

Aus der Klinik für Neurologie

der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. Dr. rer. nat. Sven Meuth

Effekt von Fingolimod (FTY720/Gilenya®) auf das periphere Immunrepertoire

von CD4+ T-Zellen und deren CCR7+ und CCR7- Subpopulationen

bei Multiple Sklerose Patienten

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin der Medizinischen Fakultät  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Pia Heike Schüttfort

2022

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. Norbert Goebels

Zweitgutachter: Prof. Dr. Colin R. MacKenzie

## Zusammenfassung:

Bei der Multiplen Sklerose (MS) stellt die Einwanderung autoreaktiver T-Zellen in das zentrale Nervensystem mit Induktion einer Inflammation einen zentralen Pathomechanismus dar. Der Immunmodulator Fingolimod (FTY720/Gilenya®), der zur Therapie der schubförmig remittierenden MS eingesetzt wird, beruht auf der Rückführung von CCR7+ Lymphozyten, darunter autoreaktive T-Zellen, in die sekundären Lymphorgane. In dieser Arbeit wurde das T-Zell-Rezeptor- $\beta$  (TZR- $\beta$ ) Immunrepertoire von CD4+ CCR7+, darunter naive T-Zellen ( $T_{NC}$ ) und zentrale Gedächtnis-T-Zellen ( $T_{CM}$ ), und CD4+ CCR7- Effektor-Gedächtnis-T-Zellen ( $T_{EM}$ ) Zellen von zwei MS Patienten vor und unter Fingolimod Therapie im Vergleich zu einem MS Patienten ohne Therapie und einer gesunden Kontrolle im zeitlichen Verlauf von 10 bzw. 12 Monaten untersucht. Mittels Illumina *Next Generation Sequencing* wurden im TZR- $\beta$ -Repertoire V-J-Kombinationsmöglichkeiten, Diversität, Klonalität, dominante CDR3 Sequenzen und mögliche Antigen-spezifitäten mit dem Ziel einer Abbildung MS spezifischer und therapieassoziiertes TZR- $\beta$ -Repertoireveränderungen analysiert. Durchflusszytometrische Untersuchungen bestätigten andere Veröffentlichungen und zeigten eine Veränderung des CD4/CD8 Quotienten zugunsten der CD8+ T-Zellen und eine Suppression der CD4+  $T_{NC}$  und  $T_{CM}$  Zellen, mit Anstieg des Anteils der CD4+  $T_{EM}$  Zellen unter 12-monatiger Fingolimod Therapie. Gleichzeitig nahmen die V-J-Rekombinationsmöglichkeiten des TZR- $\beta$  ab und es zeigte sich, dass MS Patienten eine im Vergleich zur gesunden Kontrolle erhöhte Frequenz des Segments TRBV5.1 aufwiesen. Unter Therapie nahm sowohl in den CD4+  $T_{NC}$  und  $T_{CM}$  als auch den CD4+  $T_{EM}$  Subpopulationen die Diversität des TZR- $\beta$ -Repertoires zu. Die CD4+  $T_{NC}$  und  $T_{CM}$  Subpopulation der MS Patienten zeigten eine geringere und die CD4+  $T_{EM}$  Subpopulation eine höhere Diversität als die der gesunden Kontrolle. Während es unter Fingolimod Therapie beinahe zu einem kompletten Austausch des CD4+ CCR7+ Repertoires kam, zeigte das  $T_{EM}$  Repertoire unter Therapie anteilig zunehmende klonale Persistenzen. CDR3 Sequenzen aller Probanden der  $T_{NC}$  und  $T_{CM}$  sowie  $T_{EM}$  Subpopulationen konnten den Epitopen des Cytomegalievirus, Epstein-Barr-Virus und Humanen Immundefizienz-Virus Typ I zugeordnet werden. Es fanden sich keine höheren Frequenzen dieser Epitop Spezies Zuordnung bei den MS Patienten im Vergleich zur gesunden Kontrolle. Mögliche Amplifikationsartefakte, Unterschiede in der Sequenzierertiefe und eine geringe Korrelation der Ausgangszellzahl mit dem Sequenzierungsprodukt könnten jedoch Abbildungen des TZR- $\beta$ -Repertoires quantitativ und qualitativ beeinflussen. Eine größere Kohorte an MS Patienten mit und ohne Therapie und gesunder Kontrollen sowie die Korrelation von Patientenhistorie, Nebenwirkungsprofilen, klinischen Verlaufsparemtern und bildmorphologischen Krankheitsäquivalenten mit TZR- $\beta$ -Repertoire Variablen wie Diversität, Klonalität und hochfrequente CDR3 Sequenzen würde möglicherweise die Chance bieten, einen diagnostischen, prognostischen oder behandlungsstratifizierenden Biomarker der MS zu ermitteln.

## Abstract:

In multiple sclerosis (MS), the immigration of autoreactive T cells into the central nervous system with induction of inflammation represents a central pathomechanism. The immunomodulator Fingolimod (FTY720/Gilenya®), which is used to treat relapsing-remitting MS, relies on homing of CCR7+ lymphocytes, including autoreactive T cells, into secondary lymphoid organs. In this study, the T cell receptor- $\beta$  (TCR- $\beta$ ) immune repertoire of CD4+ CCR7+, including naïve T cells ( $T_{NC}$ ) and central memory T-cells ( $T_{CM}$ ), and CD4+ CCR7- effector memory T cells ( $T_{EM}$ ) from two MS patients before and on fingolimod therapy was examined in comparison to one MS patient without therapy and a healthy control over a time course of 10 and 12 months, respectively. Illumina next generation sequencing was used to analyze V-J-recombination, diversity, clonality, dominant CDR3 sequences and possible antigen specificities in the TCR- $\beta$  repertoire with the aim of mapping MS-specific and therapy-associated TCR- $\beta$  repertoire changes. Flow cytometry confirmed other publications and showed a change in the CD4/CD8 quotient in favor of CD8+ T cells and suppression of CD4+  $T_{NC}$  and  $T_{CM}$  cells, with increase in the proportion of CD4+  $T_{EM}$  cells under 12 months of fingolimod therapy. At the same time, V-J-recombination potential of the TCR- $\beta$  decreased and MS patients were found to have an increased frequency of the TRBV5.1 segment compared with healthy control. Under therapy, the diversity of the TCR- $\beta$  repertoire increased in both the CD4+  $T_{NC}$  and  $T_{CM}$  and the CD4+  $T_{EM}$  subpopulations. The CD4+  $T_{NC}$  and  $T_{CM}$  subpopulation of MS patients showed lower and the CD4+  $T_{EM}$  subpopulation showed higher diversity than that of healthy controls. While there was almost a complete replacement of the CD4+ CCR7+ repertoire under fingolimod therapy, the  $T_{EM}$  repertoire showed proportionally increasing clonal persistence under therapy. The CDR3 sequences of all subjects of the  $T_{NC}$  and  $T_{CM}$  as well as  $T_{EM}$  subpopulations could be assigned at high frequency to the epitopes of cytomegalovirus, Epstein-Barr virus, and human immunodeficiency virus type I. No higher frequencies of these epitope species assignment were found in the MS patients compared with healthy controls. However, possible amplification artifacts, differences in sequencing depth, and lack of correlation of baseline cell number with sequencing product could quantitatively and qualitatively affect mappings of the TCR- $\beta$  repertoire. A larger cohort of MS patients with and without therapy and healthy controls, as well as correlation of patient history, adverse event profiles, clinical course parameters, and image morphologic disease equivalents with TCR- $\beta$  repertoire variables such as diversity, clonality, and high-frequency CDR3 sequences, would potentially provide an opportunity to identify a diagnostic, prognostic, or treatment-stratifying biomarker of MS.

## Abkürzungsverzeichnis:

<b>°C</b>	Grad Celsius
<b>5'RACE</b>	<i>5' rapid amplification of cDNA ends</i>
<b>bp</b>	Basenpaar ( <i>base pair</i> )
<b>CCR7</b>	C-C Chemokinrezeptor Typ 7
<b>CD</b>	<i>Cluster of differentiation</i>
<b>cDNA</b>	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure <i>(complementary deoxyribonucleic acid)</i>
<b>CDR</b>	<i>Complementarity determining region</i>
<b>CMV</b>	Cytomegalievirus
<b>Cy7</b>	Cyanin 7
<b>DAPI</b>	4',6-Diamidino-2-Phenylindole
<b>DENV-1</b>	Dengue-Virus-1
<b>DMEM</b>	<i>Dulbecco's Modified Eagle Cell Culture Medium</i>
<b>DMT</b>	<i>Disease-Modifying Therapies</i>
<b>DNA</b>	Desoxyribonukleinsäure ( <i>deoxyribonucleic acid</i> )
<b>dNTP</b>	Desoxyribonukleotid ( <i>2'-deoxyribonucleosid-5'-triphosphate</i> )
<b>DTT</b>	Dithiothreitol
<b>EBV</b>	Epstein-Barr-Virus
<b>EDSS</b>	<i>Expanded Disability Status Scale</i>

<b>FACS</b>	<i>Fluorescence-Activated Cell Sorting</i>
<b>FBS</b>	Fetales Kälberserum ( <i>fetale bovine serum</i> )
<b>FITC</b>	Fluoresceinisothiocyanat
<b>FSC</b>	Vorwärtsstreulicht ( <i>forward scatter</i> )
<b>G</b>	Gewichtskraft
<b>hC</b>	Gesunde Kontrolle ( <i>healthy control</i> )
<b>HCV</b>	Hepatitis-C-Virus
<b>HIV-I</b>	Humanes Immundefizienz-Virus Typ I
<b>IL</b>	Interleukin
<b>INF</b>	Interferon
<b>KIS</b>	Klinisch isoliertes Syndrom
<b>KM</b>	Kontrastmittel
<b>MHC</b>	Haupthistokompatibilitätskomplex ( <i>major histocompatibility complex</i> )
<b>ml</b>	Milliliter
<b>min</b>	Minute
<b>µl</b>	Mikroliter
<b>mRNA</b>	Boten-RNA ( <i>messenger ribonucleic acid</i> )
<b>MRT</b>	Magnetresonanztomographie
<b>MS</b>	Multiple Sklerose
<b>m0/m10/m12</b>	0 Monate/10 Monate/12 Monate
<b>nmol</b>	Nanomol

<b>NGS</b>	<i>Next Generation Sequencing</i>
<b>Pat.</b>	Patient
<b>PBMC</b>	Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes <i>(Peripheral Blood Mononuclear Cell)</i>
<b>PBS</b>	Phosphatgepufferte Salzlösung <i>(phosphate buffered solution)</i>
<b>PCR</b>	Polymerase-Kettenreaktion <i>(polymerase chain reaction)</i>
<b>PE</b>	Phycoerythrin
<b>pM</b>	Pikomolar
<b>PP-MS</b>	Primär Progressive MS <i>(primary progressive multiple sclerosis)</i>
<b>RT</b>	Reverse Transkriptase
<b>RNA</b>	Ribonukleinsäure <i>(ribonucleic acid)</i>
<b>RR-MS</b>	Schubförmig Remittierende MS <i>(relapsing remitting multiple sclerosis)</i>
<b>s</b>	Sekunde
<b>SARS-CoV-2</b>	Schweres-Akutes-Respiratorisches Syndrom-Coronavirus-2 <i>(severe acute respiratory distress syndrome corona virus-2)</i>
<b>SP-MS</b>	Sekundär Progreidente MS <i>(secondary progreident multiple sclerosis)</i>
<b>SSC</b>	Seitwärtsstreulicht <i>(side scatter)</i>
<b>S1P</b>	Sphingosin-1-Phosphat
<b>T<sub>CM</sub></b>	Zentrale Gedächtnis-T-Zelle <i>(central memory T cell)</i>
<b>T<sub>con</sub></b>	Konventionelle T-Zelle <i>(conventional T cell)</i>

<b>T<sub>EM</sub></b>	Effektor-Gedächtnis-T-Zelle ( <i>effector memory T cell</i> )
<b>T<sub>fh</sub></b>	Follikuläre T-Helferzelle
<b>T<sub>NC</sub></b>	Naive T-Zelle ( <i>naive T cell</i> )
<b>T<sub>reg</sub></b>	Regulatorische T-Zelle
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Tumornekrosefaktor $\alpha$
<b>TS-Oligo-Sequenz</b>	<i>Template switching</i> Oligo-Sequenz
<b>TZR/TCR</b>	T-Zell-Rezeptor ( <i>T cell receptor</i> )
<b>uC</b>	Unbehandelter MS Patient ( <i>untreated MS control</i> )
<b>UMI</b>	<i>Unique Molecular Identifiers</i>
<b>UPM</b>	Universalprimer
<b>YPV</b>	Gelb-Fieber-Virus ( <i>Yellow-Fever-Virus</i> )
<b>ZNS</b>	Zentrales Nervensystem

# Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Multiple Sklerose .....	1
1.1.1	Definition .....	1
1.1.2	Epidemiologie der MS.....	1
1.1.3	Ätiologie der MS.....	2
1.1.4	Diagnose und klinischer Verlauf.....	3
1.2	Allgemeine und spezielle Pathophysiologie.....	5
1.2.1	T-Lymphozyten in der adaptiven Immunantwort.....	5
1.2.2	Pathophysiologie der MS.....	8
1.3	Therapie der MS .....	10
1.3.1	Allgemeine Therapieoptionen.....	10
1.3.2	MS Therapie mit Fingolimod.....	12
1.4	Ziele dieser Arbeit.....	15
2	Material und Methoden.....	16
2.1	Material .....	16
2.1.1	Patientenpopulation und Probenmaterial .....	16
2.1.2	Material, Untersuchungsgeräte und Datenverarbeitungsprogramme .....	17
2.2	Methoden .....	26
2.2.1	Multiparametrische Zellanalyse mittels Durchflusszytometrie .....	26
2.2.2	Boten-RNA Isolation mit Hilfe von TRIzol®.....	29
2.2.3	Komplementäre DNA Synthese mit Hilfe des <i>SMARTer® Race 5'/3' Kits</i> ....	29

2.2.4	Protokoll zur Etablierung einer TZR- <i>Library</i> .....	31
2.2.5	Einbringen der Illumina Adapter Sequenzen.....	33
2.2.6	Magnetische <i>Bead</i> Aufreinigung.....	33
2.2.7	Einbringen der Barcode Sequenz.....	34
2.2.8	Gelelektrophorese, Gel Extraktion und Aufreinigung.....	35
2.2.9	Quantifizierung mittels Qubit 2.0 und Vorbereitung der Gen- <i>Library</i> .....	37
2.2.10	Sequenzierung.....	37
2.2.11	Auswertung.....	38
3	Ergebnisse.....	39
3.1	Durchflusszytometrische Messungen der T-Zellpopulationen.....	39
3.1.1	Totale Zellzahlen und CD3+ T-Zellpopulationen.....	39
3.1.2	CD4+ CCR7+ und CCR7- T-Zell-Subpopulationen.....	42
3.2	Allgemeine Statistik der NGS Rohdaten der CD4+ T-Zellen.....	45
3.3	TZR- $\beta$ -Rekombination der CD4+ T-Zellen.....	48
3.3.1	CD4+ CCR7+ T-Zell-Subpopulation.....	48
3.3.2	CD4+ CCR7- T-Zell-Subpopulation.....	52
3.4	Klonalität und Diversität des TZR- $\beta$ -Repertoires der CD4+ T-Zellen.....	56
3.4.1	CD4+ CCR7+ TZR- $\beta$ -Repertoire.....	56
3.4.2	CD4+ CCR7- TZR- $\beta$ -Repertoires.....	61
3.5	Longitudinale Persistenz des CD4+ TZR- $\beta$ -Repertoires.....	65
3.5.1	CD4+ CCR7+ TZR- $\beta$ -Repertoires.....	65
3.5.2	CD4+ CCR7- TZR- $\beta$ -Repertoires.....	66
3.6	Hochfrequente CDR3 Sequenzen im TZR- $\beta$ -Repertoire.....	67

3.6.1	CD4+ TZR- $\beta$ -Repertoire des Patienten C .....	67
3.6.2	CD4+ TZR- $\beta$ -Repertoire des Patienten D .....	70
3.6.3	CD4+ TZR- $\beta$ -Repertoire des unbehandelten MS Patienten .....	72
3.6.4	CD4+ TZR- $\beta$ -Repertoire der gesunden Kontrolle .....	74
3.7	Identifizierung öffentlicher und privater Klonotypen .....	76
3.7.1	CD4+ CCR7+ T-Zell-Subpopulation .....	76
3.7.2	CD4+ CCR7- T-Zell-Subpopulation .....	78
3.8	Identifizierung der Epitop Spezies.....	80
3.8.1	CD4+ CCR7+ T-Zell-Subpopulation .....	80
3.8.2	CD4+ CCR7- T-Zell-Subpopulation .....	82
4	Diskussion und Schlussfolgerung .....	85
4.1	CD4+ T-Zell-Subpopulationen und Fingolimod .....	85
4.2	TZR- $\beta$ -Repertoire Abbildung .....	88
4.2.1	V-J-Rekombination der CD4+ T-Zellen und Fingolimod .....	90
4.2.2	Diversität des CD4+ TZR- $\beta$ -Repertoires und Fingolimod .....	91
4.2.3	Klonotypen im TZR- $\beta$ -Repertoire der CD4+ T-Zellen und Fingolimod .....	93
4.2.4	Charakterisierung der Klonotypen im TZR- $\beta$ -Repertoire .....	95
4.3	Grenzen und Möglichkeiten der Methode der TZR- $\beta$ -Repertoireanalyse.....	97
4.4	Schlussfolgerung .....	100
5	Interessenkonflikt.....	101
6	Literaturverzeichnis.....	101

# 1 Einleitung

## 1.1 Multiple Sklerose

### 1.1.1 Definition

Die Multiple Sklerose (MS), auch Enzephalomyelitis disseminata genannt, ist eine chronisch entzündliche und demyelinisierende Krankheit des zentralen Nervensystems (ZNS). Sie ist der häufigste Grund für neurologische Behinderungen. Die häufigste Verlaufsform, die schubförmige remittierende MS (*relapsing remitting multiple sclerosis* - RR-MS), ist charakterisiert durch das Auftreten neurologischer Dysfunktionen im Rahmen von Schüben, Perioden der Remission und schließlich bei den meisten Patienten durch den Verlust kognitiver oder funktioneller Fähigkeiten. Dabei finden sich demyelinisierende Läsionen im zentralen Nervensystem. Ätiologisch wird ein multifaktorielles Geschehen vermutet. Die Ursache für die neurologischen Dysfunktionen sind zentrale Entzündungsvorgänge, deren Pathomechanismen trotz großen Fortschritten in der Forschung noch nicht vollständig geklärt sind. Im Fokus steht die Hypothese einer T-Zell vermittelten autoreaktiven Inflammation des ZNS', wobei ein Autoantigen bisher nicht gefunden wurde. Derzeit gibt es noch keinen kurativen Therapieansatz für die MS. Durch den Einsatz von immunsuppressiven und immunmodulativen Medikamenten, wie Interferon- $\beta$ , Natalizumab, Fingolimod oder Alemtuzumab, kann der Krankheitsverlauf positiv beeinflusst werden. Trotz allem lässt sich die Progression der Krankheit nicht aufhalten (Binder, 2009).

### 1.1.2 Epidemiologie der MS

Die weltweite Prävalenz der MS lag 2020 bei 2,8 Millionen Menschen. Global stieg die Prävalenz von 33 auf 35,9 pro 100.000 Einwohner im Zeitraum von 2013 bis 2020 (Walton et al., 2020). Im Zeitraum von 1950 bis 2010 stieg auch die Inzidenz der MS in Westeuropa, mitunter Deutschland, und Nordamerika an (Koch-Henriksen und Sørensen, 2010; Fasbender und Kölmel, 2008). Bei gleichzeitiger Zunahme der

verfügbaren Magnetresonanztomographien (MRTs) und der Zahl der praktizierenden Neurologen ist unklar, ob diese Veränderungen auf einen Anstieg der Erkrankung, auf bessere Diagnostik und Dokumentation oder eine verlängerte Lebenserwartung zurückzuführen ist (Browne et al., 2014; Koch-Henriksen und Sørensen, 2010). Trotz globalen Auftretens zeigt die Prävalenz der Multiplen Sklerose regionale Unterschiede. So liegt 2020 die Prävalenz von MS in Europa bei 142,8 pro 100.000 Einwohner, in Afrika hingegen bei 8,8 pro 100.000 Einwohner (Walton et al., 2020). Im Jahr 2013 erkrankten Frauen in Europa dabei rund drei Mal häufiger an MS als Männer (Kingwell et al., 2013). In Deutschland zeigte sich, dass sowohl Frauen als auch Männer mit einem durchschnittlichen Alter von 37,6 Lebensjahren erkrankten. Die Altersspanne reichte bei beiden Geschlechtern etwa vom 20. bis 60. Lebensjahr (Fasbender und Kölmel, 2008).

### 1.1.3 Ätiologie der MS

Die Ätiologie der MS ist noch vollständig verstanden. Zusammenhänge mit dem Epstein-Barr-Virus (EBV), einer Rauch- und Ultraviolett-B-Exposition sowie dem Vitamin D Haushalt konnten gefunden werden. Eine multifaktorielle Genese mit exogenen Umwelteinflüssen und genetischen Faktoren wird vermutet. (Ramagopalan et al., 2010) In Migrationsstudien zeigte sich ein unverändert niedriges Erkrankungsrisiko bei Umsiedlungen von Niedrig-Prävalenz- zu Hoch-Prävalenzgebieten im adulten Lebensabschnitt. Bei Geburt in einem Hoch-Prävalenzgebiet entsprach das Erkrankungsrisiko dem der regionalen Bevölkerung (Dean and Kurtzke, 1971; Kurtzke, 2013). Es zeigte sich, dass eine negative Serologie für EBV das Risiko, an einer MS zu erkranken, reduziert (Ascherio and Munger, 2007; Pakpoor et al., 2013). Symptomatische Infektionen mit dem Virus verdoppelten hingegen das Risiko einer Erkrankung (Handel et al., 2010). Somit wird als potentielle Ursache der MS ein durch EBV ausgelöstes molekulares Mimikry in Betracht gezogen (Lang et al., 2002). Gleichzeitig ist eine EBV induzierte B-Zell Immortalisierung und Transformierung ein diskutierter Pathomechanismus der MS (Tracy et al., 2012).

Auf eine genetische Prädisposition wiesen die Ergebnisse von Familien- und Zwillingsstudien hin. Einer von acht Patienten zeigte eine familiäre Geschichte von MS (Harirchian et al., 2018). Zwillingsstudien zeigten unterschiedliche Konkordanzen beim Auftreten von MS unter Zwillingen. Eine Konkordanz unter eineiigen Zwillingen von 30 % fand sich in Kanada. Im Vergleich zu zweieiigen Zwillingen war die Konkordanz um ein 10-faches erhöht (Sadovnick et al., 1993). Außerdem wurde für mehr als 100 Gene eine Assoziation zur MS gefunden. Das höchste genetische Risiko ließ sich für das Gen HLA-DRB1\*15:01 identifizieren. Homozygote Träger erkrankten retrospektiv ungefähr sechs Mal häufiger, heterozygote Träger ungefähr drei Mal häufiger an MS als Nicht-Träger des Gens (Hollenbach and Oksenberg, 2015). In der Ätiologie der MS zeichnet sich somit ein multifaktorielles Geschehen aus genetischer, infektiöser und umweltbedingter Genese ab.

#### 1.1.4 Diagnose und klinischer Verlauf

Die Diagnose der MS basiert seit 2001 auf den McDonald Kriterien, die im Verlauf mehrfach revidiert wurden. Die Hauptaspekte der Diagnosestellung sind die Klinik und der Befund der Magnetresonanztomographie (MRT). Als Grundlage dient der Nachweis der räumlichen und örtlichen Dissemination von MRT Läsionen und/oder klinischen Ereignissen. Zusätzlich kann differentialdiagnostisch die Liquoranalyse mit dem Nachweis einer intrathekalen Immunglobulinsynthese, sogenannten oligoklonalen Banden, hinzugezogen werden. (McDonald et al., 2001; Polman et al., 2011, 2005; Thompson et al., 2018).

Das Auffinden von unterschiedlich lokalisierten MRT Läsionen oder das Auftreten von Schüben anderen Ursprungs wird örtliche Dissemination genannt. Das Wiederauftreten oder das Neuauftreten von MRT Läsionen und/oder Schüben wird als zeitliche Dissemination bezeichnet. Typische MS Läsionen lassen sich sowohl in der T1 als auch der T2 Wichtung des MRTs nachweisen. Dabei lässt sich das Signal in der T2 Wichtung durch die Applikation des Kontrastmittels (KM) Gadolinium verstärken. Typische Manifestationsorte sind periventrikuläre, juxtakortikale, infratentorielle sowie spinale ZNS Areale. Es besteht eine signifikante Korrelation

zwischen Schubanzahl und Anzahl der KM-anreichernden Läsionen (Grossman et al., 1988).

Folgende Verlaufsformen werden klinisch nach Lublin et al., 2014 unterschieden:

- Schubförmig Remittierende MS  
(*relapsing remitting multiple sclerosis – RR-MS*)
- Sekundär Progrediente MS  
(*secondary progredient multiple sclerosis – SP-MS*)
- Primär Progrediente MS  
(*primary progredient multiple sclerosis – PP-MS*)

Ein initiales Ereignis eines typischen neurologischen Defizits mit Hinweis auf ein demyelinisierendes Geschehen und gleichzeitigem Fehlen der Kriterien der zeitlichen Dissemination wird als **klinisch isoliertes Syndrom (KIS)** beschrieben. Durch ein wieder auftretendes (zeitlich disseminiert) oder ein neues (zeitlich und örtlich disseminiert) neurologisches Ereignis wird dieses per Definition zur MS (Lublin et al., 2014; Miller et al., 2005).

Etwa 80 % der Patienten zeigen die Klinik einer schubförmig remittierenden MS (RR-MS). Als Schub wird dabei das Auftreten von neurologischen Defiziten über mehr als 24 Stunden bezeichnet. Danach kommt es über mehrere Wochen zur Stabilisierung oder einer Remission des neurologischen Defizits. Bis zu 65 % der Patienten mit RR-MS entwickeln eine sekundäre progrediente MS (SP-MS) mit einer progredienten Verschlechterung der Symptomatik. Der Übergang einer RR-MS in eine SP-MS kann dabei häufig nur retrospektiv diagnostiziert werden. Bei etwa 20 % der Patienten zeigt die MS primär einen progredienten Verlauf ohne Zeiten der Remission. (Compston and Coles, 2008)

Jedes Ereignis, abhängig vom Ort der Läsion, kann monosymptomatisch oder polysymptomatisch erscheinen. Die typischen Frühsymptome sind dabei Sensibilitätsstörungen, Motorik- und Koordinationsstörungen und die Ausbildung einer einseitigen Optikusneuritis (Weinshenker, 1998). Des Weiteren können kognitive

Beeinträchtigungen, wie eine Demenz, Störungen der Sexual-, Darm- und Blasenfunktion auftreten (Browne et al., 2014). Zur Quantifizierung der Behinderung dient der durch J. Kurtzke 1954/1983 beschriebene und erweiterte *Expanded Disability Status Scale* (EDSS). Dieser schätzt anhand der Gehstrecke und sieben weiteren Funktionssystemen, darunter die Pyramidenbahn, das Kleinhirn, der Hirnstamm, das sensorische System, die zerebrale Funktion, das visuelle System und die Blasen- und Mastdarmfunktion, den Behinderungsgrad auf einer Skala von 0, keine Defizite, bis 10, Tod durch MS, ein (Kurtzke, 1983). Es zeigen sich somit große interindividuelle Unterschiede in der Manifestation einer MS. Gleichzeitig findet sich trotz intensiven Forschungsbemühungen der Pharmakotherapie kein universell einsetzbares Medikament. Dieser individuelle klinische Verlauf bei MS Patienten stellt eine Herausforderung für die klinische Behandlung dar. So ist zu Beginn einer Therapie nie klar, ob und inwieweit ein klinischer Erfolg zu erzielen ist.

## 1.2 Allgemeine und spezielle Pathophysiologie

### 1.2.1 T-Lymphozyten in der adaptiven Immunantwort

Als zellulärer Bestandteil spielen T-Zellen, gemeinsam mit B-Zellen, eine wichtige Rolle im adaptiven, spezifischen Immunsystem. T-Zellen tragen mit der Expression des T-Zell-Rezeptors (TZR) die Aufgabe der Antigenerkennung. Assoziiert mit dem Oberflächenmolekül CD3 (CD - *cluster of differentiation*) bildet der TZR bei Antigenerkennung einen Komplex, der zur T-Zell Aktivierung führt (Kuhns et al., 2006).

Um eine möglichst große Variabilität und Spezifität in der Antigenabwehr zu gewährleisten, findet sowohl auf Ebene der Antikörper der B-Zellen als auch auf Rezeptorebene der T-Zellen die somatische Rekombination (V(D)J-Rekombination) statt. Die Zusammensetzung von  $\alpha$  und  $\beta$  Untereinheiten des TZR erfolgt per Zufall als Rekombination aus verschiedenen Kopien der Gensegmente V, D und J. Teil dieser variablen Domäne sind die komplementaritätsbestimmende Regionen (CDR - *complementarity determining region*), die für die Antigenbindung entscheidend sind. Unter CDR besitzt CDR3, bestehend aus V, D und J Anteilen, die größte Variabilität.

Auf die variable Domäne folgt auf Ebene des Genoms ein konstanter Genabschnitt (C), der bei jedem TZR gleich ist. So setzt sich die  $\alpha$ -Kette des TZR aus immer verschiedenen Kopien von den Gensegmenten V und J sowie einem konstanten Segment (C) zusammen. Die  $\beta$ -Kette besitzt neben den Segmenten V, J und C noch ein variables D Segment (Murphy et al., 2008).

Der TZR erkennt und bindet Antigene, die von anderen Zellen mittels MHC-Molekülen (MHC - Haupthistokompatibilitätskomplex) präsentiert werden. Antigene, die durch MHC-Klasse-1 präsentiert werden, werden von CD8+ T-Zellen erkannt. Diese Lymphozyten führen bei Antigenkontakt zur Einleitung der Apoptose, weswegen sie zytotoxische T-Zellen genannt werden. CD4+ T-Zellen, sogenannte T-Effektorzellen, erkennen Antigene, die mittels MHC-Klasse-2 Molekülen präsentiert werden. Die T-Effektorzellen werden anhand von Phänotypen und Funktion in Subpopulationen von T-Helferzellen differenziert. Dazu gehören Typ 1 ( $T_{h1}$ ), Typ 2 ( $T_{h2}$ ), Typ 17 ( $T_{h17}$ ), folliculäre Helferzellen ( $T_{fh}$ ) und induzierte regulatorische T-Zellen ( $iT_{reg}$ ) (Swain et al., 2012). Spezifische Reaktionen der verschiedenen T-Helferzellen können so über Expression von Zytokinen proinflammatorische sowie antiinflammatorische Kaskaden initiieren (Raphael et al., 2015).

Zur Bildung eines Immungedächtnisses entwickeln sich schrittweise Effektorzellen zu über mehrere Jahre persistierenden Effektor-Gedächtnis- und zentralen Gedächtnis-T-Zellen (Pepper and Jenkins, 2011). Bei Kontakt mit einem schon bekannten Antigen kann so eine schnellere sekundäre Immunantwort erfolgen (Ahmed and Gray, 1996; Dutton et al., 1998).

Der C-C Chemokinrezeptor Typ 7 (CCR7) dient mitunter zur Unterteilung der CD4+. Der Rezeptor wird vor allem auf T-Zellen exprimiert und vermittelt den Eintritt der Zellen in Lymphknoten. Einer seiner Liganden, CC-Chemokine Ligand 21, ist in hohen Konzentrationen in den hochendothelialen Venolen und den Stromazellen der T-Zone der lymphatischen Organe vorhanden. Auch der zweite Ligand, CCL19, findet sich in den Zellen der T-Zone (Cyster, 2005). So vermitteln beide Liganden nicht nur die Migration über die hochendothelialen Venolen in die lymphatischen Organe

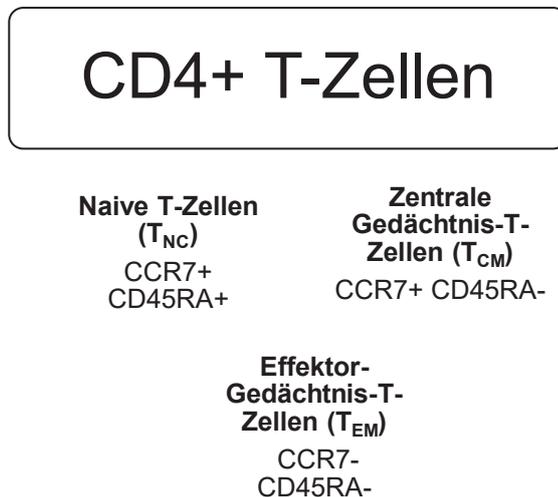
sondern auch die Mobilität innerhalb der T-Zone (Huang et al., 2007; Okada and Cyster, 2007; Worbs et al., 2007).

Nach Sallusto et al. werden die CD4<sup>+</sup> und auch die CD8<sup>+</sup> Gedächtnis-T-Zellen so in T-Zell-Subpopulationen unterteilt. Als weiterer Antikörper dient dabei CD45RA (Sallusto et al. 2004 und 1999):

CD4<sup>+</sup> T-Zellen lassen sich in drei Subpopulationen unterteilen. Dazu dienen CCR7 und CD45RA Antikörper. Die CD4<sup>+</sup> CCR7<sup>+</sup> Zellen werden in naive T- (T<sub>NC</sub>) und zentrale Gedächtnis-T- (T<sub>CM</sub>) Zellen unterteilt. T<sub>NC</sub> exprimieren neben CCR7 auch CD45RA, T<sub>CM</sub> exprimieren hingegen kein CD45RA. Der CCR7 führt zum Zurückführen (*Homing*) der Zellen zu den sekundären Lymphknotenstationen und somit zu keiner direkten Immunantwort der Zellen am Infektionsherd. Während diese Zellen in den sekundären lymphatischen Organen ruhen, können sie dendritische Zellen stimulieren und sich bei sekundärer Stimulation zu CCR7- Effektorzellen differenzieren. Zentrale Gedächtnis-T-Zellen exprimieren dabei vor allem IL-2. Die dritte Population der CD4<sup>+</sup> T-Zellen sind die Effektor-Gedächtnis-T-Zellen (T<sub>EM</sub>), die weder CCR7 noch CD45RA exprimieren. Sie exprimieren Rezeptoren, die für die Migration zu inflammatorischen Arealen verantwortlich sind, und besitzen so eine Rolle in der unmittelbaren Abwehrfunktion am Infektionsort. Innerhalb kurzer Zeit werden die Zellen durch bekannte Antigene aktiviert und es kommt zur Expression von vor allem IFN- $\gamma$ , IL-4 und IL-5. Bei Übergang einer zentralen Gedächtnis-T-Zelle in eine Effektor-Gedächtnis-T-Zelle gleicht sich das Zytokinspektrum dem einer Effektor-Gedächtnis-T-Zelle an. (Sallusto et al. 2004 und 1999)

In Abbildung 1 wird die Unterteilung der CD4<sup>+</sup> T-Zellen in die genannten Subpopulationen schematisch dargestellt.

Im Rahmen der MS kommt es zu einer Überreaktion des Immunsystems mit Folge der Abwehr körpereigener Strukturen. Während bisher einige beteiligte Zellen, mitunter CD4+ und CD8+ T-Zellen, aufgespürt werden konnten, bleibt die Frage nach den Antigenstrukturen ungeklärt.



**Abb. 1: Einteilung der CD4+ T-Zellen in ihre T-Zell-Subpopulationen.** CD4+ Zellen lassen sich nach Sallusto et. al (2004 und 1999) unterteilen in naive T-Zellen (CCR7+, CD45RA), zentrale Gedächtnis-T-Zellen (CCR7+, CD45RA-) und Effektor-Gedächtnis-T-Zellen (CCR7-, CD45RA-).

## 1.2.2 Pathophysiologie der MS

Trotz enormer Forschungsbemühungen ist das Wissen über die pathophysiologischen Mechanismen der MS noch unvollständig. Im Folgenden wird die Pathophysiologie der schubförmig verlaufenden MS in den Fokus gestellt.

Im Mittelpunkt des Verständnisses der Pathophysiologie der MS liegt eine durch autoreaktive T-Zellen vermittelte Entzündungsreaktion des ZNS. Autoreaktive T-Zellen, mit Dominanz von CD8+ T-Zellen, wandern über die Bluthirnschranke in das ZNS und induzieren dort durch Stimulation von Makrophagen und Produktion von mitunter proinflammatorischen Zytokinen eine Entzündungsreaktion (Lassmann et al., 2001). Auch B-Zellen werden in diesem Prozess zur Antigenpräsentation, Zytokin- und

Antikörperproduktion stimuliert und tragen so zur Pathologie bei (Magliozzi et al., 2007). Resultat dieser Immunreaktion sind charakteristische, inflammatorische Läsionen im ZNS. Die Läsionen lassen sich sowohl in der weißen als auch in der grauen Substanz des ZNS' finden. Häufige Manifestationsorte sind in der weißen Substanz die periventrikulären Regionen, das optische System, der Corpus Calossum, der Pedunculus cerebellaris, der Hirnstamm und Regionen des Rückenmarks (Compston and Coles, 2008). In den Läsionen sind neben demyelinisierten Axonen, proliferierenden Astrozyten und einer verminderten Anzahl an Oligodendrozyten, vor allem infiltrierende CD4+ und CD8+ Lymphozyten und Makrophagen zu finden (Huang et al., 2017). Gleichzeitig zeigt sich in den Läsionen eine Suppression der Signalwege, die die Antwort der CD4+ T-Zellen und der gewebsschädigenden zytotoxischen CD8+ T-Zellen inhibieren (Bitsch et al., 2000; Hu et al., 2004). Als Folge einer überaktiven Immunreaktion finden sich axonale Demyelinisierungen mit axonalem Schaden und Untergang. Der Mechanismus der axonalen Demyelinisierung ist dabei hauptsächlich mit Antikörper und Komplement vermittelten Veränderungen sowie hypoxischen Gewebsschäden assoziiert (Zindler and Zipp, 2010). Außerdem werden Myelinscheiden durch Produkte von Makrophagen und Mikroglia geschädigt. Dazu zählen zytotoxische Zytokine, Excitotoxine, reaktive Sauerstoff- und Stickstoffspezies (Lassmann et al., 2012).

Experimente zeigten, dass in demyelinisierten MS Läsionen vor allem CCR7+ T-Zellen zu finden sind. Gleichzeitig fanden sich auch bis zu 90 % CCR7+ T-Zellen in Liquorproben von MS Patienten. Dabei zeigten die CCR7+ Zellen den Phänotyp zentraler Gedächtnis-T-Zellen (Kivisäkk et al., 2004). Somit kann die Hypothese aufgestellt werden, dass sich ein Großteil der autoreaktiven T-Zellen unter den CCR7+ zentralen Gedächtnis-T-Zellen befindet. Zu den zentralen Gedächtnis-T-Zellen zählen auch T<sub>h</sub>17 Zellen. Durch die Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine, wie IL-17 und IL-22, induzieren diese Zellen die Zerstörung der Blut-Hirn-Schranke (Jadidi-Niaragh and Mirshafiey, 2011).

Es zeigte sich, dass die neurologische Beeinträchtigung nicht primär durch die Demyelinisierung resultiert, sondern durch axonalen Schaden. Zu Beginn der

Erkrankung existiert eine axonale Regenerationskapazität, die im Verlauf ausgeschöpft wird und zu irreversiblen Veränderungen führt. Eine Hypothese ist, dass dies den Übergang einer RR-MS in eine SP-MS verursacht. (Bjartmar et al., 2003) Im progressiven Verlauf gipfelt die MS in eine diffuse Atrophie der grauen und weißen Substanz mit zugleich diffusem Schaden der normal erscheinenden weißen Substanz außerhalb der Läsionen (Mahad et al., 2015).

Trotz einiger Fortschritte in der Erforschung des Pathomechanismus der MS bleiben viele Fragen unbeantwortet. Als wichtigste Unbekannte bleibt dabei die Ursache für die Induktion der autoreaktiven T-Zellen zu klären. Das Auffinden von klonal veränderten autoreaktiven T-Zellen würde indirekte Hinweise auf deren Autoantigen(e) liefern. Dabei könnten die CCR7+ zentralen Gedächtnis-T-Zellen wegen ihrer starken Präsenz in MS Läsionen als zentraler Ansatzpunkt gelten. Eine Identifikation von klonal veränderten autoreaktiven T-Zellen und deren Antigen(en) würde neue Ansatzpunkte für eine möglicherweise kurative Therapie der MS bieten.

## 1.3 Therapie der MS

### 1.3.1 Allgemeine Therapieoptionen

Bislang steht für keine Form der MS eine kurative Therapie in Aussicht. Im Weiteren soll der Fokus auf die Therapie der RR-MS gelegt werden.

In der Therapie der MS wird zwischen Medikamente zur Behandlung eines akuten Schubes, Verlaufs modulierenden (DMT, *Disease-Modifying Therapies*) und Symptom kontrollierenden Therapeutika unterschieden. Letztere sind grundsätzlich nicht MS-spezifisch und zielen auf die Eindämmung der neurologischen Symptomatik ab. Anwendung finden beispielsweise Anticholinergika und Therapeutika gegen neuropathischen Schmerz. Hoch dosierte Glucocorticoide werden bei initialen oder akuten Schüben, die nicht infektiös sind, eingesetzt. Die immunsuppressive und antiphlogistische Wirkung der Glucocorticoide grenzt zwar die Schubdauer und das

Ausmaß der Beeinträchtigung ein, einen Langzeiteffekt auf das Fortschreiten der Erkrankung zeigte sich jedoch nicht (Spain et al., 2009).

Zu den Basismedikamenten der DMTs gehören beispielsweise Interferon- $\beta$  (Interferon- $\beta$ -1a und -1b), Glatirameracetat und Teriflunomid. Interferone zeigten in Studien eine signifikante Reduktion der Schubrate und der KM-anreichernden Läsionen im MRT (Comi et al., 2001). Glatirameracetat und Teriflunomid zeigten eine vergleichbare Wirksamkeit (Johnson et al., 1998; O'Connor et al., 2011). So sind Interferone und Glatirameracetat der Goldstandard der Basistherapie des KIS und der RR-MS.

Als Ansatz der Eskalationstherapie gilt unter den DMTs die Immunmodulation durch Medikamente wie Natalizumab und Fingolimod. Der humanisierte monoklonale Antikörper Natalizumab bindet an der  $\alpha$ 4-Untereinheit des  $\alpha$ 4 $\beta$ 1-Integrins, einem Oberflächenmolekül von T-Zellen. Als sogenannter Integrin  $\alpha$ 4-Inhibitor inhibiert Natalizumab die Migration der autoreaktiven T-Zellen über die Blut-Hirn-Schranke in das ZNS (Polman et al., 2006). Im nächsten Abschnitt wird, unter Berücksichtigung des Schwerpunktes dieser Arbeit, detailliert auf das Medikament Fingolimod eingegangen. Ein weiterer für die Zukunft sehr bedeutsamer Ansatz unter den DMTs ist die Immunrestitution. Beispielhaft zu nennen, ist der humanisierte monoklonale Antikörper Alemtuzumab, der an das Glykoprotein CD52 bindet und so eine Depletion von zirkulierenden T- und B-Zellen initiiert (Hartung et al., 2015). So bewirkt der Antikörper eine dauerhafte Veränderung der Lymphozytenzusammensetzung und damit eine Änderung der Funktionalität des Immunsystems (Karussis and Petrou, 2018).

Die oben genannten DMTs haben gemein, dass sie den Verlauf der RR-MS verbessern, jedoch in der sekundär progressiven Phase der MS keinen Vorteil mehr bieten (Ontaneda and Fox, 2015). Die durch die DMTs bewirkte Kontrolle der ZNS Inflammation ist zudem mit Risiken assoziiert. Zu nennen sind dabei besonders das Auftreten einer progressiven multifokalen Leukenzephalopathie, einer viralen Infektion des ZNS', sowie das erhöhte Risiko für das Auftreten einer sekundären

Autoimmunerkrankung (Berger and Fox, 2016; Tuohy et al., 2015). Während die MS Patienten eine große Heterogenität im Krankheitsverlauf und Therapieansprechen zeigen, besitzen auch DMTs unterschiedliche Effizienz- und Risikoprofile. Dies führt zu dem Wunsch, Therapiekonzepte auf individuelle Krankheitscharakteristika und Präferenzen anzupassen (Derfuss, 2012). Bisher ließen sich jedoch keine Biomarker für Diagnose, Prognose und Therapieansprechen des individuellen Patienten identifizieren (Comabella et al., 2016; Graber and Dhib-Jalbut, 2011).

### 1.3.2 MS Therapie mit Fingolimod

Fingolimod ist seit 2011 das erste zugelassene orale Medikament für die RR-MS (Brinkmann et al., 2010). Es ist ein chemisches Derivat des ISP-1/Myriocin, einem Metaboliten des Pilzes *Isaria sinclairii*, der in der traditionellen chinesischen Medizin Einsatz findet (Fujita et al., 1994; Adachi et al., 1995). In Plazebo Studien zeigte Fingolimod eine signifikante Reduktion der MS Schubrate pro Jahr von bis zu 60 %. Gleichzeitig sank das Risiko für irreversible neurologische Schäden (Cohen et al., 2010; Kappos et al., 2010a). Auch die MRT wies signifikant weniger KM-anreichernde Läsionen als die der Plazebo Gruppe auf (Kappos et al., 2010a; Radue et al., 2012). Gemessen an diesen Kriterien war eine höhere Wirksamkeit von Fingolimod gegenüber Interferon- $\beta$  nachweisbar (Cohen et al., 2010).

Nach oraler Aufnahme wird Fingolimod (FTY720) in der Leber durch die Spingosin-Kinase-2 zu FTY720-P phosphoryliert. Der nun aktive Metabolit bindet agonistisch an 4 von 5 Subtypen (S1P<sub>1</sub>, S1P<sub>3</sub>, S1P<sub>4</sub>, S1P<sub>5</sub>) des Spingosin-1-Phosphat (S1P) Rezeptors. S1P Rezeptoren werden in verschiedenen Organsystemen exprimiert und induzieren bei Aktivierung eine G-Protein gekoppelte Kaskade. In absteigender Häufigkeit findet sich der Rezeptor in folgenden Geweben: Gehirn, Lunge/Milz, kardiovaskuläres System und Niere. (Brinkmann, 2007) Die S1P Rezeptoren spielen mitunter eine Rolle in der Angiogenese (Allende et al., 2004; Allende and Proia, 2002), der Neurogenese (Mizugishi et al., 2005), der endothelialen Barrierefunktion (McVerry and Garcia, 2005; Sanchez et al., 2007; Singleton et al., 2006), der Regulation des vaskulären Tonus' (Coussin Frederic et al., 2002; Dantas et

al., 2003) und in der Mediation der Zellmigration (Disanza et al., 2005; Lepley et al., 2005). Der S1P<sub>1</sub> Rezeptor übernimmt dabei eine Schlüsselfunktion in der Migration von Lymphozyten. Bei Aktivierung reguliert er den Austritt der Lymphozyten aus lymphatischen Organen in das periphere Blut (Matloubian et al., 2004). Die Wirkung von S1P ist somit konträr zu der des C-C Chemokin-Rezeptors Typ 7, der die Migration der Lymphozyten zu den sekundären Lymphknoten initiiert. Nach dem Modell von Pham et. al. überwindet die Wirkung von S1P die CCR7 vermittelte Lymphozyten Retention (Pham et al., 2008).

Fingolimod inhibiert die Wirkung von S1P. Durch die agonistische Bindung von FTY720-P kommt es zu einer Internalisierung des S1P<sub>1</sub>-Rezeptors und somit zu einer funktionellen Antagonisierung mit Inhibition der Lymphozyten Migration. Fingolimod induziert so die Rückführung der Lymphozyten, darunter auch die autoreaktiven Lymphozyten, zu den sekundären lymphatischen Organen. (Brinkmann et al., 2004; Matloubian et al., 2004) In Folge dessen kommt es zu einer Reduktion der Lymphozyten im peripheren Blut um bis zu 85 % und damit zu einer Änderung der Zusammensetzung aller peripheren Lymphozyten (Kahan et al., 2003). Es zeigte sich, dass sowohl die Population der B-Zellen als auch die der T-Zellen in ihrer Zellzahl supprimiert werden (Mehling et al., 2008; Miyazaki et al., 2014; Nakamura et al., 2014).

Durch das Wegfallen des Gegenspielers des CCR7 führt die Therapie mit Fingolimod zu einer Reduktion der CCR7 exprimierenden Zellen im peripheren Blut mit Retention möglicher autoreaktiver T-Zellen in den sekundären Lymphorganen (Claes et al., 2014; Kivisäkk et al., 2004; Mehling et al., 2010, 2008). Mitunter werden so auch die T<sub>h</sub>17 Zellen, die die Blut-Hirn-Schranke angreifen, in den sekundären Lymphorganen gehalten (Jadidi-Niaragh and Mirshafiey, 2011). Somit kommt es durch Retention der zentralen Gedächtnis-T-Zellen in Lymphorganen zur Unterbrechung der Inflammationskaskade.

Neben der Veränderung der Zusammensetzung des peripheren Blutes gibt es die Hypothese, dass Fingolimod auch direkt neuroprotektiv im ZNS wirkt (Dev et al., 2008). Durch seine lipophile Natur kann das Molekül sich ungehindert im Gewebe des ZNS

anreichern und dort zum aktiven Metaboliten phosphoryliert werden (Billich et al., 2003; Foster et al., 2007). Fingolimod zeigte in Experimenten sowohl einen Effekt auf die Blut-Hirn-Schranke als auch auf die zerebralen Zellen. *In vitro* konnte eine dosisabhängige positive Wirkung auf das neuronale Zellüberleben, die Zelldifferenzierung und die zytoskeletale Dynamik festgestellt werden (Coelho et al., 2007; Miron et al., 2008).

Die Behandlung der MS mit Fingolimod kann jedoch mit Nebenwirkungen verbunden sein. Longitudinale Untersuchungen von Kappos et al. (2010) und Cohen et al. (2010) ergaben neben häufigen leichten Nebenwirkungen wie einem Anstieg der Alanin-Aminotransferase, Übelkeit, Durchfall und Bauchschmerzen, weitere seltenere Nebenwirkungen wie mitunter einer veränderten AV-Überleitung, einem milden Anstieg des Blutdrucks, eine Infektneigung sowie die Entwicklung eines Makulaödems. Die häufigste, per Definition schwere unerwünschte Nebenwirkung war das Auftreten einer Bradykardie, die häufig durch den Patienten unbemerkt nach Ersteinnahme des Medikaments auftrat. Weitere häufige schwere unerwünschte Wirkungen waren das Auftreten eines Malignoms, darunter am häufigsten des Basalzellkarzinoms und das Erleiden eines MS Schubes. Insgesamt traten schwere Nebenwirkungen mit einer Häufigkeit von <1 % auf. (Cohen et al., 2010; Kappos et al., 2010) Kappos et al. (2010) zeigte dabei, dass nach zwei Jahren Therapie bis zu 30 % der MS Patienten einen erneuten Schub erlitten. Das Auftreten der in Abschnitt 1.3.1 bereits erwähnten progressiven multifokalen Leukenzephalopathie zeigte sich unter Therapie mit Fingolimod mit einer Inzidenz von <1:10.000 (Berger et al., 2018). In den longitudinalen Beobachtungen von Cohen et al. (2010) und Kappos et al. (2010) wurden keine sekundären Autoimmunerkrankungen unter Fingolimod Therapie beschrieben. Lysandropoulos und Benghiat (2013) beschrieben den Fall eines 19-jährigen MS Patienten, der sich unter Fingolimod Therapie mit einer autoimmunhämolytischen Anämie präsentierte. Zur Beurteilung langfristiger unerwünschter Nebenwirkungen sind weitere Studien abzuwarten.

Trotz wichtiger Werkzeuge, wie MRT, Liquordiagnostik und dem klinischen EDSS Score, bleibt der heterogene Verlauf einer MS mit und auch ohne Therapie

unvorhersehbar. Zum Zeitpunkt der Diagnose einer MS bleibt schwer abzuschätzen, welche Patienten ein erhöhtes Risiko besitzen, schwerwiegende Nebenwirkungen zu entwickeln oder auf eine Therapie nicht anzusprechen. Es bleibt somit eine Herausforderung, das individuelle Therapieansprechen und die individuellen Therapierisiken der Patienten zu erkennen.

## 1.4 Ziele dieser Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist es, das periphere lymphozytäre Repertoire von MS Patienten im Allgemeinen und unter Therapie mit Fingolimod im Vergleich zu Gesunden zu charakterisieren. Mittels *Next Generation Sequencing* (NGS) wurde das TZR- $\beta$ -Repertoire anhand der Variablen der Diversität, der Klonalität, klonaler Persistenzen und klonaler CDR3 Sequenzen von peripheren CD4<sup>+</sup> CCR7<sup>+</sup> T<sub>NC</sub> und T<sub>CM</sub> Zellen sowie CD4<sup>+</sup> CCR7<sup>-</sup> T<sub>EM</sub> Zellen von zwei MS Patienten unter Therapie mit Fingolimod, einem unbehandelten MS Patienten und einer gesunden Kontrolle im zeitlichen Verlauf von 10 bzw. 12 Monaten abgebildet. Die ermittelten Repertoirevariablen bieten die Chance, Unterschiede zwischen MS Patienten und gesunden Probanden aufzuzeigen und somit als mögliche Grundlage für weitere laborchemische Instrumente zur Diagnose- und Prognosestellung in der MS zu fungieren. Gleichzeitig soll der Vergleich der TZR- $\beta$ -Repertoires der MS Patienten unter Therapie und des unbehandelten MS Patienten den immunmodulatorischen Effekt von Fingolimod auf das periphere Immunrepertoire der CD4<sup>+</sup> T-Zellen genauer charakterisieren, um so therapieassoziierte Nebenwirkungen besser zu verstehen. Die Abbildungen der TZR- $\beta$ -Repertoires von MS Patienten soll außerdem helfen, die Pathomechanismen der MS besser zu verstehen. T-Zellen mit möglichen autoimmunen Ursprung könnten so erfasst werden, und durch die Analyse der TZRs könnten Rückschlüsse auf MS spezifische Antigene ermöglicht werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Patientenpopulation und Probenmaterial

Nach der Zulassung des Projekts durch das Ethikkomitee der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf vom 22. Juni 2012 (Studennummer MC-LKP-553; EudraCT-Nummer: 2011-005732-25; Prüfplancode: Fingo\_HHU) wurde nach schriftlichem Einverständnis von zwei weiblichen Patientinnen (Pat. C und Pat. D) mit der Diagnose RR-MS nach Blutabnahme das TZR- $\beta$ -Repertoire mittels *Next Generation Sequencing* zu verschiedenen Zeitpunkten unter Therapie mit Fingolimod analysiert. Als Vergleichskontrollen dienten nach schriftlichem Einverständnis die Proben eines männlichen unbehandelten MS Patienten (uC) und einer weiblichen gesunden Kontrolle (hC).

Allen Patientinnen unter Therapie mit Fingolimod wurde vor Beginn der Therapie (m0) und nach 12 (m12) Monaten Therapie Blut abgenommen. Auch für die gesunde Kontrolle (hC) ergaben sich die Messpunkte m0 und m12. Dem unbehandelten MS Patienten (uC) wurde zu den Zeitpunkten m0 und m10 (nach 10 Monaten) Blut abgenommen.

Die Proben wurden diesem Projekt durch das neurologische Institut des Universitätsklinikum Düsseldorf in Form von nach Protokoll isolierten und kryoarchivierten peripheren mononukleären Blutzellen (PBMCs) zur Verfügung gestellt und sind im Überblick in Tabelle 1 abgebildet.

<b>Probanden</b>	<b>Geschlecht</b>	<b>Alter zum Zeitpunkt m0</b>	<b>Blutabnahmezeitpunkte</b>
Patientin C (Pat. C)	weiblich	29 Jahre	m0, m12
Patientin D (Pat. D)	weiblich	36 Jahre	m0, m12
Unbehandelter MS Patient (uC)	männlich	46 Jahre	m0, m10
Gesunde Kontrolle (hC)	weiblich	23 Jahre	m0, m12

**Tabelle 1: Übersicht über die Patienten und die Kontrolle.** Dargestellt sind die MS Patienten unter Therapie mit Fingolimod (Pat. C und Pat. D) sowie der unbehandelte MS Patient (uC) und die gesunde Kontrolle (hC). Es werden das Geschlecht, das Alter zu Beginn der Probengewinnung und die Blutabnahmezeitpunkte aufgelistet. Zu Beginn (m0) und nach 10 bzw. nach 12 Monaten (m10, m12) fanden Blutabnahmen statt.

## 2.1.2 Material, Untersuchungsgeräte und Datenverarbeitungsprogramme

<b>Produkt und Beschreibung</b>	<b>Hersteller</b>
Advantage® 2 PCR Kit	Takara Bio Inc., Shimogyō-ku, Kyoto, Japan
Agarose	Sigma-Aldrich®, St.Louis, Missouri, USA
Agencourt AMPure XP Beads	Beckman Coulter Inc., Brea, Kalifornien, USA
Chloroform	VWR, Radnor, Pennsylvania, USA
DMEM Dulbecco's Modified Eagle Medium	ThermoFisher Scientific™, Waltham Massachusetts, USA
DNA- ExitusPlus™ BC	PanReac, AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
DNA Gel Loading Dye (6x)	ThermoFisher Scientific™, Waltham Massachusetts, USA

Qubit™ dsDNA HS-Assay Kit	ThermoFisher Scientific™, Waltham Massachusetts, USA
Dulbecco's PBS (1X) without Ca <sup>2+</sup> + Mg <sup>2+</sup>	ThermoFisher Scientific™, Waltham Massachusetts, USA Gibco™ by Life Technologies
Ethanol  Zum Gebrauch: 75 %ige und 80 %ige Lösung, verdünnt mit Nuklease freiem Wasser	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich®, St.Louis, Missouri, USA
Fetales Kälberserum (FBS)	Gibco™, ThermoFisher Scientific™, Waltham Massachusetts, USA
<i>Gene Ruler DNA Ladder Mix</i> 0,1µg/µl	ThermoFisher Scientific™, Waltham Massachusetts, USA
GlycoBlue™ Coprecipitant 15mg/ml Glycogen	Ambion®, ThermoFisher Scientific™, Waltham Massachusetts, USA
MiSeq Reagent Kits v2	Illumina, San Diego, Kalifornien, USA
Nuklease freies Wasser	Ambion®, ThermoFisher Scientific™, Waltham Massachusetts, USA
PhiX Control V3	Illumina, San Diego, Kalifornien
QIAquick Gel Extraction Kit	QIAGEN, Venlo, Niederlande
RNase AWAY, Surface Decontaminant	VWR, Radnor, Pennsylvania, USA
Recovery Cell Culture Freezing Medium	ThermoFisher Scientific™, Waltham Massachusetts, USA

SMARTer® Race 5' 3' Race Kit	Takara Bio Inc., Shimogyō-ku, Kyoto, Japan
Sybr® Safe DNA Gel Stain	ThermoFisher Scientific™, Waltham Massachusetts, USA
Tris-EDTA(TE) Puffer	Invitrogen, ThermoFisher Scientific™, Waltham Massachusetts, USA
TRIzol® Reagent	ThermoFisher Scientific™, Waltham Massachusetts, USA
Tryptan Blau	Bio-Rad, Hercules, California, USA
2-Propanol 100 %ige Lösung zum Gebrauch	Sigma-Aldrich®, St.Louis, Missouri, USA

**Tabelle 2.1: Chemikalien, Medien, Lösungen und Kits aus eigenem Bestand.**

<b>Antigen</b>	<b>Beschreibung</b>	<b>Hersteller</b>
CD 3	Wirt: Maus, Isotyp: IgG1 Fluoreszenz: PE, Klon: UCHT1; Katalog Nr.: A07747	Beckman Coulter GmbH Brea, Kalifornien, USA
CD 4	Wirt: Maus, Isotyp: IgG1, Fluoreszenz: FITC, Klon: RPA-T4, Katalog Nr.: 555346	BD Bioscience, BD Pharmingen, San Jose, Kalifornien, USA
CD 8	Wirt: Maus, Isotyp: IgG1 Fluoreszenz: PE/Cy7 Klon: SK1; Katalog Nr.: 344712	BioLegend®, San Diego, Kalifornien, USA
CD197/ CCR7	Wirt: Ratte, Isotyp: IgG2 <sub>a</sub> Fluoreszenz: Alexa Fluor 647	BD Bioscience, BD Pharmingen

	Klon: 3D12, Katalog Nr.: 557734	San Jose, Kalifornien, USA
Kern/DNA	Fluoreszenz: 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) Katalog Nr.: D1306	ThermoFisher Scientific™, Waltham, Massachusetts, USA

**Tabelle 2.2: Antikörper für die Durchflusszytometrie.**

<b>Primer</b>	<b>Sequenz (5'-3')</b>	<b>Quelle</b>
TCR_beta	AAC ACA GCG ACC TCG GGT GGG A	van Heijst et al., (2013)
UPM A Mix	Long: CTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG CAA GCA GTG GTA TCA ACG CAG AGT  Short: CTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG C	<i>SMARTer® Race 5' 3' Race Kit</i> , Clontech Laboratories, Inc.
5' Race CDS Primer A (12µM)	TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TVN	
SMARTer II A Oligonukleotide	AAG CAG TGG TAT CAA CGC AGA GTA CXX XXX	
FS_RACE	ACA CTC TTT CCC TAC ACG ACG CTC TTC CGA TCT AAG CAG TGG TAT CAA CGC AGA GT	Teil des Long aus <i>SMARTer Race Amplification Kit</i> und Illumina Adapter Sequenz** (in Anlehnung an Vollmers et al., (2013))

TCR_AdP1	TGA CTG GAG TTC AGA CGT GTG CTC TTC CGA TCT AAC ACA GCG ACC TCG GGT GGG AA	TCR_beta Primer Anteil und Illumina Adapter Sequenz** (in Anlehnung an Vollmers et al., (2013))
Reverse-III- AdP2_BC_X	CAA GCA GAA GAC GGC ATA CGA GAT <b>BARCODE</b> G TGA CTG GAG TTC AGA CGT GTG CTC TTC CGA TCT	Illumina Adapter Sequenz** mit variabler Barcodesequenz (in Anlehnung an Vollmers et al., (2013))
Forward-III- AdP2_BC_X	5' AAT GAT ACG GCG ACC ACC GAG ATC TAC AC <b>BARCODE</b> AC ACT CTT TCC CTA CAC GAC GCT CTT CCG ATC T 3'	Illumina Adapter Sequenz** mit variabler Barcodesequenz (in Anlehnung an Vollmers et al., (2013))

**Tabelle 2.3: Primer Bezeichnung, Sequenzen und Quellen der verwendeten Primer.** Die mit BARCODE markierten Sequenzen wurden durch Illumina-Barcodes aus Tabelle 2.4 ersetzt. (\*\*Oligonucleotide sequences © 2017 Illumina, Inc. All rights reserved. Derivative works created by Illumina customers are authorized for use with Illumina instruments and products only. All other uses are strictly prohibited.)

<b>15 Indices (5`-3`) für Forward-III- AdP2_BC_X*</b>	<b>17 Indices (5`-3`) für Reverse-III- AdP2_BC_X*</b>	<b>17 Indices (5`-3`) des Reverse-III-AdP2_BC_X* in der für den Einbau benötigten <i>reverse- complement</i> Form*</b>
D501 TATAGCCT	D701 ATTACTCG	D701 CGAGTAAT
D502 ATAGAGGC	D702 TCCGGAGA	D702 TCTCCGGA
D503 CCTATCCT	D703 CGCTCATT	D703 AATGAGCG

D504 GGCTCTGA	D704 GAGATTCC	D704 GGAATCTC
D505 AGGCGAAG	D705 ATTCAGAA	D705 TTCTGAAT
D506 TAATCTTA	D706 GAATTCGT	D706 ACGAATTC
D507 CAGGACGT	D707 CTGAAGCT	D707 AGCTTCAG
D508 GTA CTGAC	D708 TAATGCGC	D708 GCGCATTA

**Tabelle 2.4: Bezeichnung und Sequenzen der Illumina Barcodes.** Die mit BARCODE dargestellten Sequenzen werden durch die aufgelisteten Illumina Barcode Sequenzen ersetzt. In den Forward-III-AdP2\_BC-Primer wurde eine D50x-Sequenz eingebaut. Nach Synthese einer *reverse-complement* Form der D70x Sequenz wurde diese in den Reverse-III-AdP2\_BC-Primer eingebaut. (*\*Oligonucleotide sequences © 2017 Illumina, Inc. All rights reserved.*)

Produkt	Beschreibung	Hersteller
Corning®Costar® Stripetten, serologische Pipetten	25ml, 10ml, 5ml	Sigma Aldrich®, St.Louis, Missouri, USA
Einmalhandschuhe	MICRO-TOUCH® Nitra- Tex® EP™™	Ansell, Brüssel, Belgien
FACS Probenröhrchen	5ml mit 35µm Cell Strainer Cap	VWR, Radnor, Pennsylvania, USA
PCR Röhrchen	0,2ml	VWR, Radnor, Pennsylvania, USA
Pipettenspitze	10µl, 100µl, 200µl, 1000µl	STARLAB International GmbH, Hamburg, Deutschland TipOne®
Reaktionsgefäße	0,5ml, 1,5ml, 2ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Skalpell		Swann-Morton®, Sheffield, England UK

Spinsäulen	Bestandteil des QIAquick Gel Extraction Kit, 1,5ml	Qiagen, Venlo, Niederlande
Zentrifugierröhrchen	15ml, 50ml	greiner bio-one cellstar®, Kremsmünster, Oberösterreich

**Tabelle 2.5: Verbrauchsmaterialien.**

<b>Geräte</b>	<b>Hersteller</b>
Agencourt SPRIPlate 96 Super Magneten Platte	Beckman Coulter GmbH Brea, Kalifornien, USA
Autoclave Systec V-150	Systec, Linden, Deutschland
Cell culture sterile bench	SKAN, Allschwill, Schweiz
DNA/RNA Reinigungsbox	BioSan, Riga, Lettland
DynaMag™-2 Magnet	ThermoFisher Scientific™, Waltham Massachusetts, USA
Gel-Elektrophoresesystem	ThermoFisher Scientific™, Waltham Massachusetts, USA
Gel Imager	INTAS, Göttingen, Deutschland
Kühlgeräte -20°C -80°C	Liebherr, Bulle, Schweiz  ThermoFisher Scientific™, Waltham Massachusetts, USA  Sanyo, Mariguchi, Osaka, Japan
Mastercycler® Mastercycler® gradient	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Mikroskop Leica DM IL	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland

Nanodrop ® 2000 Spectrophotometer	ThermoFisher Scientific™, Waltham Massachusetts, USA
Pipetten	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipetus	Hirschmann Laborgeräte, Deutschland
Qubit 2.0 Fluorometer	ThermoFisher Scientific™, Waltham Massachusetts, USA
Standard-Mikrowelle	
Standard-Ultraviolett-Lampe	
Standard-Waage	Kern, Balingen, Deutschland
Stickstofftank	tec-lab, Taunusstein, Deutschland
Thermostat plus Thermomixer Comfort	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Vortexmischer Vortex Genie 2	Scientific Industries, Inc. Bohemia, New York, USA
Wasserbecken	Memmert, Schwabach, Deutschland
Zentrifuge 5417R Zentrifuge 5810R MiniSpin®	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
MiniStar Silverline	VWR, Radnor, Pennsylvania, USA

**Tabelle 2.6: Geräte aus eigenem Bestand.**

Gerät	Hersteller
MoFlo XDP	Beckman Coulter, Brea, Kalifornien, USA
Illumina Miseq	Illumina, San Diego, Kalifornien, USA

**Tabelle 2.7: Laborgeräte aus anderen Instituten.**

Einsatz	Software	Hersteller
Grafiken	Excel	Microsoft®, Redmond, Washington, USA
Vorbereitung des NGS	Illumina Experiment Manager Software	Illumina, San Diego, Kalifornien, USA
Datenprozessierung	MiXCR	MiLaboratory, Solana Beach, Kalifornien, USA nach Bolotin et al., (2015)
Grafiken	<i>RStudio</i>	RStudio Inc., Boston, Massachusetts, USA
Grafiken	<i>VDJtools</i>	MiLaboratory, Solana Beach, Kalifornien, USA nach Shugay et. al., (2015)
Grafiken	VDJdb	nach Bagaev et. al., (2020)

**Tabelle 2.8: Datenverarbeitungsprogramme.**

## 2.2 Methoden

Die Methodik wurde auf Basis der Dissertationsarbeit „*Next-Generation Sequencing* in der Neurologie: Etablierung einer Methode zur Immunrepertoireanalyse von T- und B-Lymphozyten und Anwendung der T-Zell-Rezeptorrepertoireanalyse bei Patienten mit Multipler Sklerose unter immunmodulatorischer Behandlung“ von Armin Scheffler (Scheffler, 2020) angewandt und weiter entwickelt. Gleichzeitig verweise ich auf noch folgende Veröffentlichungen der Arbeitsgruppe von Universitätsprofessor Dr. med. Norbert Goebels der Heinrich-Heine-Universität in Düsseldorf zur Abbildung des CD8+ TZR-Repertoires der hier untersuchten Probanden.

### 2.2.1 Multiparametrische Zellanalyse mittels Durchflusszytometrie

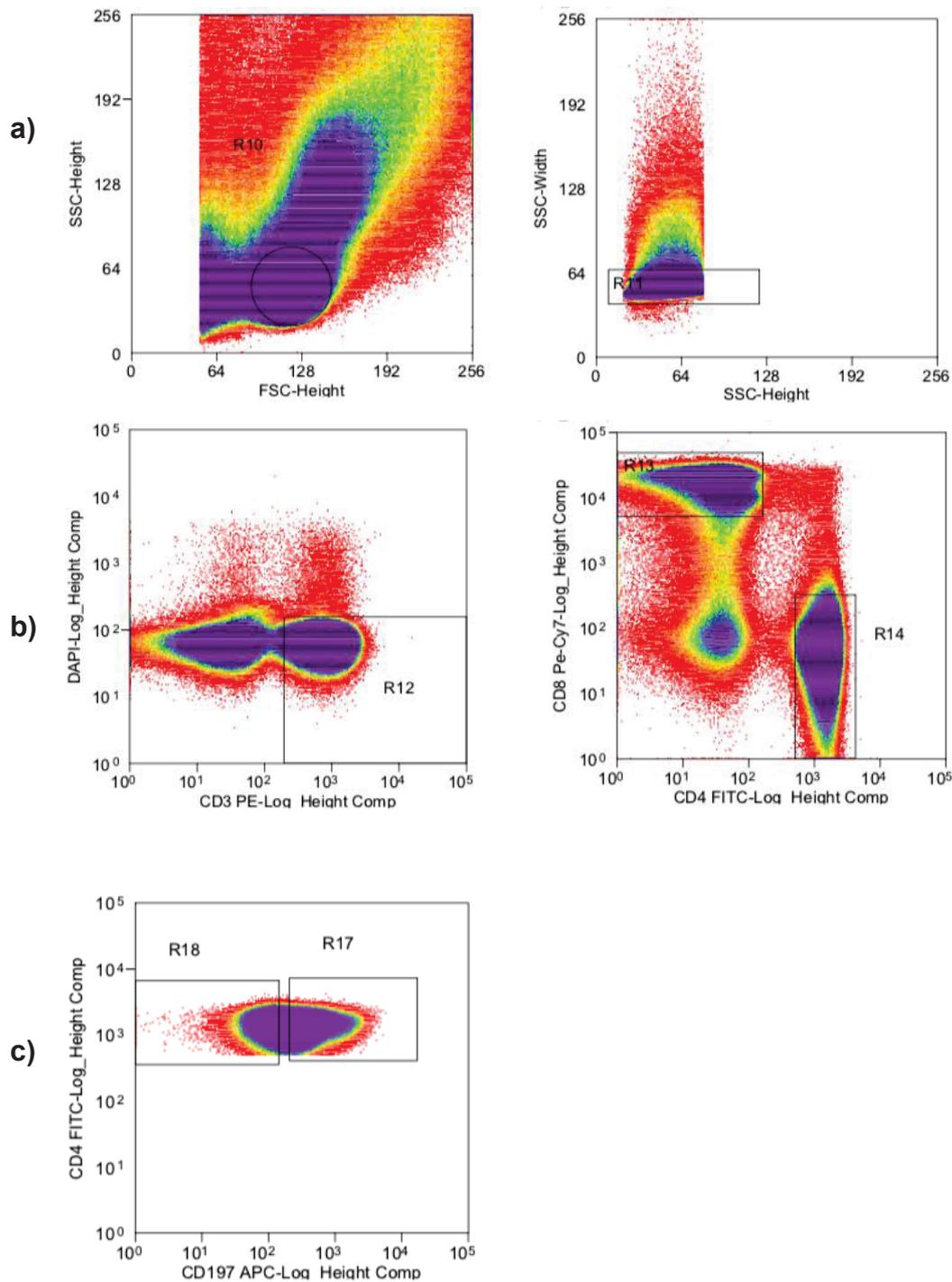
Nach zeitgerechtem Auftauen der kryoarchivierten PBMCs im Wasserbad wurden die Proben zweimal mit DMEM Medium mit 2 % FBS Anteil zur Entfernung des *Freezing Mediums* gewaschen und bei 300 G für 10 Minuten zentrifugiert. Nach Entfernung des Überstands nach der zweiten Zentrifugation folgte eine 20-minütige Inkubation mit monoklonalen Antikörpern. Dazu wurden 10 µl DAPI, 10 µl Anti-human CD3, 10 µl Anti-human CD4 und je 5 µl von Anti-human CD8 und Anti-human CD197/CCR7 auf das Pellet pipettiert. Nach der Inkubation wurden die gefärbten Zellen mit PBS mit 1 % FBS Anteil suspendiert und durch zwei Waschschriffe von überschüssigen Antikörpern getrennt. Es erfolgte ein Resuspension in 1 ml PBS mit 1 % FBS Anteil.

Mit Hilfe der *Core Flow Cytometry Facility* des Instituts für Transplantationsdiagnostik und Zelltherapeutika des Universitätsklinikums Düsseldorf wurden die Zellen mittels Durchflusszytometrie (*Fluorescence-Activated Cell Sorting - FACS*) durch den MoFlo XDP von Beckmann Coulter analysiert und sortiert. Das Ergebnis war eine FACS-Calibur auf Größe, Granularität und Fluoreszenz, die in einem Dotplot eingetragen wurde. Mittels Granularität und Größe wurden die Zellen differenziert und anhand der Fluoreszenz wurde die Expression der Oberflächenantigene bestimmt.

So wurden die Lymphozyten mittels CD3 Antikörper identifiziert. Diese Population wurde mittels CD4 und CD8 Antikörper in T-Helferzellen und zytotoxische T-Zellen differenziert. Eine weitere Unterteilung der CD4+ und CD8+ T-Zellpopulationen erfolgte mittels CCR7 Antikörper. So wurden die Zellen maschinell in **CD3+ CD4+ CCR7+** T-Zellen, darunter naive T-Zellen ( $T_{NC}$ ) und zentrale Gedächtnis-T-Zellen ( $T_{CM}$ ), und in **CD3+ CD4+ CCR7-** T-Zellen, darunter Effektor-Gedächtnis-T-Zellen ( $T_{EM}$ ), sowie in die äquivalent CD3+ CD8+ Subpopulationen sortiert.

Während die totale Zellzahl in den aufbereiteten PBMCs mittels Durchflusszytometrie erfasst wurde, galt als obere Grenze bei limitiertem Volumen der Eppendorf Gefäße eine Zellzahl von 400.000 Zellen.

Die in Vorexperimenten etablierte *Gating*strategie wird beispielhaft an einer gesunden Kontrolle (hC) in Abbildung 2 dargestellt.



**Abb. 2a-c:** Dotplot auf logarithmischer Scala einer Durchflusszytometrie am Beispiel einer gesunden Kontrolle (hC). Es erfolgte eine Einteilung der Zellen mittels Vorwärtsstreulicht (FSC) und Seitwärtsstreulicht (SSC) anhand von Zellgröße und -inhalt (R10/R11) (**Abb. 2a**). Mittels humanen CD3 Antikörper und DAPI wurde die lebende CD3+ Population der Leukozyten abgebildet (R12) (**Abb. 2b**). Eine Unterteilung in T-Helferzellen (R14) und zytotoxische T-Zellen (R13) erfolgte mittels humanen CD4 und CD8 Antikörpern. Die CD4+ Populationen wurde mittels CCR7 (CD197) in T-Zell-Subpopulationen von T<sub>CM</sub>/T<sub>NC</sub> (CCR7+, R17) und T<sub>EM</sub> (CCR7-, R15) unterteilt (**Abb. 2c**).

## 2.2.2 Boten-RNA Isolation mit Hilfe von TRIzol®

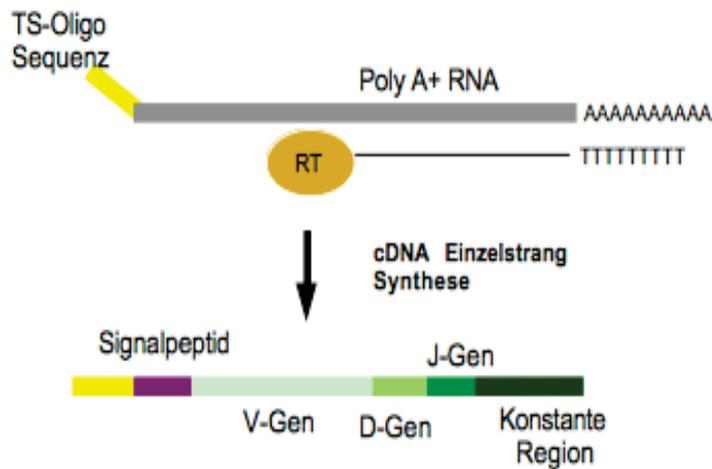
Die Boten-RNA (*messenger RNA* – mRNA) Isolation folgte dem Herstellerprotokoll des TRIzol® Reagenz. Zur Vorbereitung der RNA Isolation wurden alle Arbeitsflächen und Materialien mit 70 %igen Ethanol und *RNA Away Spray* gereinigt.

In 15 ml DMEM mit 2 % FBS Anteil wurden die sortierten Zellen gelöst. Nach einer 10-minütigen Zentrifugation bei 300 G und 4 °C wurde der Überstand entfernt, das Pellet mit 1ml Medium gespült und in ein steriles 1,5 ml Eppendorf transferiert. Darauf folgt eine 10-minütige Zentrifugation bei 300 G und 4 °C. Der Überstand wurde bis auf einen kleinen Rest (etwa 0,1 ml) entfernt und 0,75 ml TRIzol® wurden hinzu pipettiert. Nach leichtem Resuspendieren wurde das Gemisch 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde 200 µl Chloroform hinzugefügt. Per Hand wurde das Eppendorf 15 Sekunden lang gewendet, worauf eine 2 bis 3-minütige Inkubation bei Raumtemperatur folgte. Eine Zentrifugation für 15 Minuten bei 12.000 G und 4 °C folgte. Die farblose Phase wurde in ein steriles Eppendorf abpipettiert, mit 10 µg Glykogen und 0,5 ml 100 %igen Isopropanol vermischt. Nach 10-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur und einer 20-minütigen Aufbewahrung bei minus 20 °C Kühlung folgte eine Zentrifugation für 10 Minuten bei 12.000 G und 4°C. Der Überstand wurde entfernt und die Probe mit 1 ml 80 %igen Ethanol gemischt. Unter Vibration wurde die Probe vermischt und dann bei 7.500 G und 4 °C für 5 Minuten zentrifugiert. Nach Entfernen des Ethanols wurde die Pellet bei Luft getrocknet. Mit 20 µl Nuklease freiem Wasser wurde die mRNA gelöst und bei minus 80°C bis zum nächsten Schritt aufbewahrt.

## 2.2.3 Komplementäre DNA Synthese mit Hilfe des *SMARTer® Race 5'/3' Kits*

In einer Reverse-Transkriptase-Reaktion wurde basierend auf der Grundlage des *SMARTer® Race 5'/3' Kits* komplementäre DNA (cDNA) aus der isolierten mRNA synthetisiert. Eine vereinfachte schematische Darstellung der cDNA Synthese findet

sich in Abbildung 3. Die verwendeten Primer sind im Abschnitt 2.1.2. unter „Primer der cDNA Synthese und des TZR-*Library* Protokolls“ aufgelistet.



**Abb. 3: Vereinfachte Darstellung der 5' RACE cDNA Synthese auf Basis des *Template-Switch* Mechanismus modifiziert nach Matz et al., (1999).** In einer Reverse-Transkriptase-Reaktion (Reverse Transkriptase – RT) wird aus dem Ausgangsmaterial einer Poly A+ mRNA, nach Integration einer bekannten *Template-Switch*-Oligonukleotid Sequenz (TS-Oligo Sequenz) an das 5' Ende der mRNA, eine Einzelstrang cDNA synthetisiert. Ergebnis ist eine Einzelstrang cDNA des Lymphozytenrezeptors mit der konstanten Region, den V-, D- und J-Genabschnitten, dem Signalpeptid und der TS-Oligo Sequenz als Ausgangspunkt für weiter Amplifikationsschritte.

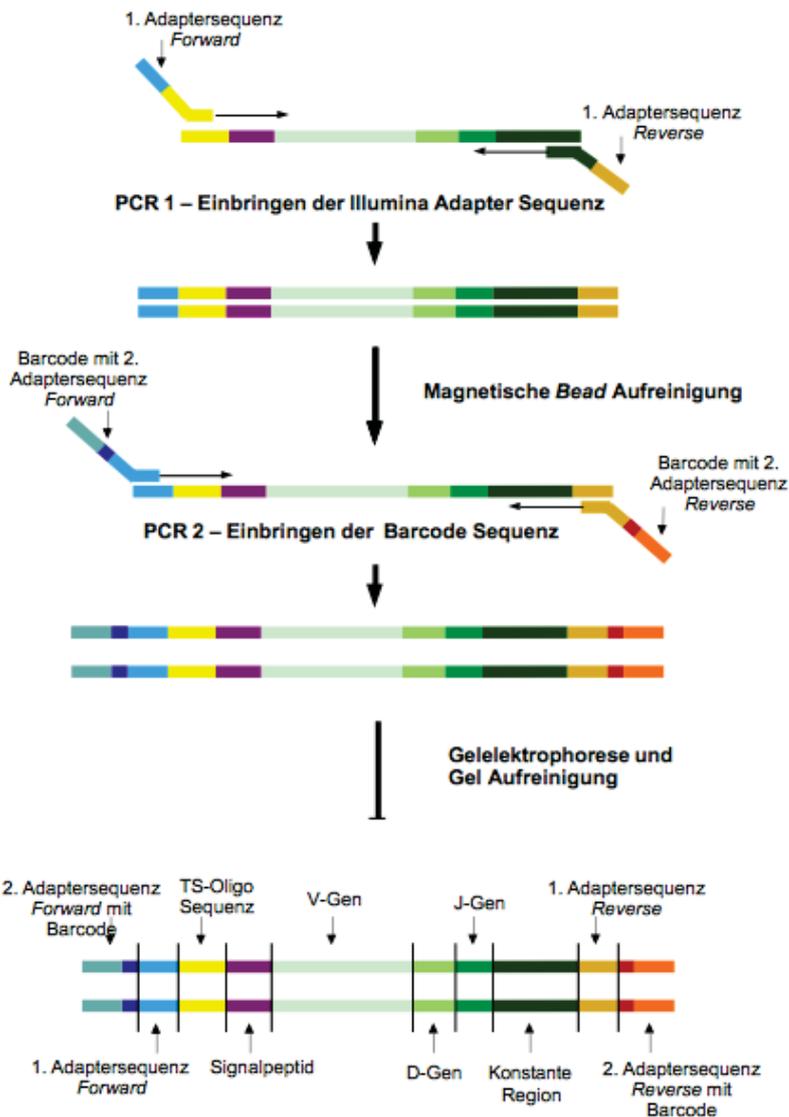
Zur Generierung der cDNA wurden die Materialien und das Herstellerprotokoll zur 5' cDNA Synthese verwendet. Neben den Proben des Projekts wurde eine positive Kontrolle zur Versuchsreihe hinzugefügt.

Zu Beginn wurde in einem Eppendorf ein erster *Mastermix* bestehend aus 4 µl 5x *First-Strand-Buffer*, 0,5 µl DTT und 1 µl dNTPs je Probe präpariert. Als Nächstes wurde für jede Probe ein Reagenz aus 10 µl RNA-Lösung und 1 µl 5' *Race CDS-Primer A* in ein steriles 0,5 ml Eppendorf pipettiert. Die Proben wurden nun mit dem *Thermocycler* inkubiert, dabei für 3 Minuten auf 72 °C erhitzt und für weitere 2 Minuten auf 42 °C gekühlt. Währenddessen wurde ein zweiter *Mastermix* vorbereitet. Dieser bestand je Probe aus 5,5 µl des ersten *Mastermix*', 0,5 µl *RNase Inhibitor* und 2 µl *SMART Scribe Reverse Transkriptase*. Pro Reaktion wurden 1 µl *SMARTer II A Oligonukleotide* zur Probenlösung hinzugefügt. Der *Mastermix* wurde anschließend dem Reagenz mit

mRNA hinzugefügt. Darauf wurden die Proben für 90 Minuten auf 42 °C erwärmt und für 10 Minuten bei 70 °C im *Thermocycler* inkubiert. Die cDNA wurde im Anschluss bei minus 20 °C Kühlung gelagert. Vor dem Beginn der PCR wurden die Proben mit 10µl EDTA Buffer verdünnt. Die Sequenzen des *5' Race CDS Primers A* und des *SMARTer II A Oligonukleotids* finden sich in Abschnitt 2.1.2.

#### 2.2.4 Protokoll zur Etablierung einer TZR-*Library*

Basierend auf der Idee einer schrittweise präparierten *Gen-Library* eines B-Zell Antikörper Repertoires wurden zwei PCRs zur Präparierung einer vollständigen TZR- $\beta$ -Repertoire *Library* etabliert (Vollmers et al., 2013a). Dabei wurde sich an dem Primerdesign von van Heijst et al. (2013) orientiert. In Abbildung 4 wird die Präparation der TZR-*Library* bestehend aus der 1. PCR mit dem Einbringen der Illumina Adapter Sequenz, der *Bead* Aufreinigung, der 2. PCR mit dem Einbringen des Barcodes und der Gel Aufreinigung vereinfacht schematisch dargestellt. Die verwendeten Primer sind in Abschnitt 2.1.2. unter „Primer der cDNA Synthese und des TZR-*Library* Protokolls“ aufgelistet.



**Abb. 4: Schematische Darstellung der TZR-Library Präparation.** Ausgangsmaterial ist die in der cDNA Synthese erstellte Einzelstrang cDNA des Lymphozytenrezeptors. In der ersten PCR bindet ein *Forward* Primer an die *template switching* Oligo-Sequenz (TS-Oligo-Sequenz) und ein *Reverse* Primer an die konstante Region des Genabschnitts. Beide Primer beinhalten eine erste Illumina Adapter Sequenz (hellblau und senfgelb), die nun in das Amplicon integriert wird. Es folgt eine DNA Aufreinigung mittels magnetischen Beads. In der zweiten PCR binden ein *Forward* und ein *Reverse* Primer bestehend aus individuellen Barcodes (dunkelblau und dunkelrot) und einer zweiten Illumina Adapter Sequenz (türkis und orange) an die erste Illumina Adapter Sequenz. Es folgt ein Nachweis der TZR-Library mittels Gelelektrophorese, das Ausschneiden der Elektrophoresebanden und eine Gel-Aufreinigung. Die Adaptersequenzen dienen im Prozess des *NGS* zur Bindung an die *Flow Cell* und als Ansatzpunkt für den Sequenzierungsprimer.

## 2.2.5 Einbringen der Illumina Adapter Sequenzen

In der ersten PCR erfolgte das Einbringen der Illumina Adapter Sequenz durch die Bindung eines *Forward* Primers an die in der cDNA Synthese eingebrachte *template switching* Oligo-Sequenz (TS-Oligo-Sequenz) und die Bindung eines *Reverse* Primers an die konstante Region des Genabschnitts des Lymphozytenrezeptors. Zur Amplifizierung der cDNA wurde das *Advantage 2 PCR Kit* benutzt. Zur Validierung der PCR wurden neben den Projektproben eine Negativ-Kontrolle, mit Hinzugabe von Nuklease freiem Wasser anstatt cDNA und eine Positiv-Kontrolle mit bekannter cDNA verwendet.

Für die erste PCR wurde je Probe ein *Mastermix* aus 0,5 µl *Forward-RACE-III-adP1 Primer*, 2,5 µl PCR Puffer, 0,5 µl dNTPs, 0,5 µl Taq-Polymerase und 0,5 µl *TCR-beta-III-adP1 Primer (Reverse Primer)* pipettiert. Bis zu einem totalen Volumen von 25 µl wurde 2,5 µl cDNA und 18 µl Nuklease freies Wasser hinzugefügt. Abhängig vom Ausgangsmaterial, speziell der im FACS gemessenen Zellzahl, wurden die letzten Zyklen der ersten PCR auf die einzelnen Subpopulation angepasst. Für Populationen >50.000 Zellen wurden zwei Zyklen, für <50.000 Zellen wurden vier Zyklen, für <10.000 Zellen wurden sechs Zyklen und für <1.000 Zellen wurden acht Zyklen durchlaufen. Der *Thermocycler* wurde wie folgt programmiert:

<u>2 Zyklen</u>		<u>2 Zyklen</u>		<u>2/4/6/8 Zyklen</u>
94 °C für 30 s	→	94 °C für 30 s	→	94 °C für 30 s
72 °C für 1 min		70 °C für 1 min		68 °C für 1 min
		72 °C für 1 min		72 °C für 1 min

## 2.2.6 Magnetische *Bead* Aufreinigung

Um die Proben mittels magnetischen *Beads* aufzureinigen, wurde das *Agencourt AMPure XP* Protokoll für zwei Durchläufe verwendet, wobei durch magnetisch geladene Kügelchen, die DNA von ungebundenen dNTPs, Primern, Primer Dimer und anderen Kontaminationen befreit wurde. Zu den Proben, darunter auch Negativ- und

Positiv-Kontrolle, wurde im Verhältnis von 5:4 die *Agencourt AMPure XP* Lösung pipettiert. Bei den Projektproben wurden so zu 50 µl amplifizierter DNA 40 µl der *Agencourt AMPure XP* Lösung pipettiert. Bei Raumtemperatur wurde das Reagenz für 5 Minuten inkubiert und dann für 2 Minuten in der *Agencourt SPRIPlate 96* Supermagneten Platte platziert. Nach Separation der gebundenen DNA wurde der Überstand abpipettiert und die Proben mit je 200 µl 70 %igen Ethanol gespült. Diese Flüssigkeit wurde nach 30 Sekunden entfernt und der Waschvorgang wurde wiederholt. Nachdem die Proben an der Luft getrocknet wurden, wurden die Proben mit je 20 µl Nuklease freiem Wasser außerhalb des Magneten gelöst. Als Nächstes wurde das Reagenz erneut für 1 Minute auf der *Agencourt SPRIPlate 96* Supermagneten Platte platziert. Die nun aufgereinigte DNA befand sich gelöst von den magnetischen Kügelchen in dem Nuklease-freiem Wasser und konnte mittels Pipette in ein neues steriles Eppendorf transferiert werden. Das Prozedere wurde nach Hinzufügen von 30 µl Nuklease freiem Wasser mit erneut 40 µl *Agencourt AMPure XP* Lösung wiederholt.

### 2.2.7 Einbringen der Barcode Sequenz

Die zweite PCR vervollständigte die Illumina Adapter Sequenz. Für den Prozess des *NGS* wurde somit die Bindung an die *Flow Cell* ermöglicht, gleichzeitig diente die Illumina Adapter Sequenz auch als Ausgangspunkt für den Sequenzierungsprimer. Der *Forward* Primer und der *Reverse* Primer banden an die durch die erste PCR eingebrachten erste Illumina Adapter Sequenz. Sowohl *Forward* als auch *Reverse* Primer beinhalteten zur Differenzierung der einzelnen Proben spezifischen Illumina Barcode Sequenzen. Die Kombinationen der verwendeten Barcodes wurden zuvor durch die Illumina *Experiment Manager Software* getestet. Die verwendeten Primer und die Barcode sequenzen sind in Abschnitt 2.1.2. unter „Primer der cDNA Synthese und des *TZR-Library* Protokolls“ aufgelistet.

Neben je einer Projektprobe mit einem totalen Volumen von 50 µl wurden eine Probe ohne Primer und eine Negativ-Kontrolle mit halbierten Reagenzien und einem totalen Volumen von 25 µl zum Versuch hinzugefügt. Es wurde ein *Mastermix* mit 5 µl

PCR Puffer, 1 µl dNTPs, 1 µl Polymerase und 36 µl Nuklease freiem Wasser je Probe vorbereitet. Außerdem wurden je 1 µl des *Forward-III-AdP2 Primers* und des *Reverse-III-AdP2 Primers* hinzugefügt. Bis zu einem totalen Volumen von 50 µl wurden 5 µl der aufgereinigten DNA hinzugefügt. In der Lösung ohne Primer wurde stattdessen Nuklease freies Wasser verwendet. In der negativen Kontrolle wurde, statt DNA, Nuklease freies Wasser hinzugefügt. Die Sequenzen des *Forward-III-AdP2 Primers* und des *Reverse-III-AdP2 Primers* finden sich in 3.1.2 unter PCR2 aufgelistet. Der *Thermocycler* wurde wie folgt programmiert:

#### 30 Zyklen

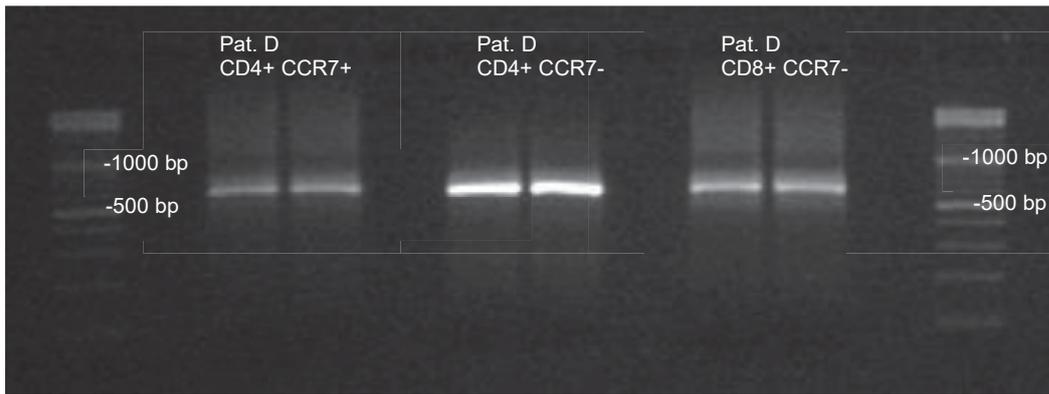
94 °C für 30 s

68 °C für 1 min

72 °C für 1 min

### 2.2.8 Gelelektrophorese, Gel Extraktion und Aufreinigung

Das amplifizierte DNA-Material wurde einer Gelelektrophorese zugeführt. Als Vorbereitung wurden alle Materialien mit DNA *Exitus* gereinigt und unter 30-minütigem Ultraviolett-Licht sterilisiert. Als Nächstes wurde eine Lösung aus TBE Puffer mit 2 % Agarose Anteil erhitzt, mit 20 µl *Sybr Safe* versetzt, abgekühlt und als Gel in die gereinigte Gelwanne gegossen. Nach 30-minütigem Aushärten mit einem Kamm wurde allen Proben in einem Verhältnis von 5:1 DNA Gel *Loading Dye* (6x) zugeführt. Das ausgehärtete Gel wurde in eine Wanne mit TBE Puffer gelegt. Daraufhin wurden die Proben und der *Gene Ruler DNA Ladder Mix* in die Taschen des Gels aufgetragen und unter 150-170 Volt für 30-40 Minuten unter Spannung gesetzt. Die 60 µl Probe wurde jeweils in zwei Taschen des Gels aufgeteilt. Das amplifizierte Produkt war dabei, mit einer Länge von 600-700 bp zu erwarten.



**Abb. 5: Gelelektrophorese am Beispiel des Patienten D.** Abgebildet werden zum Zeitpunkt m0 die Banden der T-Zell-Subpopulation CD4+ CCR7+, CD4+ CCR7- und CD8+ CCR7- des Pat. D. Bei einer Länge von 600-700 bp war das spezifische PCR Produkt zu erwarten.

Die nebeneinander aufgetragenen Gelelektrophorese Banden der Projektproben wurden mit einem sterilen Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und je Probe in einem sterilen Eppendorf zusammengeführt. Nach Protokoll des *QIAquick Gel Extraction Kit* wurde daraufhin die amplifizierte DNA aus dem Gel gewaschen. Die ausgeschnittenen Banden einer Probe wurden mit dem dreifachen ihres Volumens mit *Buffer QG* vermischt und bei 50 °C unter Vibration für 10 Minuten inkubiert und gelöst. Danach wurde das einfache Volumen der ausgeschnittenen Banden in Form von Isopropanol zur Probe hinzupipettiert. Die Lösung wurde in eine *QIAquick* Spinsäule mit Filter transferiert und für eine Minute bei 17.900 G zentrifugiert. Der Überstand, der sich im Röhrchen sammelte, wurde abpipettiert und es wurden 500 µl *Buffer QG* oberhalb des Filters, ohne Filterkontakt, appliziert. Es folgte eine erneute Zentrifugation für eine Minute bei 17.900 G. Der Überstand am Röhrchenboden wurde danach entfernt. Es folgten zwei Waschvorgänge mit je 750 µl *Buffer PE*, der oberhalb des Filters appliziert und jeweils nach 1-minütiger Zentrifugation bei 17.900 G aus dem Gefäß entfernt wurde. Der Filter der Spinsäule wurde darauf in einem sterilen Eppendorf platziert. Dann wurden 20 µl RNase freies Wasser oberhalb der Filtermembran pipettiert und die Probe wurde bei 17.900 G für eine Minute zentrifugiert. Dabei wurde die nun aufgereinigte DNA im Eppendorf aufgesammelt. Das PCR Produkt wurde bei minus 20 °C gelagert.

## 2.2.9 Quantifizierung mittels Qubit 2.0 und Vorbereitung der Gen-*Library*

Die Quantifizierung der PCR Produkte erfolgte mit dem *dsDNA HS-Assay Kit* mit dem Qubit 2.0. Nach Vorgaben des Herstellers wurden 1 µl HS Reagenz mit 199 µl HS-Puffer je Probe als *Mastermix* vermischt. Zur Kalibrierung des Qubit 2.0 wurden 190 µl mit 10 µl HS Standard 1 bzw. 2 in den vorgesehenen Reaktionsgefäßen vermengt, nach Verwirbelung mittels Vortexmischer für 2 Minuten inkubiert und mit dem Qubit 2.0 gemessen. Für jede Probe wurden je zweimal 1 µl PCR Produkt mit je 199 µl Mastermix vermischt und wie für die Kalibrierung beschrieben verarbeitet. So wurden zwei Konzentrationen einer Probe gemessen und jeweils der Mittelwert für die im Folgenden beschriebene Berechnung verwendet.

Zur Vorbereitung der Gen-*Library* für das NGS mit *Illumina MiSeq* wurden alle Proben auf eine Konzentration von 4 nmol verdünnt. Proportional zu den im FACS sortierten Zellzahlen der Subpopulationen wurde das Volumen der Proben mit unveränderter Molarität in der gepoolten Gen-*Library* reguliert. So wurden die Subpopulationszahlen aller in einem Sequenzierungslauf sequenzierten Proben addiert und die relativen Anteile der einzelnen Subpopulationen berechnet. Mit dem gleichen Anteil wurde das Volumen der 4 nmol Proben am gesamten Volumen der *Library* repräsentiert.

## 2.2.10 Sequenzierung

Die TZR-β-*Library* wurde mit Hilfe der Arbeitsgruppe Translationale Gynäkoonkologie des Universitätsklinikums in Düsseldorf durch den *Illumina MiSeq* vollzogen. Jede *Library* wurde durch Gebrauch des *MiSeq Reagent Kit v2* (500 bp) der Firma Illumina äquivalent von beiden Seiten sequenziert. Die *PhiX* Kontrolle der Firma Illumina wurde mit 40 % zu den Proben hinzugefügt, um die Variabilität des Materials zu erhöhen. Die Produkte wurden denaturiert und mit einer finalen Konzentration von 13 pM sequenziert.

## 2.2.11 Auswertung

Die Rohdaten des NGS wurden mittels MiXCR (Bolotin et al., 2015) analysiert. Die Ausrichtungseinstellungen wurde adjustiert für 5' *RACE* Produkte gemäß den Empfehlungen des Programmierers. Weiter wurden Sequenzen, die zu nicht-funktionsfähigen Rezeptoren führten, durch Auftreten eines Stopcodons oder einer Leserasterverschiebung aus der weiteren Analyse ausgeschlossen. Die Programme *VDJtools* (Shugay et al., 2015) und *VDJdb* (Bagaev et al., 2020) wurden zur weiteren Auswertung und Visualisierung verwendet. Des Weiteren wurden Daten mittels Excel (Microsoft, Redmond, Washington, USA) ausgewertet und visualisiert.

## 3 Ergebnisse

Die CD3<sup>+</sup> T-Zellen wurde nach der durchflusszytometrischen Analyse in CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> sowie in deren CCR7<sup>+</sup> und CCR7<sup>-</sup> T-Zellen unterteilt. Im Folgenden soll auf die CD4<sup>+</sup> T-Zellen und deren TZR-Repertoire eingegangen werden. Zur Abbildung der CD8<sup>+</sup> T-Zellen und deren TZR-Repertoire verweise ich auf die noch folgenden Publikationen der Arbeitsgruppe von Universitätsprofessor Dr. med. Norbert Goebels der Heinrich-Heine-Universität in Düsseldorf.

### 3.1 Durchflusszytometrische Messungen der T-Zellpopulationen

#### 3.1.1 Totale Zellzahlen und CD3<sup>+</sup> T-Zellpopulationen

Bei der durchflusszytometrischen Messung der totalen Zellzahl der aufbereiteten PBMC zeigten sich als Ausgangsmaterial zur weiteren Analyse unterschiedliche Populationsgrößen. Im PBMC von Pat. C konnten vor Beginn der Therapie mit Fingolimod 2.142.517 Zellen gezählt werden, bei Pat. D hingegen 6.638.139 Zellen. Die totale Zellzahl in den PBMCs des unbehandelten MS Patienten (uC) blieb im zeitlichen Verlauf bei etwa 5.000.000 Zellen. Die PBMCs der gesunden Kontrolle (hC) zeigten eine Differenz der Zellzahl von etwa 2.000.000 Zellen. Nach 12-monatiger Therapie (m12) mit Fingolimod fand sich im PBMC des Pat. C eine um etwa 2.000.000 Zellen höhere Zellzahl als im PBMC zum Zeitpunkt vor Beginn der Therapie (m0). Pat. D zeigte im PBMC nach 12-monatiger Therapie (m12) etwa 3.000.000 weniger Zellen als im PBMC vor Beginn der Therapie (m0). Gleichzeitig kam es bei Pat. C und Pat. D zu einer Reduktion der absoluten CD3<sup>+</sup> Lymphozytenzahl in den PBMCs. Die CD3<sup>+</sup> Lymphozyten fielen bei Pat. C von 669.679 auf 399.378 Zellen, bei Pat. D von 3.269.659 auf 611.314 Zellen. Nach 12-monatiger Therapie sanken die absoluten Zahlen der CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen bei Pat. C von 431.318 auf 83.916 Zellen, bei Pat. D von 1.998.408 auf 33.775 Zellen. In der gleichen Zeit veränderten sich die absoluten Zellzahlen der CD3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen bei Pat. C von 190.697 auf 217.045 Zellen und bei Pat. D von 965.433 auf 323.012 Zellen. Die absoluten CD3<sup>+</sup> Lymphozytenzahlen sowie die Zellzahlen der CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> und CD3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen des unbehandelten

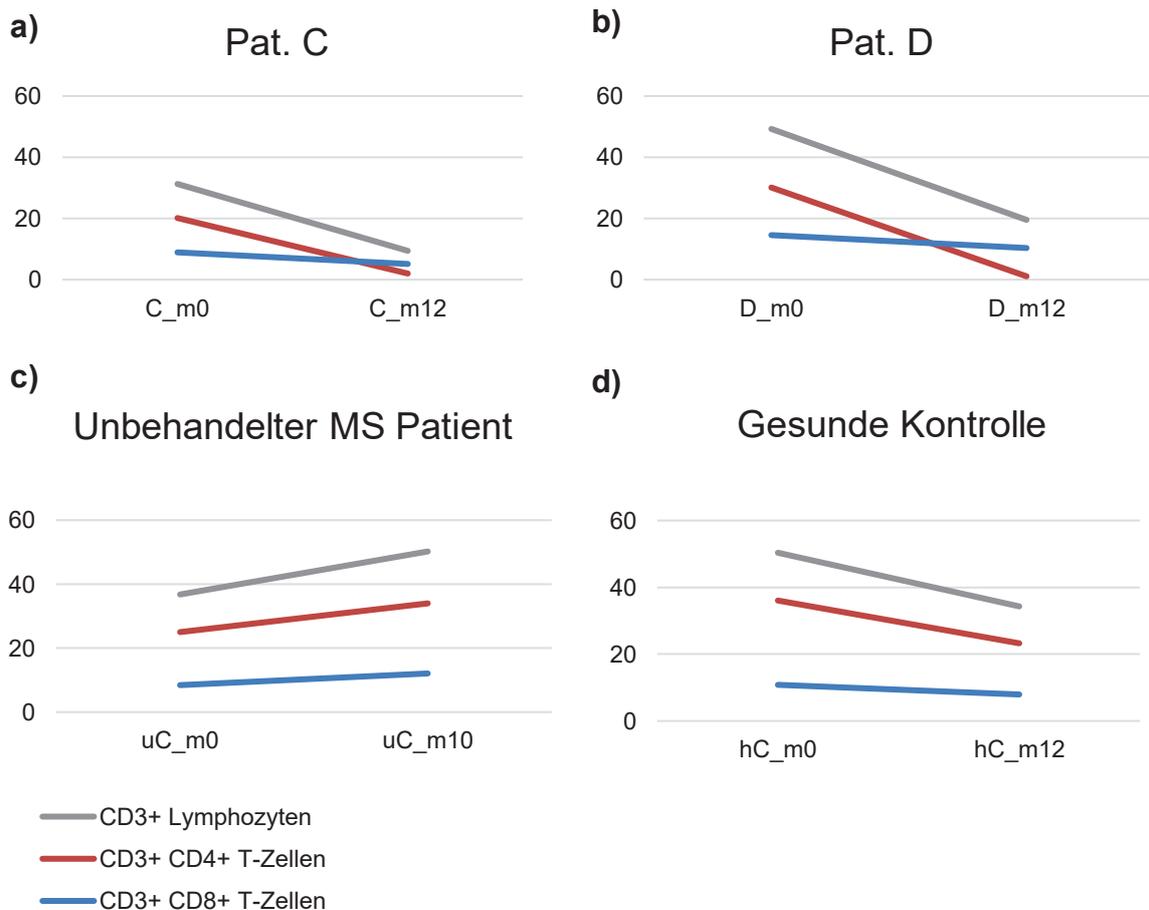
MS Patienten (uC) und der gesunden Kontrolle zeigten gleichzeitig geringe Schwankungen (Tabelle 3).

Unter Therapie mit Fingolimod fiel der relative Anteil der CD3+ Lymphozyten an der totalen Zellzahl bei Pat. C um 70 % und bei Pat. D um 60,4 %. Der relative Anteil der CD3+ CD4+ T-Zellen fiel um 90,1 % bei Pat. C und um 96,4 % bei Pat. D. Gleichzeitig fiel der relative Anteil der CD3+ CD8+ T-Zellen bei Pat. C um 42,7 %, bei Pat. D um 29 % (Abb. 6a und b, Tabelle 3).

So ergab sich unter Therapie mit Fingolimod eine Änderung des CD4/CD8 Quotienten zugunsten der CD3+ CD8+ T-Zellen. Der CD4/CD8 Quotient fiel somit nach 12 Monaten Therapie bei Pat. C von 2,3 auf 0,4, bei Pat. D von 2,1 auf 0,1.

Der unbehandelte MS Patient (uC) sowie die gesunde Kontrolle (hC) zeigten nach 10 bzw. 12 Monaten Veränderungen des CD3+ Lymphozyten Anteils an der totalen Zellzahl von etwa +/-15 % Punkten. Im gleichen Zeitraum zeigten die CD3+ CD4+ T-Zellpopulationen Schwankungen von etwa +/-12 % Punkten im Anteil an der totalen Zellzahl. In der CD3+ CD8+ T-Zellpopulation fanden sich Veränderungen von <5 % Punkten. Der CD4/CD8 Quotient blieb zu den Zeitpunkten m0 und m10 bzw. m12 je konstant bei etwa 3 (Abb. 6c und d, Tabelle 3).

Die Auswertungen der CD3+ CD8+ T-Zellpopulation sind hier zur Abbildung der CD3+ Lymphozytenpopulation ergänzend angegeben.



**Abb. 6a-d: Relativer Anteil der CD3+ Lymphozyten, der CD3+ CD4+ T-Zellen und der CD3+ CD8+ T-Zellen an der totalen Zellzahl.** Dargestellt wird der prozentuale Anteil (Y-Achse) der CD3+ Lymphozyten, der CD3+ CD4+ T-Zellen und der CD3+ CD8+ T-Zellen an der totalen Zellzahl der Patienten C (Pat. C) und D (Pat. D), des unbehandelten MS Patient (uC) und der gesunden Kontrolle (hC). Die Patienten C und D und die gesunde Kontrolle (hC) werden zu den Zeitpunkten vor Beginn der Therapie (m0) und nach 12 Monaten Therapie (m12) mit Fingolimod abgebildet. Der unbehandelte MS Patient (uC) zu Beginn m0 und nach 10 Monaten (m10). Die X-Achse bildet den zeitlichen Verlauf ab.

Unter Fingolimod Therapie ließ sich bei Pat. C und D eine stetige Abnahme des Anteils der CD3+ Lymphozyten an der totalen Zellzahl verzeichnen. Der Anteil der CD3+ CD4+ T-Zellen an der totalen Zellzahl nahm unter Therapie bei Pat. C und Pat. D ab. Der Anteil der CD3+ CD8+ T-Zellen an der totalen Zellzahl blieb gleichzeitig konstant (**Abb. 6a und b**). Der unbehandelte MS Patient (uC) und die gesunde Kontrolle (hC) zeigten geringe Schwankungen der Anteile der CD3+ Lymphozyten, der CD3+ CD4+ und CD3+ CD8+ T-Zellen an der totalen Zellzahl (**Abb. 6c und d**).

	<b>totale Zellzahl</b>	<b>CD3+ Lymphozyten</b>	<b>CD3+ CD4+ T-Zellen</b>	<b>CD3+ CD8+ T-Zellen</b>
<b>C_m0</b>	2.142.517	669.679 (31,3 %)	431.318 (20,1 %)	190.697 (8,9 %)
<b>C_m12</b>	4.246.417	399.378 (9,4 %)	83.916 (2 %)	217.045 (5,1 %)
<b>D_m0</b>	6.638.139	3.269.659 (49,3 %)	1.998.408 (30,1 %)	965.433 (14,5 %)
<b>D_m12</b>	3.129.454	611.314 (19,5 %)	33.775 (1,1 %)	323.012 (10,3 %)
<b>uC_m0</b>	5.627.112	2.069.266 (36,8 %)	1.407.563 (25 %)	474.587 (8,4 %)
<b>uC_m10</b>	5.901.224	2.962.875 (50,2 %)	2.005.020 (34 %)	712.002 (12,1 %)
<b>hC_m0</b>	4.755.171	239.4547 (50,4 %)	1.714.382 (36,1 %)	514.697 (10,8 %)
<b>hC_m12</b>	6.798.521	233.1805 (34,3 %)	1.580.903 (23,3 %)	539.379 (7,9 %)

**Tabelle 3:** Auflistung der im FACS gemessenen totalen Zellenzahlen und der CD3+ Lymphozytenzahlen, der CD3+ CD4+ und CD3+ CD8+ T-Zellzahl sowie deren relative Anteile an der totalen Zellzahl in Klammern der Patienten C (Pat. C) und D (Pat. D) sowie des unbehandelten MS Patienten (uC) und der gesunden Kontrolle (hC).

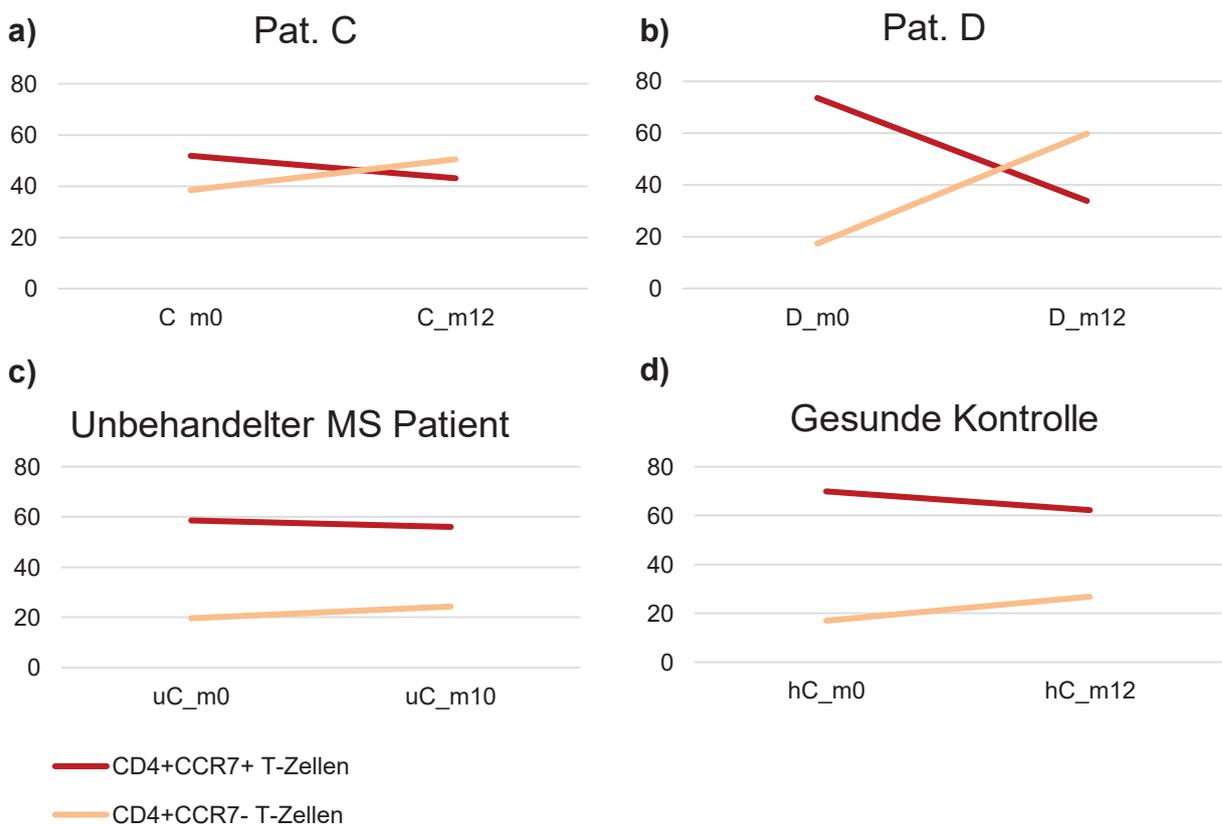
### 3.1.2 CD4+ CCR7+ und CCR7- T-Zell-Subpopulationen

Innerhalb der CD3+ CD4+ T-Zellen erfolgte die Unterteilung mittels des humanen Antikörper CCR7. Es ergaben sich die Subpopulationen der naiven T- und zentralen Gedächtnis-T-Zellen (CCR7+) und die der Effektor-Gedächtnis-T-Zellen (CCR7-).

Die absolute Zellzahl der CD4+ CCR7+ T-Zell-Subpopulation sank nach 12 Monaten Therapie mit Fingolimod von 223.684 Zellen auf 36.150 bei Pat. C und von 1.470.628 auf 11.426 Zellen bei Pat. D. Auch die Zellzahl der CD4+ CCR7- T-Zell-Subpopulation sank unter Therapie. Bei Pat. C fielen die CD4+ CCR7- Zellen von 165.855 Zellen auf 42.376 Zellen, bei Pat. D von 346.885 auf 20.194 Zellen. Die absoluten Zellzahlen der CD4+ CCR7+ und CCR7- Subpopulationen des

unbehandelten MS Patienten und der gesunden Kontrolle unterlagen gleichzeitig geringen Schwankungen (Tabelle 4).

Der relative Anteil der CCR7+ Zellen an allen CD3+ CD4+ T-Zellen fiel bei Pat. C um 17 % und bei Pat. D um 54 %. Gleichzeitig stieg der relative Anteil der CCR7- Zellen an allen CD3+ CD4+ T-Zellen bei Pat. C um das 1,3-fache und bei Pat. D um das 3,4-fache des Ausgangswertes (Abb. 7a und b, Tabelle 4).



**Abb. 7a-d: Relativer Anteil der CCR7+ und CCR7- Zellen an allen CD3+ CD4+ T-Zellen.** Dargestellt wird der prozentuale Anteil (Y-Achse) der CD4+ CCR7+ und CCR7- T-Zellpopulationen an allen CD3+ CD4+ T-Zellen des Pat. C, Pat. D, des unbehandelte MS Patient (uC) und der gesunden Kontrolle (hC) zu den Zeitpunkten m0 und m10 oder m12 (X-Achse).

Es zeigte sich eine relative Abnahme der CCR7+ Zellen sowie eine relative Zunahme der CCR7- Zellen in der CD3+ CD4+T-Zellpopulation von Pat. C und Pat. D unter Therapie mit Fingolimod (**Abb. 7a und b**). Gleichzeitig zeigten uC und hC nur geringe Veränderungen der CCR7+ und CCR7- Anteile in der CD3+ CD4+ Population (**Abb. 7c und d**).

Der unbehandelte MS Patient (uC) und die gesunde Kontrolle (hC) zeigten in der gleichen Zeit Veränderungen, von <10 % Punkten, der CCR7+ und CCR7- Subpopulationen in den CD3+ CD4+ T-Zell-Populationen (Abb. 7c und d, Tabelle 4).

Somit sank unter Immunmodulation mit Fingolimod der Anteil der CCR7+ Zellen an allen CD3+ CD4+ T-Zellen, gleichzeitig stieg der Anteil der CCR7- Zellen an dieser Population. Die Zusammensetzung der CD3+ CD4+ T-Zellpopulation veränderte sich zugunsten der CCR7- T-Zellen. Pat. C wies zu Beginn einen CCR7+/CCR7- Quotienten von 1,4, nach 12 Monaten einen Quotienten von 1 auf. Bei Pat. D veränderte sich das Verhältnis von 4,2 auf 0,6. Bei dem unbehandelten MS Patienten (uC) sowie bei der gesunden Kontrolle (hC) zeigte sich ein konstanter CCR7+/CCR7- Quotient zugunsten der CD4+ CCR7+ T-Zellen.

	<b>CD4+ T-Zellen</b>	<b>CD4+ CCR7+ T-Zellen</b>	<b>CD4+ CCR7- T-Zellen</b>
<b>C_m0</b>	431.318	223.684 (51,9 %)	165.855 (38,5 %)
<b>C_m12</b>	83.916	36.150 (43,1 %)	42.376 (50,5 %)
<b>D_m0</b>	1.998.408	1.470.628 (73,6 %)	346.885 (17,4 %)
<b>D_m12</b>	33.775	11.426 (33,8 %)	20.194 (59,8 %)
<b>uC_m0</b>	1.407.563	824.829 (58,6 %)	276.527 (19,6 %)
<b>uC_m10</b>	2.005.020	1.123.354 (56 %)	487.809 (24,3 %)
<b>hC_m0</b>	1.714.382	1.198.379 (69,9 %)	290.865 (17 %)
<b>hC_m12</b>	1.580.903	983.895 (62,2 %)	424.074 (26,8 %)

**Tabelle 4:** Auflistung der im FACS gezählten CD3+ CD4+ CCR7+ und CCR7- T-Zellen sowie des relativen Anteils der CD4+ CCR7+ und CD4+ CCR7- T-Zellen an allen CD3+ CD4+ T-Zellen in Klammern.

## 3.2 Allgemeine Statistik der NGS Rohdaten der CD4+ T-Zellen

Die durchflusszytometrisch gezählten T-Zellen wurden mit einer Obergrenze von 400.000 Zellen separiert und gesammelt. Zur Darstellung quantitativer Zusammenhänge werden im Folgendem die im FACs gesammelten Zellzahlen, die durch MiXCR (etabliert durch (Bolotin et al., 2015) ermittelten allgemein sequenzierten totalen *Readanzahlen*, die darunter erfolgreichen anteiligen TZR- $\beta$ -Alignments, die daraus durch *VDJtools* (etabliert durch Shugay et al., 2015) verwendeten *Reads* sowie die finale Anzahl der Klonotypen und deren Anteil an den in *VDJtools* verwendeten *Reads* in Tabelle 5 erfasst und im Folgenden erläutert.

Betrachtet man die allgemeinen sequenzierten totale *Read-Anzahlen* von Pat. C, Pat. D, des unbehandelten MS Patienten (uC) und der gesunden Kontrolle (hC) im Vergleich zu den im Prozess verwendeten Zellzahlen, zeigte sich eine unterschiedlich ausgeprägte Repräsentation der Ausgangspopulationen im Sequenziervorgang. So wurden die Ausgangszellzahlen bei Pat. C der T-Zell-Subpopulationen CD4+ CCR7+ und CCR7- zum Zeitpunkt m0 durch eine etwa äquivalente Anzahl an *Reads* repräsentiert. Eine starke Überrepräsentation der Ausgangspopulation zeigte sich bei dem unbehandelten MS Patient (uC) in der CD4+CCR7+ T-Zell-Subpopulation zum Zeitpunkt m10 und in den CD4+ CCR7- T-Zell-Subpopulationen zu den Zeitpunkten m0 und m10. Hier fanden sich je etwa 300.000 *Reads* mehr als Zellen zum Ausgangszeitpunkt. Eine Unterrepräsentation der Ausgangspopulation zeigte sich mitunter bei der CD4+ CCR7+ T-Zell-Subpopulation zum Zeitpunkt m12 der gesunden Kontrolle (hC). Hier wurden 400.000 Zellen durch etwa 50.000 *Reads* abgebildet.

Bei weiterer Differenzierung des NGS-Ergebnisses mittels MiXCR ergaben sich die *Reads*, die vollständig aligniert der TZR- $\beta$ -Region zugeordnet werden können. Es zeigte sich, dass das TZR- $\beta$ -Alignment zwischen den Proben von anteilig 41 % bis zu 88 % der totalen *Readanzahl* variierte. Ein anteiliges TZR- $\beta$ -Alignment von >80 % an der totalen *Readanzahl* zeigte sich in den Proben der gesunden Kontrolle (hC) für die CD4+CCR7+ T-Zell-Subpopulation zum Zeitpunkt m12 und für die CD4+ CCR7- T-Zell-Subpopulationen zu den Zeitpunkten m0 und m12. Die CD4+ CCR7- T-Zell-

Subpopulation des Pat. C und die CD4+ CCR7+ T-Zell-Subpopulation des Pat. D zu den Zeitpunkten m12 zeigten gleichzeitig ein TZR- $\beta$ -Alignment von 41 %.

Von den an TZR- $\beta$ -Region vollständig alignierten *Reads* wurde wiederum ein unterschiedlich großer Anteil zur Datenanalyse mittels *VDJtools* verwendet. So konnten >60 % der allgemein sequenzierten *Reads* in der CD4+ CCR7- T-Zell-Subpopulation des Pat. D zum Zeitpunkt m0 und in der CD4+CCR7- T-Zell-Subpopulation der gesunden Kontrolle (hC) zum Zeitpunkt m12 zur Datenverarbeitung mittels *VDJtools* verwendet werden. In den T-Zell-Subpopulationen CD4+CCR7+ des Pat. D zum Zeitpunkt m12 und CD4+ CCR7+ der gesunden Kontrolle (hC) zum Zeitpunkt m0 konnten gleichzeitig <20 % der totalen *Readanzahl* durch *VDJtools* verwendet werden.

In der weiteren Datenverarbeitung ermittelte *VDJtools* aus den verwendeten *Reads* die Anzahl der Klonotypen im TZR- $\beta$ -Repertoire. In den CD4+ CCR7- T-Zell-Subpopulation der gesunden Kontrolle (hC) zu den Zeitpunkten m0 und m12 wurden  $\leq 5$  % des durch *VDJtools* verwendeten Materials als Klonotypen definiert. Gleichzeitig wurde in der CD4+ CCR+ T-Zell-Subpopulation des Pat. D zum Zeitpunkt m12 58,4 % als Klonotypen identifiziert. Unter Therapie mit Fingolimod erhöht sich der Anteil an Klonotypen in allen CD4+ CCR7+ und CD4+ CCR7- T-Zell-Subpopulationen der Patienten C und D über den Zeitraum von 12 Monaten.

Die durch *VDJtools* verwendeten *Reads* und die Anzahl der Klonotypen gelten als Basis für die folgenden Ergebnisse.

	Zellzahl	Totale Read-Anzahl	TZR- $\beta$ -Alignment anteilig a. d. totalen Read-Anzahl	Verwendete Reads durch <i>VDJtools</i> anteilig an der totalen Read-Anzahl)	Anzahl Klonotypen anteilig an den <i>VDJtools</i> Reads)
<b>Patient C m0</b>					
<b>CD4+CCR7+</b>	180.000	146.328	73,7 %	86.633 (59,2 %)	19.946 (23 %)
<b>CD4+CCR7-</b>	120.000	139.440	77,1 %	79.480 (57 %)	8.717 (11 %)
<b>Patient C m12</b>					
<b>CD4+CCR7+</b>	25.490	16.837	66,2 %	8.460 (50,2 %)	2.722 (32,2 %)
<b>CD4+CCR7-</b>	28.670	11.453	41 %	2.312 (20,2 %)	1.090 (47,1 %)
<b>Patient D m0</b>					
<b>CD4+CCR7+</b>	400.000	145.798	58,4 %	48.013 (32,9 %)	15.476 (32,2 %)
<b>CD4+CCR7-</b>	226.000	144.334	77,7 %	88.424 (61,3 %)	11.615 (13,1 %)
<b>Patient D m12</b>					
<b>CD4+CCR7+</b>	8.400	4.737	41 %	817 (17,2 %)	477 (58,4 %)
<b>CD4+CCR7-</b>	14.530	10.782	49,9 %	3.899 (36,2 %)	1.334 (34,2 %)
<b>Unbehandelter MS Patient (uC) m0</b>					
<b>CD4+ CCR7+</b>	400.000	505.546	76,2 %	208.602 (41,3 %)	22.788 (10,9 %)
<b>CD4+ CCR7-</b>	190.000	501.936	75 %	198.338 (39,5 %)	17.845 (9 %)
<b>Unbehandelter MS Patient (uC) m10</b>					
<b>CD4+ CCR7+</b>	400.000	836.512	75,4 %	323.139 (38,6 %)	16.695 (5,2 %)
<b>CD4+ CCR7-</b>	320.000	834.542	75,9 %	328.701 (39,4 %)	17.439 (5,3 %)
<b>Gesunde Kontrolle (hC) m0</b>					
<b>CD4+ CCR7+</b>	300.000	104.429	47,1 %	20.391 (19,5 %)	9.692 (47,5 %)
<b>CD4+ CCR7-</b>	190.000	64.715	86 %	31.117 (48,1 %)	1.569 (5 %)
<b>Gesunde Kontrolle (hC) m12</b>					
<b>CD4+ CCR7+</b>	400.000	52.132	81,9 %	10.638 (20,4 %)	3.826 (36 %)
<b>CD4+ CCR7-</b>	230.000	120.244	88 %	75.628 (62,9 %)	2.817 (3,7 %)

Tabelle 5: Auflistung der gesammelten Zellzahl, der totalen *Read*anzahl, des anteiligen TZR- $\beta$ -Alignments, der durch *VDJtools* verwendeten *Reads* und deren Anteil an der totalen *Read*anzahl sowie der Anzahl der Klonotypen und deren Anteil an den in *VDJtools* verwendeten *Reads* der Patienten C und D, des unbehandelten MS Patienten (uC) und der gesunden Kontrolle (hC) zu den Zeitpunkten vor Beginn der Therapie (m0) und nach 10 bzw. 12 Monaten (m10 bzw. m12).

### 3.3 TZR- $\beta$ -Rekombination der CD4+ T-Zellen

#### 3.3.1 CD4+ CCR7+ T-Zell-Subpopulation

Pat. C wies zu Beginn (m0) in der CD4+ CCR7+ T-Zell-Subpopulation 583 V-J-Kombinationsmöglichkeiten auf. Nach einer 12-monatigen Therapie (m12) reduziert sich die Rezeptorrekombinationsmöglichkeiten auf 410 verschiedene V-J-Kombinationen. Es fand sich eine Reduktion um 29,7 %. Pat. D zeigte vor Beginn der Therapie (m0) 579 V-J-Kombinationen in der CD4+ CCR7+ T-Zell-Subpopulation. Nach einer 12-monatigen Therapie (m12) fanden sich noch 212 V-J-Kombinationsmöglichkeiten. Es zeigte sich eine prozentuale Abnahme der Kombinationsmöglichkeiten von 63,4 %. Der unbehandelte MS Patient (uC) und die gesunde Kontrolle (hC) zeigten gleichzeitig Schwankungen der V-J-Kombinationsmöglichkeiten der CD4+ CCR7+ T-Zell-Subpopulation von <18 % (Tabelle 6).

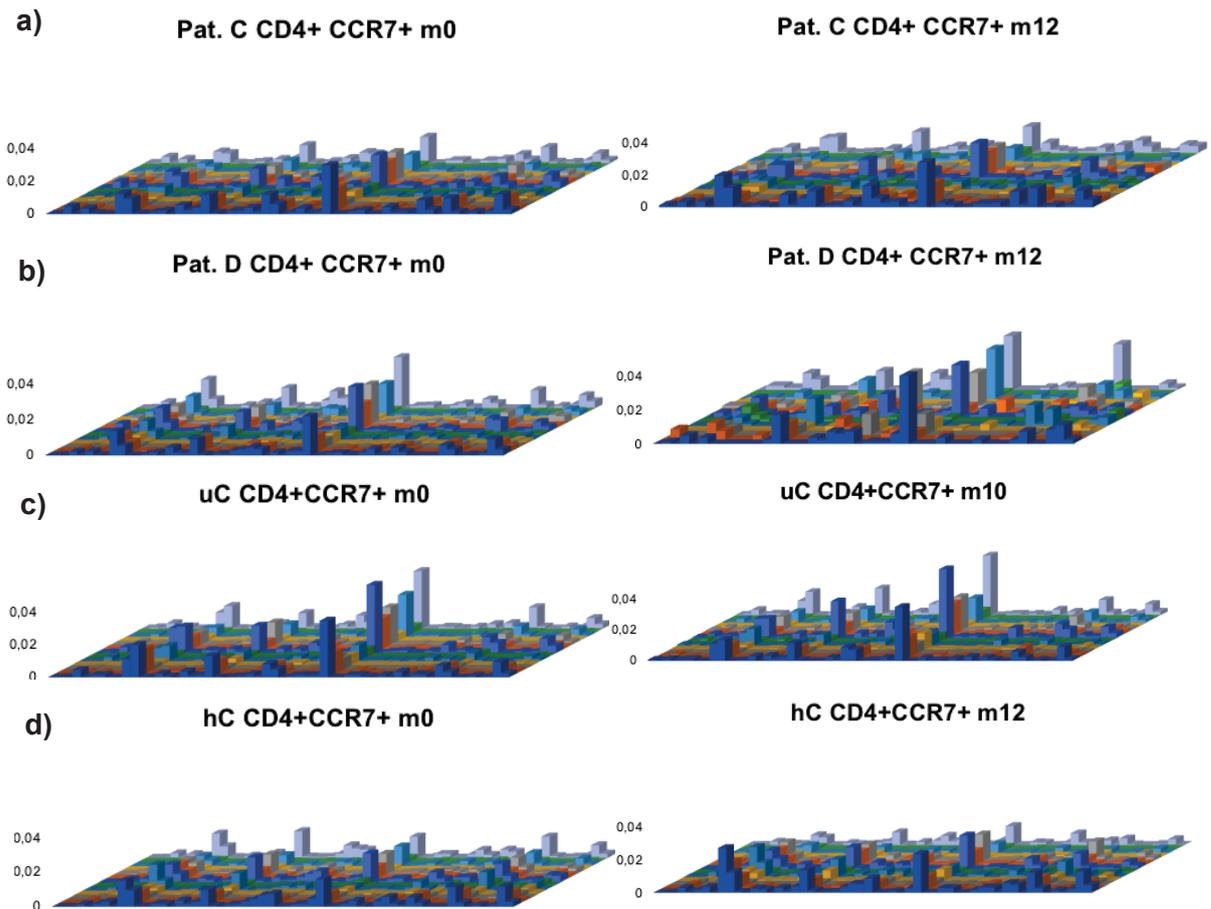
CD4+ CCR7+	Pat. C	Pat. D	uC	hC
<b>m0</b>	583	579	588	566
<b>m10/12</b>	410	212	565	465
	-29,7 %	-63,4 %	-3,9 %	-17,8 %

**Tabelle 6: Anzahl der Rekombinationsmöglichkeiten des TZR- $\beta$  der CD4+ CCR7+ T-Zell-Subpopulation der Patienten C und D, des unbehandelten MS Patienten (uC) und der gesunden Kontrolle (hC) zu den Zeitpunkten m0 und m10 bzw. m12 sowie die prozentuale Änderung der Rekombinationsmöglichkeiten im Repertoire im zeitlichen Verlauf.**

Ein überblickendes V-J-Rekombinationsraster, das die V und J Gensegmente und ihre Rekombinationen in ihrer anteiligen Frequenz darstellt, zeigte, dass bei den Patienten C und D in der CD4+ CCR7+ T-Zell-Subpopulation vor Beginn der Therapie zum Zeitpunkt m0 die Mehrheit der V-J-Kombinationsmöglichkeiten im niedrig

frequenten Bereich auftreten und sich weniger V-J-Kombinationsmöglichkeiten als hochfrequent identifiziert werden können. In der CD4+ CCR7+ T-Zell-Subpopulation des unbehandelten MS Patienten (uC) ließen sich die höchsten Frequenzen einzelner V-J-Kombinationsmöglichkeiten finden. Bei der CD4+ CCR7+ T-Zell-Subpopulation der gesunden Kontrolle (hC) zeigten sich die hochfrequenten V-J-Kombinationsmöglichkeiten im Vergleich zu den anderen Probanden niedriger. Nach 12-monatiger Therapie mit Fingolimod zeigte sich bei der CD4+ CCR7+ T-Zell-Subpopulation der Patienten C und D, dass vor Beginn der Therapie (m0) hochfrequente V-J-Kombinationsmöglichkeiten auch zum Zeitpunkt m12 hochfrequent wieder zu finden waren. In der T-Zell-Subpopulation des Patienten D stiegen zuvor bereits hochfrequente V-J-Rekombinationsmöglichkeiten weiter in ihrer Frequenz an. Die V-J-Kombinationsraster der CD4+ CCR7+ T-Zell-Subpopulation des unbehandelten MS Patienten (uC) und der gesunden Kontrolle zeigten im zeitlichen Verlauf eine geringe Variation (Abb. 8).

In Tabelle 7 findet sich eine Auflistung der Top 5 V-J-Kombinationen sowie die anteilige Frequenz des TRBV5.1 im Repertoire. Übereinstimmende V-J-Kombinationen zwischen allen Probanden waren in der CD4+ CCR7+ T-Zell-Subpopulation zum Zeitpunkt m0 TRBV5.1 mit TRBJ1-1 und TRBV5.1 mit TRBJ2-1. Unter allen MS Patienten fanden sich außerdem TRBV5.1 mit TRBJ2-7 und TRBV5.1 mit TRBJ2-3 als Top 5 hochfrequente V-J-Kombinationen zum Zeitpunkt m0. Sowohl bei den Patienten C und D als auch bei dem unbehandelten MS Patienten (uC) und der gesunden Kontrolle (hC) blieben 4 der Top 5 hochfrequenten Kombinationsmöglichkeiten nach 10 bzw. 12 Monaten bestehen. So fand sich in den CD4+ CCR7+ T-Zell-Subpopulationen aller Probanden zu beiden Zeitpunkten das variable Segment TRBV5.1 unter den Top 5 der hochfrequenten Kombinationsmöglichkeiten. Aus den Rohdaten der Matrizen zeigte sich, dass dieses Gensegment im Repertoire aller MS Patienten, speziell des unbehandelten MS Patienten (uC), mit einer bis zu doppelt so hohen Frequenz wie bei der gesunden Kontrolle (hC) auftrat (Tabelle 7).



**Abb. 8a-d:** V-J-Rekombinationsraster der T-Zell-Subpopulation CD4+ CCR7+ der Patienten C und D, des unbehandelten MS Patienten (uC) und der gesunden Kontrolle (hC) zu den Zeitpunkten m0 und m10 bzw. m12. Die X-Achse bildet unterschiedliche V-, die Y-Achse unterschiedliche J-Gensegmente ab. Die Gensegmente sind nicht einzeln benannt, sondern überblickend dargestellt. Die einzelnen Gensegmente sind nicht namentlich benannt, sondern überblickend dargestellt. Auf der Z-Achse wird die Frequenz der V-J-Kombinationen als relativer Anteil am Repertoire der Subpopulation angezeigt.

Zum Zeitpunkt m0 zeigten Pat. C und D ein breites Verteilungsmuster mit vielen niederfrequenten und wenigen hochfrequenten V-J-Kombinationsmöglichkeiten. Hochfrequente V-J-Kombinationsmöglichkeiten, die bereits zum Zeitpunkt m0 auftraten, fanden sich auch zum Zeitpunkt m12 der CD4+ CCR7+ T-Zell-Subpopulation der Pat. C und Pat. D. Nach 12-monatiger Therapie mit Fingolimod erhöhte sich die Frequenz von vorher bereits hochfrequente V-J-Rekombinationen in der CD4+ CCR7+ T-Zell-Subpopulation des Pat. D (**Abb. 8a und b**). Die T-Zell-Subpopulation des unbehandelten MS Patienten (uC) zeigte V-J-Kombinationsmöglichkeiten mit den höchsten Frequenzen (**Abb. 8c**). Die CD4+ CCR7+ T-Zell-Subpopulation der gesunden Kontrolle (hC) zeigte im Vergleich die V-J-Kombinationen mit den niedrigsten Frequenzen (**Abb. 8d**).

Probe		Top 5 V-J-Kombinationen					anteilige TRBV5.1 Frequenz im Repertoire
Pat. C CD4+ CCR7+	m0	TRBV5.1 TRBJ1-1	TRBV5.1 TRBJ2-1	TRBV5.1 TRBJ2-3	TRBV5.1 TRBJ2-7	TRBV5.1 TRBJ2-2	0,14
	m12	TRBV5.1 TRBJ1-1	TRBV5.1 TRBJ2-1	TRBV12.3 TRBJ1-1	TRBV5.1 TRBJ2-7	TRBV5.1 TRBJ2-3	0,13
Pat. D CD4+ CCR7+	m0	TRBV5.1 TRBJ2-7	TRBV5.1 TRBJ2-1	TRBV5.1 TRBJ2-3	TRBV5.1 TRBJ1-1	TRBV5.1 TRBJ2-5	0,16
	m12	TRBV5.1 TRBJ1-1	TRBV5.1 TRBJ2-7	TRBV5.1 TRBJ2-1	TRBV5.1 TRBJ2-5	TRBV7.2 TRBJ2-7	0,18
uC CD4+ CCR7+	m0	TRBV5.1 TRBJ2-1	TRBV5.1 TRBJ2-7	TRBV5.1 TRBJ1-1	TRBV5.1 TRBJ2-5	TRBV5.1 TRBJ2-3	0,23
	m10	TRBV5.1 TRBJ2-1	TRBV5.1 TRBJ2.7	TRBV5.1 TRBJ1-1	TRBV20.1 TRBJ2-1	TRBV5.1 TRBJ2-3	0,23
hC CD4+ CCR7+	m0	TRBV5.1 TRBJ2-1	TRBV5.1 TRBJ1-1	TRBV12.3 TRBJ1-1	TRBV12.3 TRBJ1-5	TRBV20.1 TRBJ2-1	0,096
	m12	TRBV12.3 TRBJ1-1	TRBV5.1 TRBJ1-1	TRBV5.1 TRBJ2-1	TRBV12.3 TRBJ1-5	TRBV12.3 TRBJ1-2	0,11

Tabelle 7: Top 5 hochfrequente TZR- $\beta$ -Rekombinationen der CD4+ CCR7+ T-Zell-Subpopulationen der Patienten C und D, des unbehandelten MS Patienten (uC) und der gesunden Kontrolle (hC) zum Zeitpunkt m0 und m10 bzw. m12 mit absteigender Häufigkeit von links nach rechts sowie die Frequenz des TRBV5.1 Segments im TZR- $\beta$ -Repertoire.

### 3.3.2 CD4+ CCR7- T-Zell-Subpopulation

Die CD4+ CCR7- T-Zell-Subpopulation des Pat. C wies zum Zeitpunkt m0 544 V-J-Kombinationsmöglichkeiten auf, zum Zeitpunkt m12 noch 333 Kombinationsmöglichkeiten. Es zeigte sich eine Reduktion der V-J-Kombinationsmöglichkeiten um 38,8 %. Pat. D zeigte zu Beginn 555 V-J-Kombinationsmöglichkeiten in der CD4+ CCR7- T-Subpopulation, nach einer 12-monatigen Therapie mit Fingolimod 365. Es fand sich eine Reduktion der V-J-Kombinationsmöglichkeiten um 34,2 %. Der unbehandelte MS Patient (uC) und die gesunde Kontrolle (hC) zeigten gleichzeitig Veränderungen der TZR- $\beta$ -Rekombinationsmöglichkeiten der CD4+ CCR7- T-Zell-Subpopulation von <4 % Punkten (Tabelle 8).

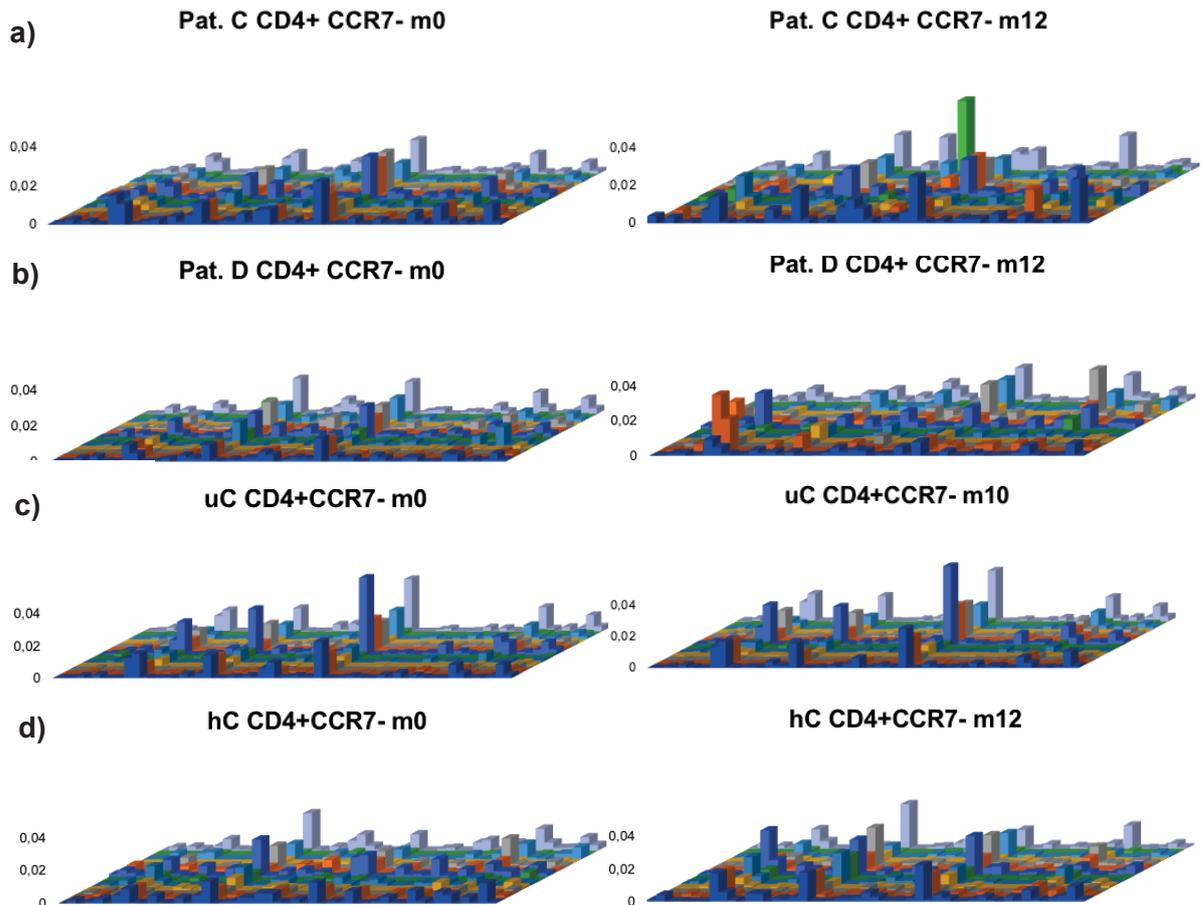
CD4+ CCR7-	Pat. C	Pat. D	uC	hC
m0	544	555	574	370
m10/12	333	365	560	382
	-34,2 %	-38,8 %	-2,4 %	+3,24 %

**Tabelle 8: Anzahl der Rekombinationsmöglichkeiten des TZR- $\beta$  der CD4+ CCR7- T-Zell-Subpopulation der Patienten C und D, des unbehandelten MS Patienten (uC) und der gesunden Kontrolle (hC) zu den Zeitpunkten m0 und m10/m12 sowie die prozentuale Änderung der Rekombinationsmöglichkeiten im Repertoire im zeitlichen Verlauf.**

In dem V-J-Rekombinationsraster der CD4+ CCR7- T-Zell-Subpopulation der Patienten C und D zum Zeitpunkt m0 zeigte sich ein breites Muster an Frequenzen, von vielen niederfrequenten bis zu wenigen hochfrequenten V-J-Kombinationen. In der CD4+ CCR7- T-Zell-Subpopulation des unbehandelten MS Patienten (uC) fand sich hingegen ein flacheres Muster mit wenigen, aber sehr hochfrequenten Unterbrechungen. Die V-J-Kombinationen mit den höchsten Frequenzen fanden sich in der CD4+ CCR7- T-Zell-Subpopulation des unbehandelten MS Patienten (uC). Nach 12-monatiger Therapie mit Fingolimod zeigte sich bei den Patienten C und D in der

CD4<sup>+</sup> CCR7<sup>-</sup> T-Zell-Subpopulation, dass hochfrequente V-J-Kombinationen, die bereits zum Zeitpunkt m0 vorhanden waren, persistierten. Gleichzeitig traten andere, nun sehr hochfrequente V-J-Kombinationen aus dem Muster hervor (Beispiel: Pat. C – grüne V-J-Kombination, Pat. D – orange V-J-Kombination). Bei dem unbehandelten MS Patienten (uC) und der gesunden Kontrolle (hC) zeigte sich eine geringe Variation der V-J-Kombinationen im zeitlichen Verlauf (Abb. 9).

Die in Tabelle 9 zusammengefassten Top 5 V-J-Kombinationen der CD4<sup>+</sup> CCR7<sup>-</sup> T-Zell-Subpopulationen zeigt, dass es keine zwischen allen Probanden übereinstimmenden V-J-Kombinationen unter den Top 5 zum Zeitpunkt m0 gab. Unter den MS Patienten fanden sich TRBV5.1 mit TRBJ2-1 und TRBV5.1 mit TRBJ2-7 als gemeinsame V-J-Kombinationen in der CD4<sup>+</sup> CCR7<sup>-</sup> T-Zellpopulation zum Zeitpunkt m0. Bei Pat. C persistierten 3 von 5 Rezeptorvarianten. Eine neu auftretende hochfrequente Rezeptorvariante war TRBV3.1 mit TRBJ1-6. Bei Pat. D ließ sich eine der Top 5 hochfrequenten Kombinationsmöglichkeiten nach 12 Monaten wiederfinden. Neue dominante Kombinationsmöglichkeiten zum Zeitpunkt m12 waren TRBV12.3 mit TRBJ1-2 und TRBV7.2 mit TRBJ2-3. Nach 10 Monaten zeigte die CD4<sup>+</sup> CCR7<sup>-</sup> T-Zell-Subpopulation des unbehandelten MS Patienten (uC) drei persistierende Rezeptorvarianten unter den Top 5 V-J-Kombinationen. Die gesunde Kontrolle (hC) zeigte eine persistierende Rezeptorvariante nach 12 Monaten. Auch in der CD4<sup>+</sup> CCR7<sup>-</sup> T-Zell-Subpopulation war das variable Segment TRBV5.1 in allen Proben hochfrequent. Hier zeigte sich beim unbehandelten MS Patienten (uC) eine bis zu doppelt so hohe Frequenz des TRBV5.1 Segments im TZR- $\beta$ -Repertoire im Vergleich zur gesunden Kontrolle (Tabelle 9).



**Abb. 9a-d:** V-J-Rekombinationsraster der T-Zell-Subpopulation CD4+ CCR7- der Patienten C und D, des unbehandelten MS Patienten (uC) und der gesunden Kontrolle (hC) zu den Zeitpunkten m0 und m10 bzw. m12. Die X-Achse bildet unterschiedliche V-, die Y-Achse unterschiedliche J-Gensegmente ab. Die Gensegmente sind nicht einzeln benannt, sondern überblickend dargestellt. Die einzelnen Gensegmente sind nicht namentlich benannt, sondern überblickend dargestellt. Auf der Z-Achse wird die Frequenz der V-J-Kombinationen als relativer Anteil am Repertoire der Subpopulation angezeigt.

In der CD4+ CCR7- T-Zell-Subpopulation der Pat. C und Pat. D zeigte sich zum Zeitpunkt m0 ein breites Muster an Frequenzen, mit mehrheitlich niedrig frequenten und wenigen hoch frequenten V-J-Kombinationen. Unter Therapie mit Fingolimod persistierten die zum Zeitpunkt m0 hochfrequenten V-J-Kombinationen bei den Patienten C und D und es traten andere V-J-Kombinationen zum Zeitpunkt m12 hervor. Beispielhaft zu nennen, sind bei Pat. C die grün markierte V-J-Kombination und bei Pat. D die orange markierte (**Abb. 9a und b**). Die CD4+ CCR7- T-Zell-Subpopulation des unbehandelten MS Patienten (uC) zeigte ein flaches Muster, mit den höchsten Frequenzen der V-J-Kombinationen im Vergleich (**Abb. 9c**). Die gesunde Kontrolle zeigte geringe Veränderungen der V-J-Kombination im zeitlichen Verlauf (**Abb. 9d**).

Probe		Top 5 V-J-Kombinationen					TRBV5.1 Frequenz im Repertoire
Pat. C CD4+ CCR7-	m0	TRBV5.1 TRBJ1-1	TRBV5.1 TRBJ2-1	TRBV5.1 TRBJ2-3	TRBV5.1 TRBJ2-2	TRBV5.1 TRBJ2-7	0,14
	m12	TRBV3.1 TRBJ1-6	TRBV5.1 TRBJ1-1	TRBV12.3 TRBJ1-1	TRBV5.1 TRBJ2-7	TRBV5.1 TRBJ2-3	0,12
Pat. D CD4+ CCR7-	m0	TRBV20.1 TRBJ2-7	TRBV5.1 TRBJ2-7	TRBV5.1 TRBJ2-1	TRBV20.1 TRBJ2-3	TRBV20.1 TRBJ2-1	0,12
	m12	TRBV12.3 TRBJ1-2	TRBV7.2 TRBJ2-3	TRBV5.1 TRBJ2-3	TRB12.3 TRBJ2-1	TRBV5.1 TRBJ2-7	0,11
uC CD4+ CCR7-	m0	TRBV5.1 TRBJ2-1	TRBV5.1 TRBJ2-7	TRBV20.1 TRBJ2-1	TRBV5.1 TRBJ1-1	TRBV5.1 TRBJ2-2	0,20
	m10	TRBV5.1 TRBJ2-1	TRBV5.1 TRBJ2-7	TRBV12.4 TRBJ2-1	TRBV5.1 TRBJ1-1	TRBV5.1 TRBJ2-2	0,21
hC CD4+ CCR7-	m0	TRBV20.1 TRBJ2-1	TRBV20.1 TRBJ2-7	TRBV7.2 TRBJ2-3	TRBV20.1 TRBJ2-3	TRBV20.1 TRBJ1-1	0,08
	m12	TRBV12.3 TRBJ2-1	TRBV20.1 TRBJ2-7	TRBV5.1 TRBJ2-1	TRBV20.1 TRBJ2-3	TRBV5.1 TRBJ1-1	0,14

Tabelle 9: Top 5 hochfrequente TZR- $\beta$ -Rekombinationen der CD4+ CCR7- T-Zell-Subpopulationen der Patienten C und D, des unbehandelten MS Patienten (uC) und der gesunden Kontrolle (hC) zu den Zeitpunkten m0 und m10 bzw. m12 mit absteigender Häufigkeit von links nach rechts sowie die Frequenz des TRBV5.1 Segments im Repertoire.

## 3.4 Klonalität und Diversität des TZR- $\beta$ -Repertoires der CD4+ T-Zellen

Zur Darstellung der Klonalität und Diversität des TZR- $\beta$ -Repertoires zu den einzelnen Zeitpunkten m0 und m10 bzw. m12 wurden „3-lagige *Donut* Diagramme“ durch die Programme MiXCR (Bolotin et al., 2015) und *VDJtools* (Shugay et al., 2015) erstellt. Der innerste Ring bildete dabei die Häufigkeit der CDR3 Sequenzen des CD4+ TZR- $\beta$ -Repertoires zu den genannten Zeitpunkten ab. Die Zahlen 1, 2 und 3+ bildeten zusammen 100 % des Repertoires ab. Die Sequenzen, die einmal (1), zweimal (2) oder  $\geq 3$ -mal (3+) im Repertoire auftraten, wurden unter dem entsprechenden Segment gezählt. Einmal auftretende Sequenzen werden „Singletons“, doppelt auftretende Sequenzen werden „Doubletons“ genannt. Ein großer Anteil an Singletons und Doubletons wies auf eine hohe Diversität des TZR- $\beta$ -Repertoires hin.

In der nächsten Lage wurden die Sequenzen, die  $\geq 3$  Mal auftraten, der Häufigkeit nach in Quintile unterteilt (Q1-Q5). Q1 symbolisierte dabei die häufigsten 20 % der  $\geq 3$ mal auftretenden CDR3 Sequenzen, Q2 die darauffolgenden 20 %. Q1-Q5 wurden anteilig an der Gesamtheit der  $\geq 3$ mal auftretenden Sequenzen abgebildet. So ließ sich die Klonalität des TZR- $\beta$ -Repertoires darstellen.

Die letzte Lage benannte die 10 häufigsten, klonal auftretenden CDR3 Sequenzen und zeigte ihren Anteil am gesamten Repertoire. Auf die Top 10 CDR3 Sequenzen wird in Abschnitt 3.6 detailliert eingegangen.

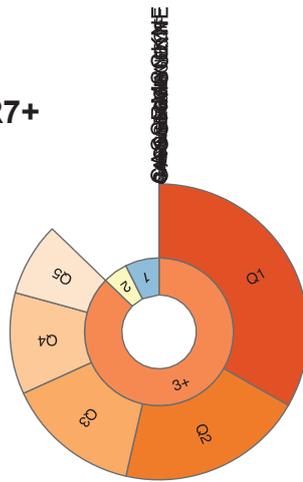
### 3.4.1 CD4+ CCR7+ TZR- $\beta$ -Repertoire

In der CD4+ CCR7+ T-Zell-Subpopulation zeigte sich bei den Patienten C und D unter Therapie mit Fingolimod eine Zunahme der Singletons und Doubletons nach 12 Monaten um das 1,8-fache bei Pat. C und um das 2,7-fache bei Pat. D. Es zeigte sich eine Zunahme der Diversität des TZR- $\beta$ -Repertoires unter Therapie. Gleichzeitig sank der Anteil der  $\geq 3$ mal auftretenden Sequenzen am Repertoire und damit die Klonalität

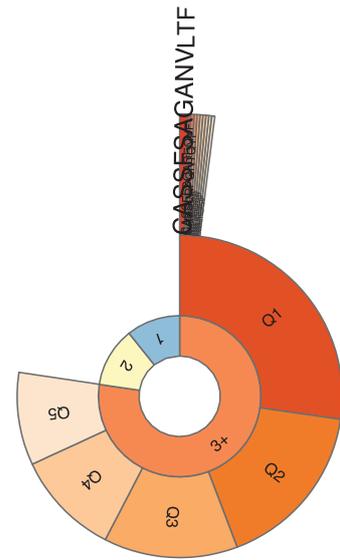
des TZR- $\beta$ -Repertoires bei Pat. C um 11,34 % und bei Pat. D um 51,3 %. Die Top 10 CDR3 Sequenzen machten nach 12-monatiger Immunmodulation bei den Patienten C und D einen größeren Anteil am Repertoire aus als vor Beginn der Therapie. Bei Pat. C stieg der Anteil der Top 10 klonalen CDR3 Sequenzen am gesamten Repertoire um das 5-fache, bei Pat. D um das 16,5-fache (Abb. 10).

a)

Pat. C CD4+ CCR7+



m0

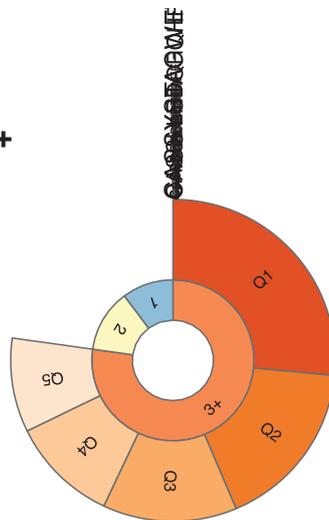


m12

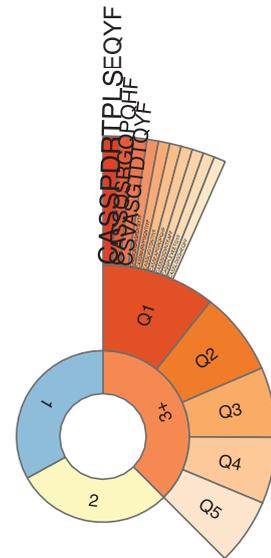
<b>1+2</b>	12,8 %	22,6 %
<b>3+</b>	87,3 %	77,4 %
<b>Top 10 CDR3</b>	0,4 %	2 %

b)

Pat. D CD4+ CCR7+



m0



m12

<b>1+2</b>	22,8 %	62,4 %
<b>3+</b>	77,2 %	37,6 %
<b>Top 10 CDR3</b>	0,4 %	6,6 %

**Abb. 10a, b: Donut Diagramm der Diversität (1+2) und Klonalität (3+) des CD4+ CCR7+ TZR-β-Repertoires sowie die Auflistung der prozentualen Anteile der Singletons und Doubletons (1+2), der  $\geq 3$ mal auftretenden CDR3 Sequenzen (3+) und der 10 häufigsten CDR3 Sequenzen am Repertoire der Patienten C und D zu den Zeitpunkten m0 und m12.** Im zeitlichen Verlauf (m0 und m12) zeigte sich bei den Patienten C und D eine zunehmende Diversität des CD4+ CCR7+ TZR-β-Repertoires. Die Klonalität nahm ab und der Anteil der Top 10 klonalen CDR3 Sequenzen am Repertoire stieg unter Therapie mit Fingolimod.

In 10 Monaten veränderten sich bei dem unbehandelten MS Patienten (uC) die Diversität und Klonalität des TZR-β-Repertoires der CD4+ CCR7+ T-Zell-Subpopulationen nur geringfügig. Der Anteil der klonalen CDR3 Sequenzen am Repertoire veränderte sich von 0,8 % auf 1,4 % (Abb. 11a).

Im CD4+ CCR7- TZR-β-Repertoires der gesunden Kontrolle (hC) sank in 12 Monaten der diverse Repertoireanteil um 39 %, während der klonale Repertoireanteil um das 1,3-fache zunahm. Im Vergleich zu den unbehandelten und behandelten Patienten wies die gesunde Kontrolle (hC) von Beginn an eine höhere Diversität, mit einem höheren Anteil an Singletons und Doubletons, auf. Der Anteil der Top 10 klonalen CDR3 Sequenzen am gesamten Repertoire veränderte sich von 0,6 % auf 1,2 % (Abb. 11b).



**Abb. 11a, b: Donut Diagramm der Diversität (1+2) und Klonalität (3+) des CD4+ CCR7+ TZR- $\beta$ -Repertoires sowie die Auflistung der prozentualen Anteile der Singletons und Doubletons (1+2), der  $\geq 3$ mal auftretenden CDR3 Sequenzen (3+) und der 10 häufigsten CDR3 Sequenzen am Repertoire des unbehandelten MS Patienten (uC) und der gesunden Kontrolle (hC) zu den Zeitpunkten m0 und m10 bzw. m12. Die Diversität und Klonalität des CD4+ CCR7+ TZR- $\beta$ -Repertoires des unbehandelten MS Patienten (uC) unterlag leichten Veränderungen im zeitlichen Verlauf (m0 und m10). In der CD4+ CCR7+ T-Zell-Subpopulation der gesunden Kontrolle nahm die Diversität nach 12 Monaten ab, gleichzeitig stieg die Klonalität. Die gesunde Kontrolle (hC) wies zu jedem Zeitpunkt eine höhere Diversität als der unbehandelte MS Patient (uC) auf.**

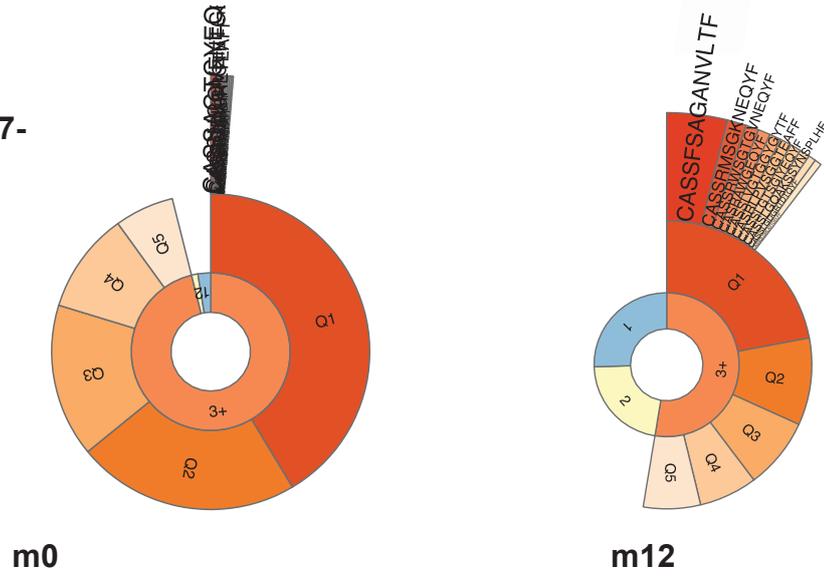
### 3.4.2 CD4+ CCR7- TZR- $\beta$ -Repertoires

In der CD4+ CCR7- T-Zell-Subpopulation zeigte sich unter 12-monatiger Therapie mit Fingolimod bei den Patienten C und D eine Zunahme der Singletons und Doubletons um das 1,21-fache bei Pat. C und um das 4,6-fache bei Pat. D. So fand sich eine größere Diversität des TZR- $\beta$ -Repertoires nach 12 Monaten Therapie. Wie in der CD4+ CCR7+ T-Zell-Subpopulation sank auch in der CD4+ CCR7- T-Zell-Subpopulation der Anteil der  $\geq 3$  auftretenden CDR3 Sequenzen und damit die Klonalität um 45,3 % bei Pat. C und um 22,6 % bei Pat. D. Die Top 10 klonalen Sequenzen machten, ähnlich wie in der CD4+ CCR7+ T-Zell-Subpopulation, nach 12 Monaten einen größeren Anteil am gesamten Repertoire aus. Bei Pat. C veränderte sich dieser Anteil um das 8-fache, bei Pat. D um das 1,7-fache (Abb. 12).

Verglich man die CD4+ CCR7+ und der CD4+ CCR7- T-Zell-Subpopulationen zum Zeitpunkt m0 zeigte sich bei Pat. C eine um das 3,3-fache, bei Pat. D eine um das 3,7-fache erhöhte Diversität des TZR- $\beta$ -Repertoires der CD4+ CCR7+ T-Zell-Subpopulation.

a)

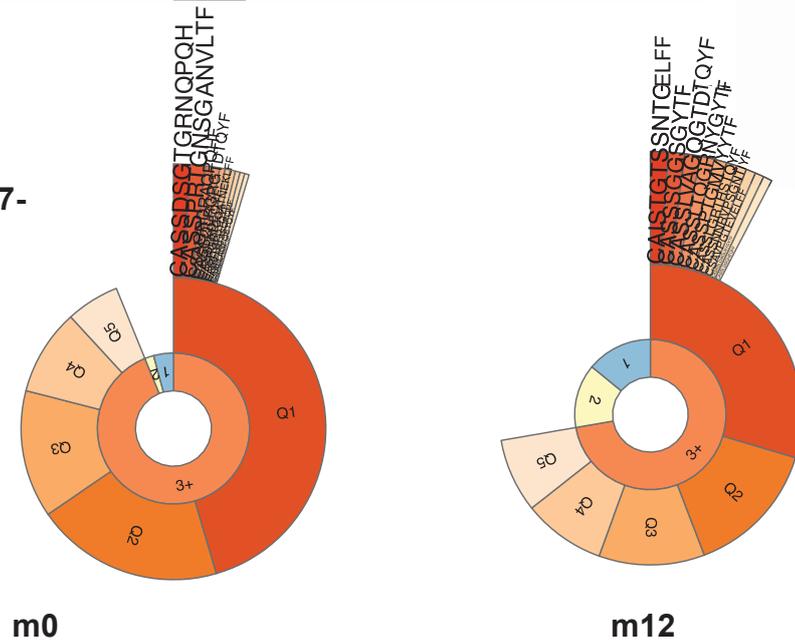
Pat. C CD4+ CCR7-



<b>1+2</b>	3,9 %	47,4 %
<b>3+</b>	96,1 %	52,6 %
<b>Top 10 CDR3</b>	1,3 %	10,4 %

b)

Pat. D CD4+ CCR7-



<b>1+2</b>	6,1 %	27,8 %
<b>3+</b>	93,9 %	72,2 %
<b>Top 10 CDR3</b>	4,6 %	7,6 %

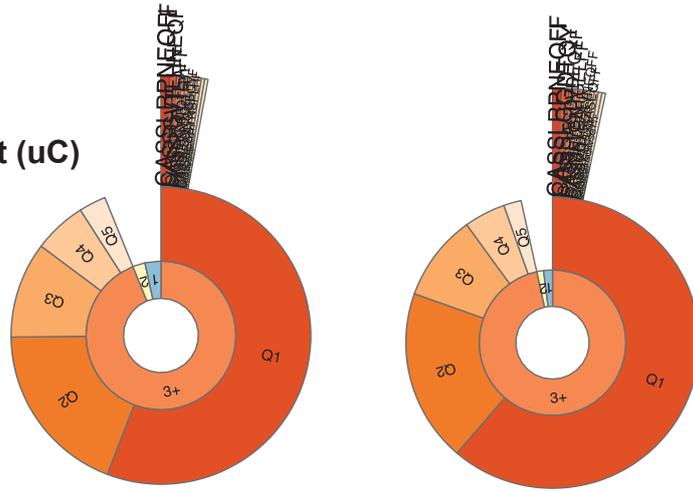
**Abb. 12a, b: Donut Diagramm der Diversität (1+2) und Klonalität (3+) des CD4+ CCR7- TZR-β-Repertoires sowie die Auflistung der prozentualen Anteile der Singletons und Doubletons (1+2), der  $\geq 3$ mal auftretenden CDR3 Sequenzen (3+) und der 10 häufigsten CDR3 Sequenzen am Repertoire der Patienten C und D zu den Zeitpunkten m0 und m12.** Unter 12-monatiger Therapie mit Fingolimod nahm im TZR-β-Repertoire der CD4+ CCR7- T-Zell-Subpopulation der Patienten C und D die Klonalität ab, gleichzeitig nahm die Diversität zu. Der Anteil Top 10 klonalen CDR3 Sequenzen am TZR-β-Repertoire stieg unter Therapie.

Im TZR-β-Repertoire der CD4+ CCR7- T-Zell-Subpopulation des unbehandelten MS Patienten (uC) zeigten sich nach 10 Monaten geringe Veränderungen der Diversität und Klonalität. Der Anteil der klonalen CDR3 Sequenzen am Repertoire veränderte sich von 2,9 % auf 3,3 % (Abb. 13a). Verglich man die Diversität zwischen CD4+ CCR7+ und CD4+ CCR7- T-Zell-Subpopulation, fiel kein klarer Unterschied auf.

Auch die CD4+ CCR7- T-Zell-Subpopulation der gesunden Kontrolle (hC) zeigte nur geringe Schwankungen der Diversität und Klonalität. Im Vergleich zu den MS Patienten wies diese von Beginn an eine geringere Diversität, mit einem niedrigeren Anteil an Singletons und Doubletons, auf. Der Anteil der Top 10 klonalen CDR3 Sequenzen am gesamten Repertoire der CD4+ CCR7- T-Zell-Subpopulation veränderte sich von 3,7 % auf 2,2 % (Abb. 13b). Beim Vergleich der CD4+ CCR7- und CCR7+ T-Zell-Subpopulation der gesunden Kontrolle, fiel eine im Allgemeinen höhere Diversität der CD4+ CCR7+ T-Zell-Subpopulation auf.

a)

Unbehandelter MS Patient (uC)  
CD4+ CCR7-



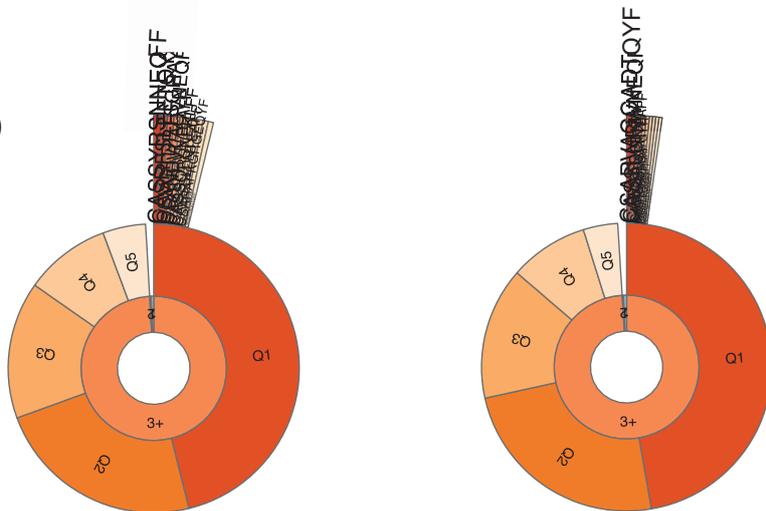
m0

m10

<b>1+2</b>	6,1 %	3,4 %
<b>3+</b>	93,9 %	96,6 %
<b>Top 10 CDR3</b>	2,9 %	3,3 %

b)

Gesunde Kontrolle (hC)  
CD4+ CCR7-



m0

m12

<b>1+2</b>	0,9 %	1 %
<b>3+</b>	99,1 %	99 %
<b>Top 10 CDR3</b>	3,7 %	2,2 %

**Abb. 13a, b: Donut Diagramm der Diversität (1+2) und Klonalität (3+) des CD4+ CCR7- TZR- $\beta$ -Repertoires sowie die Auflistung der prozentualen Anteile der Singletons und Doubletons (1+2), der  $\geq 3$ mal auftretenden CDR3 Sequenzen (3+) und der 10 häufigsten CDR3 Sequenzen am Repertoire des unbehandelten MS Patienten (uC) und der gesunden Kontrolle (hC) zu den Zeitpunkten m0 und m10 bzw. m12. Die Diversität und Klonalität des CD4+ CCR7- TZR- $\beta$ -Repertoires des unbehandelten MS Patienten (uC) und der gesunden Kontrolle zeigten leichte Veränderungen im zeitlichen Verlauf (m0 und m10 bzw. m12).**

## 3.5 Longitudinale Persistenz des CD4+ TZR- $\beta$ -Repertoires

Zur Darstellung der zeitlichen Persistenz des TZR- $\beta$ -Repertoires wurden Daten durch die Programme MiXCR (Bolotin et al., 2015). In Prozent wurde der Anteil der sich überlappenden und persistierenden CDR3 Sequenzen am gesamten Repertoire zu den Zeitpunkten m0 und m10 bzw. m12 berechnet. Auf die hochfrequentesten CDR3 Sequenzen der persistierenden Anteile soll in Abschnitt 3.6 detailliert eingegangen werden.

### 3.5.1 CD4+ CCR7+ TZR- $\beta$ -Repertoires

In der CD4+ CCR7+ T-Zell-Subpopulation des Pat. C machten zu Beginn die CDR3 Sequenzen, die zum Zeitpunkt m12 auch zu finden waren, einen Anteil von 0,7 % aus. Unter 12-monatiger immunmodulativer Therapie mit Fingolimod wuchs dieser Anteil der persistierenden Sequenzen bis auf 5%. Bei Pat. D stieg der Anteil der bereits bekannten CDR3 Sequenzen von 0,2 % auf 3,9 % in der CD4+ CCR7+ T-Zell-Subpopulation. Patienten C und D zeigten so in der CD4+ CCR7+ T-Zell-Subpopulation unter Fingolimod Therapie nur eine geringe Persistenz von  $\leq 5\%$  und damit eine stetige Änderung des TZR- $\beta$ -Repertoires. Dabei nahm unter Immunmodulation der Anteil der überlappenden CDR3 Sequenzen am gesamten Repertoire zu.

Bei dem unbehandelten MS Patienten (uC) und der gesunden Kontrolle (hC) veränderten sich die Anteile der überlappenden CDR3 Sequenzen im Zeitraum von 10 bzw. 12 Monaten um wenige Prozentpunkte. Gleichzeitig blieb der Anteil der persistierenden CDR3 Sequenzen bei  $< 5\%$ . So zeigte sich auch hier eine geringe

Persistenz im Repertoire der CD4+ CCR7+ T-Zell-Subpopulation im zeitlichen Verlauf (Tabelle 10).

CD4+ CCR7+	Pat. C	Pat. D	uC	hC
m0	0,7 %	0,2 %	2,7 %	0,6 %
m10/12	5 %	3,9 %	4,3 %	1,2 %
Anzahl überlappender Klone	122	30	369	93

**Tabelle 10: Prozentualer Anteil des sich überlappenden TZR- $\beta$ -Repertoires der CD4+ CCR7+ T-Zell-Subpopulation von Pat. C, Pat. D, dem unbehandelten MS Patienten (uC) und der gesunden Kontrolle (hC) zu den Zeitpunkten m0 und m10 bzw. m12.**

### 3.5.2 CD4+ CCR7- TZR- $\beta$ -Repertoires

In der CD4+ CCR7- T-Zell-Subpopulation des Pat. C machten zum Zeitpunkt m0 überlappende CDR3 Sequenzen einen Anteil von 5,5 % am gesamten TZR- $\beta$ -Repertoire aus. Nach 12-monatiger immunmodulatorischer Therapie mit Fingolimod stieg der Anteil der persistierenden CDR3 Sequenzen auf 28,6 %. Mit einem Anstieg des Anteils der persistierenden Sequenzen von 6,3 % auf 24,6 % zeigte Pat. D in der CD4+ CCR7- T-Zell-Subpopulation ähnliche Ergebnisse. Das Immunrepertoire der MS Patienten unter Therapie mit Fingolimod besteht somit zum Zeitpunkt m12 zu etwa 25 % aus bereits bekannten CDR3 Sequenzen.

Bei der CD4+ CCR7- T-Zell-Subpopulation des unbehandelten MS Patienten (uC) fand sich währenddessen mit 40,7 % und 41 % ein konstant hoher Anteil der persistierenden CDR3 Sequenzen.

Die gesunde Kontrolle (hC) wies mit einem überlappenden Anteil von <3,5 % im TZR- $\beta$ -Repertoire eine geringe Persistenz von CDR3 Sequenzen in der CD4+ CCR7- T-Zell-Subpopulation auf (Tabelle 11).

CD4+ CCR7-	Pat. C	Pat. D	uC	hC
m0	5,5 %	6,3 %	40,7 %	3,4 %
m10/12	28,6 %	24,6 %	41 %	2,6 %
Anzahl überlappender Klone	188	299	2557	53

Tabelle 11: Prozentualer Anteil des sich überlappenden TZR- $\beta$ -Repertoires der CD4+ CCR7- T-Zell-Subpopulation von Pat. C, Pat. D, dem unbehandelten MS Patienten (uC) und der gesunden Kontrolle (hC) zu den Zeitpunkten m0 und m10 bzw. m12.

### 3.6 Hochfrequente CDR3 Sequenzen im TZR- $\beta$ -Repertoire

Auf Basis der Rohdaten wurde nun die in Abschnitt 3.3 beschriebene Q1 Fraktion der  $\geq 3$ mal auftretenden klonalen CDR3 Sequenzen mit den ermittelten persistierenden Sequenzen verglichen. Dabei wurden jeweils die 10 hochfrequentesten CDR3 Sequenzen betrachtet. Es ergaben sich die Top 10 CDR3 Sequenzen zu den Zeitpunkten m0 und m10 bzw. m12 und die Top 10 der über die Zeit persistierenden CDR3 Sequenzen.

#### 3.6.1 CD4+ TZR- $\beta$ -Repertoire des Patienten C

Unter den häufigsten 10 CDR3 Sequenzen der CD4+ CCR7+ T-Zell-Subpopulation fand sich zwischen den Zeitpunkten m0 und m12 keine Übereinstimmung. Die persistierende CDR3 Sequenz *CASSLEGGLYNEQFF*, die zum Zeitpunkt m0 hochfrequent auftrat, ließ sich nach 12-monatiger Immunmodulation durch Fingolimod nicht mehr unter den Top 10 CDR3 Sequenzen zum Zeitpunkt m12 finden. Die persistierenden CDR3 Sequenzen *CASSFSAGANVLTF*, *CATSRDRVSSPGPQHF* und *CASSLRPQNTQYF* zeigten sich zum Zeitpunkt m0 nicht unter den Top 10 CDR3 Sequenzen, wurden aber durch Therapie mit Fingolimod zu drei der vier häufigsten CDR3 Sequenzen zum Zeitpunkt m12. So machte *CASSFSAGANVLTF* zum Zeitpunkt

m12 einen Anteil von 0,44 % am gesamten CD4+ CCR7+ TZR- $\beta$ -Repertoires des Pat. C aus. In der CD4+ CCR7- T-Zell-Subpopulation des Pat. C fanden sich die persistierenden Sequenzen *CASSRMSGKNEQYF* und *CASSRWSGTGVNEQYF* nicht zum Zeitpunkt m0 unter den Top 10 CDR3 Sequenzen. Nach 12-monatiger Therapie zeigten sich *CASSRMSGKNEQYF* mit anteilig 1,21 % und *CASSRWSGTGVNEQYF* mit anteilig 0,82 % unter den Top 3 der Top 10 CDR3 Sequenzen. Die persistierende CDR3 Sequenz *CASSFSAGANVLTf* fand sich zu den Zeitpunkten m0 und m12 unter den Top 10 der häufigsten CDR3 Sequenzen. Unter Immunmodulation durch Fingolimod wuchs ihr Anteil am Repertoire von 0,21 % zum Zeitpunkt m0 auf 3,85 % zum Zeitpunkt m12. Die CDR3 Sequenzen *CASSFSAGANVLTf* und *CASSRMSGKNEQYF* fanden sich sowohl in der CD4+ CCR7+ als auch in der CD4+ CCR7- T-Zell-Subpopulation (Tabelle 12).

**Patient C**

Top 10 überlappende CDR3 Sequenzen	Top 10 CDR3 Sequenzen zum Zeitpunkt m0 und deren Anteil am Repertoire in %	Top 10 CDR3 Sequenzen zum Zeitpunkt m12 und deren Anteil am Repertoire in %
<b>CD4+ CCR7+</b>		
<u>CASSFSAGANVLTF</u>	<u>CASSRMSGKNEQYF</u> 0,05	<u>CASSFSAGANVLTF</u> 0,44
CASSLEGGLYNEQFF	CASSLEGGLYNEQFF 0,04	CASSFLSQAGEQYF 0,19
CATSRDRVSSPGPQHF	CASSSSGTENIQYF 0,04	CASSLRPQNTQYF 0,19
CASSLALRGGVNEQFF	CASSLLEGGRGEQYF 0,04	CATSRDRVSSPGPQHF 0,17
CASRPSPEQSGYTF	CASNTNTDTQYF 0,04	CATRMSGDTGELFF 0,17
<u>CASSLRPQNTQYF</u>	CSSPLKRDRTYSGNTIYF 0,04	CASSPTSGGYNEQFF 0,17
CASSLPDGQGTEAFF	CASSPGLNYEQYF 0,04	CASSLDRGVGPELFF 0,17
CASSWYFQNTGELFF	CSVTGVSYNEQFF 0,04	CASSLGQARANVLTF 0,17
CASSFSLVAADTQYF	CASSLFAVYEQYF 0,04	CASSLGLVGGEQYF 0,17
CASGWGEQFF	CASSPQGDQPQHF 0,04	CATARGTNQPQHF 0,17
<b>CD4+CCR7-</b>		
<u>CASSFSAGANVLTF</u>	CASSAGTGYEQYF 0,21	<u>CASSFSAGANVLTF</u> 3,85
<u>CASSRMSGKNEQYF</u>	CASSNGQVENTGELFF 0,18	<u>CASSRMSGKNEQYF</u> 1,21
CASSNGQVENTGELFF	CASSQDKPPCTF 0,15	CASSRWSGTGVNEQYF 0,82
CASSQDKPPCTF	CASSPDRGRETEAFF 0,14	CASRAWGEQYF 0,78
CASSLRQKPNTAEFF	<u>CASSFSAGANVLTF</u> 0,11	CASSLVGTGGYGYTF 0,74
CSGDRGNTEAFF	CASSQVSLNSPLHF 0,1	CASRLPVSGGTEAFF 0,74
CASSTDSGNQPQHF	CSGDRGNTEAFF 0,1	CASSLGTSGIYEQYF 0,69
CASSSREGLHGYTF	CASSLRQKPNTAEFF 0,1	CASSLGQAKSSYNSPLHF 0,65
<u>CASSAGTGYEQYF</u>	CASSRLRAGGNEQFF 0,1	CASSLGDGRTDTQYF 0,48
<u>CASSRWSGTGVNEQYF</u>	CASSLEGPAFYNEQFF 0,09	CASSQLDMLAVTGELFF 0,43

**Tabelle 12: Die Top 10 der im zeitlichen Verlauf persistierenden CDR3 Sequenzen im Vergleich zu den Top 10 CDR3 Sequenzen zu den Zeitpunkten m0 und m12 der CD4+ CCR7+ und CD4+ CCR7- T-Zellen des Patienten C. Blau** markierte CDR3 Sequenzen persistieren und fanden sich unter den Top 10 der CDR3 Sequenzen zum Zeitpunkt m0. **Rot** markierte CDR3 Sequenzen persistierten und fanden sich unter den Top 10 der CDR3 Sequenzen zum Zeitpunkt m12. **Grün** markierte CDR3 Sequenzen persistierten und fanden sich sowohl zum Zeitpunkt m0, als auch zum Zeitpunkt m12 unter den Top 10 CDR3 Sequenzen. Unterstrichene CDR3 Sequenzen finden sich sowohl in der CD4+ CCR7+ als auch der CD4+ CCR7- T-Zell-Subpopulation.

### 3.6.2 CD4+ TZR- $\beta$ -Repertoire des Patienten D

In der CD4+ CCR7+ T-Zell-Subpopulation des Pat. D fanden sich keine Übereinstimmungen zwischen Top 10 der überlappenden CDR3 Sequenzen und den Top 10 der häufigsten CDR3 Sequenzen zu den Zeitpunkten m0 und m12. Unter Immunmodulation durch Fingolimod wuchs der Anteil einzelner hochfrequenter CDR3 Sequenzen am TZR- $\beta$ -Repertoire. So war zum Zeitpunkt m0 die CDR3 Sequenz *CASSYSTAGWETQYF* mit 0,06 % am TZR- $\beta$ -Repertoire dominant. Nach 12-monatiger Therapie zeigte die Sequenz *CASSPDRTPLEQYF* mit 0,86 % ein etwa 10mal so häufiges Auftreten wie *CASSYSTAGWETQYF*. Die CD4+ CCR7- T-Zell-Subpopulation des Pat. D zeigte drei persistierende CDR3 Sequenzen, die nach 12-monatiger Immunmodulation mit Fingolimod nicht mehr unter den Top 10 CDR3 Sequenzen zu finden waren (*CASSDSGTGRNQPQHF*, *CASSTGPDTQYF* und *CASSARADRGNSPLHF*). Gleichzeitig fanden sich drei persistierende CDR3 Sequenzen, die zum Zeitpunkt m0 nicht unter den Top 10 CDR3 Sequenzen auftraten, jedoch durch Therapie mit Fingolimod nach 12 Monaten zu den Top 10 CDR3 Sequenzen zählten (*CASSPTGMVYYTF*, *CASSNNRVPSGNTIYF* und *CASSLTQGRNYGYTF*). Die dominante Sequenzen *CASSDSGTGRNQPQHF* zum Zeitpunkt m0 und *CAISTGTSSNTGELFF* zum Zeitpunkt m12 nahmen mit etwa 1 % einen gleichen Anteil am TZR- $\beta$ -Repertoire der CD4+ CCR7- T-Zell-Subpopulation ein. Bei Pat. D traten die Sequenzen *CASSNNRVPSGNTIYF* und *CASSLGGGHEQFF* sowohl in der CD4+ CCR7+ als auch in der CD4+ CCR7- T-Zell-Subpopulationen auf (Tabelle 13).

**Patient D**

Top 10 überlappende CDR3 Sequenzen	Top 10 CDR3 Sequenzen zum Zeitpunkt m0 und deren Anteil am Repertoire in %	Top 10 CDR3 Sequenzen zum Zeitpunkt m12 und deren Anteil am Repertoire in %
<b>CD4+ CCR7+</b>		
CASERTPQETQYF	CASSYSTAGWETQYF 0,06	CASSPDRTPLESEQYF 0,86
CASSFSGGGTDTQYF	CASSLLRDQPQHF 0,05	CASSQSRGQPQHF 0,73
CSARPASGRAYNEQFF	CASSQERHRDTEAFF 0,04	CSVASGTDQYF 0,73
CASSLGRSDTQYF	CASSSQASSPLHF 0,04	CASSQEGHISRDIYGYTF 0,61
CASSQADRINSPLHF	CASRGHRGASTF 0,04	<u>CASSNNRVPSGNTIYF</u> 0,61
CSVGDRVNTEAFF	CASGLAGGSYNEQFF 0,04	CASSLVGTGNTIYF 0,61
CSARGSQRDGYTF	CASDDPGQGGFQAFF 0,04	CASSEAPGRQPQHF 0,61
CASSLELAGDETQYF	CASSRQGNTGELFF 0,04	CASSSGQVNTEAFF 0,61
CSVGGTGDLGAYEQYF	CASSLGGNNEQFF 0,04	CASSPLEVEETQYF 0,61
CASSLADDYEQYF	CASRKTGAYEQYF 0,04	<u>CASSLGGGHEQFF</u> 0,61
<b>CD4+CCR7-</b>		
<b>CASSPTGMVYYTF</b>	<b>CASSDSGTGRNQPHF</b> 1	CAISTGTSSNTGELFF 1,08
<b>CASSDSGTGRNQPHF</b>	CASSPRTGNNGANVLTFF 0,91	CASSSGGSYTF 1
<b>CASSTGPDTQYF</b>	CSAGRDRAPQPHF 0,44	CASSLVAGQGTDTQYF 0,95
<b>CASSNNRVPSGNTIYF</b>	CASSQLRGRGTDQYF 0,42	<b>CASSLTQGRNYGYTF</b> 0,85
CASSGTAPIYGYTF	CASSLKDEQYF 0,33	<b>CASSPTGMVYYTF</b> 0,77
<b>CASSARADRGNSNSPLHF</b>	CASRGRTGGATNEKLTFF 0,32	CASSLGRTHSTQYF 0,64
CASSLPHPNTEAFF	<b>CASSTGPDTQYF</b> 0,3	<u>CASSNNRVPSGNTIYF</u> 0,62
<b>CASSLTQGRNYGYTF</b>	CASSPAGTSSQPQHF 0,29	CSAVPGTEVELTFF 0,59
CASSQDNGETQYF	CSALLAGFQETQYF 0,28	CASRSLGMGLNYGYTF 0,54
CASSLAENIQYF	<b>CASSARADRGNSNSPLHF</b> 0,27	<u>CASSLGGGHEQFF</u> 0,54

**Tabelle 13: Die hochfrequentesten Top 10 der im zeitlichen Verlauf persistierenden CDR3 Sequenzen im Vergleich zu den Top 10 CDR3 Sequenzen zu den Zeitpunkten m0 und m12 der CD4+ CCR7+ und CD4+ CCR7- T-Zellen des Patienten D. Blau markierte CDR3 Sequenzen persistierten und fanden sich unter den Top 10 der CDR3 Sequenzen zum Zeitpunkt m0. Rot markierte CDR3 Sequenzen persistierten und fanden sich unter den Top 10 der CDR3 Sequenzen zum Zeitpunkt m12. Unterstrichene CDR3 Sequenzen fanden sich sowohl in der CD4+ CCR7+ als auch der CD4+ CCR7- T-Zell-Subpopulation.**

### 3.6.3 CD4+ TZR- $\beta$ -Repertoire des unbehandelten MS Patienten

In der CD4+ CCR7+ T-Zell-Subpopulation des unbehandelten MS Patienten (uC) trat die CDR3 Sequenz *CSVDRGNEQFF* zu beiden Zeitpunkten m0 und m10 an Platz 1 der Top 10 CDR3 Sequenzen auf. Der Anteil dieser Sequenz am TZR- $\beta$ -Repertoire der CD4+ CCR7+ T-Zell-Subpopulation stieg von 0,1 % auf 0,28 %. Gleichzeitig zeigten sich die persistierenden CDR3 Sequenzen *CASTLGSQQFF* und *CASKGEYEQYF* nur unter den Top 10 CDR3 Sequenzen zum Zeitpunkt m10, jedoch nicht zum Zeitpunkt m0. In der CD4+ CCR7- T-Zell-Subpopulation des unbehandelten MS Patienten (uC) fanden sich drei Sequenzen, die über den Zeitraum von 10 Monaten persistierten, jeweils unter den Top 10 CDR3 Sequenzen zu den Zeitpunkten m0 und m10 (*CASSLTGNTGELFF*, *CASSLGGDTQYF* und *CASSLRPNEQFF*). Während der Anteil der beiden Sequenzen *CASSLTGNTGELFF* und *CASSLGGDTQYF* am CD4+ CCR7- TZR- $\beta$ -Repertoire schwankte, blieb die Sequenz *CASSLRPNEQFF* mit etwa 0,53 % auf Platz 1 der Top 10 CDR3 Sequenzen. Gleichzeitig zeigten sich drei persistierende CDR3 Sequenzen, die nicht unter den Top 10 CDR3 Sequenzen des Zeitpunkts m0, aber unter den Top 10 CDR3+ Sequenzen des Zeitpunkts m10 zu finden waren (*CASSLIAGDVDEQYF*, *CASSQQTGGSYNEQFF* und *CASSLDQVGNEQFF*). Auch drei Sequenzen traten zum Zeitpunkt m0 unter den Top10 CDR3 Sequenzen und fanden sich nach 10 Monaten nicht mehr unter den Top10 CDR3 Sequenzen (*CASSLRPNEQFF*, *CASSLGGDTQYF* und *CASSLTGNTGELFF*). Im TZR- $\beta$ -Repertoire des unbehandelten MS Patienten (uC) fand sich die Sequenz *CASSLQPGQAVSGYTF*, die zwischen der CD4+ CCR7+ und CD4+ CCR7- T-Zell-Subpopulation übereinstimmte (Tabelle 14).

**unbehandelter MS Patient (uC)**

Top 10 überlappende CDR3 Sequenzen	Top 10 CDR3 Sequenzen zum Zeitpunkt m0 und deren Anteil am Repertoire in %	Top 10 CDR3 Sequenzen zum Zeitpunkt m10 und deren Anteil am Repertoire in %
<b>CD4+ CCR7+</b>		
CSVDRGNEQFF	CASTLGSQQFF 0,1	CSVDRGNEQFF 0,28
CASTLGSQQFF	CASSQRDEQFF 0,1	CASTLGSQQFF 0,13
CASSEGAGYQPQHF	CSATDSHTYNEQFF 0,09	CASKGEYEQYF 0,13
CASKGEYEQYF	CASSPQGEAFF 0,09	CASSPQLGTADGELFF 0,13
CASSSDRVSFYGYTF	CASSPPINTGELFF 0,08	CASSQPSQRLYGYTF 0,12
CSAGQNQETQYF	CASSLGQKGTEAFF 0,08	CASREESSEYQYF 0,12
CASGKRTSGNLYNEQFF	CASSFEQGVQSNGYTF 0,07	CASSRTPNYGYTF 0,12
CATSRGFDSGWQFF	CASSLGLGNTEAFF 0,07	CASSQERGRMDSPLHF 0,12
CASSSGEGQPQHF	CASSLHRIYEQYF 0,07	CASSLNRVNEQFF 0,11
CSARLSQNTGELFF	CASSLEQGN SPLHF 0,07	<u>CASSLQPGQAVSGYTF</u> 0,11
<b>CD4+CCR7-</b>		
CASSLRPNEQFF	CASSLRPNEQFF 0,52	CASSLRPNEQFF 0,53
CASSLGGDTQYF	CASSGVTLHNEQFF 0,42	CASSLGGDTQYF 0,49
CASSLTGNTGELFF	CASSFQVTEAFF 0,32	CASSLIAGDVDEQYF 0,36
CASSLIAGDVDEQYF	CASSFKLATDTQYF 0,26	CASSLTGNTGELFF 0,35
CASSQQTGGSYNEQFF	CASSLTGNTGELFF 0,25	CASMNTEAFF 0,32
CASSGDGTSLYEQYF	CASSLSQGGGEQYF 0,24	CASSQQTGGSYNEQFF 0,28
CASSLSQGGGEQYF	CAISAESSYNSPLHF 0,24	CASSYTPDSASEQFF 0,27
CASSLYANYGYTF	CASSLGGDTQYF 0,21	CASRDTGNSPLHF 0,24
CASSSTGLTEAFF	CASSLGQGHTEAFF 0,2	<u>CASSLQPGQAVSGYTF</u> 0,23
CASSLDQVGNEQFF	CASSGDGTSLYEQYF 0,2	CASSLDQVGNEQFF 0,22

**Tabelle 14: Die Top 10 der im zeitlichen Verlauf persistierenden CDR3 Sequenzen im Vergleich zu den Top 10 CDR3 Sequenzen zu den Zeitpunkten m0 und m10 der CD4+ CCR7+ und CD4+ CCR7- T-Zellen des unbehandelten MS Patienten (uC). Blau** markierte CDR3 Sequenzen persistierten und fanden sich unter den Top 10 der CDR3 Sequenzen zum Zeitpunkt m0. **Rot** markierte CDR3 Sequenzen persistierten und fanden sich unter den Top 10 der CDR3 Sequenzen zum Zeitpunkt m10. **Grün** markierte CDR3 Sequenzen persistieren und fanden sich sowohl zum Zeitpunkt m0, als auch zum Zeitpunkt m10. Unterstrichene CDR3 Sequenzen fanden sich sowohl in der CD4+ CCR7+, als auch der CD4+ CCR7- T-Zell-Subpopulation.

### 3.6.4 CD4+ TZR- $\beta$ -Repertoire der gesunden Kontrolle

Sowohl in der CD4+ CCR7+ als auch der CD4+ CCR7- T-Zell-Subpopulation der gesunden Kontrolle (hC) fanden sich keine der persistierenden CDR3 Sequenzen unter den Top 10 CDR3 Sequenzen zweier Zeitpunkte. In der CD4+ CCR7+ T-Zell-Subpopulation zeigte sich die persistierende CDR3 Sequenz *CASRSDRTGELFF* zum Zeitpunkt m0 unter den Top 10 CDR3 Sequenzen. Sie fand sich nicht mehr unter den Top 10 CDR3 Sequenzen zum Zeitpunkt m12. In der CD4+ CCR7- T-Zell-Subpopulation fanden sich die persistierenden CDR3 Sequenzen *CASSASGNTIYF* und *CASSLNRWNEQFF* nicht unter den Top 10 CDR3 Sequenzen zum Zeitpunkt m0, aber unter den Top CDR3 Sequenzen zum Zeitpunkt m12. Gleichzeitig trat die CDR3 Sequenz *CASSLLNTEAFF* nur zum Zeitpunkt m0 unter den Top 10 CDR3 Sequenzen und nicht zum Zeitpunkt m12 unter den Top 10 CDR3 Sequenzen auf. Es fanden sich keine übereinstimmenden Sequenzen zwischen der CD4+ CCR7+ und der CD4+ CCR7- T-Zell-Subpopulation (Tabelle 15).

gesunde Kontrolle (hC)

Top 10 überlappende CDR3 Sequenzen	Top 10 CDR3 Sequenzen zum Zeitpunkt m0 und deren Anteil am Repertoire in %	Top 10 CDR3 Sequenzen zum Zeitpunkt m12 und deren Anteil am Repertoire in %
<b>CD4+CCR7+</b>		
CASRSVRTGELFF	CASRSVRTGELFF 0,1	CASSPSGGFLNTEAFF 0,15
CASSLRGDTGELFF	CASSFLGGNTEAFF 0,07	CASSLADSYNEQFF 0,14
CASSYSGSGANVLTFF	CASSLENSAVANSPLHF 0,06	CASSLRQNQPQHF 0,14
CASSQEVTTRDPQHF	CSVEFSSGSGTDTQYF 0,06	CASSQPRANEQFF 0,12
CASSLNSGIPTGELFF	CASSLSGQGSNQPQHF 0,06	CASSLEGQNTEAFF 0,11
CASSPGGGLLAKNIQYF	CASGPTVANTGELFF 0,05	CASIAIGLTEAFF 0,12
CASSLGYRDTEAFF	CASSSHRNQPQHF 0,05	CASSLQGGPQHF 0,11
CASSIGQGDGYTF	CASSHATSGGPDGTQYF 0,05	CASSLDSGNQPQHF 0,1
CASSPRAPDTQYF	CASSTDWGQIQETQYF 0,05	CASSLDRANEKLFF 0,1
CASSLAVRSDTQYF	CASSRPLLLSGNTIYF 0,05	CASSLEGQGTEAFF 0,1
<b>CD4+CCR7-</b>		
CASSASGNTIYF	CASSYRSNNEQFF 0,43	CSARVAGGADTQYF 0,29
CASSLNRWNEQFF	CASRFLEETQYF 0,42	CASSLNRWNEQFF 0,27
CASSGRFAAEAFF	CSVGTDPSTGRAYEQYF 0,41	CASSASGNTIYF 0,24
CASSLAGDGTGELFF	CSANDVLAVNEQFF 0,39	CASTLGDSPRTEAFF 0,22
CASSFEVNTGELFF	CASSFRVNTEAFF 0,37	CSARGRDRGAYGYTF 0,21
CASRPTRNYGYTF	CASSQRSNEKLFF 0,37	CASSFGAQNQPQHF 0,2
CASSLLNTEAFF	CASSLLNTEAFF 0,36	CASSLEGGELFF 0,2
CASRKPFSGGEGDTQYF	CSARAPKGRGEQYF 0,35	CASSTPYNEQFF 0,2
CSAGQGTMSQFF	CASSLAGNTEAFF 0,33	CASSSPSGRDLRSYNEQFF 0,2
CASRFSDTVNSPLHF	CASSPYRQGTQYF 0,33	CASSLLMESGELFF 0,2

**Tabelle 15: Die Top 10 der im zeitlichen Verlauf persistierenden CDR3 Sequenzen im Vergleich zu den Top 10 CDR3 Sequenzen zu den Zeitpunkten m0 und m12 der CD4+ CCR7+ und CD4+ CCR7- T-Zellen der gesunden Kontrolle (hC). Blau** markierte CDR3 Sequenzen persistierten und fanden sich unter den Top 10 der CDR3 Sequenzen zum Zeitpunkt m0. **Rot** markierte CDR3 Sequenzen persistierten und finden sich unter den Top 10 der CDR3 Sequenzen zum Zeitpunkt m12.

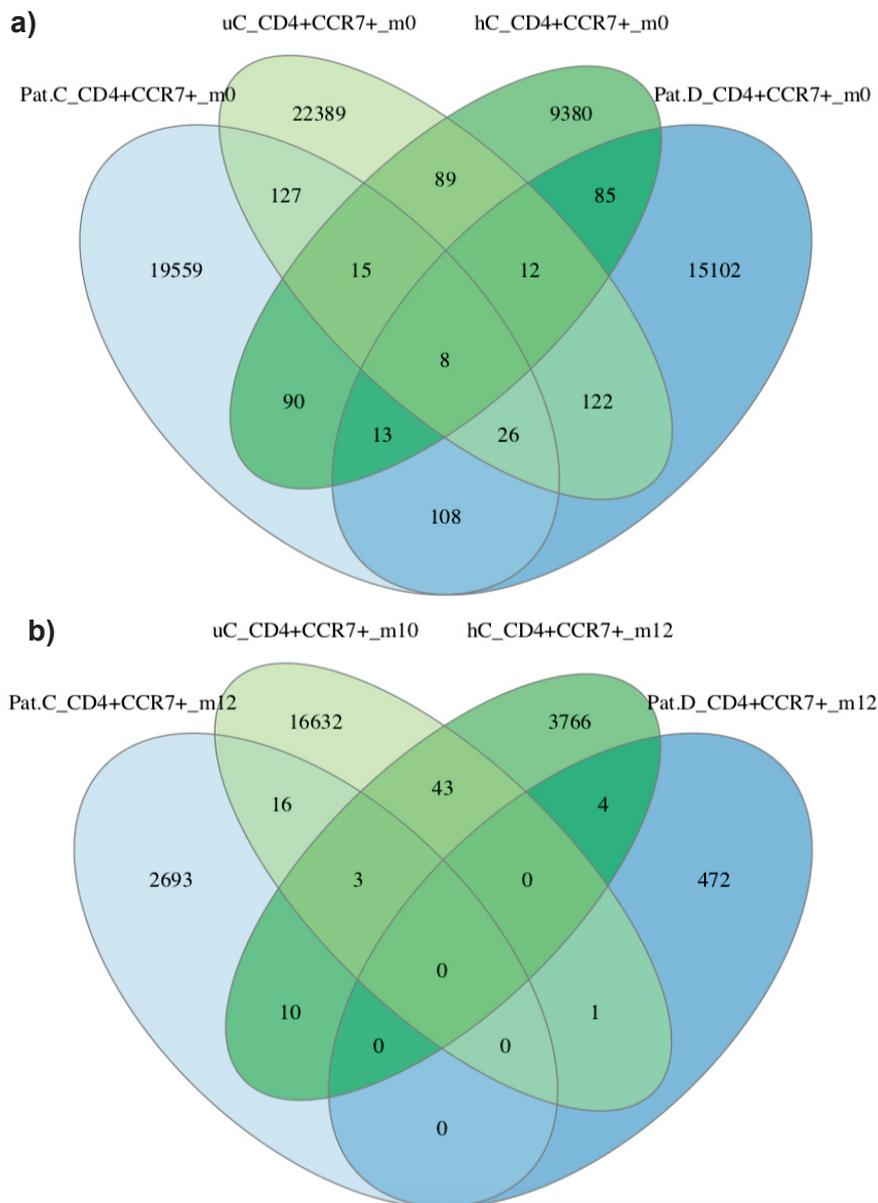
## 3.7 Identifizierung öffentlicher und privater Klonotypen

Zur Identifizierung öffentlicher und privater Klonotypen werden im Folgenden die zwischen den Pat. C, Pat. D, dem unbehandelten MS Patienten (uC) und der gesunden Kontrolle (hC) übereinstimmenden Klonotypen dargestellt. Als private Klone galten in diesem Fall Klonotypen, die sich nur in einer der vier Proben finden ließen. Als öffentliche Klonotypen galten die CDR3 Sequenzen, die sich in  $\geq 2$  Proben finden ließen.

### 3.7.1 CD4+ CCR7+ T-Zell-Subpopulation

In den CD4+ CCR7+ T-Zell-Subpopulationen der Pat. C, Pat. D, des unbehandelten MS Patienten (uC) und der gesunden Kontrolle fanden sich zum Zeitpunkt m0 66.430 Klonotypen, die nur in einer der vier Proben zu finden waren, hier definiert als private Klonotypen. Gleichzeitig ließen sich in den CD4+ CCR7+ T-Zellpopulationen der vier Probanden insgesamt 695 Klonotypen identifizieren, die in  $\geq 2$  Proben zu finden waren und somit hier als öffentlich definiert werden. Etwa 1,1 % aller abgebildeten Klonotypen zum Zeitpunkt m0 war damit privat. Darunter fanden sich 357 Klonotypen, die zwischen zwei MS Patienten und 26 Klonotypen, die zwischen allen drei MS Patienten übereinstimmten (Abb. 14a).

Nach 10 bzw. 12 Monaten und mitunter einer Therapie mit Fingolimod ließen sich in den CD4+ CCR7+ T-Zell-Subpopulationen 23.563 Klonotypen als privat und 77 Klonotypen als öffentlich identifizieren. Öffentliche Klonotypen machten somit nach 10 bzw. 12 Monaten anteilig etwa 0,3 % an allen ermittelten Klonotypen aus. Unter den öffentlichen Klonotypen konnten 17 Klonotypen zwischen zwei MS Patienten und keine Klonotypen zwischen allen drei MS Patienten als übereinstimmend identifiziert werden (Abb. 14b).



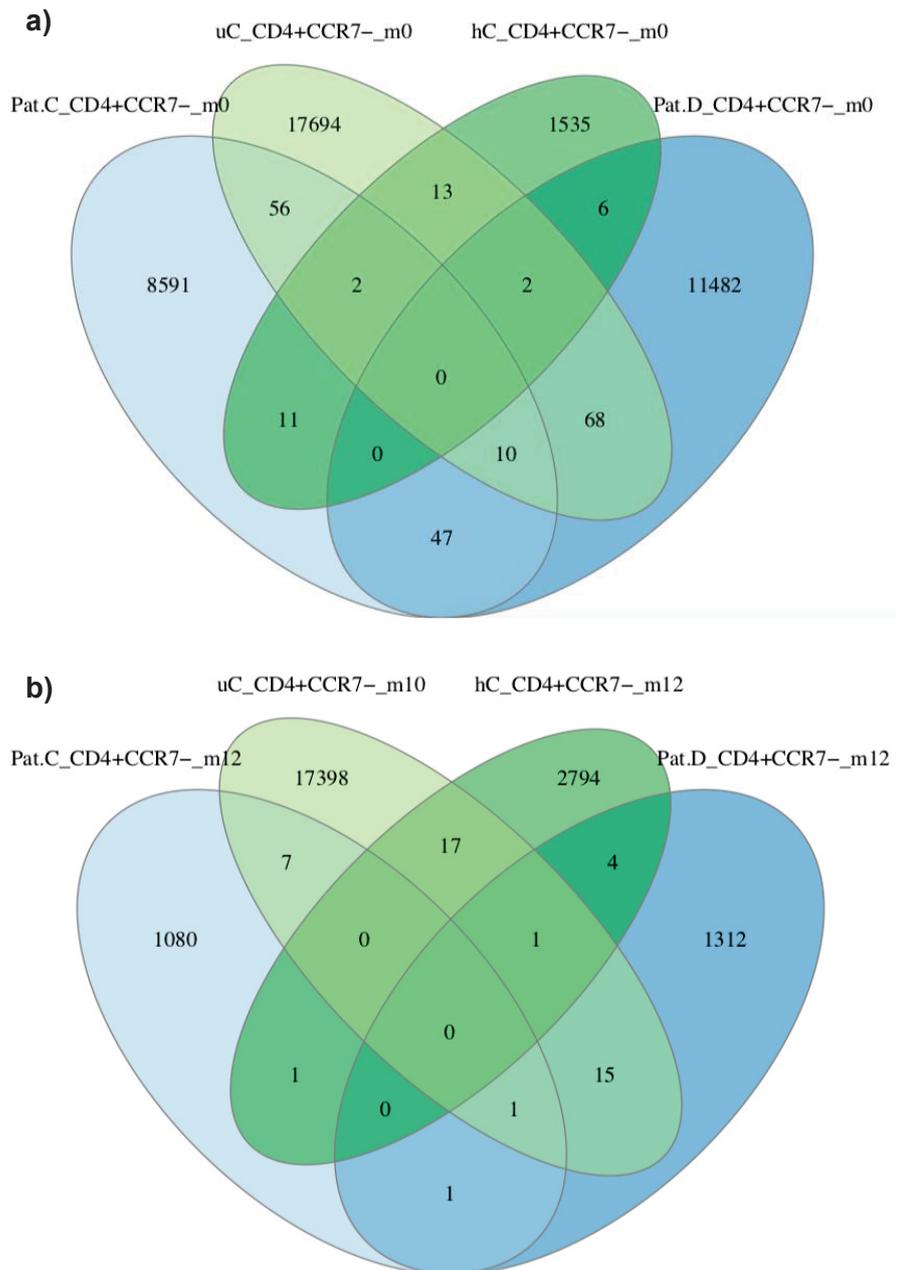
**Abb. 14a, b:** Venn-Diagramm der öffentlichen und privaten Klonotypen der CD4+ CCR7+ T-Zell-Subpopulationen der Patienten C und D, des unbehandelten MS Patienten (uC) und der gesunden Kontrolle (hC) zu den Zeitpunkten m0 und m10 bzw. m12. Bei den Pat. C, Pat. D, dem unbehandelten MS Patienten (uC) und der gesunden Kontrolle (hC) ließen sich in den CD4+ CCR7+ T-Zell-Subpopulationen zum Zeitpunkt m0 66.430 private und 695 öffentliche Klonotypen identifizieren. Darunter zeigten sich 357 Klonotypen übereinstimmend zwischen zwei und 26 Klonotypen zwischen drei MS Patienten. **(Abb. 14a)**

Zum Zeitpunkt m10 bzw. m12 fand sich 23.563 private und 77 öffentliche Klonotypen in den CD4+ CCR7+ T-Zell-Subpopulationen. Unter den öffentlichen Klonotypen fanden sich 17 Klonotypen zwischen zwei MS Patienten übereinstimmend. **(Abb. 14b)**

### 3.7.2 CD4+ CCR7- T-Zell-Subpopulation

Zum Zeitpunkt m0 zeigten sich in den CD4+ CCR7- T-Zell-Subpopulationen der Pat. C, Pat. D, des unbehandelten MS Patienten (uC) und der gesunden Kontrolle (hC) 39.302 private Klonotypen. Zum Zeitpunkt m0 ließen sich in den CD4+ CCR7- T-Zellpopulationen 215 Klonotypen und damit 0,5 % aller Klonotypen als öffentlich identifizieren. Davon zeigten sich zum Zeitpunkt m0 171 Klonotypen als übereinstimmend zwischen zwei und 10 Klonotypen als übereinstimmend zwischen drei MS Patienten (Abb. 15a).

Zum Zeitpunkt m10 bzw. m12 fanden sich 22.584 private Klonotypen unter der T-Zell-Subpopulationen der vier Probanden. Gleichzeitig ließen sich 47 Klonotypen und damit 0,2 % aller Klonotypen der CD4+ CCR7- T-Zell-Subpopulationen als öffentlich definieren. Darunter zum Zeitpunkt m10 bzw. m12 insgesamt 23 Klonotypen, die bei zwei MS Patienten auftraten und ein Klonotyp, der bei allen drei MS Patienten zu finden war (Abb. 15b).



**Abb. 15a, b: Venn-Diagramm der öffentlichen und privaten Klonotypen der CD4+ CCR7- T-Zell-Subpopulationen der Patienten C und D, des unbehandelten MS Patienten (uC) und der gesunden Kontrolle (hC) zu den Zeitpunkten m0 und m10 bzw. m12.** In den CD4+ CCR7- T-Zell-Subpopulationen der vier Probanden fanden sich 39.302 private und 215 öffentliche Klonotypen zum Zeitpunkt m0. Unter den öffentlich Klonotypen zeigten sich 171 zwischen zwei MS Patienten und 10 Klonotypen zwischen allen drei MS Patienten übereinstimmend. **(Abb. 15a)**

Zum Zeitpunkt m10 bzw. m12 konnten in den CD4+ CCR7- T-Zell-Subpopulationen 22.584 private und 47 öffentliche Klonotypen identifiziert werden. Zwischen zwei MS Patienten ließen sich 23 Klonotypen als übereinstimmend definieren. Ein Klonotyp zeigte sich bei allen drei MS Patienten zum Zeitpunkt m10 bzw. m12. **(Abb. 15b)**

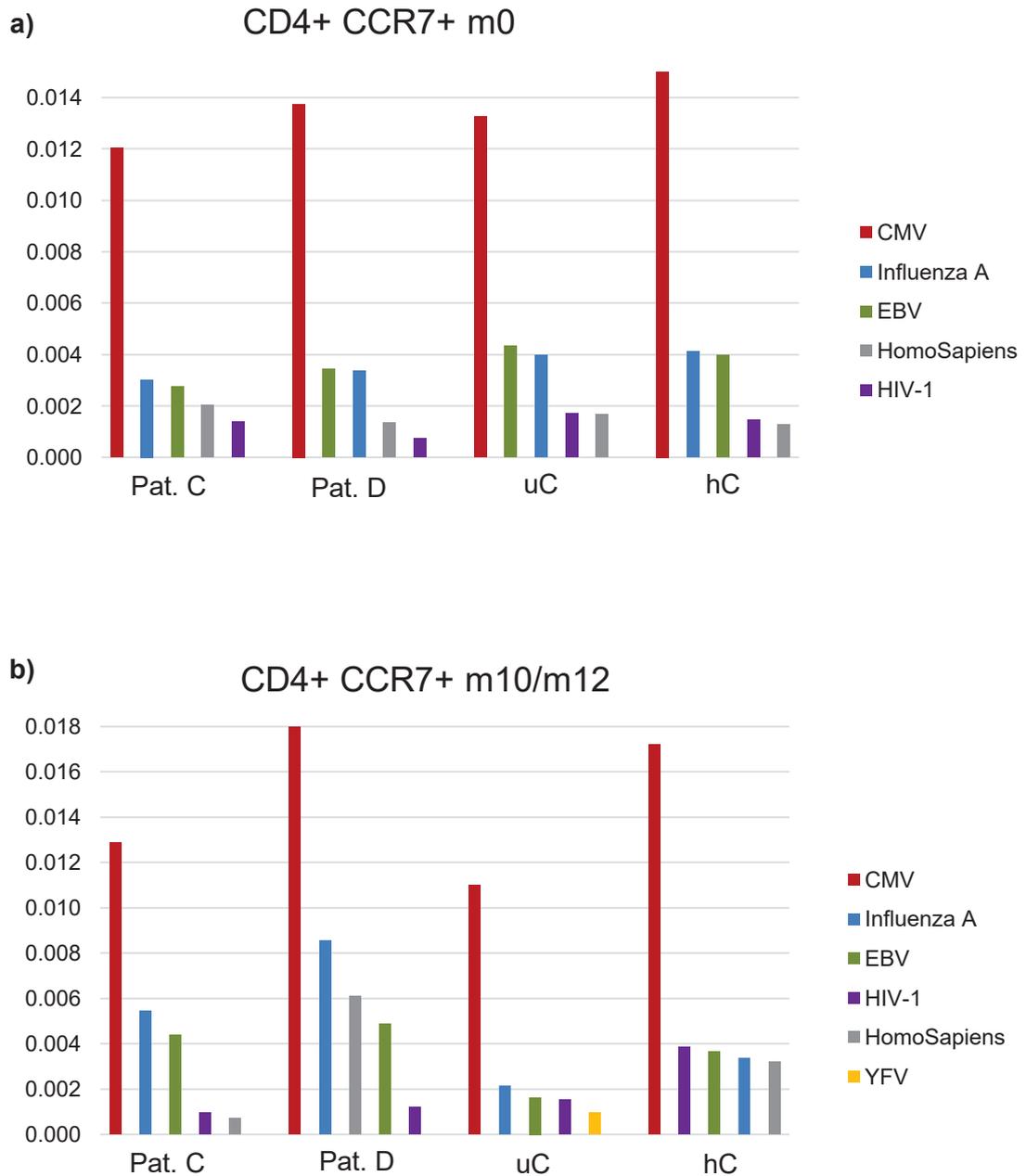
## 3.8 Identifizierung der Epitop Spezies

Zur Identifikation der Epitop Spezies der TZR- $\beta$  wurden die durch MiXCR (Bolotin et al., 2015) ermittelten Rohdaten in die Datenbank VDJdb (Bagaev et al., 2020) eingespeist und abgeglichen. Die in den folgenden zwei Abschnitten dargestellten Graphiken wurden mit Hilfe der VDJdb Plattform erstellt.

### 3.8.1 CD4+ CCR7+ T-Zell-Subpopulation

CDR3 Sequenzen des TZR- $\beta$ -Repertoires der CD4+ CCR7+ T-Zell-Subpopulationen der Patienten C und D, des unbehandelten MS Patienten (uC) und der gesunden Kontrolle (hC) ließen sich Epitop Spezies zuordnen. Zum Zeitpunkt m0 zeigten sich bei allen vier Probanden die TZR- $\beta$ , die Epitopen des Cytomegalievirus (CMV) zuzuordnen sind, als führend. Weitere Epitop Spezies wie des EBV, des Influenza A Virus und des Humane Immundefizienz-Virus Typ I (HIV-I) zeigten sich zum Zeitpunkt m0 mit wechselnder Frequenz unter den häufigsten Top 5 Epitop Spezies bei allen vier Probanden. Weitere TZR- $\beta$  ließen sich der Spezies des Homo Sapiens zuordnen. In Zusammenschau konnten sich zum Zeitpunkt m0 in den CD4+ CCR7+ T-Zell-Subpopulationen aller Probanden je <3 % der TZR- $\beta$ s Epitop Spezies zu geordnet werden (Abb. 16a).

Auch zum Zeitpunkt m10 bzw. m12 zeigten sich die TZR- $\beta$  passend zu den Epitopen des CMV hochfrequenter in den CD4+ CCR7+ T-Zell-Subpopulationen des Pat. C, Pat. D, des unbehandelten MS Patienten (uC) und der gesunden Kontrolle (hC). Bei allen vier Probanden traten unter den Top 5 Epitop Spezies auch zum Zeitpunkt m10 bzw. m12 TZR- $\beta$  mit wechselnder Frequenz auf, die sich den Epitopen des EBV, des HIV-I und des Influenza A Virus zuordnen ließen. Gleichzeitig konnten andere TZR- $\beta$  der Homo Sapiens Spezies zugerechnet werden. In der CD4+ CCR7+ T-Zell-Subpopulation des unbehandelte MS Patienten (uC) zum Zeitpunkt m10 zeigten sich außerdem TZR- $\beta$  hochfrequent, die dem Gelb-Fieber-Virus (*Yellow-Fever-Virus - YPV*) zuzuordnen seien. Über den zeitlichen Verlauf zeigt sich bei allen Probanden eine wechselnde Frequenz der Epitop Spezies. Nach 12-monatiger Therapie mit



**Abb. 16a, b:** Balkendiagramm der Top 5 Epitop Spezies der TZR- $\beta$  der CD4+ CCR7+ T-Zell-Subpopulationen der Patienten C und D, des unbehandelten MS Patienten (uC) und der gesunden Kontrolle (hC) zu den Zeitpunkten m0 und m10 bzw. m12 durch die VDJdb Datenbank (Bagaev et al. 2020) abgeglichen. Auf der X-Achse aufgetragen werden die Epitop Spezies, auf der Y-Achse die Frequenzen der Epitop Spezies anteilig am TZR- $\beta$ -Repertoire der Subpopulation zu den Zeitpunkten m0 (**Abb. 16a**) und m10 bzw. m12 (**Abb. 16b**). In der CD4+ CCR7+ T-Zell-Subpopulationen aller Probanden zeigte sich zu allen Zeitpunkten das Epitop des Cytomegalievirus (CMV) führend. Weitere TZR- $\beta$  konnten bei allen Probanden zu beiden Zeitpunkten hochfrequent dem Epstein-Barr-Virus (EBV), dem Influenza A Virus und dem Humanen Immundefizienz-Virus Typ I (HIV-1) zugeordnet werden.

Zum Zeitpunkt m10 fand sich beim unbehandelten MS Patienten (uC) hochfrequent die Epitop Zuordnung zum Gelb-Fieber-Virus (YFV). Bei Pat. C und Pat. D zeigte sich nach 12-monatiger Therapie mit Fingolimod eine Zunahme der Frequenzen der Epitope des CMV, des EBV und des Influenza A Virus.

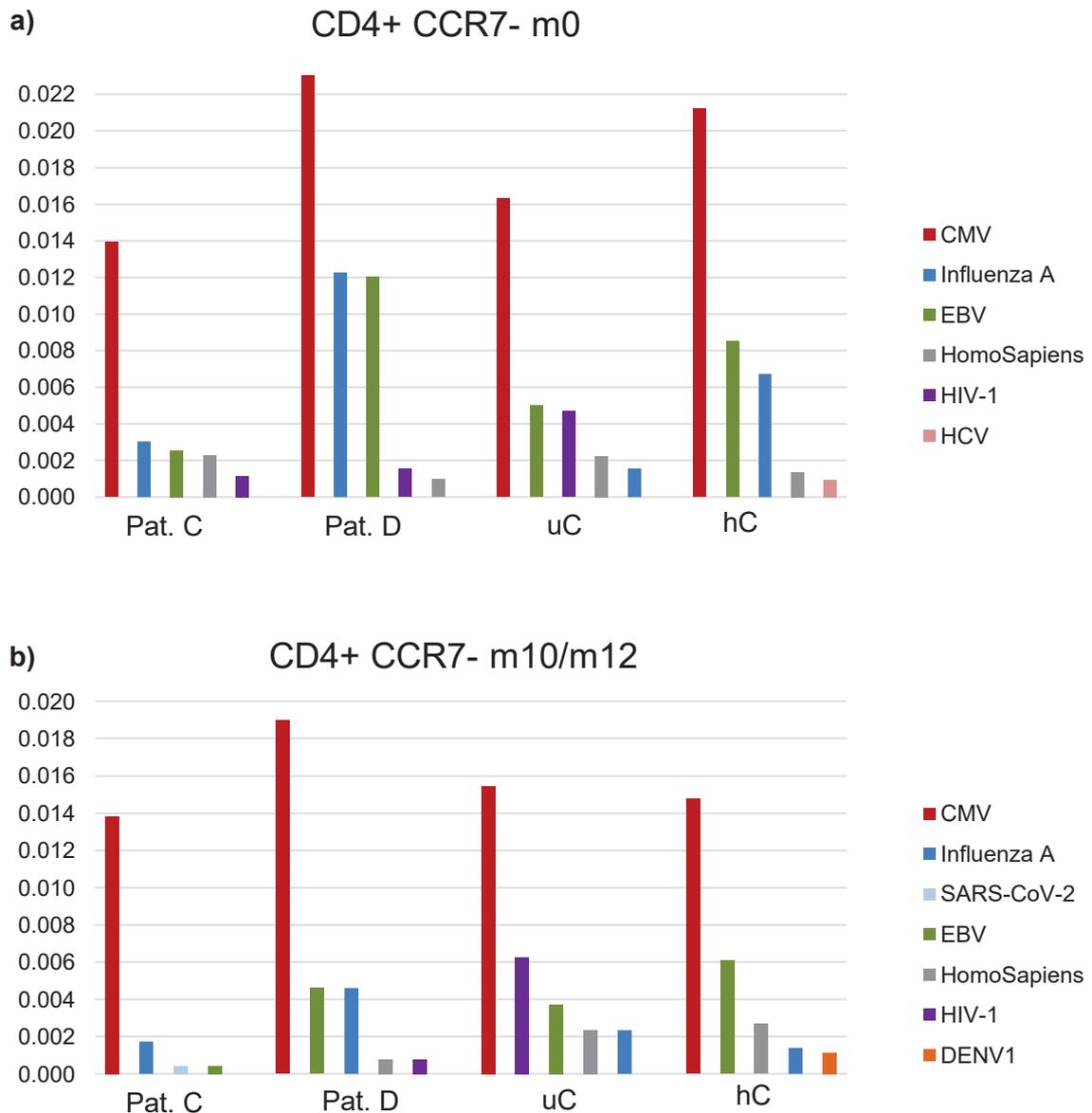
Fingolimod zeigte sich bei Pat. C und Pat. D eine Zunahme der Frequenz der TZR- $\beta$ , die den CMV, EBV und Influenza A Virus Epitopen zuzuordnen sind. Von den TZR- $\beta$ s der CD4+ CCR7+ T-Zell-Subpopulationen aller Probanden ließen sich zum Zeitpunkt m10 bzw. m12 je <4 % einer Epitop Spezies zuordnen (Abb. 16b).

### 3.8.2 CD4+ CCR7- T-Zell-Subpopulation

In den CD4+ CCR7- T-Zell-Subpopulationen der Pat. C, Pat. D, des unbehandelten MS Patienten (uC) und der gesunden Kontrolle (hC) zum Zeitpunkt m0 traten TZR- $\beta$ , die dem CMV zuzuordnen sind, hochfrequent auf. Bei allen Probanden zeigten sich zum Zeitpunkt m0 die TZR- $\beta$ , passend zu den Epitopen des EBV und des Influenza A Virus, unter den Top 5 Epitop Spezies. Bei den MS Patienten Pat. C, Pat. D und der unbehandelte MS Patienten (uC) zeigten sich in den CD4+ CCR7+ T-Zell-Subpopulationen zum Zeitpunkt m0 außerdem die TZR- $\beta$  hochfrequenter, die dem HIV-I zuzuordnen sind. Allein im CD4+ CCR7+ T-Zellrepertoire der gesunde Kontrolle (hC) zum Zeitpunkt m0 fanden sich TZR- $\beta$ , die dem Hepatitis-C-Virus (HCV) zuzurechnen seien. Andere TZR- $\beta$  konnten der Homo Sapiens Spezies zugeordnet werden. Insgesamt konnte bei je <5 % der TZR- $\beta$ s der CD4+ CCR7- T-Zell-Subpopulationen aller Probanden zum Zeitpunkt m0 eine Zuordnung zu bekannten Epitop Spezies erfolgen (Abb. 17a).

Auch in den CD4+ CCR7- T-Zell-Subpopulationen der Pat. C und Pat. D, des unbehandelten MS Patienten (uC) und der gesunden Kontrolle (hC) zeigten sich zum Zeitpunkt m10 bzw. m12 TZR- $\beta$ , die dem CMV zugewiesen werden, an erster Stelle der Top 5 Epitop Spezies. Alle Probanden wiesen zum Zeitpunkt m10 bzw. m12 TZR- $\beta$  auf, die zum EBV passend unter den Top 5 Epitop Spezies einzureihen sind. In der CD4+ CCR7- T-Zell-Subpopulation des Pat. C fanden sich zum Zeitpunkt m12 nur vier Epitop Spezies, darunter zeigten sich TZR- $\beta$ , die dem Schweres-Akutes-

Respiratorisches-Syndrom-Coronavirus-2 (SARS-CoV-2) zuzuordnen sind. Bei der gesunden Kontrolle (hC) zeigten sich zum Zeitpunkt m12 TZR- $\beta$  passend zum Dengue-Virus-1 (DENV-1) hochfrequent. Über den Zeitraum von 10 bzw. 12 Monaten veränderte sich in allen CD4+ CCR7- T-Zell-Subpopulationen die Frequenz der Epitop Spezies. Bei Pat. C und Pat. D zeigte sich unter Therapie mit Fingolimod eine Abnahme der Frequenzen der TZR- $\beta$ , die dem Influenza A Virus und EBV zuzuordnen sind. Von den TZR- $\beta$ s der CD4+ CCR7- T-Zell-Subpopulationen zum Zeitpunkt m10 bzw. m12 ließen sich bei allen Probanden je <3 % einer Epitop Spezies zuordnen (Abb. 17b).



**Abb. 17a, b:** Balkendiagramm der Top 5 Epitop Spezies der TZR- $\beta$  der CD4+ CCR7- T-Zell-Subpopulationen der Patienten C und D, des unbehandelten MS Patienten (uC) und der gesunden Kontrolle (hC) zu den Zeitpunkten m0 und m10 bzw. m12 durch die VDJdb Datenbank (Bagaev et al. 2020) abgeglichen. Auf der X-Achse aufgetragen werden die Epitop Spezies, auf der Y-Achse die Frequenzen der Epitop Spezies anteilig am TZR- $\beta$ -Repertoire der Subpopulation zu den Zeitpunkten m0 (**Abb. 17a**) und m10 bzw. m12 (**Abb. 17b**). In den CD4+ CCR7- T-Zell-Subpopulationen aller Probanden waren TZR- $\beta$ , die dem Cytomegalievirus (CMV), dem Epstein-Barr-Virus (EBV) und dem Influenza A Virus zugeordnet werden können, zu beiden Zeitpunkten hochfrequent. Bei allen MS Patienten zum Zeitpunkt m0 und bei Pat. D und dem unbehandelten MS Patienten (uC) zum Zeitpunkt m10 bzw. m12 fand sich die Epitop Zuordnung zum Humanen Immundefizienz-Virus Typ I (HIV-I) hochfrequent.

In der gesunden Kontrolle (hC) zeigte sich zum Zeitpunkt m0 eine Epitop Zuordnung zum Hepatitis-C-Virus, zum Zeitpunkt m12 eine Epitop Zuordnung zum Dengue-Virus-1 (DENV-1) und bei Pat. C zum Zeitpunkt m12 eine Epitop Zuordnung zum Schweres-Akutes-Respiratorisches-Syndrom-Coronavirus-2 (SARS-CoV-2) hochfrequent. Unter 12-monatiger Therapie mit Fingolimod zeigte sich eine Abnahme der Frequenzen der Epitope des Influenza A Virus und des EBV.

## 4 Diskussion und Schlussfolgerung

Das Ziel dieser Arbeit war, durch die Verwendung von NGS das periphere Immunrepertoire der CD4+ T-Zellen von MS Patienten unter Fingolimod Therapie im Vergleich zu einem MS Patienten ohne Therapie und einer gesunden Kontrolle anhand der TZR- $\beta$ -Repertoire Variablen Diversität, Klonalität und hochfrequente CDR3 Sequenzen im zeitlichen Verlauf zu charakterisieren und so MS spezifische und therapieassoziierte Veränderungen abzubilden. Im Folgenden soll sich auf die Diskussion des TZR-Repertoires der CD4+ T-Zellen unserer Probanden fokussiert werden, für eine Abbildung des CD8+ TZR-Repertoires der Probanden und deren Diskussion verweise ich auf noch folgende Publikationen der Arbeitsgruppe von Universitätsprofessor Dr. med. Norbert Goebels der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

### 4.1 CD4+ T-Zell-Subpopulationen und Fingolimod

Als immunmodulatorische Therapie mit funktioneller Antagonisierung des C-C Chemokin-Rezeptors Typ 7 (CCR7) bewirkt Fingolimod durch den Verlust der CCR7+ T-Zellen in den sekundären Lymphorganen eine Reduktion der Lymphozytenzahl und eine Änderung des CD4/CD8 Quotienten (Mehling et al., 2008). Mehling et al. teilten dabei, wie bereits von Sallusto et. al. 1999 beschrieben, die CD4+ und CD8+ T-Zellen mit Hilfe der Oberflächenmoleküle CCR7 und CD45RA in Subpopulationen ein. Für die CD4+ T-Zellen ergaben sich die naiven T-Zellen  $T_{NC}$  (CCR7+ CD45RA+), die zentralen Gedächtnis-T-Zellen  $T_{CM}$  (CCR7+ CD45RA-) und die Effektor-Gedächtnis-T-Zellen  $T_{EM}$  (CCR7- CD45RA-). In ihren Experimenten zeigte sich eine

supprimierende Wirkung auf die  $T_{NC}$  und die  $T_{CM}$  Subpopulationen (CCR7+) mit einem relativen Anstieg der  $T_{EM}$  Subpopulation (CCR7-). Haas et al. (2015) postulierte, dass die Wirkung von Fingolimod durch die Veränderung des Zellverhältnis der T-Zell-Subpopulationen und damit durch eine funktionelle Änderung des Repertoires zu erklären wäre.

Die durchflusszytometrischen Analysen bestätigten, dass es bei den Patienten unter Therapie mit Fingolimod zu einer relativen Reduktion der CD3+ T-Zellen anteilig an der totalen Zellzahl kam. Während die CD4+ T-Zellen unter Therapie supprimiert wurden, kam es zum relativen Anstieg der CD8+ T-Zellen an der totalen Zellzahl. Der CD4/CD8 Quotient veränderte sich zugunsten der CD8+ T-Zellen. Unter den CD4+ T-Zellen bestätigte sich eine Suppression der  $T_{NC}$  und  $T_{CM}$  Subpopulationen. Gleichzeitig zeigte sich auch eine relative Expansion der CD4+  $T_{EM}$  Subpopulationen im peripheren Blut der Patienten. So fand sich unter Fingolimod Therapie eine veränderte Zusammensetzung der CD4+ T-Zell-Subpopulationen zugunsten  $T_{EM}$  Subpopulation.

In einer anderen zusammenfassenden Arbeit empfahlen die Autoren stattdessen eine Zusammenschau der Oberflächenmoleküle CD45RO, CCR7, CD28 und CD95 zur Differenzierung sechs verschiedener T-Zell-Subpopulationen. Als Subpopulationen werden die naiven T-Zellen  $T_{NC}$  (CD45RO- CCR7+ CD28+ CD95-), die zentralen Gedächtnis-T-Zellen  $T_{CM}$  (CD45RO+ CCR7+ CD28+ CD95+), die *stem cell* Gedächtnis-T-Zellen (CD45RO- CCR7+ CD28+ CD95+), die *transitional* Gedächtnis-T-Zellen (CD45RO+ CCR7- CD28+ CD95+), die terminalen Effektor-T-Zellen (CD45RO+ CCR7- CD28- CD95+) und die *tissue resident* Gedächtnis-T-Zellen (CD45RO- CCR7- CD28- CD95+) genannt. (Mahnke et al., 2013)

Eine andere Arbeitsgruppe unterteilte die CD4+ T-Zellpopulation in konventionelle T-Zellen  $T_{con}$  (CD4+ CD25- CD127+) und in regulatorische T-Zellen  $T_{reg}$  (CD4+ CD25<sup>hi</sup> CD127<sup>lo</sup>). Sowohl die konventionellen T-Zellen, als auch die regulatorischen T-Zellen wurden in naive T-Zellen (CD45RA+ CD45RO-), Gedächtnis-T-Zellen (CD45RA- CD45RO+) und *transitional* T-Zellen (CD45RA+ CD45RO+) unterteilt. In der  $T_{con}$  und auch in der  $T_{reg}$  Subpopulation zeigte sich eine relative Abnahme der naiven T-Zellen

mit einer signifikanten relativen Zunahme der Gedächtnis-T-Zellen unter Therapie mit Fingolimod. Gleichzeitig zeigten die *transitional* Zellen eine zeitliche Stabilität. (Claes et al., 2014)

Ein anderer möglicher Fokus der T-Zell-Einteilung ist die differenzierte Analyse von den zu den Gedächtnis-T-Zellen zugehörigen  $T_{h17}$  Zellen. Als IL-17 produzierende T-Zellen wird diese Subpopulation als Mediator der Inflammation in der MS betrachtet (Jadidi-Niaragh and Mirshafiey, 2011). So konnte in einer Studie bei gleichzeitiger Reduktion der  $T_{CM}$  eine Abnahme der mitunter IL-17 produzierenden  $T_{h17}$  Zellen unter Therapie mit Fingolimod beobachtet werden (Mehling et al., 2010). Eine andere Untersuchung von Song et. al (2015) zeigte einen signifikant höheren Anteil an IL-17 produzierenden  $CD4+$  und  $CD8+$  T-Zellen im Blut von MS Patienten vor medikamentöser Therapie. Statt einer Reduktion der  $T_{h17}$  Zellen unter Therapie zeigte sich eine transiente Erhöhung der  $T_{h17}$  Zellen zwei Wochen nach Beginn der Fingolimod Therapie. Auch hier bestätigte sich eine Abnahme der  $T_{NC}$  und  $T_{CM}$  Subpopulationen und eine Zunahme der  $T_{EM}$  Subpopulation unter Fingolimod Therapie. Eine Akkumulation von Effektor-Gedächtnis-T-Zellen  $T_{EM}$  stellten Goronzy und Weyand (2012) in Zusammenhang mit gehäuften Auftreten von chronischer Inflammation und somit autoimmunen Reaktionen im Alter. So könnte eine veränderte Zusammensetzung des Immunrepertoires zugunsten der  $T_{EM}$  Subpopulation auch unter Therapie mit Fingolimod eine chronische Inflammation verstärken.

Auf Basis der unterschiedlichen Differenzierungen der T-Zell-Subpopulationen, die sich in der Literatur finden ließen, ergibt sich für die gezeigten Ergebnisse eine erschwerte Vergleichbarkeit. Eine Zuordnung der TZR- $\beta$ -Repertoire Analysen zu differenzierten Subpopulationen, lässt sich, wegen der alleinigen Verwendung des Oberflächenmarkers CCR7, nur überblickend erlauben. So fehlen zur weiteren Differenzierung der T-Zellen in den hier beschriebenen Experimenten nicht nur weitere Oberflächenmoleküle, wie beispielsweise CD45RO, CD45RA, CD28, CD95, CD25 und CD127, sondern auch die Messung von zellulären Mediatoren, wie beispielsweise IL-17 und RORC2+.

Die Kombination von longitudinalen T-Zellanalysen mit klinischen Verlaufsparemtern der MS können Korrelationen ergeben, um Therapieerfolg und Krankheitsprogression von MS Patienten abschätzen zu können. So fanden Song et al. (2015) und Teniente-Serra et al. (2016) bei Patienten, die unter Therapie mit Fingolimod einen Schub entwickelten, neben Veränderungen anderer Lymphozyten, ein signifikant höherer Anteil der CD4+ T<sub>CM</sub> Zellzahl im Verlauf der Therapie. Ghadiri et al. (2020) postulierte dagegen, dass einen erhöhten CD4+ T<sub>CM</sub> Anteil vor Beginn der Fingolimod Therapie mit einer aktiven MS unter Therapie assoziiert sei. Gleiches zeigte sich dagegen nicht bei einem erhöhten CD4+ T<sub>CM</sub> Anteil unter Therapie. Eine weitere Studie fand eine Kombination aus zellulären (Zellzahl), molekularen (Genexpression) und klinischen Markern (EDSS und Geschlecht) als einen möglichen Prädiktor für das Ansprechen auf die Therapie mit Fingolimod (Moreno-Torres et al., 2018). Um in den gezeigten Ergebnissen eine Assoziation zwischen T-Zell-Analysen und Therapieerfolg oder Krankheitsprogress zu ermöglichen, wäre die Erhebung von weiteren Daten, wie klinische Marker der MS (EDSS), bildmorphologische Untersuchungen (MRT) im Verlauf sowie eine größeres Patienten- und Kontrollkollektiv vonnöten.

## 4.2 TZR- $\beta$ -Repertoire Abbildung

Andere Auswertungen von TZR- $\beta$ -Repertoires, die mittels NGS abgebildet wurden, zeigten bereits, dass eine hohe Zahl an Fehlern in der Amplifizierung vor der Sequenzierung und in den Brücken-PCRs während der Sequenzierung zu einer verfälschten Repertoire Analyse führen. Dabei zeigte sich durch PCR Fehler eine Erhöhung der eigentlichen TZR- $\beta$ -Repertoire Diversität. (Nguyen et al., 2011; Warren et al., 2011) Ein Lösungsansatz für das Problem war dabei der Ausschluss niedrig frequenter CDR3 Sequenzen, die sich in einem Nukleotid-*Mismatch* zu anderen hoch frequenten CDR3 Sequenzen unterschieden (Nguyen et al., 2011). Ein anderer Ansatz war der Ausschluss niedrig frequenter CDR3 Sequenzen, die im gesamten 4 % der totalen Sequenzanzahl ausmachten (Warren et al., 2011). Nguyen et al. (2011) und Warren et al. (2011) beschrieben als weiteren Faktor, der zu Artefakten in der TZR- $\beta$ -Repertoire Abbildung führt, *Reads* mit einer geringen Sequenzierqualität und

postulierten den Ausschluss dieser *Reads* aus der weiteren Analyse. Weil diese Techniken zwar die Chance einer präziseren Abbildung der TZR- $\beta$ -Repertoire Diversität bieten, aber auch das Risiko einer Unterschätzung oder sogar Elimination einzelner Klonotypen bergen, schlugen Bolotin et al. (2012) einen Algorithmus aus einer CDR3 Extraktion aus allen sequenzierten *Reads*, der Bildung von *Core Clonotypes*, der Abbildung von *Reads* mit geringer Qualität und der Korrektur von PCR Fehlern vor.

Ein weiteres Artefakt, das die Abbildung des TZR- $\beta$ -Repertoires beeinflusst, sind mögliche Unterschiede in der Sequenziertiefe der Proben und damit Unterschiede in der Repräsentationsqualität der TZR- $\beta$ -Repertoires. Das Ziel wäre eine vergleichbare Sequenziertiefe zur Gewährleistung klonaler Abdeckung. Greiff et al. (2015) etablierte eine Korrelation zwischen *Shannon Evenness*, Anzahl der *Reads*, Anzahl der Klonotypen und Zellzahl und verglich so Sequenziertiefe einzelner TZR- $\beta$ -Repertoires. Alves Sousa et al. (2019) ermittelte im Sinne der Shannon-Entropie die Diversität und definierte die Vielfalt (*Richness*) des Repertoires aus einmalig auftretenden Klonotypen. Zur Vergleichbarkeit einzelner TZR- $\beta$ -Repertoires wurden Entropie und Vielfalt durch Berechnung der maximalen Shannon Entropie und der maximalen Kombinationsvielfalt für jedes Repertoires basierend auf die zu Beginn ermittelte Zellzahl normalisiert (Alves Sousa et al., 2019).

Das Ziel der Sequenzierung war eine Repräsentation der Ausgangszellzahl mit sequenzierten *Reads* von etwa 1:1. In der allgemeinen Statistik der NGS-Rohdaten zeigte sich ein sehr diverses Ergebnis. Eine gute Repräsentation zeigte sich so für die CD4+ CCR7- T-Zell-Subpopulation des Pat. C zum Zeitpunkt m0, wobei 120.000 Zellen durch etwa 140.000 *Reads* repräsentiert wurden. Anders bei der CD4+ CCR7+ T-Zell-Subpopulation der gesunden Kontrolle zum Zeitpunkt m12, hier wurden 400.000 Zellen durch etwa 50.000 *Reads* repräsentiert. Es folgte die Erfassung der vollständig alignierten *Reads* mit Ausschluss der *Reads* bei denen keine TZR- $\beta$  Zuordnung erfolgte oder V- oder J-Gensegmente fehlten und daraus die Erfassung der zur TZR- $\beta$ -Kette alignierten *Reads*. So konnten in der CD4+ CCR7- T-Zell-Subpopulation der gesunden Kontrolle zum Zeitpunkt m12 88 % der *Reads* zur TZR- $\beta$ -Kette aligniert

werden, in der CD4+ CCR7+ T-Zell-Subpopulation des Pat. D zum Zeitpunkt m0 hingegen nur 41 %. Proben mit geringem TZR- $\beta$ -Alignment zeigten dabei schon zu Beginn ein geringes erfolgreiches Alignment der totalen *Reads*. Dies deutet auf eine geringere Qualität der *Reads* hin. Das Resultat sind Qualitätsunterschiede der einzelnen Proben, die Einfluss auf die Repräsentation der CDR3 Sequenzen im TZR- $\beta$ -Repertoire zeigen.

Unter Berücksichtigung der Qualitätsunterschiede der Proben und der möglichen Artefakte in der Amplifikation vor der Sequenzierung, während der Sequenzierung, in Form von unterschiedlich qualitativen *Reads* und durch verschiedene Sequenziertiefen der zu vergleichenden TZR- $\beta$ -Repertoires folgt eine starke Beeinträchtigung der Beurteilbarkeit qualitativer und quantitativer Zusammenhänge, darunter der Diversität und der klonale Expansion, der hier gezeigten Ergebnisse.

#### 4.2.1 V-J-Rekombination der CD4+ T-Zellen und Fingolimod

Die Analyse der V-J-Genrekombination des TZR- $\beta$ -Repertoires ergab, dass unter Therapie mit Fingolimod die Anzahl der Rezeptorkombinationsmöglichkeiten der Zellen, die im peripheren Blut zu finden waren, abnahm. Dieses galt sowohl für die CD4+ CCR7+ als auch für die CD4+ CCR7- T-Zell-Subpopulation. Fingolimod nahm so nicht nur Einfluss auf die CD4+ CCR7+ T<sub>NC</sub> Zellen und die T<sub>CM</sub> Zellen, sondern reduzierte auch die Rezeptorkombinationsmöglichkeiten der CD4+ CCR7- T<sub>EM</sub> Zellen.

Das variable Segment TRBV5.1 trat im Repertoire aller MS Patienten und der gesunden Kontrolle hochfrequent auf. Dabei zeigte das Segment teilweise bis zu einer doppelt so hohen Frequenz bei den MS Patienten als bei der gesunden Kontrolle. Signifikant erhöhte Frequenzen von variablen Segmenten, darunter TRBV5.6, TRBV5.1, TRBV7.6, TRBV5.8 und TRBV20.1, bei MS Patienten wurde bereits beschrieben (Shugay et al., 2015). Eine mögliche genetische Assoziation mit MS wurde für die Segmente TRBV5.6 und TRBV5.1 diskutiert (Goebels et al., 2000; Oksenberg et al., 1993). Eine andere Studie zeigte hingegen für das Segment TRBV20.1 keine genetische Assoziation zur MS (Fozza et al., 2012). In den in dieser

Arbeit durchgeführten Experimenten zeigte sich keine Veränderung der Frequenz des TRBV5.1 Segments unter Therapie mit Fingolimod und kein Unterschied im Vergleich zwischen den CD4+ CCR7+ und CD4+ CCR7- T-Zell-Subpopulationen.

#### 4.2.2 Diversität des CD4+ TZR- $\beta$ -Repertoires und Fingolimod

Mittels NGS untersuchte Qi et al. (2014) das humane TZR- $\beta$ -Repertoire und schätzte die Variabilität des Repertoires auf über  $10^8$  verschiedene TZR- $\beta$ -Ketten im Individuum. Es zeigte sich, dass CD4+ T-Zellen unabhängig vom Alter des Individuums eine im Allgemeinen geringere Klonalität und eine höhere Diversität im TZR- $\beta$ -Repertoire zeigten als CD8+ T-Zellen. Die Variabilität (*Richness*) der naiven CD4+ T-Zellen, hier charakterisiert durch CCR7+ CD45RA<sup>high</sup> CD28+, war dabei 50-fach größer als die der CD4+ Gedächtnis-T-Zellen, hier charakterisiert durch CD45RA<sup>low</sup>. (Qi et al., 2014) Auch Klarenbeek et al. (2010) fand eine erhöhte Diversität im TZR- $\beta$ -Repertoire der naiven CD4+ T-Zellen, als im Repertoire der CD4+ Gedächtnis-T-Zellen. In dem diversen Repertoire der naiven T-Zell-Population fanden De Greef et al. (2020) wenige sehr hochfrequente Klonotypen, die nur einen sehr geringen Anteil am Repertoire ausmachten. Außerdem zeigte sich, dass die Diversität des TZR- $\beta$ -Repertoires im Alter grob linear abnimmt (Britanova et al., 2014; Qi et al., 2014).

Bei MS Patienten zeigte eine Veröffentlichung bereits eine signifikant geringere Diversität im gesamten T-Zell-Repertoire von MS Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen (Shugay et al., 2015). Alves Sousa et al. (2019) fand hingegen ein diverseres TZR- $\beta$ -Repertoire bei MS Patienten als bei den gesunden Kontrollen. Durch Ermittlung des Anteils der einfach und zweifach auftretenden CDR3 Sequenzen am TZR- $\beta$ -Repertoire wurde in dieser Methodik die Diversität des Repertoires abgebildet. In den hier genannten Experimenten zeigte die gesunde Kontrolle ein diverseres TZR- $\beta$ -Repertoire der CD4+ CCR7+ T<sub>NC</sub> und T<sub>CM</sub> Subpopulation als die MS Patienten ohne Therapie. In der CD4+ CCR7- T<sub>EM</sub> Subpopulation wies hingegen die gesunde Kontrolle eine geringere Diversität als alle MS Patienten ohne Therapie auf. Unter Berücksichtigung der Beschreibungen, dass die TZR- $\beta$ -Repertoire Diversität im Alter abnimmt, könnte eine höhere Diversität der gesunden Kontrolle auch durch

Altersunterschiede zu den MS Patienten (Pat. C 29. Lebensjahre., Pat. D 36. Lebensjahre., unbehandelter MS Patient uC 46. Lebensjahre und gesunde Kontrolle hC 23. Lebensjahre) verstärkt werden.

Unter Therapie mit Fingolimod beschrieb Chiarini et al (2015) eine Abnahme der TZR- $\beta$ -Repertoire Diversität. Eine abnehmende Diversität der CD4+ und CD8+ T-Zell-Population unter 6-monatiger Therapie mit Fingolimod zeigte sich auch in einer vorherigen Veröffentlichung unserer Arbeitsgruppe (Scheffler, 2020). In dieser aktuellen Arbeit nahm hingegen die Diversität im TZR- $\beta$ -Repertoire der MS Patienten unter 12-monatiger Therapie mit Fingolimod sowohl in der CD4+ CCR7+, darunter die naiven T-Zellen  $T_{NC}$  und die zentralen Gedächtnis-T-Zellen  $T_{CM}$ , als auch in der CD4+ CCR7- T-Zell-Subpopulation, darunter die Effektor-Gedächtnis-T-Zellen  $T_{EM}$ , zu. Bei allen Proben konnte ein diverseres Repertoire unter der Subpopulation der  $T_{NC}$  und  $T_{CM}$ , im Vergleich zur  $T_{EM}$  Subpopulation, festgestellt werden. Eine reduzierte Diversität naiver T-Zellen bei MS Patienten unter Therapie mit Natalizumab könnte eine abnehmende Immunprotektion der Patienten bedeuten (Amoriello et al. 2020). Eine zunehmende Diversität der naiven CCR7+ T-Zellen der MS Patienten unter Therapie mit Fingolimod könnte damit für einen Erhalt der Immunprotektion sprechen. Eine Korrelation zwischen Diversitätsveränderungen und Krankheitsprogress oder Therapieverlauf lässt sich ohne Einbezug von klinischen Verlaufsparemtern, darunter EDSS und MRT, und bei einer geringen Fallzahl von vier Probanden jedoch nicht beurteilen.

Das Potential einer Korrelation von TZR- $\beta$ -Repertoireanalysen mit klinischen Parametern wurde bereits beschrieben. Eine Studie an MS Patienten mit therapeutisch autologer Stammzelltransplantation zeigte, dass eine geringere Repertoire Diversität in der frühen Phase des Rekonstruktionsprozesses des Immunsystems mit einem schlechten Ansprechen auf eine Stammzelltransplantation assoziiert war (Muraro et al., 2014). Eine andere Analyse zeigte eine Assoziation einer geringen Repertoire Diversität mit der Entwicklung sekundärer Autoimmunität bei MS Patienten unter Therapie mit Alemtuzumab (Jones et al., 2013).

Die Ermittlung der TZR- $\beta$ -Repertoire Diversität ist wie in 4.2 beschrieben stark abhängig von dem Verarbeitungsprozess der Proben sowie der Sequenzierung, bietet jedoch Chancen, Korrelationen zu Therapieverläufen und Krankheitsprogress herzustellen. Gleichzeitig ist für die Diskussion der weiteren Ergebnisse der Klonalität und Persistenz im TZR- $\beta$ -Repertoire zu beachten, dass Unterschiede der TZR- $\beta$ -Repertoire Diversität einzelner Populationen die Detektion von klonaler Expansion und die Abbildung einer Repertoire Persistenz über den zeitlichen Verlauf beeinflussen könnten. So diskutierten Skulina et al. (2004) eine erschwerte Detektion klonaler Expansionen im diverseren CD4+ T-Zell-Repertoire im Vergleich zu dem weniger diversen CD8+ T-Zell-Repertoire. Bei begrenzter Probengröße könnte eine hohe Diversität eines TZR- $\beta$ -Repertoires, beispielsweise der CD4+ T-Zellen, außerdem zu einer erschwerten Erfassung von persistierenden Sequenzen im zeitlichen Verlauf führen.

#### 4.2.3 Klonotypen im TZR- $\beta$ -Repertoire der CD4+ T-Zellen und Fingolimod

Eine klonale Expansion CD8+ T-Zellen sowie deren über Jahre andauernde Persistenz wurde bereits mittels CDR3 *Spektratyping* für Liquor, Blut und ZNS Läsionen beschrieben, klonal expandierte CD4+ T-Zellen zeigten sich dabei hingegen nicht (Skulina et al., 2004). Babbe et al. (2000) beschrieb eine Mehrheit von wenigen CD8+ T-Zell Klonen in MS Läsionen, fand aber auch sehr heterogene, weniger hochfrequente CD4+ T-Zellen mit vereinzelt klonalen Expansionen. Andere Autoren konnten klonal expandierte CD8+ T-Zellen in Blut, Liquor und ZNS Läsionen von MS Patienten der T-Zell-Subpopulation der zentralen Gedächtnis-T-Zellen zuordnen (Salou et al., 2015).

In Zusammenschau der TZR- $\beta$ -Repertoire Analysen der hochfrequenten CDR3 Sequenzen und der im Repertoire persistierenden Sequenzen ließen sich in den gezeigten Ergebnissen klonal auftretenden CDR3 Sequenzen im Blut von MS Patienten im zeitlichen Verlauf beurteilen. Im Allgemeinen zeigte sich eine geringere Persistenz von CDR3 Sequenzen im Repertoire der CD4+ CCR7+, darunter T<sub>NC</sub> und T<sub>CM</sub> Zellen, als im Repertoire der CD4+ CCR7- T<sub>EM</sub> Subpopulationen. Bei den

Patienten unter Immunmodulation mit Fingolimod stieg der Anteil der persistierenden Sequenzen am jeweiligen TZR- $\beta$ -Repertoire besonders in der CD4<sup>+</sup> CCR7<sup>-</sup> T<sub>EM</sub> Subpopulationen an. So machten in den CD4<sup>+</sup> CCR7<sup>-</sup> T<sub>EM</sub> Subpopulationen bekannte CDR3 Sequenzen nach 12-monatiger Therapie je rund 25 % des Repertoires aus, in den CD4<sup>+</sup> CCR7<sup>+</sup> T<sub>NC</sub> und T<sub>CM</sub> Subpopulationen hingegen nur  $\leq 5$  %. Bei beiden Patienten traten unter Fingolimod Therapie persistierende CDR3 Sequenzen nach 12 Monaten hochfrequenter hervor. Bei Pat. C macht so zum Zeitpunkt m12 die persistierende Sequenz CASSFSAGANVLTF anteilig 3,8 % des CD4<sup>+</sup> CCR7<sup>-</sup> T<sub>EM</sub> Repertoires aus. Eine vergleichbare klonale Expansion einer einzelnen CDR3 Sequenz ließ sich bei Pat. D nicht beobachten. Auch der unbehandelte MS Patient zeigte mit etwa 40 % die stärkste Persistenz im Repertoire der CD4<sup>+</sup> CCR7<sup>-</sup> T<sub>EM</sub> Subpopulationen. Die am häufigsten auftretende CDR3 Sequenz CASSLRPNEQFF machte dabei konstant 0,5 % des Repertoires aus. Die gesunde Kontrolle zeigte weder hochfrequent persistierende CDR3 Sequenzen noch klonal expandierte CDR3 Sequenzen.

Untersuchungen der klonalen Persistenz im TZR- $\beta$ -Repertoire von MS Patienten mit einer therapeutisch autologen Stammzelltransplantation zeigten keine klonale Persistenz im CD4<sup>+</sup> T-Zell-Repertoire unter Therapie. Stattdessen beschrieben Amoriello et al. (2020) für MS Patienten unter Therapie mit Natalizumab oder autologer Stammzelltransplantation für sowohl CD4<sup>+</sup> als auch für CD8<sup>+</sup> T-Zellen eine klonale Persistenz im Repertoire. Dabei zeigte sich eine höhere klonale Persistenz in der Gedächtnis-T-Zell-Subpopulation, hier definiert durch CD45RA<sup>-</sup>. Eine Annahme, dass bei Therapie mit autologer Stammzelltransplantation oder Natalizumab eine Depletion der Klonotypen stattfand, wurde somit widerlegt. In den hier durchgeführten Experimenten zeigte sich, dass es unter Therapie mit Fingolimod zu einem  $\geq 95$  %igen Austausch des CD4<sup>+</sup> CCR7<sup>+</sup> T<sub>NC</sub> und T<sub>CM</sub> Repertoires kam, während gleichzeitig über 12 Monate die klonale Persistenz des CD4<sup>+</sup> CCR7<sup>-</sup> T<sub>EM</sub> Repertoires auf bis zu  $\geq 25$  % anstieg. In der T<sub>EM</sub> Subpopulation kam es somit unter Immunmodulation zu einer geringeren Depletion von Klonotypen. Obwohl in der CD4<sup>+</sup> CCR7<sup>+</sup> T-Zell-Subpopulation sowohl T<sub>NC</sub> als auch T<sub>CM</sub> Zellen zusammen betrachtet werden, lässt sich bei einer zusammengefassten Persistenz von  $\leq 5$  % über die T<sub>CM</sub> Subpopulation

sagen, dass es zu einer Depletion von mitunter autoimmuner T-Zellen unter Therapie mit Fingolimod kam.

#### 4.2.4 Charakterisierung der Klonotypen im TZR- $\beta$ -Repertoire

Langjährige Analysen des TZR- $\beta$ -Repertoires ergaben, dass in gesunden Individuen mehrere Millionen verschiedene TZR- $\beta$ -Klonotypen zu finden seien, die in der Häufigkeit ihres Auftretens weit variieren und zwischen verschiedenen T-Zell Kompartimenten und unter unabhängigen Individuen übereinstimmen können (Woodsworth et al., 2013). So zeigten Robins et al. (2010), dass >10.000 CDR3 Sequenzen in naiven CD8+ TZR- $\beta$ -Repertoires zweier Individuen unabhängig der HLA Typisierung identisch waren. Auch Qi et al. (2014) beobachtete im naiven T-Zell Repertoire der CD4+ und CD8+ T-Zellen übereinstimmende CDR3 Sequenzen zwischen unabhängigen Individuen. So wurden in dieser Veröffentlichung Klonotypen als *public* (öffentlich) definiert, wenn sie in  $\geq 2$  Individuen zu finden waren. Für die hier gezeigten Ergebnisse wurde diese Definition übernommen. Venturi et al. (2008) postulierte, dass eine Existenz von übereinstimmenden TZR Sequenzen auf konvergente Rekombination zurückzuführen sei. Dies führe dazu, dass einige TZRs häufiger produziert werden als andere. *Public* Klonotypen seien dabei häufig TZR Sequenzen aus simplen Segmenten, wie jene denen *nontemplated* Nukleotide in der N-Region des TZRs fehlen (Venturi et al., 2011). In den dargestellten Ergebnissen zeigten sich zum Zeitpunkt m0 mit anteilig 1 % an allen Klonotypen mehr öffentliche Klonotypen in der CD4+ CCR7+ T<sub>NC</sub> und T<sub>CM</sub> Subpopulation als in der CD4+ CCR7- T<sub>EM</sub> Subpopulation (0,5 %). Unter Therapie mit Fingolimod reduzierte sich in beiden Subpopulationen die absolute Anzahl und auch der relative Anteil der öffentlichen Klonotypen in den TZR- $\beta$ -Repertoires.

Bei post-mortem Untersuchungen von MS Läsionen mittels CDR3-*Spectratyping* von vier Patienten konnten Junker et al. (2007) keine übereinstimmenden Klonotypen zwischen MS Patienten identifizieren. Auch Alves Sousa et al. (2019) konnte mittels NGS unter 34 MS Patienten keine gemeinsamen Klonotypen isolieren. Es zeigten sich zwar keine übereinstimmenden CDR3 Sequenzen, jedoch konnten in 18 von 34 MS

Patienten Cluster verwandter CDR3 Sequenzen beschrieben werden. In den in dieser Arbeit gezeigten Experimenten stimmten zum Zeitpunkt m0 in der CD4+ CCR7+ T<sub>NC</sub> und T<sub>CM</sub> Subpopulation 357 Klonotypen zwischen zwei MS Patienten und 26 Klonotypen zwischen allen drei MS Patienten überein. In der CD4+ CCR7- T<sub>EM</sub> Subpopulation zeigten sich weniger übereinstimmende Klonotypen. So fanden sich zum Zeitpunkt m0 171 übereinstimmende Klonotypen zwischen zwei MS Patienten und 10 übereinstimmende Klonotypen zwischen drei MS Patienten. Speziell bei einem Vergleich zu nur einem gesunden Probanden ist eine Aussage, ob die identifizierten Klonotypen MS spezifisch seien, jedoch nicht zu treffen. Es könnten gleichzeitig auch Klonotypen sein, die sich bei anderen gesunden Individuen als öffentlich zeigen würden.

Eine Zuordnung der in diesen Ergebnissen ermittelten TZR Sequenzen zu Epitop Spezies und damit einer möglichen Antigenpezifität erfolgte durch Abgleich mit der VDJdb (Bagaev et al., 2020) Datenbank. Mittels NGS untersuchten Amoriello et al. (2020) das CD4+ und CD8+ TZR- $\beta$ -Repertoire von MS Patienten unter autologer Stammzelltransplantation und Natalizumab Therapie und glichen diese TZR-Sequenzen auch mit der VDJdb Datenbank ab. Dabei ließen sich in dieser Studie die TZR Sequenzen der MS Patienten mit absteigender Häufigkeit dem Cytomegalievirus (CMV), dem Humanen Immundefizienz-Virus Typ I (HIV-I) und dem Epstein-Barr-Virus (EBV) zuordnen. Im Liquor von MS Patienten zeigte sich, dass eine Antigenpezifität für EBV im Repertoire der CD8+ T-Zellen alleinig bei MS Patienten zu finden war, während eine hochfrequente Antigenpezifität für EBV bei CD4+ T-Zellen sowohl unter der gesunden Kontrollen, als auch unter den MS Patienten auftrat (Lossius et al., 2014). Auch in den hier beschriebenen Ergebnissen zeigten sich die TZR Sequenzen hochfrequenter, die CMV, HIV-I und EBV zugeordnet werden konnten. In der CD4+ CCR7+ T<sub>NC</sub> und T<sub>CM</sub> Subpopulation fand sich zum Zeitpunkt m0 jedoch diese Epitop Zuordnungen bei allen Probanden, darunter auch bei der gesunde Kontrolle, zum CMV, EBV und HIV-I. Die MS Patienten zeigten dabei regelhaft keine höhere Frequenz der zugehörigen TZR Sequenzen im Repertoire als die gesunde Kontrolle. Auch in der CD4+ CCR7- T<sub>EM</sub> Subpopulation zum Zeitpunkt m0 zeigten sich TZR Sequenzen mit der Epitop Spezies Zuordnung zum CMV und EBV bei allen Probanden

hochfrequenter. Allein die Epitop Zuordnung zum HIV-I zeigte sich nur bei den drei MS Patienten und nicht bei der gesunden Kontrolle unter den Top 5 Epitop Spezies der T<sub>EM</sub> Zellen. Für eine weitere Beurteilung der Epitop Spezies Zuordnung eines TZR- $\beta$ -Repertoires müssen jedoch noch mehr Faktoren berücksichtigt werden. So ist zu beachten, dass bei allen Proben bei  $\geq 95\%$  der Sequenzierungsdaten keine Zuordnung zu einer Epitop Spezies möglich war. Bagaev et al. (2020) geben dabei für ihre VDJdb Datenbank einen Datensatz von mehr als 61.000 TZR spezifische Sequenzen an. Eine Limitation der Epitop Spezies Zuordnung der TZR ist auf Grund von noch limitierten Datensätzen jedoch weiterhin anzunehmen. So wird hier nur ein sehr geringer Anteil der TZR- $\beta$ -Repertoires der Probanden abgebildet und gemessene Unterschiede der Frequenzen erscheinen folglich gering. Gleichzeitig ist anzustreben, die durch die Datenbank erkannten und zugeordneten Sequenzen weiter zu differenzieren. So könnten fragliche Zuordnungen oder sogar mehrfache Zuordnungen der TZR- $\beta$ s zu Epitop Spezies identifiziert werden. Außerdem wäre ein Abgleich der ermittelten V-J-Rekombination des sequenzierten TZR- $\beta$ s mit der V-J-Rekombination der in der Datenbank bekannten TZR Sequenz sowie ein Zuordnung der bekannten TZR Sequenz zu einer MHC-Klasse möglich. Unter Berücksichtigung der geringen prozentualen Zuordnung der TZR- $\beta$ s zu Epitop Spezies in den untersuchten T-Zell-Subpopulationen und ohne weitere Differenzierung der erkannten CDR3 Sequenzen sind Rückschlüsse auf Unterschiede zwischen MS Patienten und einer gesunden Kontrolle oder sogar die Identifikation MS assoziierter Epitop Spezies nur schwer möglich.

### 4.3 Grenzen und Möglichkeiten der Methode der TZR- $\beta$ -Repertoireanalyse

Neben den in 4.2. genannten Störfaktoren der TZR- $\beta$ -Repertoireabbildung wie Fehler in der Amplifizierung der Produkte vor und während der Sequenzierung, der unterschiedlichen Qualitäten der *Reads* und der erschwerten Beurteilbarkeit der Sequenziertiefe in den Ergebnissen gibt es weitere Störfaktoren in der Methode der TZR-*Library*-Präparation. Für die Diskussion weiterer Hindernisse während der Etablierung der hier verwendeten Methode verweise ich auf die Dissertation unserer

Arbeitsgruppe „*Next-Generation Sequencing* in der Neurologie: Etablierung einer Methode zur Immunrepertoireanalyse von T- und B-Lymphozyten und Anwendung der T-Zell-Rezeptorrepertoireanalyse bei Patienten mit Multipler Sklerose unter immunmodulatorischer Behandlung“ veröffentlicht von Armin Scheffler (2020).

In der hier verwendeten Methodik wurde mRNA und nicht genomische DNA als Ausgangsmaterial verwendet. Die durch reverse Transkription synthetisierte cDNA bietet die Vorteile, dass Introns in der Amplifizierung ausgeschlossen werden, vereinfacht die Sequenzierungsstrategie und reduziert die Anzahl unproduktiver Sequenzen (Li and Wilkinson, 1998). Bedingt durch eine Vielzahl an RNA Transkript Kopien in jeder Zelle ist der Gebrauch von cDNA, besonders bei Verwendung von geringen Zellzahlen als Ausgangsmaterial, sensitiver als der von genomischer DNA (Johansen et al., 2015; von Büdingen et al., 2012). Eine bessere Korrelation zwischen Zellzahl und Sequenzen und somit eine verbesserte quantitative Abbildung des TZR- $\beta$ -Repertoires fand sich jedoch bei genomischer DNA als Ausgangsmaterial (Carlson et al., 2013; Dziubianau et al., 2013). Die mRNA basierte Sequenzierung kann jedoch durch wechselnden mRNA Expressionslevel während der TZR Aktivierung beeinflusst werden (Paillard et al., 1988). Veränderte Expressionslevels der TZR könnten so Immunrepertoireveränderungen und mitunter auch klonale Expansionen vortäuschen (Benichou et al., 2012; Lossius et al., 2016).

Neben wechselnden mRNA Expressionslevel können weitere Störfaktoren einer quantitativen Analyse PCR Artefakte, unterschiedliche Amplifikationslevel, Fehler in der Präparation der *Gen-Library* und Fehler in der Sequenzierung sein (Aird et al., 2011). Um in dieser Arbeit eine Korrelation zwischen Ausgangszellzahl und Sequenzierungsprodukt herzustellen, wurden die Proben abhängig von ihrer Ausgangszellzahl anteilig in der *TZR-Library* repräsentiert. Zur Vorbereitung wurden alle Proben auf eine gleiche Molarität konzentriert. Nach Berechnung der totalen Zellzahl aller zu sequenzierender Proben wurden die Subpopulationen in gleicher Molarität proportional zu der Ausgangszellzahl zu der *TZR-Library* hinzugefügt. Eine veränderte Methodik mit Verwendung von einzigartigen Molekül Kennungen (*unique molecular identifiers - UMI*) wurde bereits als Lösungsansatz zur quantitativen Analyse

der ursprünglichen DNA beschrieben (Kivioja et al., 2012). In die DNA bzw. mRNA oder cDNA eingebrachte *UMIs* bieten die Möglichkeit eines quantitativen Vergleichs zwischen Ausgangsmaterial und Ergebnis der Sequenzierung. Die Methode fand bereits Anwendung in anderen TZR- $\beta$ -Repertoireanalysen und es zeigte sich, dass durch Analyse der gleichen Anzahl von einzigartigen cDNA Molekülen, markiert mit *UMIs*, trotz unterschiedlicher Ausgangszellpopulation und Sequenziertiefe eine Normalisierung verschiedener TZR-*Libraries* möglich war (Britanova et al., 2014; Egorov et al., 2015). Alves Sousa et al. (2019) gelang durch Verwendung von *UMIs* und die damit verbundene Erkennung von Amplifikationsartefakten die Identifikation von verwandten Klonotypen im TZR-Repertoire von MS Patienten. *UMIs* konnten jedoch auch durch PCR Fehler in der eigenen Sequenz als Störfaktor identifiziert werden (Brodin et al., 2015). In dieser Arbeit würde die Verwendung von *UMIs* dazu führen, dass Zusammenhänge zwischen Ausgangszellzahl und Sequenzierungsprodukt klarer beobachtet werden könnten. Dadurch wären vergleichende Analysen der Diversität und klonaler Expansionen verschiedener TZR-Repertoires besser möglich.

Als weiterer Störfaktor der hier verwendeten Methodik ist die Anzahl, der zu untersuchenden Proben zu nennen. Bei zwei zu vergleichenden Patientenproben (Pat. C und Pat. D) unter Therapie können sichtbare Veränderungen, auf individuelle immunologische Vorgänge oder individuelle Therapieverläufe zurückzuführen sein. Gleiches gilt für den unbehandelten MS Patienten und die gesunde Kontrolle. So lassen sich nur Ähnlichkeiten beschreiben. Eine signifikante qualitative oder quantitative Analyse kann nicht stattfinden. Die Verwendung einer größeren Kohorte, sowohl bei den Patienten unter Therapie mit Fingolimod, als auch bei den gesunden und erkrankten Kontrollen, würde die Möglichkeit bieten, richtungsweisende Übereinstimmungen klarer zu differenzieren. Um eine basierte Aussage über die Wirkung und den Erfolg von Fingolimod für MS zu treffen, wäre außerdem die Einbeziehung von weiteren klinischen Daten, wie dem *Expanded Disability Status Scale*, die Einbeziehung von weiteren Informationen über den Krankheitsverlauf der Patienten, mitunter bildmorphologische Verläufe im MRT, vorherige

Therapieschemata und Nebenwirkungsprofilen und die Einbeziehung genetischer Analysen von großem Interesse sein.

## 4.4 Schlussfolgerung

Das Ziel dieser Arbeit war es, mittels NGS das CD4<sup>+</sup> TZR- $\beta$ -Immunrepertoire von MS Patienten mit und ohne Therapie genauer zu charakterisieren, um MS spezifische Veränderungen im TZR- $\beta$ -Repertoire und die immunmodulatorische Wirkung von Fingolimod im zeitlichen Verlauf besser zu verstehen. Als Grundlage für weitere Forschungen zeigte sich in dieser Arbeit, dass MS Patienten im Vergleich zur gesunden Kontrolle ein erhöhtes Auftreten des Gensegments TRBV5.1 im TZR- $\beta$ -Repertoire aufwiesen. Außerdem zeigten MS Patienten im Vergleich zur gesunden Kontrolle eine geringere Diversität in der CD4<sup>+</sup> T<sub>NC</sub> und T<sub>CM</sub> Subpopulation und eine höhere Diversität der T<sub>EM</sub> Subpopulation. Unter Therapie mit Fingolimod kam es bei den MS Patienten zu einer Abnahme der V-J-Rekombinationsmöglichkeiten sowie zu einer Zunahme der Diversität des TZR- $\beta$ -Repertoires aller T-Zell-Subpopulationen. Die TZR- $\beta$  konnten bei allen Probanden mit erhöhten Frequenzen dem Cytomegalievirus, dem Epstein-Barr-Virus und dem Humanen Immundefizienz-Virus Typ I zugeordnet werden. Vergleiche zwischen MS Patienten und der gesunden Kontrolle zeigten dabei keine richtungsweisenden Unterschiede der Frequenzen der Epitop Spezies. Störfaktoren, die diese Ergebnisse beeinträchtigen, sind mitunter mögliche Fehler in der Amplifikation, Sequenzierungstiefenunterschiede und eine erschwerte Korrelation zwischen Sequenzierungsprodukt und Zellzahl zu Beginn des Prozesses. Unter Verbesserung der Methodik durch beispielsweise Anwendung von *UMIs* zur Korrektur quantitativer Zusammenhänge oder einer Normalisierung der unterschiedlichen Sequenziertiefen durch Korrelation von Ausgangszellzahl und Sequenzierungsprodukt könnte in einer größeren Kohorte durch die Kombination der Hochdurchsatzsequenzierung mit Langzeitstudien und relevanten klinischen Daten, die Analyse des TZR- $\beta$ -Repertoires als nützlicher diagnostischer, prognostischer oder behandlungsstratifizierender Biomarker in der MS fungieren. Mit den Variablen Diversität, Klonalität und den klonalen CDR3 Sequenzen ließen sich so Konstanten zwischen Patientengruppen feststellen. Des Weiteren wäre durch die Analyse von

nicht nur CD4+ und CD8+ T-Zellen, sondern auch anderen T- und B-Zellen, die Abbildung eines größeren Repertoireanteils von MS Patienten mit und ohne Therapie möglich. So könnte ein Auffinden autoreaktiver, klonal expandierter Zellen mittels NGS indirekt zur Identifikation eines Auto-Antigens führen.

## 5 Interessenkonflikt

Zum Teil erfolgte durch die Firma Novartis eine Unterstützung in Form von Geldmitteln für Labormaterialien et cetera. Dabei fand zu keinem Zeitpunkt eine Einflussnahme auf den Aufbau oder Ablauf der Experimente oder die Interpretation der Ergebnisse statt. Es bestehen somit keine Interessenkonflikte.

## 6 Literaturverzeichnis

- Adachi, K., Kohara, T., Nakao, N., Arita, M., Chiba, K., Mishina, T., Sasaki, S., Fujita, T., 1995. Design, synthesis, and structure-activity relationships of 2-substituted-2-amino-1,3-propanediols: Discovery of a novel immunosuppressant, FTY720. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 5, 853–856. [https://doi.org/10.1016/0960-894X\(95\)00127-F](https://doi.org/10.1016/0960-894X(95)00127-F)
- Ahmed, R., Gray, D., 1996. Immunological Memory and Protective Immunity: Understanding Their Relation. *Science* 272, 54–60. <https://doi.org/10.1126/science.272.5258.54>
- Aird, D., Ross, M.G., Chen, W.-S., Danielsson, M., Fennell, T., Russ, C., Jaffe, D.B., Nusbaum, C., Gnirke, A., 2011. Analyzing and minimizing PCR amplification bias in Illumina sequencing libraries. *Genome Biol.* 12, R18. <https://doi.org/10.1186/gb-2011-12-2-r18>
- Allende, M.L., Dreier, J.L., Mandala, S., Proia, R.L., 2004. Expression of the Sphingosine 1-Phosphate Receptor, S1P1, on T-cells Controls Thymic Emigration. *J. Biol. Chem.* 279, 15396–15401. <https://doi.org/10.1074/jbc.M314291200>
- Allende, M.L., Proia, R.L., 2002. Sphingosine-1-phosphate receptors and the development of the vascular system. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Biol. Lipids, Lysolipid Mediators in Cell Signalling and Disease* 1582, 222–227. [https://doi.org/10.1016/S1388-1981\(02\)00175-0](https://doi.org/10.1016/S1388-1981(02)00175-0)
- Alves Sousa, A. de P., Johnson, K.R., Ohayon, J., Zhu, J., Muraro, P.A., Jacobson, S., 2019. Comprehensive Analysis of TCR- $\beta$  Repertoire in Patients with Neurological Immune-mediated Disorders. *Sci. Rep.* 9. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-36274-7>

- Amoriello, R., Greiff, V., Aldinucci, A., Bonechi, E., Carnasciali, A., Peruzzi, B., Repice, A.M., Mariottini, A., Saccardi, R., Mazzanti, B., Massacesi, L., Ballerini, C., 2020. The TCR Repertoire Reconstitution in Multiple Sclerosis: Comparing One-Shot and Continuous Immunosuppressive Therapies. *Front. Immunol.* 11. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00559>
- Ascherio, A., Munger, K.L., 2007. Environmental risk factors for multiple sclerosis. Part I: The role of infection. *Ann. Neurol.* 61, 288–299. <https://doi.org/10.1002/ana.21117>
- 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.
- Bagaev, D.V., Vroomans, R.M.A., Samir, J., Stervbo, U., Rius, C., Dolton, G., Greenshields-Watson, A., Attaf, M., Egorov, E.S., Zvyagin, I.V., Babel, N., Cole, D.K., Godkin, A.J., Sewell, A.K., Kesmir, C., Chudakov, D.M., Luciani, F., Shugay, M., 2020. VDJdb in 2019: database extension, new analysis infrastructure and a T-cell receptor motif compendium. *Nucleic Acids Res.* 48, D1057–D1062. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz874>
- Benichou, J., Ben-Hamo, R., Louzoun, Y., Efroni, S., 2012. Rep-Seq: uncovering the immunological repertoire through next-generation sequencing. *Immunology* 135, 183–191. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2011.03527.x>
- Berger, J.R., Cree, B.A., Greenberg, B., Hemmer, B., Ward, B.J., Dong, V.M., Merschhemke, M., 2018. Progressive multifocal leukoencephalopathy after fingolimod treatment. *Neurology* 90, e1815–e1821. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000005529>
- Berger, J.R., Fox, R.J., 2016. Reassessing the risk of natalizumab-associated PML. *J. Neurovirol.* 22, 533–535. <https://doi.org/10.1007/s13365-016-0427-6>
- Billich, A., Bornancin, F., Dévay, P., Mechtcheriakova, D., Urtz, N., Baumruker, T., 2003. Phosphorylation of the Immunomodulatory Drug FTY720 by Sphingosine Kinases. *J. Biol. Chem.* 278, 47408–47415. <https://doi.org/10.1074/jbc.M307687200>
- Binder, M.D., 2009. [Encyclopedia of Neuroscience]. Springer-Verlag Berlin and Heidelberg GmbH & Co. K.
- Bitsch, A., Schuchardt, J., Bunkowski, S., Kuhlmann, T., Brück, W., 2000. Acute axonal injury in multiple sclerosis Correlation with demyelination and inflammation. *Brain* 123, 1174–1183. <https://doi.org/10.1093/brain/123.6.1174>
- Bjartmar, C., Wujek, J.R., Trapp, B.D., 2003. Axonal loss in the pathology of MS: consequences for understanding the progressive phase of the disease. *J. Neurol. Sci., The Progressive Phase of Multiple Sclerosis: Pathology and Treatment.* 7th European Charcot foundation Symposium 206, 165–171. [https://doi.org/10.1016/S0022-510X\(02\)00069-2](https://doi.org/10.1016/S0022-510X(02)00069-2)

- Bolotin, D.A., Mamedov, I.Z., Britanova, O.V., Zvyagin, I.V., Shagin, D., Ustyugova, S.V., Turchaninova, M.A., Lukyanov, S., Lebedev, Y.B., Chudakov, D.M., 2012. Next generation sequencing for TCR repertoire profiling: Platform-specific features and correction algorithms. *Eur. J. Immunol.* 42, 3073–3083. <https://doi.org/10.1002/eji.201242517>
- Bolotin, D.A., Poslavsky, S., Mitrophanov, I., Shugay, M., Mamedov, I.Z., Putintseva, E.V., Chudakov, D.M., 2015. MiXCR: software for comprehensive adaptive immunity profiling. *Nat. Methods* 12, 380–381. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3364>
- Brinkmann, V., 2007. Sphingosine 1-phosphate receptors in health and disease: Mechanistic insights from gene deletion studies and reverse pharmacology. *Pharmacol. Ther.* 115, 84–105. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2007.04.006>
- Brinkmann, V., Billich, A., Baumruker, T., Heining, P., Schmouder, R., Francis, G., Aradhye, S., Burtin, P., 2010. Fingolimod (FTY720): discovery and development of an oral drug to treat multiple sclerosis. *Nat. Rev. Drug Discov.* 9, 883–897. <https://doi.org/10.1038/nrd3248>
- Brinkmann, V., Cyster, J.G., Hla, T., 2004. FTY720: Sphingosine 1-Phosphate Receptor-1 in the Control of Lymphocyte Egress and Endothelial Barrier Function. *Am. J. Transplant.* 4, 1019–1025. <https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2004.00476.x>
- Britanova, O.V., Putintseva, E.V., Shugay, M., Merzlyak, E.M., Turchaninova, M.A., Staroverov, D.B., Bolotin, D.A., Lukyanov, S., Bogdanova, E.A., Mamedov, I.Z., Lebedev, Y.B., Chudakov, D.M., 2014. Age-Related Decrease in TCR Repertoire Diversity Measured with Deep and Normalized Sequence Profiling. *J. Immunol.* 192, 2689–2698. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1302064>
- Brodin, J., Hedskog, C., Heddini, A., Benard, E., Neher, R.A., Mild, M., Albert, J., 2015. Challenges with Using Primer IDs to Improve Accuracy of Next Generation Sequencing. *PLoS ONE* 10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0119123>
- Browne, P., Chandraratna, D., Angood, C., Tremlett, H., Baker, C., Taylor, B.V., Thompson, A.J., 2014. Atlas of Multiple Sclerosis 2013: A growing global problem with widespread inequity. *Neurology* 83, 1022–1024. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000000768>
- Carlson, C.S., Emerson, R.O., Sherwood, A.M., Desmarais, C., Chung, M.-W., Parsons, J.M., Steen, M.S., LaMadrid-Herrmannsfeldt, M.A., Williamson, D.W., Livingston, R.J., Wu, D., Wood, B.L., Rieder, M.J., Robins, H., 2013. Using synthetic templates to design an unbiased multiplex PCR assay. *Nat. Commun.* 4, 2680. <https://doi.org/10.1038/ncomms3680>
- Chiarini, M., Sottini, A., Bertoli, D., Serana, F., Caimi, L., Rasia, S., Capra, R., Imberti, L., 2015. Newly produced T and B lymphocytes and T-cell receptor repertoire diversity are reduced in peripheral blood of fingolimod-treated multiple sclerosis patients. *Mult. Scler. J.* 21, 726–734. <https://doi.org/10.1177/1352458514551456>

- Claes, N., Dhaeze, T., Fraussen, J., Broux, B., Van Wijmeersch, B., Stinissen, P., Hupperts, R., Hellings, N., Somers, V., 2014. Compositional Changes of B and T Cell Subtypes during Fingolimod Treatment in Multiple Sclerosis Patients: A 12-Month Follow-Up Study. *PLoS ONE* 9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0111115>
- Coelho, R.P., Payne, S.G., Bittman, R., Spiegel, S., Sato-Bigbee, C., 2007. The Immunomodulator FTY720 Has a Direct Cytoprotective Effect in Oligodendrocyte Progenitors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 323, 626–635. <https://doi.org/10.1124/jpet.107.123927>
- Cohen, J.A., Barkhof, F., Comi, G., Hartung, H.-P., Khatri, B.O., Montalban, X., Pelletier, J., Capra, R., Gallo, P., Izquierdo, G., Tiel-Wilck, K., de Vera, A., Jin, J., Stites, T., Wu, S., Aradhye, S., Kappos, L., 2010. Oral Fingolimod or Intramuscular Interferon for Relapsing Multiple Sclerosis. *N. Engl. J. Med.* 362, 402–415. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0907839>
- Comabella, M., Sastre-Garriga, J., Montalban, X., 2016. Precision medicine in multiple sclerosis: biomarkers for diagnosis, prognosis, and treatment response. *Curr. Opin. Neurol.* 29, 254–262. <https://doi.org/10.1097/WCO.0000000000000336>
- Comi, G., Filippi, M., Barkhof, F., Durelli, L., Edan, G., Fernández, O., Hartung, H.-P., Seeldrayers, P., Sørensen, P.S., Rovaris, M., Martinelli, V., Hommes, O.R., 2001. Effect of early interferon treatment on conversion to definite multiple sclerosis: a randomised study. *The Lancet* 357, 1576–1582. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)04725-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)04725-5)
- 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)
- Coussin Frederic, Scott Roderick H., Wise Alan, Nixon Graeme F., 2002. Comparison of Sphingosine 1-Phosphate–Induced Intracellular Signaling Pathways in Vascular Smooth Muscles. *Circ. Res.* 91, 151–157. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000028150.51130.36>
- Cyster, J.G., 2005. Chemokines, Sphingosine-1-Phosphate, and Cell Migration in Secondary Lymphoid Organs. *Annu. Rev. Immunol.* 23, 127–159. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.23.021704.115628>
- Dantas, A.P.V., Igarashi, J., Michel, T., 2003. Sphingosine 1-phosphate and control of vascular tone. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 284, H2045–2052. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.01089.2002>
- de Greef, P.C., Oakes, T., Gerritsen, B., Ismail, M., Heather, J.M., Hermsen, R., Chain, B., de Boer, R.J., 2020. The naive T-cell receptor repertoire has an extremely broad distribution of clone sizes. *eLife* 9. <https://doi.org/10.7554/eLife.49900>
- Dean, G., Kurtzke, J.F., 1971. On the Risk of Multiple Sclerosis According to Age at Immigration to South Africa. *Br. Med. J.* 3, 725–729.
- Derfuss, T., 2012. Personalized medicine in multiple sclerosis: hope or reality? *BMC Med.* 10, 116. <https://doi.org/10.1186/1741-7015-10-116>
- Dev, K.K., Mullershausen, F., Mattes, H., Kuhn, R.R., Bilbe, G., Hoyer, D., Mir, A., 2008. Brain sphingosine-1-phosphate receptors: Implication for FTY720 in the

- treatment of multiple sclerosis. *Pharmacol. Ther.* 117, 77–93. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2007.08.005>
- Disanza, A., Steffen, A., Hertzog, M., Frittoli, E., Rottner, K., Scita, G., 2005. Actin polymerization machinery: the finish line of signaling networks, the starting point of cellular movement. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 62, 955–970. <https://doi.org/10.1007/s00018-004-4472-6>
- Dutton, R.W., Bradley, L.M., Swain, S.L., 1998. T Cell Memory. *Annu. Rev. Immunol.* 16, 201–223. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.16.1.201>
- Dziubianau, M., Hecht, J., Kuchenbecker, L., Sattler, A., Stervbo, U., Rödelberger, C., Nickel, P., Neumann, A.U., Robinson, P.N., Mundlos, S., Volk, H.-D., Thiel, A., Reinke, P., Babel, N., 2013. TCR repertoire analysis by next generation sequencing allows complex differential diagnosis of T cell-related pathology. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* 13, 2842–2854. <https://doi.org/10.1111/ajt.12431>
- Egorov, E.S., Merzlyak, E.M., Shelenkov, A.A., Britanova, O.V., Sharonov, G.V., Staroverov, D.B., Bolotin, D.A., Davydov, A.N., Barsova, E., Lebedev, Y.B., Shugay, M., Chudakov, D.M., 2015. Quantitative Profiling of Immune Repertoires for Minor Lymphocyte Counts Using Unique Molecular Identifiers. *J. Immunol.* 194, 6155–6163. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1500215>
- Fasbender, P., Kölmel, H.W., 2008. Incidence of Multiple Sclerosis in the Urban Area of Erfurt, Thuringia, Germany. *Neuroepidemiology* 30, 147–151. <https://doi.org/10.1159/000122331>
- Foster, C.A., Howard, L.M., Schweitzer, A., Persohn, E., Hiestand, P.C., Balatoni, B., Reuschel, R., Beerli, C., Schwartz, M., Billich, A., 2007. Brain Penetration of the Oral Immunomodulatory Drug FTY720 and Its Phosphorylation in the Central Nervous System during Experimental Autoimmune Encephalomyelitis: Consequences for Mode of Action in Multiple Sclerosis. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 323, 469–475. <https://doi.org/10.1124/jpet.107.127183>
- Fozza, C., Zoledzieska, M., Pitzalis, M., Simula, M.P., Galleu, A., Contini, S., Bonfigli, S., Cucca, F., Longinotti, M., 2012. TCRBV20S1 polymorphism does not influence the susceptibility to type 1 diabetes and multiple sclerosis in the Sardinian population. *Immunogenetics* 64, 153–154. <https://doi.org/10.1007/s00251-011-0575-z>
- Ghadiri, M., Rezk, A., Li, R., Evans, A., Giacomini, P.S., Barnett, M.H., Antel, J., Bar-Or, A., 2020. Pre-treatment T-cell subsets associate with fingolimod treatment responsiveness in multiple sclerosis. *Sci. Rep.* 10. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-57114-2>
- Goebels, N., Hofstetter, H., Schmidt, S., Brunner, C., Wekerle, H., Hohlfeld, R., 2000. Repertoire dynamics of autoreactive T cells in multiple sclerosis patients and healthy subjects Epitope spreading versus clonal persistence. *Brain* 123, 508–518. <https://doi.org/10.1093/brain/123.3.508>
- Goronzy, J.J., Weyand, C.M., 2012. Immune aging and autoimmunity. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 69, 1615–1623. <https://doi.org/10.1007/s00018-012-0970-0>

- Graber, J.J., Dhib-Jalbut, S., 2011. Biomarkers of disease activity in multiple sclerosis. *J. Neurol. Sci.* 305, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2011.03.026>
- Greiff, V., Bhat, P., Cook, S.C., Menzel, U., Kang, W., Reddy, S.T., 2015. A bioinformatic framework for immune repertoire diversity profiling enables detection of immunological status. *Genome Med.* 7. <https://doi.org/10.1186/s13073-015-0169-8>
- Grossman, R.I., Braffman, B.H., Brorson, J.R., Goldberg, H.I., Silberberg, D.H., Gonzalez-Scarano, F., 1988. Multiple sclerosis: serial study of gadolinium-enhanced MR imaging. *Radiology* 169, 117–122. <https://doi.org/10.1148/radiology.169.1.3420246>
- Haas, J., Schwarz, A., Korporal-Kunke, M., Jarius, S., Wiendl, H., Kieseier, B.C., Wildemann, B., 2015. Fingolimod does not impair T-cell release from the thymus and beneficially affects Treg function in patients with multiple sclerosis. *Mult. Scler. J.* 21, 1521–1532. <https://doi.org/10.1177/1352458514564589>
- Handel, A.E., Williamson, A.J., Disanto, G., Handunnetthi, L., Giovannoni, G., Ramagopalan, S.V., 2010. An Updated Meta-Analysis of Risk of Multiple Sclerosis following Infectious Mononucleosis. *PLoS ONE* 5. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012496>
- Harirchian, M.H., Fatehi, F., Sarraf, P., Honarvar, N.M., Bitarafan, S., 2018. Worldwide prevalence of familial multiple sclerosis: A systematic review and meta-analysis. *Mult. Scler. Relat. Disord.* 20, 43–47. <https://doi.org/10.1016/j.msard.2017.12.015>
- Hartung, H.-P., Aktas, O., Boyko, A.N., 2015. Alemtuzumab: A new therapy for active relapsing–remitting multiple sclerosis. *Mult. Scler. Houndmills Basingstoke Engl.* 21, 22–34. <https://doi.org/10.1177/1352458514549398>
- Hollenbach, J.A., Oksenberg, J.R., 2015. The Immunogenetics of Multiple Sclerosis: A Comprehensive Review. *J. Autoimmun.* 64, 13–25. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2015.06.010>
- Hu, D., Ikizawa, K., Lu, L., Sanchirico, M.E., Shinohara, M.L., Cantor, H., 2004. Analysis of regulatory CD8 T cells in Qa-1-deficient mice. *Nat. Immunol.* 5, 516–523. <https://doi.org/10.1038/ni1063>
- Huang, J.H., Cárdenas-Navia, L.I., Caldwell, C.C., Plumb, T.J., Radu, C.G., Rocha, P.N., Wilder, T., Bromberg, J.S., Cronstein, B.N., Sitkovsky, M., Dewhirst, M.W., Dustin, M.L., 2007. Requirements for T Lymphocyte Migration in Explanted Lymph Nodes. *J. Immunol.* 178, 7747–7755. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.12.7747>
- Huang, W.-J., Chen, W.-W., Zhang, X., 2017. Multiple sclerosis: Pathology, diagnosis and treatments. *Exp. Ther. Med.* 13, 3163–3166. <https://doi.org/10.3892/etm.2017.4410>
- Jadidi-Niaragh, F., Mirshafiey, A., 2011. Th17 Cell, the New Player of Neuroinflammatory Process in Multiple Sclerosis. *Scand. J. Immunol.* 74, 1–13. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3083.2011.02536.x>

- Johansen, J.N., Vartdal, F., Desmarais, C., Tuttunen, A.E.V., de Souza, G.A., Lossius, A., Holmøy, T., 2015. Intrathecal BCR transcriptome in multiple sclerosis versus other neuroinflammation: Equally diverse and compartmentalized, but more mutated, biased and overlapping with the proteome. *Clin. Immunol.* 160, 211–225. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2015.06.001>
- Johnson, K.P., Brooks, B.R., Cohen, J.A., Ford, C.C., Goldstein, J., Lisak, R.P., Myers, L.W., Panitch, H.S., Rose, J.W., Schiffer, R.B., Vollmer, T., Weiner, L.P., Wolinsky, J.S., 1998. Extended use of glatiramer acetate (Copaxone) is well tolerated and maintains its clinical effect on multiple sclerosis relapse rate and degree of disability. Copolymer 1 Multiple Sclerosis Study Group. *Neurology* 50, 701–708. <https://doi.org/10.1212/wnl.50.3.701>
- Jones, J.L., Thompson, S.A.J., Loh, P., Davies, J.L., Tuohy, O.C., Curry, A.J., Azzopardi, L., Hill-Cawthorne, G., Fahey, M.T., Compston, A., Coles, A.J., 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>
- Junker, A., Ivanidze, J., Malotka, J., Eiglmeier, I., Lassmann, H., Wekerle, H., Meinl, E., Hohlfeld, R., Dornmair, K., 2007. Multiple sclerosis: T-cell receptor expression in distinct brain regions. *Brain* 130, 2789–2799. <https://doi.org/10.1093/brain/awm214>
- Kahan, B., Karlix, J., Ferguson, R., Leichtman, A., Mulgaonkar, S., Gonwa, T., Skerjanec, A., Schmouder, R., Chodoff, L., 2003. Pharmacodynamics, pharmacokinetics, and safety of multiple doses of FTY720 in stable renal transplant patients: a multicenter, randomized, placebo-controlled, phase I study. *Transplantation* 76, 1079–1084. <https://doi.org/10.1097/01.TP.0000084822.01372.AC>
- 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., 2010a. A Placebo-Controlled Trial of Oral Fingolimod in Relapsing Multiple Sclerosis [WWW Document]. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa0909494>. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0909494>
- 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., FREEDOMS Study Group, 2010b. A placebo-controlled trial of oral fingolimod in relapsing multiple sclerosis. *N. Engl. J. Med.* 362, 387–401. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0909494>
- Karussis, D., Petrou, P., 2018. Immune reconstitution therapy (IRT) in multiple sclerosis: the rationale. *Immunol. Res.* 66, 642–648. <https://doi.org/10.1007/s12026-018-9032-5>
- Kingwell, E., Marriott, J.J., Jetté, N., Pringsheim, T., Makhani, N., Morrow, S.A., Fisk, J.D., Evans, C., Béland, S.G., Kulaga, S., Dykeman, J., Wolfson, C., Koch, M.W., Marrie, R.A., 2013. Incidence and prevalence of multiple sclerosis in Europe: a systematic review. *BMC Neurol.* 13, 128. <https://doi.org/10.1186/1471-2377-13-128>

- Kivioja, T., Vähärautio, A., Karlsson, K., Bonke, M., Enge, M., Linnarsson, S., Taipale, J., 2012. Counting absolute numbers of molecules using unique molecular identifiers. *Nat. Methods* 9, 72–74. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1778>
- Kivisäkk, P., Mahad, D.J., Callahan, M.K., Sikora, K., Trebst, C., Tucky, B., Wujek, J., Ravid, R., Staugaitis, S.M., Lassmann, H., Ransohoff, R.M., 2004. Expression of CCR7 in multiple sclerosis: Implications for CNS immunity. *Ann. Neurol.* 55, 627–638. <https://doi.org/10.1002/ana.20049>
- Klarenbeek, P.L., Tak, P.P., van Schaik, B.D.C., Zwinderman, A.H., Jakobs, M.E., Zhang, Z., van Kampen, A.H.C., van Lier, R.A.W., Baas, F., de Vries, N., 2010. Human T-cell memory consists mainly of unexpanded clones. *Immunol. Lett.* 133, 42–48. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2010.06.011>
- Koch-Henriksen, N., Sørensen, P.S., 2010. The changing demographic pattern of multiple sclerosis epidemiology. *Lancet Neurol.* 9, 520–532. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(10\)70064-8](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(10)70064-8)
- Kuhns, M.S., Davis, M.M., Garcia, K.C., 2006. Deconstructing the Form and Function of the TCR/CD3 Complex. *Immunity* 24, 133–139. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2006.01.006>
- Kurtzke, J.F., 2013. Epidemiology in multiple sclerosis: a pilgrim’s progress. *Brain* 136, 2904–2917. <https://doi.org/10.1093/brain/awt220>
- Kurtzke, J.F., 1983. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). *Neurology* 33, 1444–1452. <https://doi.org/10.1212/wnl.33.11.1444>
- Lang, H.L.E., Jacobsen, H., Ikemizu, S., Andersson, C., Harlos, K., Madsen, L., Hjorth, P., Sondergaard, L., Svejgaard, A., Wucherpfennig, K., Stuart, D.I., Bell, J.I., Jones, E.Y., Fugger, L., 2002. A functional and structural basis for TCR cross-reactivity in multiple sclerosis. *Nat. Immunol.* 3, 940. <https://doi.org/10.1038/ni835>
- Lassmann, H., Brück, W., Lucchinetti, C., 2001. Heterogeneity of multiple sclerosis pathogenesis: implications for diagnosis and therapy. *Trends Mol. Med.* 7, 115–121. [https://doi.org/10.1016/S1471-4914\(00\)01909-2](https://doi.org/10.1016/S1471-4914(00)01909-2)
- Lassmann, H., van Horssen, J., Mahad, D., 2012. Progressive multiple sclerosis: pathology and pathogenesis. *Nat. Rev. Neurol.* 8, 647–656. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2012.168>
- Lepley, D., Paik, J.-H., Hla, T., Ferrer, F., 2005. The G protein-coupled receptor S1P2 regulates Rho/Rho kinase pathway to inhibit tumor cell migration. *Cancer Res.* 65, 3788–3795. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-2311>
- Li, S., Wilkinson, M.F., 1998. Nonsense Surveillance in Lymphocytes? *Immunity* 8, 135–141. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(00\)80466-5](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(00)80466-5)
- Lossius, A., Johansen, J.N., Vartdal, F., Holmøy, T., 2016. High-throughput sequencing of immune repertoires in multiple sclerosis. *Ann. Clin. Transl. Neurol.* 3, 295–306. <https://doi.org/10.1002/acn3.295>

- Lossius, A., Johansen, J.N., Vartdal, F., Robins, H., Šaltytė, B.J., Holmøy, T., Olweus, J., 2014. High-throughput sequencing of TCR repertoires in multiple sclerosis reveals intrathecal enrichment of EBV-reactive CD8+ T cells. *Eur. J. Immunol.* 44, 3439–3452. <https://doi.org/10.1002/eji.201444662>
- Lublin, F.D., Reingold, S.C., Cohen, J.A., Cutter, G.R., Sørensen, P.S., Thompson, A.J., Wolinsky, J.S., Balcer, L.J., Banwell, B., Barkhof, F., Bebo, B., Calabresi, P.A., Clanet, M., Comi, G., Fox, R.J., Freedman, M.S., Goodman, A.D., Inglesse, M., Kappos, L., Kieseier, B.C., Lincoln, J.A., Lubetzki, C., Miller, A.E., Montalban, X., O'Connor, P.W., Petkau, J., Pozzilli, C., Rudick, R.A., Sormani, M.P., Stüve, O., Waubant, E., Polman, C.H., 2014. !!! Defining the clinical course of multiple sclerosis. *Neurology* 83, 278–286. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000000560>
- Lysandropoulos, A.P., Benghiat, F., 2013. Severe auto-immune hemolytic anemia in a fingolimod-treated multiple sclerosis patient. *Mult. Scler. J.* 19, 1551–1552. <https://doi.org/10.1177/1352458513493035>
- Magliozzi, R., Howell, O., Vora, A., Serafini, B., Nicholas, R., Puopolo, M., Reynolds, R., Aloisi, F., 2007. Meningeal B-cell follicles in secondary progressive multiple sclerosis associate with early onset of disease and severe cortical pathology. *Brain* 130, 1089–1104. <https://doi.org/10.1093/brain/awm038>
- Mahad, D.H., Trapp, B.D., Lassmann, H., 2015. Pathological mechanisms in progressive multiple sclerosis. *Lancet Neurol.* 14, 183–193. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(14\)70256-X](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(14)70256-X)
- Mahnke, Y.D., Brodie, T.M., Sallusto, F., Roederer, M., Lugli, E., 2013. The who's who of T-cell differentiation: Human memory T-cell subsets. *Eur. J. Immunol.* 43, 2797–2809. <https://doi.org/10.1002/eji.201343751>
- Matloubian, M., Lo, C.G., Cinamon, G., Lesneski, M.J., Xu, Y., Brinkmann, V., Allende, M.L., Proia, R.L., Cyster, J.G., 2004. Lymphocyte egress from thymus and peripheral lymphoid organs is dependent on S1P receptor 1. *Nature* 427, 355–360. <https://doi.org/10.1038/nature02284>
- McDonald, W.I., Compston, A., Edan, G., Goodkin, D., Hartung, H.-P., Lublin, F.D., McFarland, H.F., Paty, D.W., Polman, C.H., Reingold, S.C., Sandberg-Wollheim, M., Sibley, W., Thompson, A., Noort, S.V.D., Weinshenker, B.Y., Wolinsky, J.S., 2001. Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: Guidelines from the international panel on the diagnosis of multiple sclerosis. *Ann. Neurol.* 50, 121–127. <https://doi.org/10.1002/ana.1032>
- McVerry, B.J., Garcia, J.G.N., 2005. In vitro and in vivo modulation of vascular barrier integrity by sphingosine 1-phosphate: mechanistic insights. *Cell. Signal.* 17, 131–139. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2004.08.006>
- Mehling, M., Brinkmann, V., Antel, J., Bar-Or, A., Goebels, N., Vedrine, C., Kristofic, C., Kuhle, J., Lindberg, R.L.P., Kappos, L., 2008. FTY720 therapy exerts differential effects on T cell subsets in multiple sclerosis-KEIN access. *Neurology* 71, 1261–1267. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000327609.57688.ea>

- Mehling, M., Lindberg, R., Raulf, F., Kuhle, J., Hess, C., Kappos, L., Brinkmann, V., 2010. Th17 central memory T cells are reduced by FTY720 in patients with multiple sclerosis-kein access. *Neurology* 75, 403–410. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e3181ebdd64>
- Miller, D., Barkhof, F., Montalban, X., Thompson, A., Filippi, M., 2005. Clinically isolated syndromes suggestive of multiple sclerosis, part I: natural history, pathogenesis, diagnosis, and prognosis. *Lancet Neurol.* 4, 281–288. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(05\)70071-5](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(05)70071-5)
- Miron, V.E., Schubart, A., Antel, J.P., 2008. Central nervous system-directed effects of FTY720 (fingolimod). *J. Neurol. Sci., Treatment Targets in Multiple Sclerosis: “The ends and the means”* 274, 13–17. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2008.06.031>
- Miyazaki, Y., Niino, M., Fukazawa, T., Takahashi, E., Nonaka, T., Amino, I., Tashiro, J., Minami, N., Fujiki, N., Doi, S., Kikuchi, S., 2014. Suppressed pro-inflammatory properties of circulating B cells in patients with multiple sclerosis treated with fingolimod, based on altered proportions of B-cell subpopulations. *Clin. Immunol.* 151, 127–135. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2014.02.001>
- Mizugishi, K., Yamashita, T., Olivera, A., Miller, G.F., Spiegel, S., Proia, R.L., 2005. Essential Role for Sphingosine Kinases in Neural and Vascular Development. *Mol. Cell. Biol.* 25, 11113–11121. <https://doi.org/10.1128/MCB.25.24.11113-11121.2005>
- Moreno-Torres, I., González-García, C., Marconi, M., García-Grande, A., Rodríguez-Esparragoza, L., Elvira, V., Ramil, E., Campos-Ruiz, L., García-Hernández, R., Al-Shahrour, F., Fustero-Torre, C., Sánchez-Sanz, A., García-Merino, A., Sánchez López, A.J., 2018. Immunophenotype and Transcriptome Profile of Patients With Multiple Sclerosis Treated With Fingolimod: Setting Up a Model for Prediction of Response in a 2-Year Translational Study. *Front. Immunol.* 9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01693>
- Muraro, P.A., Robins, H., Malhotra, S., Howell, M., Phippard, D., Desmarais, C., de Paula Alves Sousa, A., Griffith, L.M., Lim, N., Nash, R.A., Turka, L.A., 2014. T cell repertoire following autologous stem cell transplantation for multiple sclerosis. *J. Clin. Invest.* 124, 1168–1172. <https://doi.org/10.1172/JCI71691>
- Murphy, K.M., Travers, P., Walport, M., 2008. *Janeway’s Immunobiology*, 7th Revised edition. ed. Taylor & Francis Ltd., New York.
- Nakamura, M., Matsuoka, T., Chihara, N., Miyake, S., Sato, W., Araki, M., Okamoto, T., Lin, Y., Ogawa, M., Murata, M., Aranami, T., Yamamura, T., 2014. Differential effects of fingolimod on B-cell populations in multiple sclerosis. *Mult. Scler. J.* 20, 1371–1380. <https://doi.org/10.1177/1352458514523496>
- Nguyen, P., Ma, J., Pei, D., Obert, C., Cheng, C., Geiger, T.L., 2011. Identification of errors introduced during high throughput sequencing of the T cell receptor repertoire. *BMC Genomics* 12, 106. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-12-106>
- O’Connor, P., Wolinsky, J.S., Confavreux, C., Comi, G., Kappos, L., Olsson, T.P., Benzerdjeb, H., Truffinet, P., Wang, L., Miller, A., Freedman, M.S., 2011.

- Randomized Trial of Oral Teriflunomide for Relapsing Multiple Sclerosis. *N. Engl. J. Med.* 365, 1293–1303. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1014656>
- Okada, T., Cyster, J.G., 2007. CC Chemokine Receptor 7 Contributes to Gi-Dependent T Cell Motility in the Lymph Node. *J. Immunol.* 178, 2973–2978. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.5.2973>
- Oksenberg, J.R., Panzara, M.A., Begovich, A.B., Mitchell, D., Erlich, H.A., Murray, R.S., Shimonkevitz, R., Sherritt, M., Rothbard, J., Bernard, C.C.A., Steinman, L., 1993. Selection for T-cell receptor V $\beta$ -D $\beta$ -J $\beta$  gene rearrangements with specificity for a myelin basic protein peptide in brain lesions of multiple sclerosis. *Nature* 362, 68. <https://doi.org/10.1038/362068a0>
- Ontaneda, D., Fox, R.J., 2015. Progressive multiple sclerosis. *Curr. Opin. Neurol.* 28, 237–243. <https://doi.org/10.1097/WCO.000000000000195>
- Paillard, F., Sterkers, G., Bismuth, G., Gomard, E., Vaquero, C., 1988. Lymphokine mRNA and T cell multireceptor mRNA of the Ig super gene family are reciprocally modulated during human T cell activation. *Eur. J. Immunol.* 18, 1643–1646. <https://doi.org/10.1002/eji.1830181028>
- Pakpoor, J., Disanto, G., Gerber, J.E., Dobson, R., Meier, U.C., Giovannoni, G., Ramagopalan, S.V., 2013. The risk of developing multiple sclerosis in individuals seronegative for Epstein-Barr virus: a meta-analysis. *Mult. Scler. J.* 19, 162–166. <https://doi.org/10.1177/1352458512449682>
- Pepper, M., Jenkins, M.K., 2011. ORIGINS OF CD4+ EFFECTOR AND CENTRAL MEMORY T CELLS. *Nat. Immunol.* 12, 467–471.
- Pham, T.H.M., Okada, T., Matloubian, M., Lo, C.G., Cyster, J.G., 2008. S1P1 receptor signaling overrides retention mediated by Gai-coupled receptors to promote T cell egress. *Immunity* 28, 122–133. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2007.11.017>
- Polman, C.H., O'Connor, P.W., Havrdova, E., Hutchinson, M., Kappos, L., Miller, D.H., Phillips, J.T., Lublin, F.D., Giovannoni, G., Wajgt, A., Toal, M., Lynn, F., Panzara, M.A., Sandrock, A.W., AFFIRM Investigators, 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>
- Polman, C.H., Reingold, S.C., Banwell, B., Clanet, M., Cohen, J.A., Filippi, M., Fujihara, K., Havrdova, E., Hutchinson, M., Kappos, L., Lublin, F.D., Montalban, X., O'Connor, P., Sandberg-Wollheim, M., Thompson, A.J., Waubant, E., Weinshenker, B., Wolinsky, J.S., 2011. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 Revisions to the McDonald criteria. *Ann. Neurol.* 69, 292–302. <https://doi.org/10.1002/ana.22366>
- Polman, C.H., Reingold, S.C., Edan, G., Filippi, M., Hartung, H.-P., Kappos, L., Lublin, F.D., Metz, L.M., McFarland, H.F., O'Connor, P.W., Sandberg-Wollheim, M., Thompson, A.J., Weinshenker, B.G., Wolinsky, J.S., 2005. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2005 revisions to the “McDonald Criteria.” *Ann. Neurol.* 58, 840–846. <https://doi.org/10.1002/ana.20703>

- Qi, Q., Liu, Y., Cheng, Y., Glanville, J., Zhang, D., Lee, J.-Y., Olshen, R.A., Weyand, C.M., Boyd, S.D., Goronzy, J.J., 2014. Diversity and clonal selection in the human T-cell repertoire. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111, 13139–13144. <https://doi.org/10.1073/pnas.1409155111>
- Radue, E.-W., O'Connor, P., Polman, C.H., Hohlfeld, R., Calabresi, P., Selmaj, K., Mueller-Lenke, N., Agoropoulou, C., Holdbrook, F., Vera, A. de, Zhang-Auberson, L., Francis, G., Burtin, P., Kappos, L., Group, for the F.R.E.E. of D.O.T. in M.S. (FREEDOMS) S., 2012. Impact of Fingolimod Therapy on Magnetic Resonance Imaging Outcomes in Patients With Multiple Sclerosis. *Arch. Neurol.* 69, 1259–1269. <https://doi.org/10.1001/archneurol.2012.1051>
- Ramagopalan, S.V., Dobson, R., Meier, U.C., Giovannoni, G., 2010. Multiple sclerosis: risk factors, prodromes, and potential causal pathways. *Lancet Neurol.* 9, 727–739. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(10\)70094-6](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(10)70094-6)
- Raphael, I., Nalawade, S., Eagar, T.N., Forsthuber, T.G., 2015. T cell subsets and their signature cytokines in autoimmune and inflammatory diseases. *Cytokine, Cytokines in immune pathogenesis and therapy* 74, 5–17. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2014.09.011>
- Robins, H.S., Srivastava, S.K., Campregher, P.V., Turtle, C.J., Andriesen, J., Riddell, S.R., Carlson, C.S., Warren, E.H., 2010. Overlap and effective size of the human CD8+ T cell receptor repertoire. *Sci. Transl. Med.* 2, 47ra64. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3001442>
- Sadovnick, A.D., Armstrong, H., Rice, G.P.A., Bulman, D., Hashimoto, L., Party, D.W., Hashimoto, S.A., Warren, S., Hader, W., Murrar, T.J., Seland, T.P., Metz, L., Bell, R., Duquette, P., Gray, T., Nelson, R., Weinshenkar, B., Brunt, D., Ebers, G.C., 1993. A population-based study of multiple sclerosis in twins: Update. *Ann. Neurol.* 33, 281–285. <https://doi.org/10.1002/ana.410330309>
- Sallusto, F., Geginat, J., Lanzavecchia, A., 2004. Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance-KEIN access. *Annu. Rev. Immunol.* 22, 745–763. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.22.012703.104702>
- Sallusto, F., Lenig, D., Förster, R., Lipp, M., Lanzavecchia, A., 1999. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* 401, 708. <https://doi.org/10.1038/44385>
- Salou, M., Garcia, A., Michel, L., Gainche-Salmon, A., Loussouarn, D., Nicol, B., Guillot, F., Hulin, P., Nedellec, S., Baron, D., Ramstein, G., Soullillou, J.-P., Brouard, S., Nicot, A.B., Degauque, N., Laplaud, D.A., 2015. Expanded CD8 T-cell sharing between periphery and CNS in multiple sclerosis. *Ann. Clin. Transl. Neurol.* 2, 609–622. <https://doi.org/10.1002/acn3.199>
- Sanchez, T., Skoura, A., Wu, M.T., Casserly, B., Harrington, E.O., Hla, T., 2007. Induction of vascular permeability by the sphingosine-1-phosphate receptor-2 (S1P2R) and its downstream effectors ROCK and PTEN. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 27, 1312–1318. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.107.143735>

- Scheffler, A., 2020. Next-Generation Sequencing in der Neurologie: Etablierung einer Methode zur Immunrepertoireanalyse von T- und B-Lymphozyten und Anwendung der T-Zell-Rezeptorrepertoireanalyse bei Patienten mit Multipler Sklerose unter immunmodulatorischer Behandlung 119.
- Shugay, M., Bagaev, D.V., Turchaninova, M.A., Bolotin, D.A., Britanova, O.V., Putintseva, E.V., Pogorelyy, M.V., Nazarov, V.I., Zvyagin, I.V., Kirgizova, V.I., Kirgizov, K.I., Skorobogatova, E.V., Chudakov, D.M., 2015. VDJtools: Unifying Post-analysis of T Cell Receptor Repertoires. *PLOS Comput. Biol.* 11, e1004503. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1004503>
- Singleton, P.A., Dudek, S.M., Ma, S.-F., Garcia, J.G.N., 2006. Transactivation of sphingosine 1-phosphate receptors is essential for vascular barrier regulation. Novel role for hyaluronan and CD44 receptor family. *J. Biol. Chem.* 281, 34381–34393. <https://doi.org/10.1074/jbc.M603680200>
- Skulina, C., Schmidt, S., Dornmair, K., Babbe, H., Roers, A., Rajewsky, K., Wekerle, H., Hohlfeld, R., Goebels, N., 2004. Multiple sclerosis: brain-infiltrating CD8+ T cells persist as clonal expansions in the cerebrospinal fluid and blood. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 2428–2433.
- Song, Z.-Y., Yamasaki, R., Kawano, Y., Sato, S., Masaki, K., Yoshimura, S., Matsuse, D., Murai, H., Matsushita, T., Kira, J., 2015. Peripheral Blood T Cell Dynamics Predict Relapse in Multiple Sclerosis Patients on Fingolimod. *PLoS ONE* 10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0124923>
- Spain, R.I., Cameron, M.H., Bourdette, D., 2009. Recent developments in multiple sclerosis therapeutics. *BMC Med.* 7, 74. <https://doi.org/10.1186/1741-7015-7-74>
- Swain, S.L., McKinstry, K.K., Strutt, T.M., 2012. Expanding roles for CD4+ T cells in immunity to viruses. *Nat. Rev. Immunol.* 12, 136–148. <https://doi.org/10.1038/nri3152>
- Teniente-Serra, A., Hervás, J.V., Quirant-Sánchez, B., Mansilla, M.J., Grau-López, L., Ramo-Tello, C., Martínez-Cáceres, E.M., 2016. Baseline Differences in Minor Lymphocyte Subpopulations may Predict Response to Fingolimod in Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis Patients. *CNS Neurosci. Ther.* 22, 584–592. <https://doi.org/10.1111/cns.12548>
- Thompson, A.J., Banwell, B.L., Barkhof, F., Carroll, W.M., Coetzee, T., Comi, G., Correale, J., Fazekas, F., Filippi, M., Freedman, M.S., Fujihara, K., Galetta, S.L., Hartung, H.P., Kappos, L., Lublin, F.D., Marrie, R.A., Miller, A.E., Miller, D.H., Montalban, X., Mowry, E.M., Sorensen, P.S., Tintoré, M., Traboulsee, A.L., Trojano, M., Uitdehaag, B.M.J., Vukusic, S., Waubant, E., Weinshenker, B.G., Reingold, S.C., Cohen, J.A., 2018. Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria. *Lancet Neurol.* 17, 162–173. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(17\)30470-2](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(17)30470-2)
- Tracy, S.I., Kakalacheva, K., Lünemann, J.D., Luzuriaga, K., Middeldorp, J., Thorley-Lawson, D.A., 2012. Persistence of Epstein-Barr Virus in Self-Reactive Memory B Cells. *J. Virol.* 86, 12330–12340. <https://doi.org/10.1128/JVI.01699-12>

- Tuohy, O., Costelloe, L., Hill-Cawthorne, G., Bjornson, I., Harding, K., Robertson, N., May, K., Button, T., Azzopardi, L., Kousin-Ezewu, O., Fahey, M.T., Jones, J., Compston, D.A.S., Coles, A., 2015. Alemtuzumab treatment of multiple sclerosis: long-term safety and efficacy. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 86, 208–215. <https://doi.org/10.1136/jnnp-2014-307721>
- van Heijst, J.W.J., Ceberio, I., Lipuma, L.B., Samilo, D.W., Wasilewski, G.D., Gonzales, A.M.R., Nieves, J.L., van den Brink, M.R.M., Perales, M.A., Pamer, E.G., 2013. Quantitative assessment of T-cell repertoire recovery after hematopoietic stem cell transplantation. *Nat. Med.* 19, 372–377. <https://doi.org/10.1038/nm.3100>
- Venturi, V., Price, D.A., Douek, D.C., Davenport, M.P., 2008. The molecular basis for public T-cell responses? *Nat. Rev. Immunol.* 8, 231–238. <https://doi.org/10.1038/nri2260>
- Venturi, V., Quigley, M.F., Greenaway, H.Y., Ng, P.C., Ende, Z.S., McIntosh, T., Asher, T.E., Almeida, J.R., Levy, S., Price, D.A., Davenport, M.P., Douek, D.C., 2011. A Mechanism for TCR Sharing between T Cell Subsets and Individuals Revealed by Pyrosequencing. *J. Immunol.* 186, 4285. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1003898>
- Vollmers, C., Sit, R.V., Weinstein, J.A., Dekker, C.L., Quake, S.R., 2013a. Genetic measurement of memory B-cell recall using antibody repertoire sequencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 13463–13468. <https://doi.org/10.1073/pnas.1312146110>
- Vollmers, C., Sit, R.V., Weinstein, J.A., Dekker, C.L., Quake, S.R., 2013b. Genetic measurement of memory B-cell recall using antibody repertoire sequencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 13463–13468. <https://doi.org/10.1073/pnas.1312146110>
- von Büdingen, H.-C., Kuo, T.C., Sirota, M., van Belle, C.J., Apeltsin, L., Glanville, J., Cree, B.A., Gourraud, P.-A., Schwartzburg, A., Huerta, G., Telman, D., Sundar, P.D., Casey, T., Cox, D.R., Hauser, S.L., 2012. B cell exchange across the blood-brain barrier in multiple sclerosis. *J. Clin. Invest.* 122, 4533–4543. <https://doi.org/10.1172/JCI63842>
- Walton, C., King, R., Rechtman, L., Kaye, W., Leray, E., Marrie, R.A., Robertson, N., La Rocca, N., Uitdehaag, B., van der Mei, I., Wallin, M., Helme, A., Angood Napier, C., Rijke, N., Baneke, P., 2020. Rising prevalence of multiple sclerosis worldwide: Insights from the Atlas of MS, third edition. *Mult. Scler. Houndmills Basingstoke Engl.* 26, 1816–1821. <https://doi.org/10.1177/1352458520970841>
- Warren, R.L., Freeman, J.D., Zeng, T., Choe, G., Munro, S., Moore, R., Webb, J.R., Holt, R.A., 2011. Exhaustive T-cell repertoire sequencing of human peripheral blood samples reveals signatures of antigen selection and a directly measured repertoire size of at least 1 million clonotypes. *Genome Res.* 21, 790–797. <https://doi.org/10.1101/gr.115428.110>
- Weinshenker, B.G., 1998. The natural history of multiple sclerosis: update 1998. *Semin. Neurol.* 18, 301–307. <https://doi.org/10.1055/s-2008-1040881>

- Woodsworth, D.J., Castellarin, M., Holt, R.A., 2013. Sequence analysis of T-cell repertoires in health and disease. *Genome Med.* 5, 98. <https://doi.org/10.1186/gm502>
- Worbs, T., Mempel, T.R., Bölter, J., von Andrian, U.H., Förster, R., 2007. CCR7 ligands stimulate the intranodal motility of T lymphocytes in vivo. *J. Exp. Med.* 204, 489–495. <https://doi.org/10.1084/jem.20061706>
- Zindler, E., Zipp, F., 2010. Neuronal injury in chronic CNS inflammation. *Best Pract. Res. Clin. Anaesthesiol., The State of Neuroprotection* 24, 551–562. <https://doi.org/10.1016/j.bpa.2010.11.001>

# Danksagung

Ich danke der Arbeitsgruppe um Universitätsprofessor Dr. med. Norbert Goebels, dabei besonders Sumanta Barman, Armin Scheffler und Anna Coordt für die gute Zusammenarbeit.

Außerdem danke ich meiner Familie, darunter meinen Eltern, meinem Bruder und Johannes. Danke, für Eure unendliche Unterstützung. Ihr seid meine Heimat.