmechanismen des Antikörpers weiterhin unklar. In der vorliegenden Arbeit sollen diese genauer untersucht werden. Dabei geht es vor allem um folgende Themen: Welche Wirkung hat Alemtuzumab auf die adaptive Immunität bei MS-Patienten? Inwieweit verändert sich durch Alemtuzumab das Immunzellrepertoire? Wie verändert sich die Funktionalität der neu entstehenden Zellen im Sinne einer Reaktivität auf Antigene, die im Gehirn von MS-Patienten auf MHC-II-Molekülen präsentiert wurden? Um einen Einblick über die Bedeutung der immunologischen Veränderungen für den Krankheitsverlauf zu erlangen, beschäftigt sich die vorliegende Arbeit zudem mit folgenden Fragen: Wie korrelieren die durch Alemtuzumab verursachten immunologischen Veränderungen mit klinischen Veränderungen? Inwieweit gehen die durch Alemtuzumab verursachten immunologischen Veränderungen mit Veränderungen in radiologischen und elektrophysiologischen Parametern der Krankheitsaktivität einher?

Für die Bearbeitung dieser Fragestellung wurden Blutproben von vier Patienten und einer Patientin mit schubförmig verlaufender MS sowohl vor als auch zu mehreren Zeiten nach Applikation von Alemtuzumab gesammelt und unter anderem die Reaktivität ihrer Lymphozyten in Anwesenheit verschiedener Stimuli gemessen. Die Patienten wurden außerdem hinsichtlich ihrer Krankheitsaktivität, gemessen in klinischen, radiologischen und neurophysiologischen Parametern, beobachtet.

## 3 Material

### 3.1 Labormaterialien

Für einen besseren Überblick werden die für die Versuche verwendeten Utensilien einschließlich der Hersteller hier tabellarisch aufgelistet. Dabei sind die Verbrauchsmaterialien in **Tabelle 1** aufgelistet.

<b>Verbrauchsmaterialien</b>	<b>Hersteller/ Lieferfirma (Hauptsitz)</b>
BD Microlance™ 3 Kanülen 1,2 x 40mm 18G	Becton, Dickinson and Company (Franklin Lakes, New Jersey, Vereinigte Staaten)
BRANDplates®, 96-well, pureGrade™ PS, unsteril	Brand (Wertheim, Deutschland)
Costar® 2mL Stripette® Serological Pipets, Polystyrene, Individually Paper/Plastic Wrapped, Sterile, 50/Bag, 1000/Case	Corning/ Omnilab (New York, Vereinigte Staaten/ Bremen, Deutschland)
Cryo.S	Greiner Bio-One (Kremsmünster, Österreich)
Cryolabels for Laser Printer	Diversified Biotech/ Roth (Dedham, Massachusetts, Vereinigte Staaten/ Karlsruhe, Deutschland)
DNA LoBind Tubes, DNA LoBind, 1.5 ml, PCR clean, farblos, 250 Tubes (5 Beutel x 50 Tubes)	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Einmal-Reagenzreservoirs, Bio-pure™	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
ep T.I.P.S Standard 50-1000µl	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
ep T.I.P.S Standard/Bulk 2-200µl	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Eppendorf Combitips advanced®, 5.0 mL, Eppendorf Biopur®, blau, 100 Stück	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Eppendorf Safe-Lock Tubes, 1.5 ml, PCR clean, farblos, 1.000 Stück (1000 Stück)	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Filtropur S 0.2	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Greiner centrifuge tubes 50 ml / Röhrchen, 50 ml, PP, 30/115 mm, konischer Boden, Cellstar®, Schraubverschluss blau, natur, graduiert, Schriftfeld, steril, 20 St./Btl.	Greiner Bio-One (Kremsmünster, Österreich)
Haemacytometer-Deckgläser	Thermo Fisher Scientific Gerhard Menzel/ Roth (Braunschweig, Deutschland/ Waltham, Massachusetts, Vereinigte Staaten/ Karlsruhe, Deutschland)
Human IFN-γ ELISpot <sup>PRO</sup> (ALP); Contents: Enzyme- conjugated detection mAb (7-B6-1-ALP), Positive control (anti-CD3 mAb), Substrate (BCIP/NBT-plus), 10 Pre-coated white plates (mAb 1-D1K)	Mabtech (Nacka Strand, Schweden)
Injectomat Spritze 50 ml, mit Kanüle	Fresenius Kabi (Bad Homburg, Deutschland)
Laborhandschuhe Peha-soft® nitrile fino powderfree S, M	Hartmann (Heidenheim, Deutschland)
Millex-GV Filter, 0,22 µm sowie 0,45µm, PVDF, 13 mm, durch Ethylenoxid sterilisiert	Merck Millipore (Billerica, Massachusetts, Vereinigte Staaten)
Nalgene™ Kryoröhrchen für die Langzeitlagerung	Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, Vereinigte Staaten)
Nunc EasYFlask 75cm <sup>2</sup>	Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, Vereinigte Staaten)
Nunc™ MicroWell™ Platten mit Nunclon™ Delta Oberfläche	Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, Vereinigte Staaten)
Nunc™ unbehandelte Kolben	Thermo Fisher Scientific/ VWR (Waltham, Massachusetts, Vereinigte Staaten/ Radnor, Pennsylvania, Vereinigte Staaten)
Pipettenspitzen 20µl, farblos	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Pipettenspitzen lose 2-200 µl sowie 5-300µl	Brand/ VWR (Wertheim, Deutschland/ Radnor, Pennsylvania, Vereinigte Staaten)
Röhrchen, 15 ml, PP, 17/120 mm, konischer Boden, Cellstar®, Schraubverschluss blau, natur, graduiert, Schriftfeld, steril, 100 St./Btl.	Greiner Bio-One (Kremsmünster, Österreich)
Rotilabo®-Aluminiumfolie	Roth (Karlsruhe, Deutschland)

*Tabelle 1: Überblick über die verwendeten Verbrauchsmaterialien*

<b>Verbrauchsmaterialien</b>	<b>Hersteller/ Lieferfirma (Hauptsitz)</b>
Rotilabo®-Cryoboxen aus Karton, weiß	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
SafeSeal SurPhob Spitzen, 1250 µl, steril	Biozym (Hessisch Oldendorf, Deutschland)
Filterspitzen, Low Binding, graduiert	
DNA-, DNase-, RNase-, Pyrogenfrei	
Serological pipette, sterile 10 ml	Greiner Bio-One (Kremsmünster, Österreich)
Serological pipette, sterile 25 ml	Greiner Bio-One (Kremsmünster, Österreich)
Serological pipette, sterile 5 ml	Greiner Bio-One (Kremsmünster, Österreich)
Sicherheitsmonovette Serum-Gel 7,5ml	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
S-Monovette 9ml K3E	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Stegeinsätze aus Karton für 10x10 Stellplätze à 12,5x12,5 mm	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Stegeinsätze aus Karton für 12x12 Stellplätze à 10x10 mm	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
SuperClear™ Screw Cup Microcentrifuge Tubes, sterile, with Attached Clear Caps, 0,5 ml	Labcon/ VWR (Petaluma, Kalifornien, Vereinigte Staaten/ Radnor, Pennsylvania, Vereinigte Staaten)
SuperClear™ Screw Cup Microcentrifuge Tubes, sterile, with Attached Clear Caps, 1,5 ml	Labcon/ VWR (Petaluma, Kalifornien, Vereinigte Staaten/ Radnor, Pennsylvania, Vereinigte Staaten)
TipBox, mit Trägerplatte, leer für Pipetten- und Filterspitzen, 200 µl	Brand/ VWR (Wertheim, Deutschland/ Radnor, Pennsylvania, Vereinigte Staaten)
TipBox, mit Trägerplatte, leer für Pipetten- und Filterspitzen, 300 µl	Brand/ VWR (Wertheim, Deutschland/ Radnor, Pennsylvania, Vereinigte Staaten)
Transferpipette 3,5 ml	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Zellkulturschale, PS, 145/20mm, CELLSTAR®, steril, 5 St./ Btl.	Greiner Bio-One (Kremsmünster, Österreich)

*Tabelle 1 (Fortsetzung): Überblick über die verwendeten Verbrauchsmaterialien*

**Tabelle 2** zeigt die Reagenzien, die für die Isolierung der PBMC, die Aufbereitung für die Versuche sowie die ELISpots verwendet wurden.

<b>Reagenzien</b>	<b>Hersteller/ Lieferfirma</b>
Dimethyl Sulfoxide	Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, Vereinigte Staaten)
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline	Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, Vereinigte Staaten)
Ethanol, Rotipuran® ≥99,8 %, p.a.	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Fetal bovine serum 500ml	Biochrom, Tochterfirma von Harvard Bioscience (Holliston, Massachusetts, Vereinigte Staaten)
L-Glutamin 200mM, 100ml	Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, Vereinigte Staaten)
Lymphoprep 500 ml	Stemcell Technologies (Vancouver, Canada)
Penicillin / Streptomycin 100ml	Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, Vereinigte Staaten)
Phytohemagglutinin-M Phaseolus Vulgaris	Merck Millipore (Calbiochem)/ VWR (San Diego, Kalifornien, Vereinigte Staaten/ Radnor, Pennsylvania, Vereinigte Staaten)
RLT Puffer -> RNeasy Micro Kit (50)	Qiagen (Hilden, Deutschland)
RPMI Medium 1640 500ml	Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, Vereinigte Staaten)
Trypanblau (C.I. 23850)	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Türks Lösung	Merck Millipore (Billerica, Massachusetts, Vereinigte Staaten)

*Tabelle 2: Überblick über die verwendeten Reagenzien*

In **Tabelle 3** sind die Geräte und Gegenstände, welche im Labor für die Durchführung der Versuche benötigt wurden, aufgelistet.

<b>Geräte und Gegenstände</b>	<b>Hersteller/ Lieferfirma (Hauptsitz)</b>
Autoclav VE 150	Systemec (Linden, Deutschland)
Centrifuge 5810 R	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
AID ELISpot Reader	Advanced Imaging Devices GmbH (Strassberg, Germany)
Eppendorf Research® plus, 8-Kanal, variabel, 10 – 100 µL, gelb	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Eppendorf Research® plus, Einkanal, variabel, inkl. epT.I.P.S.®-Box, 0.1 – 2.5 µL, dunkelgrau	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Eppendorf Research® plus, Einkanal, variabel, inkl. epT.I.P.S.®-Box, 0.5 – 10 µL, mittelgrau	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Eppendorf Research® plus, Einkanal, variabel, inkl. epT.I.P.S.®-Box, 2 – 20 µL, gelb	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Eppendorf Research® plus, Einkanal, variabel, inkl. epT.I.P.S.®-Box, 10 – 100 µL, gelb	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Eppendorf Research® plus, Einkanal, variabel, inkl. epT.I.P.S.®-Box, 20 – 200 µL, gelb	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Eppendorf Research® plus, Einkanal, variabel, inkl. epT.I.P.S.®-Box, 100 – 1000 µL, blau	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Inkubator HERA cell 150	Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, Vereinigte Staaten)
Kaltlichtquelle KL 1500	Leica Biosystems (Wetzlar, Hessen)
Kühlschrank	Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, Vereinigte Staaten)
Kühlschrank profi line (Einstellung auf -26°C)	Liebherr (Bulle, Schweiz)
Kühlschrank Tischmodell, Liebherr Comfort	Liebherr (Bulle, Schweiz)
Kühlschrank, Liebherr Premium	Liebherr (Bulle, Schweiz)
Mikroskop OLYMPUS CK30-200	Olympus (Shinjuku, Tokio, Japan)
Multipette®plus	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Neubauer-improved Counting chamber	Superior Marienfeld (Lauda-Königshofen, Deutschland)
Pipetboy (Nachfolgemodell: Pipetboy acu 2)	Integra (Biebertal, Deutschland)
Scotsman ICE System	Scotsman (Mailand, Italien)
Stickstofftank	Air Liquide (Paris, Frankreich)
Transferpette® -12, 30-300 µl	Brand (Wertheim, Deutschland)
Wasserbad	Gesellschaft für Labortechnik (Burgwedel, Deutschland)

*Tabelle 3: Überblick über die verwendeten Geräte und Gegenstände*

**Tabelle 4** zeigt die Peptide, die aus dem Gehirn von MS-Patienten eluiert worden waren und in den ELISpot-Assays als Stimuli verwendet wurden. Sie werden in der Arbeit als Ligandompeptide bezeichnet. Ihre Herkunft, Funktion und Bedeutung in der Pathogenese der MS wird in der Diskussion der Arbeit erläutert.

Aminosäuresequenz	Kodierung
RAIEQLAMM	1
IRETSLDTKSVS	2
KVYNEAGVTFT	3
LNETGDEPFQYKN	4
IIEETKVEDEK	5
YEMPSEEGYQD	6
WISKQEYDESGPSIVHRK	7
RHGSKYLATASTMDHARH	8
DENPVVHFFKN	9
HKGFKGVDAQGTLS	10
IVTPRTPPPSQGKGRG	11
QYIKANSKFIGITEL	12
VDSITEVECFLTPEM	13

Tabelle 4: Aminosäuresequenzen der als Stimuli verwendeten Peptide

### 3.2 Überblick über die Patienten

Die Wirkung von Alemtuzumab auf die adaptive Immunität wurde bei fünf Patienten mit schubförmiger MS untersucht, welche zwischen 2014 und 2017 aufgrund hoher Krankheitsaktivität mit dem monoklonalen Antikörper behandelt wurden. **Tabelle 5** zeigt einen Überblick über die bisherige Erkrankungsdauer, den HLA-DRB1\*1501-Status sowie vorher verabreichte immunmodulatorische Therapien.

Patienten-Nummer	Alter bei erster Infusion (in Jahren)	Geschlecht	HLA-DRB1*1501	Immunmodulatorische Therapie vor Alemtuzumab
01	Zwischen 30 und 40	M	Heterozygot	Keine
02	Zwischen 30 und 40	M	Negativ	Glatirameracetat, Interferon- $\beta$ -1a, Natalizumab, Fingolimod, Dimethylfumarat
03	Zwischen 20 und 30	M	Heterozygot	Interferon- $\beta$ -1a, Teriflunomid
04	Zwischen 30 und 40	M	Heterozygot	Teilnahme an einer placebokontrollierten Studie mit Daclizumab, Interferon- $\beta$ -1a, Fingolimod
05	Zwischen 30 und 40	W	Negativ	Glatirameracetat, Interferon- $\beta$ -1a, Natalizumab, Fingolimod

Tabelle 5: Überblick über die Patienten, die mit Alemtuzumab behandelt wurden

## 4 Methodik

### 4.1 Bestimmung des kleinen Blutbilds und Differentialblutbilds

Sowohl vor Applikation von Alemtuzumab als auch in regelmäßigen Abständen nach Beginn der Therapie wurden bei den fünf Patienten im Rahmen der klinischen Routine das kleine Blutbild und das Differentialblutbild in regelmäßigen Abständen überprüft. Mittels einer Mehrkanalmesstechnologie von sysmex wurden die Erythrozyten, Thrombozyten, Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten gezählt. Dabei wurde nach der Anleitung des Herstellers vorgegangen.

Die Anzahl der Erythrozyten und Thrombozyten wurde im ersten Kanal bestimmt. Mittels Unterdrucks wurden sie durch eine Kapillaröffnung zwischen zwei

Messkammern gesaugt. Ihre Zählung erfolgte durch die Messung eines elektrischen Impulses, der durch eine Widerstandsänderung beim Durchtritt der Zellen durch die Kapillaröffnung entsteht. Die Stärke des elektrischen Impulses variiert dabei abhängig von der Zellgröße, sodass Erythrozyten und Thrombozyten aufgrund ihrer physiologischen Größenunterschiede differenziert werden können.

Die Anzahl der Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten wurde durchflusszytometrisch bestimmt. Dieses Verfahren nutzt Streu- und Fluoreszenzsignale, welche von Zellen während der Passage eines Laserstrahls ausgesendet werden, zur Analyse ihrer Struktur. Da die basophilen Granulozyten in deutlich geringerer Konzentration im Blut vorliegen als die anderen Zellspezifitäten, wurden sie in einem eigenen Kanal gezählt, in welchem durch Zugabe eines stromatolyser Reagenz die anderen Zellarten lysiert oder in ihrer Struktur destabilisiert werden. Eosinophile und neutrophile Granulozyten sowie Monozyten und Lymphozyten wurden nach Lysierung der Erythrozyten in einem gemeinsamen Kanal gezählt. Hier wurde der Fluoreszenzfarbstoff stromatolyser-4DS hinzugegeben, der an Nukleinsäuren bindet und Rückschlüsse auf die entsprechende Zellart zulässt.

#### 4.2 Durchflusszytometrie zur Bestimmung des Immunstatus im peripheren Blut

Das Verfahren der Durchflusszytometrie wurde auch genutzt, um die absolute Anzahl der Lymphozytensubgruppen im peripheren Blut zu bestimmen. Die Messungen erfolgten im Rahmen der klinischen Routine zu unterschiedlichen Zeitpunkten sowohl nach dem ersten als auch nach dem zweiten Behandlungszyklus von Alemtuzumab, um die Veränderung im zeitlichen Verlauf beurteilen zu können. Die Ausgangswerte wurden bei vier der fünf Patienten auf Basis der Gesamtleukozytenzahl im aktuellen Differentialblutbild geschätzt, da aufgrund fehlender medizinischer Indikation das kostenaufwändige Verfahren zur Bestimmung des Lymphozytenstatus vor der Behandlung nicht durchgeführt worden war. Da die Patienten zu dieser Zeit keine immunmodulierende Therapie erhielten, wurde für die Schätzung eine normale Verteilung der Zellspezifitäten innerhalb des Lymphozytenpools angenommen.

Durch vorherige Färbung der Zellen mittels spezifischer Antikörper konnten sie genauer differenziert werden. Die T-Lymphozyten wurden anhand ihres Oberflächenantigens CD3 identifiziert. Von besonderem Interesse war dabei der Anteil an T-Helfer-Zellen, da diese für die IFN- $\gamma$ -Synthese hauptverantwortlich sind und in der Pathogenese der MS von besonderer Bedeutung zu sein scheinen (Riedhammer and Weissert 2015).

Diese sind positiv sowohl für das CD3 als auch für das CD4 Antigen. Bestimmt wurden außerdem die Anteile der CD8+ T-Lymphozyten, der NK-Zellen (CD16+CD56+) sowie der B-Lymphozyten (CD19+).

### 4.3 Vorbereitung der PBMC für den ELISpot-Assay

#### 4.3.1 Isolieren der PBMC

Die für den ELISpot verwendeten peripheren mononukleären Zellen (PBMCs) wurden zuvor aus dem Blut von MS-Patienten isoliert.

Dafür wurde das Prinzip der Dichtezentrifugation genutzt. Mithilfe von Lymphoprep, welches eine geringere Dichte aufweist als Erythrozyten und Granulozyten, jedoch eine höhere Dichte als PBMCs und Thrombozyten, konnten die verschiedenen Blutzellen voneinander getrennt werden. Sowohl bei der Isolierung der Zellen, als auch beim Einfrieren und Auftauen wurde nach Anleitung (Riedhammer et al. 2016) vorgegangen.

Für die Aufreinigung einer PBMC-Probe wurden 100ml Blut aus peripheren Venen in sterilen Spritzen abgenommen. Es wurde dann in phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) auf das dreifache Volumen verdünnt. Anschließend wurden jeweils 30 ml der Verdünnung in Falcon Tubes, die bereits jeweils 15 ml Lymphoprep enthielten, gegeben. Wichtig dabei war, dass sich das verdünnte Blut nicht mit dem Lymphoprep mischt, da letzteres schädlich für die Zellen ist und somit Zellen für spätere Assays verloren gingen. Deshalb wurde die automatische Pipette auf die langsamste Stufe gestellt und die Pipette gegen die Wand der Tubes gehalten, sodass immer eine scharfe Abgrenzung zwischen der Lymphoprep-Phase und dem verdünnten Blut in der Tube sichtbar war. Die Falcon Tubes wurden dann 25 Minuten bei 670-800-facher Erdbeschleunigung und einer Temperatur von 18°C zentrifugiert, sodass sich die verschiedenen Blutzellen nach ihrer Dichte voneinander trennten. Die Bremse der Zentrifuge war zuvor abgeschaltet worden, um eine Vermischung der Zellschichten zu vermeiden.

Am Ende der Zentrifugation fand man die Erythrozyten und Granulozyten am Boden der Tube, während sich die mononukleären Zellen und Thrombozyten über der Lymphoprep-Phase befanden. Die wolkige Schicht der PBMCs wurde dann mit einer Pipette vorsichtig abgesaugt. Dabei wurden die PBMCs von jeweils zwei Tubes in einer neuen Tube zusammengefasst und der Inhalt derer mit PBS auf 50ml aufgefüllt.



Die neuen Tubes wurden dann zehn Minuten bei 150-facher Erdbeschleunigung und einer Temperatur von 4°C zentrifugiert, sodass sich die PBMCs vom Blutplasma und den Thrombozyten trennten und ein Pellet am Boden bildeten.

Das Plasma wurde verworfen und die Zellen erneut gewaschen. Dafür wurden die Pellets in 5ml RPMI-1640 Medium resuspendiert, die Tubes wieder auf 20 ml aufgefüllt und nochmals bei den gleichen Einstellungen zentrifugiert. Die Zellen bildeten wieder ein Pellet am Boden. Diesmal wurde das RPMI-Medium verworfen und die Zellen in 5ml Zellmedium resuspendiert. Dieses Zellmedium setzte sich zusammen aus 88% RPMI-Medium, 1% Penicillin und Streptomycin, 1% L-Glutamin und 10% fetales Kälberserum (FBS).

Anschließend wurden 20µl der Zellsuspension entnommen und mit TÜRK'scher Lösung in einem Verhältnis von 1:64 verdünnt. Vorhandene Erythrozyten wurden somit lysiert, Leukozyten hingegen angefärbt. Mithilfe einer Zählkammer konnten die PBMCs dann unter dem Mikroskop gezählt werden.

#### 4.3.2 Einfrieren

Da die isolierten Zellen nicht sofort genutzt wurden, sondern für später durchgeführte Assays aufbewahrt werden sollten, wurden sie eingefroren, um ein langes Überleben zu ermöglichen.

Dafür wurde zu der Zellsuspension zunächst so viel Zellmedium zugegeben, dass eine Zellkonzentration von  $10 \cdot 10^6$  Zellen pro Milliliter entstand. Anschließend wurde die Zellsuspension mit Freezing Medium in drei Zügen jeweils im Abstand von zwei bis drei Minuten insgesamt auf das doppelte Volumen verdünnt. Freezing Medium setzte sich zusammen aus 80% FBS und 20% Dimethylsulfoxid (DMSO). Durch seine Zugabe zur Zellsuspension sank die Konzentration der Zellen auf  $5 \cdot 10^6$  Zellen pro Milliliter. Die verdünnte Zellsuspension wurden dann zügig auf mehrere Kryotubes verteilt. In jedes Kryotube sollte dabei ein Volumen von 1ml, also jeweils  $5 \cdot 10^6$  Zellen, gelangen. Die gefüllten Kryotubes wurden dann innerhalb weniger Minuten auf -80°C eingefroren, und nach einigen Tagen bei -150°C auf flüssigem Stickstoff gelagert.

#### 4.3.3 Auftauen

Vor der Durchführung der ELISpots wurden die benötigten Zellen von -150°C auf -80°C umgelagert und später auf Zimmertemperatur aufgetaut. Durch Zugabe von Zellmedium wurde die Zellsuspension dann zügig auf das doppelte Volumen verdünnt.

Anschließend wurden noch weitere zwei Male im Abstand von jeweils drei bis fünf Minuten das gleiche Volumen an Zellmedium zugegeben. Die verdünnte Zellsuspension wurde dann zehn Minuten lang bei Raumtemperatur, 150-facher Erdbeschleunigung und abgeschalteter Bremse zentrifugiert. Das dabei gebildete Pellet wurde im folgenden Wasch-Schritt in RPMI-Medium resuspendiert und auf die gleiche Weise erneut zentrifugiert, sodass ein neues Pellet entstand. Dieses wurde in Zellmedium resuspendiert. Nach Anfertigung einer 1:16-Verdünnung mit Trypanblau konnten die Zellen der Suspension in einer Zählkammer gezählt und anschließend mit Zellmedium auf die gewünschte Konzentration verdünnt werden.

#### 4.4 ELISpot-Assay

Mithilfe der ELISpots wurde die Zahl an IFN- $\gamma$  produzierenden Zellen in Anwesenheit verschiedener Stimuli gemessen. Die verwendeten PBMCs waren wie beschrieben aus Blutproben von MS-Patienten, die mit Alemtuzumab behandelt wurden, isoliert und dann in Stickstoff gelagert worden. Diese Blutproben wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten abgenommen, teils vor dem ersten Behandlungszyklus, teils nach dem ersten und teils nach dem zweiten Behandlungszyklus. Auf diese Weise sollte die durch Alemtuzumab bedingte Veränderung der Reaktivität der Lymphozyten im zeitlichen Verlauf beurteilt werden. Als Messwert für die zelluläre Reaktivität wurde die Zahl IFN- $\gamma$  sezernierender Zellen in Anwesenheit verschiedener Peptide gewählt, welche aus dem Gehirn von verstorbenen MS-Patienten eluiert worden und dort auf MHC-Komplexen präsentiert worden waren. Eine Stimulation mit dem T-Zell-Mitogen Phytohämagglutinin (PHA) diente als Positivkontrolle. Außerdem wurde zu Vergleichszwecken auch die Reaktivität in Anwesenheit der Kontrollpeptide JC-Virus-Antigen und Tetanustoxin sowie in Anwesenheit von lediglich DMSO gemessen.

Bei der Durchführung der ELISpot-Assays wurde nach der Anleitung des Herstellers vorgegangen: Die Wells der 96-Well-Platte, deren Böden mit dem monoklonalen Antikörper gegen IFN- $\gamma$ , 1-D1K, beschichtet waren, wurden viermal mit jeweils 200 $\mu$ l PBS gewaschen. Anschließend wurden die unspezifischen Bindungsstellen mit jeweils 200 $\mu$ l Zellmedium geblockt und die Platte für ungefähr zwei Stunden inkubiert. In der Zwischenzeit wurden die benötigten Zellen wie oben beschrieben aufgetaut und die Stimuli mit Zellmedium auf die gewünschte Konzentration verdünnt. Anschließend wurde das zum Blocken verwendete Zellmedium entfernt und in jedes Well Folgendes zugegeben:

- 100µl Zellmedium, um ein Volumen zu schaffen, in dem die Zellen reagieren konnten
- 20µl der Stimuli. Dabei wurden die Ligandompeptide sowie PHA jeweils in einer Konzentration von 0,66µg/20µl zugegeben, sodass die Konzentration im Endvolumen des Wells 3µg/ml betrug. DMSO war zuvor so verdünnt worden, dass sein Verhältnis zum Endvolumen 1:1333,3 betrug.
- 100µl der Zellsuspension in einer Konzentration von  $2 \cdot 10^6$  Zellen/ml.

Das Pipettierschema für die Zugabe der verschiedenen Peptide in die Wells einer ELISpot-Platte ist in **Abbildung 1** abgebildet. Dabei wurden in die Wells der Reihen A bis D PBMC einer Blutprobe gegeben, während in die Wells der Reihen E bis H Zellen einer anderen Blutprobe zugefügt wurden.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1	1	1	5	5	5	8	8	8	11	11	11
B	2	2	2	6	6	6	9	9	9	12	12	12
C	3	3	3	7	7	7	10	10	10	13	13	13
D	4	4	4	Kein Ag	Kein Ag	Kein Ag	DMSO	DMSO	DMSO	PHA	PHA	PHA
E	1	1	1	5	5	5	8	8	8	11	11	11
F	2	2	2	6	6	6	9	9	9	12	12	12
G	3	3	3	7	7	7	10	10	10	13	13	13
H	4	4	4	Kein Ag	Kein Ag	Kein Ag	DMSO	DMSO	DMSO	PHA	PHA	PHA

*Abbildung 1: Pipettierschema bei den ELISpot-Assays.*

Die Platte wurde dann locker in Alufolie eingewickelt und 48 Stunden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach Ende der Inkubation wurden zunächst aus jedem Well 110µl Überstand entnommen und auf eine sterile 96-Well-Platte mit U-förmigen Löchern übertragen. Diese 96-Well-Platte wurde mit Parafilm luftdicht verschlossen und auf -80°C eingefroren. Anschließend wurde jedes Well der ELISpot-Platte fünfmal mit je 200µl PBS gewaschen. Der Sekundärantikörper 7-B6-1-ALP wurde im Verhältnis 1:200 in PBS mit 0,5% FBS verdünnt. Jeweils 100µl der Verdünnung wurden dann in jedes Well der Platte gegeben, bevor diese für zwei Stunden bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert wurde. Zur Darstellung der Spots wurde nach erneutem fünfmaligem Waschen mit PBS die auf 0,45µm gefilterte Substratlösung BCIP/NBT-plus hinzugegeben. Die Farbreaktion mit Entwicklung der Spots wurde nach zehn Minuten

durch gründliches Waschen mit entkalktem Wasser gestoppt und die Platten schließlich gründlich getrocknet. Die Auswertung der ELISpot Platten erfolgte mit einem AID ELISpot Reader und die Punkte wurden mithilfe der AID ELISpot Software gezählt. Bleibende Artefakte, die von der Software fälschlicherweise als Spots gewertet worden waren, wurden per Hand entfernt.

#### 4.5 Durchflusszytometrie der gefrorenen PBMC-Proben

Auch die zuvor gefrorenen PBMC-Proben wurden durchflusszytometrisch analysiert, um die Anteile der verschiedenen Zellspezifitäten zu bestimmen. Diese Analysen erfolgten mit Hilfe des Teams von Frau Evelyn Orsó im Zentrum für klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin. Wie bei der oben beschriebenen Analyse von unbehandelten Blutproben wurde auch diesmal der Anteil der T-Lymphozyten, der B-Lymphozyten, der NK-Zellen sowie der CD4+ und CD8+ T-Lymphozyten bestimmt. Auch diesmal wurde nach der Anleitung des Herstellers vorgegangen. Zuerst wurden die BD Trucount™ Tubes, welche am Boden lyophilisiertes Sediment mit einer bekannten Anzahl fluoreszierender Mikropartikel enthalten, jeweils mit der Patientenidentifikationsnummer beschriftet. Anschließend wurden in jedes dieser Tubes 20µl des 6-Farben-Immunfluoreszenzreagenz (6-Color-TBNK) gegeben. Die PBMC-Suspension wurde innerhalb weniger Minuten von -80°C auf Raumtemperatur aufgetaut. Jeweils 50µl der Suspension wurden dann in die Tubes pipettiert. Die Röhrchen wurden mithilfe eines Vortexgerätes gemischt und 15 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert, sodass die Antikörper an die entsprechenden Zellen binden konnten. Nach Ende der Inkubationszeit wurden in jedes Tube 450µl einer 1:10 mit destilliertem Wasser verdünnten FACS™ Lysing Solution hinzugegeben, die der Lyse von Erythrozyten diente. Nach erneutem sorgfältigem Vortexen folgte eine weitere Inkubation. Eine Zeit von fünf Minuten war diesmal ausreichend, da durch die vorherige Isolierung der PBMCs kaum Erythrozyten in der Probe vorhanden waren. Anschließend wurden die Tubes ein drittes Mal im Vortexgerät gemischt, um Zellaggregationen zu vermeiden. Die Messung erfolgte dann in einem BD FACS™ II Durchflusszytometer.

#### 4.6 Auswertung des klinischen Verlaufs

Die Patienten wurden hinsichtlich ihres klinischen Zustands sowohl vor als auch nach Beginn der Behandlung genau charakterisiert. Die Phänotypisierung mit Anamnesegesprächen zu ihrem subjektiven Wohlbefinden und neurologische

Untersuchungen wurden regelmäßig durch Prof. Dr. Dr. med. Robert Weißert durchgeführt. Geachtet wurde dabei insbesondere auf das Auftreten von Schüben, die Entwicklung des Behinderungsgrades gemessen auf der EDSS, das Vorkommen von Infektionen oder von anderen Erscheinungen, welche mit der Behandlung mit Alemtuzumab in Verbindung stehen könnten. Schübe wurden definiert als Verschlechterung einer bekannten Symptomatik oder Hinzukommen eines neuen Symptoms, das über mindestens 24 Stunden bestehen blieb und nicht durch einen Infekt oder eine Erhöhung der Körpertemperatur erklärt werden konnte.

#### 4.7 Auswertung der MRT-Befunde

Für die Beurteilung der MRT-Befunde des Gehirns wurden vor allem die FLAIR- und T2-gewichteten axialen Aufnahmen sowie die T1-gewichteten Aufnahmen nach Kontrastmittelapplikation betrachtet. Aufnahmen in sagittaler und koronarer Schnittebene wurden zu Vergleichszwecken herangezogen. Bezüglich der MRT-Aufnahmen des Rückenmarks wurden vor allem die sagittalen Aufnahmen beurteilt, aber auch Bilder in axialer Schnitfführung und protonengewichtete Aufnahmen wurden betrachtet. Von besonderem Interesse waren bei der Analyse die Zahl, Lokalisation und Größe von einzelnen Läsionen sowie ihre Entwicklung im zeitlichen Verlauf vor und nach der Behandlung.

#### 4.8 Auswertung der Befunde der Neurophysiologie

Nach Beginn der Alemtuzumabtherapie wurden durch Ärzte der Abteilung für Neurologie am Bezirksklinikum Regensburg bei den fünf Patienten insgesamt zwölf neurophysiologische Untersuchungen durchgeführt. Besonderes Augenmerk wurde dabei auf die Entwicklung des visuell evozierten Potentials und der Reizantwort nach kortikaler Magnetstimulation gelegt. Die visuelle Stimulation erfolgte durch ein kontrastalternierendes Schachbrettmuster beziehungsweise durch eine Blitzbrille bei eingeschränktem Visus. Die Ableitung der Reizantwort nach kortikaler oder wurzelnaher lumbaler Stimulation erfolgte über dem M. tibialis anterior.

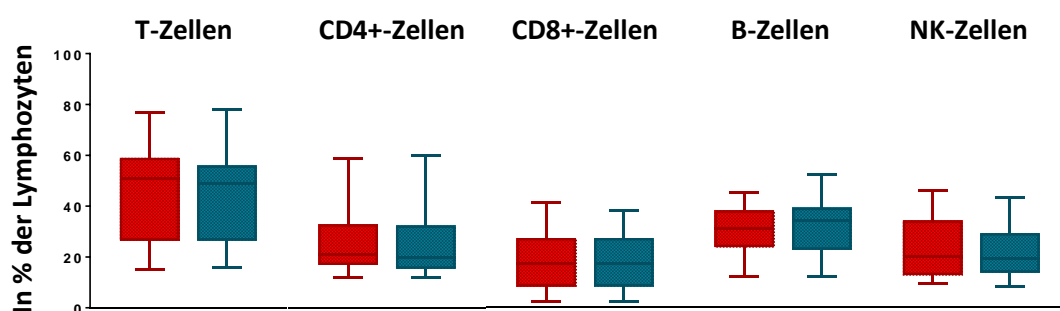
## 5 Ergebnisse

Bei der Beurteilung der Wirkung einer Alemtuzumabtherapie auf die adaptive Immunität bei Patienten mit schubförmig verlaufender MS wurden sowohl die Veränderung der Anteile der verschiedenen Immunzellspezifitäten an der Gesamtheit der peripheren mononukleären Zellen als auch die Veränderung ihrer Aktivität berücksichtigt. Auch die Veränderung des klinischen Zustands und der in der

Bildgebung gemessenen Krankheitsaktivität wurden beurteilt, um Rückschlüsse auf einen Zusammenhang der experimentellen Ergebnisse und des klinischen Verlaufs ziehen zu können.

### 5.1 Einfluss des Einfrierens der PBMC auf die Zellzusammensetzung

Wie im **Kapitel 4.3** beschrieben, wurden die PBMCs der ELISpot-Assays zuvor in einem DMSO haltigen Medium bei  $-150^{\circ}\text{C}$  gelagert. Vor Auswertung der ELISpot-Assays wurde deshalb zunächst überprüft, ob die Zusammensetzung der Zellen durch die Lagerung im Stickstoff beeinflusst wurde. Dafür wurden die Anteile von Zellspezifitäten in 13 unbehandelten Zellproben mit denjenigen von 13 gefrorenen Zellproben verglichen, wobei jeweils eine unbehandelte und eine gefrorene Zellprobe vom selben Patienten stammten und zum gleichen Zeitpunkt dem Patienten entnommen worden waren. Zum Vergleich des Anteils einer Zellspezifität in der unbehandelten Probe mit demjenigen in der zugehörigen gefrorenen Probe wurde der Wilcoxon Test für verbundene Werte herangezogen. Die Ergebnisse zeigten bei keiner der untersuchten Zellspezifitäten einen signifikanten Unterschied. Das Lagern der Proben unter den beschriebenen Bedingungen scheint also die Zusammensetzung der Zellfraktionen nicht in signifikantem Ausmaß zu verändern. **Abbildung 2** zeigt die mittleren Anteile der Zellspezifitäten im Lymphozytenpool und die zugehörigen Ergebnisse des Signifikanztests.

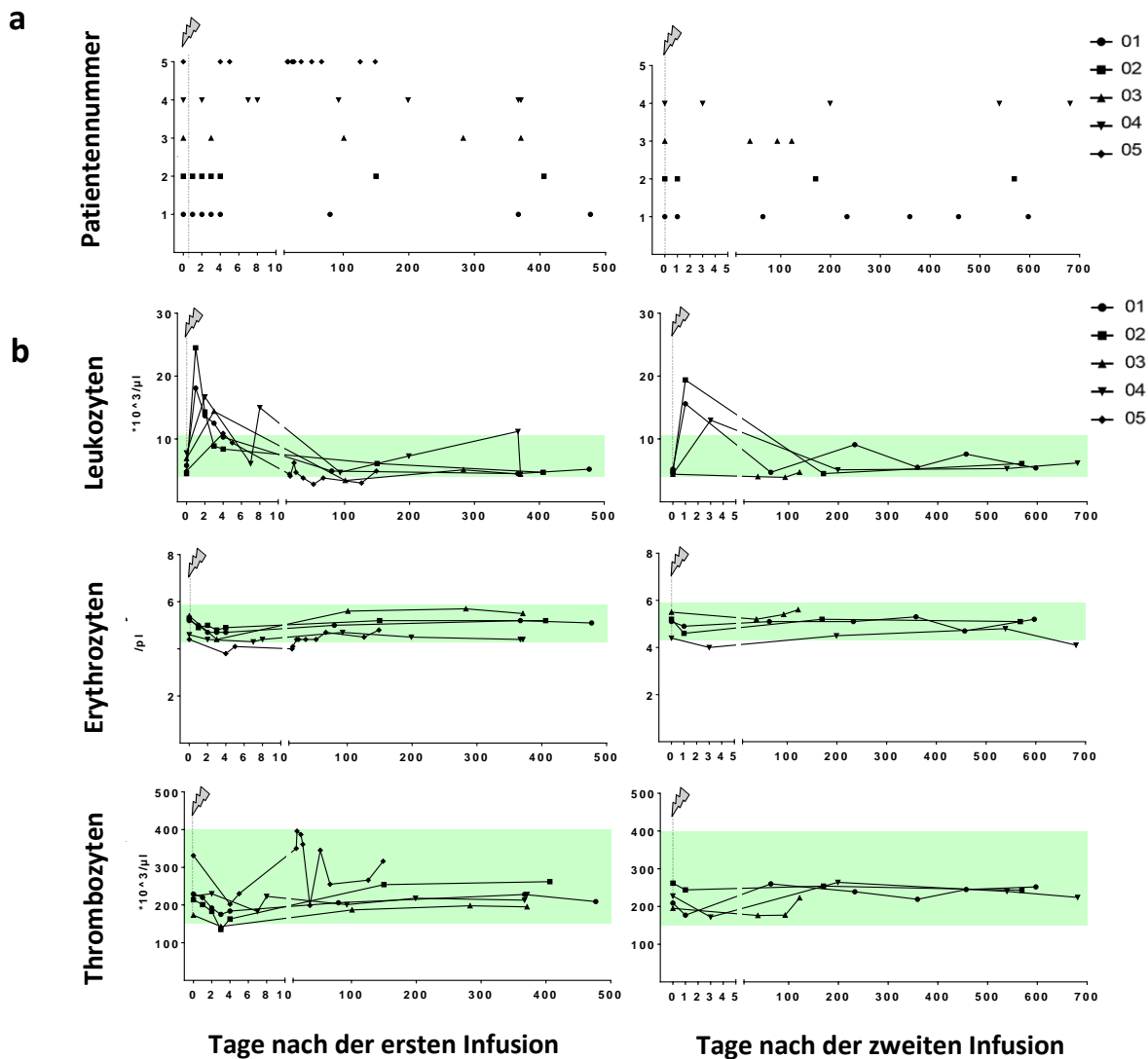


	T-Zellen	CD4+-Zellen	CD8+-Zellen	B-Zellen	NK-Zellen
In % der Lymphozyten	~50	~25	~20	~35	~25
P Unbehandelt Versus behandelt	0,0767	0,2656	0,3477	0,0723	0,2358

**Abbildung 2:** Anteile unterschiedlicher Zellspezifitäten innerhalb des Lymphozytenpools in frischen unbehandelten Zellproben (rot) sowie in den Proben, die über längere Zeit bei  $-150^{\circ}\text{C}$  in Stickstoff gelagert wurden (blau). Die p Werte des Wilcoxon Tests für verbundene Werte sind in der darunter stehenden Tabelle dargestellt. Der Test wurde für den Vergleich der Anteile zwischen unbehandelten und behandelten Proben verwendet.

## 5.2 Einfluss von Alemtuzumab auf die Zahl der Zellen des kleinen Blutbilds

Um den Einfluss von Alemtuzumab auf die Zellen im peripheren Blut zu untersuchen, wurden zunächst zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach dem ersten und zweiten Behandlungszyklus sowohl die Gesamtzahl der Leukozyten, Erythrozyten und Thrombozyten im kleinen Blutbild bestimmt. **Abbildung 3** zeigt die Entwicklung der Anzahl dieser Zellspezifitäten im zeitlichen Verlauf.



**Abbildung 3: Entwicklung der absoluten Anzahl der Leukozyten, Erythrozyten und Thrombozyten nach Alemtuzumab.** In **Abbildung (a)** sind zur Verdeutlichung die Zeitpunkte der Analyse des kleinen Blutbildes bei den fünf Patienten dargestellt. **Abbildung (b)** zeigt die Entwicklung der Konzentration der untersuchten Zellen im peripheren Blut sowohl nach dem ersten Behandlungszyklus (linke Spalte) als auch nach dem zweiten Behandlungszyklus (rechte Spalte). Der grün hinterlegte Bereich kennzeichnet den Normbereich der Konzentration der jeweiligen Zellart. Den Patienten sind entsprechend der Abbildungslegende Symbole zugeordnet.

Wie in der Abbildung ersichtlich, blieben die Gesamtzahlen der Leukozyten, der Erythrozyten und der Thrombozyten zu den meisten Beobachtungszeiträumen im Normbereich. Dies galt sowohl für das Jahr nach dem ersten Behandlungszyklus als auch für den Zeitraum nach dem zweiten Behandlungszyklus. Die wenigen Abweichungen vom Normbereich, die während des Beobachtungszeitraums auffielen, werden im Folgenden beschrieben.

Bei den Leukozyten war eine Erhöhung ihrer Gesamtzahl in der ersten Woche nach Beginn des ersten Behandlungszyklus zu erkennen, wobei die Leukozytenzahlen aller fünf Patienten innerhalb dieser Zeit den Normbereich überschritten. Den höchsten Wert erreichte Patient 02 mit  $24,5 \cdot 10^3$  Leukozyten pro Milliliter an Tag 1 nach Beginn des ersten Behandlungszyklus. Auch infolge des zweiten Behandlungszyklus zeigten alle drei Patienten, deren kleines Blutbild direkt nach Beginn der Behandlung analysiert worden war, eine Leukozytose. Die auffällige Leukozytose blieb aber nicht dauerhaft bestehen und im weiteren Verlauf blieben die meisten gemessenen Werte im Normbereich und nur kleine Abweichungen wurden vereinzelt festgestellt.

Die Zahl der Erythrozyten überschritt hingegen bei keinem der fünf Patienten zu irgendeinem Zeitpunkt den Normbereich. Die Erythrozytenkonzentration von Patientin 05, die vor Beginn der Behandlung bereits im unteren Normbereich lag, wich nach Behandlungsbeginn für wenige Tage unter den Normbereich, erreichte diesen aber innerhalb von drei Wochen wieder. Eine Abweichung nach unten zeigte auch die Erythrozytenkonzentration von Patient 04 an zwei Messzeitpunkten nach dem zweiten Behandlungszyklus, jedoch war auch diese nur gering von der unteren Normgrenze entfernt.

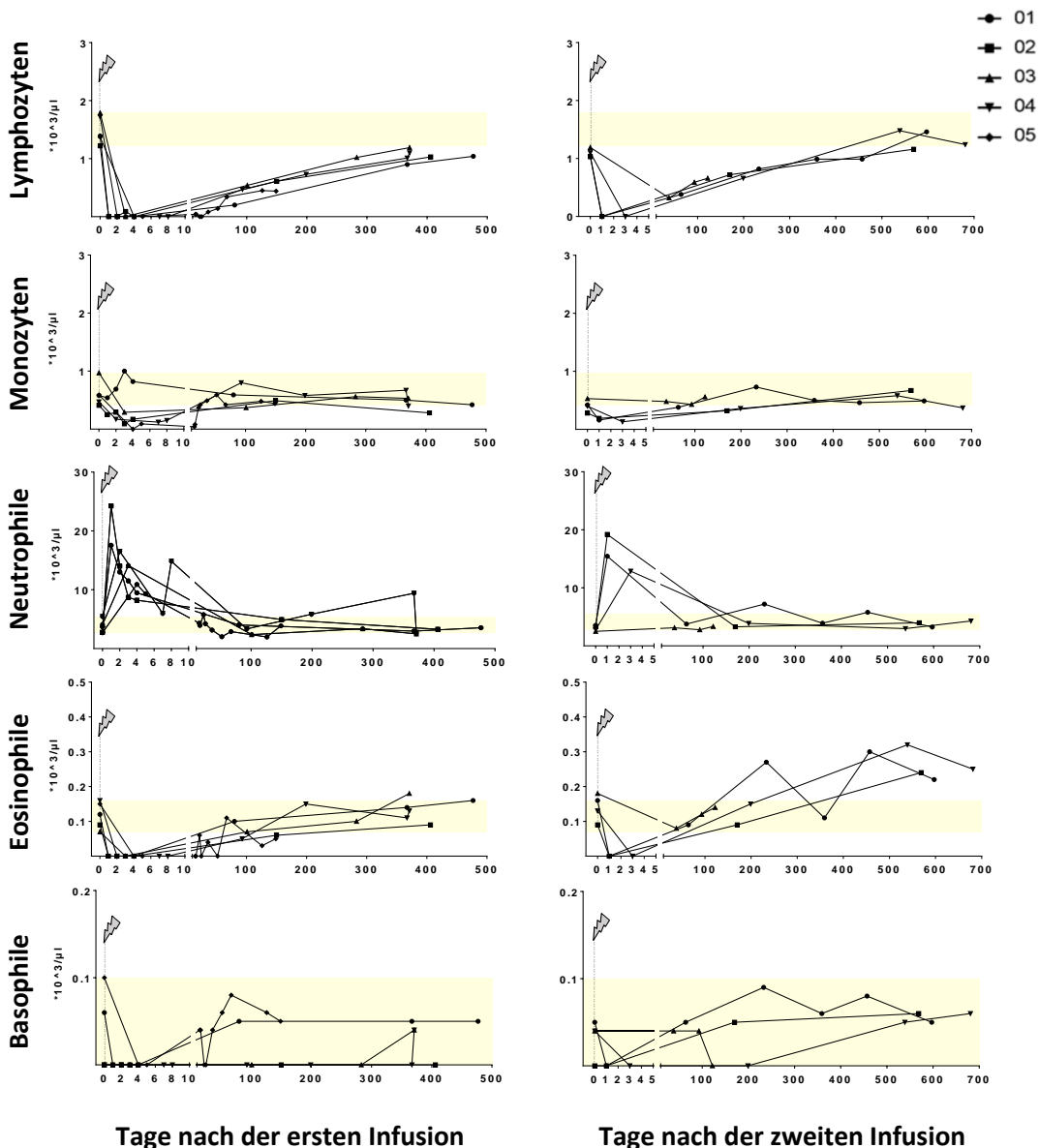
Auch die gemessenen Konzentrationen der Thrombozyten blieben an fast allen Messzeitpunkten im Normbereich. Werte außerhalb des Normbereichs wurden lediglich an Tag 3 bei Patient 02 und Patient 03 bemerkt. Bei ihnen lag die Thrombozytenkonzentration zu diesem Zeitpunkt bei  $135 \cdot 10^3/\mu\text{l}$  beziehungsweise  $143 \cdot 10^3/\mu\text{l}$  und somit nur knapp von der Untergrenze von  $150 \cdot 10^3/\mu\text{l}$  entfernt.

### 5.3 Einfluss von Alemtuzumab auf die Zahl der Zellen des Differentialblutbilds

Neben dem kleinen Blutbild wurde auch das Differentialblutbild regelmäßig analysiert.

**Abbildung 4** zeigt die Entwicklung der Anzahl der Lymphozyten, Monozyten sowie der neutrophilen, eosinophilen und basophilen Granulozyten.





**Abbildung 4:** Entwicklung der absoluten Anzahl der Lymphozyten, Monozyten sowie neutrophilen, eosinophilen und basophilen Granulozyten nach Alemtuzumab im zeitlichen Verlauf. Dargestellt ist die Entwicklung der Konzentration dieser Zellarten im peripheren Blut sowohl nach dem ersten Behandlungszyklus (linke Spalte) als auch nach dem zweiten Behandlungszyklus (rechte Spalte). Auf die Darstellung eines Normbereichs wurde in dieser Abbildung verzichtet, da der Normbereich der Untergruppen der Leukozyten von der Gesamtzahl der Leukozyten abhängt und somit bei den fünf Patienten nicht identisch ist. Stattdessen wurde der Bereich der Ausgangswerte vor Beginn des ersten Infusionszyklus in Gelb hinterlegt. Den Patienten sind entsprechend der Abbildungslegende Symbole zugeordnet.

Beim Betrachten der zeitlichen Entwicklung der absoluten Zellzahlen im Differentialblutbild fällt auf, dass die Lymphozyten in ihrer Anzahl am stärksten durch Alemtuzumab beeinträchtigt wurden. Sie wurden innerhalb weniger Tage nach Behandlungsbeginn nahezu vollständig depletiert und erreichten im folgenden Jahr bis zu Beginn des neuen Behandlungszyklus nicht mehr ihre Ausgangswerte. Der zweite

Behandlungszyklus führte zu einer erneuten Depletion der Lymphozyten, die danach bis zum Erreichen der Ursprungswerte länger als 400 Tage brauchten.

Während die Konzentration der Monozyten bei Patient 01 infolge der ersten Behandlung mit Alemtuzumab geringfügig anstieg, wurde diese bei den anderen vier Patienten zunächst reduziert, wobei die Depletion der Monozyten bei keinem Patienten so deutlich ausfiel wie diejenige der Lymphozyten. Im weiteren Verlauf lag die Anzahl der Monozyten pro Mikroliter zu den meisten Beobachtungszeitpunkten im Bereich der Ausgangswerte. Eine deutliche Veränderung der Monozytenkonzentration durch Alemtuzumab war im langfristigen Verlauf also nicht zu erkennen.

Die Anzahl der Neutrophilen stieg infolge der ersten Behandlung deutlich an. Der stärkste Anstieg wurde bei Patient 02 festgestellt. Die Konzentration der Neutrophilen stieg bei ihm innerhalb von einem Tag auf über  $24 \cdot 10^3/\mu\text{l}$ . Innerhalb der folgenden Wochen nahm ihre Konzentration wieder ab und im langfristigen Verlauf war die Zahl der Neutrophilen bei allen fünf Patienten den Ausgangswerten ähnlich. Ein starker Anstieg der Neutrophilenkonzentrationen mit nachfolgender erneuter Abnahme zeigte sich auch nach dem zweiten Behandlungszyklus.

Die Eosinophilen wurden durch den ersten Behandlungszyklus mit Alemtuzumab nahezu vollständig depletiert. Im Vergleich zu den Lymphozyten verlief ihre Rekonstruktion allerdings deutlich schneller, sodass sie vor Beginn des zweiten Behandlungszyklus den Bereich der Ausgangswerte erreichten. Nach dem zweiten Behandlungszyklus zeigte sich ebenfalls zunächst eine starke Depletion und anschließend eine erfolgreiche Rekonstruktion. Im langfristigen Verlauf wurde der Bereich der Ausgangswerte durch die Eosinophilen sogar überschritten.

Die basophilen Granulozyten lagen schon vor Beginn der Behandlung in nur sehr kleiner Anzahl vor mit Konzentrationen zwischen 0 und  $1 \cdot 10^3/\mu\text{l}$ . Zu allen Messzeitpunkten nach Beginn des ersten und zweiten Infusionszyklus lag ihre Konzentration in diesem Bereich, sodass hier kein größerer Einfluss von Alemtuzumab vermutet werden kann.

#### 5.4 Einfluss von Alemtuzumab auf die Anteile der Zellen des Differentialblutbilds

Neben der absoluten Anzahl wurden auch die Anteile einzelner Zellarten an den Gesamtleukozyten bestimmt. Die Ergebnisse hierzu sind in **Abbildung 5** abgebildet.

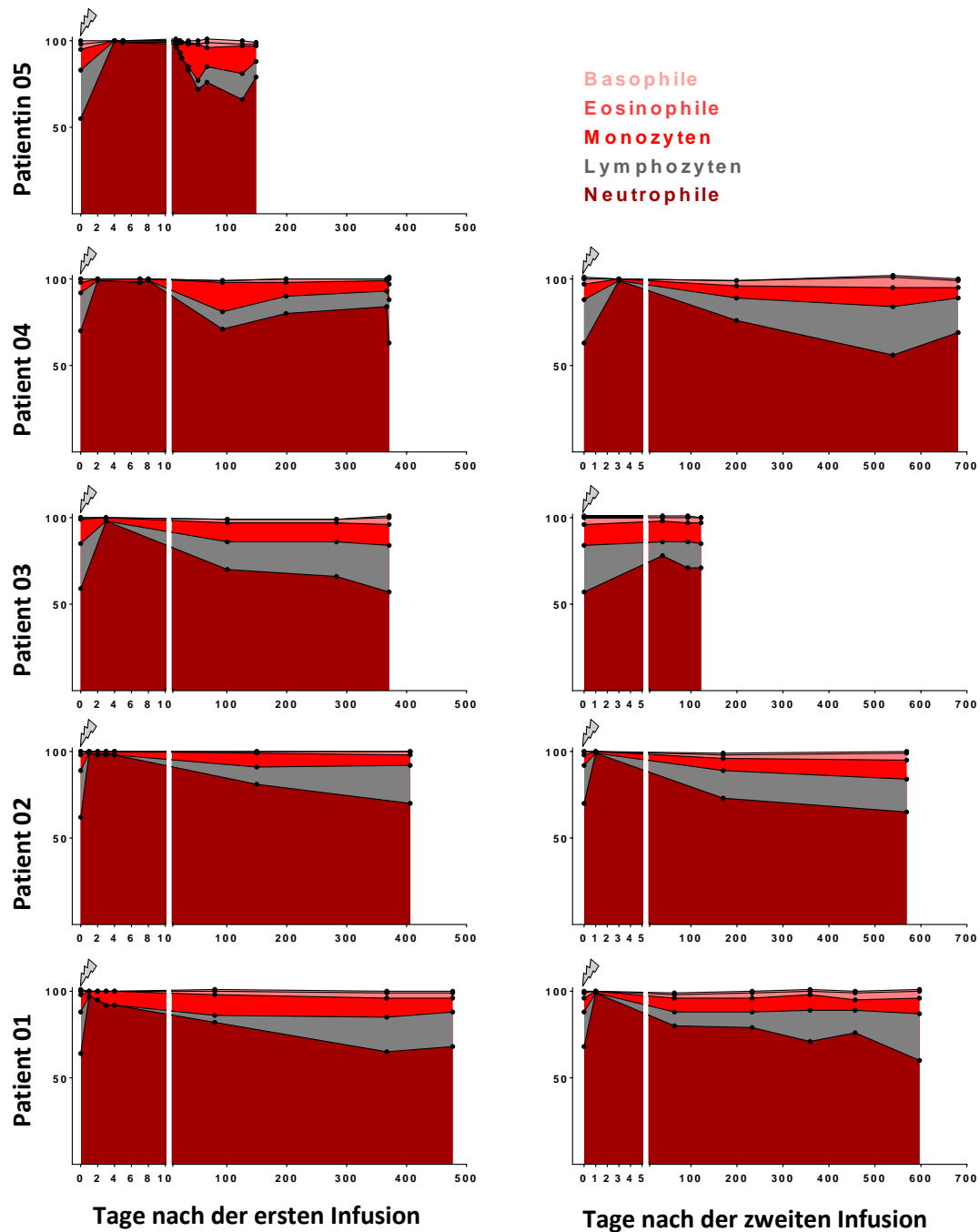


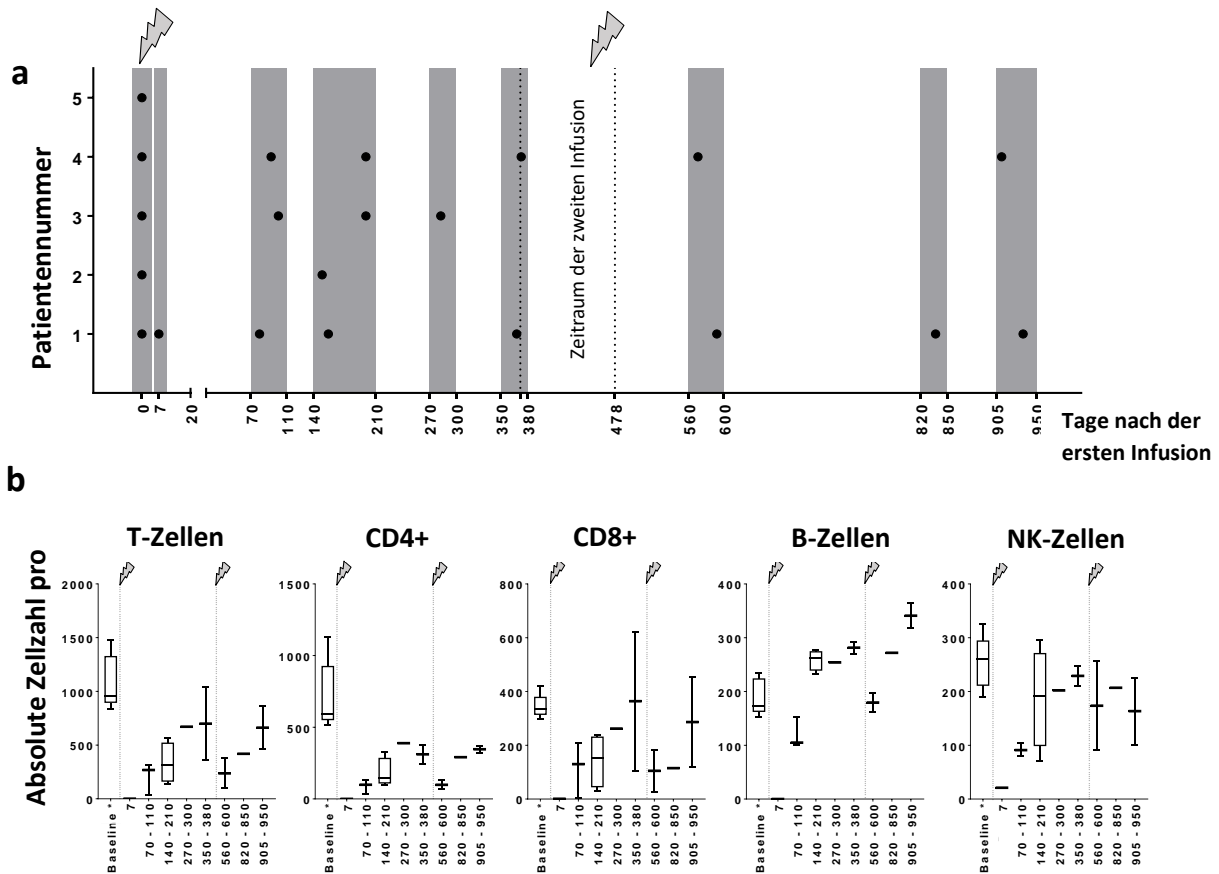
Abbildung 5: Entwicklung der Anteile der Lymphozyten, Monozyten sowie neutrophilen, eosinophilen und basophilen Granulozyten unter den Leukozyten nach Alemtuzumab im zeitlichen Verlauf. Dargestellt ist die Entwicklung der Anteile dieser Zellarten im peripheren Blut sowohl nach dem ersten Behandlungszyklus (linke Spalte) für alle fünf Patienten als auch nach dem zweiten Behandlungszyklus (rechte Spalte) für die Patienten 01 bis 04.

Die Entwicklung der Anteile der Zellarten unter den Leukozyten wurde bei den fünf Patienten unterschiedlich lange verfolgt. Bei allen fünf Patienten wurde jedoch die Veränderung des Differentialblutbildes in den ersten Tagen nach Beginn der Behandlung engmaschig kontrolliert. Dabei wird deutlich erkennbar, dass infolge der

Behandlung der Anteil der Lymphozyten an der Gesamtheit der Leukozyten schnell abnahm und wenige Tage nach Beginn der Behandlung verschwindend gering war. Gleichzeitig kam es zu einer schnellen Zunahme des Anteils der Neutrophilen, welche zwar schon vor Beginn der Behandlung die Mehrheit der Leukozyten ausmachten, aber nach Alemtuzumab ihren Anteil weiterhin erhöhten. Der Anteil der Monozyten wurde ähnlich wie derjenige der Lymphozyten durch Alemtuzumab innerhalb weniger Tage reduziert. Bei den Patienten 01, 02 und 04 wurde das Differentialblutbild auch nach Beginn des zweiten Behandlungszyklus innerhalb von drei Tagen untersucht. Auch hier zeigte sich eine schnelle Veränderung der Zellfraktionen mit ähnlichem Muster wie ein Jahr zuvor.

Im langfristigen Verlauf kam es im Rahmen der Rekonstruktion der depletierten Zellen zu einer langsamen Annäherung ihrer Anteile an ihren Ursprungswert und zu einer Normalisierung der Zellfraktionen. Der Anteil der Monozyten schien dabei den Ausgangswert früher zu erreichen als derjenige der Lymphozyten.

5.5 Einfluss von Alemtuzumab auf die Zellzahlen des Immunstatus der Lymphozyten  
Da Alemtuzumab seine Wirkung vorwiegend über die Depletion von Lymphozyten entfaltet, wurde die Depletion von Untergruppen der Lymphozyten genauer betrachtet und die absolute Anzahl verschiedener Lymphozytenuntergruppen zu verschiedenen Zeitpunkten bestimmt. Die Messung wurde mittels Durchflusszytometrie an frischen Zellen durchgeführt. Die Ergebnisse zeigt **Abbildung 6**.



**Abbildung 6: Entwicklung der absoluten Anzahl verschiedener Zellspezifitäten im zeitlichen Verlauf nach Alemtuzumab.** Abbildung (a) zeigt die Zeitpunkte der durchflusszytometrischen Bestimmung des Immunstatus der Lymphozyten in Relation zur ersten Infusion. Die grau hinterlegten Flächen markieren die Zeiträume, in denen der Immunstatus eines oder mehrerer Patienten bestimmt wurde. Ergebnisse von Immunstatus desselben Zeitraums wurden bei der Auswertung gemeinsam betrachtet. Die beiden gepunkteten Linien umfassen den Zeitraum, in welchem der zweite Behandlungszyklus begann. Abbildung (b) zeigt die absolute Anzahl von T-Lymphozyten, CD4+ und CD8+ T-Lymphozyten sowie von B-Lymphozyten und NK-Zellen in den festgelegten Zeiträumen (Angabe in Tagen nach der ersten Infusion). Der Zeitpunkt direkt vor der ersten Applikation von Alemtuzumab wird als Baseline bezeichnet. In den Zeiträumen, in welchen der Immunstatus mehrerer Patienten erfasst wurde, sind der Median sowie Minimum und Maximum der gemessenen Anzahl einer Zellart dargestellt. \* Der Ausgangswert vor Beginn der Therapie wurde bei Patient 01, 02 und 04 auf Basis der absoluten Lymphozytenzahl im aktuellen Differentialblutbild geschätzt, da aufgrund fehlender medizinischer Indikation das kostenaufwändige Verfahren zur Bestimmung des Immunstatus der Lymphozyten hier nicht durchgeführt wurde. Da die Patienten zu dieser Zeit keine immunmodulierende Therapie erhielten, wurde eine normale Verteilung der Zellspezifitäten angenommen.

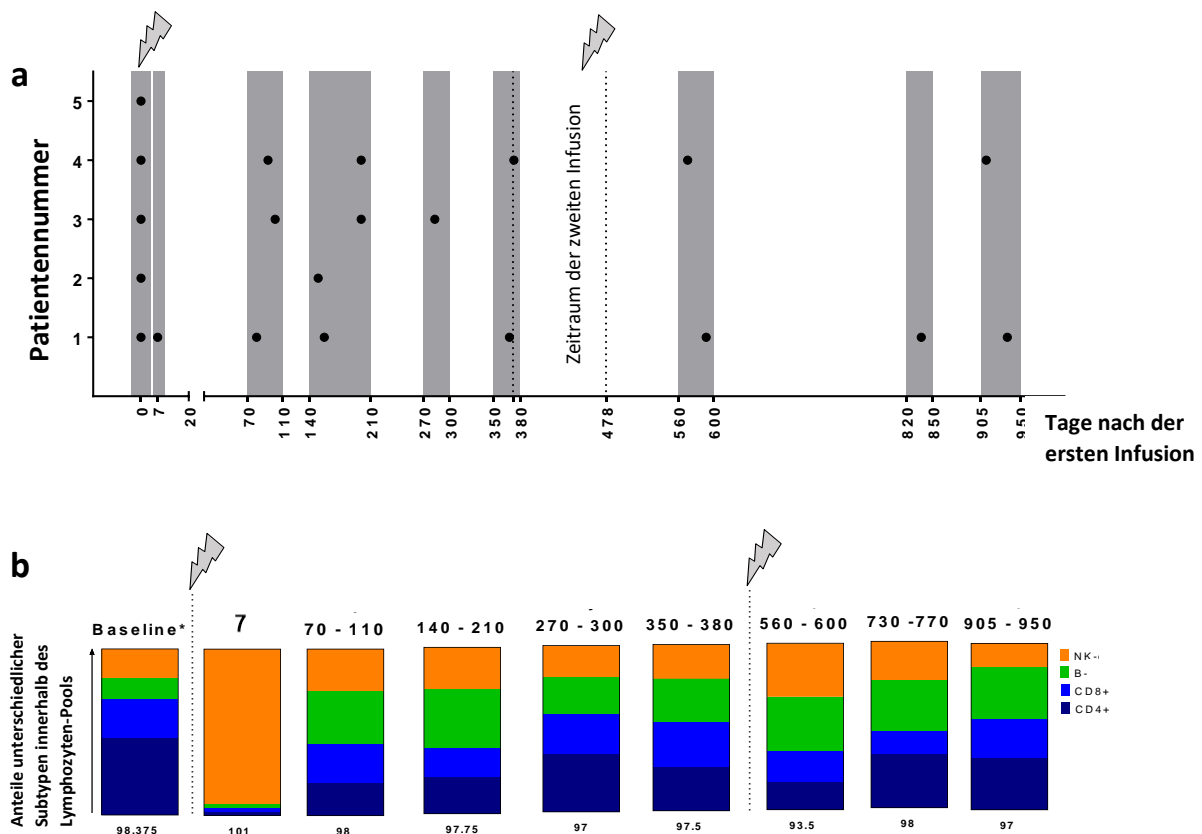
Wie in der Abbildung ersichtlich, kam es nach Alemtuzumab zu einer deutlichen Reduktion der absoluten Zellzahl aller untersuchten Immunzellen. An Tag 7 wurde exemplarisch der Immunstatus von Patient 01 bestimmt, um einen Eindruck der Zellfraktionen direkt nach der Behandlung zu gewinnen. Die gemessene Konzentration

der CD4+ T-Lymphozyten und B-Lymphozyten lag dabei unter einer Zelle pro Mikroliter. Die Konzentration der CD8+ T-Lymphozyten erreichte eine Zelle pro Mikroliter, während NK-Zellen immerhin noch in einer Konzentration von 21 Zellen pro Mikroliter erfasst wurden.

In der folgenden Zeit kam es zu einem Anstieg der Anzahl der Immunzellen, wobei die Repopulation im chronologischen Verlauf unter den verschiedenen Immunzellspezifitäten deutlich variierte. Auf einen rechnerischen Vergleich der Zellzahlen, welche in unterschiedlichen Zeiträumen vorlagen, mit Angabe genauer Prozentwerte wird hier bewusst verzichtet, da bei fehlender medizinischer Indikation nicht in jedem Zeitraum von allen Patienten die absoluten Zellzahlen bestimmt wurden. Bei Betrachtung der Diagramme können aber trotzdem folgende Entwicklungen erkannt werden: Die B-Lymphozyten erholten sich in ihrer Anzahl am schnellsten und übertrafen den geschätzten mittleren Ursprungswert sogar bereits nach wenigen Monaten. Auch während der Repopulation nach der zweiten Behandlung überschritten sie in ihrer mittleren Anzahl den Ursprungswert deutlich. Die Rekonstruktion der T-Lymphozyten erfolgte dagegen im beobachteten Zeitraum nur in begrenztem Maße. Beim beispielhaften Vergleich der absoluten Zellzahlen der CD4+ und CD8+ Zellen in den Zeiträumen Tag 70 bis 110 (entspricht ungefähr Monat 3) sowie Tag 350 bis 380 (entspricht ungefähr Monat 12) mit den Ursprungswerten wird erkennbar, dass die Rekonstruktion dieser Zellreihen im angegebenen Zeitraum nur in geringerem Ausmaß stattfand als die der B-Lymphozyten. Außerdem wird erkennbar, dass unter allen Zellspezifitäten die Rekonstruktion der CD4+ Zellen am schwächsten ausfiel.

#### 5.6 Einfluss von Alemtuzumab auf die Anteile der Zellen im Immunstatus der Lymphozyten

Neben den absoluten Zellzahlen wurden auch die Anteile verschiedener Zellspezifitäten im Lymphozytenpool direkt nach der Depletion und zu verschiedenen Zeitpunkten während der Rekonstruktion untersucht. Die Anteile wurden dabei aus den absoluten Zellzahlen errechnet, welche durchflusszytometrisch an unbehandelten Zellzahlen bestimmt worden waren. Die Entwicklung der Zellanteile im zeitlichen Verlauf ist in **Abbildung 7** dargestellt. Zur besseren Übersicht sind die Zeitpunkte der durchflusszytometrischen Analyse in der Abbildung nochmals mit dargestellt.



**Abbildung 7: Anteile der CD4+ Lymphozyten, CD8+ Lymphozyten, B-Lymphozyten und NK-Zellen innerhalb des Lymphozytenpools zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Depletion.** Abbildung (a) zeigt die Zeitpunkte der durchflusszytometrischen Bestimmung des Immunstatus der Lymphozyten in Relation zur ersten Infusion. Die grau hinterlegten Flächen markieren die Zeiträume, in denen der Immunstatus eines oder mehrerer Patienten bestimmt wurde. Ergebnisse von Immunstatus desselben Zeitraums wurden bei der Auswertung gemeinsam betrachtet. Die beiden gepunkteten Linien umfassen den Zeitraum, in welchem der zweite Behandlungszyklus begann. Abbildung (b) zeigt die Anteile der CD4+ Lymphozyten, CD8+ Lymphozyten sowie der B-Lymphozyten und NK-Zellen innerhalb des Lymphozytenpools in den festgelegten Zeiträumen. In den Zeiträumen, in welchen der Immunstatus mehrerer Patienten bestimmt wurde, ist der mittlere Anteil der Zellart angegeben. Die Summe der gerundeten Anteile in Prozent ist unter jeder Säule angegeben. \*Die Ausgangswerte der Anteile der verschiedenen Subgruppen vor Beginn der Alemtuzumabtherapie wurden für die Patienten 01, 02, 04 und 05 geschätzt, da das kostenaufwendige Verfahren zur Bestimmung des Immunstatus der Lymphozyten aufgrund fehlender medizinischer Indikation hier nicht durchgeführt wurde. Da die Patienten zu dieser Zeit keinerlei immunbeeinflussende Medikamente einnahmen, wurden Normwerte angenommen und der Mittelwert des Normbereichs für die Patienten angegeben. Für die Normbereiche der verschiedenen Zellarten gilt: CD4+ T-Lymphozyten 28%-57%, CD8+ T-Lymphozyten 10%-39%, B-Lymphozyten 6%-19%, NK-Zellen 7%-31%.

### *Verteilung der Zellfraktionen direkt nach Beginn der Therapie*

Auffällig in der Verteilung von Lymphozytensubgruppen waren vor allem die Ergebnisse von Tag 7. CD4+ T-Lymphozyten, welche normalerweise 28% bis 57% der Lymphozyten stellen, machten bei Patient 01, dessen Blut an diesem Tag exemplarisch untersucht worden war, nur noch 2% innerhalb des Lymphozytenpools aus. Auch der Anteil der B-Lymphozyten lag an Tag 7 nur noch bei 2%. Der Anteil der CD8+ T-Lymphozyten war zu diesem Zeitpunkt mit 3% ebenfalls deutlich reduziert. Die NK-Zellen hingegen, deren Anteil im Bereich von 7% bis 31% normwertig ist, machten nun mit 94% den weitaus größten Teil der Lymphozyten aus.

### *Veränderung der Zellfraktionen während der Rekonstruktionsphase*

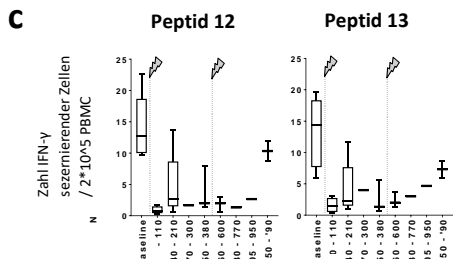
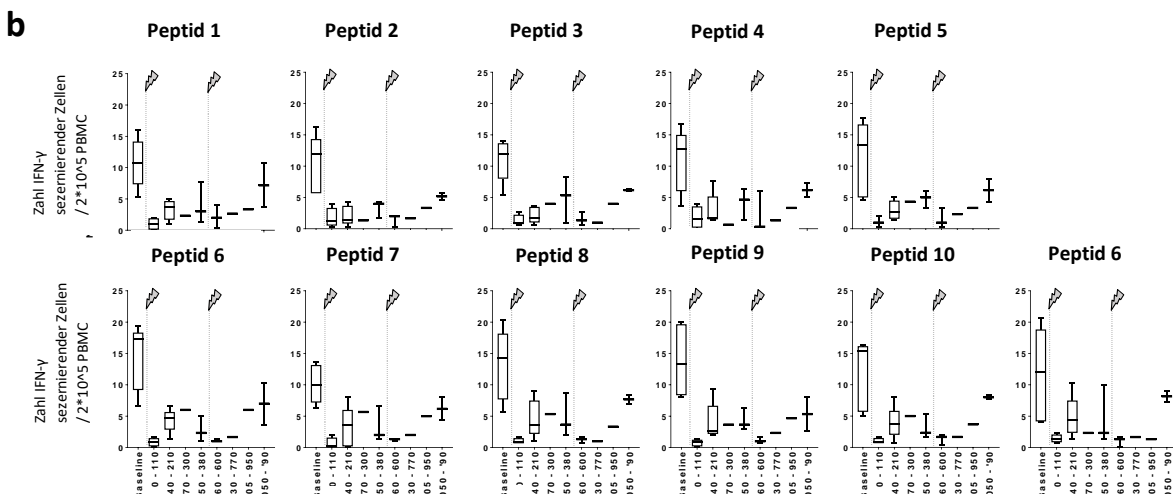
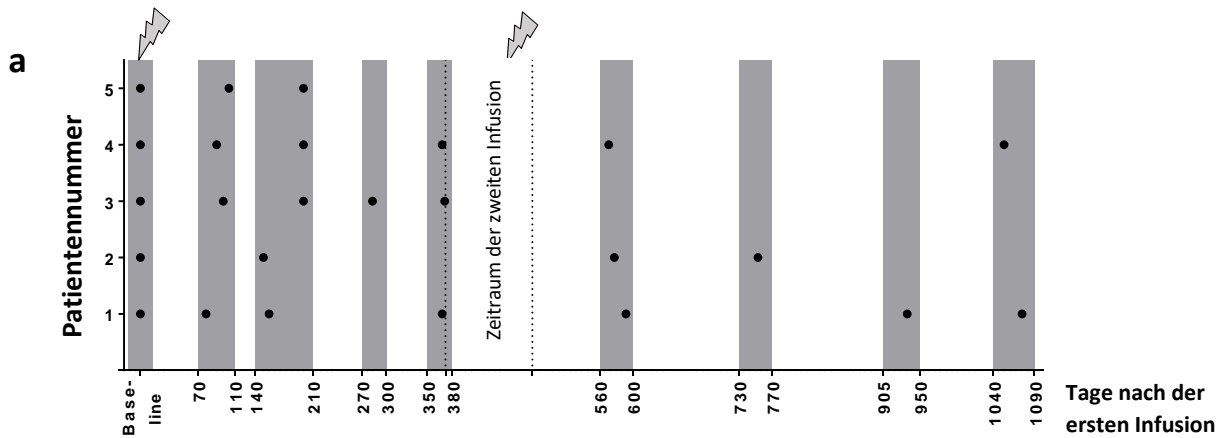
Während der Rekonstruktionsphase veränderten sich mit der absoluten Anzahl der Zellen auch die Anteile der verschiedenen Zellspezifitäten. Durch die schnellere Rekonstruktion der B-Lymphozyten erhöhte sich deren mittlerer Anteil in den folgenden Monaten sehr stark und lag schon innerhalb von 70 bis 110 Tagen nach Beginn der Therapie mit 31% nicht nur deutlich über dem mittleren Ausgangswert, sondern auch über dem Normbereich von 6%-19%. Trotz gewisser Schwankungen des B-Lymphozytenanteils während der weiteren Rekonstruktionszeit blieb dieser zu allen gemessenen Zeitpunkten über der Norm. Mit der Vergrößerung des B-Lymphozytenanteils in der Folge der Alemtuzumab-Therapie ging eine Verkleinerung des T-Lymphozytenanteils einher. Dieser nahm zwar sowohl im Jahr nach der ersten Depletion als auch in der Zeit nach dem zweiten Infusionszyklus insgesamt zu, erreichte aber auch nach 905 bis 950 Tagen noch nicht den ursprünglichen Wert. Eine Abnahme des T-Lymphozytenanteils zwischen den Zeiträumen Tag 70 bis 110 und Tag 140 bis 210 sowie zwischen den Zeiträumen Tag 270 bis 300 und Tag 350 bis 380 war nur geringfügig und nicht durch eine Abnahme der absoluten T-Lymphozytenzahl, sondern durch eine vergleichsweise schnellere Vermehrung der B-Lymphozyten zu erklären. Die Anteile der CD4+ und der CD8+ Untergruppen vergrößerten sich unterschiedlich schnell. Die CD8+ T-Lymphozyten näherten sich in ihrem Anteil dem Ursprungswert deutlich mehr an als die CD4+ T-Lymphozyten, die also nicht nur in ihrer absoluten Anzahl, sondern auch in ihrem Anteil unter den Lymphozyten am stärksten durch Alemtuzumab beeinträchtigt blieben.



## 5.7 Einfluss von Alemtuzumab auf die zelluläre Reaktivität

### 5.7.1 Veränderung der Zahl IFN- $\gamma$ sezernierender Zellen

Zur Untersuchung der Veränderung der zellulären Reaktivität durch Alemtuzumab dienten ELISpot-Assays mit PBMC aus Blutproben, welche sowohl vor Beginn der Behandlung als auch zu unterschiedlichen Zeitpunkten während der Repopulationsphase gesammelt worden waren. Als Messwert für die zelluläre Reaktivität wurde die Zahl Interferon(IFN)- $\gamma$  sezernierender Zellen gewählt, da IFN- $\gamma$  hauptsächlich von TH1-Zellen produziert wird und diese von entscheidender Bedeutung in der Pathogenese der MS zu sein scheinen. **Abbildung 8** zeigt die Veränderung der zellulären Reaktivität in Anwesenheit jedes als Stimuli verwendeten Peptids im zeitlichen Verlauf. Da für die Messung jeweils  $2 \cdot 10^5$  PBMC in jedes Well der ELISpot-Platte gegeben wurden, zeigen die Ergebnisse die Zahl IFN- $\gamma$  sezernierender Zellen pro  $2 \cdot 10^5$  PBMC an.



**Abbildung 8: Veränderung der zellulären Reaktivität in Form der Zahl IFN- $\gamma$  sezernierender Zellen im zeitlichen Verlauf.** Abbildung (a) zeigt die Zeitpunkte der Aufreinigung von PBMC-Proben, welche später in den ELISpot-Assays untersucht wurden, in Relation zur ersten Infusion. Die grau hinterlegten Flächen markieren die Zeiträume, in denen die Aufreinigung einer Probe mindestens eines Patienten erfolgte. Ergebnisse von ELISpot-Assays, welche demselben Zeitraum zugehörten, wurden bei der Auswertung gemeinsam betrachtet. Die beiden gepunkteten Linien umfassen den Zeitraum, in welchem der zweite Behandlungszyklus begann. Abbildung (b) und (c) zeigen die Veränderung der zellulären Reaktivität im zeitlichen Verlauf in Form der Zahl IFN- $\gamma$  sezernierender Zellen pro  $2 \cdot 10^5$  PBMC. In den Zeiträumen, in denen die Ergebnisse mehrere ELISpot-Assays verwertet wurden, sind Boxplots mit Median sowie Minimum und Maximum dargestellt. In (b) ist die Veränderung der Reaktivität in Anwesenheit

*der verschiedenen Ligandompeptide dargestellt, während (c) die Entwicklung der Reaktivität in Anwesenheit jeweils eines Kontrollpeptids zeigt.*

*Im ersten Jahr nach der Depletion ist die Reaktivität der PBMCs in Form der Zahl IFN- $\gamma$  sezernierender Zellen reduziert*

Die Veränderung der Reaktivität in Form der Zahl IFN- $\gamma$  sezernierender Zellen in Relation zu  $2 \cdot 10^5$  PBMC zeigte im Jahr nach der ersten Depletion in Anwesenheit aller untersuchten Peptide einen ähnlichen Verlauf. Dies galt sowohl in Anwesenheit der Ligandompeptide 1 bis 11, die aus dem Gehirn von verstorbenen MS-Patienten selektioniert und synthetisiert worden waren und im Verdacht stehen, Angriffsziele der autoreaktiven Zellen von MS-Patienten darzustellen, als auch für die Kontrollpeptide 12 und 13, also JC Virus VP1\_34-48 und Tetanustoxin tt830-844. Aufgrund einer zu kleinen Datenmenge konnten Berechnungen zur Signifikanz der Reaktivitätsveränderung in Anwesenheit jedes einzelnen Peptids nicht durchgeführt werden. Eine Signifikanztestung erfolgte stattdessen bei gemeinsamer Betrachtung aller Ligandompeptide und wird gesondert beschrieben. Die Veränderung der Reaktivität in Anwesenheit einzelner Peptide wurde rein deskriptiv ausgewertet. Wie in der Abbildung ersichtlich, war die mediane Zahl IFN- $\gamma$  sezernierender Zahlen zu allen Messzeitpunkten nach der Behandlung geringer als vor Applikation von Alemtuzumab. Im Laufe des ersten Jahres variierte die Entwicklung der Reaktivität geringfügig unter den einzelnen Peptiden, insgesamt schien sie jedoch zwischen den beiden Zeiträumen Tag 70 bis 110 und Tag 350 bis 380 zuzunehmen.

*Die Reduktion der Reaktivität der Zellen in Form der Zahl IFN- $\gamma$  sezernierender Zellen pro  $2 \cdot 10^5$  PBMC bleibt in der Zeit nach der zweiten Depletion bestehen*

In der Zeit nach der zweiten Depletion blieb die Zahl an IFN- $\gamma$  sezernierenden Zellen in Relation zu  $2 \cdot 10^5$  PBMC weiterhin auf niedrigerem Niveau. Im Vergleich zu den Ursprungswerten, die vor Beginn der Behandlung erhoben worden waren, blieb die mediane Zahl der IFN- $\gamma$  sezernierenden Zellen auch zu allen Messzeitpunkten nach dem zweiten Infusionszyklus reduziert. Allerdings sei auch hier noch einmal darauf hingewiesen, dass Signifikanztests aufgrund zu kleiner Datensätze nicht zu jedem einzelnen Peptid durchgeführt wurden.

*Die Reduktion der Zahl IFN- $\gamma$  sezernierender Zellen pro  $2 \cdot 10^5$  PBMC bei gemeinsamer Betrachtung der Peptide 1 bis 11 ist signifikant*

Da die Datenmenge für die Überprüfung einer Signifikanz bei einzelnen Peptiden zu gering war, wurden hierfür Reaktivitäten in Anwesenheit der Ligandompeptide 1 bis 11 zusammen einem Signifikanztest unterzogen. Das Ergebnis der Testung soll lediglich als Hinweis für eine mögliche Signifikanz der Reaktivitätsminderung in Anwesenheit einzelner Peptide verstanden werden. Zur Überprüfung dieser sind weitere Forschungen mit größeren Datensätzen notwendig. **Abbildung 9** zeigt den zugehörigen Graphen sowie die Ergebnisse des Wilcoxon Tests für verbundene Werte.

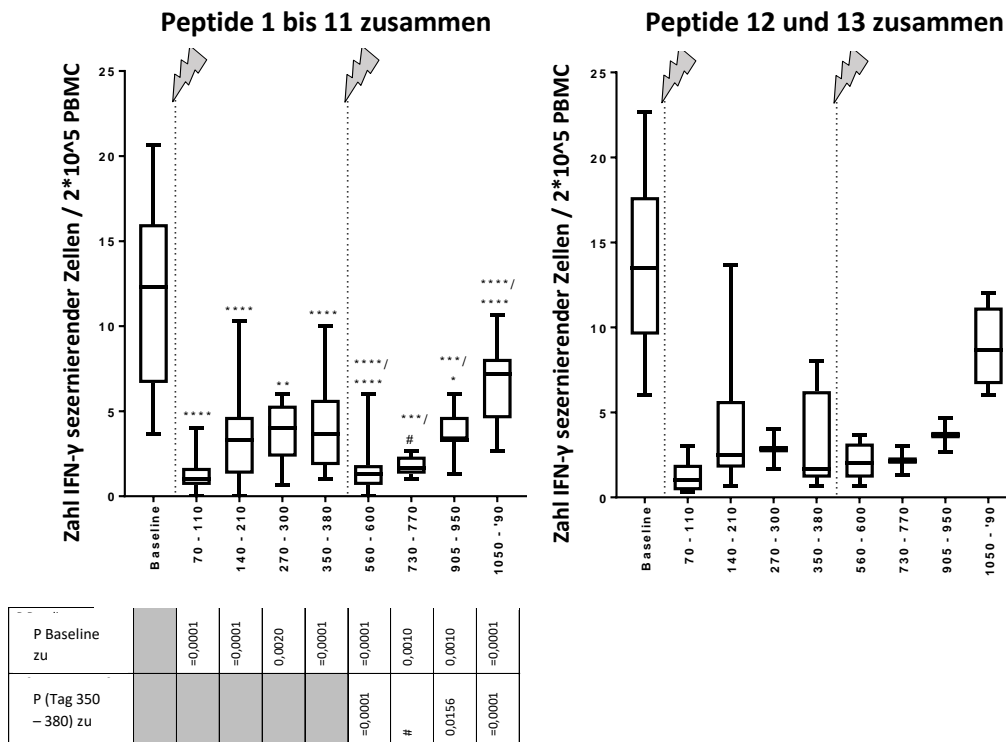


Abbildung 9: Zahl der IFN- $\gamma$  sezernierender Zellen bei gemeinsamer Betrachtung der Reaktivitäten in Anwesenheit mehrerer Stimuli im zeitlichen Verlauf. Abbildung (a) zeigt die Veränderung der zellulären Reaktivität in Form der Zahl IFN- $\gamma$  sezernierender Zellen bei gemeinsamer Betrachtung der Ligandompeptide. Zur Überprüfung der Signifikanz wurde der Wilcoxon Test für verbundene Werte herangezogen. Er diente einerseits dem Vergleich der ursprünglichen Reaktivitäten mit denjenigen anderer Zeiträume und andererseits dem Vergleich der Ergebnisse von Tag 350 bis 380 mit denen von späteren Zeiträumen. Für die Ergebnisse des Signifikanztests gilt: \*\*\*\*  $p \leq 0,0001$ ; \*\*\*  $p \leq 0,0010$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*  $p \leq 0,05$ . # Ein Vergleich des Zeitraums 350 bis 380 mit dem Zeitraum Tag 730 bis 770 mit dem Wilcoxon Test für verbundene Werte konnte nicht durchgeführt werden, weil die Blutproben dieser Zeiträume von unterschiedlichen Patienten stammten. Zur Verdeutlichung sind die p Werte der Signifikanzprüfung außerdem in der darunter stehenden Tabelle dargestellt. Abbildung (b) zeigt die Veränderung der Zahl IFN- $\gamma$  sezernierender Zellen bei gemeinsamer Betrachtung der beiden Kontrollpeptide. Statistische Analysen wurden aufgrund einer zu kleinen Datenmenge hier nicht durchgeführt, aber der Trend ist dargestellt.

Bei gemeinsamer Betrachtung der Zahl IFN- $\gamma$  sezernierender Zellen in Anwesenheit der Ligandompeptide 1 bis 11 fiel ein signifikanter Unterschied zwischen dem Ursprungswert und dem Ergebnis der ersten Messung nach der Depletion auf. Trotz eines Anstiegs der mittleren Reaktivität im Lauf des ersten Jahres blieb die Reduktion im Vergleich zum Ursprungswert weiterhin signifikant. Nach der zweiten Infusionsfolge ein Jahr später ergab sich eine erneute signifikante Reduktion der Zahl IFN- $\gamma$  sezernierender Zellen im Vergleich zur vorherigen Messung zwischen Tag 350 und

380. Da die Ligandompeptide hier gemeinsam betrachtet wurden, lässt sich hier jedoch kein Rückschluss auf einen signifikanten Rückgang der Reaktivität in Anwesenheit eines einzelnen Peptids ziehen. Insgesamt blieb die Reaktivität zu allen beobachteten Zeitpunkten deutlich unter derjenigen vor der Behandlung.

Für die Kontrollpeptide wurden Signifikanztests aufgrund zu kleiner Datenmengen nicht durchgeführt, dennoch ist auch hier ein ähnlicher Trend der Reaktivitätsveränderung zu erkennen. Die Veränderung der Reaktivität kann daher nicht als spezifisch für die Ligandompeptide angesehen werden, sondern vorerst eher als eine allgemeine Reaktivitätsminderung der Zellen. Ein signifikanter Unterschied zwischen dem Rückgang der Reaktivität in Anwesenheit der Ligandompeptide im Vergleich zum Rückgang der Reaktivität in Anwesenheit der Kontrollpeptide konnte in dieser Arbeit somit nicht gezeigt werden.

#### 5.7.2 Veränderung der Zahl IFN- $\gamma$ sezernierender Zellen in Relation zu $2 \cdot 10^5$ anwesenden CD4+ Lymphozyten

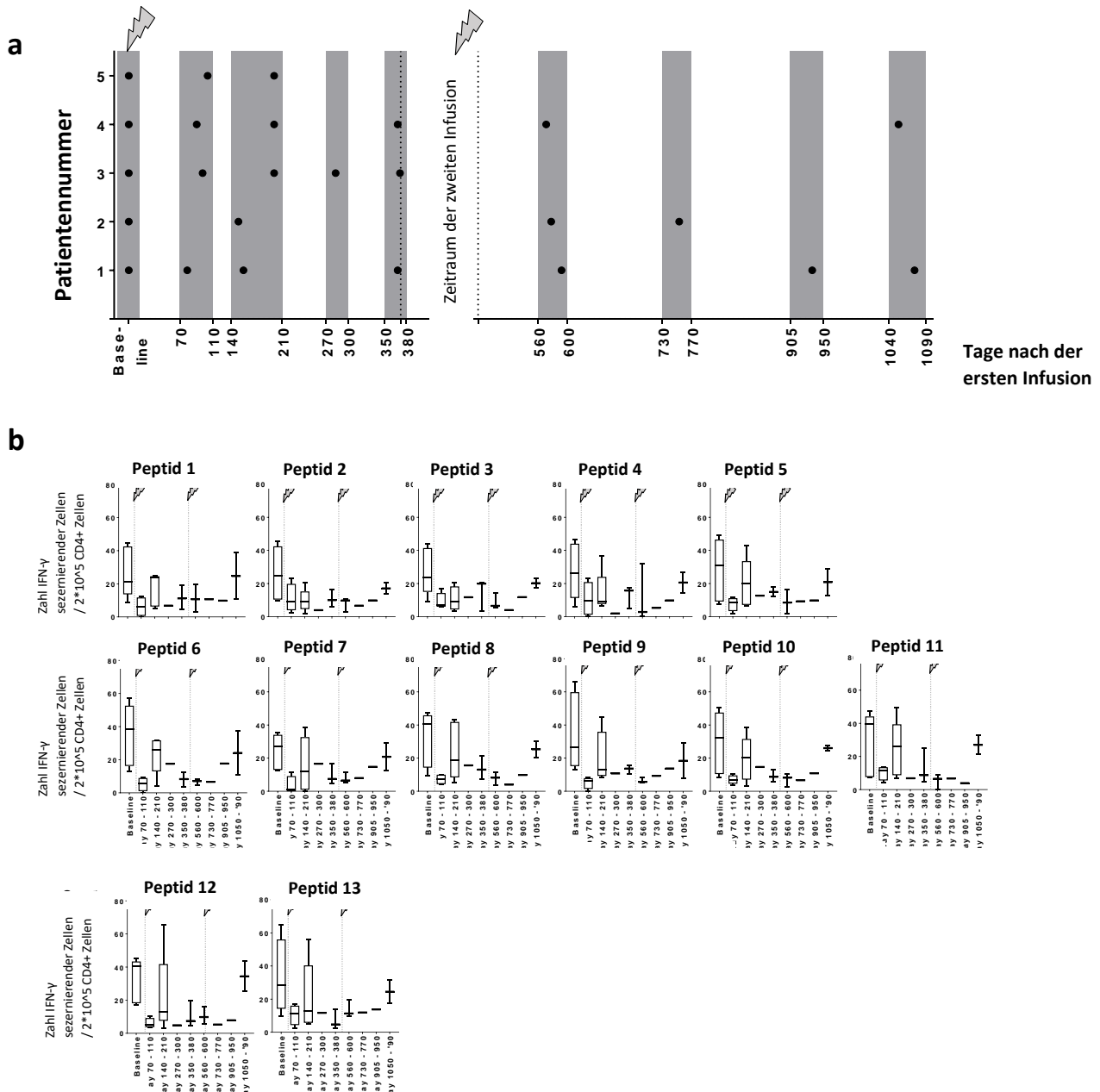
Wie oben beschrieben, kam es durch Alemtuzumab zu einer veränderten Verteilung der Zellspezifitäten mit einem Rückgang des Anteils der CD4+ T-Lymphozyten.

Diese sind hauptverantwortlich für die Produktion von IFN- $\gamma$ . Um zu überprüfen, ob der Rückgang der Zahl IFN- $\gamma$  sezernierender Zellen allein durch den Rückgang des Anteils der CD4+ T-Lymphozyten bedingt ist oder auch funktionelle Veränderungen angenommen werden können, wurde deshalb auch die Zahl IFN- $\gamma$  produzierender Zellen auf die anwesenden CD4+ T-Lymphozyten normalisiert. Dafür wurden mittels Durchflusszytometrie die Anteile der CD4+ T-Lymphozyten unter den gefrorenen PBMC-Proben bestimmt und die Zahl IFN- $\gamma$  sezernierender Zellen im ELISpot-Assay durch den Anteil der CD4+ T-Lymphozyten der entsprechenden Probe dividiert. Die durchflusszytometrisch bestimmten Anteile der CD4+ Lymphozyten innerhalb der PBMC-Probe sind in **Abbildung 10** aufgelistet.

05	50,55	--	--	--	--	--	--	--	--
04	35,98	16,01	20,84	--	26,76	18,77	--	--	27,55
03	60,29	17,39	31,08	34,11	--	--	--	--	--
02	30,33	--	20	--	--	20,36	25,06	--	--
01	50,36	13,92	14,8	--	28,02	11,76	--	33,88	34,36
Patienten- num- mer	Ursprungs-wert	Tag 70 - 110	Tag 140 - 210	Tag 270 - 300	Tag 360 - 380	Tag 560 - 600	Tag 730 - 770	Tag 905 - 950	Tag 1040 - 1080
Zeitraum									

*Abbildung 10: Anteile der CD4+ T-Lymphozyten unter den PBMC gesamt in den gefrorenen Zellproben der fünf Patienten vor Beginn der Behandlung und zu unterschiedlichen Zeitpunkten während der Rekonstruktion. Die Anteile sind in Prozent angegeben.*

**Abbildung 11** zeigt die zelluläre Reaktivität in Form der Zahl IFN- $\gamma$  sezernierender Zellen nach Normalisierung für anwesende CD4+ T-Lymphozyten. Die Werte stellen somit die Zahl IFN- $\gamma$  sezernierender Zellen pro  $2 \cdot 10^5$  CD4+ T-Lymphozyten dar. Zur Verdeutlichung sind die Zeitpunkte der Probenaufreinigung nochmal mit dargestellt.



**Abbildung 11: Veränderung der zellulären Reaktivität in Form der Zahl IFN- $\gamma$  sezernierender Zellen nach Normalisierung zu anwesenden CD4+ T-Lymphozyten in den Wells der ELISpot-Platte im zeitlichen Verlauf.** *Abbildung (a) zeigt nochmals die Zeitpunkte der Aufreinigung von PBMC-Proben, welche später in den ELISpot-Assays untersucht wurden, in Relation zur ersten Infusion. Die grau hinterlegten Flächen markieren die Zeiträume, in denen die Aufreinigung einer Probe mindestens eines Patienten erfolgte. Ergebnisse von ELISpot-Assays, welche demselben Zeitraum zugehörten, wurden bei der Auswertung gemeinsam betrachtet. Die beiden gepunkteten Linien umfassen den Zeitraum, in welchem der zweite Behandlungszyklus begann. **Abbildung (b) und (c)** zeigen die Veränderung der zellulären Reaktivität im zeitlichen Verlauf in Form der Zahl IFN- $\gamma$  sezernierender Zellen pro  $2 \cdot 10^5$  CD4+ T-Lymphozyten. In den Zeiträumen, in denen die Ergebnisse mehrere ELISpot-Assays verwertet wurden, sind Boxplots mit Median sowie Minimum und Maximum dargestellt. In **(b)** ist die Veränderung der Reaktivität in*



*Anwesenheit der verschiedenen Ligandompeptide dargestellt, während (c) die Entwicklung der Reaktivität in Anwesenheit jeweils eines Kontrollpeptids zeigt.*

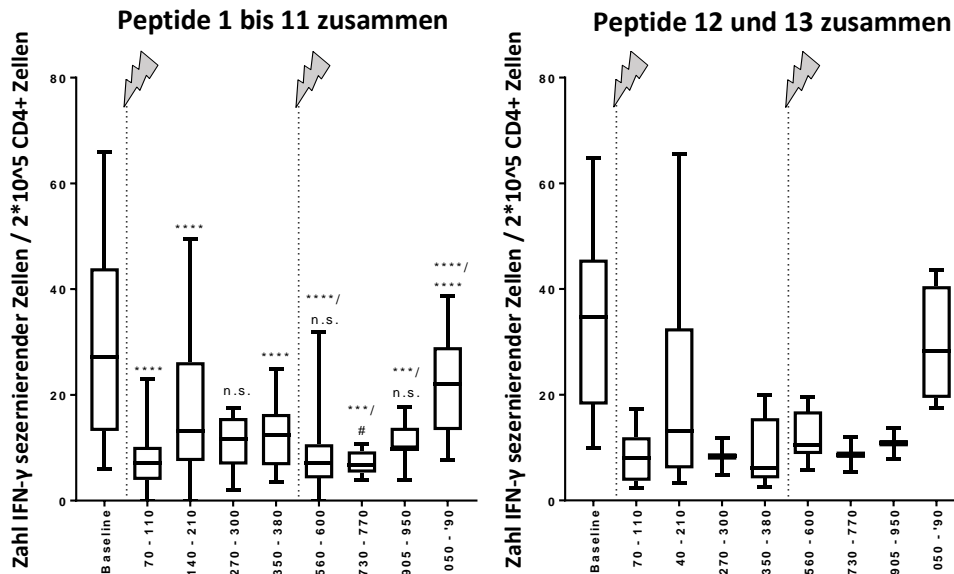
Ähnlich wie bei Betrachtung der Reaktivität in Relation zu den PBMC ergab sich auch bei der Reaktivität der Zellen in Form der Zahl IFN- $\gamma$  sezernierender Zellen pro  $2 \cdot 10^5$  CD4+ T-Lymphozyten eine Reduktion durch Alemtuzumab.

*Nach beiden Alemtuzumab-Behandlungen ist die Reaktivität der Zellen auch in Form der Zahl IFN- $\gamma$  sezernierender Zellen pro  $2 \cdot 10^5$  CD4+ T-Lymphozyten reduziert*

Auch hier zeigte sich ein ähnlicher Verlauf bei allen untersuchten Peptiden. Die Zahl IFN- $\gamma$  sezernierender Zellen war zum ersten Messzeitpunkt nach der Behandlung zwischen Tag 70 und 110 geringer als vorher. Die mediane Zahl der IFN- $\gamma$  sezernierenden Zellen pro  $2 \cdot 10^5$  anwesenden CD4+ T-Lymphozyten blieb auf niedrigem Niveau zu allen Messzeitpunkten nach der Depletion.

*Die Reduktion der Zahl IFN- $\gamma$  sezernierender Zellen pro  $2 \cdot 10^5$  CD4+ T-Lymphozyten bei gemeinsamer Betrachtung der Peptide 1 bis 11 ist signifikant*

Bei der Signifikanzprüfung der Veränderung der zellulären Reaktivität in Relation zu anwesenden CD4+ T-Lymphozyten wurde wie bei der Signifikanzprüfung der Reaktivität in Relation zu den Gesamt-PBMC vorgegangen. Die Ligandompeptide 1 bis 11 wurden zusammen betrachtet und die Ergebnisse des Wilcoxon Tests für verbundene Werte zusammen mit dem Graphen in **Abbildung 12** dargestellt.



P Baseline zu		=0,0001	=0,0001	n.s.	=0,0001	=0,0001	0,0010	0,0010	=0,0001
P (Tag 350 - 380) zu					n.s.	#	n.s.	n.s.	=0,0001

Abbildung 12: Zahl der IFN- $\gamma$  sezernierender Zellen in Relation zu anwesenden CD4+ T-Lymphozyten bei gemeinsamer Betrachtung der Reaktivitäten in Anwesenheit mehrerer Stimuli im zeitlichen Verlauf. Abbildung (a) zeigt die Veränderung der zellulären Reaktivität in Form der Zahl IFN- $\gamma$  sezernierender Zellen in Relation zu  $2 \cdot 10^5$  anwesenden CD4+ T-Lymphozyten bei gemeinsamer Betrachtung der Ligandompeptide. Zur Überprüfung der Signifikanz wurde der Wilcoxon Test für verbundene Werte herangezogen. Er diente einerseits dem Vergleich der ursprünglichen Reaktivitäten mit denjenigen anderer Zeiträume und andererseits dem Vergleich der Ergebnisse von Tag 350 bis 380 mit denen von späteren Zeiträumen. Für die Ergebnisse des Signifikanztests gilt: \*\*\*\*  $p \leq 0,0001$ ; \*\*\*  $p \leq 0,0010$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*  $p \leq 0,05$ , n.s.: nicht signifikant # Ein Vergleich des Zeitraums 350 bis 380 mit 730 bis 770 mit dem Wilcoxon Test für verbundene Werte konnte nicht durchgeführt werden, weil die Blutproben dieser Zeiträume von unterschiedlichen Patienten stammten. Zur Verdeutlichung sind die p Werte der Signifikanzprüfung außerdem in der darunter stehenden Tabelle dargestellt. Abbildung (b) zeigt die Veränderung der Zahl IFN- $\gamma$  sezernierender Zellen in Relation zu  $2 \cdot 10^5$  anwesenden CD4+ T-Lymphozyten bei gemeinsamer Betrachtung der beiden Kontrollpeptide. Statistische Analysen wurden hier nicht durchgeführt, aber der Trend ist dargestellt.

Bei gemeinsamer Betrachtung der Zahl IFN- $\gamma$  sezernierender Zellen pro CD4+ T-Lymphozyten in Anwesenheit der Ligandompeptide 1 bis 11 fiel ein signifikanter Unterschied zwischen dem Ursprungswert und dem Ergebnis der ersten Messung nach der Depletion auf. Abgesehen von der Reaktivität im Zeitraum Tag 140 bis 210 blieb diese Reduktion im Vergleich zum Ursprungswert zu allen Messzeitpunkten

signifikant. Insgesamt blieb die mediane Reaktivität zu allen beobachteten Zeitpunkten unter derjenigen vor der Behandlung.

Im Fall der Kontrollpeptide zeigte sich auch hier eine ähnliche Entwicklung. Aufgrund eines kleinen Datensatzes wurde hier wieder auf die Prüfung einer Signifikanz verzichtet.

## 5.8 Einfluss von Alemtuzumab auf den klinischen Verlauf

Die fünf Patienten, die mit Alemtuzumab behandelt wurden, entwickelten die ersten Symptome der MS im Alter von 20 bis 30 Jahren. Die Symptome waren vielfältig und umfassten unter anderem Taubheitsgefühle und Lähmungen sowie Sprach- und Sehstörungen. Alle fünf Patienten erhielten Alemtuzumab aufgrund von hoher Krankheitsaktivität. Vor Beginn dieser Behandlung haben vier der fünf Patienten bereits andere Krankheitsmodifizierende Therapien erhalten, welche jedoch Schübe nicht verhindern und die Krankheitsprogression nicht zum Stillstand bringen konnten. Patient 04 hatte dagegen hohe Krankheitsaktivität bereits zu Beginn der Erkrankung und erhielt Alemtuzumab deshalb schon als erste krankheitsmodifizierende Therapie. Die Entwicklung ihres klinischen Zustands wurde sowohl vor als auch nach der Therapie genau charakterisiert und wird im Folgenden beschrieben.

### 5.8.1 Patient 01

Bei Patient 01 (geb. zwischen 1980 und 1990) manifestierte sich die MS vom schubförmigen Verlaufstyp erstmalig 2014. Die Diagnose wurde im gleichen Monat gestellt. An Vorerkrankungen war eine Infektiöse Mononukleose bekannt. Hinsichtlich Noxen gab der Patient einen Nikotinkonsum von drei bis vier Zigaretten pro Tag bei insgesamt 14 pack years an. Die vorherrschende Symptomatik bestand anfangs aus einer Dysarthrie und einer latenten brachiofazial betonten Hemiparese rechts. Nach Durchführungen einer Cortisonstoßtherapie kam es zu einer leichten Besserung der Dysarthrie, allerdings stellte sich innerhalb weniger Wochen eine Sensibilitätsstörung der rechten Hand ein. Aufgrund der großen Krankheitsaktivität und der schnellen Zunahme von großen cerebralen Läsionen wurde eine Therapie mit Alemtuzumab begonnen. Im folgenden Jahr war der klinische Zustand des Patienten stabil und die regelmäßig durchgeführten klinischen Untersuchungen unauffällig. Der Grad der Behinderung, der vor der Behandlung auf 2,0 in der EDSS eingestuft worden war, verbesserte sich auf 0. Die einzigen Veränderungen, die vom Patienten bemerkt wurden, waren eine vorübergehende leichte Reduktion der Haardichte, die sich

allerdings von selbst wieder normalisierte und ein Jahr später eine verwaschene Sprache nach längerem Reden. Anfang des Jahres 2016 erhielt der Patient die zweite Behandlung mit Alemtuzumab. Auch im nun folgenden Jahr zeigte der Patient klinisch einen stabilen Befund.

#### 5.8.2 Patient 02

Bei diesem Patienten (geb. zwischen 1980 und 1990) wurde die MS vom schubförmigem Verlaufstyp schon 2004 diagnostiziert. Sie manifestierte sich erstmals 2003 durch einen Bulbusbewegungsschmerz, später dann durch eine linksbetonte Visusminderung mit rezidivierenden Optikusneuritiden. Andere Vorerkrankungen, Allergien und Nikotinkonsum wurden verneint. In den folgenden Jahren erhielt er vielfältige Therapieversuche: 2004 bis 2005 mit Glatirameracetat, 2005 bis 2008 mit Interferon- $\beta$ -1a, 2008 bis 2011 mit Natalizumab und 2011 bis 2014 mit Fingolimod. Im März 2014 wurde auch eine therapeutische Plasmapherese mit normalem Plasma durchgeführt. 2014 erhielt der Patient über einige Monate Dimethylfumarat und Fampridin. Trotz der vielfältigen Therapieversuche kam es über mehrere Jahre hinweg zu einer fortschreitenden Visusverschlechterung, sodass der Visus 2014 beidseits weniger als 0,1 betrug. Außerdem entwickelte sich eine komplexe Okulomotoriusstörung und Sensibilitätsstörungen im Bereich der linken Hand. Der EDSS nahm im Verlauf zu und wurde schließlich auf 4,5 eingestuft. Aufgrund der hohen Krankheitsaktivität, die sich durch die bisherigen Schubprophylaxen nicht einschränken ließ, wurde eine Therapie mit Alemtuzumab begonnen. Die ersten Infusionen wurden Anfang des Jahres 2015 verabreicht. In der folgenden Zeit blieb der EDSS konstant auf 4,5. Laut eigenen Angaben fühlte sich der Patient wohl und bemerkte lediglich des Öfteren ein leichtes Kribbeln in der linken und rechten Hand. Der hochgradige Visusverlust blieb weiterhin bestehen. Im Frühling 2016 wurde der zweite Behandlungszyklus durchgeführt. Auch dieses Mal wurde das Medikament gut vertragen. Die Symptomatik blieb weiterhin stabil.

#### 5.8.3 Patient 03

Patient 03 (geb. zwischen 1980 und 1990) entwickelte erste Zeichen der Erkrankung 2009. Die Diagnose der RRMS wurde 2012 gestellt. Andere Erkrankungen oder Allergien sind nicht bekannt. Nikotinkonsum bestand seit ca. 2002 mit durchschnittlich einer Schachtel pro Tag, wurde aber ab 2016 deutlich auf zwei Zigaretten pro Tag eingeschränkt. In den Jahren 2013 und 2014 wurde der Patient mit Interferon- $\beta$ -1a

behandelt, anschließend wurde die Medikation auf Teriflunomid umgestellt. Trotz dieser krankheitsmodifizierenden Therapie blieb die Erkrankung klinisch aktiv und äußerte sich durch eine Fußheberparese links bei Belastung, eine Hypästhesie des Fußes sowie ein Taubheitsgefühl der Finger IV/V links. Deswegen erhielt der Patient im Sommer 2016 zum ersten Mal Alemtuzumab. Im folgenden Jahr fühlte sich der Patient laut eigenen Angaben wieder besser. Außer einem Fallfuß links nach längerem Gehen würde ihm keine Behinderung auffallen. In der klinischen Untersuchung fielen zwei Monate nach der Verabreichung eine leichte Parese des linken Beins sowie eine leichte Verplumpung beim Einbeinhüpfen links auf, welche sich in den folgenden Monaten jedoch zurückbildeten. Die Einstufung im EDSS konnte nach einem halben Jahr von 2,0 auf 0 reduziert werden. Der zweite Zyklus der Alemtuzumabapplikation erfolgte ein Jahr später.

#### 5.8.4 Patient 04

Die Diagnose der MS mit vorwiegend schubförmigem Verlauf wurde bei diesem Patienten (geb. zwischen 1970 und 1980) 2008 gestellt. Kurz zuvor waren die ersten Krankheitssymptome aufgetreten, die sich in Form einer Taubheit an beiden Händen, im Verlauf auch an den Füßen und den Unterschenkeln bis hin zu den Hüften äußerten. Der Nikotinkonsum lag 2014 bei insgesamt fünf pack years, in den folgenden Jahren bei ca. 15 Zigaretten pro Tag. Neben der MS war ein asymptomatischer Hydrozephalus internus bekannt. Allergien wurden verneint. Auch dieser Patient hat vor der Therapie mit Alemtuzumab schon andere krankheitsmodifizierende Therapien erhalten. 2009 bis 2010 nahm er an einer placebokontrollierten Dosisfindungsstudie mit Daclizumab teil. Anschließend erhielt er Interferon- $\beta$ -1a. 2012 wurde die Therapie auf Fingolimod umgestellt. Während dieser Zeit erlitt der Patient mehrere Schübe mit inkompletter Rückbildung, sodass sich die Einstufung im EDSS bis 2014 auf 4,5 erhöhte. Die vielfältige Symptomatik umfasste neben Taubheitsgefühlen und Koordinationsstörungen auch Sehstörungen, eine diskrete Dysarthrie, Muskelschmerzen, eine diskrete Urge-Symptomatik und mittelgradige Fatigue-Symptomatik. Wegen der hohen Krankheitsaktivität trotz krankheitsmodifizierender Medikation wurde ein Therapieversuch mit Alemtuzumab begonnen. Der Patient erhielt den ersten Infusionszyklus 2014, den zweiten genau ein Jahr später. Schon nach der ersten Dosis blieb der klinische Verlauf stabil. Der Patient äußerte eine erhöhte Anfälligkeit für leichte Infekte, fühlte sich anamnestisch sonst aber sehr gut. In der klinisch-neurologischen Untersuchung ergab sich ein weitgehend stabiler Befund.

Auffällig waren ein omnidirektionales Schwanken im Romberg-Stehversuch, eine leichte Schwäche des rechten Beins, eine verplumptes Einbeinhüpfen beidseits und ein leicht reduziertes Vibrationsempfinden an den Daumengrundgelenken und Innenknöcheln. Der EDSS hat sich auf eine Stufe von 2,5 bis 3 reduziert.

#### 5.8.5 Patientin 05

Diese Patientin (geb. zwischen 1980 und 1990) erhielt die Diagnose der MS vom schubförmigen Verlauf im Jahr 2010. Die vorherrschende Symptomatik war dabei eine deutliche Sehverschlechterung am rechten Auge im Rahmen einer Neuritis n. optici. Die Erkrankung könnte sich möglicherweise auch schon früher manifestiert haben, denn anamnestisch lag bereits im Juni 2009 ein über zwei bis drei Wochen bestehendes Kribbeln im rechten Fuß vor. Außerdem war der Patientin zum Zeitpunkt der Diagnosestellung schon seit mehreren Jahren ein elektrisierendes Gefühl entlang der Wirbelsäule bei Kopfbewegungen aufgefallen. Eine Tagesmüdigkeit sowie Blasen- oder Mastdarmfunktionsstörungen wurden zunächst verneint. In den folgenden Jahren wurden unterschiedliche Therapieversuche mit krankheitsmodifizierenden Medikamenten durchführt. Eine initial begonnene Therapie mit Glatirameracetat wurde wegen Unverträglichkeit auf Interferon- $\beta$ -1a umgestellt. Weil unter dieser Therapie weiterhin Schübe auftraten, wurde eine Eskalation mit Natalizumab begonnen. Wegen Positivität für JCV-Antikörper musste auch diese Therapie beendet werden. Schübe traten bei der Patientin auch während zwei Schwangerschaften auf und wurden zum Teil mit einer Cortisonstoßtherapie behandelt. Die Symptome waren dabei sehr vielfältig und umfassten unter anderem eine Schwäche der rechten Körperhälfte bis hin zur Hemiparese, Taubheitsgefühle, Feinmotorikstörungen und eine Urge-Symptomatik. Aufgrund einer nur inkompletten Rückbildung der Symptomatik stieg die Einstufung im EDSS im Verlauf auf 4,5. Ein Therapieversuch mit Fingolimod bis Mai 2017 konnte die Krankheitsaktivität ebenfalls nicht zum Stillstand bringen. Auch eine Plasmapherese brachte keine deutliche Besserung. Im Sommer 2017 wurde eine Behandlung mit Alemtuzumab begonnen.

Ungefähr drei Wochen später stellte sich die Patienten wegen einer neu aufgetretenen Feinmotorikstörung der linken Hand erneut vor. Nach einer hochdosierten Cortisonstoßtherapie kam es zur Stabilisierung dieser Symptomatik, allerdings zeigte die linke Hand in der Folge eine leichte spastische Tonuserhöhung. Der EDSS wurde nun bei 3,5 eingestuft.

## 5.9 Einfluss von Alemtuzumab auf die radiologisch gemessene Krankheitsaktivität

Auch die Veränderung der in der MRT gemessenen Krankheitsaktivität durch Alemtuzumab wurde beurteilt. Für die Auswertung der MRT-Befunde des Schädels wurden vor allem axiale Bilder in FLAIR- und T2-Wichtung, außerdem nach Kontrastmittelaufnahme in T1-Wichtung betrachtet. Auch Bilder in sagittaler und coronarer Schnittebene wurden zum Vergleich herangezogen. Bei der Auswertung der MRT-Befunde des Myelons wurden vorwiegend die sagittalen und axialen Aufnahmen betrachtet. Zur besseren Darstellung der Läsionen wurden hier auch die protonengewichteten Aufnahmen begutachtet. Bei allen Bildern wurde besonderes Augenmerk auf die Anzahl, Lokalisation und Größe der einzelnen Läsionen und deren Entwicklung im Verlauf der Behandlung gelegt.

### 5.9.1 Patient 01

Bei diesem Patienten wurden zum Zeitpunkt der Erstmanifestation der MS Ende August 2014 MRT-Bilder extern aufgenommen. Im Vergleich zu diesen Voraufnahmen zeigte sich im MRT-Befund des Schädels wenige Wochen später ein deutlicher Progress der FLAIR-hyperintensiven Läsionen. Die größte Läsion war balkenassoziiert links paraventrikulär zu finden mit einer Größenzunahme von vormals 12\*8mm auf nun 25\*20mm. Außerdem zeigten sich in beiden Hemisphären multiple neue Läsionen in einer Größe zwischen 1mm und 9mm. Einige dieser Herde zeigten sowohl eine Diffusions- als auch eine Schrankenstörung. Einzelne Herde blieben im Vergleich zur Voraufnahme größenkonstant, lediglich eine Läsion zeigte sich geringfügig größenregredient.

Im Herbst 2014 wurde die Therapie mit Alemtuzumab begonnen. In der folgenden Zeit wurden in regelmäßigen Abständen MRT-Befunde erhoben. Ein MRT des Schädels wurde im April und September 2015 sowie im Juli 2016 und im Januar 2017 durchgeführt. In all diesen Befunden zeigten sich die bekannten Läsionen teilweise größenkonstant, teilweise größenregredient. Außerdem ergab sich kein Hinweis auf neue Läsionen sowie kein pathologisches Kontrastmittelenhancement. Der N. Opticus zeigte jedoch eine Signalanhebung im Sinne einer Opticusneuritis.

Das Myelon zeigte bei diesem Patienten weder vor noch nach Beginn der Behandlung mit Alemtuzumab eine Signalauffälligkeit oder ein pathologisches Kontrastmittelenhancement.

### 5.9.2 Patient 02

Von diesem Patienten lagen Berichte zu externen MRT-Aufnahmen des Schädels zwischen 2007 und 2011 vor. Während dieser Zeit kam es zu keiner wesentlichen Befundänderung. Es zeigten sich in der T2-Sequenz hyperintense Demyelinisierungsherde vor allem rechtshemisphärisch, aber auch in der linken Hemisphäre. Akut entzündliche Veränderungen am Sehnerv konnten nicht sicher nachgewiesen werden.

In eine Aufnahme des Myelons von 2011 zeigte sich außerdem eine fragliche Hyperintensität dorsal von C1, die sich in der folgenden Zeit vergrößerte. 2014 war eine diffuse Signalanhebung von HWK 1 bis HWK 6 erkennbar. Im MRT des Schädels wurde Ende 2014 neben den bekannten T2-hyperintensiven Läsionen eine neue FLAIR-hyperintense Läsion links parietal ventrikelnah in einer Größe von ungefähr 3mm nachgewiesen. Eine Diffusionsrestriktion und ein pathologisches Kontrastmittelenhancement wurden nicht nachgewiesen. Der N. Opticus zeigte einen Kontrastverlust als möglichen Hinweis auf entzündlichen Veränderungen.

Daraufhin wurde dem Patienten im Januar 2015 die erste Dosis von Alemtuzumab verabreicht. In den folgenden 24 Monaten wurden jeweils drei Aufnahmen des Schädels und des Myelons erstellt. Die bekannten cerebralen Läsionen sowie die Nn. Optici stellten sich dabei unverändert dar. Weder eine Diffusions- oder Schrankenstörung noch neue Läsionen wurden nachgewiesen. Die langstreckige Läsion im Myelon zeigte sich größenkonstant bis geringfügig größenregredient.

### 5.9.3 Patient 03

Dieser Patient bekam die erste Infusion von Alemtuzumab 2016. In den MRT-Aufnahmen des Schädels und des Myelons, die zwei Wochen zuvor erstellt worden waren, zeigten sich in der FLAIR- und T2-Sequenz mehrere Dutzend Läsionen, vorwiegend periventrikulär, aber auch im Hirnstamm sowie in den beiden Kleinhirnstielen. Mindestens vier der cerebralen Läsionen nahmen Kontrastmittel auf. Diese kontrastmittelaufnehmenden Läsionen befanden sich linksfrontal, im Hirnstamm links, am linken Kleinhirnstiel sowie am Hinterhorn des linken Seitenventrikels. Im Myelon wurden Signalanhebungen in Höhe HWK 2 und 3 sowie in Höhe HWK 4 bis 6, außerdem in Höhe BWK 10 und 11 nachgewiesen.

Die MRT-Aufnahmen, welche Anfang des Jahres 2017 erstellt wurden, zeigten eine unveränderte Darstellung sowohl der craniellen als auch der spinalen Herde. Ein



pathologisches Kontrastmittelenhancement sowie neue Läsionen wurden nicht nachgewiesen.

#### 5.9.4 Patient 04

Bei Patient 04 lagen Berichte zu MRT-Befunden ab 2008 vor. Dabei zeigten sich im Januar 2008 supratentoriell in beiden Hemisphären Marklagerläsionen mit periventrikulärer Betonung. Sie nahmen eine Einzelgröße von bis zu 7mm ein. Eine zehn Monate später erstellte Aufnahme zeigte einen unveränderten Befund im Vergleich zu Januar. Eine Diffusions- oder Schrankenstörung lag zu diesem Zeitpunkt nicht vor. Im Myelon wurde im gleichen Jahr ein ovulärer Herd auf Höhe HWK 4/5 mit flauer Kontrastmittelaufnahme nachgewiesen.

2009 lag die Zahl der Läsionen bei ungefähr 12. Bis 2014 kam es zu einer Zunahme der Läsionen, sodass schließlich in der FLAIR-Sequenz und in der T2-Sequenz ungefähr 25 kleine Läsionen zu sehen waren. Neben supratentoriellen Marklagerläsionen waren auch kleine Herde im Balken abzugrenzen.

Ende 2014 wurde mit der Alemtuzumab-Therapie begonnen. Die ein bzw. eineinhalb Jahre später aufgenommenen MRT-Bilder des Schädels zeigten eine unveränderte Darstellung der bekannten periventrikulären Herde sowie der im Balken gelegenen Läsionen. Neu aufgetretene Herde sowie eine Diffusions- oder Schrankenstörung wurden nicht nachgewiesen. Eine 2015 erstellte Aufnahme des Myelons zeigte eine T2-hyperintense Läsion auf Höhe HWK 5 ohne Kontrastmittelaufnahme.

#### 5.9.5 Patientin 05

Zum Zeitpunkt der Diagnosesstellung 2010 zeigten sich im MRT des Schädels dieser Patientin signalreiche T2-hyperintense Läsionen im periventrikulären Marklager, im Balken sowie im oberen Zervikalmark, außerdem postentzündliche Veränderungen im N. opticus rechts, möglicherweise auch links. Bei fehlendem Nachweis einer Schrankenstörung ergab sich zu dieser Zeit kein Hinweis auf eine akute Läsion. Eine wenige Monate später erstellte Aufnahme zeigte im Vergleich hierzu keine Befundänderung.

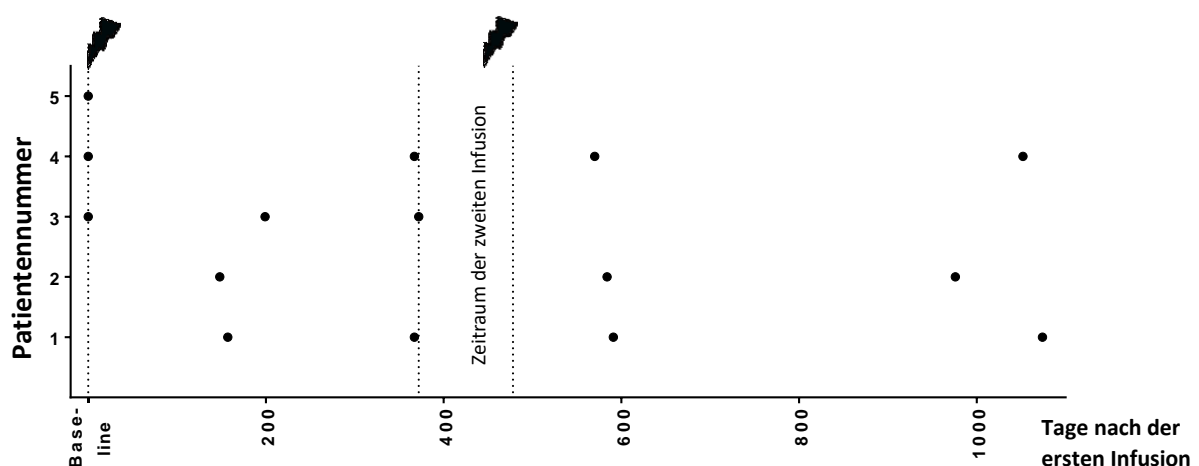
In einer Aufnahme, die im Sommer 2017 erstellt wurde, zeigten sich eine Vielzahl von Läsionen vor allem periventrikulär. Diesmal war auch eine diffuse Kontrastmittelaufnahme im Hirnstamm zu erkennen. Insgesamt ergaben sich bei dieser Aufnahme Hinweise auf große Läsionen mit Gewebsdestruktionen. Im Myelon

zeigten sich zu dieser Zeit Veränderungen auf Höhe von HWK 1 bis 2, HWK 5 bis 7 und BWK 2 bis 4. Daraufhin wurde der erste Infusionszyklus von Alemtuzumab verabreicht.

Bereits im Juli 2017 wurde aufgrund einer neuen Schubsymptomatik ein neues MRT angefertigt. Dieses zeigte ungefähr zwölf kleine kontrastmittelaufnehmende Läsionen.

#### 5.10 Einfluss von Alemtuzumab auf Ergebnisse der Neurophysiologie

Die Zeitpunkte der neurophysiologischen Testungen bei den fünf Patienten in Relation zum Beginn des ersten Infusionszyklus sind in **Abbildung 13** dargestellt. Der Einfluss von Alemtuzumab auf die neurophysiologischen Befunde konnte bei Patientin 05 nicht untersucht werden, da bei ihr im Beobachtungszeitraum keine Testung nach Beginn der Behandlung durchgeführt wurde. Die Entwicklung dieser Befunde ist im Folgenden deshalb nur bei den Patienten 01 bis 04 beschrieben.



*Abbildung 13: Zeitpunkte der neurophysiologischen Untersuchungen bei den fünf Patienten in Relation zum Beginn des ersten Infusionszyklus. Als Baseline-Werte sind die Testungen angegeben, welche bei drei Patienten innerhalb weniger Wochen vor Beginn der Therapie durchgeführt wurden. Die beiden gepunkteten Linien an Tag 372 und 478 umfassen den Zeitraum, in welchem der zweite Behandlungszyklus begann.*

##### 5.10.1 Patient 01

Bei Patient 01 konnten die Ergebnisse der Neurophysiologie nicht mit Ursprungswerten verglichen werden, da vor dem ersten Infusionszyklus keine Testung erfolgt war. Im Folgenden ist deshalb die Entwicklung nach Beginn der Therapie beschrieben. Im Beobachtungszeitraum wurden bei diesem Patienten insgesamt vier neurophysiologische Untersuchungen durchgeführt. Dabei erfolgte jedes Mal eine transkranielle Magnetstimulation, wobei sowohl nach kortikaler als auch nach

wurzelnaher lumbaler Stimulation regelrechte Reizantworten gemessen wurden. Auch die F-Welle war bei allen vier Testungen beidseits und ohne signifikante Seitendifferenz reproduzierbar. Hinsichtlich der visuell evozierten Potentiale bei Stimulation mittels kontrastalternierenden Schachbrettmusters ergab sich bei allen vier Testungen dieses Patienten ein Normalbefund. Die P100-Latenz mit einem Normbereich bis zu 120 ms, schwankte insgesamt zwischen 104 ms und 110 ms. Die neurophysiologischen Untersuchungen ergaben bei diesem Patienten also im gesamten Beobachtungszeitraum nach Beginn der Alemtuzumabtherapie einen Normalbefund.

#### 5.10.2 Patient 02

Bei Patient 02 wurden drei Testungen nach Beginn der Therapie durchgeführt. Ursprungswerte lagen auch hier nicht vor. Die Messung der Antwort auf visuelle Reize erfolgte bei diesem Patienten nur zu einem Zeitpunkt mittels einer Blitzbrille. Ein visuell evoziertes Potential war links nicht ableitbar und rechts mit einer pathologisch verzögerten P100-Latenz, sodass die Befunde zu einer beidseitigen abgelaufenen Optikusläsion passen. Bei der transkraniellen Magnetstimulation war die F-Welle zu allen drei Zeitpunkten ohne signifikante Seitendifferenz reproduzierbar. Jedoch ergaben sich Hinweise auf eine beidseitige Pyramidenbahnläsion aufgrund auffälliger Latenzverzögerung beziehungsweise fehlender Reizantwort über den Mm. tibiales anteriores nach kortikaler Stimulation.

#### 5.10.3 Patient 03

Patient 03 wurde ungefähr zwei Wochen vor Beginn der Alemtuzumabtherapie hinsichtlich neurophysiologischer Parameter getestet. Die visuelle Reizung erfolgte dabei mittels kontrastalternierenden Schachbrettmusters, wobei sich Hinweise auf eine beidseitig abgelaufene Optikusläsion aufgrund einer pathologisch verzögerten P100-Latenz von 135 ms beidseits bei ausreichendem Visus ergaben. Nach transkranieller Magnetstimulation war die F-Welle beidseits ohne signifikante Seitendifferenz reproduzierbar, aber die Reizantwort nach kortikaler Stimulation fehlte sowohl links als auch rechts, sodass die Befunde zu einer beidseitigen Pyramidenbahnschädigung passten.

Bei den beiden Testungen, die nach Beginn der Alemtuzumabtherapie durchgeführt wurden, kam es zu keiner wesentlichen Befundänderung hinsichtlich des visuell evozierten Potentials. Die P100-Latenz lag rechts bei 136 ms beziehungsweise 131

ms und links beide Male bei 129 ms. Allerdings kam es nach dem ersten Zyklus der Alemtuzumab-Applikation zu einer Änderung der Befunde der transkraniellen Magnetstimulation. 199 Tage nach Beginn des ersten Infusionszyklus fehlte die kortikale Reizantwort zwar weiterhin bei Ableitung über dem linken M. tibialis anterior, während sie aber über dem rechten M. tibialis anterior nun regelrecht abgeleitet werden konnte. Diese Ergebnisse deuteten auf eine Läsion der Pyramidenbahn lediglich auf der Seite zum linken Bein hin. Die Befunde verbesserten sich nochmal bis zur Testung an Tag 372 nach Beginn der Alemtuzumab-Therapie. Die Reizantwort über dem rechten M. tibialis anterior war nach kortikaler Stimulation erneut regelrecht ableitbar. Außerdem war dieses Mal eine kortikale Reizantwort mit Verzögerung auch über dem linken M. tibialis anterior ableitbar.

#### 5.10.4 Patient 04

Patient 04 wurde ebenfalls wenige Wochen vor dem ersten Infusionszyklus neurophysiologisch untersucht. Ein visueller Reiz wurde auch hier mittels kontrastalternierenden Schachbrettmusters gesetzt. Dabei ergab sich passend zu einer abgelaufenen Optikusläsion auf der rechten Seite eine geringfügig vergrößerte P100-Latenz mit 121 ms. Auf der linken Seite war die P100-Latenz mit 113 ms unauffällig. Die Reizantworten auf kortikale Magnetstimulation waren beidseits regelrecht.

Nach Beginn der Alemtuzumabtherapie folgten bei diesem Patienten drei weitere neurophysiologische Untersuchungen, wobei sich zu all diesen Messzeitpunkten ein Normalbefund in der transkraniellen Magnetstimulation ergab. Beim visuell evozierten Potential wurden an Tag 367 und Tag 570 normale P100-Latenzen gemessen, jedoch war diese bei der dritten Untersuchung rechts mit 137 ms wieder deutlich vergrößert und stellte somit einen Hinweis auf eine neue Läsion der Sehbahn dar. Außerdem kam es im Beobachtungszeitraum im Vergleich zum Ursprungswert zu einer zunehmenden Visusminderung auf der rechten Seite auf bis zu 0,3.

## 6 Diskussion

### 6.1 Depletion

#### 6.1.1 Aktionsmechanismen der Depletion

Alemtuzumab wirkt als Antikörper gegen das Oberflächenmolekül CD52. Dabei handelt es sich um ein Glykosylphosphatidylinositol gebundenes Glykoprotein (Xia et al. 1993). Es wird unter anderem auf B- und T-Lymphozyten sowie auf Monozyten und

dendritischen Zellen exprimiert (Rao et al. 2012). Für die kurzfristigen Effekte von Alemtuzumab wird unter anderem die nahezu komplette Depletion von T-Lymphozyten (Zhang et al. 2013) und B-Lymphozyten (Thompson et al. 2010) verantwortlich gemacht, die hier bei exemplarischer Untersuchung einer Blutprobe von Patient 01 wenige Tage nach intravenöser Applikation von Alemtuzumab nachgewiesen wurde. Die genauen Mechanismen der alemtuzumabinduzierten Zelldepletion sind noch nicht vollständig geklärt. In Diskussion stehen unter anderem eine komplementabhängige Zytolyse, eine antikörperabhängige zelluläre Toxizität und eine direkte Zytotoxizität. In einer in vitro Studie, in welcher der Einfluss von Alemtuzumab auf entartete Zellen bei chronisch lymphatischer Leukämie untersucht wurde, zeigte sich nur ein kleiner Einfluss einer direkten Zytotoxizität, jedoch eine signifikante Depletion der Zellen in Anwesenheit von menschlichem Serum, was den Mechanismus der komplementabhängigen Zytolyse in den Vordergrund stellte (Zent et al. 2008). Allerdings war in einem Experiment, bei dem transgene Mäuse mit Expression von humanem CD52 mit Alemtuzumab behandelt wurden, die Depletion zwar abhängig von der Anwesenheit neutrophiler Granulozyten und NK-Zellen, nicht aber von einer Funktionsfähigkeit der Komplementfaktoren. Dieses Ergebnis deutet auf einen größeren Einfluss der antikörperabhängigen zellulären Zytotoxizität in vivo hin (Hu et al. 2009). Aber auch eine Induktion der Apoptose und ein Zelltod durch Quervernetzung CD52-haltiger sogenannter Lipid Rafts könnte die depletierende Eigenschaft von Alemtuzumab vermitteln (Mone et al. 2006). Welcher der genannten Mechanismen bei der Depletion von Lymphozyten im Menschen die größte Bedeutung hat, ist noch nicht geklärt. Dabei besteht auch die Möglichkeit, dass die Depletion verschiedener Zellarten auf unterschiedliche Weise erfolgt. Bei einer in vitro Behandlung von Zellen gesunder Freiwilliger zeigte sich beispielsweise, dass die Elimination von CD4+ T-Lymphozyten vorwiegend komplementabhängig erfolgt, während bei den CD8+ T-Lymphozyten der komplementunabhängige Zelltod von größerer Bedeutung ist (Lowenstein et al. 2006).

#### 6.1.2 Mögliche Korrelation zwischen CD52-Expression und Ausmaß der Depletion

Wenige Tage nach Beginn der Therapie kam es bei Patient 01 zu einer starken Veränderung der Zellfraktionen im Lymphozytenpool. Der Anteil der T- und B-Lymphozyten war deutlich geschrumpft, während die NK-Zellen die deutliche Mehrheit im Lymphozytenpool einnahmen. Eine ähnliche Veränderung in der Verteilung von Zellspezifitäten im Lymphozytenpool wurde auch in einem Modell mit transgenen

Mäusen, welche humanes CD52 exprimierten, gefunden. Dort kam es durch Alemtuzumab bei einer Dosierung von 1mg/kg Körpergewicht zu einer nahezu kompletten Depletion von B- und T-Lymphozyten im Blut, während reife NK-Zellen nicht so sehr beeinträchtigt waren (Hu et al. 2009).

Für die Veränderung der Zellanteile könnte unter anderem eine unterschiedliche CD52-Expression verantwortlich sein, die für die Anfälligkeit gegenüber einer alemtuzumabinduzierten Depletion wesentlich ist. Denn die CD4+ T-Lymphozyten, deren CD52-Expression diejenige der CD8+ T-Lymphozyten bei weitem übertrifft (Lowenstein et al. 2006), waren in ihrem Anteil stärker reduziert, obwohl sie mit einem Normbereich von 55% bis 83% vorher die größte Zellfraktion darstellten. Des Weiteren wurden die B-Lymphozyten, welche eine hohe CD52-Expression aufweisen (Klabusay et al. 2007; Rao et al. 2012), durch Alemtuzumab sowohl in ihrer absoluten Zahl als auch in ihrem Anteil deutlich reduziert. Dagegen stellten die NK-Zellen, welche die geringste CD52-Expression unter den lymphatischen PBMCs aufweisen (Rao et al. 2012), an Tag 7 nach Beginn der Alemtuzumabtherapie mit 94% die überwiegende Mehrheit der Lymphozyten dar, auch wenn sie in ihrer absoluten Anzahl ebenfalls reduziert waren. Eine gewisse Korrelation zwischen der Expression von CD52 und dem Ausmaß der alemtuzumabinduzierten Zelldepletion wurde schon öfter festgestellt. Lowenstein et al. beispielsweise wiesen diese für CD4+/CD25+ T-Lymphozyten, CD4+/CD25- T-Lymphozyten und CD8+ T-Lymphozyten in vitro nach (Lowenstein et al. 2006), aber auch für B- und T-Lymphozyten, NK-Zellen und plasmazytotische dendritische Zellen besteht eine solche Korrelation (Rao et al. 2012).

### 6.1.3 Geringere Beeinträchtigung von Zellen des angeborenen Immunsystems

Trotz nahezu vollständiger Depletion der Lymphozyten im peripheren Blut, die sich bei MS-Patienten durch die Alemtuzumab-Therapie innerhalb weniger Tage entwickelt, blieb die Zahl an Infektionen in großen Studien mit einer Beobachtungszeit von mehreren Jahren deutlich geringer als erwartet (Coles et al. 2012b), was auf eine weiterhin bestehende Funktionalität des Immunsystems hindeutet. Dafür könnte eine zumindest teilweise Resistenz des angeborenen Immunsystems gegenüber der Depletion verantwortlich sein. In einem Maus-Modell zeigte sich beispielsweise ein nur geringer Einfluss von Alemtuzumab auf die Zellen des angeborenen Immunsystems (Turner et al. 2013). Neutrophile können zwar auch in ihrer Zahl reduziert werden, eine Neutropenie wurde dann aber meist nur als mild eingestuft (Baker et al. 2017).

Bei der Untersuchung des Differentialblutbildes der fünf Patienten dieser Studie fiel tatsächlich auf, dass die Lymphozyten stärker durch Alemtuzumab depletiert wurden und in der Folge am längsten in ihrer Zahl reduziert blieben, während die Zellen des angeborenen Immunsystems nicht in gleichem Ausmaß beeinträchtigt schienen. Doch auch innerhalb des Zellrepertoires des angeborenen Immunsystems ergaben sich Unterschiede. Denn Monozyten und eosinophile Granulozyten waren zunächst in ihrer Anzahl reduziert, während die Zahl der neutrophilen Granulozyten in den ersten Tagen nach Beginn der Therapie sogar deutlich erhöht war.

Die variierende Suszeptibilität gegenüber einer alemtuzumabinduzierten Depletion könnte auch innerhalb des angeborenen Immunsystems zum Teil durch unterschiedliche CD52-Expression erklärt werden, denn eosinophile Granulozyten beispielsweise zeigen eine signifikante und homogene CD52-Expression auf ihrer Oberfläche, während neutrophile Granulozyten dieses Molekül nicht exprimieren (Elsner et al. 1996) und somit möglicherweise eine natürliche Resistenz gegenüber Alemtuzumab aufweisen. Dass die Neutrophilen in ihrer Anzahl nicht auf gleichem Niveau blieben, sondern sich sogar deutlich vermehrten, muss nicht unbedingt durch Alemtuzumab bedingt sind, sondern ist möglicherweise auf die gleichzeitige Applikation von Glukokortikoiden zurückzuführen, die der Reduktion von infusionsassoziierten Nebenwirkungen diene. Die Monozyten, deren Anzahl sich infolge der Behandlung verkleinerte, weisen eine hohe CD52-Expression (Rao et al. 2012) auf. Ihre Depletion erfolgte allerdings nicht in gleichem Ausmaß wie die der Lymphozyten. Der Grund dafür könnte in einer höheren Expression an komplementbindenden Proteinen zu finden sein, welche vor der komplementabhängigen Zytolyse schützen (Rao et al. 2012) und somit manchen Monozyten trotz CD52-Expression ein Überleben ermöglichen. Als weiterer Grund für die relativ geringe Beeinträchtigung der Monozyten durch Alemtuzumab wird auch eine vergleichsweise schnelle Rekonstruktion diskutiert, denn bei Patienten mit rheumatoider Arthritis zeigte sich nach Alemtuzumab zunächst eine komplette Depletion der Monozyten, aber eine komplette Erholung ihrer Anzahl schon nach 60 Tagen (Brett et al. 1996). Jedoch konnten bei unserem Patienten auch keine basophilen Granulozyten nachgewiesen werden, obwohl diese nur geringe Mengen an CD52 exprimieren und deswegen nicht allzu anfällig für eine Depletion sein dürften. Da Basophile jedoch von Natur aus nur in geringen Konzentrationen im peripheren

Blut zu finden sind, könnte der fehlende Nachweis auch in einer lediglich geringen Abweichung ihrer Anzahl nach unten begründet sein.

#### 6.1.4 Geringere Depletion in lymphatischen Organen

Wie bereits erwähnt, war die Infektionsrate bei MS-Patienten nach der Therapie mit Alemtuzumab trotz der nahezu kompletten Depletion von Lymphozyten im Blut nicht so hoch wie erwartet. Neben einer gewissen Resistenz der angeborenen Immunabwehr könnte hierfür auch von Bedeutung sein, dass die Konzentration der Lymphozyten im Blut nicht unbedingt den Zustand im gesamten Organismus widerspiegelt und möglicherweise Lymphozyten in anderen Geweben bestehen bleiben. In transgenen Mäusen, welche humanes CD52 exprimieren, beispielsweise wurden nach der Applikation von Alemtuzumab Lymphozyten in den lymphatischen Organen noch in signifikantem Ausmaß nachgewiesen, während sie im peripheren Blut nahezu komplett depletiert waren (Turner et al. 2013). Dass ein Überleben von Lymphozyten außerhalb der Blutbahn auch beim Menschen möglich ist, zeigt das Ergebnis einer Untersuchung der Synovia von zwei Patienten mit rheumatoider Arthritis (RA), die nach einer Alemtuzumab-Behandlung eine Synovialitis entwickelten. Hier wurden T-Lymphozyten in signifikantem Ausmaß nachgewiesen, obwohl sie zu diesem Zeitpunkt im peripheren Blut nahezu komplett depletiert waren (Ruderman et al. 1995). Das Ausbleiben der Depletion außerhalb der Blutbahn könnte einerseits durch eine reduzierte Penetranz und somit geringere Wirkung von Alemtuzumab an dieser Stelle erklärt werden, oder dadurch, dass Mechanismen, welche die Wirkung von Alemtuzumab vermitteln, in diesen Organen nicht greifen (Hu et al. 2009). Aber auch eine abweichende Expression von CD52 von Zellen außerhalb der Blutbahn könnte von Bedeutung sein, wie es beispielsweise für dendritische Zellen nachgewiesen wurde (Buggins et al. 2002).

#### 6.2 Rekonstruktion der B- und T-Lymphozyten

Wie im vorherigen Kapitel beschrieben, entfaltet die alemtuzumabinduzierte Depletion ihr größtes Ausmaß unter den B- und T-Lymphozyten des peripheren Blutes, während Zellen des angeborenen Immunsystems sowie Zellen der lymphatischen Organe weniger beeinträchtigt scheinen. Hämatopoetische Stammzellen bleiben durch Alemtuzumab unbeeinträchtigt (Gilleece and Dexter 1993) und ermöglichen somit eine Rekonstruktion der depletierten B- und T-Lymphozyten, wobei die Rekonstruktion im zeitlichen Verlauf bei den Zellspezifitäten variiert. Durch die unterschiedlichen



Rekonstruktionsmuster kommt es zu langfristigen Veränderungen im Lymphozytenpool, welche für die länger andauernde Unterdrückung der Krankheitsaktivität verantwortlich sein könnten. Diese werden im Folgenden genauer erläutert.

#### 6.2.1 Rekonstruktion der B-Lymphozyten

Auch wenn an Tag 7 bei Patient 01 keine B-Zellen nachweisbar waren, erreichte die mediane Anzahl der B-Zellen im Zeitraum Tag 70 bis 110 bereits wieder 60% des geschätzten Ursprungswerts. In der folgenden Zeit erhöhte sie sich weiter und ein Jahr nach der Depletion war die geschätzte ursprüngliche mediane Anzahl von 278 pro Mikroliter sogar überschritten (**Abbildung 6**). Eine schnelle Erholung der B-Zellzahl wurde auch in einer größeren Studie festgestellt, wo die B-Zellzahl allerdings schon nach drei Monaten wieder den Ursprungwert erreichte und zwölf Monate nach der Depletion sogar auf 165% erhöht war (Thompson et al. 2010). Auch bei RA-Patienten erholten sich die B-Lymphozyten nach Alemtuzumab zwar langsamer als NK-Zellen und Monozyten, jedoch schneller als die T-Lymphozyten. Hier erreichten sie ihren Ursprungswert innerhalb von 150 Tagen (Brett et al. 1996). Thompson et al. wiesen auch eine Veränderung innerhalb des B-Lymphozytenpools nach. Die unreifen naiven B-Zellen mit einem CD19+/CD123-/CD127- Phänotyp dominierten dabei einen Monat nach der Depletion, auch wenn ihre absolute Zahl in dieser Zeit im Vergleich zum Ursprungswert nicht signifikant verändert war. Ab Monat 3 dominierten dann die reifen naiven B-Lymphozyten (CD19+/CD123+/CD127-) den B-Zellpool. Für ihren Anstieg könnte auch eine Erhöhung des aktivierenden Faktors für B-Zellen (BAFF) von Bedeutung sein. Die Rekonstruktion der B-Gedächtniszellen (CD19+/CD123+/CD127+) dagegen dauerte länger. Deren absolute Anzahl erreichte auch zwölf Monate nach der Depletion nur 25% ihres Ursprungswertes (Thompson et al. 2010).

Die Entwicklung der B-Zellen wurde in dieser Arbeit auch im Jahr nach der zweiten Infusionsfolge verfolgt. In dieser Zeit erhöhte sich die mediane B-Zellzahl erneut. Wie sich die B-Zellzahl in den folgenden Jahren veränderte, wurde hier nicht untersucht, laut einer Studie bei RA-Patienten allerdings scheint sie sich im Lauf von mehreren Jahren wieder zu normalisieren. Dort ergaben sich nämlich zwölf Jahre nach Alemtuzumab altersbezogen normale Werte sowohl für die Gesamtzahl der B-Lymphozyten als auch für die Anzahl der naiven und der Gedächtnis-B-Zellen.

Lediglich die CD5+ B-Zellen blieben bis zu diesem Zeitpunkt signifikant reduziert (Anderson et al. 2012).

### 6.2.2 Rekonstruktion der T-Lymphozyten

Die T-Zellen brauchten deutlich länger als die B-Zellen für ihre Rekonstruktion. Diese im Vergleich zu den B-Zellen deutlich verzögerte Rekonstruktion, welche auch bei MS-Patienten bereits bekannt ist (Zhang et al. 2013), könnte u.a. dadurch beeinflusst sein, dass Thymozyten, welche für die Rekonstruktion der T-Lymphozyten verantwortlich sind, durch Alemtuzumab mehr beeinträchtigt werden, als Vorläuferzellen der B-Lymphozyten im Knochenmark (Hu et al. 2009). Bei Betrachtung der Subgruppen fiel auf, dass sich die CD8+ T-Lymphozyten in ihrer Anzahl schneller dem Normwert annäherten als die CD4+ T-Lymphozyten, welche unter den Lymphozyten also am längsten reduziert blieben. Die Rekonstruktion dieser beiden Unterarten wird hier getrennt genauer betrachtet.

#### 6.2.2.1 CD8+ T-Lymphozyten

Die CD8+ T-Lymphozyten erreichten in ihrer medianen Anzahl im Zeitraum Tag 70 bis 110 ca. 39% ihres geschätzten Ursprungswertes. Ein Jahr nach der ersten Applikation hat diese den geschätzten Ausgangswert geringfügig überschritten. Bei Patienten der CARE-MS II Studie war die absolute Anzahl der CD8+ T-Lymphozyten über 12 Monate hinweg reduziert, während ihr Anteil unter den Lymphozyten bereits nach 3 Monaten wieder normale Werte annahm (Zhang et al. 2013). Auch bei RA-Patienten stieg die Zahl der CD8+ T-Lymphozyten schneller an als die der CD4+ T-Lymphozyten. Dort erreichte sie innerhalb von 30 Tagen 25% und innerhalb von 66 Tagen 50% ihres Ursprungswertes, zeigte dann aber keinen weiteren Anstieg bis zu Tag 500 (Brett et al. 1996). Bei anderen Patienten mit RA wurde auch die langfristige Wirkung von Alemtuzumab auf die Zahl der CD8+ T-Lymphozyten untersucht. Dabei ergab sich 12 Jahre nach der Therapie ein altersentsprechender Normwert, allerdings bei einer veränderten Verteilung von Subgruppen mit reduzierter Zahl an naiven und zentralen Gedächtniszellen neben normalen Zahlen für Effektor Gedächtniszellen (Anderson et al. 2012).

#### 6.2.2.2 CD4+ T-Lymphozyten

Die Depletion der CD4+ T-Lymphozyten war am auffälligsten im Gesamtpool der Lymphozyten. Eine verzögerte Rekonstruktion der CD4+ T-Lymphozyten wurde bereits in einigen anderen Studien festgestellt. Bei Patienten der CARE-MS II Studie

blieb die absolute Anzahl der CD4+ T-Lymphozyten über 12 Monate hinweg signifikant reduziert (Zhang et al. 2013). Außerdem zeigten langfristige Beobachtungen des Immunzellrepertoires von Patienten mit chronisch progredienter MS auf, dass die mediane Rekonstruktionszeit der CD4+ T-Lymphozyten nach Alemtuzumab 35 Monate betrug und im Zeitraum von 12 Jahren nur 21% der Patienten in ihrer CD4+ Zellzahl wieder den Ursprungswert erreichten (Hill-Cawthorne et al. 2012).

Das Zurückbleiben der CD4+ T-Lymphozyten in der Rekonstruktion nach Alemtuzumab scheint dabei nicht spezifisch für die MS zu sein, denn auch bei RA-Patienten waren mehrere Jahre nach der Applikation von Alemtuzumab die CD4+ T-Lymphozyten noch reduziert, während die Anzahl der CD8+ T-Lymphozyten und der B-Lymphozyten wieder im Normbereich lag (Anderson et al. 2012) und auch bei Patienten mit Nierentransplantation kam es nach Alemtuzumab zu einer Reduktion des CD4/CD8-Quotienten (Macedo et al. 2012). Dennoch scheint die lang andauernde Reduktion dieser Zellart für die Unterdrückung der Krankheitsaktivität bei MS maßgeblich zu sein. Genau sie werden nämlich als am bedeutsamsten in der Pathogenese der MS angesehen (Sawcer et al. 2011). Außerdem gibt es Hinweise darauf, dass eine schnellere Rekonstruktion der CD4+ T-Lymphozyten mit einem schlechteren Therapieerfolg hinsichtlich klinischer und radiologischer Parameter einhergeht (Cossburn et al. 2013).

Die immunologische Rekonstruktion der CD4+ T-Lymphozyten ist gekennzeichnet durch eine geänderte Verteilung von Untergruppen des CD4+ Zellpools. Neben einer relativen Erhöhung der TH2-Zellen kommt es zu relativen Abnahme der TH17- und TH1-Zellen (Zhang et al. 2013) und damit einhergehend zu Veränderungen im Zytokinprofil. Das vorwiegend durch TH2-Zellen produzierte IL-4 steigt an, während die Konzentrationen der durch TH17-Zellen produzierten Zytokine IL-17A, IL-17F, IL-21 und IL-22 sowie des durch TH1-Zellen produzierten IFN- $\gamma$  sinken (Zhang et al. 2013).

Auffällig während der Repopulation der CD4+ T-Lymphozyten war auch eine Verschiebung der Subtypen zugunsten von Gedächtniszellen (Zhang et al. 2013). In den Vordergrund trat dabei eine relative Zunahme von Zellen mit regulatorischem Phänotyp, wobei die Möglichkeiten einer bevorzugten Expansion oder einer gewissen Resistenz dieser Zellart gegenüber der Depletion diskutiert werden. Beispielsweise

wurde bei MS-Patienten einen Monat nach der Depletion ein Höchstwert des Anteils an CD4+CD25+CD127<sup>low</sup> regulatorischen Zellen festgestellt (Zhang et al. 2013), wobei CD4+ T-Lymphozyten mit CD25-Expression eine regulatorische Funktion zugesprochen wird (Sakaguchi et al. 2011). Außerdem war bei MS-Patienten der Anteil an CD4+CD25<sup>high</sup> T-Zellen über sechs Monate nach der Therapie signifikant erhöht (Cox et al. 2005). Die Tatsache, dass die CD4+CD25+CD127<sup>low</sup> regulatorischen Zellen an Tag 7 nahezu komplett depletiert waren und auch die CD4+CD25<sup>high</sup> Zellen in vitro durch Alemtuzumab zerstört wurden, legt die Theorie einer bevorzugten Expansion der regulatorischen T-Lymphozyten nahe. Im Gegensatz dazu zeigte sich in einem Modell mit transgenen Mäusen, dass die T-Lymphozyten mit einem CD4+CD25+FoxP3+ Phänotyp 72 Stunden nach der Applikation von Alemtuzumab noch zu einem höherem Prozentsatz im Blut vorhanden waren als CD4+ T-Lymphozyten gesamt (Hu et al. 2009), was wiederum auf eine geringere Suszeptibilität gegenüber der Depletion hindeutet.

Ein Anstieg des Anteils der Zellen mit regulatorischem Phänotyp könnte für die langfristige Reduktion der Krankheitsaktivität von großer Bedeutung sein, da diese die Möglichkeit haben, autoreaktive Mechanismen zu unterdrücken (Sakaguchi et al. 2011). Dass die verbleibenden Lymphozyten auch funktionelle Charakteristika von regulatorischen Zellen haben, wurde in vitro gezeigt. Dort zeigten sie sowohl eine geringere Proliferation nach einer Stimulation mit allogenen dendritischen Zellen, als auch eine Suppression der Reaktivität von autologen T-Lymphozyten (Havari et al. 2014).

### 6.3 Einfluss von Alemtuzumab auf die zelluläre Reaktivität

Als Messwert für die zelluläre Reaktivität wurde in dieser Studie die Zahl der IFN- $\gamma$  sezernierenden Zellen gewählt, da IFN- $\gamma$  hauptsächlich durch TH1-Zellen produziert wird und diese von entscheidender Bedeutung in der Pathogenese der EAE und der MS zu sein scheinen (Riedhammer and Weissert 2015). Denn TH1-Zellen scheinen auch unabhängig von TH17-Zellen pathogen zu wirken und werden für die Initiierung der Entzündungsreaktion verantwortlich gemacht (O'Connor et al. 2008). Ein weiterer Hinweis für eine pathogene Funktion der TH1-Zellen ergab sich aus den Erkenntnissen, dass eine Behandlung mit IFN- $\gamma$  zur Exazerbation der Erkrankung führt (Panitch et al. 1987). Nach der Behandlung mit Alemtuzumab zeigte sich ein Rückgang der Zahl IFN- $\gamma$  sezernierender Zellen in Anwesenheit unterschiedlicher Peptide, wobei

Signifikanztests aufgrund der kleinen Datenmenge nicht zu jedem einzelnen Peptid durchgeführt wurden. Dennoch war in den Abbildungen ein Rückgang der Zahl IFN- $\gamma$  sezernierender Zellen zu erkennen. Dieser blieb auch bestehen, als die Zahl der IFN- $\gamma$  sezernierenden Zellen in Relation zu den anwesenden CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten dargestellt wurde. Er lässt sich also nicht allein durch den Rückgang des Anteils der CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten erklären, sondern könnte auch auf mögliche funktionelle Veränderungen der Zellen durch Alemtuzumab hindeuten. Hinweise auf eine gesunkene zelluläre Reaktivität nach Alemtuzumab liefert auch das Ergebnis einer Untersuchung der T-Lymphozyten von RA-Patienten, welche mit Alemtuzumab behandelt worden waren, denn hier wurde eine zumindest vorübergehend reduzierte Proliferation während einer Stimulation mit Anti-CD3 festgestellt (Brett et al. 1996). Dass die Zellen durch Alemtuzumab grundsätzlich in ihrer Aktivität beeinträchtigt sind, ist hier jedoch keineswegs bewiesen und die Ergebnisse anderer Studien deuten eher auf eine gleichbleibende Funktionalität der Zellen hin. In einem Modell mit transgenen Mäusen wurde beispielsweise gezeigt, dass durch Alemtuzumab weder die zytolytische Aktivität von NK-Zellen ex vivo noch die Fähigkeit der Makrophagen zur Phagozytose in vivo noch die Antikörperproduktion der B-Lymphozyten auf ein T-unabhängiges Antigen signifikant beeinträchtigt sind (Turner et al. 2013). In der gleichen Studie ergaben sich auch Hinweise auf eine gleichbleibende Aktivität der T-Lymphozyten. Denn im Gegensatz zu den Ergebnissen von Brett et al. zeigten die T-Zellen hier bei Stimulation mit Anti-CD3 eine normale Proliferation und Zytokinproduktion (Turner et al. 2013). Des Weiteren war ihre primäre Reaktion nach einer Immunisierung mit dem Adenovirusvektor Ad2 nicht signifikant eingeschränkt (Turner et al. 2013). Die Antwort auf Neoantigene und bekannte Antigene wurde bereits auch in vivo untersucht. Dabei lag die Antikörperproduktion bei RA-Patienten 12 Jahre nach einer Alemtuzumabtherapie in dem für die Altersklasse normalen Bereich. Demnach wären Impfungen bei alemtuzumabbehandelten Patienten sicher und würden trotz Lymphopenie Reaktionen induzieren, die über dem Mindestniveau für einen sicheren Schutz liegen (Anderson et al. 2012).

Die gesunkene Zahl IFN- $\gamma$  sezernierender Zellen, die in den ELISpot-Assays festgestellt wurde, könnte auch durch eine Verminderung des Anteils der IFN- $\gamma$  sezernierenden TH1-Zellen im CD4<sup>+</sup> T-Lymphozytenpool bedingt sein, welche bereits in MS-Patienten nachgewiesen wurde (Cox et al. 2005; Zhang et al. 2013). Zhang et

al. zeigten auch, dass der Rückgang der TH1-Zellen mit einer reduzierten Konzentration von IFN- $\gamma$  im Serum einherging (Zhang et al. 2013) und in einem Maus-Modell wurde gezeigt, dass nach Alemtuzumab die IFN- $\gamma$  Produktion pro TH1-Zelle durch Alemtuzumab nicht signifikant verändert wurde (Turner et al. 2013).

#### 6.4 Bedeutung der als Stimuli verwendeten Peptide

Die zelluläre Reaktivität wurde in Anwesenheit unterschiedlicher Stimuli gemessen. Dabei waren die als Ligandompeptide bezeichneten Peptide 1 bis 11 Antigene, die aus dem Gehirn von MS-Patienten eluiert worden waren (Fissolo et al. 2009). Sie waren dort auf MHC-Molekülen präsentiert worden und stellen möglicherweise Antigene dar, auf die autoreaktive Zellen bei MS-Patienten sensibilisiert sind. Peptide 12 und 13 wurden als Kontrollpeptide ausgewählt. Dabei handelt es sich um Peptide des Tetanustoxin und des JC-Virus. Die Ligandompeptide und ihre Sequenzen sind in **Tabelle 6** aufgelistet, die Kontrollpeptide in **Tabelle 7**.

Nummer	Name /Ursprung des Peptids	Sequenz	HLA-Typ und Krankheit des Gehirnautopsiespenders / der Gehirnautopsiespender
1	Survivin	RAIEQLAMM	DRB1*1501 (PPMS)
2	Saures Gliafaserprotein (GFAP)389-400	IRETSLDTKSVS	DRB1*1501 (SPMS)
3	Glutamatdehydrogenase	KVYNEAGVTFT	DRB1*1501 (SPMS)
4	Glutaminsynthetase	LNETGDEPFQYKN	DRB1*1501 (SPMS), DRB1*0101 (SPMS), DRB1*0301 (2 Patienten mit SPMS, ein anderer Patient mit MS)
5	Neurofilament-3 (Medium Polypeptid)	IIEETKVEDEK	DRB1*1501 (SPMS), DRB1*1301 (SPMS)
6	Alpha-Synuklein	YEMPSEEGYQD	DRB1*0101 (SPMS)
7	Aktin	WISKQEYDESGPSIVHRK	DRB1*1501 (2 Patienten mit SPMS), DRB1*0101 (SPMS and ein anderer Patient mit MS), DRB1*0301 (2 Patienten mit SPMS)
8	MBP10-27	RHGSKYLATASTMDHARH	DRB1*1501 (SPMS)
9	MBP84-94	DENPVVHFFKN	DRB1*1501 (SPMS) DRB1*0401 (SPMS)
10	MBP139-153	HKGFKGVDAQGTLN	DRB1*1501 (SPMS)
11	MBP95-110	IVTPRTPPPSQGKGRG	DRB1*1501 (SPMS)

*Tabelle 6: Überblick über die getesteten Peptide, die aus dem Gehirn von MS-Patienten eluiert wurden, und ihre Sequenzen (Fissolo et al. 2009).*

Nummer	Name /Ursprung des Peptids	Sequenz	Referenz
12	Tetanustoxin (tt830-844)	QYIKANSKFIGITEL	(Panina-Bordignon et al. 1989)
13	JC-Virus (VP1 34-48)	VDSITEVECFLTPEM	(Aly et al. 2011)

*Tabelle 7: Überblick über die verwendeten Kontrollpeptide.*

Die in der Arbeit verwendeten Ligandompeptide stehen in der Diskussion, potenzielle Angriffsziele autoreaktiver T-Zellen bei MS-Patienten darzustellen. Im Zentrum der Forschung stand dabei lange das MBP (Sospedra and Martin 2005). MBP-spezifische T-Zellen wurden zwar auch bei nicht betroffenen Kontrollpersonen nachgewiesen (Riedhammer and Weissert 2015), doch die Zahl an MBP-spezifischen T-Zellen im Blut und Liquor ist bei MS-Patienten höher (Martin et al. 1992) und der Anteil der T-Zellen, die in Anwesenheit von MBP mit einer IFN- $\gamma$ -Synthese reagierten, war bei MS-Patienten ebenfalls signifikant höher (Riedhammer and Weissert 2015). Welches Epitop des MBP dabei von autoreaktiven Zellen erkannt wird, ist bislang nicht eindeutig geklärt, möglicherweise sind auch in Abhängigkeit des HLA-Status unterschiedliche Sequenzabschnitte dafür verantwortlich (Muraro et al. 1997).

In der vorliegenden Arbeit wurden vier Epitope des MBP als Ligandompeptide verwendet. Sie sind als Peptide 8 bis 11 aufgelistet: MBP(10-27), MBP(84-94), MBP(95-110) und MBP(139-153). MBP(84-94), das als Peptid 9 eingesetzt wurde, entspricht in seiner Sequenz zum großen Teil dem Epitop MBP(85-99), das mithilfe eines monoklonalen Antikörpers in MS-Läsionen DR2-gebunden nachgewiesen wurde (Krogsgaard et al. 2000). Außerdem zeigen MBP(84-94) und MBP(95-110), welches als Peptid 11 untersucht wurde, Übereinstimmungen mit MBP(84-102) sowie MBP(87-106), für die Hinweise auf eine funktionelle Bedeutung in der Pathogenese der MS existieren. Denn verschiedene Epitope des MBP(87-106), jeweils mit der Kernsequenz MBP(89-99), wurden im Kontext mit vier verschiedenen MS-assoziierten HLA-DR Molekülen erkannt (Martin et al. 1991) und auch MBP(84-102) bindet mit hoher Affinität an das DRB1\*1501 Molekül des krankheitsassoziierten DR2 Haplotyps und scheint mit diesem einen immunogenen Komplex zu bilden (Wucherpfennig et al. 1994). Transgene Mäuse, die positiv für HLA-DR1\*1501 waren, entwickelten außerdem nach der Administration eines MBP(84-102)-spezifischen T-Zell-Klons spontan EAE mit neurologischen Symptomen, die dem Krankheitsverlauf der MS ähnelten (Madsen et al. 1999) und T-Zelllinien von MS-Patienten scheinen in größerem Ausmaß auf MBP(84-102) zu reagieren als diejenigen gesunder Kontrollpersonen (Ota et al. 1990). Auch die anderen beiden in der Arbeit verwendeten Epitope des MBP werden als potenzielle Autoantigene bei MS diskutiert. MBP(10-27) und MBP(139-153) überlappen mit den Epitopen MBP(13-32) beziehungsweise MBP(146-170). Für diese Epitope konnten signifikante Unterschiede in der Reaktivität

von T-Zelllinien von MS-Patienten und gesunden Kontrollpersonen nachgewiesen werden (Bielekova et al. 2004).

Hinsichtlich der Reaktivität der PBMC in Form der Zahl IFN- $\gamma$  sezernierender Zellen in Anwesenheit dieser Peptide 8 bis 11 zeigte sich nach der Applikation von Alemtuzumab ein Trend nach unten, auch wenn Signifikanztests für einzelne Peptide nicht durchgeführt wurden. Die Ergebnisse geben somit weitere Hinweise darauf, dass eine Reaktivität der T-Zellen auf diese Peptide in der Pathogenese der MS von Bedeutung sein könnte und ein Rückgang der Reaktivität nach Applikation von Alemtuzumab mit verantwortlich sein könnte für die lang andauernden Therapieerfolge des Antikörpers.

Auch die Reaktivität der PBMC der fünf Patienten in Anwesenheit von Neurofilament-3, welches in der vorliegenden Arbeit als Peptid 5 eingesetzt wurde, schien durch Alemtuzumab reduziert zu werden. Dieser Mechanismus könnte möglicherweise ebenfalls für die Verminderung der Krankheitsaktivität durch Alemtuzumab bedeutsam sein. Antikörper gegen die Untereinheit Neurofilament light protein (NF-L) sind im Liquor (Silber et al. 2002) und Serum (Ehling et al. 2004) von MS-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen erhöht. Ihre Konzentration scheint sogar mit dem Ausmaß der zerebralen Atrophie zu korrelieren (Eikelenboom et al. 2003). Auch die Ergebnisse eines Maus-Modells legen nahe, dass Autoimmunität gegen NF-L neurologische Symptomatik verursachen kann (Huizinga et al. 2007). Daneben könnte auch eine Autoimmunität gegen Neurofilament medium protein (NF-M) von pathogenetischer Bedeutung sein, denn transgene Mäuse, die positiv für einen MOG-spezifischen T-Zell-Rezeptor waren, entwickelten trotz Abwesenheit von MOG neurologische Symptomatik und die autoimmune Reaktion der transgenen T-Zellen war dabei gegen NF-M gerichtet (Krishnamoorthy et al. 2009).

Auch für die übrigen Peptide, die in der Arbeit als Stimuli für die PBMC verwendet wurden, existieren Hinweise für eine Assoziation mit MS. Aktin gilt als Biomarker für neuronalen und axonalen Schaden (Bielekova and Martin 2004). GFAP ist wie NF-L im Liquor von MS-Patienten erhöht (Malmeström et al. 2003), während bei Alpha-Synuklein eher niedrige Spiegel im peripheren Gewebe Krankheitsaktivität anzeigen (Mejía et al. 2018). Survivin könnte als antiapoptotischer Faktor durch Behinderung der Eliminierung der pathogenen autoreaktiven Zellen mitverantwortlich sein für die



anhaltende Dauer des Entzündungsprozesses. Tatsächlich zeigten aktivierte T-Lymphozyten von Patienten mit aktiver RRMS eine signifikant höhere Expression an Survivin als aktivierte T-Lymphozyten gesunder Kontrollpersonen (Sharief and Semra 2001). Glutaminsynthetase und Glutamatdehydrogenase sind beide an der Metabolisierung des Neurotransmitters Glutamat beteiligt. Werner et al. fanden heraus, dass die beiden Enzyme in normaler weißer Substanz vorhanden sind, während sie in aktiven und auch chronischen MS-Läsionen keine Aktivität zeigen. (Werner et al. 2001). Aus ihrer fehlenden Aktivität resultiert eine gestörte Glutamathomeostase mit erhöhter Glutamatkonzentration, die laut den Ergebnissen eines Tiermodells der MS einen wichtigen Mechanismus in der autoimmun bedingten Demyelinisierung darstellt (Werner et al. 2000).

Zusammenfassend lässt sich erkennen, dass die Reaktivität der PBMC bei Stimulation durch jedes der Ligandompeptide nach Applikation von Alemtuzumab reduziert zu werden scheint. Daneben zeigt auch ihre Reaktivität bei Stimulation durch die Kontrollpeptide Tetanustoxin (tt830-844) und JC-Virus (VP1 34-48) nach Applikation von Alemtuzumab einen Trend nach unten, sodass hier keine endgültigen Rückschlüsse auf die pathogenetische Bedeutung der Ligandompeptide gezogen werden können. Die Reduktion der Reaktivität der PBMC in Anwesenheit der Ligandompeptide, für die einige Hinweise auf eine Assoziation mit der MS bestehen, könnte jedoch einen wichtigen Mechanismus für die langanhaltende Wirkung von Alemtuzumab darstellen.

#### 6.5 Veränderung der klinischen und radiologisch gemessenen Krankheitsaktivität durch Alemtuzumab und Verträglichkeit

Nach Beginn der Behandlung mit Alemtuzumab bei den fünf Patienten zwischen 2014 und 2017 blieb der klinische Zustand bei vier der Patienten stabil oder zeigte sogar eine Verbesserung. Nur Patientin 05 zeigte drei Wochen nach dem ersten Infusionszyklus erneute Schubsymptomatik, die mit Kortison behandelt werden musste. Die Behinderungsgrad blieb im Beobachtungszeitraum von 8 bis 40 Monaten stabil. Die Einschätzung auf der EDSS, die vor der Behandlung zwischen 2 und 4,5 Punkten lag, blieb in einem Fall auf dem gleichen Niveau bestehen und reduzierte sich bei den übrigen vier Patienten. Auch die radiologisch gemessene Krankheitsaktivität blieb bei den Patienten nach der Behandlung insgesamt stabil.

Bei den fünf Patienten dieser Studie wurden im Beobachtungszeitraum keine sekundären Autoimmunerkrankungen festgestellt. Der Beobachtungszeitraum der fünf Patienten dieser Studie variierte in seiner Dauer zwischen 8 und 40 Monaten, sodass ein Neuauftreten in der folgenden Zeit prinzipiell nicht ausgeschlossen werden kann.

Die Pathomechanismen der sekundären Autoimmunität sind noch nicht vollständig geklärt. Möglich ist eine Zerstörung der Selbsttoleranz während der homeostatischen Proliferation von T-Lymphozyten, welche der Depletion durch Alemtuzumab entkommen sind. Im Gegensatz zur Thymopoese entsteht bei der homeostatischen Proliferation ein T-Zell-Repertoire mit geringerer Komplexität, das chronisch aktivierte CD4+ und CD8+ T-Lymphozyten enthält (Jones et al. 2013). Aber auch B-Lymphozyten, welche sich in der Abwesenheit von toleranzfördernden CD8+ T-Lymphozyten entwickeln, könnten in der Entstehung von sekundären Autoimmunerkrankungen von Bedeutung sein (Kutzleben et al. 2017). Auch ein Einfluss von IL-21 an der Pathogenese der sekundären Autoimmunität wird diskutiert, da sich diese bei denjenigen Patienten entwickelte, welche einen höheren T-Lymphozytenumsatz nach Alemtuzumab aufwiesen und dieser durch IL-21 vermittelt wird (Jones et al. 2009).

Da ein beträchtlicher Anteil der Patienten nach Alemtuzumab eine sekundäre Autoimmunität entwickelt, glücklicherweise die Mehrheit jedoch davon verschont bleibt, gab es Bemühungen, weitere Einflussfaktoren zu identifizieren, um das individuelle Risiko der Patienten vor der Behandlung besser einschätzen zu können. Einen möglichen Hinweis könnte die IL-21-Konzentration im Serum vor Beginn der Behandlung liefern, denn bei den Patienten, die später eine Autoimmunität entwickelten, war diese vor Beginn der Therapie mehr als doppelt so hoch wie bei denjenigen Patienten, die später keine Autoimmunität entwickelten. Eine Konzentration oberhalb einer willkürlichen Grenze von 210pg/ml konnte eine Autoimmunität immerhin mit einem positiven prädiktiven Wert von 70% und einem negativen prädiktiven Wert von 62% vorhersagen (Jones et al. 2009). Des Weiteren scheint das Risiko für die Entwicklung einer sekundären Autoimmunität nach Alemtuzumab durch eine positive Familienanamnese für Autoimmunerkrankungen und eine positive Raucheranamnese erhöht zu sein (Cossburn et al. 2011).

## 6.6 Veränderung neurophysiologischer Parameter durch Alemtuzumab

Der Einfluss von Alemtuzumab auf die kognitive Funktion war 2017 untersucht worden. Dabei ergaben sich Hinweise auf eine allgemein stabilisierende Wirkung des Antikörpers und eine Verbesserung der Geschwindigkeit zur Verarbeitung von Informationen (Riepl et al. 2017). In dieser Studie wurden nach Beginn der Alemtuzumab-Therapie bei vier der fünf Patienten insgesamt zwölf neurophysiologische Untersuchungen durchgeführt. Besonderes Augenmerk wurde auf die Veränderung des visuell evozierten Potentials und der Reizantwort auf transkranielle Magnetstimulation gelegt. Insgesamt deuten auch hier die Ergebnisse auf eine stabilisierende Wirkung hin, wobei aufgrund der kleinen Datenmenge auf eine statistische Auswertung verzichtet wurde. Stattdessen erfolgte eine Beschreibung der Entwicklung der Befunde bei jedem Patienten. Während sich bei Patient 01 zu allen Messzeitpunkten Normalbefunde ergaben, zeigten sich bei Patient 02 Hinweise auf eine abgelaufene Optikusläsion und Pyramidenbahnschädigung. Bei Patient 03 und 04 erfolgten neurophysiologische Untersuchungen kurz vor Beginn der Alemtuzumab-Therapie, welche zu Vergleichszwecken herangezogen wurden. Dabei war bei Patient 03 nach Beginn der Behandlung eine Verbesserung zu erkennen, da die zuvor beidseitig vorliegende Pyramidenbahnläsion später auf eine Seite beschränkt war. Bei Patient 04 zeigte das visuell evozierte Potential rechts vor Beginn der Behandlung einen geringgradig pathologischen Befund. Nach einer vorübergehenden Stabilisierung während der ersten zwei Jahre nach Alemtuzumab kam es hier allerdings zu einer erneuten Verschlechterung, die mit einer Visusminderung einherging.

## 6.7 Zusammenfassung

Alemtuzumab als erst seit wenigen Jahren für die Behandlung der MS zugelassenes Medikament zeigt sich vielversprechend in der Reduktion der Krankheitsaktivität sowohl hinsichtlich klinischer als auch radiologischer oder neurophysiologischer Parameter. Seine Wirkung entfaltet der Antikörper vor allem über die Depletion von B- und T-Lymphozyten, welche sich in der darauffolgenden Zeit unterschiedlich schnell reorganisieren. Die genauen Mechanismen, über die Alemtuzumab die Krankheitsaktivität reduziert, sind allerdings noch nicht geklärt. In dieser Arbeit wurde sowohl die Veränderung des Immunzellrepertoires als auch die Veränderung der zellulären Reaktivität nach einer Alemtuzumab-Behandlung bei fünf Patienten mit schubförmig verlaufender MS untersucht, um weitere Informationen über die

Aktionsmechanismen des monoklonalen Antikörpers zu gewinnen. Während des Zeitraums der Probensammlung für die experimentellen Versuche erfolgte außerdem eine Beobachtung des klinischen Verlaufs, der radiologisch gemessenen Krankheitsaktivität sowie der Befunde der Neurophysiologie. Als Stimuli für die isolierten PBMC wurden hier verschiedene Peptide verwendet, die aus dem Gehirn von verstorbenen MS-Patienten eluiert worden waren und für die einige Hinweise auf eine Assoziation mit der MS existieren. Eine Reduktion der Reaktivität in Form der Zahl IFN- $\gamma$  sezernierender Zellen wurde in Anwesenheit jedes dieser Peptide festgestellt, wobei Signifikanztests für einzelne Peptide jedoch nicht durchgeführt wurden. Insgesamt kann diese Reaktivitätsminderung jedoch nicht als spezifisch für die Stimulation mit den Ligandompeptiden angesehen werden, da die Zahl IFN- $\gamma$  sezernierender Zellen auch in Anwesenheit von Kontrollpeptiden reduziert war. Die Ergebnisse dieser Studie stehen in Einklang mit der Theorie einer pathogenen Funktion der IFN- $\gamma$  produzierenden CD4+ Lymphozyten und deuten darauf hin, dass die verzögerte Rekonstruktion dieser Zellart für die langanhaltende Reduktion der Krankheitsaktivität nach Alemtuzumab von entscheidender Bedeutung ist. Weitere Studien werden nötig sein, um genauere Informationen über die Aktionsmechanismen des Antikörpers zu gewinnen und die Behandlung der MS optimieren zu können.

## References

- (2014) Alemtuzumab prescribing information: Available online:  
[http://www.Accessdata.Fda.Gov/drugsatfda\\_docs/label/2014/103948s5139lbl.Pdf](http://www.Accessdata.Fda.Gov/drugsatfda_docs/label/2014/103948s5139lbl.Pdf)
- [Der Titel "#232" kann nicht dargestellt werden – Die Vorlage "Literaturverzeichnis - Internetdokument - (Standardvorlage)" beinhaltet nur Felder, welche bei diesem Titel leer sind.]
- Aly L, Yousef S, Schipling S, Jelcic I, Breiden P, Matschke J, Schulz R, Bofill-Mas S, Jones L, Demina V, Linnebank M, Ogg G, Girones R, Weber T, Sospedra M, Martin R (2011) Central role of JC virus-specific CD4+ lymphocytes in progressive multi-focal leucoencephalopathy-immune reconstitution inflammatory syndrome. *Brain* 134:2687–2702.  
<https://doi.org/10.1093/brain/awr206>
- Anderson AE, Lorenzi AR, Pratt A, Wooldridge T, Diboll J, Hilkens CMU, Isaacs JD (2012) Immunity 12 years after alemtuzumab in RA: CD5+ B-cell depletion, thymus-dependent T-cell reconstitution and normal vaccine responses. *Rheumatology (Oxford)* 51:1397–1406.  
<https://doi.org/10.1093/rheumatology/kes038>
- Ascherio A, Munger KL (2007) Environmental risk factors for multiple sclerosis. Part II: Noninfectious factors. *Ann Neurol* 61:504–513. <https://doi.org/10.1002/ana.21141>
- Babbe H, Roers A, Waisman A, Lassmann H, Goebels N, Hohlfeld R, Friese M, Schröder R, Deckert M, Schmidt S, Ravid R, Rajewsky K (2000) Clonal expansions of CD8(+) T cells dominate the T cell infiltrate in active multiple sclerosis lesions as shown by micromanipulation and single cell polymerase chain reaction. *J Exp Med* 192:393–404
- Baker D, Giovannoni G, Schmierer K (2017) Marked neutropenia: Significant but rare in people with multiple sclerosis after alemtuzumab treatment. *Mult Scler Relat Disord* 18:181–183.  
<https://doi.org/10.1016/j.msard.2017.09.028>
- Barcellos LF, Oksenberg JR, Begovich AB, Martin ER, Schmidt S, Vittinghoff E, Goodin DS, Pelletier D, Lincoln RR, Bucher P, Swerdlin A, Pericak-Vance MA, Haines JL, Hauser SL (2003) HLA-DR2 dose effect on susceptibility to multiple sclerosis and influence on disease course. *Am J Hum Genet* 72:710–716. <https://doi.org/10.1086/367781>
- Barcellos LF, Sawcer S, Ramsay PP, Baranzini SE, Thomson G, Briggs F, Cree BCA, Begovich AB, Villoslada P, Montalban X, Uccelli A, Savettieri G, Lincoln RR, DeLoa C, Haines JL, Pericak-Vance MA, Compston A, Hauser SL, Oksenberg JR (2006) Heterogeneity at the HLA-DRB1 locus and risk for multiple sclerosis. *Hum Mol Genet* 15:2813–2824. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddl223>
- Becklund BR, Severson KS, Vang SV, DeLuca HF (2010) UV radiation suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis independent of vitamin D production. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:6418–6423. <https://doi.org/10.1073/pnas.1001119107>
- Beecham AH, Patsopoulos NA, Xifara DK, Davis MF, Kempainen A, Cotsapas C, Shah TS, Spencer C, Booth D, Goris A, Oturai A, Saarela J, Fontaine B, Hemmer B, Martin C, Zipp F, D'alfonso S, Martinelli-Boneschi F, Taylor B, Harbo HF, Kockum I, Hillert J, Olsson T, Ban M, Oksenberg JR, Hintzen R, Barcellos LF, Agliardi C, Alfredsson L, Alizadeh M, Anderson C, Andrews R, Sondergaard HB, Baker A, Band G, Baranzini SE, Barizzone N, Barrett J, Bellenguez C, Bergamaschi L, Bernardinelli L, Berthele A, Biberacher V, Binder TMC, Blackburn H, Bomfim IL, Brambilla P, Broadley S, Brochet B, Brundin L, Buck D, Butzkueven H, Caillier SJ, Camu W, Carpentier W, Cavalla P, Celius EG, Coman I, Comi G, Corrado L, Cosemans L, Courneau-Rebeix I, Cree BAC, Cusi D, Damotte V, Defer G, Delgado SR, Deloukas P, Di Sapio A, Dilthey AT, Donnelly P, Dubois B, Duddy M, Ekins S, Elovaara I, Esposito F, Evangelou N, Fiddes B, Field J, Franke A, Freeman C, Frohlich IY, Galimberti D, Gieger C, Gourraud P-A, Graetz C, Graham A, Grummel V, Guaschino C, Hadjixenofontos A, Hakonarson H, Halfpenny C, Hall G, Hall P, Hamsten A, Harley J, Harrower T, Hawkins C, Hellenthal G, Hillier C, Hobart J, Hoshi M, Hunt SE, Jagodic M, Jelcic I,

- Jochim A, Kendall B, Kermodé A, Kilpatrick T, Koivisto K, Konidari I, Korn T, Kronsbein H, Langford C, Larsson M, Lathrop M, Lebrun-Frenay C, Lechner-Scott J, Lee MH, Leone MA, Leppa V, Liberatore G, Lie BA, Lill CM, Linden M, Link J, Luessi F, Lycke J, Macchiardi F, Mannisto S, Manrique CP, Martin R, Martinelli V, Mason D, Mazibrada G, McCabe C, Mero I-L, Mescheriakova J, Moutsianas L, Myhr K-M, Nagels G, Nicholas R, Nilsson P, Piehl F, Pirinen M, Price SE, Quach H, Reunanen M, Robberecht W, Robertson NP, Rodegher M, Rog D, Salvetti M, Schnetz-Boutaud NC, Sellebjerg F, Selter RC, Schaefer C, Shaunak S, Shen L, Shields S, Siffrin V, Slee M, Sorensen PS, Sorosina M, Sospedra M, Spurkland A, Strange A, Sundqvist E, Thijs V, Thorpe J, Ticca A, Tienari P, van Duijn C, Visser EM, Vucic S, Westerlind H, Wiley JS, Wilkins A, Wilson JF, Winkelmann J, Zajicek J, Zindler E, Haines JL, Pericak-Vance MA, Ivinson AJ, Stewart G, Hafler D, Hauser SL, Compston A, McVean G, Jager P de, Sawcer SJ, McCauley JL (2013) Analysis of immune-related loci identifies 48 new susceptibility variants for multiple sclerosis. *Nat Genet* 45:1353–1360. <https://doi.org/10.1038/ng.2770>
- Berkovich R (2013) Treatment of acute relapses in multiple sclerosis. *Neurotherapeutics* 10:97–105. <https://doi.org/10.1007/s13311-012-0160-7>
- Bielekova B, Martin R (2004) Development of biomarkers in multiple sclerosis. *Brain* 127:1463–1478. <https://doi.org/10.1093/brain/awh176>
- Bielekova B, Sung M-H, Kadom N, Simon R, McFarland H, Martin R (2004) Expansion and functional relevance of high-avidity myelin-specific CD4+ T cells in multiple sclerosis. *J Immunol* 172:3893–3904
- Bloomgren G, Richman S, Hotermans C, Subramanyam M, Goelz S, Natarajan A, Lee S, Plavina T, Scanlon JV, Sandrock A, Bozic C (2012) Risk of natalizumab-associated progressive multifocal leukoencephalopathy. *N Engl J Med* 366:1870–1880. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1107829>
- Bomprezzi R (2015) Dimethyl fumarate in the treatment of relapsing-remitting multiple sclerosis: an overview. *Ther Adv Neurol Disord* 8:20–30. <https://doi.org/10.1177/1756285614564152>
- Boyko AN, Boyko OV (2018) Cladribine tablets' potential role as a key example of selective immune reconstitution therapy in multiple sclerosis. *Degener Neurol Neuromuscul Dis* 8:35–44. <https://doi.org/10.2147/DNND.S161450>
- Brett S, Baxter G, Cooper H, Johnston JM, Tite J, Rapson N (1996) Repopulation of blood lymphocyte sub-populations in rheumatoid arthritis patients treated with the depleting humanized monoclonal antibody, CAMPATH-1H. *Immunology* 88:13–19
- Browne P, Chandraratna D, Angood C, Tremlett H, Baker C, Taylor BV, Thompson AJ (2014) Atlas of Multiple Sclerosis 2013: A growing global problem with widespread inequity. *Neurology* 83:1022–1024. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000000768>
- Buggins AGS, Mufti GJ, Salisbury J, Codd J, Westwood N, Arno M, Fishlock K, Pagliuca A, Devereux S (2002) Peripheral blood but not tissue dendritic cells express CD52 and are depleted by treatment with alemtuzumab. *Blood* 100:1715–1720
- Challoner PB, Smith KT, Parker JD, MacLeod DL, Coulter SN, Rose TM, Schultz ER, Bennett JL, Garber RL, Chang M (1995) Plaque-associated expression of human herpesvirus 6 in multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:7440–7444
- Cohen JA, Coles AJ, Arnold DL, Confavreux C, Fox EJ, Hartung H-P, Havrdova E, Selmaj KW, Weiner HL, Fisher E, Brinar VV, Giovannoni G, Stojanovic M, Ertik BI, Lake SL, Margolin DH, Panzara MA, Compston DAS (2012) Alemtuzumab versus interferon beta 1a as first-line treatment for patients with relapsing-remitting multiple sclerosis: a randomised controlled phase 3 trial. *The Lancet* 380:1819–1828. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)61769-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)61769-3)
- Coles AJ (2013) Alemtuzumab therapy for multiple sclerosis. *Neurotherapeutics* 10:29–33. <https://doi.org/10.1007/s13311-012-0159-0>

- Coles AJ, Compston DAS, Selmaj KW, Lake SL, Moran S, Margolin DH, Norris K, Tandon PK (2008) Alemtuzumab vs. interferon beta-1a in early multiple sclerosis. *N Engl J Med* 359:1786–1801. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0802670>
- Coles AJ, Twyman CL, Arnold DL, Cohen JA, Confavreux C, Fox EJ, Hartung H-P, Havrdova E, Selmaj KW, Weiner HL, Miller T, Fisher E, Sandbrink R, Lake SL, Margolin DH, Oyuela P, Panzara MA, Compston DAS (2012a) Alemtuzumab for patients with relapsing multiple sclerosis after disease-modifying therapy: a randomised controlled phase 3 trial. *The Lancet* 380:1829–1839. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)61768-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)61768-1)
- Coles AJ, Fox E, Vladic A, Gazda SK, Brinar V, Selmaj KW, Skoromets A, Stolyarov I, Bass A, Sullivan H, Margolin DH, Lake SL, Moran S, Palmer J, Smith MS, Compston DAS (2012b) Alemtuzumab more effective than interferon  $\beta$ -1a at 5-year follow-up of CAMMS223 clinical trial. *Neurology* 78:1069–1078. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e31824e8ee7>
- Compston A (1999) The genetic epidemiology of multiple sclerosis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 354:1623–1634. <https://doi.org/10.1098/rstb.1999.0507>
- Compston A, Coles A (2008) Multiple sclerosis. *The Lancet* 372:1502–1517. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(08\)61620-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(08)61620-7)
- Conradi S, Malzahn U, Schroter F, Paul F, Quill S, Spruth E, Harms L, Then Bergh F, Ditzenbach A, Georgi T, Heuschmann P, Rosche B (2011) Environmental factors in early childhood are associated with multiple sclerosis: a case-control study. *BMC Neurol* 11:123. <https://doi.org/10.1186/1471-2377-11-123>
- Correale J, Gilmore W, McMillan M, Li S, McCarthy K, Le T, Weiner LP (1995) Patterns of cytokine secretion by autoreactive proteolipid protein-specific T cell clones during the course of multiple sclerosis. *J Immunol* 154:2959–2968
- Correale J, Villa A (2010) Role of CD8+ CD25+ Foxp3+ regulatory T cells in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 67:625–638. <https://doi.org/10.1002/ana.21944>
- Correale J, Ysraelit MC, Gaitán MI (2009) Immunomodulatory effects of Vitamin D in multiple sclerosis. *Brain* 132:1146–1160. <https://doi.org/10.1093/brain/awp033>
- Cosburn M, Pace AA, Jones J, Ali R, Ingram G, Baker K, Hirst C, Zajicek J, Scolding N, Boggild M, Pickersgill T, Ben-Shlomo Y, Coles A, Robertson NP (2011) Autoimmune disease after alemtuzumab treatment for multiple sclerosis in a multicenter cohort. *Neurology* 77:573–579. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e318228bec5>
- Cosburn MD, Harding K, Ingram G, El-Shanawany T, Heaps A, Pickersgill TP, Jolles S, Robertson NP (2013) Clinical relevance of differential lymphocyte recovery after alemtuzumab therapy for multiple sclerosis. *Neurology* 80:55–61. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e31827b5927>
- Cox AL, Thompson SAJ, Jones JL, Robertson VH, Hale G, Waldmann H, Compston DAS, Coles AJ (2005) Lymphocyte homeostasis following therapeutic lymphocyte depletion in multiple sclerosis. *Eur J Immunol* 35:3332–3342. <https://doi.org/10.1002/eji.200535075>
- Dean G, Kurtzke JF (1971) On the risk of multiple sclerosis according to age at immigration to South Africa. *Br Med J* 3:725–729
- Deutsche Gesellschaft für Neurologie (2014) Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie - Diagnose und Therapie der Multiplen Sklerose
- Didonna A, Oksenberg JR (2015) Genetic determinants of risk and progression in multiple sclerosis. *Clin Chim Acta* 449:16–22
- Duddy M, Bar-Or A (2006) B-cells in multiple sclerosis. *Int MS J* 13:84–90
- Ebers GC, Bulman DE, Sadovnick AD, Paty DW, Warren S, Hader W, Murray TJ, Seland TP, Duquette P, Grey T (1986) A population-based study of multiple sclerosis in twins. *N Engl J Med* 315:1638–1642. <https://doi.org/10.1056/NEJM198612253152603>

- Ebers GC, Sadovnick AD, Risch NJ (1995) A genetic basis for familial aggregation in multiple sclerosis. Canadian Collaborative Study Group. *Nature* 377:150–151. <https://doi.org/10.1038/377150a0>
- Ehling R, Lutterotti A, Wanschitz J, Khalil M, Gneiss C, Deisenhammer F, Reindl M, Berger T (2004) Increased frequencies of serum antibodies to neurofilament light in patients with primary chronic progressive multiple sclerosis. *Mult Scler* 10:601–606. <https://doi.org/10.1191/1352458504ms1100a>
- Eikelenboom MJ, Petzold A, Lazeron RHC, Silber E, Sharief M, Thompson EJ, Barkhof F, Giovannoni G, Polman CH, Uitdehaag BMJ (2003) Multiple sclerosis: Neurofilament light chain antibodies are correlated to cerebral atrophy. *Neurology* 60:219–223
- Elsner J, Höchstetter R, Spiekermann K, Kapp A (1996) Surface and mRNA expression of the CD52 antigen by human eosinophils but not by neutrophils. *Blood* 88:4684–4693
- Fissolo N, Haag S, Graaf KL de, Drews O, Stevanovic S, Rammensee HG, Weissert R (2009) Naturally presented peptides on major histocompatibility complex I and II molecules eluted from central nervous system of multiple sclerosis patients. *Mol Cell Proteomics* 8:2090–2101. <https://doi.org/10.1074/mcp.M900001-MCP200>
- Fletcher JM, Lalor SJ, Sweeney CM, Tubridy N, Mills KHG (2010) T cells in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *Clin Exp Immunol* 162:1–11. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2010.04143.x>
- Flynn JP, Gerriets V (2019) StatPearls: Ocrelizumab, Treasure Island (FL)
- Fox EJ (2006) Management of worsening multiple sclerosis with mitoxantrone: a review. *Clin Ther* 28:461–474. <https://doi.org/10.1016/j.clinthera.2006.04.013>
- Garg N, Smith TW (2015) An update on immunopathogenesis, diagnosis, and treatment of multiple sclerosis. *Brain Behav* 5:e00362. <https://doi.org/10.1002/brb3.362>
- Gilleece MH, Dexter TM (1993) Effect of Campath-1H antibody on human hematopoietic progenitors in vitro. *Blood* 82:807–812
- Giovannoni G, Comi G, Cook S, Rammohan K, Rieckmann P, Soelberg Sørensen P, Vermersch P, Chang P, Hamlett A, Musch B, Greenberg SJ (2010) A placebo-controlled trial of oral cladribine for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med* 362:416–426. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0902533>
- Hafner DA, Compston A, Sawcer S, Lander ES, Daly MJ, Jager PL de, Bakker PIW de, Gabriel SB, Mirel DB, Ivins AJ, Pericak-Vance MA, Gregory SG, Rioux JD, McCauley JL, Haines JL, Barcellos LF, Cree B, Oksenberg JR, Hauser SL (2007) Risk alleles for multiple sclerosis identified by a genomewide study. *N Engl J Med* 357:851–862. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa073493>
- Hale G, Bright S, Chumbley G, Hoang T, Metcalf D, Munro AJ, Waldmann H (1983) Removal of T cells from bone marrow for transplantation: a monoclonal antilymphocyte antibody that fixes human complement. *Blood* 62:873–882
- Hanaway MJ, Woodle ES, Mulgaonkar S, Peddi VR, Kaufman DB, First MR, Croy R, Holman J (2011) Alemtuzumab induction in renal transplantation. *N Engl J Med* 364:1909–1919. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1009546>
- Handel AE, Williamson AJ, Disanto G, Dobson R, Giovannoni G, Ramagopalan SV (2011) Smoking and multiple sclerosis: an updated meta-analysis. *PLoS ONE* 6:e16149. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016149>
- Haring JS, Pewe LL, Perlman S (2002) Bystander CD8 T cell-mediated demyelination after viral infection of the central nervous system. *J Immunol* 169:1550–1555
- Hauser SL, Waubant E, Arnold DL, Vollmer T, Antel J, Fox RJ, Bar-Or A, Panzara M, Sarkar N, Agarwal S, Langer-Gould A, Smith CH (2008) B-cell depletion with rituximab in relapsing-remitting multiple sclerosis. *N Engl J Med* 358:676–688. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0706383>



- Hauser SL, Bar-Or A, Comi G, Giovannoni G, Hartung H-P, Hemmer B, Lublin F, Montalban X, Rammohan KW, Selmaj K, Traboulsee A, Wolinsky JS, Arnold DL, Klingelschmitt G, Masterman D, Fontoura P, Belachew S, Chin P, Mairon N, Garren H, Kappos L (2017) Ocrelizumab versus Interferon Beta-1a in Relapsing Multiple Sclerosis. *N Engl J Med* 376:221–234. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1601277>
- Havari E, Turner MJ, Campos-Rivera J, Shankara S, Nguyen T-H, Roberts B, Siders W, Kaplan JM (2014) Impact of alemtuzumab treatment on the survival and function of human regulatory T cells in vitro. *Immunology* 141:123–131. <https://doi.org/10.1111/imm.12178>
- Hedstrom AK, Hillert J, Olsson T, Alfredsson L (2013) Smoking and multiple sclerosis susceptibility. *Eur J Epidemiol* 28:867–874
- Hedström AK, Sundqvist E, Bäärnhielm M, Nordin N, Hillert J, Kockum I, Olsson T, Alfredsson L (2011) Smoking and two human leukocyte antigen genes interact to increase the risk for multiple sclerosis. *Brain* 134:653–664. <https://doi.org/10.1093/brain/awq371>
- Hedström AK, Bomfim IL, Barcellos LF, Briggs F, Schaefer C, Kockum I, Olsson T, Alfredsson L (2014) Interaction between passive smoking and two HLA genes with regard to multiple sclerosis risk. *Int J Epidemiol* 43:1791–1798. <https://doi.org/10.1093/ije/dyu195>
- Hernán MA, Olek MJ, Ascherio A (2001) Cigarette smoking and incidence of multiple sclerosis. *Am J Epidemiol* 154:69–74
- Hernán MA, Jick SS, Logroscino G, Olek MJ, Ascherio A, Jick H (2005) Cigarette smoking and the progression of multiple sclerosis. *Brain* 128:1461–1465. <https://doi.org/10.1093/brain/awh471>
- Hill-Cawthorne GA, Button T, Tuohy O, Jones JL, May K, Somerfield J, Green A, Giovannoni G, Compston DAS, Fahey MT, Coles AJ (2012) Long term lymphocyte reconstitution after alemtuzumab treatment of multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 83:298–304. <https://doi.org/10.1136/jnnp-2011-300826>
- Hilton DA, Love S, Fletcher A, Pringle JH (1994) Absence of Epstein-Barr virus RNA in multiple sclerosis as assessed by in situ hybridisation. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 57:975–976
- Hu Y, Turner MJ, Shields J, Gale MS, Hutto E, Roberts BL, Siders WM, Kaplan JM (2009) Investigation of the mechanism of action of alemtuzumab in a human CD52 transgenic mouse model. *Immunology* 128:260–270. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2009.03115.x>
- Huizinga R, Heijmans N, Schubert P, Gschmeissner S, Hart BA 't, Herrmann H, Amor S (2007) Immunization with neurofilament light protein induces spastic paresis and axonal degeneration in Biozzi ABH mice. *J Neuropathol Exp Neurol* 66:295–304. <https://doi.org/10.1097/nen.0b013e318040ad5c>
- Jones JL, Phuah C-L, Cox AL, Thompson SA, Ban M, Shawcross J, Walton A, Sawcer SJ, Compston A, Coles AJ (2009) IL-21 drives secondary autoimmunity in patients with multiple sclerosis, following therapeutic lymphocyte depletion with alemtuzumab (Campath-1H). *J Clin Invest* 119:2052–2061. <https://doi.org/10.1172/JCI37878>
- Jones JL, Thompson SAJ, Loh P, Davies JL, Tuohy OC, Curry AJ, Azzopardi L, Hill-Cawthorne G, Fahey MT, Compston A, Coles AJ (2013) Human autoimmunity after lymphocyte depletion is caused by homeostatic T-cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110:20200–20205. <https://doi.org/10.1073/pnas.1313654110>
- Kappos L, Radue E-W, O'Connor P, Polman C, Hohlfeld R, Calabresi P, Selmaj K, Agoropoulou C, Leyk M, Zhang-Auberson L, Burtin P (2010) A placebo-controlled trial of oral fingolimod in relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med* 362:387–401. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0909494>
- Kappos L, Li D, Calabresi PA, O'Connor P, Bar-Or A, Barkhof F, Yin M, Leppert D, Glanzman R, Tinbergen J, Hauser SL (2011) Ocrelizumab in relapsing-remitting multiple sclerosis: A phase 2, randomised, placebo-controlled, multicentre trial. *The Lancet* 378:1779–1787. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)61649-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(11)61649-8)

- Kaufman DB, Leventhal JR, Gallon LG, Parker MA (2006) Alemtuzumab induction and prednisone-free maintenance immunotherapy in simultaneous pancreas-kidney transplantation comparison with rabbit antithymocyte globulin induction - long-term results. *Am J Transplant* 6:331–339. <https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2005.01166.x>
- Keating MJ, Flinn I, Jain V, Binet J-L, Hillmen P, Byrd J, Albitar M, Brettman L, Santabarbara P, Wacker B, Rai KR (2002) Therapeutic role of alemtuzumab (Campath-1H) in patients who have failed fludarabine: results of a large international study. *Blood* 99:3554–3561
- Keegan M, König F, McClelland R, Brück W, Morales Y, Bitsch A, Panitch H, Lassmann H, Weinschenker B, Rodriguez M, Parisi J, Lucchinetti CF (2005) Relation between humoral pathological changes in multiple sclerosis and response to therapeutic plasma exchange. *The Lancet* 366:579–582. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)67102-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)67102-4)
- Klabusay M, Sukova V, Coupek P, Brychtova Y, Mayer J (2007) Different levels of CD52 antigen expression evaluated by quantitative fluorescence cytometry are detected on B-lymphocytes, CD 34+ cells and tumor cells of patients with chronic B-cell lymphoproliferative diseases. *Cytometry B Clin Cytom* 72:363–370. <https://doi.org/10.1002/cyto.b.20181>
- Köhler G, Milstein C (1975) Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256:495–497
- Krishnamoorthy G, Saxena A, Mars LT, Domingues HS, Mentele R, Ben-Nun A, Lassmann H, Dornmair K, Kurschus FC, Liblau RS, Wekerle H (2009) Myelin-specific T cells also recognize neuronal autoantigen in a transgenic mouse model of multiple sclerosis. *Nat Med* 15:626–632. <https://doi.org/10.1038/nm.1975>
- Krogsgaard M, Wucherpfennig KW, Cannella B, Hansen BE, Svejgaard A, Pyrdol J, Ditzel H, Raine C, Engberg J, Fugger L, Canella B (2000) Visualization of myelin basic protein (MBP) T cell epitopes in multiple sclerosis lesions using a monoclonal antibody specific for the human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-DR2-MBP 85-99 complex. *J Exp Med* 191:1395–1412
- Kurtzke JF, Page WF (1997) Epidemiology of multiple sclerosis in US veterans: VII. Risk factors for MS. *Neurology* 48:204–213
- Kutzelnigg A, Lucchinetti CF, Stadelmann C, Brück W, Rauschka H, Bergmann M, Schmidbauer M, Parisi JE, Lassmann H (2005) Cortical demyelination and diffuse white matter injury in multiple sclerosis. *Brain* 128:2705–2712. <https://doi.org/10.1093/brain/awh641>
- Kutzleben S von, Pryce G, Giovannoni G, Baker D (2017) Depletion of CD52-positive cells inhibits the development of central nervous system autoimmune disease, but deletes an immune-tolerance promoting CD8 T-cell population. Implications for secondary autoimmunity of alemtuzumab in multiple sclerosis. *Immunology* 150:444–455. <https://doi.org/10.1111/imm.12696>
- Lalive PH, Neuhaus O, Benkhoucha M, Burger D, Hohlfeld R, Zamvil SS, Weber MS (2011) Glatiramer acetate in the treatment of multiple sclerosis: emerging concepts regarding its mechanism of action. *CNS Drugs* 25:401–414. <https://doi.org/10.2165/11588120-000000000-00000>
- Lang HLE, Jacobsen H, Ikemizu S, Andersson C, Harlos K, Madsen L, Hjorth P, Sondergaard L, Svejgaard A, Wucherpfennig K, Stuart DI, Bell JI, Jones EY, Fugger L (2002) A functional and structural basis for TCR cross-reactivity in multiple sclerosis. *Nat Immunol* 3:940–943. <https://doi.org/10.1038/ni835>
- Lassmann H, Bruck W, Lucchinetti CF (2007) The immunopathology of multiple sclerosis: an overview. *Brain Pathol* 17:210–218. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.2007.00064.x>
- Leibowitz U, Antonovsky A, Medalie JM, Smith HA, Halpern L, Alter M (1966) Epidemiological study of multiple sclerosis in Israel. II. Multiple sclerosis and level of sanitation. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 29:60–68

- Lemire JM, Archer DC (1991) 1,25-dihydroxyvitamin D3 prevents the in vivo induction of murine experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Clin Invest* 87:1103–1107. <https://doi.org/10.1172/JCI115072>
- Lockwood CM, Hale G, Waldman H, Jayne DRW (2003) Remission induction in Behçet's disease following lymphocyte depletion by the anti-CD52 antibody CAMPATH 1-H. *Rheumatology (Oxford)* 42:1539–1544. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/keg424>
- Lowenstein H, Shah A, Chant A, Khan A (2006) Different mechanisms of Campath-1H-mediated depletion for CD4 and CD8 T cells in peripheral blood. *Transpl Int* 19:927–936. <https://doi.org/10.1111/j.1432-2277.2006.00382.x>
- Lowther DE, Chong DL, Ascough S, Ettore A, Ingram RJ, Boyton RJ, Altmann DM (2013) Th1 not Th17 cells drive spontaneous MS-like disease despite a functional regulatory T cell response. *Acta Neuropathol* 126:501–515. <https://doi.org/10.1007/s00401-013-1159-9>
- Lucchinetti CF, Popescu BFG, Bunyan RF, Moll NM, Roemer SF, Lassmann H, Bruck W, Parisi JE, Scheithauer BW, Giannini C, Weigand SD, Mandrekar J, Ransohoff RM (2011) Inflammatory cortical demyelination in early multiple sclerosis. *N Engl J Med* 365:2188–2197. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1100648>
- Macedo C, Walters JT, Orkis EA, Isse K, Elinoff BD, Fedorek SP, McMichael JM, Chalasani G, Randhawa P, Demetris AJ, Zeevi A, Tan H, Shapiro R, Landsittel D, Lakkis FG, Metes D (2012) Long-term effects of alemtuzumab on regulatory and memory T-cell subsets in kidney transplantation. *Transplantation* 93:813–821. <https://doi.org/10.1097/TP.0b013e318247a717>
- Madsen LS, Andersson EC, Jansson L, Krogsgaard M, Andersen CB, Engberg J, Strominger JL, Svejgaard A, Hjorth JP, Holmdahl R, Wucherpfennig KW, Fugger L (1999) A humanized model for multiple sclerosis using HLA-DR2 and a human T-cell receptor. *Nat Genet* 23:343–347. <https://doi.org/10.1038/15525>
- Malmeström C, Haghighi S, Rosengren L, Andersen O, Lycke J (2003) Neurofilament light protein and glial fibrillary acidic protein as biological markers in MS. *Neurology* 61:1720–1725
- Martin R, Howell MD, Jaraquemada D, Flerlage M, Richert J, Brostoff S, Long EO, McFarlin DE, McFarland HF (1991) A myelin basic protein peptide is recognized by cytotoxic T cells in the context of four HLA-DR types associated with multiple sclerosis. *J Exp Med* 173:19–24
- Martin R, McFarland HF, McFarlin DE (1992) Immunological aspects of demyelinating diseases. *Annu Rev Immunol* 10:153–187. <https://doi.org/10.1146/annurev.iy.10.040192.001101>
- Martyn CN, Cruddas M, Compston DA (1993) Symptomatic Epstein-Barr virus infection and multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 56:167–168
- Massa J, O'Reilly EJ, Munger KL, Ascherio A (2013) Caffeine and alcohol intakes have no association with risk of multiple sclerosis. *Mult Scler* 19:53–58. <https://doi.org/10.1177/1352458512448108>
- Mejía M, Rodríguez-Leyva I, Cortés-Enríquez F, Chi-Ahumada E, Portales-Pérez DP, Macías-Islas MA, Jiménez-Capdeville ME (2018) Low levels of alpha-synuclein in peripheral tissues are related to clinical relapse in relapsing-remitting multiple sclerosis: a pilot cross-sectional study. *J Neurol Sci* 396:87–93. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2018.11.003>
- Melcon MO, Correale J, Melcon CM (2014) Is it time for a new global classification of multiple sclerosis? *J Neurol Sci* 344:171–181. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2014.06.051>
- Milo R (2019) Therapies for multiple sclerosis targeting B cells. *Croat Med J* 60:87–98
- Mone AP, Cheney C, Banks AL, Tridandapani S, Mehter N, Guster S, Lin T, Eisenbeis CF, Young DC, Byrd JC (2006) Alemtuzumab induces caspase-independent cell death in human chronic lymphocytic leukemia cells through a lipid raft-dependent mechanism. *Leukemia* 20:272–279. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2404014>
- Montalban X, Hauser SL, Kappos L, Arnold DL, Bar-Or A, Comi G, Seze J de, Giovannoni G, Hartung H-P, Hemmer B, Lublin F, Rammohan KW, Selmaj K, Traboulsee A, Sauter A, Masterman D,

- Fontoura P, Belachew S, Garren H, Mairon N, Chin P, Wolinsky JS (2017) Ocrelizumab versus Placebo in Primary Progressive Multiple Sclerosis. *N Engl J Med* 376:209–220. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1606468>
- Moreau T, Thorpe J, Miller D, Moseley I, Hale G, Waldmann H, Clayton D, Wing M, Scolding N, Compston A (1994) Preliminary evidence from magnetic resonance imaging for reduction in disease activity after lymphocyte depletion in multiple sclerosis. *Lancet* 344:298–301
- Mowry EM, Krupp LB, Milazzo M, Chabas D, Strober JB, Belman AL, McDonald JC, Oksenberg JR, Bacchetti P, Waubant E (2010) Vitamin D status is associated with relapse rate in pediatric-onset multiple sclerosis. *Ann Neurol* 67:618–624. <https://doi.org/10.1002/ana.21972>
- Munger KL, Zhang SM, O'Reilly E, Hernán MA, Olek MJ, Willett WC, Ascherio A (2004) Vitamin D intake and incidence of multiple sclerosis. *Neurology* 62:60–65
- Munger KL, Levin LI, Hollis BW, Howard NS, Ascherio A (2006) Serum 25-hydroxyvitamin D levels and risk of multiple sclerosis. *JAMA* 296:2832–2838. <https://doi.org/10.1001/jama.296.23.2832>
- Muraro PA, Vergelli M, Kalbus M, Banks DE, Nagle JW, Tranquill LR, Nepom GT, Biddison WE, McFarland HF, Martin R (1997) Immunodominance of a low-affinity major histocompatibility complex-binding myelin basic protein epitope (residues 111-129) in HLA-DR4 (B1\*0401) subjects is associated with a restricted T cell receptor repertoire. *J Clin Invest* 100:339–349. <https://doi.org/10.1172/JCI119539>
- Nakajima H, Fukuda K, Doi Y, Sugino M, Kimura F, Hanafusa T, Ikemoto T, Shimizu A (2004) Expression of TH1/TH2-related chemokine receptors on peripheral T cells and correlation with clinical disease activity in patients with multiple sclerosis. *Eur Neurol* 52:162–168. <https://doi.org/10.1159/000081856>
- Neumann H (2002) Cytotoxic T lymphocytes in autoimmune and degenerative CNS diseases. *Trends in Neurosciences* 25:313–319. [https://doi.org/10.1016/S0166-2236\(02\)02154-9](https://doi.org/10.1016/S0166-2236(02)02154-9)
- O'Connor RA, Prendergast CT, Sabatos CA, Lau CWZ, Leech MD, Wraith DC, Anderton SM (2008) Cutting edge: Th1 cells facilitate the entry of Th17 cells to the central nervous system during experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 181:3750–3754
- Odoardi F, Sie C, Streyll K, Ulaganathan VK, Schläger C, Lodygin D, Heckelsmiller K, Nietfeld W, Ellwart J, Klinkert WEF, Lottaz C, Nosov M, Brinkmann V, Spang R, Lehrach H, Vingron M, Wekerle H, Flügel-Koch C, Flügel A (2012) T cells become licensed in the lung to enter the central nervous system. *Nature* 488:675–679. <https://doi.org/10.1038/nature11337>
- Oh J, O'Connor PW (2013) An update of teriflunomide for treatment of multiple sclerosis. *Ther Clin Risk Manag* 9:177–190. <https://doi.org/10.2147/TCRM.S30947>
- Operskalski EA, Visscher BR, Malmgren RM, Detels R (1989) A case-control study of multiple sclerosis. *Neurology* 39:825–829
- Ota K, Matsui M, Milford EL, Mackin GA, Weiner HL, Hafler DA (1990) T-cell recognition of an immunodominant myelin basic protein epitope in multiple sclerosis. *Nature* 346:183–187. <https://doi.org/10.1038/346183a0>
- Panina-Bordignon P, Tan A, Termijtelen A, Demotz S, Corradin G, Lanzavecchia A (1989) Universally immunogenic T cell epitopes: promiscuous binding to human MHC class II and promiscuous recognition by T cells. *Eur J Immunol* 19:2237–2242. <https://doi.org/10.1002/eji.1830191209>
- Panitch HS, Hirsch RL, Haley AS, Johnson KP (1987) Exacerbations of multiple sclerosis in patients treated with gamma interferon. *Lancet* 1:893–895
- Pelletier D, Hafler DA (2012) Fingolimod for multiple sclerosis. *N Engl J Med* 366:339–347. <https://doi.org/10.1056/NEJMct1101691>
- Peterson JW, Bö L, Mörk S, Chang A, Trapp BD (2001) Transected neurites, apoptotic neurons, and reduced inflammation in cortical multiple sclerosis lesions. *Ann Neurol* 50:389–400

- Polman CH, O'Connor PW, Havrdova E, Hutchinson M, Kappos L, Miller DH, Phillips JT, Lublin FD, Giovannoni G, Wajgt A, Toal M, Lynn F, Panzara MA, Sandrock AW (2006) A randomized, placebo-controlled trial of natalizumab for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med* 354:899–910. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa044397>
- Ponsonby A-L, van der Mei I, Dwyer T, Blizzard L, Taylor B, Kemp A, Simmons R, Kilpatrick T (2005) Exposure to infant siblings during early life and risk of multiple sclerosis. *JAMA* 293:463–469. <https://doi.org/10.1001/jama.293.4.463>
- Popescu BFG, Lucchinetti CF (2012) Pathology of demyelinating diseases. *Annu Rev Pathol* 7:185–217
- Ramagopalan SV, Dymment DA, Cader MZ, Morrison KM, Disanto G, Morahan JM, Berlanga-Taylor AJ, Handel A, Luca GC de, Sadovnick AD, Lepage P, Montpetit A, Ebers GC (2011) Rare variants in the CYP27B1 gene are associated with multiple sclerosis. *Ann Neurol* 70:881–886. <https://doi.org/10.1002/ana.22678>.
- Ransohoff RM (2007) Natalizumab for multiple sclerosis. *N Engl J Med* 356:2622–2629. <https://doi.org/10.1056/NEJMct071462>
- Rao SP, Sancho J, Campos-Rivera J, Boutin PM, Severy PB, Weeden T, Shankara S, Roberts BL, Kaplan JM (2012) Human peripheral blood mononuclear cells exhibit heterogeneous CD52 expression levels and show differential sensitivity to alemtuzumab mediated cytotoxicity. *PLoS ONE* 7:e39416. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0039416>
- Reder AT, Feng X (2014) How type I interferons work in multiple sclerosis and other diseases: some unexpected mechanisms. *J Interferon Cytokine Res* 34:589–599. <https://doi.org/10.1089/jir.2013.0158>
- Riedhammer C, Weissert R (2015) Antigen Presentation, Autoantigens, and Immune Regulation in Multiple Sclerosis and Other Autoimmune Diseases. *Front Immunol* 6:322. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00322>
- Riedhammer C, Halbritter D, Weissert R (2016) Peripheral Blood Mononuclear Cells: Isolation, Freezing, Thawing, and Culture. *Methods Mol Biol* 1304:53–61. [https://doi.org/10.1007/7651\\_2014\\_99](https://doi.org/10.1007/7651_2014_99)
- Riepl E, Pfeuffer S, Ruck T, Lohmann H, Wiendl H, Meuth SG, Johnen A (2017) Alemtuzumab Improves Cognitive Processing Speed in Active Multiple Sclerosis-A Longitudinal Observational Study. *Front Neurol* 8:730. <https://doi.org/10.3389/fneur.2017.00730>
- Risch N (1987) Assessing the role of HLA-linked and unlinked determinants of disease. *Am J Hum Genet* 40:1–14
- Ruck T, Bittner S, Wiendl H, Meuth SG (2015) Alemtuzumab in Multiple Sclerosis: Mechanism of Action and Beyond. *Int J Mol Sci* 16:16414–16439. <https://doi.org/10.3390/ijms160716414>
- Ruderman EM, Weinblatt ME, Thurmond LM, Pinkus GS, Gravalles EM (1995) Synovial tissue response to treatment with Campath-1H. *Arthritis Rheum* 38:254–258
- Sadovnick AD, Armstrong H, Rice GP, Bulman D, Hashimoto L, Paty DW, Hashimoto SA, Warren S, Hader W, Murray TJ (1993) A population-based study of multiple sclerosis in twins: update. *Ann Neurol* 33:281–285. <https://doi.org/10.1002/ana.410330309>
- Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M (2011) Pillars article: immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor  $\alpha$ -chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J. Immunol.* 195. *J Immunol* 186:3808–3821
- Sanofi-Aventis Deutschland GmbH (2019) Rote-Hand-Brief zu Alemtuzumab (LEMTRADA): Einschränkung der Anwendung bei Multipler Sklerose aufgrund von Sicherheitsbedenken
- Sawcer S, Ban M, Maranian M, Yeo TW, Compston A, Kirby A, Daly MJ, Jager PL de, Walsh E, Lander ES, Rioux JD, Hafler DA, Ivinson A, Rimmler J, Gregory SG, Schmidt S, Pericak-Vance MA, Akesson E, Hillert J, Datta P, Oturai A, Ryder LP, Harbo HF, Spurkland A, Myhr K-M, Laaksonen M, Booth D,

Heard R, Stewart G, Lincoln R, Barcellos LF, Hauser SL, Oksenberg JR, Kenealy SJ, Haines JL (2005) A high-density screen for linkage in multiple sclerosis. *Am J Hum Genet* 77:454–467. <https://doi.org/10.1086/444547>

- Sawcer S, Hellenthal G, Pirinen M, Spencer CCA, Patsopoulos NA, Moutsianas L, Dilthey A, Su Z, Freeman C, Hunt SE, Edkins S, Gray E, Booth DR, Potter SC, Goris A, Band G, Oturai AB, Strange A, Saarela J, Bellenguez C, Fontaine B, Gillman M, Hemmer B, Gwilliam R, Zipp F, Jayakumar A, Martin R, Leslie S, Hawkins S, Giannoulatou E, D'Alfonso S, Blackburn H, Martinelli Boneschi F, Liddle J, Harbo HF, Perez ML, Spurkland A, Waller MJ, Mycko MP, Ricketts M, Comabella M, Hammond N, Kockum I, McCann OT, Ban M, Whittaker P, Kempainen A, Weston P, Hawkins C, Widaa S, Zajicek J, Dronov S, Robertson N, Bumpstead SJ, Barcellos LF, Ravindrarajah R, Abraham R, Alfredsson L, Ardlie K, Aubin C, Baker A, Baker K, Baranzini SE, Bergamaschi L, Bergamaschi R, Bernstein A, Berthele A, Boggild M, Bradfield JP, Brassat D, Broadley SA, Buck D, Butzkueven H, Capra R, Carroll WM, Cavalla P, Celius EG, Cepok S, Chiavacci R, Clerget-Darpoux F, Clysters K, Comi G, Cossburn M, Cournu-Rebeix I, Cox MB, Cozen W, Cree BAC, Cross AH, Cusi D, Daly MJ, Davis E, Bakker PIW de, Debouverie M, D'hooghe MB, Dixon K, Dobosi R, Dubois B, Ellinghaus D, Elovaara I, Esposito F, Fontenille C, Foote S, Franke A, Galimberti D, Ghezzi A, Glessner J, Gomez R, Gout O, Graham C, Grant SFA, Guerini FR, Hakonarson H, Hall P, Hamsten A, Hartung H-P, Heard RN, Heath S, Hobart J, Hoshi M, Infante-Duarte C, Ingram G, Ingram W, Islam T, Jagodic M, Kabesch M, Kermodé AG, Kilpatrick TJ, Kim C, Klopp N, Koivisto K, Larsson M, Lathrop M, Lechner-Scott JS, Leone MA, Leppä V, Liljedahl U, Bomfim IL, Lincoln RR, Link J, Liu J, Lorentzen AR, Lupoli S, Macchiardi F, Mack T, Marriott M, Martinelli V, Mason D, McCauley JL, Mentch F, Mero I-L, Mihalova T, Montalban X, Mottershead J, Myhr K-M, Naldi P, Ollier W, Page A, Palotie A, Pelletier J, Piccio L, Pickersgill T, Piehl F, Pobywajlo S, Quach HL, Ramsay PP, Reunanen M, Reynolds R, Rioux JD, Rodegher M, Roesner S, Rubio JP, Ruckert I-M, Salvetti M, Salvi E, Santaniello A, Schaefer CA, Schreiber S, Schulze C, Scott RJ, Sellebjerg F, Selmaj KW, Sexton D, Shen L, Simms-Acuna B, Skidmore S, Sleiman PMA, Smestad C, Sorensen PS, Sondergaard HB, Stankovich J, Strange RC, Sulonen A-M, Sundqvist E, Syvanen A-C, Taddeo F, Taylor B, Blackwell JM, Tienari P, Bramon E, Tourbah A, Brown MA, Tronczynska E, Casas JP, Tubridy N, Corvin A, Vickery J, Jankowski J, Villoslada P, Markus HS, Wang K, Mathew CG, Wason J, Palmer CNA, Wichmann H-E, Plomin R, Willoughby E, Rautanen A, Winkelmann J, Wittig M, Trembath RC, Yaouanq J, Viswanathan AC, Zhang H, Wood NW, Zuvich R, Deloukas P, Langford C, Duncanson A, Oksenberg JR, Pericak-Vance MA, Haines JL, Olsson T, Hillert J, Ivinson AJ, Jager PL de, Peltonen L, Stewart GJ, Hafler DA, Hauser SL, McVean G, Donnelly P, Compston A (2011) Genetic risk and a primary role for cell-mediated immune mechanisms in multiple sclerosis. *Nature* 476:214–219. <https://doi.org/10.1038/nature10251>
- Selter RC, Hemmer B (2013) Update on immunopathogenesis and immunotherapy in multiple sclerosis. *Immunotargets Ther* 2:21–30. <https://doi.org/10.2147/ITT.S31813>
- Sharief MK, Semra YK (2001) Heightened expression of survivin in activated T lymphocytes from patients with multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 119:358–364
- Silber E, Semra YK, Gregson NA, Sharief MK (2002) Patients with progressive multiple sclerosis have elevated antibodies to neurofilament subunit. *Neurology* 58:1372–1381
- Simpson S, Taylor B, Blizzard L, Ponsonby A-L, Pittas F, Tremlett H, Dwyer T, Gies P, van der Mei I (2010) Higher 25-hydroxyvitamin D is associated with lower relapse risk in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 68:193–203. <https://doi.org/10.1002/ana.22043>
- Simpson S, Blizzard L, Otahal P, van der Mei I, Taylor B (2011) Latitude is significantly associated with the prevalence of multiple sclerosis: a meta-analysis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 82:1132–1141. <https://doi.org/10.1136/jnnp.2011.240432>

- Sospedra M, Martin R (2005) Immunology of multiple sclerosis. *Annu Rev Immunol* 23:683–747. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.23.021704.115707>
- Spach KM, Hayes CE (2005) Vitamin D3 confers protection from autoimmune encephalomyelitis only in female mice. *J Immunol* 175:4119–4126
- Tejada-Simon MV, Hong J, Rivera VM, Zhang JZ (2001) Reactivity pattern and cytokine profile of T cells primed by myelin peptides in multiple sclerosis and healthy individuals. *Eur J Immunol* 31:907–917. [https://doi.org/10.1002/1521-4141\(200103\)31:3<907::AID-IMMU907>3.0.CO;2-1](https://doi.org/10.1002/1521-4141(200103)31:3<907::AID-IMMU907>3.0.CO;2-1)
- Thacker EL, Mirzaei F, Ascherio A (2006) Infectious mononucleosis and risk for multiple sclerosis: a meta-analysis. *Ann Neurol* 59:499–503. <https://doi.org/10.1002/ana.20820>
- Thompson SAJ, Jones JL, Cox AL, Compston DAS, Coles AJ (2010) B-cell reconstitution and BAFF after alemtuzumab (Campath-1H) treatment of multiple sclerosis. *J Clin Immunol* 30:99–105. <https://doi.org/10.1007/s10875-009-9327-3>
- Turner MJ, Lamorte MJ, Chretien N, Havari E, Roberts BL, Kaplan JM, Siders WM (2013) Immune status following alemtuzumab treatment in human CD52 transgenic mice. *J Neuroimmunol* 261:29–36. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2013.04.018>
- van der Mei IA, Ponsonby AL, Blizzard L, Dwyer T (2001) Regional variation in multiple sclerosis prevalence in Australia and its association with ambient ultraviolet radiation. *Neuroepidemiology* 20:168–174. <https://doi.org/10.1159/000054783>
- Vos AF de, van Meurs M, Brok HP, Boven LA, Hintzen RQ, van der Valk P, Ravid R, Rensing S, Boon L, Hart BA 't, Laman JD (2002) Transfer of central nervous system autoantigens and presentation in secondary lymphoid organs. *J Immunol* 169:5415–5423
- Waldmann H, Hale G (2005) CAMPATH: from concept to clinic. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 360:1707–1711. <https://doi.org/10.1098/rstb.2005.1702>
- Weinblatt ME, Maddison PJ, Bulpitt KJ, Hazleman BL, Urowitz MB, Sturrock RD, Coblyn JS, Maier AL, Spreen WR, Manna VK (1995) CAMPATH-1H, a humanized monoclonal antibody, in refractory rheumatoid arthritis. An intravenous dose-escalation study. *Arthritis Rheum* 38:1589–1594
- Weissert R, Svenningsson A, Lobell A, Graaf KL de, Andersson R, Olsson T (1998) Molecular and genetic requirements for preferential recruitment of TCRBV8S2+ T cells in Lewis rat experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 160:681–690
- Weissert R (2011) Progressive multifocal leukoencephalopathy. *J Neuroimmunol* 231:73–77
- Weissert R (2013) The Immune Pathogenesis of Multiple Sclerosis. *J Neuroimmune Pharmacol* 8:857–866. <https://doi.org/10.1007/s11481-013-9467-3>
- Weltgesundheitsorganisation (2008) Atlas multiple sclerosis resources in the world 2008. WHO, Geneva
- Werner P, Pitt D, Raine CS (2000) Glutamate excitotoxicity--a mechanism for axonal damage and oligodendrocyte death in Multiple Sclerosis? *J Neural Transm Suppl*:375–385
- Werner P, Pitt D, Raine CS (2001) Multiple sclerosis: altered glutamate homeostasis in lesions correlates with oligodendrocyte and axonal damage. *Ann Neurol* 50:169–180
- Wing MG, Moreau T, Greenwood J, Smith RM, Hale G, Isaacs J, Waldmann H, Lachmann PJ, Compston A (1996) Mechanism of first-dose cytokine-release syndrome by CAMPATH 1-H: involvement of CD16 (FcgammaRIII) and CD11a/CD18 (LFA-1) on NK cells. *J Clin Invest* 98:2819–2826. <https://doi.org/10.1172/JCI119110>
- Wingerchuk DM (2012) Smoking: effects on multiple sclerosis susceptibility and disease progression. *Ther Adv Neurol Disord* 5:13–22. <https://doi.org/10.1177/1756285611425694>
- Wucherpfennig KW, Sette A, Southwood S, Oseroff C, Matsui M, Strominger JL, Hafler DA (1994) Structural requirements for binding of an immunodominant myelin basic protein peptide to DR2 isotypes and for its recognition by human T cell clones. *J Exp Med* 179:279–290

- Xia MQ, Hale G, Lively MR, Ferguson MA, Campbell D, Packman L, Waldmann H (1993) Structure of the CAMPATH-1 antigen, a glycosylphosphatidylinositol-anchored glycoprotein which is an exceptionally good target for complement lysis. *Biochem J* 293 (Pt 3):633–640
- Zent CS, Secreto CR, LaPlant BR, Bone ND, Call TG, Shanafelt TD, Jelinek DF, Tschumper RC, Kay NE (2008) Direct and complement dependent cytotoxicity in CLL cells from patients with high-risk early-intermediate stage chronic lymphocytic leukemia (CLL) treated with alemtuzumab and rituximab. *Leuk Res* 32:1849–1856. <https://doi.org/10.1016/j.leukres.2008.05.014>.
- Zhang X, Tao Y, Chopra M, Ahn M, Marcus KL, Choudhary N, Zhu H, Markovic-Plese S (2013) Differential reconstitution of T cell subsets following immunodepleting treatment with alemtuzumab (anti-CD52 monoclonal antibody) in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. *J Immunol* 191:5867–5874. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1301926>



## Danksagung

Ohne die Unterstützung zahlreicher Personen hätte die vorliegende Arbeit in dieser Form nicht realisiert werden können. Für die vielfältig erfahrene Hilfe möchte ich mich an dieser Stelle herzlich bedanken.

Mein besonderer Dank gilt zunächst meinem Doktorvater Prof. Dr. Dr. med. Robert Weißert, der meine Arbeit von Anfang an begleitete und so über mehrere Jahre hinweg viel Zeit investierte. Er unterstützte die Arbeit sowohl während der Zeit der Themenfindung als auch während der praktischen Umsetzung durch zahlreiche Anregungen und Hilfestellungen.

Bedanken möchte ich mich außerdem herzlich bei den Teilnehmern dieser Studie, die sich bereitklärten, die Forschung zu unterstützen und dafür auch regelmäßig Blutproben für Laboranalysen spendeten.

Für ihre Unterstützung danke ich auch Dr. Evelyn Orsó und ihrem Team, die bei Analysen im Labor ihre wertvolle Hilfe angeboten und Geräte ihres Labors zur Verfügung gestellt haben.

Für die freundlichen Atmosphäre danke ich meinen Kommilitoninnen, die im gleichen Labor tätig waren. Insbesondere danke ich dabei auch Luise Schulze und Franziska Bartschmid für die Einarbeitung in die Laborarbeit.

Mein besonderer Dank gilt schließlich meinen Eltern und Geschwistern, meinem Freund und meinen Freundinnen und Freunden, die mir während der Zeit der Erstellung der Arbeit viel Verständnis entgegenbrachten und mich vielfältig unterstützten.

Ich erkläre hiermit, dass die Dissertation in Ihrer Form auf Anregung von Prof. Dr. Dr. med. Robert Weißert entstand. Die Ausarbeitung wurde ebenso durch Prof. Dr. Dr. med. Robert Weißert überwacht.

Außerdem erkläre ich hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeit erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

---

---