

Aus der Klinik für Neurologie

Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Sven Meuth

**Effekte von Fingolimod (Gilenya®) auf CD 8+
T-Lymphozyten und ihre CCR7+ und CCR7-
Subpopulationen im peripheren Blut von
Patienten mit schubförmig verlaufender
Multipler Sklerose**

Dissertation

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

vorgelegt von

Anna Coordt

2024

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

gez.:

Dekan/in: Prof. Dr. Nikolaj Klöcker

Erstgutacher: Prof. Dr. Norbert Goebels

Zweitgutacher: Prof. Dr. Amin Polzin

Widmung

Meinen Großeltern gewidmet, deren hohes Maß an Entbehrung und Aufbauwille in einem zerstörten Nachkriegsdeutschland ohne Träume meiner Generation ein Leben in Frieden, Forschung und Wissenschaft ermöglicht hat. In diesen friedlosen Zeiten sind wir euch unendlich dankbar.

Zusammenfassung

Die Multiple Sklerose (MS) ist eine vorrangig chronisch inflammatorisch demyelinisierende Erkrankung des zentralen Nervensystems (ZNS), deren zentrales pathophysiologisches Model auf ZNS-infiltrierenden, wahrscheinlich antigen-getriggerten autoreaktiven Immunzellen basiert, ohne dass dieses Antigen bisher identifiziert werden konnte. In den aktiven inflammatorischen ZNS-Läsionen finden sich vermehrt zytotoxische CD8⁺ T-Lymphozyten, deren ZNS-Migration aus den sekundären Lymphorganen durch Therapie mit dem Immunmodulator Fingolimod (FTY720/Gilenya®) bei schubförmig remittierenden MS-Patienten (RRMS) verhindert werden soll. In dieser Arbeit wurden die quantitativen (n=3) und qualitativen (n=2) Veränderungen des CD8⁺ T-Zell-Rezeptor-(TZR)- β -Repertoires der naiven T-Zellen T_{NC}, zentralen Gedächtnis-T-Zellen T_{CM} sowie der (terminalen)Effektor-Gedächtnis-T-Zellen T_{EM/EMRA} in RRMS-Patienten im longitudinalen Verlauf von zwölf Monaten unter Fingolimodtherapie im Vergleich zu einer gesunden Kontrolle und einem untherapierten primär progredienten MS-Patienten (PPMS) im Zehnmonatsverlauf aus peripherem Blut untersucht. Die Arbeit diente der Etablierung eines *Next Generation Sequencing (NGS)-Workflows* auf Basis der Verwendung des *Illumina® Mlseq*, der Programme *MiXCR*, *VDJtools* und der Datenbank *VDJdb*. Quantitative Analysen mittels Durchflusszytometrie bestätigten vorherige Veröffentlichungen und zeigten eine CD3⁺ T-Zellreduktion, einen *Shift* zu Gunsten der CD8⁺ T-Zellen sowie innerhalb dieser Population ein *Shift* zu Gunsten der T_{EM/EMRA} unter Fingolimodtherapie. Die V-J-Rekombinationen des TZR- β nahmen ab und es zeigte sich analog zu vorherigen Arbeiten in MS-Patienten eine erhöhte Frequenz des Segments *TRBV5.1* in T_{NC} und T_{CM}. Fingolimod reduzierte die Diversität in allen T-Zellpopulationen und es ergaben sich Hinweise auf einen reduzierenden Effekt auf die monoklonale Expansion und Persistenz der im Gegensatz zu den T_{NC} und T_{CM} ausgeprägt mono- und oligoklonalen persistenten T_{EM/EMRA}. Es konnten keine relevanten übereinstimmenden dominanten Klone zwischen den MS-Patienten identifiziert werden. Dominante T-Zell-Klone aller T_{NC}, T_{CM} und T_{EM/EMRA} konnten führend den Epitopen des Cytomegalievirus, des Epstein-Barr-Virus und des Influenza Virus A zugeordnet werden. Auffällig war ein dominant monoklonal stark expandierter Klon mit Persistenz in der Probe des PPMS-Patienten, der für das Human Immunodeficiency Virus Type 1-Epitop und möglicherweise im Sinne einer Kreuzreaktivität gegen humane endogene Retroviren kodierte. Eine valide Interpretation der *NGS*-basierten Daten aufgrund möglicher Sequenzqualitätsunterschiede trotz etablierter Filter ist herausfordernd, sodass TZR- β -Repertoire-Analysen quantitativ und qualitativ variieren. Ein Studiendesign mit größeren Kohorten sowie klinischer und bildmorphologischer Verlaufskorrelation könnten unter Einschluss von Statistik mit dem hier etablierten *NGS-Workflow* signifikante Ergebnisse liefern, um diagnostische, prognostische oder behandlungsrelevante Biomarker der MS zu ermitteln.

Abstract

Multiple sclerosis (MS) is a chronic inflammatory demyelinating disease of the central nervous system (CNS) that is of likely autoimmune etiology, with cytotoxic CD8⁺ T-lymphocytes often identified at sites of active inflammation. The immunomodulating drug Fingolimod (FTY720/Gilenya®) was designed to reduce the migration of damaging CD8⁺ T cells into the CNS in relapse-remitting-MS-patients (RRMS) by retaining T-cells in the secondary lymphoid tissue. In this work, changes in the quantity (n=3) and quality (n=2) of CD8⁺ T-cell-receptor -(TCR)-β-Repertoires (naive T-cells T_{NC}, central memory T-cells T_{CM} and (terminal)effector memory T-cells T_{EM/EMRA}) in the peripheral blood of RRMS-patients treated with fingolimod were analyzed over a period of one year and compared to one healthy donor and one untreated primary progressive MS-patient (PPMS) over a course of ten months. This work established a *Next Generation Sequencing (NGS)-workflow* based on usage of *Illumina® MiSeq*, the software *MiXCR*, *VDJtools* and the data base *VDJdb*. Quantitative analysis through *Fluorescence Activated Cytometry (FACS)* confirmed earlier publications by showing a general reduction in the CD3⁺ T-cell population as well as a shift towards CD8⁺ T-cells and T_{EM/EMRA} under therapy with Fingolimod. Furthermore, V-J-Recombination in TCR-β was reduced and MS-patients showed a higher frequency of *TRBV5.1* compared to the healthy donor. This finding has previously been genetically associated with MS. Fingolimod reduced diversity in all T-cell populations and a fingolimod-dependent reduction of monoclonal expansion and persistence of rather mono- and oligoclonal persistent T_{EM/EMRA} instead of T_{NC} and T_{CM} was observed. There were no overlapping dominant clones of any relevance in MS-patients. Dominant T-cell-clones of all T_{NC}, T_{CM} and T_{EM/EMRA} populations corresponded to epitopes of cytomegalovirus, Epstein-Barr virus and influenza virus A. Strikingly, one strongly dominant monoclonally expanded clone in the blood of the untreated PPMS-patient matched the epitope of human immunodeficiency virus type I which might be based on cross reactivity towards human endogenous retrovirus. Validation of NGS-derived data is challenging due to possible artefacts in amplification and variable sequencing depths; to address this, filtering has recently been implemented. Consequentially, TCR-β-repertoire-analysis varies in terms of quantity and quality. A better study design including more patients and controls as well as correlation with clinical and imaging data would improve the reliability of data from this *NGS-workflow* with regard to diagnostic, prognostic and therapy-stratifying biomarkers in MS.

Abkürzungsverzeichnis

bp	Basenpaar
B-Zelle	Knochenmarkszellen, <i>engl. bone marrow cells</i>
CCL	Chemokin Ligand
CCR-7	C-C-Chemokin Rezeptor Typ 7
CD	Immunophänotypisches Oberflächenmerkmal, <i>engl. cluster of differentiation</i>
CMV	Zytomegalievirus, <i>engl. Cytomegalievirus</i>
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure, <i>engl. complementary DNA</i>
CDR	Komplementaritätsbestimmende Region, <i>engl. complementarity determining region</i>
CY7	Cyanin 7
DAPI	4', 6-Diamidin-2-phenylindol
DENV	Dengue Virus
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMTs	Krankheits-modifizierende Therapien, <i>engl. disease modifying therapies</i>
dNTPs	Desoxy Nukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol

EAE	Experimentelles-autoimmunes-Enzephalomyelitis-Modell, <i>engl. experimental autoimmune encephalomyelitis</i>
EBER	Epstein-Barr-Virus-kodierende kleine Ribonukleinsäuren, <i>engl. Epstein-Barr-virus-encoding small RNAs</i>
EBV	Epstein-Barr-Virus
EBNA 1	Epstein-Barr-Virus nukleäres Antigen 1
EDSS	Behinderungsskala, <i>engl. Expanded Disability Status Scale</i>
EDTA	Edetinsäure, <i>engl. ethylene diamine tetraacetic acid</i>
EMA	Europäische Arzneimittelagentur
FACS	Durchflusszytometrie, <i>engl. Fluorescence Activated Cell Sorting</i>
FBS	Fetal bovine serum
FDA	U.S. Food and Drug Administration
FITC	Fluorescein isothiocyanate
FTY720	Fingolimod
gDNA	genomische Desoxyribonukleinsäure
GlialCAM	<i>engl. glial cell adhesion molecule</i>
HCV	Hepatitis Virus C
HERV	Humaner endogener Retrovirus
HHV-6	Humaner Herpesvirus -6
HIV-1	Humanes Immundefizienz Virus Typ I
HLA	Humanes Leukozyten Antigen

HTS	<i>engl. High-Throughput-Sequencing</i>
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
IRT	Immunrekonstituierende Therapie
JCV	John Cunningham Virus
KIS	Klinisch isoliertes Syndrom
LMP 1	„Ruhendes“ Membran Protein 1, <i>engl. latent membrane protein 1</i>
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex, <i>engl. major histocompatibility complex</i>
miRNA	mikroRNA
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure, <i>engl. messenger ribonucleic acid</i>
MRT	Magnetresonanztomografie
MS	Multiple Sklerose
NADPH	Nikotinamid Adenin Dinucleotid Phosphat
NGS	Sequenzierverfahren der nächsten Generation, <i>engl. Next Generation Sequencing</i>
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
PBMC	Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes, <i>engl. peripheral blood mononuclear cells</i>
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung, <i>engl. phosphate buffered saline</i>

PCR	Polymerase Kettenreaktion, <i>engl. polymerase chain reaction</i>
PE	Phycoerythrin
PML	Progressive multifokale Leukenzephalopathie
PPMS	Primär progrediente Multiple Sklerose
PRMS	Progressive schubförmige Multiple Sklerose, <i>engl. Progressive-relapsing multiple sclerosis</i>
RIS	Radiologisch isoliertes Syndrom
RNA	Ribonukleinsäuren, <i>engl. ribonucleic acids</i>
RRMS	Schubförmig remittierende Multiple Sklerose, <i>engl. relapsing-remitting multiple sclerosis</i>
RTE	Junge naive T-Zellen, die den Thymus gerade verlassen haben, <i>engl. recent thymic emigrants</i>
S1P	Sphingosin-1-Phosphat
S1P-R	Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptor
SARS-CoV-2	Schweres akutes respiratorisches Syndrom, <i>engl. severe acute respiratory syndrome coronavirus type 2</i>
SPMS	Sekundär progrediente Multiple Sklerose
TBE	Tris-Borat-EDTA
TCR	T-Zell-Rezeptor, <i>engl. T-cell-receptor</i>
TCR-β	Beta-Kette des T-Zell-Rezeptor
TCM	Zentrale Gedächtnis-T-Zellen, <i>engl. T-cell central memory</i>

TEM	Effektorgedächtniszellen, <i>engl. T-cell effector memory</i>
TEMRA	terminale Effektorgedächtniszellen, <i>engl. terminal T-cell effector memory cell</i>
TNC	naive T-Zellen, <i>engl. naive T-cells</i>
T-Zelle	Thymus Zelle, <i>engl. T-cell</i>
TZR	T-Zell-Rezeptor
UMI	<i>engl. unique molecular identifiers</i>
VZV	Varizella-Zoster-Virus, <i>engl. VCV</i>
YFV	Gelbfieber Virus, <i>engl. Yellow Fever Virus</i>
ZNS	Zentrales Nervensystem

Einheiten:

° C	Grad Celsius
%	Prozent
g	(Erd-/Fall-)Beschleunigung
ml	Milliliter
min	Minuten
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
rpm	Umdrehung pro Minute, <i>engl. rounds per minute</i>
sek	Sekunden
V	Volt

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung.....	1
1.1 MULTIPLE SKLEROSE	1
1.1.1 Definition.....	1
1.1.2 Epidemiologie.....	2
1.1.3 Ätiologie	3
1.1.4 Pathophysiologie	7
1.1.5 Klinik und Diagnostik.....	10
1.1.6 Therapie.....	13
1.2 FINGOLIMOD / GILENYA®	15
1.2.1 Eigenschaften	15
1.2.2 Wirkung	16
1.2.3 Nebenwirkung.....	17
1.2.4 Immunsystem im Kontext der Fingolimodtherapie.....	18
1.3 FRAGESTELLUNG UND ZIELSETZUNG DER DISSERTATIONSSCHRIFT.....	23
2 Materialien und Methoden	24
2.1 ETHIKVOTUM	24
2.2 STUDIENDESIGN.....	24
2.3 PATIENTENKOLLEKTIV UND KONTROLLGRUPPE	25
2.4 MATERIALIEN.....	26
2.4.1 Geräte	26
2.4.2 Materialien zum einmaligen Gebrauch.....	28
2.4.3 Produkte und Kits	29
2.5 METHODEN	35
2.5.1 Übersicht	35
2.5.2 PBMC-Isolation.....	36
2.5.3 Durchflusszytometrie/ Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS)	38
2.5.4 Isolation der Boten-Ribonukleinsäure (messenger ribonucleic acid, mRNA).....	40
2.5.5 cDNA-Synthese	43
2.5.6 Etablierung eines PCR-Stufenplans zur Generierung einer cDNA-basierten T-Zell-Rezeptor-Bibliothek (TZR-library).....	46
2.5.7 Quantitätsanalyse der DNA mittels Qubit 2.0 und Vorbereitung der Gen- Library	55
2.5.8 Sequenzierung mit Next Generation Sequencing	56
2.5.9 Auswertung der Rohdaten	57
3 Ergebnisse und Datenanalyse	57
3.1 DURCHFLUSSZYTOMETRIE DER T-ZELLEN.....	57
3.1.1 Totale Zellzahlen, CD3+ T-Zellen, CD4+ T-Zellen und CD8+ T-Zellen.....	57
3.1.2 CCR+ und CCR7- Subpopulationen der CD8+ T-Zellen	63
3.2 NEXT GENERATION SEQUENCING: ROHDATEN	68
3.3 TZR-B-REKOMBINATION DER V- UND J-SEGMENTE DER CD8+ T-ZELLEN	72
3.3.1 CD8+CCR7+ Subpopulation	72
3.3.2 CD8+CCR7- Subpopulation	80

3.4 DIVERSITÄT UND KLONALITÄT DES TZR-B-REPERTOIRES DER CD8+ T-ZELLEN.....	88
3.4.1 CD8+CCR7+ Subpopulation	89
3.4.2 CD8+CCR7- Subpopulation	94
3.5 LONGITUDINALE PERSISTENZ DES CD8+ TZR-B-REPERTOIRES	99
3.5.1 Longitudinale Persistenz und Mono-/Oligoklonalitätsanalyse der zehn häufigsten CDR3-Sequenzen (Klone)	99
3.5.2 Allgemeine longitudinale Persistenz im Zwölfmonatsverlauf unter Therapie mit Fingolimod	111
3.6 IDENTIFIZIERUNG GEMEINSAMER INTERINDIVIDUELLER KLONE	121
3.6.1 CD8+CCR7+ Subpopulation	121
3.6.2 CD8+CCR7- Subpopulation	121
3.7 IDENTIFIZIERUNG DER EPITOP-SPEZIES	126
3.7.1 CD8+CCR7+ Subpopulation	126
3.7.2 CD8+CCR7- Subpopulation	129
4 Diskussion	131
4.1 QUANTITATIVER KONTEXT VON CD8+ T-LYMPHOZYTEN UND FINGOLIMOD	131
4.2. QUALITATIVER KONTEXT DES CD8+ TZR-β-REPERTOIRES UND FINGOLIMOD	136
4.2.1 Next Generation Sequencing: Ein allgemeines Interpretationsproblem für die Zukunft	136
4.2.2 V-J-Rekombinationsraster: Longitudinale Rekombinationsreduktion unter Fingolimodtherapie in T _{NC} , T _{CM} und T _{EM/EMRA}	138
4.2.3 Diversität des CD8+ TZR-β-Repertoires: Höhere Diversität in T _{NC} und T _{CM} als in T _{EM} , Fingolimodtherapie reduziert Diversität	139
4.2.4 Klonalität und longitudinale Persistenz des CD8+ TZR-β-Repertoires: Hinweise für dominante monoklonal expandierte T _{EM/EMRA} mit starker Persistenz	141
4.2.5 Private vs. öffentliche Klone: > 99 % private Klone in MS-Patienten	144
4.2.6 Epitop-Spezies: CMV-/EBV-Epitope führend sowohl in MS-Patienten als auch in gesunder Kontrolle, dominantes HIV-Epitop im untherapierten MS-Patienten	145
4.3 GRENZEN DER METHODIK.....	148
5 Schlussfolgerung	149
6 Interessenkonflikt	151
7 Literaturverzeichnis	153

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Vereinfachte schematische Darstellung zur Einteilung der CD8+ T-Zellen in ihre Subpopulationen*.	22
Abb. 2: Überblick der experimentellen Arbeitsschritte bis zur bioinformatischen Datenprozessierung.	36
Abb. 3: Phasenseparation im Eppendorf-Gefäß nach Hinzufügen einer separierenden Ficoll/Biocoll-Lösung zum Ausgangsbiomaterial (Blut).	37
Abb. 4: Durchflusszytometrie (FACS) anhand von Oberflächenmarkern (CD) von T-Lymphozyten im Dotplot auf logarhythmischer Skala am Beispiel der Kontrolle K_g (gesunder Proband).	40
Abb. 5: Phasenseparation im Eppendorf-Gefäß nach Hinzufügen von Chloroform während der Isolation der Ribonukleinsäure (RNA).	42
Abb. 6: Schematische Darstellung der cDNA-Synthese mittels SMART®er RACE 5'/3'-Kit von Clontec™ gemäß Herstellerprotokoll.	45
Abb. 7: PCR 1 Programm: Integration der ersten Illumina® Adapter Sequenz.	47
Abb. 8: PCR 2 Programm: Integration der zweiten Illumina® Adapter Sequenz inklusive Barcode.	49
Abb. 9: Gelelektrophorese des PCR 2 Produktes am Beispiel Patient C (PC).	51
Abb. 10: Schematische Darstellung der Präparation einer cDNA basierten TCR-Library.	52
Abb. 11: Darstellung der geschnittenen Gelelektrophorese des PCR 2 Produktes am Beispiel Patient C.	54
Abb. 12: Relative Anteilsentwicklung der CD3+, CD4+ und CD8+ T-Zellpopulationen gemessen an der Gesamtpopulation (totale Zellzahl) von Patient B (P_B), Patient C (P_C) und Patient D (P_D) im Zeitraum vor Therapie (m_0) und zwölf Monate nach Therapie mit Fingolimod (m_{12}) sowie der unbehandelten Kontrollen (gesunder Proband K_g und MS-Patient untherapiert MS_u^*) im Zwölfmonatsverlauf (m_{12}). * <i>Zehnmonatsverlauf m_{10} bei MS_u</i> .	62

Abb. 13: Entwicklung des CD4+/CD8+ Quotienten unter Therapie mit Fingolimod im Zeitraum von zwölf Monaten (m_0 vor Therapie, m_{12} zwölf Monate nach Therapie).....	63
Abb. 14: Relative Anteilsentwicklung der CCR7+ und CCR7- CD8+ T-Zellen gemessen an der gesamten CD8+ Zellpopulation von Patient C (P_C) und Patient D (P_D) im Zeitraum vor Therapie (m_0) und zwölf Monate nach Therapie mit Fingolimod (m_{12}) sowie der unbehandelten Kontrollen (gesunder Proband K_g und MS-Patient untherapiert MS_u^*) im Zehn-/Zwölfmonatsverlauf ($*m_{10/12}$).....	67
Abb. 15: Entwicklung des CD8+CCR7+/CD8+CCR7- Quotienten unter Therapie mit Fingolimod im Zeitraum von zwölf Monaten (m_0 vor Therapie, m_{12} zwölf Monate nach Therapie).....	68
Abb. 16: Grafische Darstellung der Frequenz (Ordinate, y-Achse) einzelner TZR- β -Rekombinationen von V-Segmenten (Abszisse, x-Achse) und J-Segmenten (Applikate, z-Achse) innerhalb der CD8+CCR7+ T-Zell-Subpopulation im Verlauf von zwölf Monaten vor und nach Therapie mit Fingolimod (Zeitpunkt m_0 und m_{12}) von Patient C (P_C) und Patient D (P_D) (hier m_0).	76
Abb. 17: Grafische Darstellung der Frequenz (Ordinate, y-Achse) einzelner TZR- β -Rekombinationen von V-Segmenten (Abszisse, x-Achse) und J-Segmenten (Applikate, z-Achse) innerhalb der CD8+CCR7+ T-Zell- Subpopulation im Verlauf von zwölf Monaten nach Therapie mit Fingolimod (Zeitpunkt m_{12}) von Patient D (P_D), sowie der Zwölfmonatsverlauf der gesunden Kontrolle (K_g) (m_0 und m_{12}).	78
Abb. 18: Grafische Darstellung der Frequenz (Ordinate, y-Achse) einzelner TZR- β -Rekombinationen von V-Segmenten (Abszisse, x-Achse) und J-Segmenten (Applikate, z-Achse) innerhalb der CD8+CCR7+ T-Zell-Subpopulation im Verlauf von zehn Monaten (Zeitpunkt m_0 und m_{10}) des untherapierten MS-Patienten (MS_u).	79
Abb. 19: Grafische Darstellung der Frequenz (Ordinate, y-Achse) einzelner TZR- β -Rekombinationen von V-Segmenten (Abszisse, x-Achse) und J-Segmenten (Applikate, z-Achse) innerhalb der CD8+CCR7- T-Zell-Subpopulation im Verlauf von zwölf Monaten vor und nach Therapie mit Fingolimod (Zeitpunkt m_0 und m_{12}) von Patient C (P_C) und Patient D (P_D) (hier m_0).	84

- Abb. 20: Grafische Darstellung der Frequenz (Ordinate, y-Achse) einzelner TZR- β -Rekombinationen von V-Segmenten (Abszisse, x-Achse) und J-Segmenten (Applikate, z-Achse) innerhalb der CD8+CCR7- T-Zell-Subpopulation im Verlauf von zwölf Monaten nach Therapie mit Fingolimod (Zeitpunkt m_{12}) von Patient D (P_D), sowie der Zwölfmonatsverlauf der gesunden Kontrolle (K_g) (m_0 und m_{12}). 86
- Abb. 21: Grafische Darstellung der Frequenz (Ordinate, y-Achse) einzelner TZR- β -Rekombinationen von V-Segmenten (Abszisse, x-Achse) und J-Segmenten (Applikate, z-Achse) innerhalb der CD8+CCR7- T-Zell-Subpopulation im Verlauf von zehn Monaten (Zeitpunkt m_0 und m_{10}) des untherapierten MS-Patienten (MS_u). 87
- Abb. 22 a.-b.: Donut Diagramm der Diversität (1+2; 3+) und Klonalität (Quantile Q1-5) des CD8+CCR7+ TZR- β -Repertoires mit Auflistung der prozentualen Anteile der Singletons und Doubletons (1+2), der ≥ 3 mal auftretenden CDR3-Sequenzen (3+), der Quantile Q1-5 und der zehn häufigsten* CDR3-Sequenzen von Patient C P_C (a.) und Patient D P_D (b.) im Verlauf von zwölf Monaten unter Therapie mit Fingolimod (Zeitpunkt m_0 und m_{12}). 91
- Abb. 23 a.-b.: Donut Diagramm der Diversität (1+2; 3+) und Klonalität (Quantile Q1-5) des CD8+CCR7+ TZR- β -Repertoires mit Auflistung der prozentualen Anteile der Singletons und Doubletons (1+2), der ≥ 3 mal auftretenden CDR3 Sequenzen (3+), der Quantile Q1-5 und der zehn häufigsten CDR3-Sequenzen der gesunden Kontrolle K_g (a.) und des untherapierten MS-Patienten MS_u^* (b.) im Zeitraum von zwölf/zehn Monaten (m_0 und m_{12} und $*m_{10}$). 93
- Abb. 24 a.-b.: Donut Diagramm der Diversität (1+2; 3+) und Klonalität (Quantile Q1-5) des CD8+CCR7- TZR- β -Repertoires mit Auflistung der prozentualen Anteile der Singletons und Doubletons (1+2), der ≥ 3 mal auftretenden CDR3 Sequenzen (3+), der Quantile Q1-5 und der zehn häufigsten CDR3 Sequenzen von Patient C P_C (a.) und Patient D P_D (b.) im Verlauf von zwölf Monaten unter Therapie mit Fingolimod (Zeitpunkt m_0 und m_{12}). 96
- Abb. 25 a.-b.: Donut Diagramm der Diversität (1+2; 3+) und Klonalität (Quantile Q1-5) des CD8+CCR7- TZR- β -Repertoires mit Auflistung der prozentualen Anteile der Singletons und Doubletons (1+2), der ≥ 3 mal auftretenden CDR3 Sequenzen (3+), der Quantile Q1-5 und der zehn häufigsten CDR3 Sequenzen der gesunden Kontrolle K_g (a.) und des untherapierten MS-Patienten MS_u^* (b.) im Zeitraum von zwölf/zehn Monaten (m_0 und m_{12} und $*m_{10}$). 98
- Abb. 26: Overlap Analyse der CD8+CCR7+ T-Zellen von Patient C mit nahezu keiner Persistenz (<1 %) des CD8+CCR7+ TZR- β -Repertoires unter Fingolimodtherapie. 112

Abb. 27: Overlap Analyse der CD8+CCR7+ T-Zellen von Patient D mit einer Persistenz des CD8+CCR7+ TZR- β -Repertoires von <10 % unter Fingolimodtherapie.	113
Abb. 28: Overlap Analyse der CD8+CCR7+ T-Zellen der gesunden Kontrolle mit einer Persistenz des CD8+CCR7+ TZR- β -Repertoires von <1% im Zwölfmonatsverlauf.....	114
Abb. 29: Overlap Analyse der CD8+CCR7+ T-Zellen des MS-Patienten ohne Therapie mit einer Persistenz des CD8+CCR7+ TZR- β -Repertoires von <1 % im Zehnmonatsverlauf.	115
Abb. 30: Overlap Analyse der CD8+CCR7- T-Zellen von Patient C mit einer Persistenz des CD8+CCR7- TZR- β -Repertoires von \pm 40 % unter Fingolimodtherapie.	117
Abb. 31: Overlap Analyse der CD8+CCR7- T-Zellen von Patient D mit einer Persistenz des CD8+CCR7- TZR- β -Repertoires von \pm 70 % unter Fingolimodtherapie.	118
Abb. 32: Overlap Analyse der CD8+CCR7- T-Zellen der gesunden Kontrolle mit einer Persistenz des CD8+CCR7- TZR- β -Repertoires von 65,7 % im Zwölfmonatsverlauf.....	119
Abb. 33: Overlap Analyse der CD8+CCR7+ T-Zellen des MS-Patienten ohne Therapie mit einer Persistenz des CD8+CCR7+ TZR- β -Repertoires von 93,9 % im Zehnmonatsverlauf. ...	120
Abb. 34: Venn-Diagramm zur Darstellung privater (nicht geteilter) und öffentlicher (geteilter) Klone des TZR- β -Repertoires der CD8+CCR7+ T-Zellen zwischen Patient C (PC), Patient D (PD), dem untherapierten MS-Patienten (MSu)* und der gesunden Kontrolle (KG) zum Zeitpunkt m ₀ vor Therapie mit Fingolimod (a.) und im Beobachtungszeitraum von zehn* bzw. zwölf Monaten (m _{10/12} *) mit Therapie (b.).	123
Abb. 35: Venn-Diagramm zur Darstellung privater (nicht geteilter) und öffentlicher (geteilter) Klone des TZR- β -Repertoires der CD8+CCR7- T-Zellen zwischen Patient C (PC), Patient D (PD), dem untherapierten MS-Patienten (MSu)* und der gesunden Kontrolle (KG) zum Zeitpunkt m ₀ vor Therapie mit Fingolimod (a.) und im Beobachtungszeitraum von zehn* bzw. zwölf Monaten (m _{10/12} *) mit Therapie (b.).	125
Abb. 36 a.-b.: Grafische Darstellung der Top fünf Epitop-Spezies des TZR- β -Repertoires der CD8+CCR7+ T-Zellen von Patient C (PC), Patient D (PD), der gesunden Kontrolle (KG) und des untherapierten MS-Patienten (MSu)* vor Therapie mit Fingolimod (Zeitpunkt m ₀) (a.) und im Beobachtungszeitraum von zehn* bzw. zwölf Monaten (m _{10/12} *) mit Therapie (b.) nach Abgleich mit der VDJdb-Datenbank.	128

Abb. 37 a.-b.: Grafische Darstellung der Top fünf Epitop-Spezies des TZR- β -Repertoires der CD8+CCR7- T-Zellen von Patient C (PC), Patient D (PD), der gesunden Kontrolle (Kg) und des untherapierten MS-Patienten (MSu)* vor Therapie mit Fingolimod (Zeitpunkt m_0) (a.) und im Beobachtungszeitraum von zehn* bzw. zwölf Monaten ($m_{10/12}$ *) mit Therapie (b.) nach Abgleich mit der VDJdb-Datenbank. 130

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht Patientenkollektiv und Kontrollen.	25
Tabelle 2: Liste der verwendeten Geräte und deren Hersteller.	26
Tabelle 3: Liste der verwendeten Einmalprodukte und deren Hersteller.	28
Tabelle 4: Liste der verwendeten Chemikalien, Medien und Lösungen, sowie deren Hersteller.	29
Tabelle 5: Liste der verwendeten Kits und deren Hersteller.	31
Tabelle 6: Antikörper für FACS (Fluorescence Activated Cell Sorting).	31
Tabelle 7: Primer, Sequenzen und Quellen der Primer.	32
Tabelle 8: Bezeichnung und Sequenzen der Illumina® Barcodes.	34
Tabelle 9: Übersicht der durchflusszytometrischen Daten der T-Zellen zum Zeitpunkt vor (m_0) und nach zwölf Monaten Therapie mit Fingolimod (m_{12} *) von Patient B (P_B), Patient C (P_C), Patient D (P_D) und den Kontrollen (gesunder Proband K_g und MS-Patient untherapiert MS_u). * <i>Zehnmonatsverlauf m_{10} bei MS_u</i>	59
Tabelle 10: Übersicht der durchflusszytometrischen Daten der CD8+CCR7+ und CD8+CCR7- T-Zellen zum Zeitpunkt vor (m_0) und nach zwölf Monaten Therapie mit Fingolimod ($m_{10/12}$) von Patient C (P_C), Patient D (P_D) und den Kontrollen (Gesunder Proband K_g und MS-Patient ohne Therapie MS_u). * <i>Zehnmonatsverlauf m_{10} bei MS_u</i>	64
Tabelle 11: Quantitative Darstellung der durchflusszytometrisch Daten (FACS) und der durch <i>Next Generation Sequencing</i> generierten Rohdaten.	70
Tabelle 12: Übersicht der absoluten Anzahl an TZR- β -Rekombinationen von V- und J- Segmenten innerhalb der CD8+CCR7+ T-Zell-Subpopulation im Verlauf von zwölf Monaten vor und nach Therapie mit Fingolimod (Zeitpunkt m_0 und m_{12} (* m_{10})) von Patient C (P_C), Patient D (P_D), der gesunden Kontrolle (K_g) und dem untherapierten MS-Patienten (MS_u *).....	73
Tabelle 13: Auflistung der Top fünf V/J-Rekombinationen (Top1-5) und deren Frequenzen zum Zeitpunkt vor (m_0) und nach zwölf Monaten Therapie mit Fingolimod (m_{12} (* m_{10})) von Patient	

C (P_C), Patient D (P_D) und den Kontrollen (gesunder Proband K_g und untherapierter MS-Patient MS_u*). 74

Tabelle 14: Übersicht der absoluten Anzahl an TZR-β-Rekombinationen von V- und J-Segmenten innerhalb der CD8+CCR7- T-Zell-Subpopulation im Verlauf von zwölf Monaten vor und nach Therapie mit Fingolimod (Zeitpunkt m₀ und m₁₂ (*m₁₀)) von Patient C (P_C), Patient D (P_D), der gesunden Kontrolle (K_g) und dem untherapierten MS-Patienten (MS_u*). 81

Tabelle 15: Auflistung der Top fünf V/J-Rekombinationen (Top1-5) und deren Frequenzen zum Zeitpunkt vor (m₀) und nach zwölf Monaten Therapie mit Fingolimod (m₁₂ (*m₁₀)) von Patient C (P_C), Patient D (P_D) und den Kontrollen (Gesunder Proband K_g und untherapierter MS-Patient MS_u*). 82

Tabelle 16: Auflistung der prozentualen Frequenzen an Singletons, Doubletons und 3+ Sequenzen zur Darstellung der quantitativen Verhältnisse als Ausdruck an Diversität (1+2; 3+) und Klonalität (Quantile Q1-Q5) des CD8+CCR7+ TZR-β-Repertoires von Patient C (P_C), Patient D (P_D), der gesunden Kontrolle (K_g) und des untherapierten MS-Patienten (MS_u) im Verlauf von zwölf/zehn* Monaten unter Therapie mit Fingolimod (Zeitpunkt m₀ und m₁₂ und m₁₀*). 89

Tabelle 17: Auflistung der prozentualen Frequenzen an Singletons, Doubletons und 3+ Sequenzen zur Darstellung der quantitativen Verhältnisse als Ausdruck an Diversität (1+2; 3+) und Klonalität (Quantile Q1-Q5) des CD8+CCR7- TZR-β-Repertoires von Patient C (P_C), Patient D (P_D), der gesunden Kontrolle (K_g) und des untherapierten MS-Patienten (MS_u*) im Verlauf von zwölf/zehn* Monaten unter Therapie mit Fingolimod (Zeitpunkt m₀ und m₁₂ und m₁₀*). 94

Tabelle 18: Auflistung der zehn häufigsten Aminosäuresequenzen (Top 10) basierend auf den CDR3 Nukleinbasen-Sequenzen anteilig am gesamten CD8+CCR7+ TZR-β-Repertoire und ihre Frequenzen zum Zeitpunkt m₀ und m₁₂ von Patient C (P_C). 100

Tabelle 19: Auflistung der zehn häufigsten Aminosäuresequenzen (Top 10) basierend auf den CDR3 Nukleinbasen-Sequenzen anteilig am gesamten CD8+CCR7+ TZR-β-Repertoire und ihre Frequenzen zum Zeitpunkt m₀ und m₁₂ von Patient D (P_D). 101

Tabelle 20: Auflistung der zehn häufigsten Aminosäuresequenzen (Top 10) basierend auf den CDR3 Nukleinbasen-Sequenzen anteilig am gesamten CD8+CCR7+ TZR- β -Repertoire und ihre Frequenzen zum Zeitpunkt m_0 und m_{12} von der gesunden Kontrolle (K_g).	102
Tabelle 21: Auflistung der zehn häufigsten Aminosäuresequenzen (Top 10) basierend auf den CDR3 Nukleinbasen-Sequenzen anteilig am gesamten CD8+CCR7+ TZR- β -Repertoire und ihre Frequenzen zum Zeitpunkt m_0 und m_{10} des MS-Patienten ohne Therapie (MS_u).....	103
Tabelle 22: Auflistung der zehn häufigsten Aminosäuresequenzen (Top 10) basierend auf den CDR3 Nukleinbasen-Sequenzen anteilig am gesamten CD8+CCR7- TZR- β -Repertoire und ihre Frequenzen zum Zeitpunkt m_0 und m_{12} von Patient C (P_c).	106
Tabelle 23: Auflistung der zehn häufigsten Aminosäuresequenzen (Top 10) basierend auf den CDR3 Nuklein-Sequenzen anteilig am gesamten CD8+CCR7- TZR- β -Repertoire und ihre Frequenzen zum Zeitpunkt m_0 und m_{12} von Patient D (P_D).....	107
Tabelle 24: Auflistung der zehn häufigsten Aminosäuresequenzen (Top 10) basierend auf den CDR3 Nukleinbasen-Sequenzen anteilig am gesamten CD8+CCR7- TZR- β -Repertoire und ihre Frequenzen zum Zeitpunkt m_0 und m_{12} von der gesunden Kontrolle (K_g).	109
Tabelle 25: Auflistung der zehn häufigsten Aminosäuresequenzen (Top 10) basierend auf den CDR3 Nukleinbasen-Sequenzen anteilig am gesamten CD8+CCR7- TZR- β -Repertoire und ihre Frequenzen zum Zeitpunkt m_0 und m_{10} des untherapierten MS-Patienten (MS_u).	110

Hinweis

Aus Gründen der besseren Lesbarkeit wird auf die gleichzeitige Verwendung der Sprachformen männlich, weiblich und divers (m/w/d) verzichtet.

1 Einleitung

1.1 Multiple Sklerose

Als Augustus de Esté, Enkelsohn von König George III von England, im Dezember 1822 in sein Tagebuch „*Einwirkung auf meine Augen*“ notiert, ist die von ihm beschriebene Erstmanifestation einer bilateralen Sehnervenentzündung (Optikusneuritis) eine der weltweit ältesten verschriftlichten Dokumentationen über den Leidensweg einer Erkrankung an Multipler Sklerose [1]. Augustus de Esté kann nicht wissen, dass sich in den folgenden zwei Jahrhunderten ein bahnbrechender Forschergeist entwickeln wird, der es aufgrund innovativer wissenschaftlicher Methoden ermöglicht, die Erkrankung besser zu verstehen und zu therapieren.

1.1.1 Definition

Die Multiple Sklerose (MS) ist eine chronisch inflammatorisch demyelinisierende Erkrankung des zentralen Nervensystems (ZNS), die zu einem teils irreversiblen axonalen Schaden mit einer fehlerhaften Signalübertragung der Neurone führt. Klinisch entsteht konsekutiv ein disperses Bild an Beschwerdesymptomatik hineinreichend in nahezu alle funktionellen Systeme des zentralen Nervensystems. Die Multiple Sklerose ist somit *die* führende Erkrankung, die zu einer Behinderung von jungen und mittelalten Menschen führt [2]. Die meist initial noch vorhandene Fähigkeit zur Remyelinisierung erklärt das komplexe dynamische Krankheitspiel aus wiederkehrender, schubförmig-verlaufender, teils remittierender Klinik (schubförmig remittierende Multiple Sklerose, relapsing-remitting multiple sclerosis, RRMS), die innerhalb von 10-15 Jahren in eine sekundär progrediente Form (sekundär progrediente Multiple Sklerose, SPMS) übergehen kann. Darüber hinaus ist in 5-15 % der Fälle ein primär progredienter Verlauf (primär progrediente Multiple Sklerose, PPMS) sowie in etwa 5 % der Fälle eine progressive schubförmige Verlaufsform (progressive-relapsing multiple sclerosis, PRMS) zu beobachten [3, 4]. Letzte wird allerdings mittlerweile von vielen Wissenschaftlern der PPMS zugeordnet. Ergänzend veröffentlichte die *MS Phenotype Group* um Lublin et al. 2014 basierend auf Revisionen der 1996 vom *US National*

Multiple Sclerosis Society Advisory Committee on Clinical Trials in Multiple Sclerosis definierten Konzept der MS-Subtypen ein weiteres Model zur phänotypischen Identifikation von MS-Patienten. Maßgeblich ist hier die Differenzierung anhand von zwei Parametern: Krankheitsaktivität und Krankheitsprogression über einen definierten Zeitraum. Konsekutiv werden daher zunächst schubförmige von progressiven Verläufen unterschieden, die sich aktiv oder inaktiv mit oder ohne Progression zeigen [5]. Die zugrundeliegende Ätiologie des inflammatorischen, vorrangig T-Zell-(Thymus-Zell) vermittelten Prozesses bei der MS gestaltet sich in ihrer Differenzierbarkeit äußerst diffizil, konkurrieren vermutlich genetische Faktoren mit Umwelteinflüssen innerhalb eines gesamtätiologischen heterogenen Kontextes, der zum Zusammenbruch von Immuntoleranznetzwerken führt. Angesichts dieser Komplexität konnte bis heute kein kurativer Therapieansatz erzielt werden. Dennoch stehen mit dem Einsatz von immunsuppressiven und immunmodulierenden Medikamenten (*disease modifying therapies*, DMTs) therapeutische Optionen zur Verfügung, die den Krankheitsverlauf begünstigen können [6].

1.1.2 Epidemiologie

Die klinische Manifestation der MS erfolgt oftmals in einer der prägendsten Lebensphasen des Menschen (Ausbildung, Berufseintritt, Familienplanung, Hausbau etc.), da die Erstdiagnose weltweit durchschnittlich im Alter von 32 Jahren gestellt wird [7]. Basierend auf den ausgewerteten Daten des Atlas für Multiple Sklerose, dritte Edition, lag im Jahr 2020 die globale Prävalenz (basierend auf den übermittelten Daten von 81 Ländern) von an Multiple Sklerose erkrankten Patienten bei etwa 2,8 Millionen Menschen mit einem seit 2013 registrierten Anstieg der Prävalenz bezogen auf 100.000 Einwohner von 33 auf 35,9 [7]. Die mehrfach in der Literatur beschriebenen regionalen und ethnischen Unterschiede der Prävalenzen und Inzidenzen (vorzugsweise höher in den zwischen den 40. und 60. Breitengraden der Nord- und Südhalbkugel) ließen sich auch in der Datenauswertung von Walton et al. erfassen [2, 7, 8]. So zeigte sich ein Anstieg der europaweiten Prävalenz von 2013 bis 2020 von 108 auf 143 Menschen pro 100.000 Einwohner (entspricht einem Anstieg um 32 %), wohingegen die westlichen pazifischen Inseln einen Anstieg von 3,6 auf 4,8 erkrankter Menschen pro 100.000 Einwohner

(entspricht einem Anstieg um 32 %) verzeichneten; eine deutlich niedrigere Prävalenz bei gleichem prozentualem Prävalenzanstieg [7]. Zudem beträgt die aus den vorliegenden Daten von 75 Ländern ermittelte Inzidenz 2,1 Menschen pro 100.000 Einwohner (global in Europa die höchste ermittelte Inzidenz von 6,8 pro 100.000 Einwohner), sodass davon auszugehen ist, dass weltweit mindestens alle fünf Minuten ein Mensch die Diagnose einer Multiplen Sklerose erhält [7]. Im Jahr 2006 erkrankten in Deutschland Frauen bis zu drei Mal häufiger als Männer an MS [9], europaweit erkrankten Frauen im Jahr 2013 und im Jahr 2020 doppelt so häufig als Männer an MS [7, 10]. Da heutzutage durch eine verbesserte globale Abdeckung mit Magnetresonanztomografien (MRT) und Ärzten eine frühere Diagnosestellung erfolgt und global noch Lücken in den Länderdatenbanken existieren, gilt es zu hinterfragen, ob der Anstieg der Zahlen allein auf einen Ausbreitungsprogress der Erkrankung zurückzuführen ist. Zudem ersuchen Frauen häufiger als Männer eine Arztkonsultation bei milden Symptomen, sodass die Frau-zu-Mann-Ratio möglicherweise Störfaktoren unterliegt [2].

1.1.3 Ätiologie

Die Ursachen, die zu einer Erkrankung mit MS führen, sind nach aktuellem Kenntnisstand weiterhin unverstanden, jedoch verdichten sich die Hinweise auf das Vorliegen eines multifaktoriellen Gesamtgeschehens [11]. Eine der gängigsten Hypothesen ist das Vorliegen eines autoimmunen Prozesses durch den Verlust von sogenannten Immuntoleranznetzwerken, der sich gegen ein aktuell noch unbekanntes Antigen richtet. In diesem Kontext werden zunehmend Infektionen mit Viren diskutiert [12], allerdings wurden auch genetische Prädispositionen und weitere Umwelteinflüsse identifiziert, die eine Erkrankungsentstehung begünstigen [13, 14].

1.1.3.1 Umweltfaktoren

Das Epstein-Barr-Virus (EBV), das humane Herpesvirus-6 (HHV-6), das Varizella-Zoster Virus (VZV), das John Cunningham Virus (JCV) sowie das humane endogene Retrovirus (HERV) bilden unter den Viren das derzeitig vorrangig explorierte Forschungsinteresse ab. Außer den HERVs, deren Ursprungs-RNA bereits vor langer

Zeit in das menschliche Genom integriert wurde, persistieren diese Viren ein Leben lang im menschlichen Körper. Es wird diskutiert, dass sie dort rezidivierende, durch zellulären Stress getriggerte Reaktivierungszyklen durchlaufen, die klinisch analog den schubförmigen Verlauf der MS abbilden [15]. Dieser Trigger könnte direkt durch Reaktivierung von viralen Ribonukleinsäuren- (ribonucleic acids, RNA) und Proteinprodukten und/oder indirekt durch antigenes Mimikry, in das Knochenmarkszellen (B-Zellen, bone marrow cells), T-Zellen und zytokin-aktivierende Astrozyten und Mikroglia involviert sind, gesetzt werden [12]. Eine zentrale Rolle in diesem hypothetischen „3-Virus-Kaskaden-Zyklus“ spielt der Epstein-Barr-Virus [16]. Nach durchlebter Infektion, besser bekannt als Mononukleose oder Pfeiffersches Drüsenfieber, führt eine erneute EBV-Reaktivierung mittels Ausschüttung von spezifischen Virus-Produkten wie den Epstein-Barr-Virus-kodierenden kleinen RNAs (epstein-barr-virus-encoding small RNAs, EBER), mikroRNAs (miRNAs) und dem ruhenden gebundenen Membranprotein 1 (LMP1) durch Bildung verschiedenster Immunantworten durch T-/B-/ und natürliche Killerzellen (NK-Zelle), Antikörper und Zytokine (Interferon Typ 1, Tumornekrosefaktor alpha, Interleukin 6, -10, -17A) zu einem lokalen ZNS-Inflamationsprozess [17, 18]. Zudem wird dadurch eine mögliche Expression der Keimbahn-kodierten HERVs-Virussequenzen (HERV-K/-W) und des HHV-6-A in reaktiven Lymphozyten, sowie Gliazellen, Astrozyten und Oligodendrozyten diskutiert, die den lokalen Entzündungsprozess befeuern [12, 19-22]. Die konsekutiv entstandene abnorme Aktivierung von ZNS-Mikroglia und Astrozyten bei nun mehr unvollständiger Blut-Hirnschranke mag mitunter ursächlich für die Zerstörung der Oligodendrozyten sein, die letztendlich zu den MS-typischen Läsionen führt [12].

Neben den Viren zählen darüber hinaus zu den am häufigsten in der Literatur beschriebenen Umwelteinflüssen der Nikotinkonsum, Adipositas und ein vorliegender Vitamin-D-Mangel [11, 13]. Untersucht wurden das Risiko an MS zu erkranken, Einflüsse auf den Verlauf der Erkrankung sowie die genetische Prädisposition. Im Jahr 2011 und 2021 ergaben Untersuchungen, dass Rauchen, explizit Zigaretten rauchen, mit einer erhöhten Anfälligkeit an MS zu erkranken einhergeht [23, 24]. Zudem ergaben sich Hinweise darauf, dass Zigaretten rauchen ein erhöhtes Risiko birgt von einer RRMS zu

einer SPMS überzugehen. Ein frühzeitiger Nikotinkonsum sowie hohe Dosen an Nikotin sind womöglich mit einem erhöhten Risiko an einer PPMS als an einer RRMS zu erkranken vergesellschaftet [24]. In einer 2015 breit angelegten Auswertung von 44 Metaanalysen zu den Umweltfaktoren Nikotinkonsum, Adipositas und Vitamin-D-Mangel, ließ sich nur in Bezug auf den Nikotinkonsum eine konsistente relevante Assoziation mit der MS-Erkrankung registrieren [14].

1.1.3.2 Genetik

Hinweise auf das Vorliegen einer genetischen Prädisposition ergaben sich bereits nach Veröffentlichung einer longitudinalen Zwillingsstudie aus Kanada im Jahr 2003, nachdem sich unterschiedliche Konkordanzen der untersuchten Zwillinge auf das Vorliegen einer MS ergaben. Im Vergleich zu dizygoten Zwillingen zeigte sich die Konkordanz der monozygoten Zwillinge um ein zehnfaches erhöht (5,4 % vs. 25,3 %) [25]. Zudem zeichnete sich 2005 durch eine dänische Studie ab, dass Familienmitglieder ersten Grades von MS-Erkrankten an MS zu erkranken ein erhöhtes Risiko haben. Bezogen auf die dänische Population ergab sich in dieser Studie sogar ein siebenfach erhöhtes Risiko [26]. Rezentere Studienergebnisse zeigen, dass das erneute Auftreten einer MS-Erkrankung innerhalb einer Familie 20 % beträgt, mit einer Risikoreduktion innerhalb des ersten Verwandtschaftsgrades (Geschwister 5 %, Eltern 2 %, Kinder 2 %) von allgemein 3 % und einer Risikoreduktion innerhalb des zweiten und dritten Verwandtschaftsgrades von 1 % [8, 27]. Zudem wurden mehr als 200 Gene identifiziert, die mit der Erkrankung einer MS assoziiert sind [28]. Bereits 1976 ließ sich eine Assoziation mit bestimmten Allelen des Haupthistokompatibilitätskomplexes (MHC) nachweisen [29]. Die identifizierten Marker wurden als DR15 and DQ6 und die korrespondierenden Genotypen als DRB1*1501, DRB5*0101, DQA1*0102, und DQB2*0602 bezeichnet [30]. Das höchste genetische Risiko in Europa ließ sich für das Gen *Humanes Leukozyten Antigen* (HLA)-DRB1*1501 identifizieren. In Sardinien und einigen anderen Mittelmeerräumen zeigte sich zudem eine häufige Assoziation mit DR4 (DRB1*0405–DQA1*0301–DQB1*0302) [31, 32].

1.1.3.3 Migration und Ethnie

Von großem Interesse waren zuletzt Ergebnisse einiger Migrationsstudien, nachdem spätestens seit den 1990-er Jahren größere Datensätze andeuteten, dass Migranten (erste Generation), die von einem Niedrigrisikogebiet in ein Hochrisikogebiet migrierten, das Ursprungsrisiko ihres Geburtslandes mit sich trugen, deren Kinder (zweite Generation) jedoch das Risiko des neuen Landes adaptierten [33]. Rezentere Studien zeigten jedoch, dass dieses allgemein deklarierte Dogma nicht differenziert genug betrachtet wurde. Spätestens seit den 2010- Jahren wurden zunehmend mehr Daten veröffentlicht, die darauf hindeuten, dass Genetik und Ethnie in diesen Untersuchungen deutlich mehr Aufmerksamkeit benötigen. Zu den früheren Studien partiell konträre Untersuchungen aus Schweden ergaben, dass die Prävalenz für MS unter den Migranten, die aus Niedrigrisikogebieten stammten, durch die Migration nach Schweden allgemein anstieg. Darunter zeigte sich in der Subpopulation der Iraner, eine im Vergleich zur gesamten schwedischen Prävalenz deutlich erhöhte Prävalenz, sodass genetische- und Umweltfaktoren diskutiert werden müssen. Zudem ergaben sich erste Hinweise darauf, dass selbst wenn bestimmte Subpopulationen (Indien, China, Rumänien) nach der Migration im Vergleich zu den ethnischen Schweden eine niedrigere Prävalenz zu erkranken aufwiesen, sie dennoch ein erhöhtes Risiko in sich trugen als in ihrem Geburtsland [34]. Daten aus Dänemark bestärkten zuletzt diese Annahme. In einer groß angelegten Kohortenstudie mit Dateneinschluss von 1968- 2015 ließ sich bestätigen, dass Migranten der ersten Generation, ein niedrigeres Risiko hatten an einer MS zu erkranken als ethnische Dänen, jedoch ein höheres Risiko als das in ihrem Geburtsland [35]. Rezente Untersuchungen aus einer Kohortenstudie aus Nordkalifornien mit erfassten Daten im Zeitraum von 2010- 2016 konnten die Annahme unterstützen, der Ethnie in den Migrationsstudien mehr Aufmerksamkeit zu widmen, da sich zeigte, dass sich unter den afrikanisch-stämmigen Einwohnern ein überproportionaler Anteil mit der Diagnosestellung einer MS konfrontiert sah (im Vergleich zu Menschen mit asiatischer, kaukasischer und hispanischer Abstammung). Zudem ergaben sich auch Hinweise darauf, dass diese Patienten häufiger an einer PPMS oder PRMS als an einer RRMS erkrankten [36].

1.1.4 Pathophysiologie

Die Pathophysiologie der MS ist trotz größter Bemühungen der Wissenschaft weiterhin nicht vollständig verstanden. Das allgemeine Charcot Dogma von 1876, dass es sich bei der Erkrankung um eine chronische Inflammation handelt, die ausschließlich nur fokale Läsionen (demyelinisierende Plaques) in der weißen Substanz hervorruft, musste spätestens mit der Beschreibung von Läsionen in der grauen Substanz des ZNS (Kortex, Basalganglien, Hirnstamm) und der grauen Substanz des Rückenmarks verabschiedet werden [37-43]. Zusätzlich zu der daraus resultierenden Hirnatrophie mit Zunahme der klinischen Behinderung konnte zuletzt nachgewiesen werden, dass MS-spezifischer axonaler Schaden trotz pathologisch unauffälliger weißer Substanz im Sinne einer Neurodegeneration unabhängig und parallel von der vorhandenen Neuroinflammation entsteht [39-41, 44-46]. Pathophysiologisch sind daher mehrere unterschiedliche, teils parallel ablaufende und ineinander übergreifende Prozesse von Bedeutung.

1.1.4.1 Inflammation

Sie ist ursächlich für die Entstehung von Läsionen. Die Inflammation beginnt im Bereich der postkapillären Venolen und Venen, sodass typische Erstmanifestationsorte von Läsionen im perivenösen, periventriculären Raum zu finden sind. Inflammation findet sowohl in den Läsionen selbst, als auch in den angrenzenden Arealen als Kontinuum in allen Formen und Stadien der MS statt [45]. Es wurde nicht nur nachgewiesen, dass Inflammation in aktiv demyelinisierenden Läsionen, sondern auch in inaktiven Läsionen und remyelinisierenden Plaques zu finden ist [46]. Auch wenn bisher qualitativ histologisch keine wesentliche Differenzierung der einzelnen MS-Stadien und -Formen gelang, so wurden dennoch ausgeprägte Unterschiede in der quantitativen Zusammensetzung der beteiligten Zellpopulationen beobachtet [3, 41, 47]. Studien wiesen nach, dass sich in den aktiven Läsionen der weitestgehend normal aussehenden weißen Substanz, wie auch im vulnerablen diffusen Gewebe, fast ausschließlich CD8+ T-Zellen (immunophänotypisches Oberflächenmerkmal, cluster of differentiation, CD) begleitet von Immunoglobulin-G-Zellen (IgG-Zellen) finden lassen, im perivaskulären, meningealen Raum jedoch bei weiterhin weit verbreiteter CD8+ T-Zellpopulation sich

zusätzlich auch relevante Mengen an CD4⁺ T-Zellen und Plasmazellen (B-Zellen) aufhalten [46, 48-57]. Dabei unterliegen die CD8⁺ T-Zellen gegenüber den CD4⁺ T-Zellen im höheren Maß einer klonalen Expansion [53]. Auch wenn Lymphozyten fast überall vorliegen, so sind sie nur wenig im direkten Areal der Demyelinisierung und Neurodegeneration zu finden. Daher ist die Hypothese, dass sie keinen direkten oder wenn nur einen partiellen Gewebsuntergang verantworten, sie jedoch viel mehr eine direkte oder indirekte Aktivierung der Mikroglia und Makrophagen auslösen (Phagozytose, Antigenpräsentation). Welches Antigen die Produktion möglicher löslicher Faktoren und die Aktivierung der adaptiven Immunantwort letztendlich hervorruft bleibt weiterhin unklar [45].

1.1.4.2 Aktive Läsion

Eine aktive Läsion ist assoziiert mit einer großen Population an phagozitierenden Zellen, die den Abbau der Myelinscheiden und die Zerstörung der myelinbildenden Oligodendrozyten vorantreibt. Im Zentrum der aktiven Läsionen lassen sich Makrophagen nachweisen, die teils noch Reste der zerstörten Myelinscheiden enthalten. Am Rand hingegen finden sich vorrangig Mikroglia. Makrophagen und Mikroglia können sowohl einen proinflammatorischen als auch antiinflammatorischen Phänotyp ausbilden [58]. Eine Aktivierung der proinflammatorischen Zellen führt in aktiven Läsionen und dem vulnerablen Hirngewebe zur Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen [59], sowie zu einer erhöhten Expression an Nikotinamid Adenin Dinucleotid Phosphat-Oxidase (NADPH-Oxidase) als Hinweis auf oxidativen Stress mit konsekutivem Gewebsschaden. Sobald die Makrophagen die Reste der Myelinscheiden aufgenommen haben, wird die Expression der NADPH-Oxidase herunterreguliert [60]. Axonaler Schaden wird anfänglich innerhalb der Läsionen noch vermieden, jedoch entsteht im weiteren Verlauf ein irreversibler Untergang der Axone, der mitursächlich für die klinische Behinderung ist. Dabei wurde beobachtet, dass die Anzahl der registrierten zerstörten Axone einhergeht mit dem Ausmaß an Inflammation [61].

Die beschriebenen aktiven Läsionen sind charakteristisch für eine RRMS und zu unterscheiden von sich langsam expandierenden aktiven Läsionen, die im Läsionskern aus einem inaktiv demyelinisierenden Zentrum mit randständigen Mikroglia und Makrophagen sowie axonalem Schaden bestehen, die wiederum typisch für ein Fortschreiten der Erkrankung (*Smoldering Disease, Silent Progression*) sind [62]. Zudem ist das Vorliegen vieler neuer aktiver Läsionen eher typisch für eine RRMS. Die Anzahl dieser Läsionen nimmt ab, sobald ein Übergang in eine progressive Form beobachtet wird [45]. Bereits in frühen Krankheitsstadien sind aktive Läsionen im Kortex nachweisbar [42], jedoch steigt das Ausmaß der kortikalen Beteiligung bei progressiven Verläufen massiv an [63].

1.1.4.3 Inaktive Läsion

Die häufigsten inaktiven Läsionen bestehen aus Demyelinisierung bei teils erhaltenen Axonen und reaktiver Gliose. Dennoch ist innerhalb der Läsionen in einem geringen Ausmaß ein voranschreitender axonaler Untergang zu beobachten, der den chronischen Charakter der Erkrankung untermalt. In den inaktiven Läsionen befinden sich die Makrophagen und Mikroglia in der läsionsumgebenden weißen oder grauen Substanz [45, 64].

1.1.4.4 Demyelinisierung und Remyelinisierung

Demyelinisierung ist zusätzlich zu dem Prozess der Inflammation eine Konsequenz einer Astrozytenaktivierung. Die Rolle der Astrozyten in der Pathogenese der MS ist noch nicht vollständig geklärt, jedoch ist nachgewiesen, dass Astrozyten nach ihrer Aktivierung eine Reihe an frühen morphologischen, transkriptionellen, biochemischen, und funktionell modulierenden Prozessen einleiten, die teils schädliche, teils begünstigende Effekte hervorrufen und zudem partiell den Prozess der Neurodegeneration fördern [45, 65, 66]. Kommt es zu einer Entzündung des Gewebes, so proliferieren Astrozyten und bilden Gliosenarben in vorrangig inaktiven Läsionen aus, die als Konglomerat aus hypertrophierten Zellen entstehen. In diesen Bereichen findet eine Expression von Adhäsionsmolekülen, Zytokinen, Wachstumsfaktoren, Rezeptoren, Enzymen und

Proteaseinhibitoren statt, die die umgebende extrazelluläre Matrix modifizieren [65, 67]. Die entstandenen Gliosenarben stellen eine Art Barriere dar, die die Oligodendrozyten daran hindert eine Remyelinisierung einzuleiten.

Viele Läsionen können initial als Ergebnis von Rekrutierung und Differenzierung der Oligodendrozyten-Vorläuferzellen (Progenitorzellen) noch remyelinisieren [68]. Das Ausmaß der Remyelinisierung ist dabei individuell unterschiedlich stark ausgeprägt und zudem auch in unterschiedlichen Läsionsorten unterschiedlich hoch. Dieser Umstand wird bestimmt durch Faktoren wie Anzahl und Präsenz der Progenitorzellen und das Maß an deren Differenzierungspotenzial. Zudem können neue Läsionen auf dem Boden alter Läsionen entstehen. Das dortige Ausmaß und die Häufigkeit von ineinander übergreifenden Demyelinisierungs- und Remyelinisierungsprozessen bestimmt zusätzlich das dort vorhandene Remyelinisierungspotenzial [69].

1.1.5 Klinik und Diagnostik

1.1.5.1 Verlaufsformen und klinische Präsentation

Stand 2023 unterscheidet man die folgenden Formen einer Multiplen Sklerose [3, 8, 11, 70]:

- 1) Schubförmig-remittierende MS (RRMS): 70 bis 80 % der an MS erkrankten Patienten mit einem schubförmig-remittierenden Verlauf, die die folgenden Kriterien erfüllen:
 - Neues oder immer wiederkehrendes neurologisches Symptom
 - Symptombdauer mindestens 24 bis 48 h
 - Symptome entwickeln sich in Tagen über Wochen, bilden ein Plateau und remittieren
- 2) Primär progrediente MS (PPMS): 5-15 % der Patienten zeigen bereits initial einen kontinuierlich progredienten Krankheitsverlauf ohne das typische Auftreten von Schüben.

- 3) Sekundär progrediente MS (SPMS): 65 % der Patienten mit RRMS gehen nach etwa 10-20 Jahren in eine sekundär progrediente MS mit zunehmender neurologischer Verschlechterung mit teils überlappenden Schüben über.
- 4) Progressive-schubförmige MS (PRMS): 5 % der an MS erkrankten Patienten mit initial progredienter neurologischer Verschlechterung mit überlappenden Schüben. Wird von manchen Wissenschaftlern der PPMS zugeordnet.

Zudem finden in der Literatur noch die folgenden MS-Spektren Erwähnung:

- 5) Radiologisch isoliertes Syndrom (RIS): Entspricht einer bildmorphologisch gesicherten, asymptomatischen, präexistentiellen Form der MS.
- 6) Klinisch isoliertes Syndrom (CIS/KIS): Illustriert eine klinische Indexpräsentation bei mono- oder polysymptomatischer Beschwerdesymptomatik entsprechend der Lokalisation.
- 7) Maligner Verlauf: Charakterisiert durch einen aggressiven, rapiden, progredient voranschreitenden Verlauf bis hin zu schwerer Behinderung oder Tod innerhalb weniger Monate (Marburg-Variante).
- 8) Konzentrische Sklerose Baló: Atypische Form einer MS, die mit einer ringförmigen, wechselnd starken Demyelinisierung der weißen Substanz einhergeht. Charakterisiert ist diese Erkrankung durch einen akuten oft monophasischen Verlauf, der unerkannt und untherapiert zum Tod führen kann.
- 9) Benigner Verlauf: Sehr milder Verlauf der MS. Schübe sind selten.

Die teils fluiden Übergänge einer Verlaufsform in die andere betonen die Notwendigkeit der Beantwortung, ob die Multiple Sklerose nicht eher als ein Kontinuum von stets erhaltenen Anteilen von Gesundheit und Krankheit zur äquivalenten Zeit anstelle von existierenden parallelen Verlaufsformen zu betrachten ist. Zum einen betrifft dies vorrangig den Übergang eines KIS mit neurologischem Defizit ohne Erfüllung der definitionsgemäßen Diagnosekriterien einer Multiplen Sklerose nach McDonald in eine definitive MS [71, 72]. Zum anderen den Übergang einer RRMS in eine SPMS.

Zu den klinischen Symptomen gehört ein breites Spektrum an Beschwerden, die die unterschiedlichen funktionellen Systeme des ZNS betreffen. Diese können monosymptomatisch oder polysymptomatisch vorliegen. Hierzu gehören Störungen der Sensibilität und Motorik, die Ausbildung einer Optikusneuritis, Diplopie, Schwindel, Dysphagie, Gleichgewichtsstörungen, Tremor, Dysarthrie, Steifheit und schmerzvolle Spasmen, Störungen der Blasen-/Mastdarmfunktion, Obstipation, erektile Dysfunktion, Fatigue, körperliche Schwäche und Schmerzen, Temperatursensibilität, Depressionen, emotionale Labilität und kognitive Beeinträchtigungen [8]. Zwecks einheitlicher Identifizierung des Behinderungsgrades findet weiterhin die von Kutzke 1983 vorgestellte „*Expanded Disability Status Scale*“ (EDSS) Verwendung. Diese bewertet das Maß an Behinderung basierend auf Einschränkungen im Bereich der Pyramidenbahn, des Kleinhirns, des Hirnstammes, der Sensorik, der Blasen-/Mastdarmfunktion, der Sehfunktion und höherer zerebraler Funktionen (z.B. kognitive Beeinträchtigung) mit einem Punktesystem von 0 bis 10 als Äquivalent zu kein Defizit bis Tod [73].

1.1.5.2 Diagnostik

Goldstandard in der Diagnostik der Multiplen Sklerose sind die McDonald Kriterien von 2001, die in den letzten zwanzig Jahren multiple Male revidiert wurden, zuletzt im Jahr 2017, sowie die MS-typische klinische Präsentation des Patienten und der Nachweis von Oligoklonalen Banden im Liquor. Dabei dienen die Kriterien primär der Differenzierung eines KIS von einer MS. Wesentliche Termini in diesem Kontext sind die zeitliche und örtliche Dissemination [71, 72]:

- 1) Zeitliche Dissemination: Zeitliche Entwicklung neuer Läsionen im bildmorphologischen Befund, die den dynamischen Krankheitsprozess charakterisieren.
- 2) Örtliche Dissemination: Entwicklung von Läsionen in spezifischen anatomischen Arealen, die auf einen multifokalen ZNS-Prozess hindeuten.

Läsionen sind bildmorphologisch sichtbar durch Hyperintensitäten in der T2-gewichteten oder Protein-Dichte-gewichteten-MRT, die in den langen Achsen mindestens >3 mm

groß sein müssen [74]. Mittels Gabe von Kontrastmittel (Gadolinium) lässt sich dieses Signal verstärken und somit einen aktiven Prozess anzeigen. Typische Läsionsorte sind periventrikuläre, juxtakortikale, infratentorielle und spinale Läsionen. Bis 2017 galt, dass die Kombination aus einem KIS mit zeitlicher und örtlicher bildmorphologischer Dissemination, sowie der Nachweis oligoklonaler Banden im Liquor bei fehlender plausibler Differentialdiagnose die Diagnosestellung einer MS ermöglicht. Durch die letzte Revision der McDonald Kriterien wurde dieses Dogma erweitert. Die Kombination aus typischem KIS sowie dem Nachweis oligoklonaler Banden erlaubt bei fehlender plausibler Differentialdiagnose nun auch die Diagnosestellung der MS, selbst wenn zunächst in der initialen MRT keine Läsionen zu finden sind. Somit bekommen die oligoklonalen Banden seit der Revision mehr Wichtung in der Diagnosestellung, da sie als Kriterium der zeitlichen Dissemination gewertet werden können [72].

1.1.6 Therapie

1.1.6.1. Allgemeiner Therapieansatz

Trotz intensiven Bemühens um einen kurativen Ansatz in der Therapie der MS ist die Erkrankung bis heute nicht heilbar. Dennoch haben in den letzten Jahren neue Medikamente Patienten und Ärzten die Möglichkeit eröffnet, die Erkrankung und den Verlauf zumindest zu begünstigen. Dieser krankheitsmodifizierende Ansatz (DMTs) bildet zu den symptomatischen Therapien (Anticholinergika, reversible Kaliumkanalblocker, Antispastika, supportive Therapien) und der akuten Schubtherapie (Glucokortikoide, Plasmaseparation) eine der Grundsäulen in der Behandlung der MS, jedoch vorzugsweise nur in Bezug auf die Behandlung der RRMS. Stand 2022 sind für die Basistherapie der MS folgende Substanzen zugelassen [75, 76]:

- Interferon beta-1a (Avonex® und Rebif®)
- Interferon beta-1b (Betaseron® und Extaviar®)
- Peginterferon beta-1a (Plegridy®)
- Mitoxantron (Generic)
- Glatirameracetat (Copaxone® und Glatopa®)

- Teriflunomid (Aubagio®)
- Dimethylfumarat (Tecfidera®)
- Diroximelfumarat (Vumerity®)
- Monomethylfumarat (Bafiertam®)
- Natalizumab (Tysabri®)
- **Fingolimod (Gilenya®)**
- Alemtuzumab (Lemtrada®)
- Ocrelizumab (Ocrevus®)
- Cladribin (Mavenclad®)
- Siponimod (Mayzent®)
- Ozanimod (Zeposia®)
- Ofatumumab (Kesimpta®)
- Ponesimod (Ponvory®)

1.1.6.2. Krankheitsmodifizierender Ansatz (DMTs)

Grundsätzlich unterscheidet man drei Therapiekonzepte:

- 1) Immunsuppressiv
 - Substanzen wie **Fingolimod**, Natalizumab
 - Charakterisiert durch die Notwendigkeit einer fortwährenden Therapie, um die Suppression der Erkrankung aufrecht zu erhalten.
- 2) Immunmodulierend
 - o Substanzen wie Interferon beta, Glatirameracetat, Teriflunomid, Dimethylfumarat
 - o Charakterisiert durch die Notwendigkeit einer fortwährenden Therapie, um die Suppression der Erkrankung aufrecht zu erhalten.
- 3) Immunrestituierend (IRTs)
 - o Substanzen wie Alemtuzumab, Cladribin, Mitoxantron, Rituximab (*off-label use*), Ocrelizumab oder eine autologe Stammzelltransplantation

- o Werden als einmalige- oder Impulstherapien angesehen, die das Immunsystem nachhaltig verändern, teilweise erneuern und längerfristige immunologische Effekte erzielen sollen [3, 77].

Die Wahl der richtigen Therapie sollte stets ein individuelles Gesamtkonzept darstellen [78]. Die Ausrichtung dessen erfolgt anhand eines Stufenkonzeptes, das sich an der Krankheitsaktivität, der MRT-Bildgebung und patientenbezogenen Fakten (Kontraindikationen, Nebenwirkungsprofil, Familienplanung, Frequenz der Applikation, Applikationsart, Symptomprofil) orientiert. Auch wenn die Therapie mit DMTs oft effizient wirkt, so ist sie dennoch vergesellschaftet mit relevanten Risiken, wie der Entstehung einer progressiven multifokalen Leukenzephalopathie (PML) z.B. bei Natalizumab. [79].

1.2 Fingolimod / Gilenya®

Eines der ersten Medikamente, das als krankheitsmodifizierende Therapie den deutschen/europäischen Markt erreichte, ist die Substanz Fingolimod, die auch unter dem Handelsnamen Gilenya® bekannt ist und zur Therapie einer hochaktiven schubförmigen RRMS eingesetzt werden kann. Die Indexzulassung erfolgte über die *U.S. Food and Drug Administration (FDA)* im Jahr 2010, sowie für den europäischen Markt 2011 über die europäische Arzneimittelagentur (EMA). Zur Zeit der Zulassung stellte die Substanz das erste zur Verfügung stehende orale Therapeutikum zur Behandlung einer RRMS dar und war gleichzeitig die erste Substanz der Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptor(S1P-R)-modulierenden Medikamente [66].

1.2.1 Eigenschaften

Fingolimod (FTY720) ist ein synthetisches Derivat des ISP-1/Myriocins, einem natürlichen Wirkstoff aus dem Pilz *Isaria sinclairii*, dem bereits 1994 mögliche immunsuppressive Wirkungen mit einer 10- bis 100- fachen Potenz gegenüber dem Standardimmunsuppressivum Ciclosporin A zugeschrieben wurden [80].

FTY720 wird nach der oralen Aufnahme in der Leber durch die Sphingosin-Kinase-2 zu dem aktiven Metaboliten FTY720-P (*S*-Enantiomer) phosphoryliert. Dieser ist Mitglied einer lysophospholipiden Familie an Mediatoren, die an verschiedensten zellulären Prozessen (Proliferation, Migration, Adhäsion, zelluläre Kommunikation) beteiligt sind. FTY720-P bindet agonistisch mit hoher Affinität (höchste Affinität zu S1P₁) an 4 von 5 Subtypen des S1P-Rezeptors (S1P₁, S1P₃, S1P₄, S1P₅), der seinen Signalweg G-proteingekoppelt vermittelt [66, 81, 82]. S1P-Rezeptoren werden im menschlichen Körper an den verschiedensten Organen exprimiert und lassen sich in den unterschiedlichsten Körperflüssigkeiten finden. Sie sind wichtiger Bestandteil in der embryonalen Entwicklung des kardiovaskulären- und zentralen Nervensystems [81, 83, 84]. Zudem spielen sie eine wichtige Rolle in der Immunologie, da sie auf Lymphozyten (z.B. T-Zellen) exprimiert werden [85]. Dabei ist vorrangig der S1P₁-Rezeptor-Subtyp ein wesentlicher Mediator der Migration von Lymphozyten. Sobald er aktiviert wird, reguliert er die Auswanderung (Egress) der Lymphozyten aus den lymphatischen Organen in das periphere Blut [86].

1.2.2 Wirkung

FTY720-P bindet an lymphozytäre S1P₁-R und inhibiert dadurch ihre physiologische Signalkaskade. Durch die agonistische Bindung kommt es zu einer Rezeptor-Internalisierung und -Expressionsverminderung an der Zelloberfläche. Im Sinne einer funktionellen Antagonisierung führt dies zu einer Reduktion des S1P₁-R-abhängigen Egresses der Lymphozyten aus den sekundären lymphatischen Organen und somit zu einer Reduktion der Rezirkulation von autoaggressiven T-Zellen über die Lymphe und das Blut in das ZNS [66]. Zudem ist die lipophile Substanz FTY720-P in der Lage die Blut-Hirnschranke zu überwinden. Es ist anhand eines *in vivo* Tiermodells (experimentelles Tiermodell der autoimmunen Enzephalitis, *EAE*) theoretisch davon auszugehen, dass FTY720-P, einmal in das ZNS gelangt, an die S1P₁-R auf ZNS-residenten Zellen (hauptsächlich auf Astrozyten) bindet und die Entstehung von Astroglie, Demyelinisierung und axonalen Schaden im Sinne einer Neuroprotektion reduziert [87]. Bereits zuvor hatten Coelho et. al 2007 *in vitro* eine durch FTY720 induzierte positive zytoprotektive Wirkung auf die Oligodendrozyten Progenitorzellen

nachgewiesen [88]. Somit vermittelt Fingolimod zusätzlich zur peripheren Immunantwort vermutlich auch eine direkte ZNS-Wirkung.

Durch das Verhindern des Lymphozytenegresses kommt es zu einer Reduktion der Lymphozyten im peripheren Blut abhängig von der Dosis um bis zu 88 % und zu einer Änderung aller peripheren Lymphozytenkompartimente, sodass sowohl die Anzahl der im peripheren Blut zirkulierenden B-Zellen als auch die der T-Zellen supprimiert wird [89-94].

Die klinische Wirkung von Fingolimod wurde in zwei großen multinationalen Phase-III-Studien (FREEDOMS und TRANSFORMS) mit Erwachsenen, die an RRMS erkrankt waren, überprüft. Die orale Dosis von 0.5mg/d Fingolimod konnte gegenüber der Placebokontrollgruppe (FREEDOMS), sowie einer Interferon-beta-1a-Kontrollgruppe (TRANSFORMS), klinisch die Anzahl der jährlichen Schubereignisse sowie die Anzahl der aktiven, Gadolinium-aufnehmenden T2-Läsionen im MRT reduzieren, als auch die Progression der Erkrankung (gemessen am klinischen Behinderungsgrad) positiv beeinflussen. Fingolimod wurde über den Untersuchungszeitraum von zwei Jahren weitestgehend gut von den Probanden vertragen, mit nur milden bis moderaten Nebenwirkungen. Es verstarben zwei Probanden aufgrund von opportunistischen Infektionen, jedoch beide bei einer Dosiseinnahme von 1.25 mg/d [82, 95-98].

1.2.3 Nebenwirkung

Zu den milden bis moderaten Nebenwirkungen, die bei der Behandlung mit Fingolimod auftraten, zählen ein arterieller Hypertonus, Lymphopenie, eine erhöhte Alanin Aminotransferase im Serum, das Auftreten eines atrioventrikulären Blockbildes I° und II° Mobitz und selten aber schwerwiegend eine Bradykardie, oft nach erstmaliger oraler Einnahme von Fingolimod. Schwere seltenere Nebenwirkungen waren das Auftreten von malignen Neoplasien (vorrangig Basalzellkarzinom), Infektneigung mit opportunistischen Infektionen und einem Makulaödem [96-98]. Kumulativ konnten schwere Nebenwirkungen nur in <1 % der Fälle beobachtet werden [97, 98]. 2018 untersuchten *Berger et al.* die Sicherheitsdatenbank von Novartis nach seit der

Markteinführung von Fingolimod bis August 2017 registrierten Patientenfälle von progressiver multifokaler Leukenzephalopathie. Wichtig war, dass diese Patienten in den letzten sechs Monaten vor Beginn mit der Fingolimodtherapie keine Therapie mit Natalizumab erhalten haben durften. Es wurden 15 Patienten identifiziert, 14 davon hatten Fingolimod über zwei Jahre eingenommen. Die generelle Inzidenz bzgl. des Auftretens einer PML betrug somit $<1:10.000$ [99].

1.2.4 Immunsystem im Kontext der Fingolimodtherapie

1.2.4.1 Grundlagen: T-Zellen in der adaptiven Immunantwort

Die adaptive Immunreaktion ist eine *spezifische* Immunreaktion, da sie sich mit der zellulären und/oder humoralen Immunantwort gegen ganz bestimmte Antigene richtet. Die Immunantwort wird im Wesentlichen neben B-Lymphozyten durch T-Lymphozyten (B- und T-Zellen) vermittelt. Sobald eine adaptive Immunantwort abgelaufen ist, bilden B- und T-Lymphozyten Gedächtniszellen aus, durch die die Immunität langfristig erhalten bleibt. Um eine adäquate Antigenpräsentation zu ermöglichen, bedarf es bestimmter Bausteine, die die zuvor abgebauten Antigen-Peptidfragmente den B- und T-Lymphozyten präsentieren können; den sogenannten HLA-Proteinen oder auch MHC-Proteinen. Zu differenzieren sind zwei Klassen: MHC-I-Proteine, die von fast allen Zellen außer von kernlosen Zellen an ihrer Oberfläche exprimiert werden und MHC-II-Proteine, die von dendritischen Zellen, Makrophagen und B-Zellen an ihrer Oberfläche exprimiert werden.

T-Lymphozyten entstehen im Knochenmark, wandern jedoch in einem frühen Stadium in den Thymus zur Reifung ein. Dort kommt es analog zu den Immunoglobulinen zu einer somatischen Rekombination (V(D)J-Rekombination) bestimmter Gensegmente in den T-Zellen. Diese ermöglicht in den meisten T-Zellen die Expression spezifischer alpha- und beta-Ketten, die den T-Zell Rezeptor (TZR) bilden. Die alpha- und beta-Ketten bilden die Antikörper-Domänen der T-Zellen, da sie zusammen mit der Expression von CD-Oberflächenmolekülen wie CD3, CD4 und CD8, Antigenpeptide, die MHC-Protein-assoziiert auf der Oberfläche von antigenpräsentierenden Zellen dargeboten werden,

erkennen können [100, 101]. Sobald die T-Zellen in ihrem Reifungsprozess im Thymus die positive und negative Selektion überlebt haben und an ihrer Oberfläche den T-Zell Rezeptor sowie CD4 zur Bindung an MHC-II-Proteine oder CD8 zur Bindung an MHC-I-Proteine exprimiert haben, werden die T-Zellen durch Bindung an das Antigen nach „*Schlüssel-Schloss-Prinzip*“ aktiviert [102]. Zusätzlich exprimiert die T-Zelle Interleukin-2 (IL2) und einen Interleukin-2-Rezeptor (IL2-R), um die eigene Proliferation zu stimulieren [100]. Konsekutiv entstehen so im Sinne der *klonalen Expansion* identische (monoklonale) Lymphozyten.

1.2.4.2 Somatische Rekombination in T-Zellen

Die somatische Rekombination ist die genetische Grundlage für die große Antikörper- und Rezeptorvielfalt im menschlichen Immunsystem. Sie findet sowohl in B-Zellen als auch auf T-Zell-Rezeptorebene in T-Zellen statt. Im Kontext dieser Dissertation wird im Folgenden die Somatische Rekombination der T-Zellen behandelt.

Abhängig von der Entwicklungsstufe des TZR besteht dieser vorrangig aus Ketten (α , β , γ , δ , ϵ , ν - Ketten), die unterschiedlich häufig in den TZR vorkommen und deren Funktion teilweise noch nicht erforscht ist [103]. Die bereits gut erforschten alpha- und häufig vorkommenden beta-Ketten des TZR setzen sich aus einer konstanten Domäne (C) und einer variablen Domäne (V), sowie einer Transmembrandomäne und einem kurzen c-terminalen cytoplasmatischen Bereich zusammen. Die variable Domäne enthält komplementaritätsbestimmende Regionen (complementarity determining region, CDR), die als CDR1, CDR2 und CDR3 bezeichnet werden und ganz entscheidend für die vielfältige Antigenbindung sind. CDR3 bietet das höchste Maß an Variabilität, da sich dieser Abschnitt im Kontext der somatischen Rekombination zufällig aus verschiedensten Kopien bzw. Varianten bestimmter Gensegmente zusammensetzt [100, 104-109]:

- 1) **V** (variable)
- 2) **D** (diversity) – *nur in der beta-Kette vorhanden*
- 3) **J** (joining)

1.2.4.3 T-Helferzellen: Effektor-T-Zellen mit CD4+ Marker

Sobald naive CD4+ T-Zellen aktiviert werden, entwickeln sie sich zu T-Helferzellen. Basierend auf dem Typ des von der dendritischen Zelle präsentierten Antigens entstehen auf Grundlage des Phänotyps und der auszuübenden Funktion unterschiedliche Arten von Helferzellen: T_H1-Zellen binden an MHC-II-Proteine von Makrophagen und aktivieren diese, T_H2-Zellen binden an MHC-II-Proteine von B-Zellen und helfen bei deren Aktivierung, T_H17-Zellen sezernieren Interleukin-17 (IL17) und verstärken dadurch Immunreaktionen sowie T_{reg}-Zellen, die Immunreaktionen regulieren und supprimieren. Zudem wurden innerhalb der CD4+ Subpopulationen noch follikuläre und zytolytische T-Helferzellen identifiziert [110].

1.2.4.4 Zytotoxische T-Zellen: Effektor-T-Zellen mit CD8+ Marker

CD8+ T-Zellen stehen im Fokus dieser Dissertationsschrift. Sie werden auch als zytotoxische T-Zellen bezeichnet, da sie nach ihrer Aktivierung die gezielte Abtötung körpereigener Zellen, die von Erregern (bspw. Viren oder intrazelluläre Erreger) befallen sind, einleiten. CD8+ T-Zellen sind nicht in der Lage die infizierte Zelle direkt eigenständig zu töten, sondern lösen in ihnen eine Apoptose, d.h. einen programmierten Zelltod aus. Dies geschieht vorrangig über die Sekretion des porenbildenden Proteins Perforin und der Protease Granzym [111].

1.2.4.5 Subpopulationen der CD8+ T-Zellen

Sobald das Antigen durch die spezifischen effektiven CD8+ Zellklone eliminiert wurde, geht auch die zytotoxische CD8+ T-Zelle mittels Apoptose zugrunde. Nur eine kleine Population (5-20 %) überlebt: die Gedächtniszellen (*memory cells*). Bei einer Reinfektion mit dem bereits dem Immunsystem bekannten Erreger (Antigen) können diese Gedächtniszellen sofort Effektormoleküle sezernieren, die erneut eine klonale Expansion einleiten, sodass frühzeitig sekundäre Effektorzellen entstehen, die zu einer deutlich schnelleren Immunantwort führen als zu Zeiten der Erstinfektion. Dadurch besitzen diese Gedächtniszellen stammzellartige Charakteristika, da sie sich erneut differenzieren und

prolifrieren können [112]. Der Kreislauf, den die CD8⁺ T-Zellen von inaktiven naiven Zellen (T_{NC}) zu effektiven Zellen und letztendlich zu Gedächtniszellen durchlaufen, ist in der letzten Dekade vielfach von Wissenschaftlern untersucht worden. Ursächlich hierfür ist die Beobachtung durch Analyse verschiedenster Oberflächenmarker und Genexpressionen, dass T-Zellen sich nur sukzessive über bestimmte Stadien hinweg von Effektorzellen zu Gedächtniszellen weiterentwickeln können [113, 114]. Die wohl unumstrittenste Erkenntnis bezüglich CD8⁺ Gedächtniszellen ist das Vorliegen differenzierter zentraler Gedächtniszellen (T-cell central memory, T_{CM}) und Effektor-Gedächtniszellen (T-cell effector memory, T_{EM}) sowie den terminal differenzierten Effektor-Gedächtniszellen (T_{EMRA}) in einer koexistierenden heterogenen Gedächtniszellpopulation [115, 116]. Die Differenzierung von naiven T-Zellen T_{NC} und T_{CM} sowie den T_{EM/EMRA} gelingt durch Nachweis der Expression des C-C-Chemokin Rezeptor Typ 7 (CCR7-Rezeptors) auf der Oberfläche mancher T-Zellen (über das CCR7-Gen), der auch als Oberflächenprotein CD197 bezeichnet wird. Bindet CCR7 an seine Liganden CC-Chemokin Ligand 19 und 21 (CCL19 und CCL21), die in hohen Konzentrationen in den hochendothelialen Venolen und den Stromazellen der T-Zone der lymphatischen Organe vorhanden sind [117], werden Integrine aktiviert, die Adhäsion und Transmigration in den Lymphknoten vermitteln [118]. Daher wird dieser Rezeptor auch als *Homing-Rezeptor* der T-Zellen bezeichnet. T_{CM}, die diesen Rezeptor exprimieren, dienen funktionell keiner direkten Antigenbekämpfung, sondern wirken indirekt über eine hochpotente Stimulation von antigenpräsentierenden dendritischen Zellen. T_{CM} besitzen die Fähigkeit zur Proliferation über IL2 und Differenzierung innerhalb der Lymphknoten (daher ist die Expression von CCR7 so wichtig), sodass sie bei sekundärem Antigenkontakt den CCR7-Rezeptor verlieren und sich zu Effektor Gedächtniszellen weiterentwickeln. T_{EM} exprimieren statt CCR7 andere Rezeptoren, die es ihnen ermöglichen direkt in die Areale des Inflammationsgeschehens zu migrieren. Somit besitzen sie eine unmittelbare Abwehrfunktion im Sinne der primären Effektorzellen [115, 119]. Zusätzlich zum Oberflächenmarker CD197 (CCR7) gelingt anhand der Expression des Oberflächenproteins CD45RA die Differenzierung T_{NC/CM} und T_{EM/EMRA}, sodass mittels dieser zwei Oberflächenmarker eine phänotypische

Differenzierung der Subpopulationen der CD8⁺ T-Zellen möglich ist (Abbildung 1) [115].

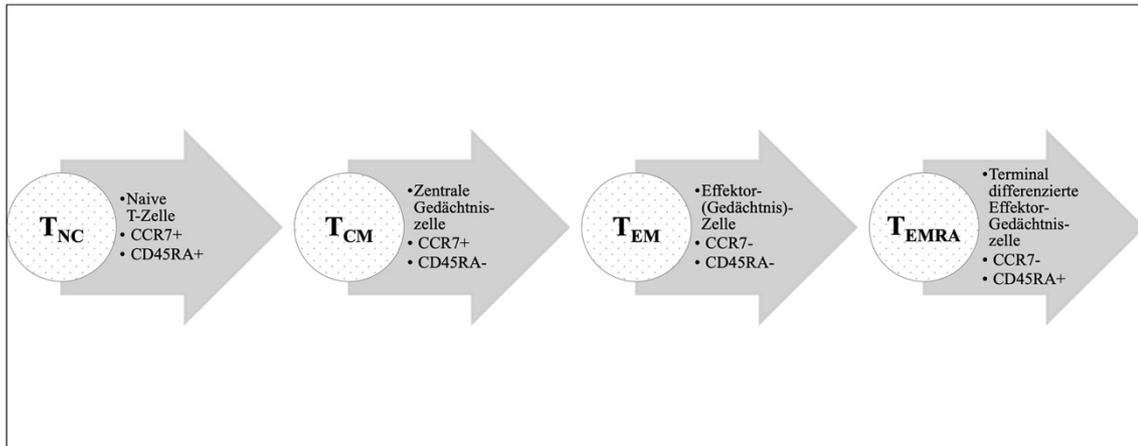


Abb. 1: Vereinfachte schematische Darstellung zur Einteilung der CD8⁺ T-Zellen in ihre Subpopulationen*.

CD8⁺ T-Zellen werden nach *Sallusto et al. (1999 und 2004)* und *Geginat et al. (2003)* anhand von Oberflächenmolekülen unterteilt in naive T-Zellen T_{NC} (CCR7⁺, CD45RA⁺), zentrale Gedächtnis-T-Zellen T_{CM} (CCR7⁺, CD45RA⁻), Effektor-Gedächtnis-T-Zellen T_{EM} (CCR7⁻, CD45RA⁻) und terminal differenzierte Effektor-Gedächtnis-T-Zellen T_{EMRA} (CCR7⁻, CD45RA⁺). *CD- Oberflächenmarker, *engl. Cluster of differentiation*.

1.2.4.6 Adaption der T-Zell vermittelten Immunantwort durch Therapie mit Fingolimod

Nach einem Model von *Pham et. al* ist S1P₁ nicht nur ein funktioneller Gegenspieler zu CCR7, vielmehr ist die Wirkung, die durch S1P₁ vermittelt wird (Lymphozytenegress aus den Lymphknoten), den Signalen, die durch CCR vermittelt werden (Homing der Lymphozyten in den Lymphknoten) überlegen [120]. Zudem konnte beobachtet werden, dass die durch FTY720 induzierte Reduktion der CD4⁺ und CD8⁺ Lymphozyten sich vorrangig auf Ebene der Subpopulationen von T_{NC}- und T_{CM}-Gedächtniszellen abspielt (Rezirkulation innerhalb der Lymphknoten), wohingegen T_{EM/EMRA}-Gedächtniszellen die Mehrheit der persistierenden peripheren Lymphozyten im Blut von Fingolimod-behandelten MS-Patienten darstellen [121].

1.3 Fragestellung und Zielsetzung der Dissertationsschrift

Grundlage für diese Dissertationsschrift sind einige wenige Forschungsarbeiten, die sich in den letzten zwanzig Jahren damit beschäftigt haben, Wege zu finden, T-Lymphozyten anhand ihres genetischen Rekombinationsmusters der variablen Domäne (V) der CDR3-Region des TZR (bspw. Beta-Kette) zu identifizieren, analog zu der Idee eines genetischen *Fingerprints der Zelle (Signatur)*, sodass eine zeitliche und örtliche Verfolgung dieser Zell-Klone (*cell Traffic*) im menschlichen Körper möglich wird. Die Hoffnungen ruhen darauf so ein besseres Grundlagenverständnis für das Verhalten von T-Lymphozyten in Krankheiten und unter diversen Therapien zu generieren und reziproke Hinweise auf noch unbekannte Antigene zu gewinnen. Ziel dieser Forschungsarbeit ist es diese bisherigen etablierten Methoden aufzugreifen, weiterzuentwickeln und exemplarisch auf MS-Patienten unter Fingolimod Therapie zu übertragen. Gegenstand der Untersuchung ist die longitudinale Charakterisierung des peripheren T-lymphozytären Repertoires von drei RRMS-Patienten unter Fingolimodtherapie (Subanalyse erfolgt anhand von zwei RRMS-Patienten), einem untherapierten PPMS-Patienten und einer gesunden Kontrolle. Die rein deskriptiven Ergebnisse werden mit Fokus auf CD8⁺ T-Zellen und deren Subpopulationen ($T_{NC/CM}$, $T_{EM/EMRA}$) festgehalten. Wurden zu dem Thema in den meisten Forschungsarbeiten zuvor meist nur quantitative Beschreibungen des peripheren lymphozytären Repertoires mittels Flow Cytometrie (Durchflusszytometrie, FACS) durchgeführt [89, 122] und nur in einzelnen Arbeiten die Genexpressionen- und Sequenzen der TZR mittels *CDR3-Spectratyping* und *Single-cell-PCR* analysiert [53, 123], fehlt es weiterhin an Arbeiten, die das TZR- β -Repertoire von MS-Patienten unter Fingolimodtherapie anhand von Diversität, Klonalität und klonaler Persistenzen bestimmen. Um einen größtmöglichen Datengewinn zu generieren, erfolgte die Methodik mittels Ergänzung durch *Next Generation Sequencing (NGS)*. Die Hypothese ist, dass durch Durchleuchtung der TZR- β -Repertoirevariabilität Unterschiede zwischen MS-Patienten mit oder ohne Fingolimodtherapie und gesunden Probanden identifiziert werden können, die eine mögliche Basis für laborchemische Instrumente zur Diagnose- und Prognosestellung in der MS dienen. Zudem sollen die analysierten TZR- β -Repertoires von MS-Patienten helfen, die

Pathophysiologie der MS besser zu verstehen und Rückschlüsse auf mögliche Antigene zu ziehen.

2 Materialien und Methoden

2.1 Ethikvotum

Nachweislich erfolgte ein positives Ethikvotum der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf unter folgenden Referenzen:

Studiennummer: MC-LKP-553

EudraCT-Nr: 2011-005732-25

Prüfplancode: Fingo_HHU

2.2 Studiendesign

Die Dissertation baut auf einem longitudinalen Zeitraum von zwölf Monaten auf, in denen drei Patienten (Patient_{B-D}: P_B, P_C, P_D), die an einer RRMS erkrankt waren, vor der erstmaligen oralen Gabe (Baseline Zeitpunkt 0 Monate, m₀) und zwölf Monate nach Erstgabe von Fingolimod (Zeitpunkt zwölf Monate, m₁₂) Blut entnommen wurde. Analog dazu wurden einer gesunden Probandin (Kontrolle_{gesund}, K_g) ohne MS-Erkrankung im selben Zeitraum Blut entnommen, sowie einem PPMS-Patienten ohne eine medikamentöse bzw. interventionelle (Basis-)Therapie (MS_u) im Zeitraum von zehn Monaten (Zeitpunkt 10 Monate, m₁₀) Blut entnommen. Quantitative Analysen zum methodischen Abgleich mit den bisherigen Forschungsarbeiten in der Literatur erfolgten mit dem Biomaterial aller drei Patienten, weiterführende qualitative Analysen im Rahmen der Methodenweiterentwicklung erfolgten mit dem Biomaterial der Patienten P_C und P_D sowie den Kontrollen MS_u und K_g.

2.3 Patientenkollektiv und Kontrollgruppe

Zugrundeliegend ist ein Patientenkollektiv von drei Patienten, die in einem Zeitraum von 1993 bis 2012 mit einer RRMS erstdiagnostiziert wurden. Im Januar 2014 erhielten diese Patienten erstmalig Fingolimod zur Therapie ihrer Grunderkrankung. Die gesammelten Daten basieren auf einem therapeutischen Fenster von zwölf Monaten. Das Patientenalter zum Zeitpunkt der Blutentnahme vor Behandlung mit Fingolimod (m_0) betrug zwischen 29 und 57 Jahren (Median: 36 Jahre). Klinisch berichteten die Patienten von Vorjahresschubraten zwischen null und vier Schüben im Jahr (Median: 0 Schübe/Jahr). Der Zeitraum ab der Erstdiagnose bis hin zur erstmaligen Behandlung der Patienten mit Fingolimod betrug zwischen 2 und 21 Jahre (Median: 5 Jahre). Patient B und C waren vor Einleitung der Fingolimodtherapie mit Glatirameracetat behandelt, eine Umstellung auf Fingolimod erfolgte bei Patientin B aufgrund von Nebenwirkungen und bei Patientin C bei Zunahme der Läsionslast. Patient D hatte in den Jahren zuvor keine Basistherapie erhalten. Kontrolldaten wurden durch einen PPMS-Patienten, der zehn Monate prior keine Basistherapie erhalten hatte und eine gesunde Probandin generiert. Das Alter der Kontrollprobanden zum Zeitpunkt der Blutentnahme m_0 betrug zwischen 23 und 46 Jahre (Median: 34,5 Jahre) (*Tabelle 1*).

Tabelle 1: Übersicht Patientenkollektiv und Kontrollen.

Proband	Geschlecht	MS-Form	Erstdiagnose	Vorherige Basistherapie	Zeitpunkt der ersten Gabe Fingolimod	Alter zum Zeitpunkt m_0
P_B	Weiblich	RRMS	1993	Glatirameracetat	01/2014	57
P_C	Weiblich	RRMS	2012	Glatirameracetat	01/2014	29
P_D	Weiblich	RRMS	2009	keine	01/2014	36
MS_u	Männlich	PPMS	2012	keine	-	46
K_g	Weiblich	-	-	-	-	23

2.4 Materialien

2.4.1 Geräte

Tabelle 2: Liste der verwendeten Geräte und deren Hersteller.

Gerät	Hersteller
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-Elektrophorese System	ThermoFisher Scientific™ Waltham, Massachusetts, USA
Gel Imager	INTAS, Göttingen, Deutschland
Illumina® Miseq™-System	Illumina, San Diego, Kalifornien, USA
Kühlgerät -20 °C	Liebherr, Bulle, Schweiz
Kühlgerät -80 °C	ThermoFisher Scientific™ Waltham, Massachusetts, USA
Mastercycler®	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Mastercycler® gradient	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Mikroskop Leica DM IL	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
MiniStar Silverline	VWR, Radnor, Pennsylvania, USA

Gerät	Hersteller
MoFlo XDP	Beckman Coulter GmbH Brea, Kalifornien USA
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
Standardmikrowelle	-
Standard Ultraviolett Lampe	-
Standardwaage	Kern, Balingen, Deutschland
Stickstofftank	Tec-lab, Taunusstein, Deutschland
Thermostat plus/ Thermomixer Comfort	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Vortexgerät: Vortex Genie 2	Scientific Industries, Inc. Bohemia, New York, USA
Wasserbecken	Memmert, Schwabach, Deutschland
Zentrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge 5810R MiniSpin®	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

2.4.2 Materialien zum einmaligen Gebrauch

Tabelle 3: Liste der verwendeten Einmalprodukte und deren Hersteller.

Einmalprodukt	Hersteller
Corning® Costar® Stripetten, serologische Pipetten, 25ml, 10ml, 5ml	Sigma Aldrich®, St. Louis, Missouri, USA
Einmalhandschuhe MICRO-TOUCH® Nitra-Tex® EP ^{TMTM}	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-Mortin®, Sheffield, England UK
Spin-Säulen	QIAquick Gel Extraction Kit 1,5mk, QIAGEN, Venlo, Niederlande
Zentrifugenröhrchen, 15ml, 50ml	Greiner bio-one, cellstar®, Kremsmünster, Oberösterreich

2.4.3 Produkte und Kits

2.4.3.1 Chemikalien, Medien und Lösungen

Tabelle 4: Liste der verwendeten Chemikalien, Medien und Lösungen, sowie deren Hersteller.

Chemikalie	Hersteller
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
Dulbecco's PBS (1x) ohne Ca ²⁺ /Mg ²⁺	Gibco™ ThermoFisher Scientific™ Waltham, Massachusetts, USA
Ethanol 75 % (hergestellt aus Ethanol 80 % verdünnt mit Nuklease-freiem Wasser)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich®, St. Louis, Missouri, USA
Ficoll/ Biocoll Separating Solution	Merck, Darmstadt, Deutschland
Fetales Kälberserum (FBS)	Gibco™ ThermoFisher Scientific™ Waltham, Massachusetts, USA

Chemikalie	Hersteller
Gene Ruler DNA Ladder Mix 0,1 µg/µl	ThermoFisher Scientific™ Waltham, Massachusetts, USA
GlycoBlue™ Coprecipitant 15mg/ml Glycogen	Ambion®, ThermoFisher Scientific™ Waltham, Massachusetts, USA
Nuklease-freies Wasser	Ambion®, ThermoFisher Scientific™ Waltham, Massachusetts, USA
PhiX Control V3	Illumina San Diego, Kalifornien
RNAse away, Surface Decontaminant	VWR, Radnor, Pennsylvania, USA
Recovery Cell Culture Freezing Medium	ThermoFisher Scientific™ Waltham, Massachusetts, USA
Sybr® Safe DNA Gel Stain	ThermoFisher Scientific™ Waltham, Massachusetts, USA
Tris-EDTA (TE) Puffer	Invitrogen, ThermoFisher Scientific™ Waltham, Massachusetts, USA
TRIzol® Reagenz	ThermoFisher Scientific™ Waltham, Massachusetts, USA
Tryptan Blau	Bio-Rad, Hercules, California, USA
VersaLyse™ Lysing Solution	Beckman Coulter Inc., Brea, Kalifornien, USA
2- Propanol 100 % Lösung zum Gebrauch	Sigma-Aldrich®, St. Louis, Missouri, USA

2.4.3.2 Kits

Tabelle 5: Liste der verwendeten Kits und deren Hersteller.

Kit	Hersteller
Advantage® 2 PCR-Kit	Takara Bio Inc., Shimogyōku, Kyoto, Japan
Qubit™ dsDNA HS-Assay Kit	ThermoFisher Scientific™ Waltham, Massachusetts, USA
MiSeq Reagent Kits V2	Illumina, San Diego, Kalifornien, USA
QIAquick Gel Extraction Kit	QIAGEN, Venlo, Niederlande
SMARTer® Race 5'3' Race Kit	Takara Bio Inc., Shimogyō-ku, Kyoto, Japan

2.4.3.3 Durchflusszytometrie Antikörper

Tabelle 6: Antikörper für FACS (Fluorescence Activated Cell Sorting).

Antigen	Fluoreszenz	Beschreibung	Hersteller
CD3	Phycoerythrin	Maus, Isotyp: IgG1	Beckmann Coulter GmbH
	(PE)	Klon: UCHT1 Katalog Nr.: A07747	Brea, Kalifornien, USA
CD4	Fluorescein isothiocyanate	Maus, Isotyp: IgG1	BD Bioscience, BD
	(FITC)	Klon: RPA-T4 Katalog Nr.: 555346	Pharmingen San Jose, Kalifornien, USA
CD8	Phycoerythrin/	Maus, Isotyp: IgG1	BioLegend®

Antigen	Fluoreszenz	Beschreibung	Hersteller
	Cyanin 7 (PE/Cy7)	Klon: SK1 Katalog Nr.: 344712	San Diego, Kalifornien, USA
CD197/ CCR7	Alexa Fluor 647	Ratte, Isotyp: IgG2 _a Klon: 3D12 Katalog Nr.: 557734	BD Bioscience, BD Pharmingen San Jose, Kalifornien, USA
Nucleus/ DNA	4', 6-Diamidin-2- phenylindol (DAPI)	Katalog Nr.: D1306	ThermoFisher Scientific™ Waltham, Massachusetts, USA

2.4.3.4 Primer

2.4.3.4.1 Primer cDNA- Synthese und TCR- Bibliothek (Library)

Tabelle 7: Primer, Sequenzen und Quellen der Primer.

Primer	Sequenz	Quelle
TCR_Beta	AAC ACA GCG ACC TCG GGT GGG A	Referenz [124]
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	SMARTer® Race 5'3'Race Kit, Clontech Laboratories, Inc.
5' Race CDS Primer A 12 µM	TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TVN	SMARTer® Race 5'3'Race Kit, Clontech Laboratories, Inc.

Primer	Sequenz	Quelle
SMARTer II A Oligonukleotide	AAG CAG TGG TAT CAA CGC AGA GTA CXX XXX	SMARTer® Race 5'3' Race Kit, Clontech Laboratories, Inc.
FS_RACE	ACA CTC TTT CCC TAC ACG ACG CTC TTC CGA TCT AAG CAG TGG TAT CAA CGC AGA GT	Teile des Long Primers aus dem SMARTer® Race Amplification Kit und Illumina Adapter Sequenz** (Referenz [125])
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**(Referenz [125])
Reverse-III- AdP2_BC_X	CAA GCA GAA GAC GGC ATA CGA GAT BARCODE* G TGA CTG GAG TTC AGA CGT GTG CTC TTC CGA TCT	Illumina Adapter Sequenz** mit einer variablen Barcode Sequenz (Referenz [125])
Forward-III- AdP2_BC_X	5' AAT GAT ACG GCG ACC ACC GAG ATC TAC AC BARCODE* AC ACT CTT TCC CTA CAC GAC GCT CTT CCG ATC T 3'	Illumina Adapter Sequenz** mit einer variablen Barcode Sequenz (Referenz [125])

* Die mit *BARCODE* markierten Sequenzen wurden jeweils durch einen Illumina Barcode aus Tabelle 8 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.

2.4.3.4.2 Illumina® TruSeq DNA- und RNA-Indexes

Tabelle 8: Bezeichnung und Sequenzen der Illumina® Barcodes.

8 Indices (5'-3') für Forward-III-AdP2_BC_X* Index 2 (i5) Adapter	12 Indices (5'-3') für Reverse-III-AdP2_BC_X* Index 1 (i7) Adapter	12 Indices (5'-3') für Reverse-III-AdP2_BC_X* in der für die Implementierung benötigten reverse-complement Form*
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 GTACTGAC	D708 TAATGCGC	D708 GCGCATTA
	D709 CGGCTATG	D709 CATAGCCG
	D710 TCCGCGAA	D710 TTCGCGGA
	D711 TCTCGCGC	D711 GCGCGAGA
	D712 AGCGATAG	D712 CTATCGCT

* Die mit BARCODE dargestellten Sequenzen in Tabelle 7 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.)

2.5 Methoden

Die Methodik entstand in Kooperation mit 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 [126] und der Dissertationsschrift „*Effekt von Fingolimod (FTY720/Gilenya®) auf das periphere Immunrepertoire von CD4+ T-Zellen und deren CCR7+ und CCR7- Subpopulationen bei Multiple Sklerose Patienten*“ von Pia Heike Schüttfort [127].

2.5.1 Übersicht

Ziel der experimentellen Methodik ist die bioinformatische Datenprozessierung aus Gensequenzen, genauer aus komplementärer Desoxyribonukleinsäure (cDNA) der β -Kette des TZR, die mittels multipler laborchemischer Verarbeitungsprozesse aus EDTA (Edetinsäure)-Blut generiert wird (*Abbildung 2*). Die erforderlichen experimentellen Arbeitsschritte basieren zum einen auf bereits etablierten Protokollen und Kits, zum anderen auf eigenen PCR-Protokollen, die im Rahmen dieser Dissertation entwickelt wurden.

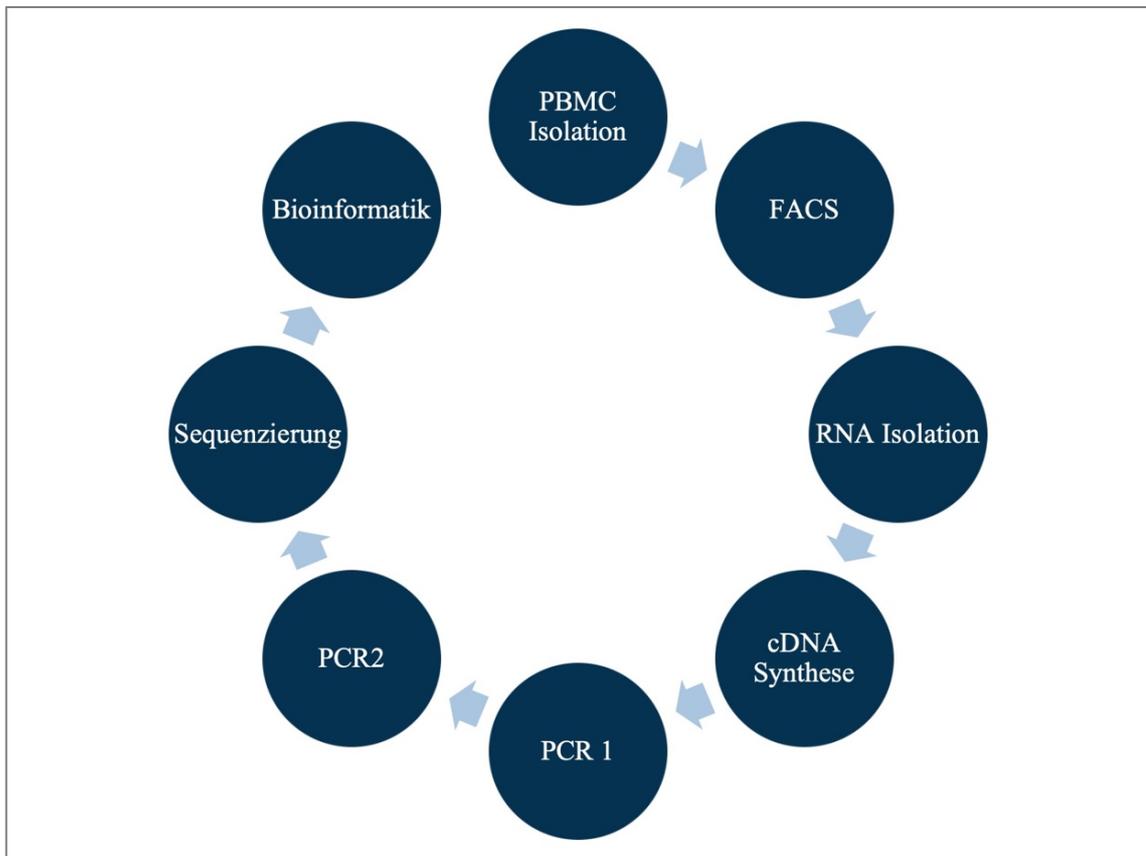


Abb. 2: Überblick der experimentellen Arbeitsschritte bis zur bioinformatischen Datenprozessierung

2.5.2 PBMC-Isolation

Mononukleäre Zellen wurden aus dem peripheren Blut (peripheral blood mononuclear cells, PBMC) gemäß eigenem Protokoll auf Basis gängiger Standardprotokolle aus 25 ml EDTA-Blut isoliert. Als Pufferlösung diente eine phosphatgepufferte Salzlösung (phosphate buffered Saline, PBS), die in einem Mischverhältnis von 1:1 zu den 25 ml EDTA-Blut hinzugegeben wurde. Die daraus entstandene Blut-/Pufferlösung wurde auf eine separierende Ficoll/Biocoll-Lösung pipettiert, ohne dabei eine Mischung der Substanzen zu provozieren. Nach einer Zentrifugation mit 2000 rpm für 30 Minuten bei Raumtemperatur zeigte sich das Material in vier Phasen separiert (*Abbildung 3*), die

makroskopisch oft nur in drei Hauptphasen unterschieden werden können (Plasmaüberstand, PBMC und Ficoll).

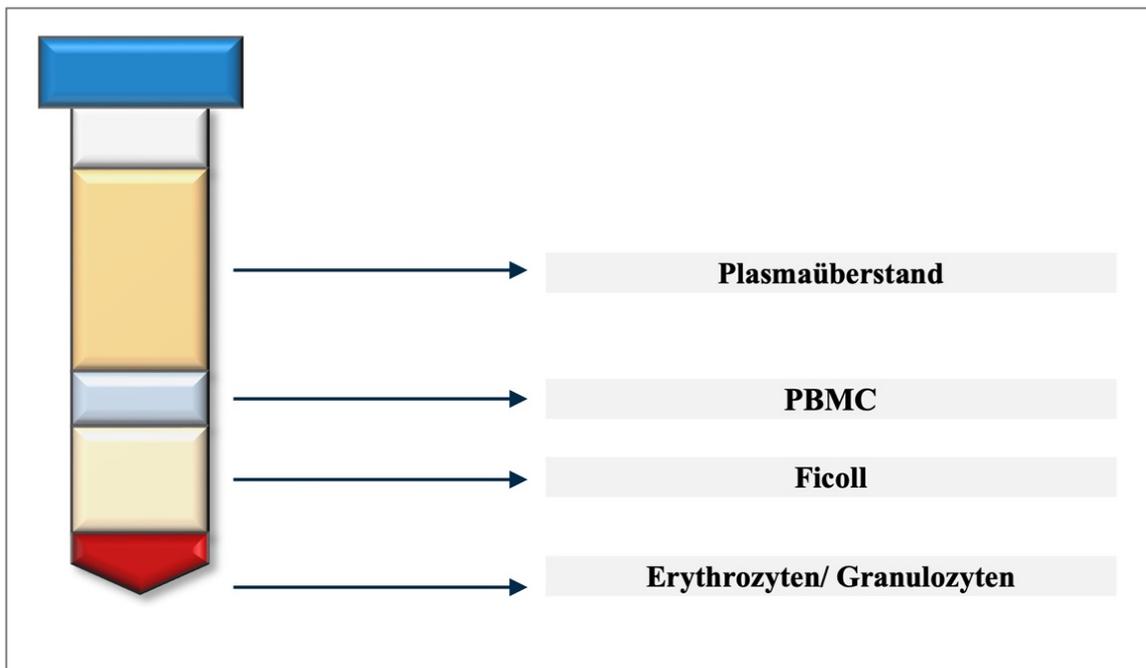


Abb. 3: Phasenseparation im Eppendorf-Gefäß nach Hinzufügen einer separierenden Ficoll/Biocollo-Lösung zum Ausgangsmaterial (Blut).

Plasmaüberstand wurde entfernt und die mittlere PBMC-Phase abpipettiert, gesammelt und erneut in einem 1:1- Verhältnis mit PBS gemischt. Nach erneuter Zentrifugation mit 300 g für 30 Minuten wurde erneut der Überstand entfernt und das PBMC-Pellet (Bodensatz) in 1-1,5 ml (abhängig von der Größe des Pellets) VersaLyse™ Lysing Solution gelöst. Nach einer Inkubationszeit in Dunkelheit von 20 Minuten wurde die Lösung mittels PBS auf ein Gesamtvolumen von 50 ml aufgefüllt. Nach einer Zentrifugation bei 300 g für 30 Minuten wurde erneut der Überstand entfernt. Zu diesem Zeitpunkt konnten die Zellen entweder gezählt und direkt weiterverarbeitet werden oder aus Zeitgründen nach Standardprotokollen eingefroren werden (in der experimentellen Methodik für diese Dissertationsschrift erfolgte eine Kryoarchivierung).

Im Kontext der Kryokonservierung wurden die Zellen mittels *Neubauer Zählkammer* unter dem Mikroskop ausgezählt, mit Einfriermedium (Recovery Cell Culture Freezing Medium) versetzt (10 Millionen Zellen auf 1 ml Einfriermedium) und anschließend sofort bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren.

2.5.3 Durchflusszytometrie/ *Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS)*

Zur Vorbereitung auf die durchzuführende FACS-Analyse erfolgte zunächst ein schonendes und zeitgerechtes Auftauen der kryokonservierten PBMCs im Wasserbad bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Anschließend wurden die PMBC-Pellets mit Medium (Dulbecco's Modified Eagle Medium, DMEM versetzt mit 2 % fetal bovine serum, FBS) zur Entfernung des Freezing Mediums insgesamt zwei Mal gewaschen, indem nach Zentrifugation mit 300 g bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ für zehn Minuten der Überstand jeweils entfernt wurde und neues Medium hinzugegeben wurde. Nach dem zweiten Waschvorgang erfolgte eine 20-minütige Inkubationszeit mit fluoreszierenden monoklonalen Antikörpern. Hierfür wurde das PBMC-Pellet insgesamt mit 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 versetzt (*Tabelle 6*). Letztendlich wurde die Probe auf ein Gesamtfärbervolumen von 100 μl mit FACS-Puffer (PBS+ 2 % FBS) aufgefüllt und auf Eis für 20 Minuten verdunkelt inkubiert. Danach erfolgten zur Entfernung der überschüssigen Antikörper erneut zwei Waschvorgänge mit jeweils 1 ml FACS-Puffer und anschließender Zentrifugation mit 300 g, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 10 Minuten sowie der Entfernung des Überstandes. Schlussendlich wurden die gefärbten Zellen erneut mit 1 ml FACS-Puffer versetzt auf Eis gelagert und direkt zur weiterführenden FACS-Analyse und Zellsortierung transportiert. Diese wurde mit Hilfe der *Core Flow Cytometry Facility* des Instituts für Transplantationsdiagnostik und Zelltherapeutika des Universitätsklinikums Düsseldorf durch den MoFlo XDP von Beckmann Coulter durchgeführt. Grafisch ließ sich ein Dotplot-Diagramm basierend auf einem FACS-Calibur darstellen.

Die Durchflusszytometrie ermöglicht durch unterschiedliche Größen und Granularitäten der Zellen eine Differenzierung der Zellen untereinander. Konsekutiv kann auf Basis der

jeweiligen detektierbaren Fluoreszenzen die Oberflächenantigenexpression der Zellen bestimmt werden.

Lymphozyten wurden zunächst mittels CD3 Antikörper-Fluoreszenz (PE) ermittelt und weiterführend mittels CD4 und CD8 Antikörper-Fluoreszenz (FITC und PE/Cy7) nach T-Helferzellen und zytotoxischen T-Zellen sortiert. Zum Zeitpunkt der ersten Experimentreihen vom Ausgangsbiomaterial von Patientin B fand die FACS-Analyse mit der Differenzierung der Populationen an T-Helferzellen und zytotoxischen T-Zellen ein Ende. Im weiteren methodischen Verlauf der Experimente erfolgte jedoch an dieser Stelle ausgehend vom EDTA-Blut der Patienten C und D sowie der Kontrollen K_g und MS_u eine weiterführende Sortierung der Zellen anhand der CD197 Antikörper-Fluoreszenz (Alexa Fluor 647) nach CCR7⁺ und CCR7⁻ T-Zellen.

Schlussendlich gelang so mittels FACS-Prozessierung die Sortierung in CD3⁺CD8⁺CCR7⁺ naive T-Zellen (T_{NC}) und zentrale Gedächtnis- T-Zellen (T_{CM}) sowie CD3⁺CD8⁺CCR7⁻ Effektorgedächtnis-T-Zellen (T_{EM}) und deren terminaler Form (T_{EMRA}). Äquivalent hierzu wurden Sortierungen der CD4⁺ Zellpopulationen durchgeführt. Die Durchflusszytometrie ermöglichte die Erfassung der totalen/absoluten Zellzahl der PBMCs, allerdings konnten angesichts des limitierten Fassungsvermögens der Eppendorf-Gefäße nur maximal 400.000 Zellen als Obergrenze asserviert werden. Die in multiplen Vorexperimenten etablierte Gatingstrategie ist exemplarisch am Beispiel einer Kontrollprobe eines gesunden Probanden in *Abbildung 4* dargestellt.

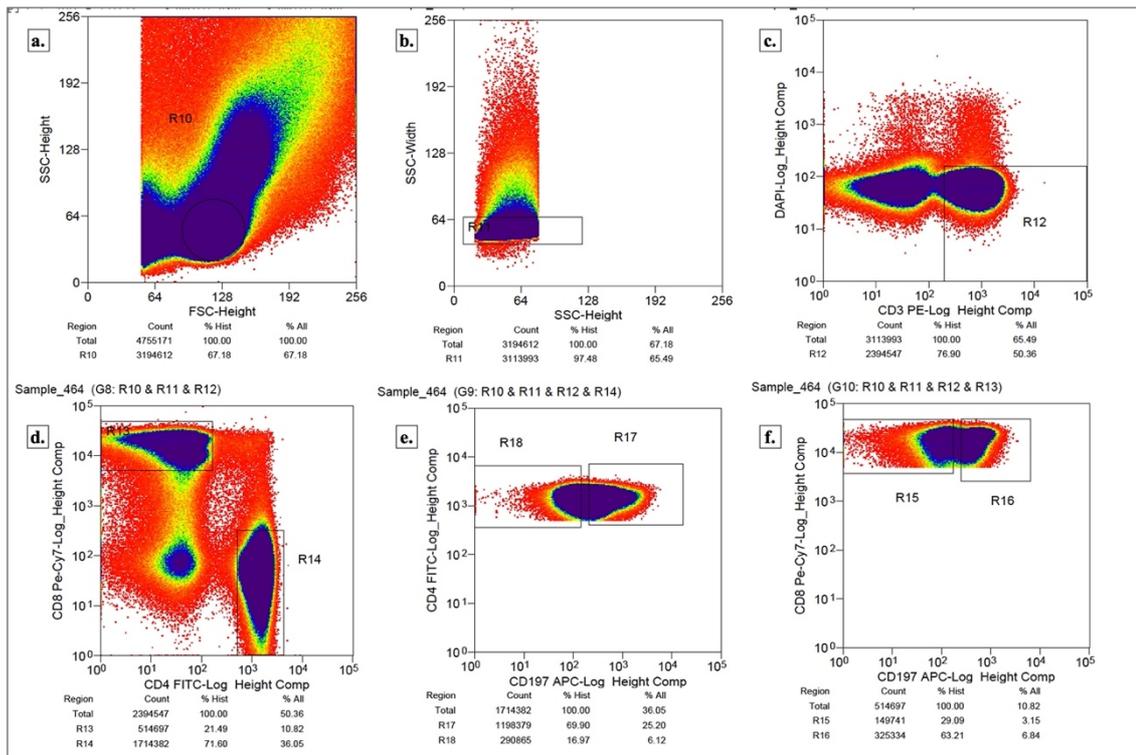


Abb. 4: Durchflusszytometrie (FACS) anhand von Oberflächenmarkern (CD) von T-Lymphozyten im Dotplot auf logarithmischer Skala am Beispiel der Kontrolle Kg (gesunder Proband).

Grundsortierung der Zellen mittels Vorwärtsstreulicht (FSC) und Seitwärtsstreulicht (SSC) auf Basis von Zellgröße und Zellgranularität (a.-b.). Durch Sortierung von CD3⁺ und DAPI⁺ Zellen gelingt die Abgrenzung der noch lebenden intakten CD3⁺-T-Zellpopulation (R12) (c.). Durch humane CD4⁺ und CD8⁺ Antikörper erfolgt die Differenzierung der CD4⁺ T-Helferzellen (R14) von den CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen (R13) (d.). Die jeweiligen CD4⁺ und CD8⁺ Zellpopulationen werden final auf Basis des CD197⁺ Antikörpers exemplarisch für CD8⁺ T-Zellen in CCR7⁺ und CCR7⁻ Populationen in naive T-Zellen (T_{NC})/ zentrale Gedächtnis-T-Zellen (T_{CM}) und Effektorgedächtnis-T-Zellen (T_{EM})/ und deren terminaler Form (T_{EMRA}) unterteilt (R16 und R15) (f.).

2.5.4 Isolation der Boten-Ribonukleinsäure (messenger ribonucleic acid, mRNA)

In Vorbereitung auf alle weiterführenden Arbeitsprozesse erfolgte eine Reinigung aller Arbeitsflächen und Materialien mit 70 % Ethanol, RNA-freien Tüchern und RNase Away Spray. Die mRNA-Isolation basierte auf den Herstellerprotokollen des TRIzol®-Reagenz. Zunächst wurden die jeweiligen Zellpopulationen in ein Falcon mit 15 ml

DMEM+ 2 % FBS überführt, vorsichtig gelöst und anschließend mit 300 g, 4 °C für zehn Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Pellet erneut in 1 ml DMEM+ 2 % FBS gelöst und in ein steriles Eppendorf-Gefäß überführt. Es erfolgte eine erneute Zentrifugation mit 300 g bei 4 °C für zehn Minuten mit erneuter Entfernung des Überstandes. Letztendlich konnte ca. 0,1 ml Pellet im sterilen Eppendorf-Gefäß belassen werden, auf das nun 1 ml TRIzol®-Reagenz pipettiert werden konnte. TRIzol®- Reagenz ist ein Säure-Guanidinium-Phenol-basiertes Reagenz, das es ermöglicht durch Inhibition der RNase-Aktivität trotz Abbauprozesses der Zelle und Lösung von Zellkomponenten eine intakte (m-)RNA zu belassen. Nach Hinzugabe von TRIzol® erfolgte ein leichtes Resuspendieren mit anschließender Inkubation bei Raumtemperatur von fünf Minuten. Danach wurden 200 µl Chloroform zur Phasenseparation hinzugegeben und das Eppendorf-Gefäß 15 Sekunden per Hand vorsichtig zum Suspendieren gewendet, woraufhin erneut drei Minuten Inkubation bei Raumtemperatur folgten. Als Nächstes wurde eine Zentrifugation für 15 Minuten mit 12.000 g bei 4 °C durchgeführt, wonach im Eppendorf-Gefäß makroskopisch zwischen drei Phasen unterschieden werden konnte (*Abbildung 5*).

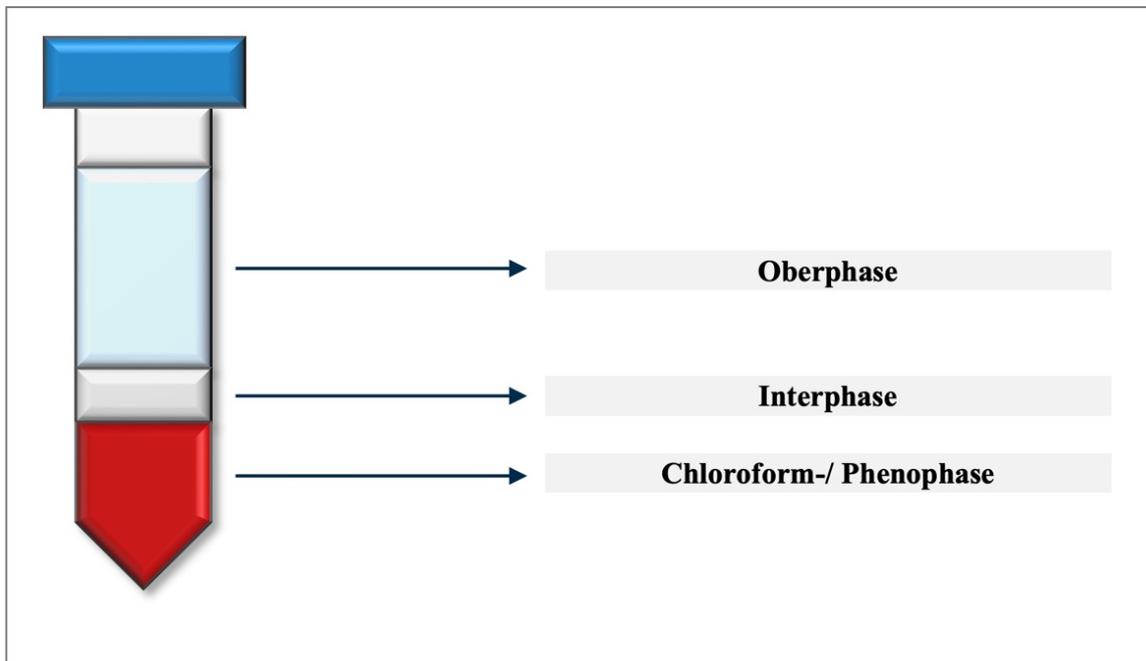


Abb. 5: Phasenseparation im Eppendorf-Gefäß nach Hinzufügen von Chloroform während der Isolation der Ribonukleinsäure (RNA).

Obere wässrige Phase mit Anteilen an RNA, mittlere Phase (Interphase) als Zwischenphase, teils vermischt mit Proteinen, untere Chloroform-/Phenolphase mit organischen Resten (bspw. Proteine, Lipide).

Zur Darstellung kam eine farblose wässrige obere RNA-Phase, sowie eine mittlere Interphase und eine untere rötliche Phenol-/Chloroformphase (organische Phase: bspw. Proteine, Lipide). Die farblose RNA-Phase wurde vorsichtig abpipettiert, in ein neues steriles Eppendorf-Gefäß überführt und mit 10 μ l GlycoBlue® gefärbt. GlycoBlue® enthält das für Nukleinsäuren wichtige Fällungsmittel Glykogen sowie einen blauen Farbstoff, der es leichter ermöglicht die Sichtbarkeit des Pellets zu erhöhen. Zusätzlich wurde nun mit 500 μ l 100 % Isopropanol gemischt. Nach zehn Minuten Inkubation bei Raumtemperatur und anschließender Inkubation für 20 Minuten bei -20 °C folgte eine Zentrifugation für zehn Minuten mit 12.000 g und 4 °C. Anschließend wurde der Überstand von der bläulichen RNA-Phase entfernt und diese mit 1 ml 75 % Ethanol gemischt. Durch das Vortexgerät erfolgte eine Mischung der Probe unter Vibration nach der anschließend erneut für fünf Minuten bei 7500 g und 4 °C zentrifugiert wurde. Der

Ethanol-Überstand wurde erneut entfernt und das Pellet im Eppendorf-Gefäß kopfüber an der Luft getrocknet. Schlussendlich wurden 20 µl Nuklease-freies Wasser zur Lösung der mRNA hinzugefügt und die Probe bei -80 °C bis zum nächsten methodischen Schritt eingefroren und aufbewahrt.

2.5.5 cDNA-Synthese

2.5.5.1 Übersicht

Ausgangspunkt der zu etablierenden Gensequenz-Bibliothek (*Library*) für die β -Kette des TZR (TZR- β) durch *Next Generation Sequencing (NGS)* war die Synthese von cDNA aus der zuvor isolierten mRNA. Vollständige Genom-Bibliotheken auf Basis von vollständiger DNA sind äußerst groß und umfassen sowohl kodierende (Exons) als auch nicht kodierende Abschnitte (Introns), wohingegen cDNA auf Basis der bereits prozessierten mRNA synthetisiert wird und somit nur aus kodierenden Abschnitten besteht. cDNA-Bibliotheken umfassen vorrangig zwar nur bestimmte Gensegmente aus Gewebe/Zellen zu einem bestimmten Zeitpunkt im Organismus, haben allerdings den Vorteil gegenüber Genombibliotheken, dass sie kleiner und somit handlicher in ihrer Auswertung sind. Gegenüber reinen Transkriptom-Bibliotheken gibt es zudem einen laborchemischen Vorteil in der Generierung von cDNA-basierten Bibliotheken: cDNA ist deutlich verwendungsstabiler als mRNA.

2.5.5.2 Laborchemische Prozessierung der cDNA

Zur Synthese von komplementärer cDNA aus der vorbestehenden mRNA mittels Reverse-Transkriptase-Reaktion wurde mit dem *SMART[®]er RACE 5'/3'-Kit* von Clontec[™] und dem entsprechenden Protokoll gearbeitet. Die einzelnen Syntheseschritte werden schematisch in *Abbildung 6* dargestellt. Auf Basis von Erfahrungswerten vorheriger Experimente (v.a. quantitativen RNA-Analysen) konnte der Materialverbrauch im Vergleich zum Ausgangsprotokoll des Herstellers halbiert werden, da die Halbierung weiterhin eine Konvertierung von etwa 10 ng bis 1 µg mRNA in cDNA ermöglicht (zu erwartende Menge an RNA befindet sich auf Basis vorheriger

Experimente in genau diesem Zielbereich). Für alle weiteren laborchemischen Schritte ist zu erwähnen, dass jeweils eine Negativkontrolle als auch eine Positivkontrolle hergestellt wurde, die jeweils nur mit der Hälfte der in den Protokollen erwähnten Materialien bearbeitet wurden.

Zunächst wurde ein so genannter erster *Buffer-mix* bestehend aus 5x 2 µl *First-strand-Buffer*, 0,25 µl DTT (Dithiothreitol) und 0,5 µl dNTPs (Desoxy Nukleosidtriphosphat) für jede einzelne RNA-Probe hergestellt, sodass pro *Buffer-mix* ein Gesamtvolumen von 2,75 µl bestand. In einem nächsten Schritt wurden in ein steriles 0,5 ml Eppendorf-Gefäß 5 µl RNA- Lösung mit 0,5 µl 5' CDS Primer A pipettiert und in einer Mikrozentrifuge kurz gemischt (totales Volumen 5,5 µl). Anschließend folgte eine Inkubationszeit in einem Thermocycler von 3 Minuten bei 72 °C und nachfolgend eine Kühlphase bei 42 °C für 2 Minuten. Währenddessen konnte ein endgültiger *Mastermix* hergestellt werden. Dieser bestand aus dem bereits angelegten *Buffer-mix* (2,75 µl), sowie 0,25 µl RNase Inhibitor und 1 µl *SMART Scribe Reverse Transcriptase* (totales Volumen des Mastermix von 4µl). Nach der Kühlphase des RNA-Gemisches wurden die 0,5 ml Eppendorf-Gefäße für 10 Sekunden bei 14.000 g zentrifugiert und 0,5 µl SMARTer II Oligonucleotide für die cDNA-Synthese hinzugefügt. Zum Abschluss wurde nun auch der gesamte *Mastermix* in das 0,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt, sodass ein Gesamtvolumen von 10 µl entstand. Nach vorsichtiger Durchmischung mittels Pipettierung und kurzem Spin in der Mikrozentrifuge wurde die Probe erneut in den Thermocycler überführt und bei 42 °C für 90 Minuten inkubiert und anschließend für zehn Minuten auf 70 °C erhitzt. Vor weiterführender Prozessierung der Proben mittels PCR erfolgte die Hinzugabe von Tricine EDTA Puffer, gemäß Herstellerangaben bei einer zu erwartenden Menge von <200 ng RNA mit 10 µl EDTA- Puffer.

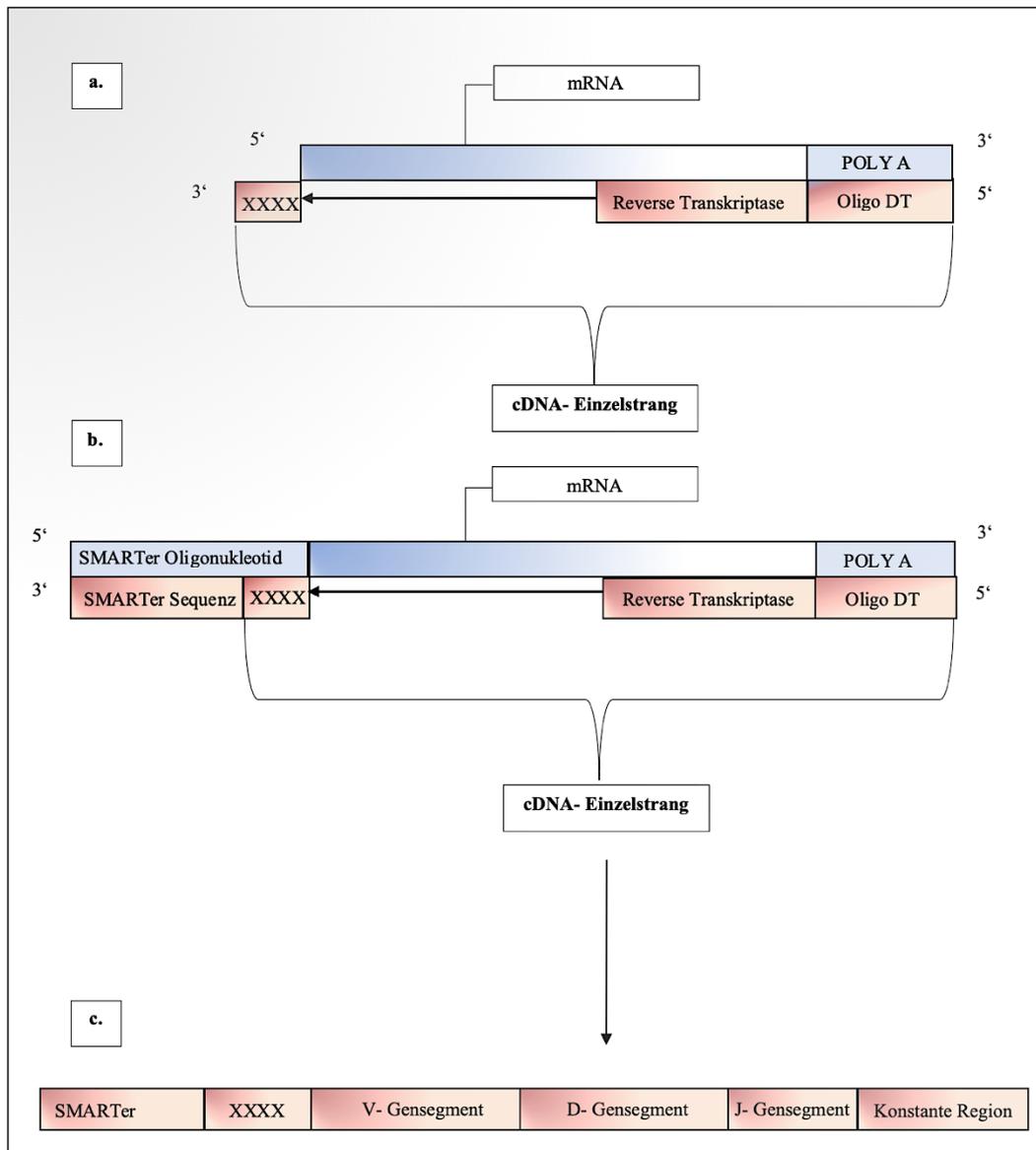


Abb. 6: Schematische Darstellung der cDNA-Synthese mittels SMART[®]er RACE 5'/3'-Kit von ClontecTM gemäß Herstellerprotokoll.

Sobald die SMARTScribe Reverse Transkriptase ausgehend von einem Oligo(dt)Primer das 5'-Ende der mRNA erreicht, fügt sie durch ihre eigene endständige Transferaseaktivität einige neue Nucleotide (XXXX) als Signalpeptid zum 3'-Ende des neuen cDNA-Einzelstranges hinzu (a.). An diese neu hinzugefügten Nucleotide binden modifizierte Basen des terminalen Endes eines SMARTer II A Oligonucleotids, sodass die vorbekannte Oligonucleotid-Sequenz als weitere Vorlage von der Reversen Transkriptase durch einen *Template-Switch* verwendet und in den neuen cDNA-Einzelstrang integriert wird (b.). Als Resultat entsteht eine Einzelstrang-cDNA der β -Kette des T-Zell-Rezeptors (TZR- β) (c.).

2.5.6 Etablierung eines PCR-Stufenplans zur Generierung einer cDNA-basierten T-Zell-Rezeptor-Bibliothek (*TZR-library*)

2.5.6.1 Konzeptionelle Übersicht des PCR-Protokolls

Grundlage für die folgenden experimentellen Schritte ist die Idee eines Primer-basierten Bauplans, der es ermöglicht, bekannte Sequenzen so in die cDNA-Matrix zu integrieren, dass anhand der bekannten Sequenz eine Probendifferenzierung innerhalb eines Sequenzierungsvorganges möglich ist. Die bekannte Sequenz stellt somit indirekt eine Art spezifischen *Fingerprint* der Probe (Zellpopulation) dar und wird als Barcode bezeichnet. Bereits 2013 etablierte eine Arbeitsgruppe um *Christopher Vollmers et al.* an der Stanford University diesen schrittweisen Stufenplan der *Library*-Präparation [125]. Da dies allerdings im Rahmen von molekulargenetischen Forschungen zu Influenza Vakzinen im Kontext von B-Zell-Bibliotheken (*libraries*) erfolgte, bedurfte es im Rahmen dieser Dissertationsforschung mit Fokus auf T-Zellen einer Reorientierung bezüglich der zu verwendenden T-Zell-Primer [124]. Alle verwendeten Primer sind im Abschnitt 2.4.3.4 *Primer* zu finden. Eine generelle Übersicht der einzelnen Syntheseschritte (Bauplan) ist in der vereinfachten schematischen Darstellung in *Abbildung 10* zu finden.

2.5.6.2. PCR 1: Integration der ersten Illumina® Adapter Sequenz

Zunächst erfolgte eine Amplifikation der zuvor synthetisierten cDNA mittels *Advantage 2 PCR-Kit* von Clontec™. Weiterhin wurden zur Validierung der PCR neben den Forschungsproben sowohl eine Negativkontrolle (Nuklease-freies Wasser anstatt cDNA) als auch eine Positivkontrolle (bekannte cDNA) in die Experimentreihen hinzugefügt.

Es erfolgte die erneute Herstellung eines *Mastermix*. Je Probe bestand dieser aus 2,5 µl Advantage 2 PCR-Puffer, 0,5 µl Advantage 2 Polymerase Mix (Taq-Polymerase), 0,5 µl dNTPs und 18 µl Nuklease-freiem Wasser. Anschließend wurden zu dem bestehenden *Mastermix* mit einem Gesamtvolumen von 21,5 µl jeweils 0,5 µl des *Forward-RACE-III-adPI Primer* und des *TCR-beta-III-adPI Primer (Reverse Primer)* hinzupipettiert. Zum Schluss wurden jeweils pro *Mastermix* 2,5 µl der entsprechenden Proben cDNA

hinzugefügt (Gesamtvolumen 25 μ l). Das PCR-Programm wurde auf Basis der Primer und abhängig von der Ausgangszellzahl programmiert. Es wurden vor allem die letzten Zyklen adaptiert: 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. Das PCR 1 Programm für den Thermocycler ist in *Abbildung 7* dargestellt.

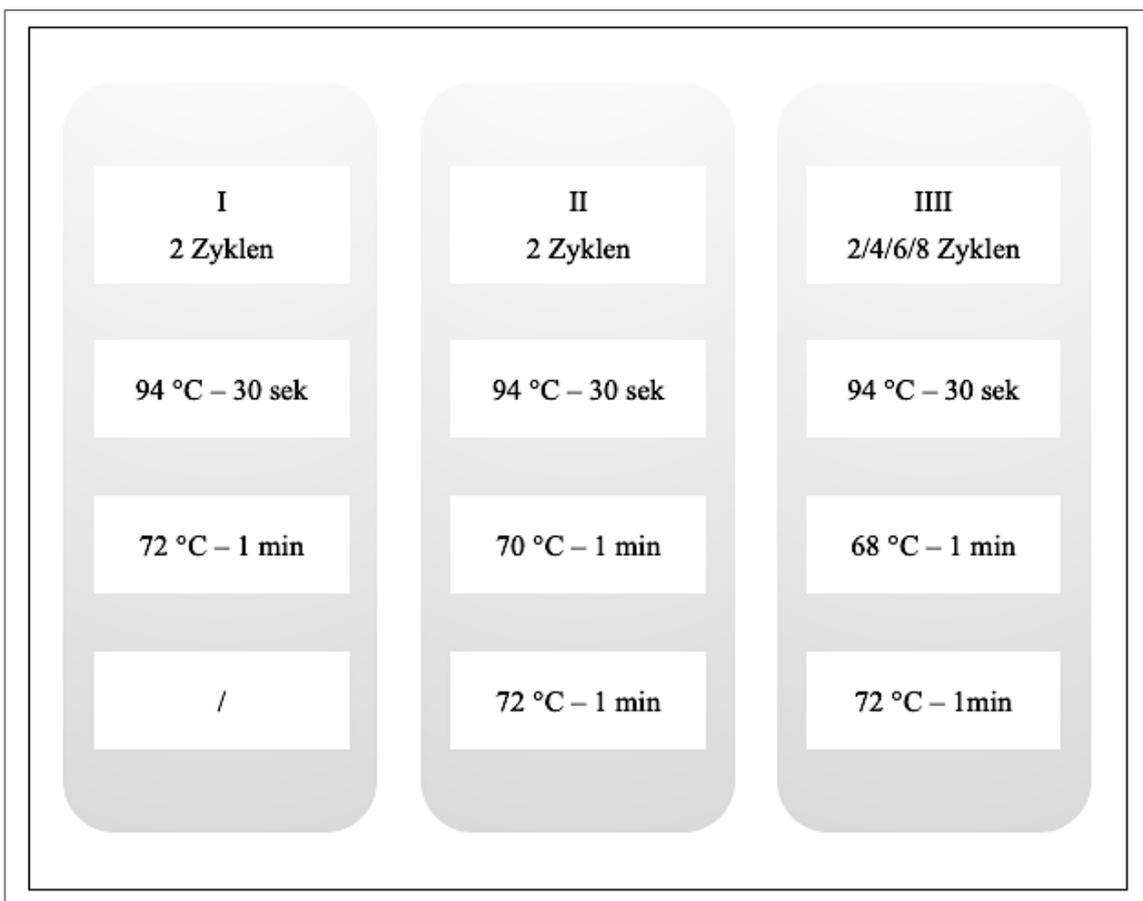


Abb. 7: PCR 1 Programm: Integration der ersten Illumina® Adapter Sequenz.

2.5.6.3. Aufreinigung mit magnetischen Beads

Die Aufreinigung mittels magnetischer *Beads* erfolgte auf Basis des *AgentCourt AMPure XP* Protokolls in zweifacher Ausführung. *Beads* sind magnetische Kügelchen mit

Siliciumdioxid-Oberflächen, die selektiv DNA (PCR-Produkt > 100 Basenpaare, bp) binden, die anschließend mittels Magneten von ungebundenen dNTPs, Primern, Salzen und anderen Kontaminanten und Abbauprodukten gereinigt werden können.

Die Proben und Kontrollen wurden in einem Verhältnis von 5:4 mit der AgentCourt AMPure XP Lösung versetzt. Die 25 µl Gesamtvolumen des PCR-Produkts wurden zuvor zur Erhöhung des Gesamtvolumens auf 50 µl mit 25 µl Nuklease-freiem Wasser ergänzt, sodass letztendlich 40 µl der AgentCourt AMPure XP zu dem PCR-Produkt hinzu pipettiert und mittels 10-facher Pipettierung gemischt wurde. Anschließend erfolgte eine Inkubation bei Raumtemperatur für fünf Minuten und folgend für zwei Minuten eine Platzierung in der *AgentCourt SPRIPlate 96* Supermagneten Platte. Durch den Magneten konnten die DNA-gebundenen-*Beads* isoliert werden, in dem der Überstand abpipettiert und verworfen werden konnte. Die DNA-gebundenen-*Beads* wurden mit 200 µl Ethanol 70 % bei Raumtemperatur gewaschen, die flüssige Phase nach 30 Sekunden entfernt und anschließend erneut mit Ethanol gewaschen. Nachdem die Proben an der Luft getrocknet wurden, erfolgte zur Lösung der DNA von den *Beads* eine Hinzugabe von Nuklease-freiem Wasser außerhalb des Supermagneten. Daraufhin wurde die Probe erneut im Magneten platziert und die von den *Beads* losgelöste DNA in der flüssigen Phase abpipettiert und in ein steriles Eppendorf-Gefäß überführt. Das asservierte Volumen wurde mit Nuklease-freiem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 50 µl erneut aufgefüllt, sodass der gesamte Aufreinigungsvorgang erneut mit 40 µl *AgentCourt AMPure XP* wiederholt werden konnte.

2.5.6.4. PCR 2: Integration der Barcode-Sequenz

Mit einer zweiten PCR erfolgte die Ergänzung der ersten Illumina® Adapter Sequenz sowie die Integration eines Barcodes, um eine Bindung an die Flow Cell im *Next Generation Sequencing* zu ermöglichen und somit einen Ansatzpunkt für den Sequenzierungsprimer zu bieten. Erneut wurde mit dem *Advantage 2 PCR-Kit* von Clontec™, einem *Forward* und einem *Reverse Primer* gearbeitet, die an die in der ersten PCR eingebrachten Adapter Sequenzen banden. Um die einzelnen Proben voneinander zu differenzieren, befand sich innerhalb dieser Primer eine spezifische Illumina®

Barcode-Sequenz. Die für den Sequenzierungsvorgang verwendeten Barcode-Sequenzen wurden mittels *Illumina® Experiment Manager Software* nach ihrer Kombinierbarkeit getestet. Weiterhin wurden erneut zur Validierung der PCR neben den Forschungsproben sowohl eine Negativkontrolle (Nuklease-freies Wasser anstatt PCR1 Produkt) als auch eine Positivkontrolle (bekannte cDNA) in die Experimentreihen hinzugefügt.

Es erfolgte erneut die Herstellung eines *Mastermix*. Je Probe bestand dieser aus 5 μ l Advantage 2 PCR-Puffer, 1 μ l Advantage 2 Polymerase Mix (Taq-Polymerase), 1 μ l dNTPs und 36 μ l Nuklease-freiem Wasser. Anschließend wurden zu dem bestehenden Mastermix mit einem Gesamtvolumen von 43 μ l jeweils 1 μ l des *Forward-Ill-AdP2 Primers* und des *Reverse-Ill-AdP2 Primers* hinzupipettiert. Zum Schluss wurden jeweils pro *Mastermix* 5 μ l der entsprechenden Beads-gereinigten PCR 1 Produkte hinzugefügt (Gesamtvolumen 50 μ l). Das PCR 2 Programm wurde auf Basis der Primer programmiert und ist in *Abbildung 8* dargestellt.

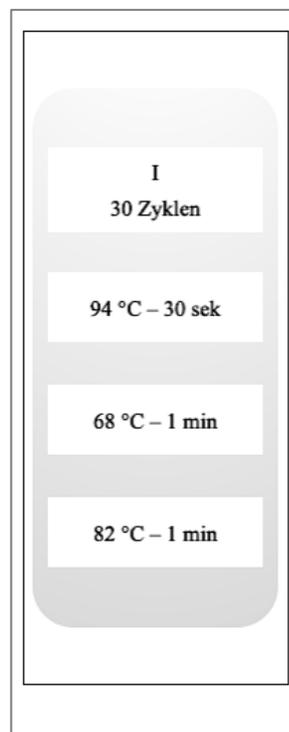


Abb. 8: PCR 2 Programm: Integration der zweiten Illumina® Adapter Sequenz inklusive Barcode.

2.5.6.4. Gelelektrophorese

Nachdem die zweite PCR zur Amplifikation des DNA-Materials durchgeführt wurde, erfolgte das Auftragen des Produktes in einer Gelelektrophorese. Zuvor wurden alle Materialien und die verwendete Wanne mit *DNA-Exitus* gereinigt und für 30 Minuten mittels ultraviolettem Licht sterilisiert. Zeitlich versetzt erfolgte die Herstellung des Gels, im Volumen abhängig von der zu verwendeten Wannengröße, indem Tris-Borat-EDTA (TBE)-Puffer mit 2 % Agarose in einem Kolben versetzt und aufgekocht wurde (hier Verwendung einer großen Wanne mit einem herzustellenden Gelvolumen aus 200 ml TBE-Puffer und 4 g Agarose). Anstelle den vielfach im Kontext einer Gelelektrophorese verwendeten Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid zur Sichtbarkeit des Produktes unter ultraviolettem Licht hinzuzugeben, erfolgte die Arbeit mit *SybrSafe*®, da dieses weniger gefährlich im Umgang ist. So wurden 20 µl *SybrSafe*® zu dem erhitzten Gel gegeben, vorsichtig durch Schwenken des Kolbens vermischt und bei etwa 55 °C in die sterilisierte Form gegossen. Anschließend wurde das Gel mit einem Kamm versehen und das Aushärten des Gels für etwa 30 Minuten abgewartet. Währenddessen wurden die zuführenden Proben und eine Negativkontrolle mit Nuklease-freiem Wasser vorbereitet. Dafür wurden die Proben in einem Verhältnis von 5:1 mit einem Loading Dye (6x) gemischt. Im nächsten Schritt wurde das ausgehärtete Gel nach Entfernung des Kamms in eine mit TBE-Puffer gefüllte Wanne gelegt und die Proben sowie ein Markierungsmarker (*Gene Ruler DNA Ladder Mix*) in die Taschen des Gels aufgetragen (da das amplifizierte PCR-Produkt mit dem Loading Dye ein Gesamtvolumen von 60 µl ausmachte, wurde das Produkt halbiert und jeweils 30 µl in eine Tasche aufgetragen). Anschließend wurde eine Spannung von etwa 150-170 V für 30-40 Minuten angelegt. Die Basenpaarlänge, bei der das Produkt zu erwarten war, betrug dabei etwa 600-700 Basenpaare (bp).

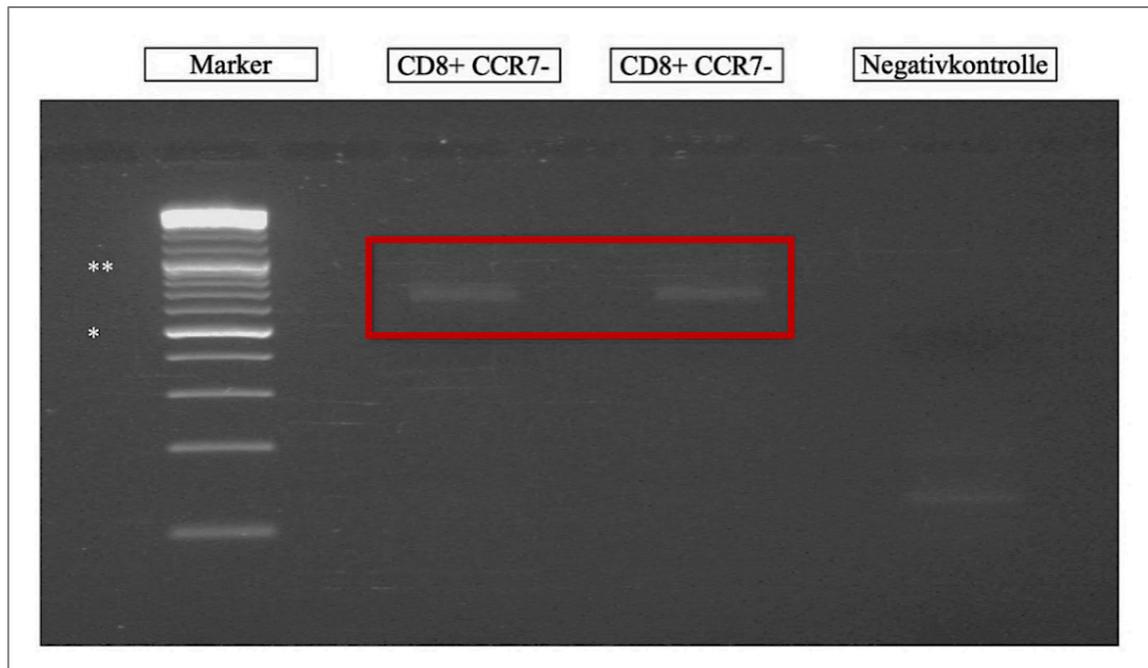


Abb. 9: Gelelektrophorese des PCR 2 Produktes am Beispiel Patient C (PC).

Dargestellt sind DNA-Proben der Zellpopulation CD8+CCR7- (rot markiert) von Patient C zum Zeitpunkt nach sechs Monaten Behandlung mit Fingolimod und eine Negativkontrolle. Die Länge des zu erwartenden PCR-Produktes liegt bei ca. 600-700 bp (Basenpaare). * Marker für 500 bp ** Marker für 1.000 bp

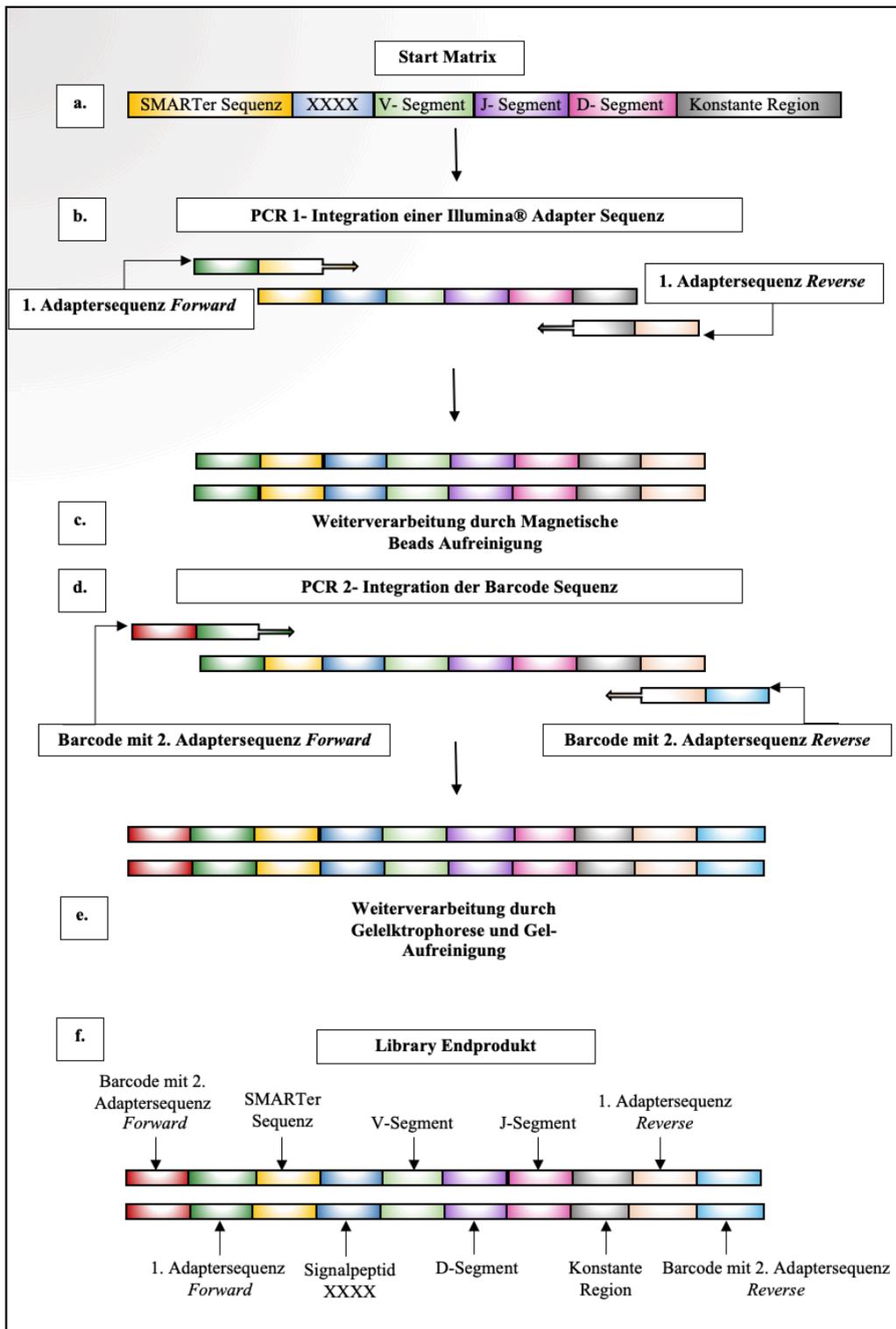


Abb. 10: Schematische Darstellung der Präparation einer cDNA basierten TCR-Library.

Ausgangspunkt der Synthese ist die zuvor bereits hergestellte Einzelstrang cDNA (Start Matrix) der TCR- β -Kette (a.). In der ersten PCR bindet ein *Forward Primer* (dunkelgrün) an die bereits vorbekannte und

integrierte Oligosequenz (gelb) sowie ein *Reverse Primer* (hellbraun) an die konstante Region (grau) des Genabschnitts. Bestandteil in beiden Primern ist eine erste Illumina® Adapter Sequenz, die in die vorbestehende Matrix eingebaut wird (b.). Mit magnetischen Beads erfolgt eine erste Aufreinigung des Amplikons (c.). In der zweiten PCR binden erneut *Forward und Reverse Primer* an die vorbestehende Illumina® Adapter Sequenz. Sie selbst bestehen aus einer individuellen Sequenz (Barcode) und einer zweiten Illumina® Adapter Sequenz (rot und hellblau) (d.). Die Adaptersequenzen dienen während des *Next Generation Sequencing* der Bindung an eine mit Oligonukleotiden-beschichteten hohlen Glasschiene (Flow Cell), sodass die Einzelstrang-cDNA komplementär gebunden werden kann. Zum Nachweis der erfolgreichen stufenweise durchgeführten Amplifikation wird anschließend eine Gelelektrophorese durchgeführt, deren Bande bei 600-700 bp zu erwarten ist und ausgeschnitten wird und mittels Gel-Aufreinigung als Endprodukt asserviert wird (e.-f.).

2.5.6.4. Gelextraktion und Gelaufreinigung

Die Gelaufreinigung erfolgte gemäß dem Protokoll des *QIAquick Gel Extraction Kits* um die Proben-DNA vom Gel zu trennen/waschen. Die Banden wurden mit einem sterilen Skalpell aus dem Gel geschnitten (*Abbildung 11*) und in ein steriles Eppendorf-Gefäß überführt (beide Banden in ein Gefäß zusammen).

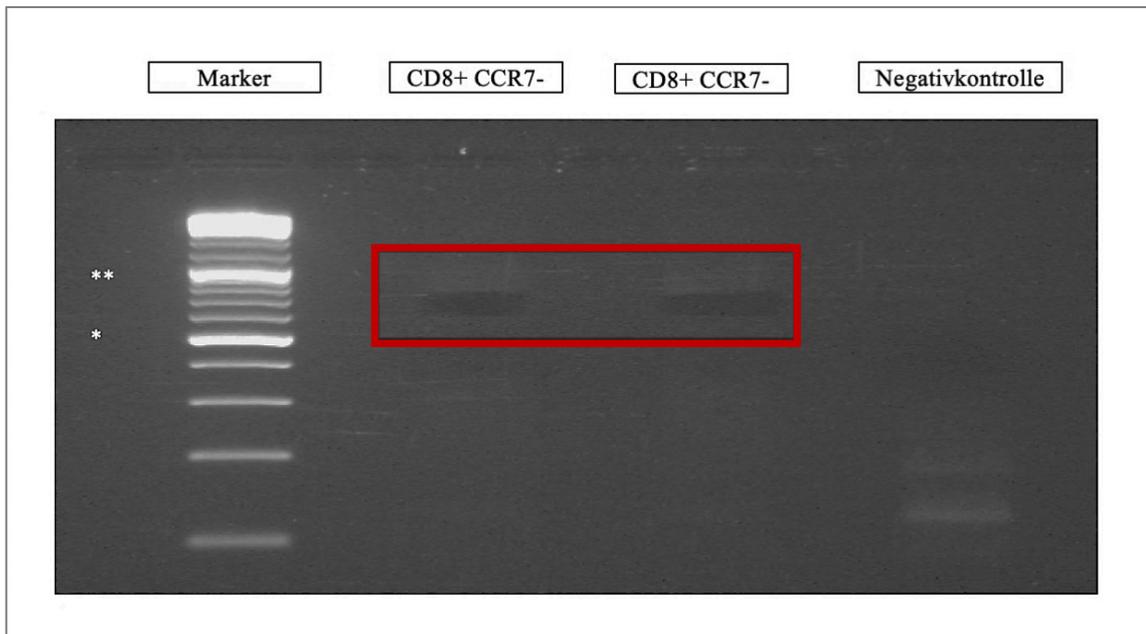


Abb. 11: Darstellung der geschnittenen Gelelektrophorese des PCR 2 Produktes am Beispiel Patient C.

Dargestellt sind DNA-Proben der Zellpopulation CD8+CCR7- von Patient C zum Zeitpunkt nach sechs Monaten Behandlung mit Fingolimod und eine Negativkontrolle (Abbildung 9).

Anschließend wurden die Banden gewogen und das dreifache ihres Volumens an *Buffer QG* hinzupipettiert. Um eine adäquate Durchmischung zu generieren erfolgte ein anschließender Vortexvorgang bei 50 °C für zehn Minuten, bis sich das Gel vollständig gelöst zeigte. Dabei war es wichtig, dass die Farbe der Probe eher gelblich zur Darstellung kam, da dies einen pH-Wert von < 7,5 zeigte, was entscheidend für eine fehlerfreie Membranadsorption der DNA in den weiteren Schritten war. Anschließend wurde analog zum Ausgangsvolumen Isopropanolol zu Probe hinzupipettiert. Die nun entstandene Probe wurde auf eine *QIAquick* Spinsäule mit Filter (Membranadsorption der DNA) aufgetragen und für eine Minute bei 17.900 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und 500 µl *Buffer QG* oberhalb des Filters, ohne den Filter mit der Pipettenspitze zu berühren appliziert. Es folgte eine erneute Zentrifugation für eine Minute bei 17.900 g mit erneuter Entfernung des Überstandes am Gefäßboden. Als Nächstes erfolgten zwei Waschvorgänge mit je 750 µl *Buffer PE*, der jeweils oberhalb

des Filters appliziert und nach einminütiger Zentrifugation bei 17.900 g aus dem Gefäß entfernt wurde. Der Filter (Membran) mit der gebundenen DNA wurde daraufhin in einem neuen sterilen Eppendorf-Gefäß platziert, 20 µl RNase freies Wasser zum Lösen der DNA oberhalb dazu pipettiert und eine Zentrifugation bei 17.900 g für eine Minute gestartet. Dabei sammelte sich die aufgereinigte DNA im Eppendorf-Gefäß und das Produkt wurde bei -20 °C gelagert.

2.5.7 Quantitätsanalyse der DNA mittels *Qubit 2.0* und Vorbereitung der *Gen-Library*

Nachdem das DNA-Produkt bereits qualitativ zur Darstellung gekommen war, bedurfte es einer quantitativen Analyse, die mittels *Qubit 2.0* und dem *dsDNA HS Assay Kit* durchgeführt werden konnte. Gemäß dem Protokoll wurden 1 µl High Sensitivity (HS)-Reagenz mit 199 µl HS-Puffer als *Mastermix* pro Probe vorbereitet. Parallel dazu mussten zwecks Kalibrierung des *Qubit 2.0* zwei Standards, bestehend aus 190 µl HS-Puffer und 10 µl HS-Standard 1 bzw. 2, generiert werden. Nach Durchmischung mittels Vortexvorgang für zwei Minuten wurden die Proben für zwei Minuten inkubiert und mittels *Qubit 2.0* gemessen. Dafür mussten zweifach 199 µl des *Mastermix* mit je 1 µl der Probe versetzt und gemäß der Kalibrierungsbeschreibung verarbeitet werden. Da insgesamt die Probe zwei Mal gemessen wurde, konnte ein quantitativer Mittelwert erstellt werden, auf dessen Basis die folgende Berechnung für die Vorbereitung der *Gen Library* erfolgte.

Zur Vorbereitung der *Gen Library*, die mittels *Next Generation Sequencing* mit Illumina® *MiSeq* erstellt wurde, wurden alle Proben auf eine Konzentration von 4 nmol verdünnt. Basierend auf den mittels FACS-Analyse ermittelten Zellzahlen der Populationen wurde dann proportional das Volumen der Proben mit unveränderter Molarität in der gepoolten *Gen Library* reguliert, sodass die Subpopulationszellzahlen aller an einem Sequenzierungslauf beteiligten Proben addiert werden konnten und die relativen Anteile der einzelnen Populationen berechnet werden konnten. Dies ermöglichte, dass das einzelne Volumen der Proben (4 nmol) mit einem gleich großen Anteil am Gesamtvolumen der *Gen Library* repräsentiert werden konnte.

2.5.8 Sequenzierung mit *Next Generation Sequencing*

Die Sequenzierung erfolgte durch *Next Generation Sequencing* mit dem *Illumina® MiSeq* und der Hilfe der Arbeitsgruppe für Translationale Gynäkoonkologie der Universitätsklinik Düsseldorf.

Next Generation Sequencing ist ein im Vergleich zur bekannten Sanger-Sequenzierung verbessertes DNA-Sequenzierungsverfahren. Wesentlicher Unterschied ist, dass mittels der alten Sequenzierungstechnologien immer nur einzelne Abschnitte nacheinander sequenziert und analysiert werden konnten, die dann anschließend einer Zusammenführung bedurften. Somit waren Sequenzierungen größerer Bibliotheken sehr aufwendig und kostspielig. *Next Generation Sequencing* ermöglicht ein paralleles Sequenzieren und Analysieren. Eine Analyse gelingt somit deutlich schneller.

2.5.8.1 *Illumina®-Sequenzierung*

Die *Illumina®-Sequenzierung* beruht auf einem einzigartigen Prinzip („*Sequencing-by-Synthesis*“). Durch Implementierung spezieller Nukleotide (dNTPs), die jeweils mit einer speziellen Fluoreszenz markiert und so durch bestimmte Wellenlängen detektierbar sind, lässt sich durch die Kamera der Einbau eines jeden Nukleotids in den komplementären DNA-Strang 1:1 nachverfolgen. Das Besondere an der *Illumina®-Sequenzierung* ist die Signalverstärkung des Fluoreszenzsignals, da das Signal eines einzelnen DNA-Moleküls zu schwach wäre, um detektiert zu werden. Hierfür wird eine besondere PCR (Brücken-PCR) veranlasst, die es ermöglicht, dass sich die einzelnen zuvor amplifizierten DNA-Fragmente (ca. 300 bp) anhand bestimmter eingebauter Primer zu Clustern auf einem Chip zusammenfinden. Als Cluster erzeugen diese dann ein ausreichend starkes Signal, um detektiert zu werden.

Jede *Library* der im Kontext dieser Dissertation generierten Proben wurde durch Gebrauch des *Illumina®MiSeq Reagent Kit v2* (500 bp) äquivalent von beiden Seiten sequenziert. Die *Illumina®PhiX* Kontrolle wurde mit insgesamt 40 % der Proben ergänzt,

um die Variabilität des Materials zu erhöhen. Die Produkte wurden denaturiert und mit einer finalen Konzentration von 13 pM sequenziert.

2.5.9 Auswertung der Rohdaten

Die Analyse der durch die Sequenzierung generierten Rohdaten erfolgte mittels *MiXCR*[128]. Aufgrund der Empfehlung des Programmierers bedurfte es einer Adaption der Ausrichtungseinstellungen für 5' Race Produkte. Außerdem wurden Sequenzen, die für nicht-funktionsfähige Rezeptoren kodierten durch StopCodons oder eine Leserasterverschiebung (*Frameshift*) aus der Analyse ausgeschlossen. Für die Darstellung der Analyseergebnisse und Visualisierungen wurden *VDJtools*, *VDJdb*, *Excel* und *Word* (*Microsoft, Redmond, Washington, USA*) verwendet [129] [130].

3 Ergebnisse und Datenanalyse

3.1 Durchflusszytometrie der T-Zellen

3.1.1 Totale Zellzahlen, CD3+ T-Zellen, CD4+ T-Zellen und CD8+ T-Zellen

Nach erfolgter durchflusszytometrischer Analyse kamen innerhalb der einzelnen PBMC-Proben unterschiedliche Populationsgrößen gemessen an ihrer totalen Zellzahl zur Darstellung. In Zusammenschau der Zellzahlen ist wichtig zu wissen, dass die totale Zellzahl im FACS vor Sortierung auch immer tote Zellen miteinschließt. Der im folgenden Text beschriebene Zehnmonatsverlauf bezieht sich immer nur auf den untherapierten MS-Patienten, da alle anderen Proben im Zwölfmonatsverlauf generiert wurden.

Die PBMC-Probe von Patient B beinhaltete vor Therapie mit Fingolimod kumulativ 6.087.431 Zellen. Ähnlich groß zeigte sich zeitgleich die totale Zellpopulation von Patient D mit 6.638.139 Zellen. Die kleinste Zellpopulation war die von Patient C mit

2.142.517 Zellen. Die Kontrollen (gesunde Kontrolle K_g und MS-Patient ohne Therapie MS_u) zeigten zum Zeitpunkt m_0 Populationsgrößen mit 4.755.171 und 5.627.112 Zellen. Nach zwölf Monaten Therapie mit Fingolimod waren die totalen Zellzahlen von Patient B und D reduziert, die totale Zellzahl von Patient C zeigte sich höher als zuvor. In der PBMC-Probe von Patient B konnte eine totale Zellzahl von 2.652.619 Zellen detektiert werden, in der PBMC-Probe von Patient D eine totale Zellzahl von 3.129.454 und in der PBMC-Probe von Patient C eine totale Zellzahl von 4.246.417. In der Probe der gesunden Kontrolle K_g wurden im Zwölfmonatsverlauf 6.798.521 Zellen gemessen. Die totale Zellzahl der PBMC-Probe des MS-Patienten ohne Fingolimodtherapie zeigte sich zum Zeitpunkt m_{10} nahezu stabil mit 5.901.224 Zellen. Die relativen Anteile boten in allen Proben eine Reduktion der CD3+ Populationen, allerdings in den Patientenproben eine 2,4-fach höhere Reduktion mit durchschnittlich 69 % als bei den Kontrollproben mit durchschnittlich 29,5 %.

Aus den genannten totalen Zellpopulationen wurden anhand der Expression des CD3+ Oberflächenmarkers CD3+ T-Lymphozyten (T-Zellen) isoliert. Im Verlauf von zwölf Monaten unter Therapie mit Fingolimod reduzierten sich die CD3+ T-Zellen von Patient B von 2.277.659 auf 228.941 Zellen, von Patient C von 669.679 auf 399.378 Zellen und von Patient D von 3.269.659 auf 611.314 Zellen. Die Zellzahl der CD3+ T-Zellen der Kontrollen zeigten sich im Zehnmonatsverlauf/Zwölfmonatsverlauf ohne relevante Reduktion. Die Zellzahl der gesunden Kontrolle K_g kam bei 2.394.547 Zellen zum Zeitpunkt m_0 und 2.331.805 Zellen zum Zeitpunkt m_{12} nahezu stabil zur Darstellung. Die Zellpopulation der CD3+ Zellen des untherapierten MS-Patienten zeigte eine Erhöhung von 2.069.266 auf 2.962.875 Zellen innerhalb von zehn Monaten.

Aus den CD3+ T-Zellen wurden die T-Zellen weiter sortiert, die zusätzlich die Expression von CD4+ und CD8+ Oberflächenmolekülen zeigten. Nach zwölfmonatiger Therapie sanken die absoluten CD3+CD4+ Zellzahlen in allen drei Patientenproben stark; bei Patient B von 1.062.525 auf 11.631 Zellen, bei Patient C von 431.318 auf 83.916 Zellen und bei Patient D von 1.998.408 auf 33.775 Zellen. Nach zwölf Monaten sanken die absoluten CD3+CD4+ Zellzahlen der gesunden Kontrolle K_G nur leicht von 1.714.382 auf 1.580.903 Zellen, beim MS-Patienten ohne Therapie erhöhten sich diese nach zehn

Monaten von 1.407.563 auf 2.005.020 Zellen. Nach zwölfmonatiger Therapie sanken die absoluten CD3+CD8+ Zellzahlen bei den Patienten B und D; bei Patient B von 1.108.451 auf 190.257 Zellen und bei Patient D von 965.433 auf 323.012 Zellen. Die CD3+CD8+ T-Zellen in der PMBC-Probe von Patient C stiegen von 190.697 auf 217.045 nach zwölf Monaten. Gleiches ließ sich in den Proben der Kontrollen beobachten. In der CD3+CD8+ Zellpopulation der gesunden Kontrolle K_g ließ sich eine Erhöhung der Zellzahl von 514.697 auf 539.379 Zellen und beim MS-Patienten ohne Therapie MS_u von 474.587 auf 712.002 Zellen registrieren (*Tabelle 9*).

Tabelle 9: Übersicht der durchflusszytometrischen Daten der T-Zellen zum Zeitpunkt vor (m_0) und nach zwölf Monaten Therapie mit Fingolimod (m_{12}^*) von Patient B (P_B), Patient C (P_C), Patient D (P_D) und den Kontrollen (gesunder Proband K_g und MS-Patient untherapiert MS_u).^{*} Zehnmonatsverlauf m_{10} bei MS_u .

Dargestellt sind die absoluten Zellzahlen und deren anteilige absolute CD3+ sowie CD3+CD4+ und CD3+CD8+ Populationen. In Klammern finden sich jeweils deren relative Anteile beziehungsweise auf die absolute Gesamtpopulation, sodass anhand derer ein Vergleich mittels CD4+/CD8+ Quotienten gelingt. Die CD4+/CD8+ Quotienten aller drei Patientenproben zeigen sich im Vergleich zu den Kontrollen unter Therapie mit Fingolimod stark zu Ungunsten der CD4+ T-Zellen verschoben.

	P_B	P_C	P_D	K_G	MS_u
Zellzahl total m_0	6.087.431	2.142.517	6.638.139	4.755.171	5.627.112
CD3+ T-Zellen m_0	2.277.659 (37,4 %)	669.679 (31,3 %)	3.269.659 (49,3 %)	2.394.547 (50,4 %)	2.069.266 (69%)
CD4+ T-Zellen m_0	1.062.525 (17,5 %)	431.318 (20,1 %)	1.998.408 (30,1 %)	1.714.382 (36,1 %)	1.407.563 (36,8 %)
CD8+ T-Zellen m_0	1.108.451 (18,2 %)	190.697 (8,9 %)	965.433 (14,5 %)	514.697 (10,8 %)	474.587 (8,4 %)
CD4+/CD8+ Quotient m_0	1	2,3	2,1	3,3	3

	P_B	P_C	P_D	K_G	MS_u
Zellzahl total m_{10/12}	2.652.619	4.246.417	3.129.454	6.798.521	5.901.224
CD3+ T-Zellen m_{10/12}	228.941 (8,6 %)	399.378 (9,4 %)	611.314 (19,5 %)	2.331.805 (34,3 %)	2.962.875 (50,2 %)
CD4+ T-Zellen m_{10/12}	11.631 (0,4 %)	83.916 (2 %)	33.775 (1,1 %)	1.580.903 (23,3 %)	2.005.020 (34 %)
CD8+ T-Zellen m_{10/12}	190.257 (7,2 %)	217.045 (8,1 %)	323.012 (10,3 %)	539.379 (8 %)	712.002 (12,1 %)
CD4+/CD8+ Quotient m_{10/12}	0,1	0,4	0,1	2,9	2,8

Um anhand der unterschiedlichen Größen der Gesamtpopulationen (Zellzahl total) zum Zeitpunkt m_0 und $m_{10/12}$ eine mögliche Vergleichsbasis zu schaffen, erfolgte zudem die Kalkulation der relativen Anteile der einzelnen Populationen an der Gesamtpopulation, sodass eine prozentuale Bewertung der Anteilsreduktionen der einzelnen Populationen gelang. Der relative Anteil der CD3+ T-Zellen an der totalen Zellzahl sank erwartungsgemäß unter Therapie mit Fingolimod in allen drei Patienten (Lymphopenie) im Zeitraum von zwölf Monaten. Bei Patient B erfolgte eine Reduktion um 77 %, bei Patient C um 70 % und bei Patient D um 60,4 %. Das entspricht einer durchschnittlichen relativen lymphopenischen Anteilsreduktion der CD3+ T-Zellen um 69,1 % in einem Behandlungszeitraum von zwölf Monaten mit Fingolimod. In der gesunden Kontrolle K_G und dem MS-Patienten ohne Therapie konnte auch eine Reduktion des relativen CD3+ Anteils um 32 % und 27,2 % nachgewiesen werden. Das entspricht einer durchschnittlichen natürlichen (ohne Therapie) relativen lymphopenischen Anteilsreduktion von CD3+ T-Zellen um 29,6 %.

Der relative Anteil der CD4+ Zellen an der totalen Zellzahl sank zudem stark unter Therapie mit Fingolimod in allen drei Patienten im Zeitraum von zwölf Monaten. Bei Patient B erfolgte eine Reduktion um 97,7 %, bei Patient C um 90 % und bei Patient D um 96,3 %. Das entsprach einer durchschnittlichen relativen Anteilsreduktion der CD4+ Zellen um 94,7 % in einem Behandlungszeitraum von zwölf Monaten mit Fingolimod. Im gleichen Zeitraum zeigten die Kontrollen eine natürliche (ohne Therapie) relative Anteilsreduktion der CD4+ Zellen um je 35,5 % (K_G) und 7,6 % (MS_u), durchschnittlich um 21,6 %.

Die ausgeprägte Reduktion relativer Anteile der CD4+ T-Zellen an der Gesamtpopulation unter den Patientenproben von durchschnittlich 94,7 % ließ sich bei den relativen Anteilen der CD8+ Zellen an der Gesamtpopulation nicht beobachten. Bei Patient B erfolgte eine Reduktion um 60,4 %, bei Patient C um 9 % und bei Patient D um 29 %. Das entspricht einer durchschnittlichen relativen Anteilsreduktion der CD8+ Zellen um 32,8 % in einem Behandlungszeitraum von zwölf Monaten mit Fingolimod. Im gleichen Zeitraum zeigte die Probe der gesunden Kontrolle K_G eine relative Anteilsreduktion der CD8+ Zellen um 25,9 %, die Probe des untherapierten MS-Patienten hingegen bot nach zehn Monaten sogar einen Anstieg des relativen CD8+ Anteils an der Gesamtpopulation um 44 %. Somit zeigte sich bei einer durchschnittlichen Anteilsveränderung von 9,1 % ein nahezu stabiles Niveau der CD8+ Anteile an der Gesamtpopulation unter den Kontrollen (*Tabelle 9, Abbildung 12-13*).

Die wesentlich weniger stark ausgeprägte Reduktion der relativen Anteile der CD8+ T-Zellen an der Gesamtpopulation im Zeitraum von zwölf Monaten unter Fingolimodtherapie unter den Patienten führte zu einer relevanten Verschiebung des CD4+/CD8+ Quotienten (physiologisch $> 1,0$) im peripheren Blut zu Ungunsten der CD4+ T-Zellen (CD4+/CD8+ Quotient $< 1,0$). Im Durchschnitt führte die Therapie mit Fingolimod zu einer Verschiebung des CD4+/CD8+ Quotienten von 1,8 auf 0,2 wohingegen der Quotient bei den Kontrollen nahezu bei etwa 3 stabil blieb (von 3,2 auf 2,9) (*Abbildung 13*).

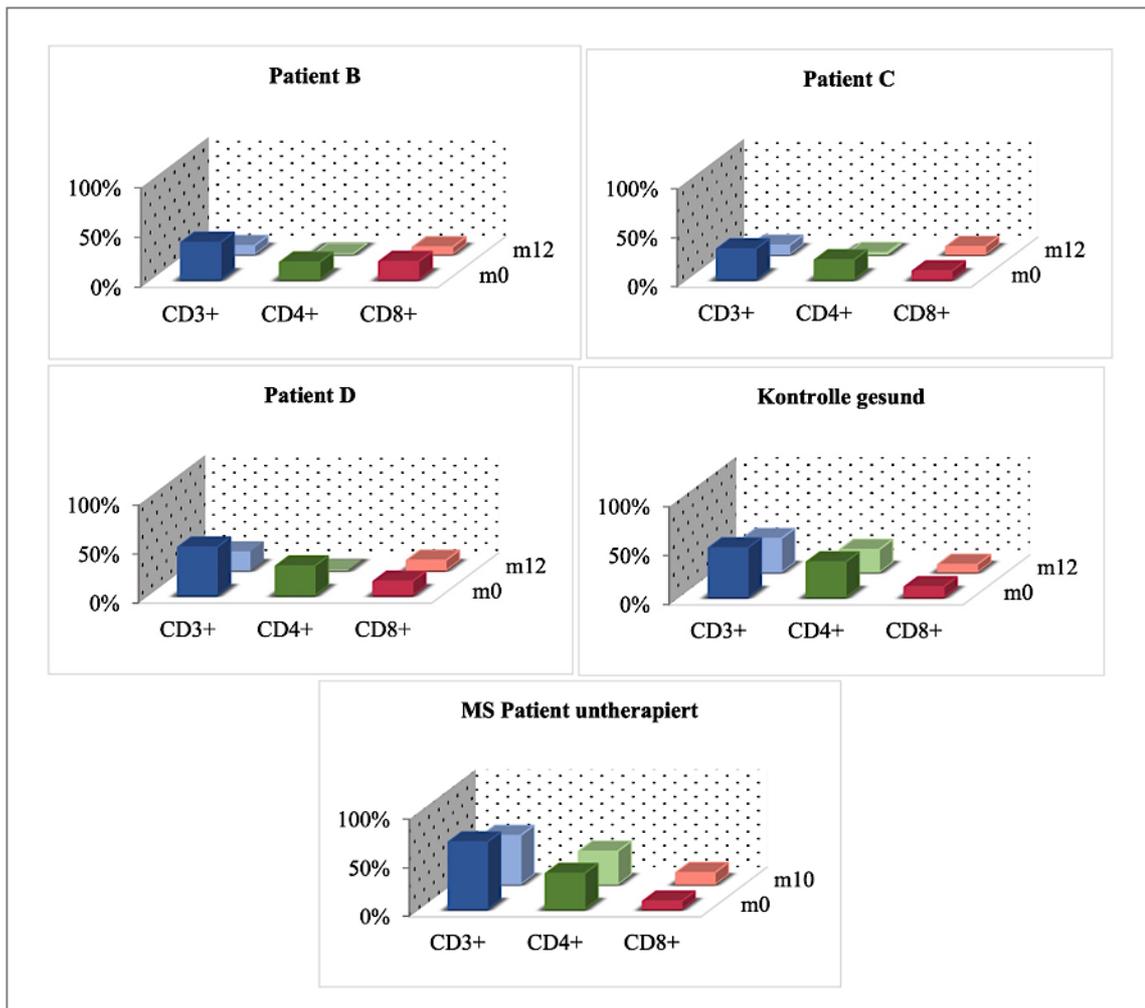


Abb. 12: Relative Anteilsentwicklung der CD3+, CD4+ und CD8+ T-Zellpopulationen gemessen an der Gesamtpopulation (totale Zellzahl) von Patient B (P_B), Patient C (P_C) und Patient D (P_D) im Zeitraum vor Therapie (m_0) und zwölf Monate nach Therapie mit Fingolimod (m_{12}) sowie der unbehandelten Kontrollen (gesunder Proband K_g und MS-Patient untherapiert MS_u^*) im Zwölfmonatsverlauf (m_{12}). * Zehnmonatsverlauf m_{10} bei MS_u .

Dargestellt ist der jeweilige prozentuale Anteil (Ordinate, y-Achse) der CD3+, CD3+CD4+ und CD3+CD8+ T-Zellen (Abszisse, x-Achse) an der totalen Zellzahl im zeitlichen Verlauf von zehn*/zwölf Monaten (Applikate, z-Achse). Die starke Reduktion der CD3+CD4+ T-Zellen der Patientenproben führt dazu, dass nach zwölf Monaten die CD3+ T-Zellpopulation vorrangig durch CD3+CD8+ T-Zellen repräsentiert wird. Bei den Kontrollen K_g und MS_u erfolgt die Repräsentation der CD3+ T-Zellpopulation stabil über den Beobachtungszeitraum hinweg durch überwiegend CD3+CD4+ T-Zellen.

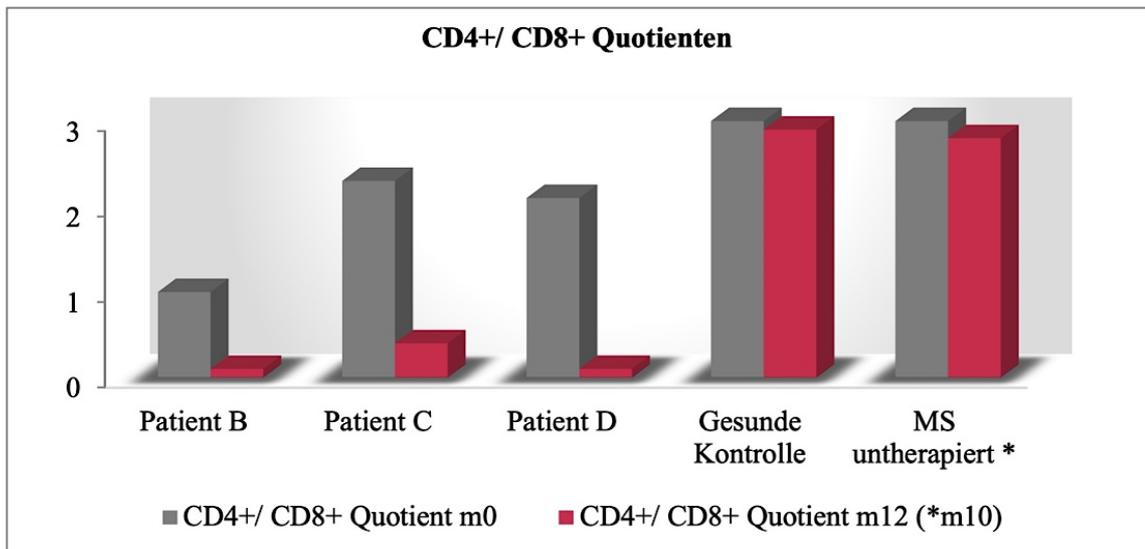


Abb. 13: Entwicklung des CD4+/CD8+ Quotienten unter Therapie mit Fingolimod im Zeitraum von zwölf Monaten (m₀ vor Therapie, m₁₂ zwölf Monate nach Therapie).

Es kommen die CD4+/CD8+ Quotienten der Patienten B (P_B), C (P_C) und D (P_D) sowie der unbehandelten Kontrollen (gesunder Proband K_g und MS-Patient untherapiert MS_u*) auf der Abszisse (x-Achse) zu den Zeiträumen m₀, *m₁₀ und m₁₂ zur Darstellung. Auf der Ordinate (y-Achse) sind die absoluten Zahlen des CD4+/CD8+ Quotienten aufgetragen. Das Diagramm zeigt eine starke Reduktion des CD4+/CD8+ Quotienten in den Patientenproben unter Fingolimodtherapie durchschnittlich von 1,8 auf 0,2 (physiologisch >1) sowie das stabile Niveau der Kontrollen bei etwa 3.

3.1.2 CCR+ und CCR7- Subpopulationen der CD8+ T-Zellen

Damit eine Differenzierung der CD8+ T-Zellen in naive T-Zellen (CCR7+, CD45RA+) und zentrale Gedächtnis-T-Zellen (CCR7+, CD45RA-) sowie den Effektor-Gedächtnis-T-Zellen (CCR7-, CD45RA-) und den terminalen Effektorgedächtniszellen (CCR7-, CD45RA+) gelang, erfolgte durchflusszytometrisch die Unterteilung in CCR7+ und CCR7- Subpopulationen anhand des humanen Antikörpers gegen CCR7 (CD 197). Eine weiterführende tiefere Differenzierung innerhalb der CD8+CCR7+ T-Zellen gelang nicht, da mittels *MoFlo XDP* von Beckmann Coulter nur eine Sortierung von vier Populationen zum gleichen Zeitpunkt gelang (hier CD4+CCR7+, CD4+CCR7-, CD8+CCR7+, CD8+CCR7-). Die weiterführende Subanalyse erfolgte anhand der Patientenproben C und D.

Nach zwölfmonatiger Therapie mit Fingolimod sanken die absoluten CD8+CCR7+ Zellzahlen in beiden Patientenproben; bei Patient C von 63.326 auf 10.456 Zellen und bei Patient D von 327.700 auf 3.385 Zellen. Im gleichen Zeitraum stiegen die absoluten CD8+CCR7+ Zellzahlen der gesunden Kontrolle K_g von 325.334 auf 332.350 Zellen und in den Proben des MS-Patienten ohne Therapie nach zehn Monaten von 104.028 auf 712.002 Zellen. Bis auf die Probe von Patient D konnte in allen anderen Proben im Zeitraum von zehn/zwölf Monaten eine Erhöhung der absoluten Zellzahl der CD8+CCR7- T-Zellpopulation nachgewiesen werden; bei Patient C ein Anstieg von 116.195 auf 200.732 Zellen, bei der gesunden Kontrolle von 149.741 auf 171.026 Zellen und in der Probe des MS-Patienten ohne Therapie von 335.121 auf 540.798 Zellen. Im gleichen Zeitraum sank die Anzahl der CD8+CCR7- Zellen bei Patient D von 593.636 auf 307.696 Zellen (*Tabelle 10*).

Tabelle 10: Übersicht der durchflusszytometrischen Daten der CD8+CCR7+ und CD8+CCR7- T-Zellen zum Zeitpunkt vor (m_0) und nach zwölf Monaten Therapie mit Fingolimod ($m_{10/12}$) von Patient C (P_C), Patient D (P_D) und den Kontrollen (Gesunder Proband K_g und MS-Patient ohne Therapie MS_u). * *Zehnmonatsverlauf m_{10} bei MS_u .*

Dargestellt sind die totalen absoluten CD8+ Zellzahlen und deren CD8+CCR7+ sowie CD8+CCR7- Subpopulationen. In Klammern finden sich jeweils deren relative Anteile beziehungsweise auf die absolute CD8+ Zellzahl, sodass anhand derer ein Vergleich mittels CD8+CCR7+/CD8+CCR7- Quotienten gelingt.

	P_C	P_D	K_g	MS_u
CD8+ Zellzahl total m_0	190.697	965.433	514.697	474.587
CD8+CCR7+ T- Zellen m_0	63.326 (33,2 %)	327.700 (33,9 %)	325.334 (63,2 %)	104.028 (21,9 %)
CD8+CCR7- T- Zellen m_0	116.195 (60,9 %)	593.636 (61,5 %)	149.741 (29,1 %)	335.121 (70,6 %)
CD8+CCR7+/ CD8+CCR7- Quotient m_0	0,5	0,6	2,2	0,3

	P _C	P _D	K _g	MS _u
CD8+ Zellzahl total m_{10/12}	217.045	323.012	539.379	712.002
CD8+CCR7+ T- Zellen m_{10/12}	10.456 (4,8 %)	3.385 (1,1 %)	332.350 (61,6 %)	129.277 (18,2 %)
CD8+CCR7- T- Zellen m_{10/12}	200.734 (92,5 %)	307.696 (95,3 %)	171.026 (31,7 %)	540.798 (76 %)
CD8+CCR7+/ CD8+CCR7- Quotient m_{10/12}	0,05	0,01	1,9	0,2

Der relative Anteil der CCR7+ Zellen an allen CD3+CD8+ T-Zellen reduzierte sich nach zwölf Monaten Therapie mit Fingolimod bei Patient C um 85,5 % und bei Patient D um 96,8 %. Das entsprach einer durchschnittlichen Anteilsreduktion der CCR7+ Zellen an allen CD3+CD8+ T-Zellen um 91,2 %. Im gleichen Zeitraum reduzierte sich dieser Anteil in den Proben der gesunden Kontrolle und des MS-Patienten ohne Therapie um 2,5 % und 16,9 %. Das entsprach einer durchschnittlichen natürlichen (ohne Therapie) Anteilsreduktion der CCR7+ Zellen an allen CD3+CD8+ T-Zellen um 9,7 %. Somit zeigte die Therapie mit Fingolimod in den beiden Patientenproben einen neunfach-stärkeren Effekt auf die CCR7+ Zellanteilsreduktion an der Gesamtpopulation an CD3+CD8+ T-Zellen im Vergleich zu den Kontrollen (*Tabelle 10, Abbildung 14*).

Durch die Anteilsreduktion der CCR7+ Zellen ließ sich erwartungsgemäß ein Shift in Richtung der CCR7- Zellen beobachten. Der relative Anteil der CCR7- Zellen an allen CD3+CD8+ T-Zellen erhöhte sich nach zwölf Monaten Therapie mit Fingolimod bei Patient C und Patient D um das 1,5-fache. Im gleichen Zeitraum blieb dieser Anteil in den Proben der gesunden Kontrolle und des MS-Patienten ohne Therapie mit einer Erhöhung um das 0,85-fache nahezu verlaufsstabil (*Tabelle 10, Abbildung 14*).

Anhand dieser Daten sowie anhand des CD8+CCR7+/CD8+CCR7- Quotienten ließ sich beobachten, dass sich bei den mit Fingolimod behandelten Patienten in dem Zeitraum von zwölf Monaten im Vergleich zu den Kontrollen eine veränderte Zusammensetzung der CD3+CD8+ T-Zellpopulation zu Gunsten der CCR7- T-Zellen darstellen ließ. Im Durchschnitt führte die Therapie mit Fingolimod zu einer Verschiebung des CD8+CCR7+/CD8+CCR7- Quotienten von 0,55 auf 0,03 (ca. 20- fache Reduktion des Verschiebungsfaktors) wohingegen die Quotienten bei der gesunden Kontrolle mit im Mittel 2,1 und bei dem MS-Patienten ohne Therapie mit 0,25 nahezu stabil blieben (*Tabelle 10, Abbildung 15*).

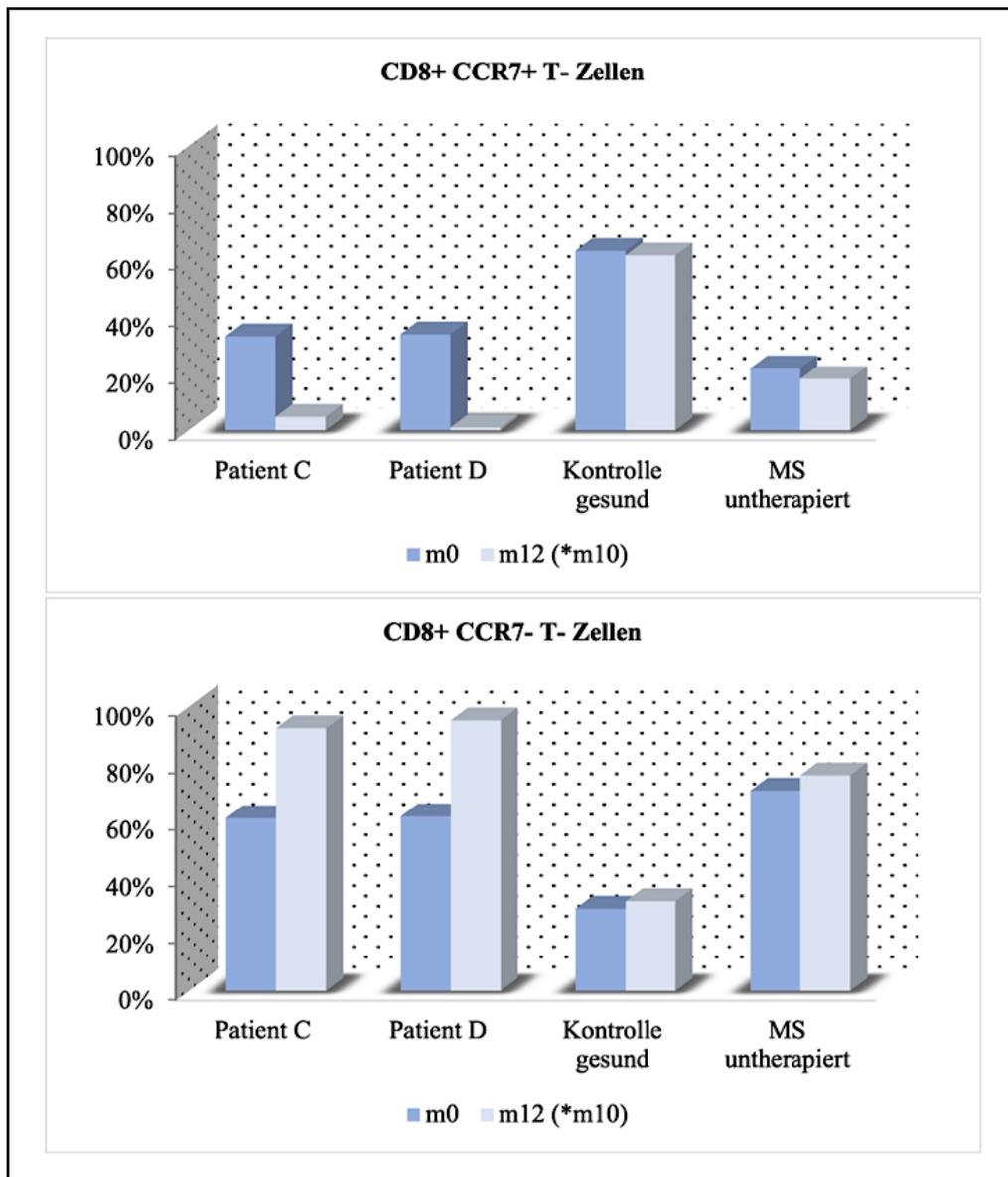


Abb. 14: Relative Anteilsentwicklung der CCR7+ und CCR7- CD8+ T-Zellen gemessen an der gesamten CD8+ Zellpopulation von Patient C (P_C) und Patient D (P_D) im Zeitraum vor Therapie (m₀) und zwölf Monate nach Therapie mit Fingolimod (m₁₂) sowie der unbehandelten Kontrollen (gesunder Proband K_g und MS-Patient untherapiert MS_u*) im Zehn-/ Zwölfmonatsverlauf (*m_{10/12}). Dargestellt ist der jeweilige prozentuale Anteil (Ordinate, y-Achse) der CD8+CCR7+ und CD8+CCR7- T-Zellen (Abszisse, x-Achse) an der totalen CD8+ Zellzahl im zeitlichen Verlauf von zwölf Monaten (m₀ blau, m₁₂ hellblau), bei MS_u nach zehn Monaten (m₁₀). Die Therapie mit Fingolimod führt in den beiden Patientenproben zu einer neunfach stärkeren CCR7+ Zellanteilsreduktion an der Gesamtpopulation an

CD3+CD8+ T-Zellen im Vergleich zu den Kontrollen. Im Gegensatz dazu steigt der Anteil der CCR7-Zellen innerhalb der CD3+CD8+ T-Zellen in den Patientenproben um das 1,5-fache.

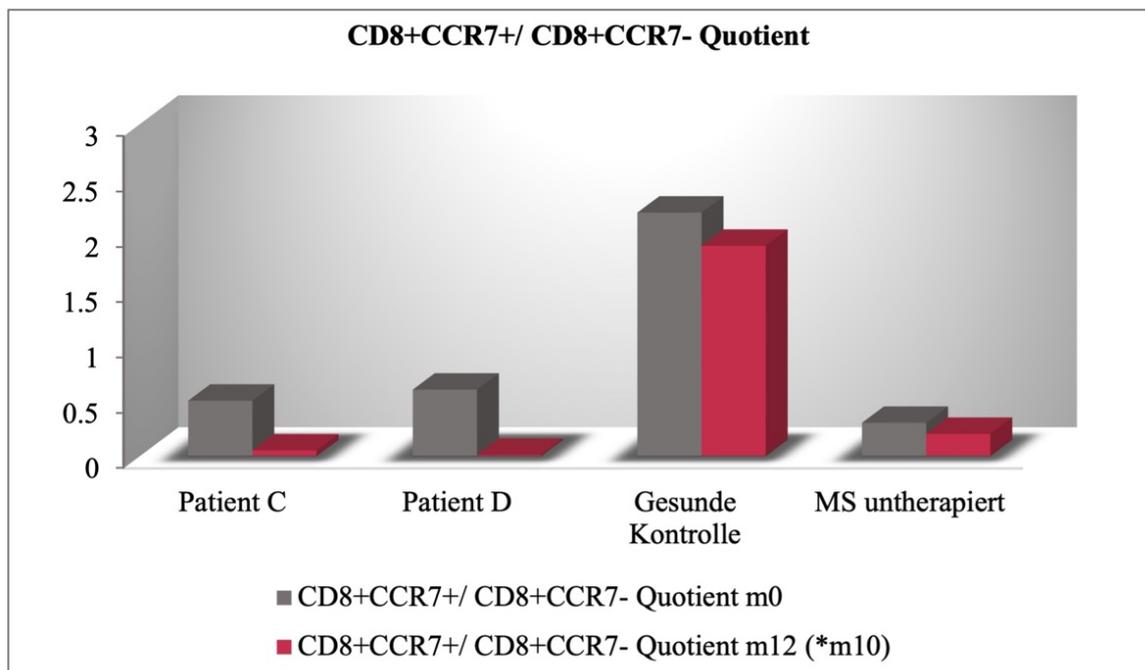


Abb. 15: Entwicklung des CD8+CCR7+/CD8+CCR7- Quotienten unter Therapie mit Fingolimod im Zeitraum von zwölf Monaten (m₀ vor Therapie, m₁₂ zwölf Monate nach Therapie).

Es kommen die CD8+CCR7+/CD8+CCR7- Quotienten der Patienten C (P_C) und D (P_D) sowie der unbehandelten Kontrollen (gesunder Proband K_g und MS-Patient ohne Therapie MS_u*) auf der Abszisse (x-Achse) zu den Zeiträumen m₀, *m₁₀ und m₁₂ zur Darstellung. Auf der Ordinate (y-Achse) sind die absoluten Zahlen des CD8+CCR7+/CD8+CCR7- Quotienten aufgetragen. Das Diagramm zeigt die Reduktion des CD8+CCR7+/CD8+CCR7- Quotienten in den Patientenproben als Ausdruck eines *Shifts* in der Zusammensetzung der CD8+ T-Zellpopulation durch vorrangig dominierende CCR7- T-Zellen.

3.2 Next Generation Sequencing: Rohdaten

Angesichts eines limitierten Auffangvolumens eines Eppendorf-Gefäßes konnten durchflusszytometrisch die gezählten T-Zellen nur mit einer maximalen Obergrenze von 400.000 Zellen gesammelt werden. Basierend auf der nach der Durchflusszytometrie in

der Methodik verwendeten totalen Anzahl an Ausgangszellen finden sich in *Tabelle 11* für alle quantitativen Zusammenhänge der NGS-Rohdaten die Anzahl an allgemein sequenzierten *Reads* und den daran anteiligen erfolgreichen TZR- β -*Alignments*. *Reads* sind DNA-Abschnitte, die mit einer Sequenzierungsreaktion abgelesen werden. *Alignments* sind Übereinstimmungen einer Sequenz mit einer Vergleichssequenz (hier TZR- β). *Reads* und *Alignments* wurden durch *MiXCR* analysiert. Weiterführend wurden daraufhin nur bestimmte *Reads* aus der totalen Gesamtzahl an *Reads* zur Prozessierung durch das Visualisierungsprogramm *VDJtools* weiterverwendet, sodass eine Analyse an kodierten Klonotypen (Klonen) erfolgen konnte.

Anhand der in *Tabelle 11* gelisteten totalen Zellzahlen und *Read*zahlen ist ersichtlich, dass die jeweilige Ausgangspopulation im Sequenzierungsvorgang unterschiedlich stark repräsentiert wurde. Während die Ausgangszellen der Patientenproben von Patient C und Patient D meist durch ähnliche Zahlen an *Reads* präsentiert wurden (durchschnittliches Verhältnis: P_C 1:1,2; P_D 1:0,7), zeigten die Kontrollen entweder eine Unterrepräsentation (K_G 1:0,3) oder Überrepräsentation (MS_u 1:3,3). Zusätzlich wurden mittels *MiXCR* die *Reads* identifiziert, die anteilig an der Gesamtzahl an *Reads* eindeutig der kodierenden DNA-Region für den TZR- β (TZR- β -Alignment) zugeordnet werden konnten. Hier zeichnete sich eine Anteilsvariabilität in den Proben zwischen 32,9 % und 85,9 % ab.

Durch die Verwendung von *VDJtools* gelang die Analyse und Visualisierung spezifischer Klonotypen des TZR- β -Repertoires. Hierzu wurden nur die *Reads* aus der totalen *Read*-Anzahl vom *VDJtool* verwendet, die sinnhafte *Reads* (bspw. nach Ausschluss von Frameshifts/Stop Codons) darstellten. In der Ausgangsprobe des MS-Patienten ohne Therapie wurde in der CD8+CCR7- Subpopulation zu den Zeitpunkten m₀ und m₁₀ nur etwa 1% des von *VDJtools* verwendeten Materials als Klonotyp definiert. Hingegen wurden mehr als die Hälfte der von *VDJtools* verwendeten *Reads* in der Subpopulation der CD8+CCR7+ Zellen zum Zeitpunkt m₀ der gesunden Kontrolle (55,3 %) als Klonotyp charakterisiert. Bis auf die CD8+CCR7+ Zellen von Patient C reduzierte sich der Anteil an Klonotypen beider Patientenproben und der gesunden Kontrolle innerhalb der Subpopulationen unter Therapie mit Fingolimod binnen des Behandlungszeitraums um nahezu der Hälfte (durchschnittlich um -54,2 %). Die CD8+CCR7+ Zellen von Patient C

zeigten einen Anstieg der Anteile an Klonotypen innerhalb der registrierten Reads um 11,1 %. Gleichzeitig zeigten sich die Subpopulationen der Kontrolle des untherapierten MS-Patienten mit einer durchschnittlichen Schwankung im Zehnmonatsverlauf von 0,4% nahezu stabil (*Tabelle 11*)

Tabelle 11: Quantitative Darstellung der durchflusszytometrisch Daten (FACS) und der durch *Next Generation Sequencing* generierten Rohdaten.

Aufgeführt sind die gesammelte Zellzahl nach FACS, totale *Read*-Anzahl, absolute und anteilige (*) TZR- β -Alignments, durch *VDJtools* verwendete *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 (P_C) und D (P_D), des untherapierten MS-Patienten (MS_u) und der gesunden Kontrolle (K_g) zu den Zeitpunkten vor Beginn der Therapie (m_0) und nach zwölf Monaten der Therapie mit Fingolimod (m_{12} , bei MS_u im Zehnmonatsverlauf m_{10}).

Patient C P_C	Zellzahl nach FACS	Read Anzahl total	TZR- β - Alignment von total	Von <i>VDJtools</i> verwendete Reads von total	Anzahl identifizierter Klonotypen
CD8+CCR7+ m_0	50.000	59.091	45.633 (77,2 %) *	36.661 (62 %) **	1988 (5,4 %) ***
CD8+CCR7+ m_{12}	7.190	8.973	5.851 (65,2 %)	4.875 (54,3 %)	803 (16,5 %)
CD8+CCR7- m_0	89.200	118.820	89.275 (75,1 %)	72.290 (60,8 %)	1925 (2,7 %)
CD8+CCR7- m_{12}	138.000	164.697	122.792 (74,6 %)	99.529 (60,4 %)	689 (0,7 %)
Patient D P_D	Zellzahl nach FACS	Read Anzahl total	TZR- β - Alignment von total	Von <i>VDJtools</i> verwendete Reads von total	Anzahl identifizierter Klonotypen
CD8+CCR7+ m_0	228.000	105.349	47.553	29.606	14.848

			(45 %)	(28,1 %)	(50,2 %)
CD8+CCR7+ m₁₂	2.390	2.974	1.519	1.230	298
			(51,1 %)	(41,4 %)	(24,2 %)
CD8+CCR7- m₀	390.000	142.238	70.859	54.230	5.277
			(49,8 %)	(38,1 %)	(9,7 %)
CD8+CCR7- m₁₂	230.000	158.285	67.862	53.405	3.091
			(42,9 %)	(33,7 %)	(5,8 %)
Gesunde Kontrolle K_g	Zellzahl nach FACS	Read Anzahl total	TZR-β- Alignment von total	Von VDJtools verwendete Reads von total	Anzahl identifizierter Klonotypen
CD8+CCR7+ m₀	254.000	73.481	24.194	7.973	4.407
			(32,9 %)	(10,9 %)	(55,3 %)
CD8+CCR7+ m₁₂	248.000	73.189	61.394	32.331	7.778
			(83,9 %)	(44,2 %)	(24,1 %)
CD8+CCR7- m₀	77.700	13.880	9.170	5.312	988
			(66,1 %)	(38,3 %)	(18,6 %)
CD8+CCR7- m₁₂	110.000	31.046	25.633	15.528	1.517
			(82,6 %)	(50 %)	(9,8 %)
MS-Patient untherapiert MS_u	Zellzahl nach FACS	Read Anzahl total	TZR-β- Alignment von total	Von VDJtools verwendete Reads von total	Anzahl identifizierter Klonotypen
CD8+CCR7+ m₀	70.000	211.643	145.336	77.516	8.330
			(68,7 %)	(36,6 %)	(10,7 %)

CD8+CCR7+ m₁₀	88.800	392.793	265.116 (67,5 %)	153.137 (39 %)	15.393 (10,1 %)
CD8+CCR7- m₀	210.000	741.129	636.916 (85,9 %)	374.665 (50,6 %)	3.347 (0,9 %)
CD8+CCR7- m₁₀	350.000	848.169	657.065 (77,5 %)	352.864 (41,6 %)	3.786 (1,1 %)

3.3 TZR- β -Rekombination der V- und J-Segmente der CD8+ T-Zellen

3.3.1 CD8+CCR7+ Subpopulation

In den beiden Patientenproben ließ sich im Vergleich zu den Kontrollen im Zeitraum von zwölf Monaten unter Therapie mit Fingolimod eine Reduktion der Kombinationsmöglichkeiten von V- und J-Segmenten beobachten. Bei Patient C ließ sich eine Reduktion um 54,1 % nachweisen, bei Patient D eine Reduktion um 73,9 %. In der Analyse der Kombinationsmöglichkeiten bei den Kontrollen zeigte sich im Vergleich dazu eine anteilige Erhöhung von durchschnittlich 12,7 % der Kombinationsmöglichkeiten im Beobachtungszeitraum von zehn/zwölf Monaten. Die absoluten Zahlen können aus *Tabelle 12* entnommen werden.

Tabelle 12: Übersicht der absoluten Anzahl an TZR- β -Rekombinationen von V- und J-Segmenten innerhalb der CD8+CCR7+ T-Zell-Subpopulation im Verlauf von zwölf Monaten vor und nach Therapie mit Fingolimod (Zeitpunkt m0 und m12 (*m₁₀)) von Patient C (P_C), Patient D (P_D), der gesunden Kontrolle (K_G) und dem untherapierten MS-Patienten (MS_u*).

Im Vergleich m₁₀/m₁₂ zeigt sich anders als bei den Kontrollproben bei den Patientenproben eine Reduktion der TZR- β -Rekombinationen von V- und J-Segmenten im Zwölfmonatsverlauf unter Therapie mit Fingolimod.

CD8+CCR7+	P _C	P _D	K _G	MS _u *
m ₀	486	525	472	467
m ₁₂	223	137	523	535
Vergleich m ₀ m ₁₀ /m ₁₂	-263	-388	+51	+68

Anhand eines Rekombinationsrasters gelang eine Visualisierung der einzelnen Rekombinationsmöglichkeiten der V- und J-Segmente (*Abbildung 16-18*). Durch Analyse der Daten und des Rekombinationsrasters erfolgte die Identifikation der Top fünf Rekombinationen an V- und J-Segmenten zu den Zeitpunkten vor und zwölf Monate nach Therapie mit Fingolimod (beim untherapierten MS-Patienten nach zehn Monaten). In der CD8+CCR7+ Subpopulation des Patienten C zum Zeitpunkt m₀ konnte die frequenteste Rekombination (TRBV7-9/TRBJ1-2) mit 14,6 % identifiziert werden. Alle anderen Rekombinationen zeigten sich im gesamten Beobachtungszeitraum von zwölf Monaten im niedrigfrequenten Bereich <5,1% (*Tabelle 13*). Die Rekombination TRBV7-9/TRBJ1-2 ließ sich zum Zeitpunkt m₁₂ unter den Top fünf Rekombinationen nicht wiederfinden, allerdings zeigten sich in beiden Patientenproben jeweils zwei Rekombinationen, die sich sowohl vor und nach der Therapie mit Fingolimod unter den Top fünf Rekombinationen befanden. Es fand sich in den Patientenproben zu beiden Beobachtungszeitpunkten eine größere Rekombinationsvielfalt innerhalb der Top fünf Rekombinationen unter Therapie mit Fingolimod als bei beiden Kontrollen. Wie in *Tabelle 13* ersichtlich konnten in beiden

Kontrollproben im Zehn-/Zwölfmonatsverlauf dieselben Top drei Rekombinationen identifiziert werden.

Tabelle 13: Auflistung der Top fünf V/J-Rekombinationen (Top1-5) und deren Frequenzen zum Zeitpunkt vor (m_0) und nach zwölf Monaten Therapie mit Fingolimod (m_{12} (* m_{10})) von Patient C (P_C), Patient D (P_D) und den Kontrollen (gesunder Proband K_g und untherapierter MS-Patient MS_u^*).

Die farblichen Markierungen dienen zur leichteren Identifikation gleicher Rekombinationsmuster innerhalb der Beobachtungszeitraums von zwölf Monaten. Es zeigt sich in den Top fünf der Patientenproben eine größere Rekombinationsvielfalt unter Therapie mit Fingolimod als bei beiden Kontrollen.

Top 5 V/J-Rekombination	Top 1	Top 2	Top 3	Top 4	Top 5
P_C	TRBV7-9/	TRBV5-1/	TRBV7-8/	TRBV5-1/	TRBV27/
m_0	TRBJ1-2 14,6 %	TRBJ2-1 3,6 %	TRBJ2-1 3,4 %	TRBJ2-7 2,6 %	TRBJ2-7 2,6 %
P_C	TRBV7-9/	TRBV29/	TRBV5-1/	TRBV29-1/	TRBV27/
m_{12}	TRBJ2-7 2,1 %	TRBJ1-1 2,0 %	TRBJ2-7 2,0 %	TRBJ2-1 1,9 %	TRBJ2-7 1,8 %
P_D	TRBV28/	TRBV27/	TRBV5-1/	TRBV27/	TRBV12-3/
m_0	TRBJ2-7 2,7 %	TRBJ2-7 2,3 %	TRBJ2-7 1,6 %	TRBJ2-1 %	TRBJ2-1 1,3 %
P_D	TRBV27/	TRBV28/	TRBV27/	TRBV5-1/	TRBV5-6/
m_{12}	TRBJ1-5 3,7 %	TRBJ2-7 3,6 %	TRBJ2-7 3,0 %	TRBJ1-6 %	TRBJ2-2 2,3 %
K_g	TRBV7-9/	TRBV7-9/	TRBV7-9/	TRBV12-4/	TRBV4-3/
m_0	TRBJ2-7 2,9 %	TRBJ1-1 2,7 %	TRBJ2-1 2,3 %	TRBJ1-1 %	TRBJ2-7 1,3 %
K_g	TRBV7-9/	TRBV7-9/	TRBV7-9/	TRBV7-9/	TRBV4-3/
m_{12}	TRBJ2-7 1,9 %	TRBJ1-1 1,9 %	TRBJ2-1 1,7 %	TRBJ1-2 %	TRBJ2-7 1,2 %

Top 5 V/J- Rekombination		Top 1	Top 2	Top 3	Top 4	Top 5
MS_u*	m₀	TRBV7-9/ TRBJ2-1 5,1 %	TRBV7-9/ TRBJ2-7 5,1 %	TRBV7-9/ TRBJ1-1 3,1 %	TRBV27/ TRBJ2-7 %	TRBV5-1/ TRBJ2-7 2,1 %
MS_u*	m₁₀	TRBV7-9/ TRBJ2-7 4,7 %	TRBV7-9/ TRBJ2-1 4,5 %	TRBV27/ TRBJ2-7 3,4 %	TRBV7-9/ TRBJ1-1 %	TRBV27/ TRBJ2-1 2,4 %

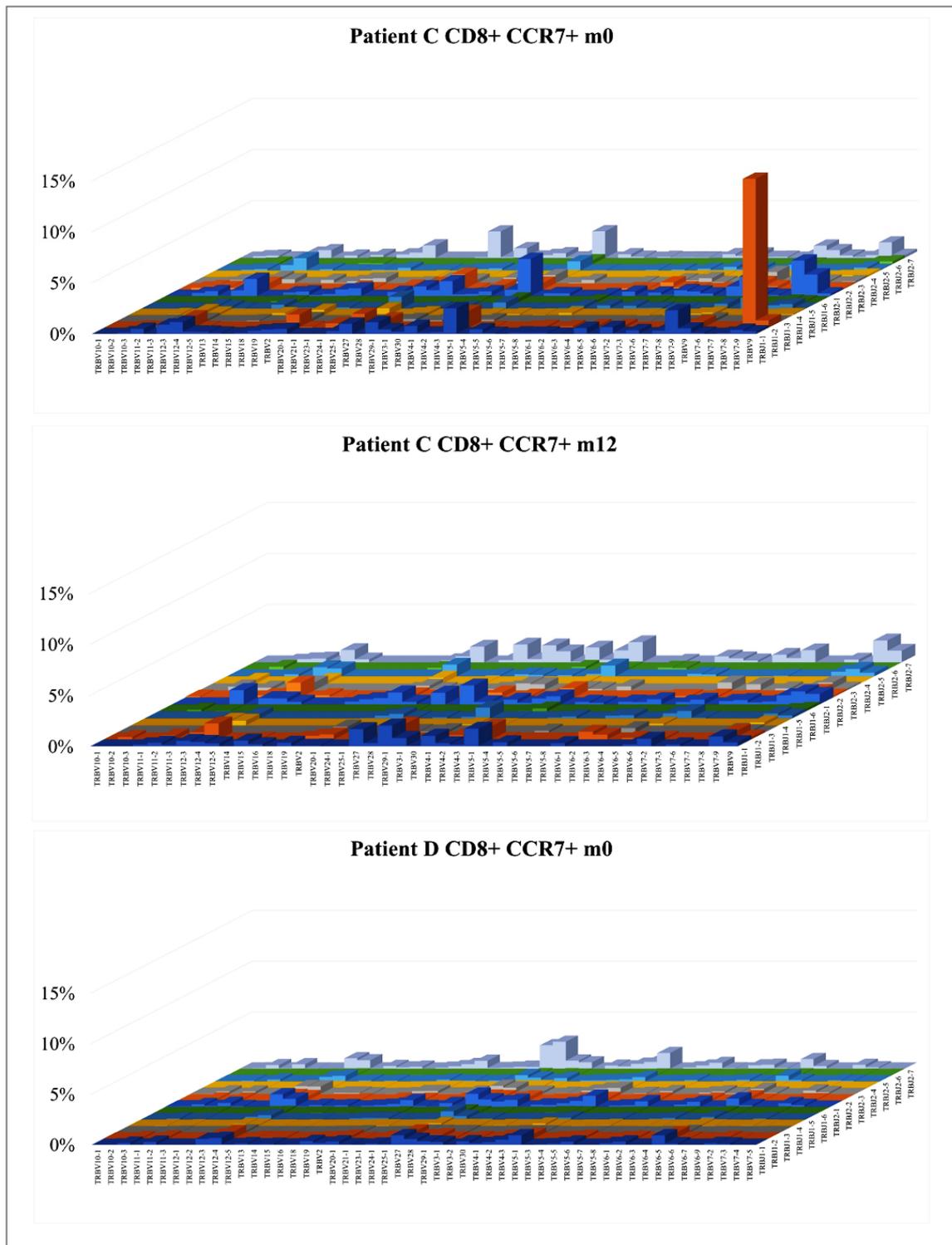


Abb. 16: Grafische Darstellung der Frequenz (Ordinate, y-Achse) einzelner TZR- β -Rekombinationen von V-Segmenten (Abszisse, x-Achse) und J-Segmenten (Applikate, z-Achse)

innerhalb der CD8+CCR7+ T-Zell-Subpopulation im Verlauf von zwölf Monaten vor und nach Therapie mit Fingolimod (Zeitpunkt m0 und m12) von Patient C (P_C) und Patient D (P_D) (hier m₀). Bei P_C zum Zeitpunkt m₀ zeigt sich die Rekombination *TRBV7-9/TRBJ1* mit 14,6 % am frequentesten, ist jedoch nach zwölf Monaten Therapie mit Fingolimod nicht mehr relevant darzustellen. Alle anderen Rekombinationsraster zeigen sich wenig auffällig für die Identifikation hochfrequenter Rekombinationen.

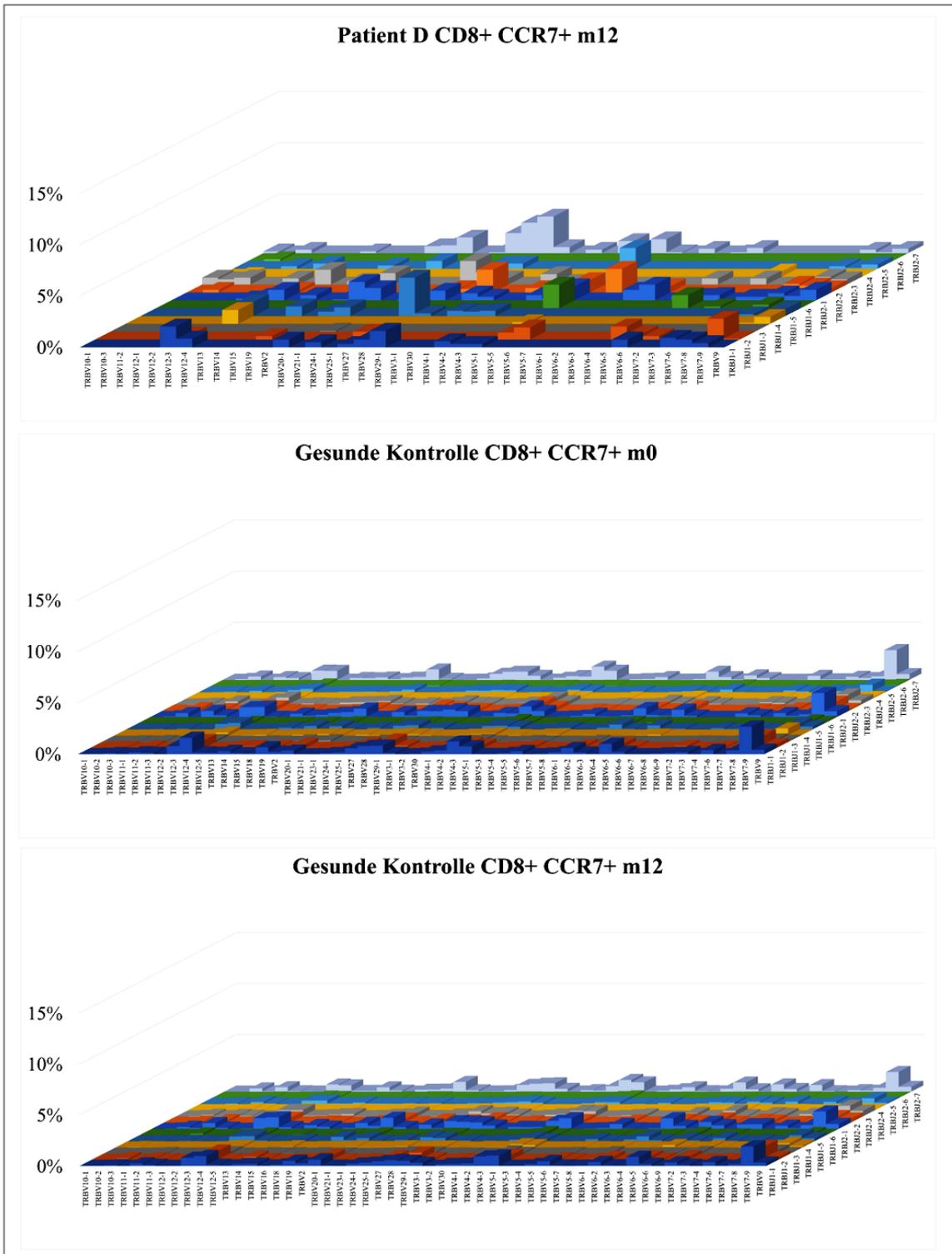


Abb. 17: Grafische Darstellung der Frequenz (Ordinate, y-Achse) einzelner TZR- β -Rekombinationen von V-Segmenten (Abszisse, x-Achse) und J-Segmenten (Applikate, z-Achse) innerhalb der CD8+CCR7+ T-Zell- Subpopulation im Verlauf von zwölf Monaten nach Therapie

mit Fingolimod (Zeitpunkt m_{12}) von Patient D (P_D), sowie der Zwölfmonatsverlauf der gesunden Kontrolle (K_g) (m_0 und m_{12}).

Alle Rekombinationsraster zeigen sich wenig auffällig für die Identifikation hochfrequenter Rekombinationen und kommen nahezu stabil im Zwölfmonatsverlauf zur Darstellung.

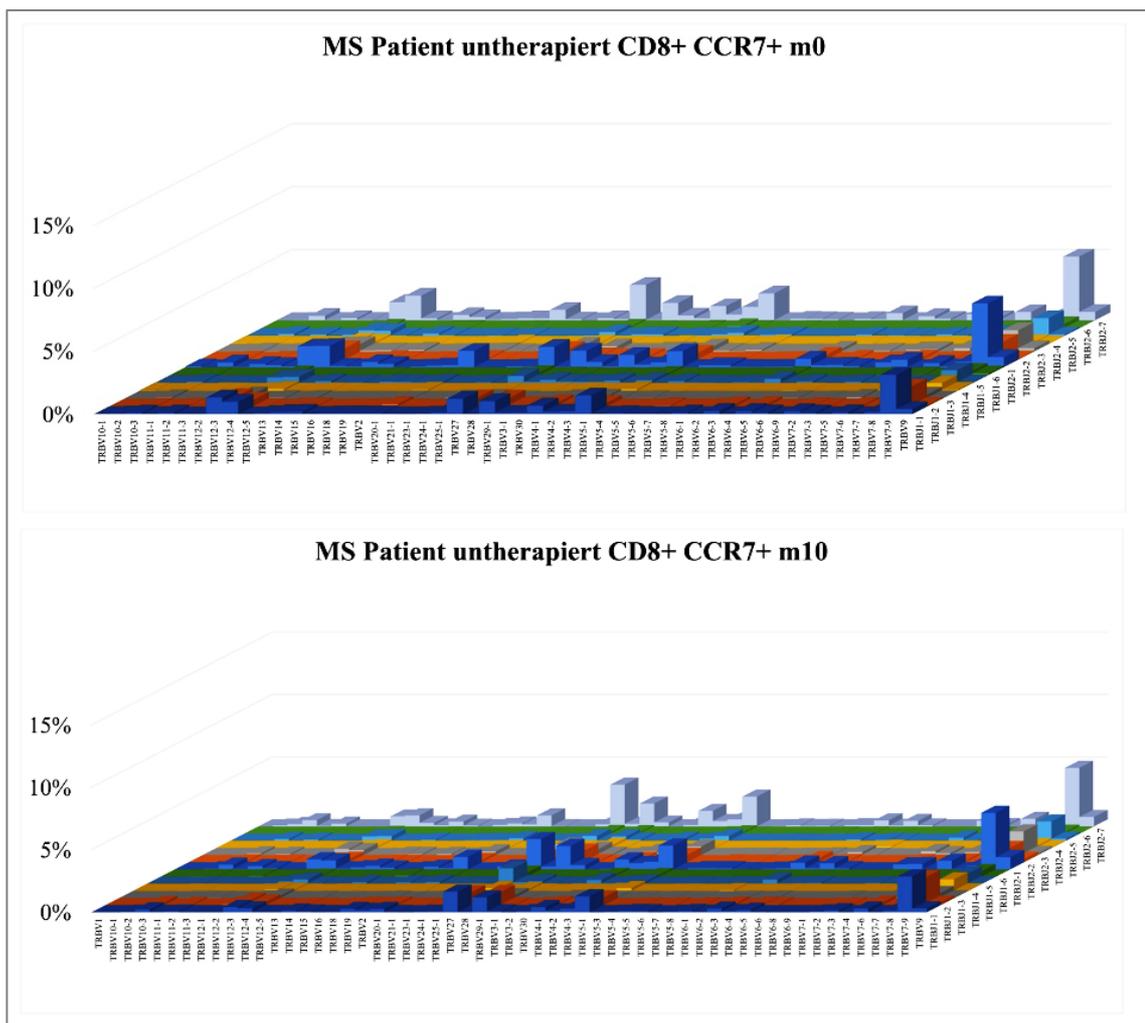


Abb. 18: Grafische Darstellung der Frequenz (Ordinate, y-Achse) einzelner TZR- β -Rekombinationen von V-Segmenten (Abszisse, x-Achse) und J-Segmenten (Applikate, z-Achse)

innerhalb der CD8+CCR7+ T-Zell-Subpopulation im Verlauf von zehn Monaten (Zeitpunkt m_0 und m_{10}) des untherapierten MS-Patienten (MS_u).

Vereinzelte Rekombinationsmuster (*TRBV7-9/TRBJ2-1* und *TRBV7-9/TRBJ2-7* mit je 5,1 %) zeichnen sich vor dem Hintergrund einer vielfältigen Rekombinationsvielfalt ab, die im Zehnmonatsverlauf nahezu stabil bleibt.

3.3.2 CD8+CCR7- Subpopulation

Auch in den CD8+CCR7- Subpopulationen beider Patientenproben ließ sich im Vergleich zu den Kontrollen im Zeitraum von zwölf Monaten unter Therapie mit Fingolimod eine Reduktion der Kombinationsmöglichkeiten von V- und J-Segmenten beobachten. Bei Patient C ließ sich eine Reduktion um 39,6 % nachweisen, bei Patient D eine Reduktion um 13,7 %. In der Analyse der Kombinationsmöglichkeiten bei den Kontrollen zeigte sich im Vergleich dazu eine anteilige Erhöhung der Kombinationsmöglichkeiten im Beobachtungszeitraum von zwölf Monaten in der gesunden Kontrolle um 18,4 %, die Probe des untherapierten MS-Patienten ergab ein nahezu stabiles absolutes Rekombinationsniveau (+ 1,4 %) im Zehnmonatsverlauf. Die absoluten Zahlen können aus *Tabelle 14* entnommen werden. Augenscheinlich zeigte sich somit in allen CD8+ Subpopulationen, egal ob CCR7+ oder CCR7-, durch die Therapie mit Fingolimod eine Reduktion der absoluten TZR- β -Rekombinationszahl von V- und J-Segmenten und somit eine generelle Reduktion der Rekombinationsvielfalt.

Tabelle 14: Übersicht der absoluten Anzahl an TZR- β -Rekombinationen von V- und J-Segmenten innerhalb der CD8+CCR7- T-Zell-Subpopulation im Verlauf von zwölf Monaten vor und nach Therapie mit Fingolimod (Zeitpunkt m_0 und m_{12} (* m_{10})) von Patient C (P_C), Patient D (P_D), der gesunden Kontrolle (K_g) und dem untherapierten MS-Patienten (MS_u^*).

Im Vergleich $m_0/m_{10}/m_{12}$ zeigt sich anders als bei den Kontrollproben bei den Patientenproben eine Reduktion der TZR- β -Rekombinationen von V- und J-Segmenten im Zwölfmonatsverlauf unter Therapie mit Fingolimod.

CD8+CCR7-	P_C	P_D	K_g	MS_u^*
m_0	323	488	293	369
m_{12}	195	421	347	375
Vergleich $m_0 \quad m_{10}/m_{12}$	-128	-67	+54	+6

In der CD8+CCR7- Subpopulation des untherapierten MS-Patienten konnte zum Zeitpunkt m_0 die frequenteste Rekombination *TRBV6-3/TRBJ2-2* mit 58,9 % identifiziert werden. Zudem zeigte sich bei Patient D zum selben Zeitpunkt eine weitere hochfrequente Rekombination aus den Segmenten *TRBV6-4/TRBJ2-5* mit einer Frequenz von 40,6 %. Bis auf die Rekombination *TRBV6-3/TRBJ1-5* als zweithöchste frequente Rekombination innerhalb der Top fünf Rekombinationsmuster des untherapierten MS-Patienten zeigten sich alle anderen Rekombinationen im gesamten Beobachtungszeitraum von zwölf Monaten im niedrigfrequenten Bereich <6% (Tabelle 15). Anders als noch in den CD8+CCR7+ Subpopulationen zu beobachten war, zeigte bei den CD8+CCR7- Subpopulationen nur Patient D eine hohe Rekombinationsvielfalt innerhalb der Top fünf Rekombinationen (kein einziges Rekombinationsmuster von m_0 zum Zeitpunkt m_{12} nachweisbar), das bedeutet auch, dass die zum Zeitpunkt m_0 dominante Rekombination *TRBV6-4/TRBJ2-5* in den Top fünf Rekombinationen zum Zeitpunkt m_{12} nicht wiederzufinden war. Bei Patient C und dem untherapierten MS-Patienten ließen sich nach zwölf/zehn Monaten vier von fünf Rekombinationen unter den Top fünf wiederfinden (Abbildung 19-21).

Tabelle 15: Auflistung der Top fünf V/J-Rekombinationen (Top1-5) und deren Frequenzen zum Zeitpunkt vor (m_0) und nach zwölf Monaten Therapie mit Fingolimod (m_{12} (* m_{10})) von Patient C (P_C), Patient D (P_D) und den Kontrollen (Gesunder Proband K_g und untherapierter MS-Patient MS_u^*).

Die farblichen Markierungen dienen zur leichteren Identifikation gleicher Rekombinationsmuster innerhalb der Beobachtungszeitraums von zwölf Monaten. Es zeigt sich in den Top fünf Rekombinationen in der Patientenprobe P_D eine größere Rekombinationsvielfalt unter Therapie mit Fingolimod als bei beiden Kontrollen und der Patientenprobe P_C .

Top 5 V/J-Rekombination	Top 1	Top 2	Top 3	Top 4	Top 5
P_C m_0	TRBV5-1/ TRBJ1-1 4,3 %	TRBV20-1/ TRBJ1-1 3,8 %	TRBV20-1/ TRBJ2-7 3,4 %	TRBV20-1/ TRBJ2-1 2,4 %	TRBV29-1/ TRBJ2-1 2,4 %
P_C m_{12}	TRBV5-1/ TRBJ1-1 6 %	TRBV20-1/ TRBJ2-1 4,7 %	TRBV20-1/ TRBJ2-7 4,4 %	TRBV29-1/ TRBJ2-1 2,5 %	TRBV27/ TRBJ1-1 2,1 %
P_D m_0	TRBV6-5/ TRBJ2-5 40,6 %	TRBV12-3/ TRBJ2-5 2,5 %	TRBV7-9/ TRBJ1-2 2,1 %	TRBV9/ TRBJ1-4 2,0 %	TRBV9/ TRBJ2-3 1,7 %
P_D m_{12}	TRBV12-3/ TRBJ2-7 5,2 %	TRBV4-3/ TRBJ2-7 2,8 %	TRBV10-3/ TRBJ2-4 2,6 %	TRBV6-4/ TRBJ2-3 2,6 %	TRBV4-3/ TRBJ2-3 2,5 %
K_g m_0	TRBV12-4/ TRBJ2-2 4,1 %	TRBV29-1/ TRBJ2-1 4,0 %	TRBV9/ TRBJ1-5 3,9 %	TRBV6-3/ TRBJ2-1 3,0 %	TRBV12-4/ TRBJ1-1 2,6 %
K_g m_{12}	TRBV2/ TRBJ2-2 4,4 %	TRBV12-4/ TRBJ2-2 4,1 %	TRBV7-2/ TRBJ1-2 3,8 %	TRBV5-1/ TRBJ2-1 3,7 %	TRBV29-1/ TRBJ2-1 3,4 %

MS_u	TRBV6-3/	TRBV6-3/	TRBV7-2/	TRBV11-2/	TRBV12-4/
m₀	TRBJ2-2	TRBJ1-5	TRBJ2-1	TRBJ2-3	TRBJ2-5
	58,9 %	7,9 %	3,8 %	2,8 %	2,5 %
MS_u	TRBV6-3/	TRBV6-3/	TRBV7-2/	TRBV7-6/	TRBV11-2/
m₁₀	TRBJ2-2	TRBJ1-5	TRBJ2-1	TRBJ2-7	TRBJ2-3
	39,2 %	19 %	4,8 %	3,2 %	2,9 %

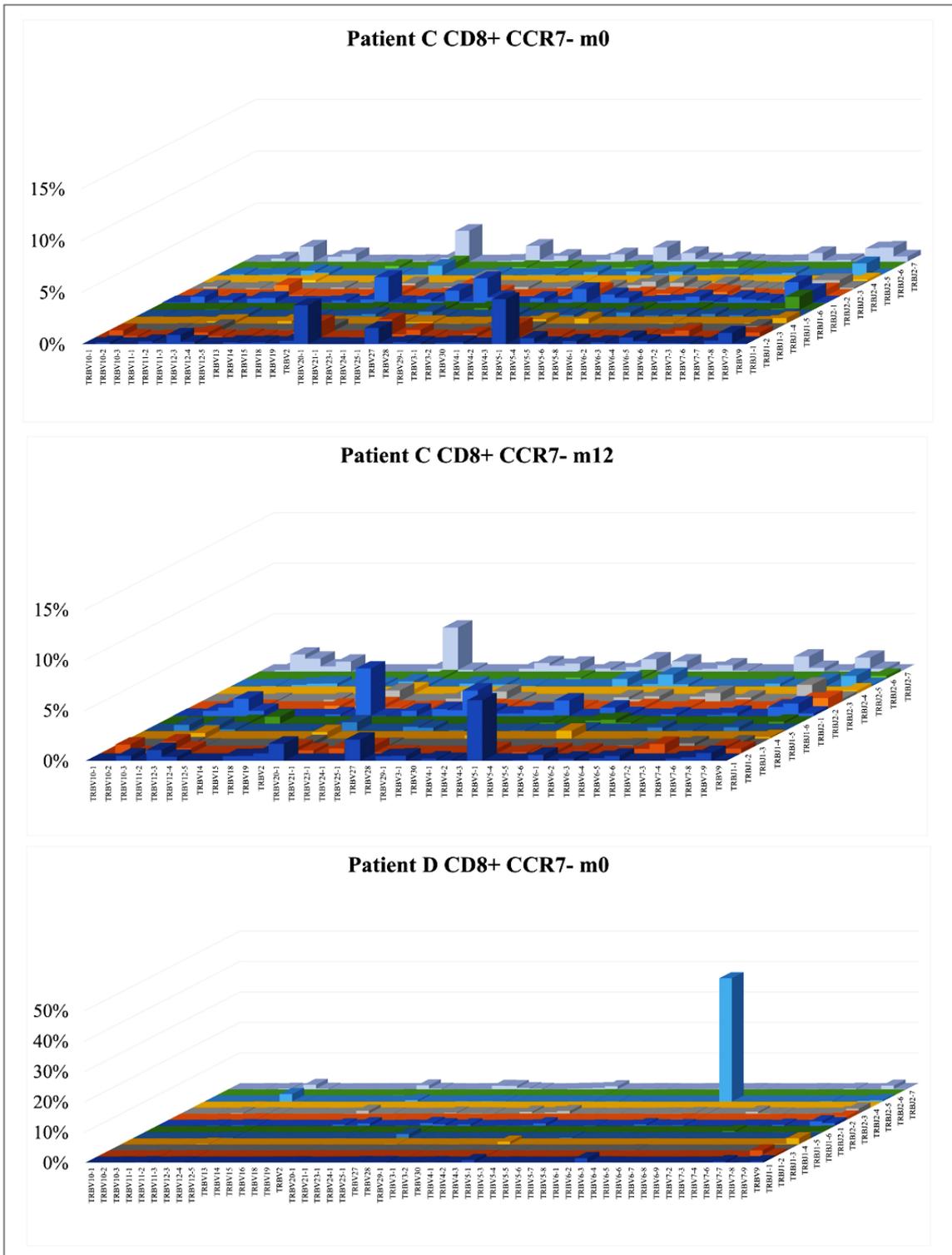


Abb. 19: Grafische Darstellung der Frequenz (Ordinate, y-Achse) einzelner TZR- β -Rekombinationen von V-Segmenten (Abszisse, x-Achse) und J-Segmenten (Applikate, z-Achse)

innerhalb der CD8+CCR7- T-Zell-Subpopulation im Verlauf von zwölf Monaten vor und nach Therapie mit Fingolimod (Zeitpunkt m_0 und m_{12}) von Patient C (P_C) und Patient D (P_D) (hier m_0). Angesichts der dominanten Rekombination *TRBV6-4/TRBJ2-5* in der Probe des Patienten D mit 40,6% bedurfte es zur Visualisierung des Sachverhaltes einer Adaption der Achseneinteilung der Ordinate. Das Rekombinationsraster von Patient C zu beiden Zeitpunkten m_0 und m_{12} zeigt sich nahezu stabil.

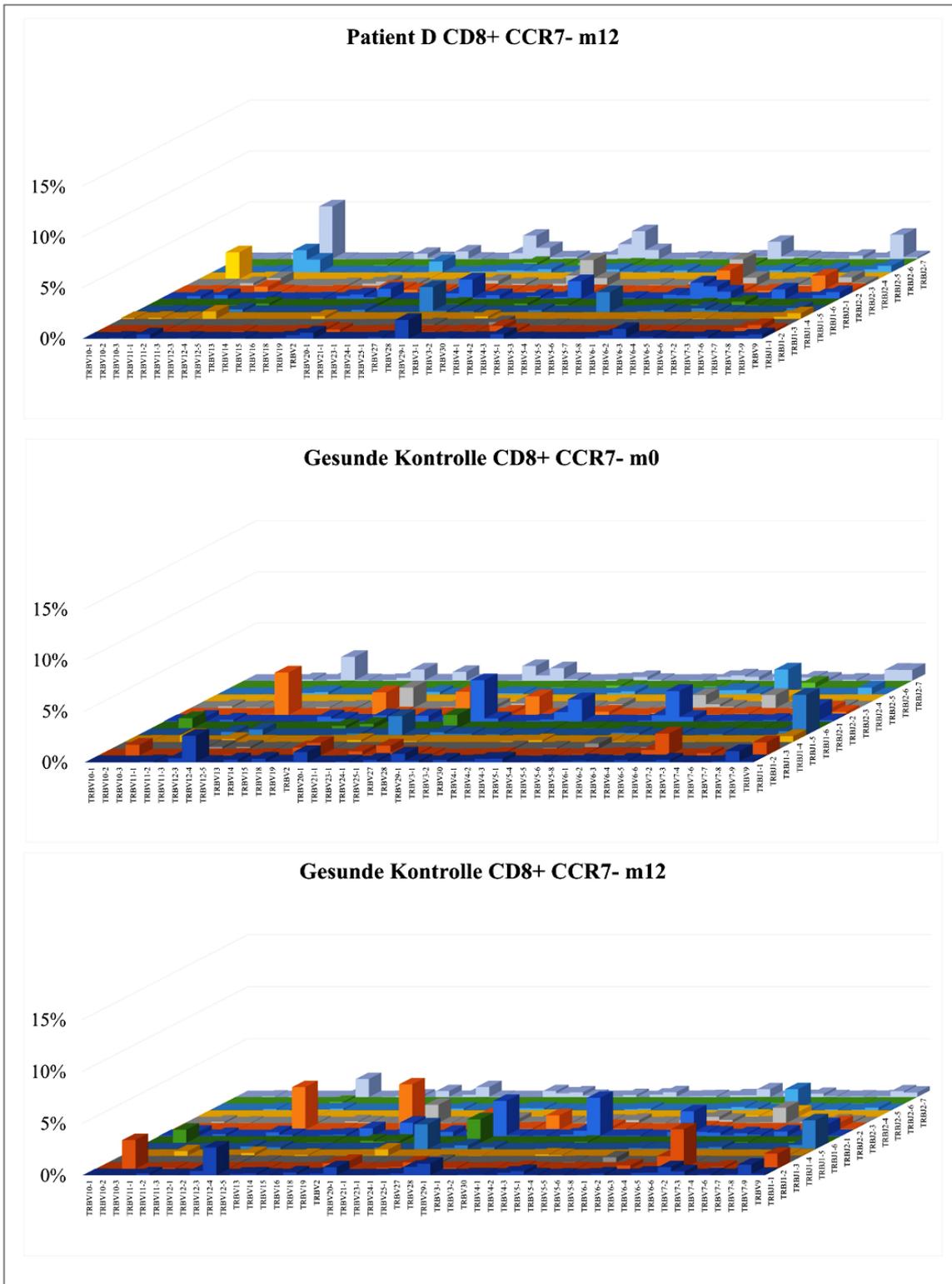


Abb. 20: Grafische Darstellung der Frequenz (Ordinate, y-Achse) einzelner TZR- β -Rekombinationen von V-Segmenten (Abszisse, x-Achse) und J-Segmenten (Applikate, z-Achse)

innerhalb der CD8+CCR7- T-Zell-Subpopulation im Verlauf von zwölf Monaten nach Therapie mit Fingolimod (Zeitpunkt m_{12}) von Patient D (P_D), sowie der Zwölfmonatsverlauf der gesunden Kontrolle (K_g) (m_0 und m_{12}).

Die in Abb. 19 hochfrequente Rekombination von *TRBV6-4/TRBJ2-5* von Patient D ist im Zwölfmonatsverlauf nicht mehr als hochfrequent identifizierbar. Das Rekombinationsmuster der gesunden Kontrolle zum Zeitpunkt m_0 zeigt sich um Zeitpunkt m_{12} nahezu stabil. Eine deutlich dominante Rekombination lässt sich in den Proben der gesunden Kontrolle nicht identifizieren.

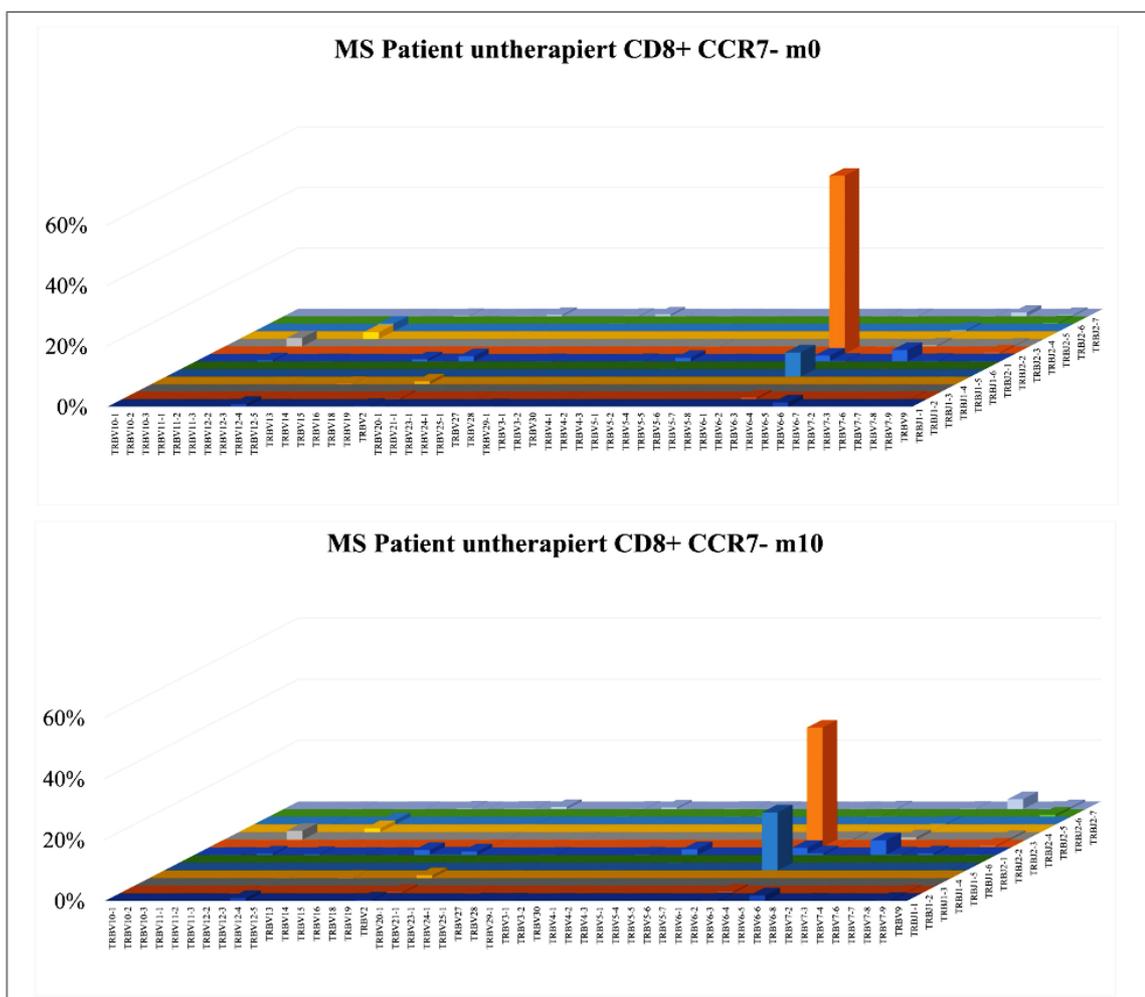


Abb. 21: Grafische Darstellung der Frequenz (Ordinate, y-Achse) einzelner TZR- β -Rekombinationen von V-Segmenten (Abszisse, x-Achse) und J-Segmenten (Applikate, z-Achse)

innerhalb der CD8+CCR7- T-Zell-Subpopulation im Verlauf von zehn Monaten (Zeitpunkt m_0 und m_{10}) des untherapierten MS-Patienten (MS_u).

Angesichts der dominanten Rekombination *TRBV6-3/TRBJ2-2* in der Probe des untherapierten MS-Patienten mit 58,9 % (m_0) und 39,2 % (m_{12}) bedurfte es zur Visualisierung des Sachverhaltes einer Adaption der Achseneinteilung der Ordinate. Das Rekombinationsraster zeigt sich im Zehnmonatsverlauf nahezu stabil, die *TRBV6-3/TRBJ2-2*- Rekombination sticht weiterhin als dominante Rekombination hervor.

3.4 Diversität und Klonalität des TZR- β -Repertoires der CD8+ T-Zellen

Basierend auf den NGS-Rohdaten, die mittels *MiXCR* analysiert werden konnten, erfolgte durch die Verwendung des *VDJtools* Programmes die Visualisierung der Klonalität und Diversität des TZR- β -Repertoires zu den Zeitpunkten m_0 und m_{12} . Hierzu wurden *Donut Diagramme* erstellt, die aus drei Schichten bestehen:

- 1. Schicht (innen)- Darstellung der Diversität:** Häufigkeit an CDR3-Sequenzen des CD8+ TZR- β -Repertoires zu den Zeitpunkten m_0 und m_{12} bzw. m_{10} . Die Zahlen 1, 2 und 3+ bilden zusammen das gesamte Repertoire ab (100 %).
 - Zahl 1 (*Singletons*): Anteil der Sequenzen, die im gesamten Repertoire nur ein einziges Mal vorkommen.
 - Zahl 2 (*Doubletons*): Anteil der Sequenzen, die im gesamten Repertoire zwei Mal vorkommen.
 - Zahl 3+: Anteil der Sequenzen, die im gesamten Repertoire drei Mal und/oder häufiger vorkommen.
- 2. Schicht (Mitte)- Darstellung der Klonalität:** Einteilung der „3+ Sequenzen“ aus der inneren Schicht in Quintile (Q1-Q5). Q1 beinhaltet die häufigsten 20 % der ≥ 3 mal auftretenden CDR3-Sequenzen, Q2 die darauffolgenden häufigsten 20 % etc.
- 3. Schicht (außen)- Grundlage für die Auswertung der klonalen Persistenz (siehe Vgl. 3.5 Longitudinale Persistenz des CD8+ TZR- β -Repertoires):** Darstellung der

zehn häufigsten klonal auftretenden CDR3-Sequenzen und deren Anteil am Gesamtrepertoire.

3.4.1 CD8+CCR7+ Subpopulation

Patient C und D zeigten in der Analyse der CD8+CCR7+ Subpopulationen ein inverses Verhalten bezüglich ihrer Diversität und Klonalität im longitudinalen Verlauf (*Tabelle 16, Abbildung 22a.-b.*). Betrachtete man die *Singletons* und *Doubletons* als Ausdruck an Diversität, so führte dies in Ergänzung ihrer beiden prozentualen Anteile im Zeitraum von zwölf Monaten unter Therapie mit Fingolimod bei Patient C zu einer Erhöhung der Anteile um das 3,8-fache (Steigerung an Diversität) und bei Patient D um eine Reduktion von 74,5 % (Verminderung an Diversität). Im gleichen Zeitraum sank die Klonalität in der Probe von Patient C leicht (Reduktion des Anteils an 3+Sequenzen um 5,8 %), während die Klonalität der Probe von Patient D stieg (Erhöhung des Anteils an 3+ Sequenzen um das 1,7-fache).

Tabelle 16: Auflistung der prozentualen Frequenzen an Singletons, Doubletons und 3+ Sequenzen zur Darstellung der quantitativen Verhältnisse als Ausdruck an Diversität (1+2; 3+) und Klonalität (Quantile Q1-Q5) des CD8+CCR7+ TZR- β -Repertoires von Patient C (P_C), Patient D (P_D), der gesunden Kontrolle (K_g) und des untherapierten MS-Patienten (MS_u) im Verlauf von zwölf/zehn* Monaten unter Therapie mit Fingolimod (Zeitpunkt m0 und m12 und m10*).

	Singletons	Doubletons	3+ Sequenzen	Q1	Q2	Q3	Q4	Q5
P _C m ₀	1,3 %	0,7 %	98 %	45 %	24,3 %	15,6 %	9,3 %	4,1%
P _C m ₁₂	5,7 %	2 %	92,3 %	34,8 %	22,3 %	15,7 %	12,1 %	7,4 %
P _D m ₀	24,1 %	25,4 %	50,5 %	16,3 %	10,5 %	8,6 %	7,6 %	7,6 %
P _D m ₁₂	8,4 %	4,2 %	87,3 %	34 %	19,1 %	14,4 %	11 %	8,8 %

	Singletons	Doubletons	3+ Sequenzen	Q1	Q2	Q3	Q4	Q5
K_g m₀	29,7 %	28,7 %	41,6 %	12,8 %	8,7 %	7 %	6,5 %	6,5 %
K_g m₁₂	5,9 %	6,7 %	87,4 %	32,1 %	20 %	15,2 %	11,4 %	8,7 %
MS_u m₀	3,6 %	3 %	93,4 %	50 %	21,4 %	12,1 %	6,6 %	3,4 %
MS_u m₁₀	3,3 %	2,9 %	93,8 %	50,6 %	21,5 %	12 %	6,5 %	3,2 %

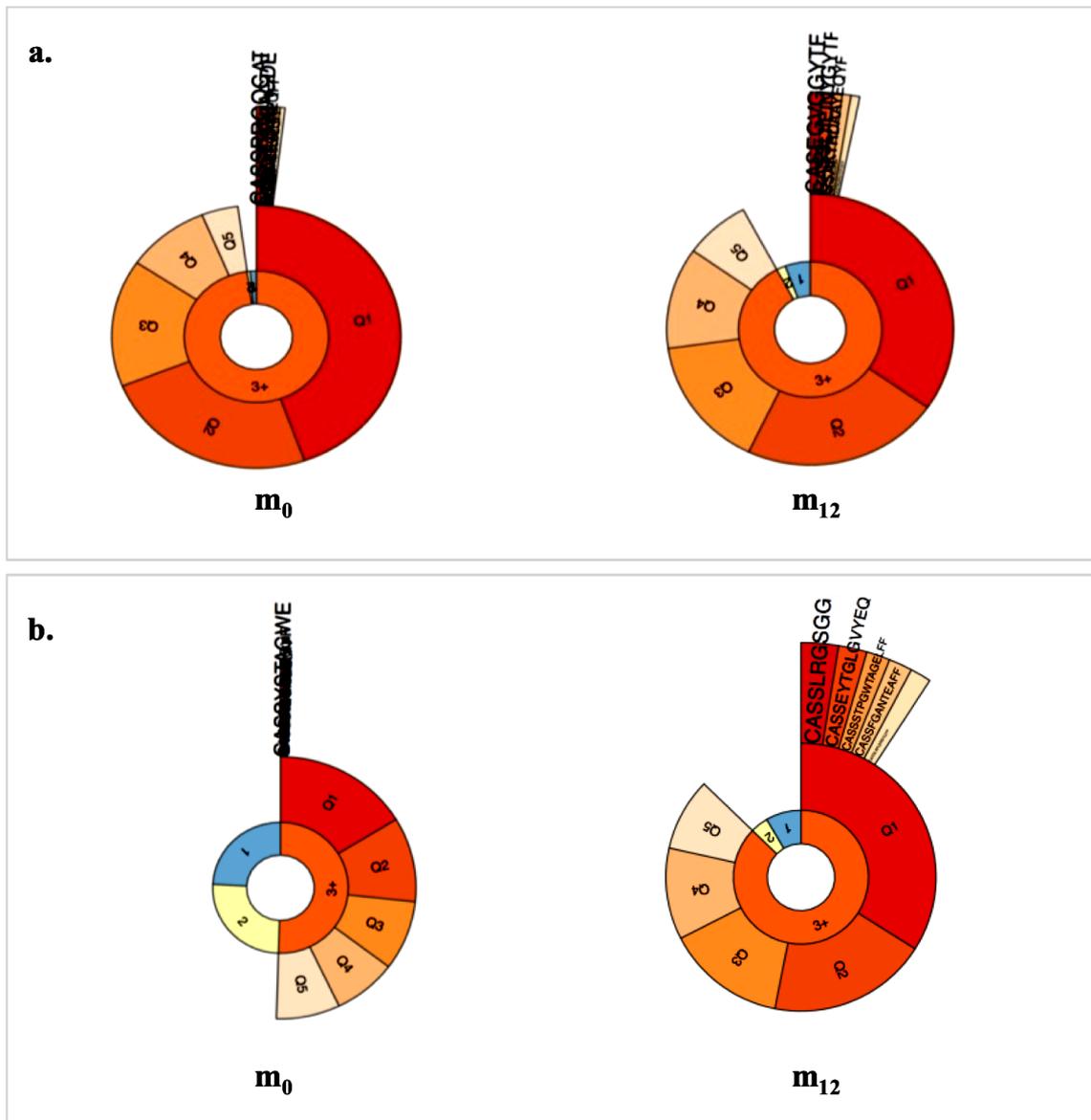


Abb. 22 a.-b.: Donut Diagramm der Diversität (1+2; 3+) und Klonalität (Quantile Q1-5) des CD8+CCR7+ TZR- β -Repertoires mit Auflistung der prozentualen Anteile der Singletons und Doubletons (1+2), der ≥ 3 mal auftretenden CDR3-Sequenzen (3+), der Quantile Q1-5 und der zehn häufigsten* CDR3-Sequenzen von Patient C P_C (a.) und Patient D P_D (b.) im Verlauf von zwölf Monaten unter Therapie mit Fingolimod (Zeitpunkt m₀ und m₁₂).

Die Singletons (1) und Doubletons (2) sind ein Ausdruck für Diversität, da sie Sequenzen beinhalten, die im gesamten Repertoire nur einmal oder zweimal identifiziert werden können. Je höher dieser Anteil desto diverser ist das Repertoire. Die CDR3-Sequenzen (3+) und deren Aufspaltung in Quantile (Q1-5) sind Ausdruck der Klonalität, je mehr Klone eines Klonotypen vorliegen (idiotype Sequenz) desto monoklonaler ist das Repertoire. Die Donut Diagramme der Patientenproben zeigten ein inverses Verhalten. Während in

der Probe von Patient C die Diversität leicht stieg und die Klonalität sank, stieg die Diversität und sank die Klonalität in der Probe von Patient D während der zwölf Monate der Therapie mit Fingolimod. * *Je nach Anteilsgröße sind visuell nicht alle zehn häufigsten 3+ Sequenzen dargestellt, da die Anteile teilweise zu klein sind und nicht adäquat in ihrer Klonsequenz lesbar sind. Ausführliche Analyse unter 3.5 Longitudinale Persistenz des CD8+ TZR- β -Repertoires.*

Ähnlich wie bei Patient D verhielt es sich in der Analyse der gesunden Kontrolle. Im Zwölfmonatsverlauf zeigte sich eine anteilige Reduktion der *Singletons* und *Doubletons* um 78,4 % (Abnahme der Diversität) bei gleichzeitiger Erhöhung der Klonalität durch Erhöhung der anteiligen 3+ Sequenzen um das 2,1-fache. Die Probe des untherapierten MS-Patienten zeigte im Vergleich zu allen anderen CD8+CCR7+ Subpopulationen interessanterweise ein sehr stabiles Niveau der Klonalität und Diversität am gesamten TZR- β -Repertoire im Zehnmonatsverlauf (*Tabelle 16, Abbildung 23a.-b.*).

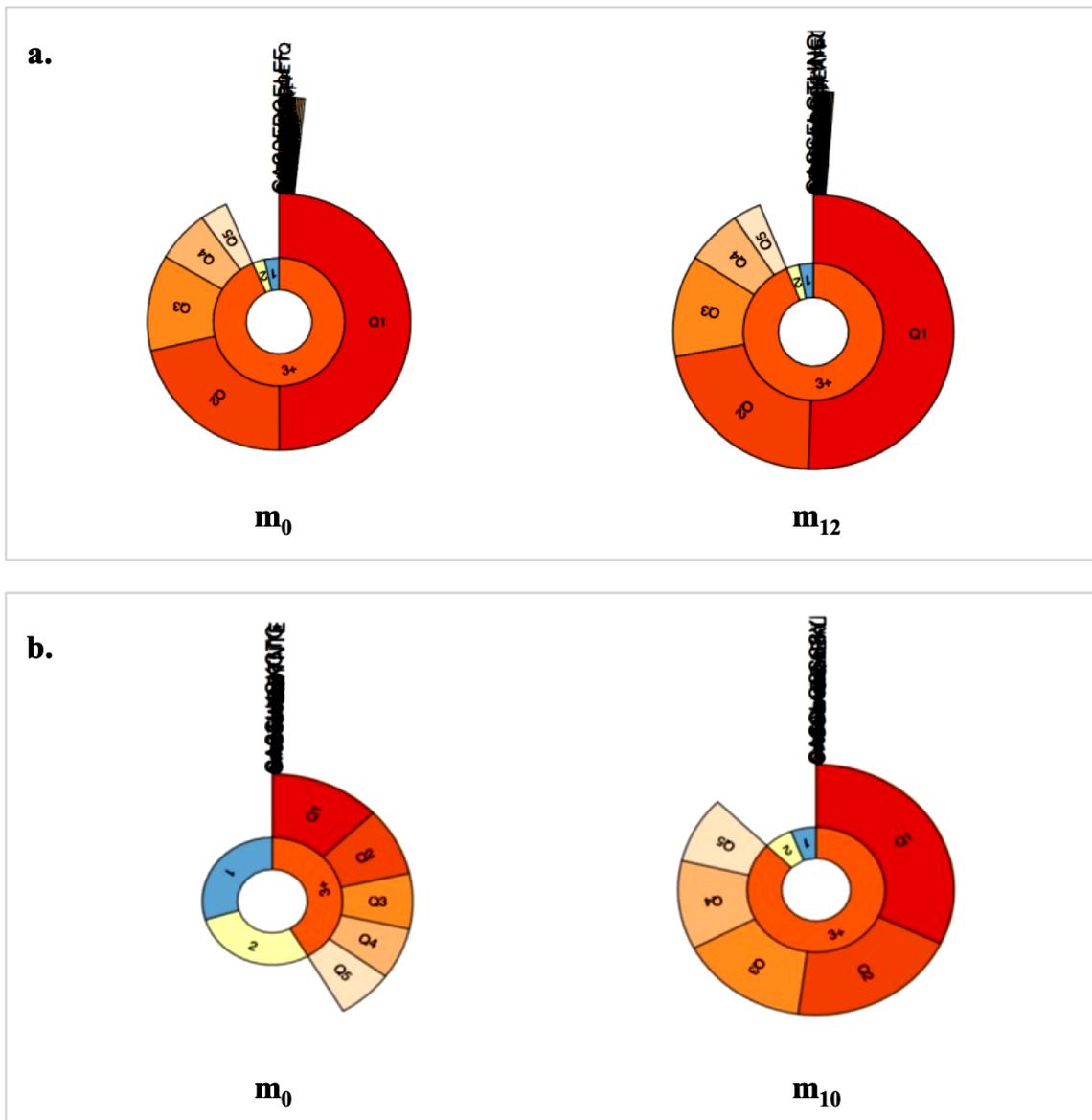


Abb. 23 a.-b.: Donut Diagramm der Diversität (1+2; 3+) und Klonalität (Quantile Q1-5) des CD8+CCR7+ TZR- β -Repertoires mit Auflistung der prozentualen Anteile der Singletons und Doubletons (1+2), der ≥ 3 mal auftretenden CDR3 Sequenzen (3+), der Quantile Q1-5 und der zehn häufigsten CDR3-Sequenzen der gesunden Kontrolle Kg (a.) und des untherapierten MS-Patienten MSu* (b.) im Zeitraum von zwölf/zehn Monaten (m₀ und m₁₂ und *m₁₀).

Die Singletons (1) und Doubletons (2) sind ein Ausdruck für Diversität, da sie Sequenzen beinhalten, die im gesamten Repertoire nur einmal oder zweimal identifiziert werden können. Je höher dieser Anteil desto diverser ist das Repertoire. Die CDR3-Sequenzen (3+) und deren Aufspaltung in Quantile (Q1-5) sind Ausdruck der Klonalität, je mehr Klone eines Klonotypen vorliegen (idiotype Sequenz) desto monoklonaler ist das Repertoire. Die Donut Diagramme der gesunden Kontrolle zeigten eine Abnahme der Diversität bei Zunahme der Klonalität im Zwölfmonatsverlauf. Die Donut Diagramme des untherapierten MS-Patienten

zeigten eine auffällige Stabilität sowohl bzgl. der Diversität als auch der Klonalität. *Je nach Anteilsgröße sind visuell nicht alle zehn häufigsten 3+ Sequenzen dargestellt, da die Anteile teilweise zu klein sind und nicht adäquat in ihrer Klonsequenz lesbar sind. Ausführliche Analyse unter 3.5 Longitudinale Persistenz des CD8+ TZR- β -Repertoires.

3.4.2 CD8+CCR7- Subpopulation

Anders als bei den CD8+CCR7+ Subpopulationen zeigte sich in der Analyse der CD8+CCR7- Subpopulationen bei beiden Patientenproben eine ähnliche Entwicklung der Klonalität und Diversität im Verlauf von zwölf Monaten unter Therapie mit Fingolimod. Betrachtete man erneut die *Singletons* und *Doubletons* als Ausdruck an Diversität, so führte dies in Ergänzung ihrer beiden prozentualen Anteile bei Patient C zu einer Reduktion um 77,8 % und bei Patient D um eine Reduktion von 67,5 % (bei beiden Proben Verminderung an Diversität). Im gleichen Zeitraum zeigten sich keine relevanten Schwankungen bei der Analyse der 3+ Sequenzen als Ausdruck einer stabilen Klonalität (Tabelle 17, Abbildung 24a.-b.).

Tabelle 17: Auflistung der prozentualen Frequenzen an Singletons, Doubletons und 3+ Sequenzen zur Darstellung der quantitativen Verhältnisse als Ausdruck an Diversität (1+2; 3+) und Klonalität (Quantile Q1-Q5) des CD8+CCR7- TZR- β -Repertoires von Patient C (P_C), Patient D (P_D), der gesunden Kontrolle (K_G) und des untherapierten MS-Patienten (MS_u*) im Verlauf von zwölf/zehn* Monaten unter Therapie mit Fingolimod (Zeitpunkt m0 und m12 und m10*).

	Singletons	Doubletons	3+ Sequenzen	Q1	Q2	Q3	Q4	Q5
P_C m₀	0,7 %	0,2 %	99,1 %	55,5 %	20,8 %	12,6 %	7,3 %	2,9 %
P_C m₁₂	0,2 %	0,0002 %	99,8 %	52,7 %	21,7 %	14,5 %	8,4 %	2,6 %
P_D m₀	4,2 %	3,5 %	92,3 %	81,1 %	4,3 %	2,8 %	2,2 %	1,9 %

	Singletons	Doubletons	3+ Sequenzen	Q1	Q2	Q3	Q4	Q5
P_D m₁₂	1,6 %	0,9 %	97,5 %	75,3 %	10,5 %	5,8 %	3,7 %	2,3 %
K_g m₀	7,8 %	7,4 %	84,8 %	61 %	9,6 %	5,9 %	4,5 %	3,9 %
K_g m₁₂	2,5 %	2,5 %	95,0 %	2,5 %	9,7 %	6,5 %	4,9 %	3,5 %
MS_u m₀	0,3 %	0,2 %	99,5 %	96,6 %	1,4 %	0,8 %	0,4 %	0,2 %
MS_u m₁₂	0,4 %	0,3 %	99,3 %	95,3 %	2,2 %	1,1 %	0,5 %	0,3 %

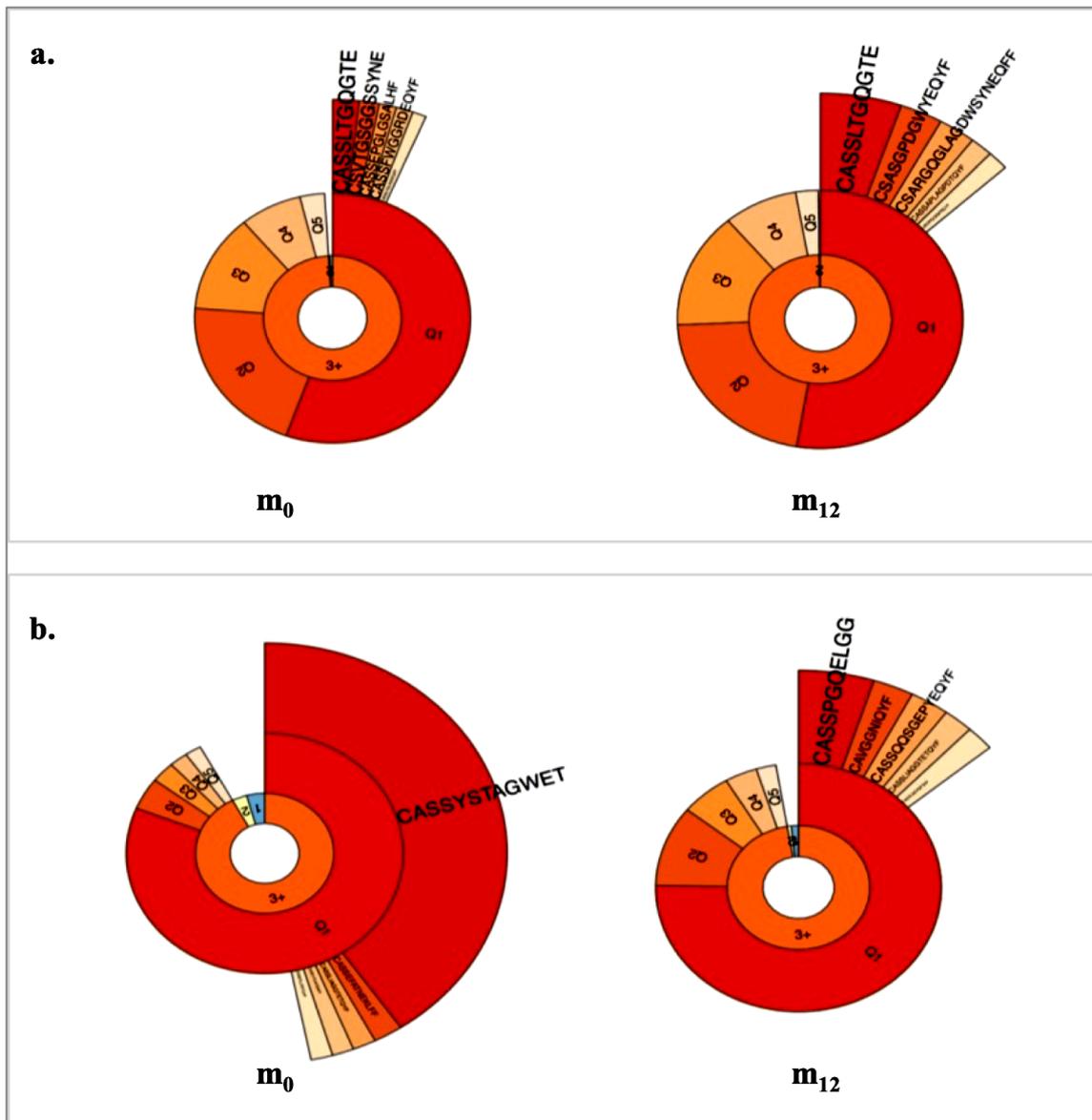


Abb. 24 a.-b.: Donut Diagramm der Diversität (1+2; 3+) und Klonalität (Quantile Q1-5) des CD8+CCR7- TZR-β-Repertoires mit Auflistung der prozentualen Anteile der Singletons und Doubletons (1+2), der ≥ 3 mal auftretenden CDR3 Sequenzen (3+), der Quantile Q1-5 und der zehn häufigsten CDR3 Sequenzen von Patient C PC (a.) und Patient D PD (b.) im Verlauf von zwölf Monaten unter Therapie mit Fingolimod (Zeitpunkt m_0 und m_{12}).

Die Singletons (1) und Doubletons (2) sind ein Ausdruck für Diversität, da sie Sequenzen beinhalten, die im gesamten Repertoire nur einmal oder zweimal identifiziert werden können. Je höher dieser Anteil desto diverser ist das Repertoire. Die CDR3-Sequenzen (3+) und deren Aufspaltung in Quantile (Q1-5) sind Ausdruck der Klonalität, je mehr Klone eines Klonotypen vorliegen (idiotype Sequenz) desto monoklonaler ist das Repertoire. Die Donut Diagramme der Patientenproben zeigten beide eine Reduktion an Diversität bei stabiler Klonalität während der zwölf Monate der Therapie mit Fingolimod. * Je nach Anteilsgröße

sind visuell nicht alle zehn häufigsten 3+ Sequenzen dargestellt, da die Anteile teilweise zu klein sind und nicht adäquat in ihrer Klonsequenz lesbar sind. Ausführliche Analyse unter 3.5 Longitudinale Persistenz des CD8+ TZR- β -Repertoires.

Ähnlich wie bei beiden Patientenproben verhielt es sich in der Analyse der gesunden Kontrolle. Im Zwölfmonatsverlauf zeigte sich eine anteilige Reduktion der *Singletons* und *Doubletons* um 67,1 % (Abnahme der Diversität) bei gleichzeitiger geringfügiger Erhöhung der Klonalität durch Erhöhung der anteiligen 3+ Sequenzen um das 1,1-fache. Die Probe des untherapierten MS-Patienten zeigte im Vergleich zu allen anderen CD8+CCR7- Subpopulationen, wie auch schon bei den CD8+CCR7+ Subpopulationen, ein sehr stabiles Niveau der Klonalität und Diversität am gesamten TZR- β -Repertoire im Zwölfmonatsverlauf (*Tabelle 16, Abbildung 25a.-b.*).

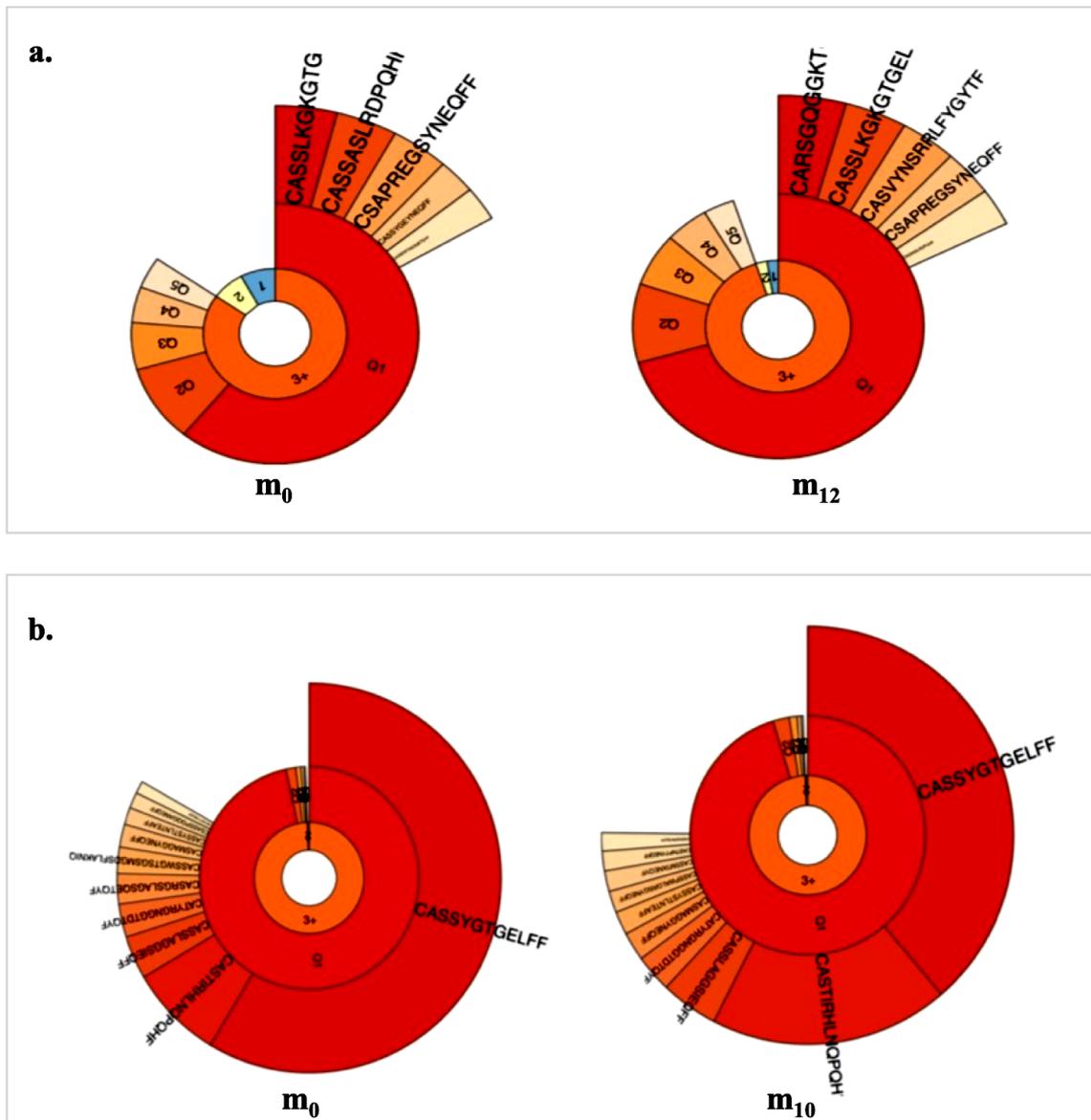


Abb. 25 a.-b.: Donut Diagramm der Diversität (1+2; 3+) und Klonalität (Quantile Q1-5) des CD8+CCR7- TZR- β -Repertoires mit Auflistung der prozentualen Anteile der Singletons und Doubletons (1+2), der ≥ 3 mal auftretenden CDR3 Sequenzen (3+), der Quantile Q1-5 und der zehn häufigsten CDR3 Sequenzen der gesunden Kontrolle Kg (a.) und des untherapierten MS-Patienten MS_u* (b.) im Zeitraum von zwölf/zehn Monaten (m₀ und m₁₂ und *m₁₀).

Die Singletons (1) und Doubletons (2) sind ein Ausdruck für Diversität, da sie Sequenzen beinhalten, die im gesamten Repertoire nur einmal oder zweimal identifiziert werden können. Je höher dieser Anteil desto diverser ist das Repertoire. Die CDR3-Sequenzen (3+) und deren Aufspaltung in Quantile (Q1-5) sind Ausdruck der Klonalität, je mehr Klone eines Klonotypen vorliegen (idiotype Sequenz) desto monoklonaler ist das Repertoire. Die Donut Diagramme der gesunden Kontrolle zeigten eine Abnahme der Diversität bei nur leichter Zunahme der Klonalität im Zwölfmonatsverlauf. Die Donut Diagramme des untherapierten

MS-Patienten zeigten eine auffällige Stabilität sowohl bzgl. der Diversität als auch der Klonalität.
* *Je nach Anteilsgröße sind visuell nicht alle zehn häufigsten 3+ Sequenzen dargestellt, da die Anteile teilweise zu klein sind und nicht adäquat in ihrer Klonsequenz lesbar sind. Ausführliche Analyse unter 3.5 Longitudinale Persistenz des CD8+ TZR- β -Repertoires.*

3.5 Longitudinale Persistenz des CD8+ TZR- β -Repertoires

3.5.1 Longitudinale Persistenz und Mono-/Oligoklonalitätsanalyse der zehn häufigsten CDR3-Sequenzen (Klone)

Im Folgenden soll auf die unter 3.4 vernachlässigte Analyse der 3+ Sequenzen und deren Persistenz eingegangen werden. Diese Sequenzen bildeten, genauso wie die *Singletons* und *Doubletons*, die Sequenz an Nukleinbasen ab, die für die CDR3 des TZR- β kodierten. Sie wurden allerdings als 3+ Sequenzen gelistet, da sie innerhalb des NGS multiple Male (Prämisse ≥ 3 mal) identifiziert werden konnten. Je häufiger diese Klone in ihrer Nukleinbasen-Sequenz identisch nachweisbar waren, desto höher war ihre monoklonale Klonalität. In den Donut Diagrammen unter 3.4 waren einige der zehn häufigsten CDR3-Sequenzen bereits anteilmäßig dargestellt, aufgrund ihrer teils sehr geringen Anteile jedoch visuell nicht klar differenzierbar, sodass eine ausführliche Datenanalyse folgt. Die Namen dieser Klone beruhen bereits auf den kodierten Aminosäuresequenzen, daher können im Folgenden gleiche Aminosäuresequenzen mehrfach Einzug in die Top zehn der häufigsten CDR3-Sequenzen finden, da sie auf unterschiedlichen Nukleinbasen-Sequenzen basieren.

3.5.1.1 CD8+CCR7+ Subpopulation

In der Probe von Patient C zeigte sich zu beiden Analyse-Zeitpunkten kein hohes Maß an monoklonaler Klonalität, da viele verschiedene Ausgangssequenzen mit jeweils nur geringen Anteilen am gesamten CD8+CCR7+ TZR- β -Repertoire nachweisbar waren. Nur ein einziger Klon *CASSLYGLAGDEQFF* konnte in den Listen der zehn häufigsten Sequenzen zu den Zeitpunkten vor und zwölf Monate nach Therapie mit Fingolimod identifiziert werden (*Tabelle 18*). In der Probe von Patient D konnte sogar kein einziger

Klon identifiziert werden, der sich unter den zehn häufigsten CDR3-Sequenzen zu beiden Untersuchungszeitpunkten befand. Grundsätzlich zeigte sich das CD8+CCR7+ TZR- β -Repertoire von Patient D zu beiden Zeitpunkten wenig monoklonal, allerdings ließ sich zum Zeitpunkt m_{12} eine leicht höhere monoklonale Expansion nachweisen (Tabelle 19.) Da in den Patientenproben nur ein bzw. kein Klonotyp nach zwölf Monaten unter den Top zehn der häufigsten CDR3-Sequenzen wiedergefunden werden konnte, zeigte sich in den Top zehn keine relevante klonale Persistenz.

Tabelle 18: Auflistung der zehn häufigsten Aminosäuresequenzen (Top 10) basierend auf den CDR3 Nukleinbasen-Sequenzen anteilig am gesamten CD8+CCR7+ TZR- β -Repertoire und ihre Frequenzen zum Zeitpunkt m_0 und m_{12} von Patient C (Pc).

Die rot markierte Aminosäuresequenz findet sich als einziger Klon in beiden Top 10 Listen der beiden Zeitpunkte m_0 und m_{12} mit einer Erhöhung der Frequenz um das 1,55-fache. Beide Aminosäuresequenzen basieren auf der gleichen Nukleinbasen Sequenz.

Pc	Top 10	CDR3-Sequenz (Aminosäure) m_0	Frequenz m_0	CDR3-Sequenz (Aminosäure) m_{12}	Frequenz m_{12}
	1	CASSPRGQGATNEKLFF	0,41 %	CASEGVGGYTFF	0,73 %
	2	CASSLYGLAGDEQFF	0,40 %	CASSLIIEINYGYTF	0,69 %
	3	CASSLERQPINEQFF	0,35 %	CSAKTRDAAEQYF	0,63 %
	4	CASSSSAGSLDEQFF	0,33 %	CASSLYGLAGDEQFF	0,62 %
	5	CASSPIGRGLTAEAFF	0,32 %	CASTRGRSTDTQYF	0,56 %
	6	CASSLYEELFF	0,31 %	CASQGNNGNTIYF	0,54 %
	7	CASSLGDRYNEQFF	0,30 %	CASSFLSGSETQYF	0,52 %
	8	CASSYVRRSTDTQYF	0,29 %	CSVNTGTAYEQYF	0,52 %

P _C	Top 10	CDR3-Sequenz (Aminosäure) m ₀	Frequenz m ₀	CDR3-Sequenz (Aminosäure) m ₁₂	Frequenz m ₁₂
	9	CASSLDASNTEAFF	0,29 %	CSATVGTTEAFF	0,52 %
	10	CASSQDVSGRMSGELFF	0,27 %	CASSYSGGASNEQFF	0,50 %

Tabelle 19: Auflistung der zehn häufigsten Aminosäuresequenzen (Top 10) basierend auf den CDR3 Nukleinbasen-Sequenzen anteilig am gesamten CD8+CCR7+ TZR-β-Repertoire und ihre Frequenzen zum Zeitpunkt m₀ und m₁₂ von Patient D (P_D).

Es findet sich kein einziger identischer Klon in beiden Top 10 Listen der beiden Zeitpunkte m₀ und m₁₂. Bei den blau markierten Aminosäuresequenzen handelt es sich zwar um identische Aminosäuresequenzen, allerdings werden die durch unterschiedliche Nukleinbasen-Sequenzen kodiert, sodass sie als eigenständige Klone gelistet sind.

P _D	TOP 10	CDR3-Sequenz m ₀	Frequenz m ₀	CDR3-Sequenz m ₁₂	Frequenz m ₁₂
	1	CASSYSTAGWETQYF	0,27 %	CASSLRGSGGHFQPQHF	2,55 %
	2	CASSFDRGYEQYF	0,11 %	CASSEYTGLGVYEQYF	1,95 %
	3	CASSSIQGAGELFF	0,11 %	CASSSTPGWTAGELFF	1,61 %
	4	CASSLAQGSYNEQFF	0,08 %	CASSFGANTEAFF	1,61 %
	5	CASSFDRGYEQYF	0,067 %	CASSLSPLERDTQYF	1,44 %
	6	CASSFDRGYEQYF	0,059 %	CASSTRSYATNEKLFF	1,27 %
	7	CASDPGTTGELFF	0,056 %	CASGGGYSNQPQHF	1,27 %

P_D	TOP 10	CDR3-Sequenz m_0	Frequenz m_0	CDR3-Sequenz m_{12}	Frequenz m_{12}
	8	CASSFDRGYEQYF	0,056 %	CASSSLFSGGHGNEQFF	1,10 %
	9	CATSDVFQSGDLTDTQYF	0,052 %	CASSLPGTSDTDTQYF	1,10 %
	10	CASSPDRGYEQYF	0,052 %	CASSAGQHGYTF	1,10 %

In den Proben der Kontrollen zeichnete sich bezüglich der monoklonalen Expansion und der Persistenz ein ähnliches Bild wie bei den Patientenproben ab. Auch hier waren viele unterschiedliche Klone mit jeweiligen niedrigfrequenten Anteilen am gesamten CD8+CCR7+ TZR- β -Repertoire zu identifizieren. Zudem gelang nur in der gesunden Kontrolle der Nachweis eines Klons *CASSLKGGKTGELFF*, der sich sowohl zum Zeitpunkt m_0 als auch zum Zeitpunkt m_{12} in der Liste der zehn häufigsten CDR3-Sequenzen wiederfand. (Tabelle 20-21).

Tabelle 20: Auflistung der zehn häufigsten Aminosäuresequenzen (Top 10) basierend auf den CDR3 Nukleinbasen-Sequenzen anteilig am gesamten CD8+CCR7+ TZR- β -Repertoire und ihre Frequenzen zum Zeitpunkt m_0 und m_{12} von der gesunden Kontrolle (K_g).

Die rot markierte Aminosäuresequenz findet sich als einziger Klon in beiden Top 10 Listen der beiden Zeitpunkte m_0 und m_{12} mit einer Reduktion der Frequenz um die Hälfte (-50%). Beide Aminosäuresequenzen basieren auf der gleichen Nukleinbasen-Sequenz.

K_g	TOP 10	CDR3-Sequenz m_0	Frequenz m_0	CDR3-Sequenz m_{12}	Frequenz m_{12}
	1	CASSLKGGKTGELFF	0,16 %	CASSLGSSSSYNEQFF	0,09 %
	2	CASTWGDNTTEAFF	0,16 %	CASSLAGQAEKLFF	0,09 %

K_g	TOP 10	CDR3-Sequenz m₀	Frequenz m₀	CDR3-Sequenz m₁₂	Frequenz m₁₂
	3	CASSLSYEQYF	0,14 %	CASSLKKGKGTGELFF	0,08 %
	4	CASSQTSGPSYNEQFF	0,13 %	CASSNGADDSSYNEQFF	0,079 %
	5	CSVEGGQGNNYGYTF	0,13 %	CASNLRSGRGNEQFF	0,076 %
	6	CASSPILAGGYNEQFF	0,12%	CATKGKANTEAFF	0,076 %
	7	CASSISDRAANEKLFF	0,12 %	CASRESGNEQFF	0,073 %
	8	CASSPTGGSYNEQFF	0,12 %	CASSRLSGANTEAFF	0,073%
	9	CASRSASGLENIQYF	0, 12 %	CASSLAGLNTEAFF	0,070 %
	10	CASSILGVNTEAFF	0, 12%	CASSVVGTTGGTGELFF	0,070 %

Tabelle 21: Auflistung der zehn häufigsten Aminosäuresequenzen (Top 10) basierend auf den CDR3 Nukleinbasen-Sequenzen anteilig am gesamten CD8+CCR7+ TZR-β-Repertoire und ihre Frequenzen zum Zeitpunkt m₀ und m₁₀ des MS-Patienten ohne Therapie (MS_u).

Es konnte kein einziger identischer Klon im Verlauf von zehn Monaten in den Top 10 identifiziert werden.

MS_u	TOP 10	CDR3-Sequenz m₀	Frequenz m₀	CDR3-Sequenz m₁₀	Frequenz m₁₀
	1	CASSFPGELFF	0,22 %	CASSFLGTHNQPHF	0,17 %
	2	CASSLPWSPQETQYF	0,19 %	CSVGLADQSFYNEQFF	0,15%
	3	CASSYGTGELFF	0,19 %	CASRDRGANTEAFF	0,14 %

MS _u	TOP 10	CDR3-Sequenz m ₀	Frequenz m ₀	CDR3-Sequenz m ₁₀	Frequenz m ₁₀
	4	CASSLEIREAFF	0, 19%	CASSLENYGYTF	0,14 %
	5	CASSSTGTSGTIEQYF	0,17 %	CASSLDWREQDTQYF	0,13 %
	6	CASSLTSYNEQFF	0,17 %	CASSLVGGGRGNEQFF	0,13 %
	7	CASSLGPTYEQYF	0,17 %	CASSVTAPFYEQYF	0,12 %
	8	CASSQVDRLYEYF	0,17 %	CASSLERYNEQFF	0, 12 %
	9	CASSSDSSGEQYF	0,17 %	CASSQEGQSFSNQPQHF	0,12 %
	10	CASSLKGDEQFF	0, 16 %	CASSSVGQQNYGYTF	0,12 %

Zumindest unter den zehn häufigsten gelisteten CDR3-Sequenzen konnte bei nur jeweils einem persistenten Klonotypen in der Probe von Patient C und der gesunden Kontrolle eine relevante longitudinale Persistenz der Klonotypen in der CD8+CCR7+ Subpopulation ausgeschlossen werden. Allerdings beruht diese Analyse nur auf den zehn häufigsten CDR3-Sequenzen und gibt noch keinen allgemeinen Aufschluss über die generelle Stabilität des CD8+CCR7+ TZR- β -Repertoires im Verlauf eines Jahres unter Therapie mit Fingolimod. Eine diesbezügliche weiterführende Analyse folgt im Kapitel 3.5.2. *Allgemeine Longitudinale Persistenz im Zwölfmonatsverlauf unter Therapie mit Fingolimod.*

Die Klonalitätsanalyse der CD8+CCR7+ T-Zellen ohne Nachweis relevanter monoklonaler Expansion entsprach den Ergebnissen der unter 3.3 *TZR- β -Rekombination der V- und J-Segmente der CD8+ T-Zellen* gelisteten TZR- β -Rekombinationen der V-

und J-Segmente der CD8+CCR7+ T-Zellen. Da sich allerdings in Rekombinationsrastern eine frequente TZR- β - Rekombination der V- und J-Segmente der CD8+CCR7- T-Zellen sowohl bei Patient D (*TRBV6-5/ TRBJ2-5*) als auch dem untherapierten MS-Patienten (*TRBV6-3/ TRBJ2-2*) zum Zeitpunkt m_0 zeigte, versprach die Klonalitätsanalyse der CD8+CCR7- T-Zellen andere Ergebnisse.

3.5.1.2 CD8+CCR7- Subpopulation

In der Analyse aller CD8+CCR7- Subpopulationen zeigte sich, wenn auch meist weiterhin im niedrigfrequenten Bereich, als mögliche Beobachtung einer erhöhten Neigung zur monoklonalen Expansion, in CD8+CCR7- T-Zellen grundsätzlich höhere Frequenzen als in den CD8+CCR7+ Subpopulationen.

In der Probe von Patient C wurden im Zwölfmonatsverlauf drei überlappende Klone identifiziert. *CASSLTGQGTEAFF*, *CSVTGSGGSSYNEQFF* und *CASSPGQGAYEQYF* konnten sowohl vor Fingolimodtherapie als auch zwölf Monate nach Therapie unter den zehn häufigsten CDR3-Sequenzen nachgewiesen werden (Persistenz in den Top zehn Listen höher als in der CD8+CCR7+ Subpopulation). Allerdings zeigte sich eine inhomogene Frequenzsteigerung oder -reduktion. *CASSLTGQGTEAFF* konnte nach zwölf Monaten Therapie mit Fingolimod etwa 2,9-mal so häufig wie vor der Therapie nachgewiesen werden, *CSVTGSGGSSYNEQFF* war nach Therapie um 15,4 % weniger zu identifizieren (Tabelle 22). In der Probe von Patient D konnten mit *CASSLIAGGTETQYF* und *CASSPGQELGGYEQYF* zwei Klone identifiziert werden, die nach zwölf Monaten Behandlung mit Fingolimod unter den zehn häufigsten CDR3 Sequenzen noch persistierten. Das jedoch auffälligste Ergebnis war die Klonalitätsanalyse. Vor Therapie mit Fingolimod machte der Klon *CASSYSTAGWETQYF* mit seiner monoklonalen Expansion 40,6 % des gesamten CD8+CCR7- TZR- β -Repertoires aus (Tabelle 23). Dieser Klonotyp rekombinierte sich aus den Segmenten *TRBV6-5*, *TRBD1* und *TRBJ2-5* und entsprach damit dem auffälligen Rekombinationsraster an V- und J-Segmenten unter 3.3.2 (Vgl. siehe Tabelle 15 und Abbildung 19). Nach zwölf Monaten Behandlung mit Fingolimod war weder das V-J-Rekombinationsraster noch der Klon *CASSYSTAGWETQYF* mehr in den Top fünf/zehn

Listen zu finden. *CASSYSTAGWETQYF* machte anteilig nur noch 0,14 % des gesamten CD8+CCR7+ TZR- β -Repertoires aus. Das entsprach unter Therapie einer Reduktion um 96,6 %.

Tabelle 22: Auflistung der zehn häufigsten Aminosäuresequenzen (Top 10) basierend auf den CDR3 Nukleinbasen-Sequenzen anteilig am gesamten CD8+CCR7- TZR- β -Repertoire und ihre Frequenzen zum Zeitpunkt m_0 und m_{12} von Patient C (Pc).

Die rot, blau und grün markierten Aminosäuresequenzen finden sich in beiden Top 10 Listen der beiden Zeitpunkte m_0 und m_{12} wieder. *CASSLTGQGTEAFF* bildet in beiden Listen den Top 1 Klon ab, sein Anteil am gesamten CD8+CCR7- TZR- β -Repertoire steigt innerhalb eines Jahres unter Therapie mit Fingolimod um das 2,9-fache.

Pc	Top 10	CDR3-Sequenz (Aminosäure) m_0	Frequenz m_0	CDR3-Sequenz (Aminosäure) m_{12}	Frequenz m_{12}
		1	<i>CASSLTGQGTEAFF</i>	1,8 %	<i>CASSLTGQGTEAFF</i>
2	<i>CSVTGSGGSSYNEQFF</i>	1,3 %	CSASGPDGWYEQYF	2,8 %	
3	CASSEPLGSLHF	1,2 %	CSARGQGLAGDWSYNEQFF	2,4 %	
4	CASSFWGGRDEQYF	1,1 %	CASSAPLAGPDTQYF	1,5 %	
5	CASSLYGLAGDEQFF	0,9 %	<i>CASSPGQGAYEQYF</i>	1,4 %	
6	CSARDRDTEAFF	0,9 %	CASTMTYTGVDTTEAFF	1,3 %	
7	<i>CASSPGQGAYEQYF</i>	0,9 %	CAITSWREIIEQYF	1,2 %	
8	CASRVSGRAGELFF	0,9 %	<i>CSVTGSGGSSYNEQFF</i>	1,1 %	
9	CASSFIPGQETQYF	0,7 %	CASSLTGVDGYTF	0,9 %	
10	CASSLQGGNYGYTF	0,7 %	CASSKEGRTMYSNQPQHF	0,9 %	

Tabelle 23: Auflistung der zehn häufigsten Aminosäuresequenzen (Top 10) basierend auf den CDR3 Nuklein-Sequenzen anteilig am gesamten CD8+CCR7- TZR- β -Repertoire und ihre Frequenzen zum Zeitpunkt m_0 und m_{12} von Patient D (P_D).

Die rot und blau markierten Aminosäuresequenzen finden sich in beiden Top 10 Listen der beiden Zeitpunkte m_0 und m_{12} wieder. *CASSYSTAGWETQYF* ist zum Zeitpunkt m_0 mit 40,5 % ein stark präsender monoklonal expandierter Klon im CD8+CCR7- TZR- β -Repertoire, jedoch nach zwölf Monaten Therapie mit Fingolimod in seiner Anteilsfrequenz noch nicht einmal mehr unter den Top zehn Sequenzen zu finden.

P_D	Top 10	CDR3-Sequenz (Aminosäure) m_0	Frequenz m_0	CDR3-Sequenz (Aminosäure) m_{12}	Frequenz m_{12}
	1	CASSYSTAGWETQYF	40,6 %	CASSPGQELGGYEYF	4,9 %
	2	CASSEFATNEKLFF	2,0 %	CAVGGNIQYF	2,6 %
	3	CASSLIAGGTETQYF	1,6 %	CASSQSGEPYEYF	2,5 %
	4	CASSYTLNTEAFF	1,4 %	CASSLIAGGTETQYF	1,9 %
	5	CASSTLLTDTQYF	1,4 %	CASSLGENQPQHF	1,8 %
	6	CASSVFLADEQYF	1,2 %	CSALTTLQGTEAFF	1,8 %
	7	CASSPGQELGGYEYF	1,2 %	CASSLGLSYEYF	1,7 %
	8	CASSLGAGAYGYTF	1,2 %	CASSLRGSGGHFQPQHF	1,6 %
	9	CASSPLYPWDEQFF	1,2 %	CASSWVGRSNTGELFF	1,5 %
	10	CASSVFSVPTGELFF	1,1 %	CASSQEVGGGADTQYF	1,3 %

In beiden Kontrollen ließen sich grundsätzlich deutlich mehr identische CDR3-Sequenzen zu den unterschiedlichen Zeitpunkten m_0 und m_{12} nachweisen als bei den Kontrollproben der CD8+CCR7+ Subpopulationen. In der Probe der gesunden Kontrolle waren es mit *CASSLKGKGTGELFF*, *CASSASLRDPQHF*, *CSAPREGSYNEQFF*, *CASSYGEYNEQFF*, *CARSGQGGKTGELFF* und *CASVYNSRRLFYGYTF* gleich sechs Klonotypen, die sich zu beiden Zeitpunkten unter den Top zehn als möglicher Hinweis auf ein stabileres (persistenteres) CD8+CCR7- TZR- β -Repertoire zeigten. Ähnliches zeigte sich auch in den Proben des untherapierten MS-Patienten. Mit *CASSYGTGELFF*, *CASTIRHLNQPQHF*, *CASSLAGGSIEQFF*, *CATYRGNGGTDQYF*, *CASMAGGYNEQFF* und *CASSYSTLNTEAFF* konnten auch in dieser Kontrollprobe sechs Klonotypen in den Listen der zehn häufigsten CDR3-Sequenzen zum Zeitpunkt m_0 und m_{10} wiedergefunden werden (Tabelle 25). Allerdings zeigte sich auch hier, wie auch schon beim Patienten D, die Klonalitätsanalyse das interessanteste Ergebnis. *CASSYGTGELFF* machte zu Beginn des Beobachtungszeitraums 58,9 % des gesamten CD8+CCR7- TZR- β -Repertoire als Ausdruck einer ausgeprägten monoklonalen Expansion aus. Somit ging beinahe 2/3 des CD8+CCR7- TZR- β -Repertoire auf einen T-Zell-Klon zurück. *CASSYGTGELFF* rekombinierte sich aus den Segmenten *TRBV6-3* und *TRBJ2-2* und spiegelte somit die frequenteste Rekombination aus dem Rekombinationsraster unter 3.3.2 wider (siehe Vgl. Tabelle 15 und Abbildung 21). Nach einem Beobachtungszeitraum von zehn Monaten war der Klon *CASSYGTGELFF*, anders als bei dem Patienten D, der eine Therapie mit Fingolimod erhalten hatte, weiterhin mit 38,8 % der meist frequenteste Klon des CD8+CCR7- TZR- β -Repertoires. Das entsprach einer Reduktion um 34,2 % und somit nahezu nur einem Drittel der Reduktion, die Patient D unter Fingolimodtherapie erfuhr.

Tabelle 24: Auflistung der zehn häufigsten Aminosäuresequenzen (Top 10) basierend auf den CDR3 Nukleinbasen-Sequenzen anteilig am gesamten CD8+CCR7- TZR- β -Repertoire und ihre Frequenzen zum Zeitpunkt m_0 und m_{12} von der gesunden Kontrolle (K_g).

Die rot, blau, grün, lila, orange und rosa markierten Aminosäuresequenzen finden sich in beiden Top 10 Listen der beiden Zeitpunkte m_0 und m_{12} wieder. Somit sind mehr als die Hälfte der Top 10 Klone nach einem Jahr weiterhin in den Top 10 zu identifizieren.

K_g	TOP 10	CDR3-Sequenz m_0	Frequenz m_0	CDR3-Sequenz m_{12}	Frequenz m_{12}
	1	CASSLKGGKTGELFF	4,0 %	CARSGQGGKTGELFF	4,3 %
	2	CASSASLRDPQHF	3,9 %	CASSLKGGKTGELFF	4,0 %
	3	CSAPREGSYNEQFF	3,7 %	CASVYNSRRLFYGYTF	3,6 %
	4	CASSYGEYNEQFF	2,5 %	CSAPREGSYNEQFF	3,2 %
	5	CASSFRTSGGQETQYF	2,4 %	CASSASLRDPQHF	2,6 %
	6	CARSGQGGKTGELFF	2,1 %	CAISDIATRGS DGYTF	2,4 %
	7	CASTPKRTGELFF	2,1 %	CATSDLSINQPQHF	2,4 %
	8	CASVYNSRRLFYGYTF	2,0 %	CASSLLLTGEDSPLHF	2,3 %
	9	CASTGTEVSYEQYF	1,8 %	CASSLGSSSSYNEQFF	2,0 %
	10	CAWSVRGLDTGELFF	1,8 %	CASSYGEYNEQFF	2,0 %

Tabelle 25: Auflistung der zehn häufigsten Aminosäuresequenzen (Top 10) basierend auf den CDR3 Nukleinbasen-Sequenzen anteilig am gesamten CD8+CCR7- TZR- β -Repertoire und ihre Frequenzen zum Zeitpunkt m_0 und m_{10} des untherapierten MS-Patienten (MS_u).

Die rot, blau, grün, lila, orange und rosa markierten Aminosäuresequenzen finden sich in beiden Top 10 Listen der beiden Zeitpunkte m_0 und m_{12} wieder. Somit sind mehr als die Hälfte der Top 10 Klone nach zehn Monaten weiterhin in den Top 10 zu identifizieren. Die vier häufigsten Klone persistieren weiterhin nach einem Jahr als die vier häufigsten Klone. Zudem zeigt sich eine starke monoklonale Expansion, die auf *CASSYGTGELFF* zurückgeht und zum Beobachtungszeitpunkt m_0 58,9 % des gesamten CD8+CCR7-TZR- β -Repertoire ausmacht.

MS_u	TOP 10	CD3 Sequenz m_0	Frequenz m_0	CD3 Sequenz m_{12}	Frequenz m_{12}
	1	<i>CASSYGTGELFF</i>	58,6 %	<i>CASSYGTGELFF</i>	38,8 %
	2	<i>CASTIRHLNQPQHF</i>	7,9 %	<i>CASTIRHLNQPQHF</i>	18,8 %
	3	<i>CASSLAGGSIEQFF</i>	3,6 %	<i>CASSLAGGSIEQFF</i>	4,5 %
	4	<i>CATYRGNGGTDQYF</i>	2,7 %	<i>CATYRGNGGTDQYF</i>	2,9 %
	5	CASRGLAGSQETQYF	2,5 %	<i>CASMAGGYNEQFF</i>	2,2 %
	6	CASSWGTS _F GSMGDSFLAKNIQY	2,2 %	<i>CASSYSTLNTEAFF</i>	1,8 %
	7	<i>CASMAGGYNEQFF</i>	1,9 %	CASSPWALGRSGYNEQF _F	1,7 %
	8	<i>CASSYSTLNTEAFF</i>	1,4 %	CASSMTANEQYF	1,7 %
	9	CSASSPGQGANEQFF	1,3 %	CASTNPTYNEQFF	1,5 %
	10	CASTNPTYNEQFF	1,0 %	CASSAGPNYEQYF	1,4 %

3.5.2 Allgemeine longitudinale Persistenz im Zwölfmonatsverlauf unter Therapie mit Fingolimod

3.5.2.1 *CD8+CCR7+ Subpopulation*

Um eine Aussage bezüglich der *allgemeinen* Stabilität (Persistenz) des CD8+CCR7+ TZR- β -Repertoire im Verlauf von zwölf Monaten unter Fingolimodtherapie ableiten zu können, erfolgte eine *Overlap*-Analyse der jeweiligen Populationen mittels des Programmes *VDJtools* auf Basis der durch *MiXCR* analysierten NGS-Rohdaten.

In der CD8+CCR7+ Subpopulation des Patienten C bestätigte sich die bereits in der Analyse der Top zehn CDR3-Sequenzen vorab vermutete Beobachtung eines instabilen fluiden CD8+CCR7+ TZR- β -Repertoires im Verlauf von zwölf Monaten unter Fingolimodtherapie. Lediglich zwei Klone, *CASSLYGLAGDEQFF* und *CASMSETQYF*, waren zu beiden Analysezeitpunkten in den Proben nachweisbar. Das entsprach einem Repertoireaustausch von 99,3 % nach zwölf Monaten Therapie (*Abbildung 26*). Ähnlich verhielt es sich in der CD8+CCR7+ Subpopulation des Patienten D. Hier konnten zwar mehr persistente Klonotypen identifiziert werden (16 *Overlap*-CDR3-Sequenzen), die sich im Verlauf auch monoklonal expandierten, allerdings waren 91,2 % aller Klonotypen nach zwölf Monaten Therapie mit Fingolimod nicht mehr nachweisbar und ausgetauscht. Demnach zeigte sich auch das CD8+CCR7+ TZR- β -Repertoires im Verlauf instabil fluide und somit wenig persistent (*Abbildung 27*).

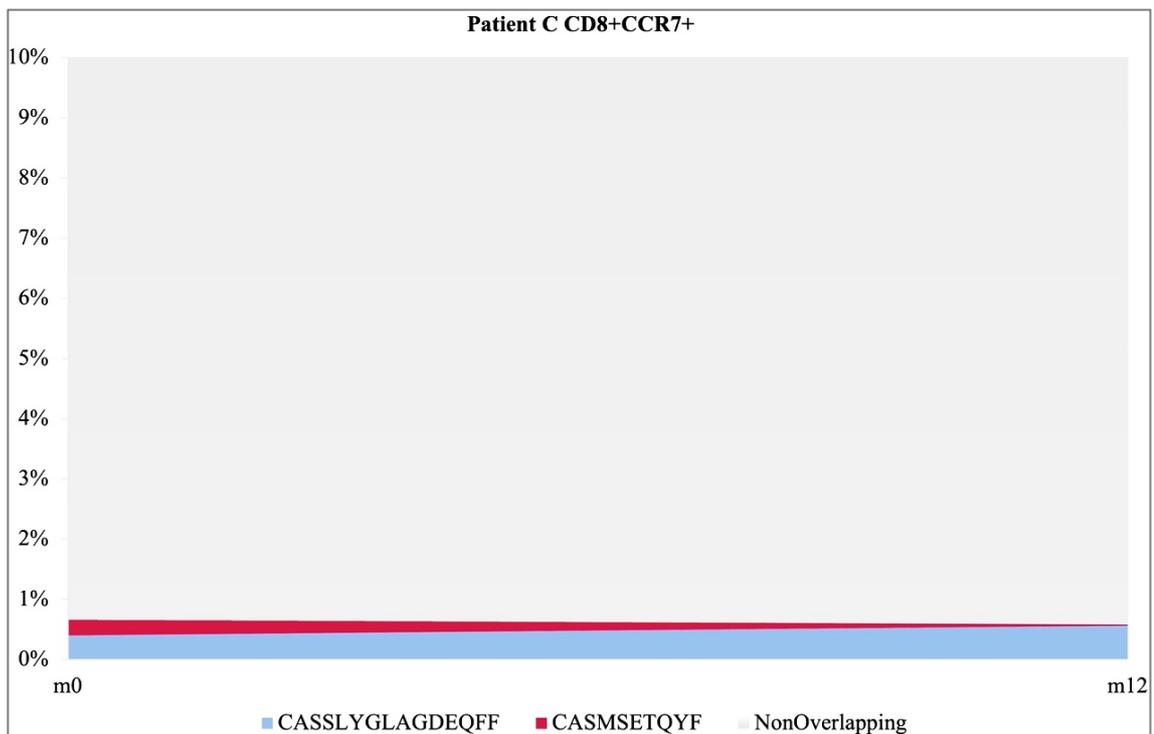


Abb. 26: Overlap Analyse der CD8+CCR7+ T-Zellen von Patient C mit nahezu keiner Persistenz (<1 %) des CD8+CCR7+ TZR- β -Repertoires unter Fingolimodtherapie.

In den Farben dargestellt sind die Klone, die vor Therapie mit Fingolimod (m_0) und zwölf Monate nach Therapie mit Fingolimod (m_{12}) anteilig im CD8+CCR7+ TZR- β -Repertoires nachweisbar waren und somit persistierten. In grau markiert sich der Bereich der „nicht-überlappenden“ Sequenzen (*NonOverlapping*), der mit 99,3 % des CD8+CCR7+ TZR- β -Repertoires deutlich überwog. Aus Darstellungsgründen, um die niedrigfrequenten Persistenzen sichtbar zu machen, kommen auf der Ordinate (y-Achse) nur 10 % des CD8+CCR7+ TZR- β -Repertoires zur Darstellung. Die restlichen nicht dargestellten 90 % bestanden auch aus *NonOverlapping* Sequenzen. Auf der Abszisse (x-Achse) wird der gesamte longitudinale Verlauf der Analyse zu den Zeitpunkten m_0 und m_{12} dargestellt.

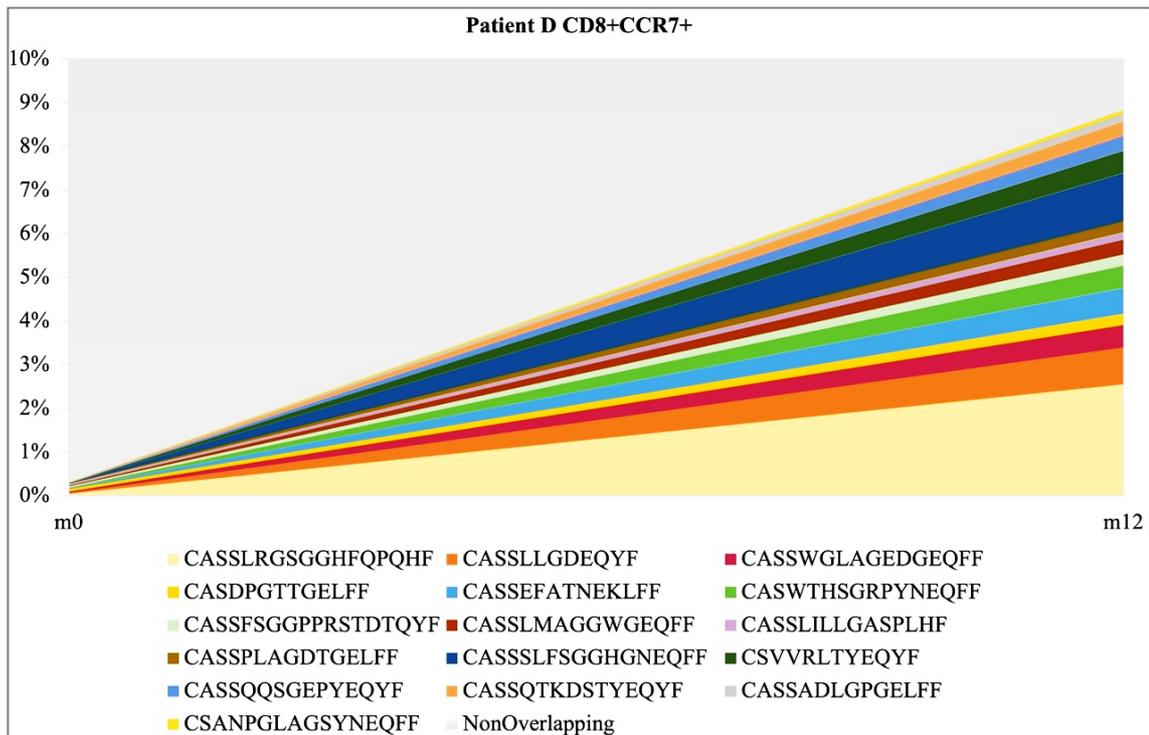


Abb. 27: Overlap Analyse der CD8+CCR7+ T-Zellen von Patient D mit einer Persistenz des CD8+CCR7+ TZR- β -Repertoires von <10 % unter Fingolimodtherapie.

In den Farben dargestellt sind die Klone, die vor Therapie mit Fingolimod (m_0) und zwölf Monate nach Therapie mit Fingolimod (m_{12}) im CD8+CCR7+ TZR- β -Repertoires nachweisbar waren und somit persistierten. Anhand der Frequenzentwicklung zeigt sich eine monoklonale Expansion der meisten dieser Klone im longitudinalen Verlauf. In grau markiert sich der Bereich der „nicht-überlappenden“ Sequenzen (NonOverlapping), der deutlich mit 91,2 % des CD8+CCR7+ TZR- β -Repertoires überwiegt. Aus Darstellungsgründen, um die niedrigfrequenten Persistenzen sichtbar zu machen, werden auf der Ordinate (y-Achse) nur 10 % des CD8+CCR7+ TZR- β -Repertoires dargestellt. Die restlichen nicht dargestellten 90 % bestanden auch aus NonOverlapping Sequenzen. Auf der Abszisse (x-Achse) wird der gesamte longitudinale Verlauf der Analyse zu den Zeitpunkten m_0 und m_{12} dargestellt.

In den CD8+CCR7+ Subpopulationen beider Kontrollen (gesunde Kontrolle und MS-Patient ohne Therapie) ließen sich mehr persistierende Klonotypen im Zehn-/Zwölfmonatsverlauf identifizieren als bei Patient C. Allerdings bildeten auch diese nur <1 % des gesamten CD8+CCR7+ TZR- β -Repertoires ab, da sich 99 % neue Klonotypen zum Zeitpunkt m_{10}/m_{12} identifizieren ließen und sich das CD8+CCR7+ TZR- β -

Repertoires somit wenig persistent zeigte. Anders als jedoch in den Ergebnissen von Patient D ersichtlich und analog zu den Auswertungen der Klonalität der CD8+CCR7+ Subpopulationen beider Kontrollen aus den Top zehn Sequenzen nahm das Ausmaß an klonaler Expansion in den persistenten Klonotypen in beiden Kontrollproben im Beobachtungszeitraum ab (*Abbildung 28-29*).

Somit zeigten sich in allen CD8+CCR7+ Subpopulationen, unabhängig von einer Therapie mit Fingolimod, sehr niedrige Persistenzen im (Zehn-) Zwölfmonatsverlauf von <10 %. Dies ist als Ausdruck eines instabilen, fluiden, sich erneuernden CD8+CCR7+ TZR- β -Repertoire zu werten.

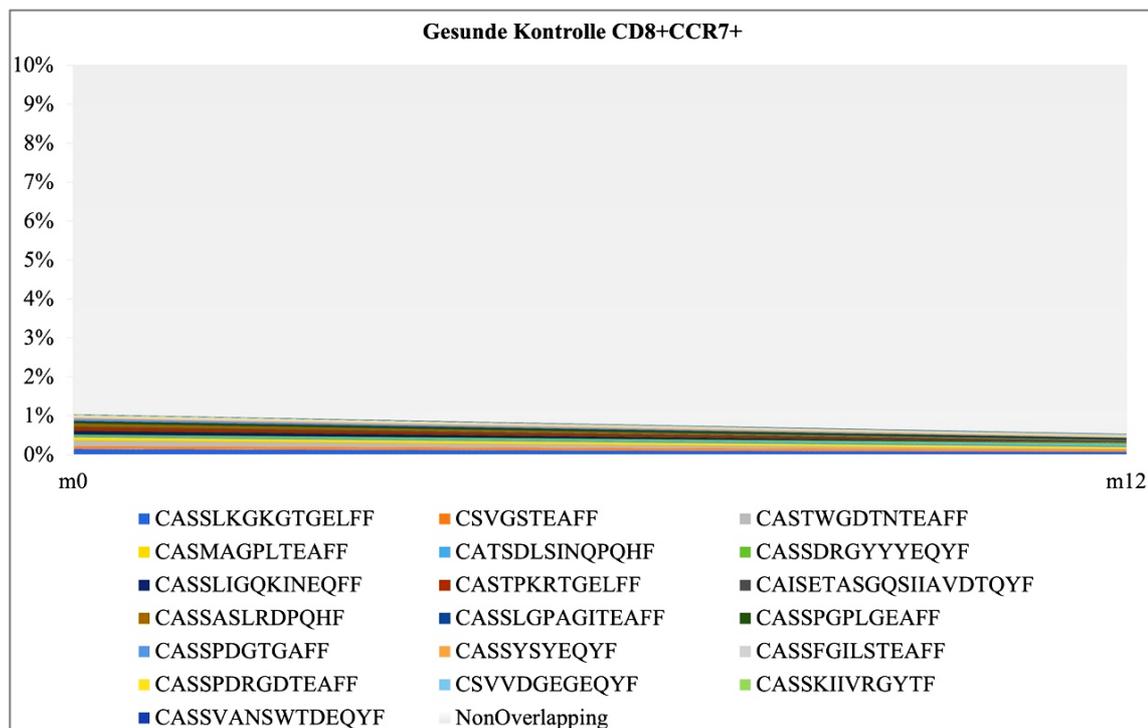


Abb. 28: Overlap Analyse der CD8+CCR7+ T-Zellen der gesunden Kontrolle mit einer Persistenz des CD8+CCR7+ TZR- β -Repertoires von <1% im Zwölfmonatsverlauf.

In den Farben dargestellt sind die Klone, die zur Baseline (m₀) und zwölf Monate später (m₁₂) im CD8+CCR7+ TZR- β -Repertoires nachweisbar waren und somit persistierten. In grau markiert sich der Bereich der „nicht-überlappenden“ Sequenzen (NonOverlapping), der deutlich mit 99 % des CD8+CCR7+ TZR- β -Repertoires überwiegt. Aus Darstellungsgründen, um die niedrigfrequenten Persistenzen sichtbar zu machen, werden auf der Ordinate (y-Achse) nur 10 % des CD8+CCR7+ TZR- β -Repertoires dargestellt.

Die restlichen nicht dargestellten 90 % bestanden auch aus NonOverlapping Sequenzen. Auf der Abszisse (x-Achse) wird der gesamte longitudinale Verlauf der Analyse zu den Zeitpunkten m_0 und m_{12} dargestellt.

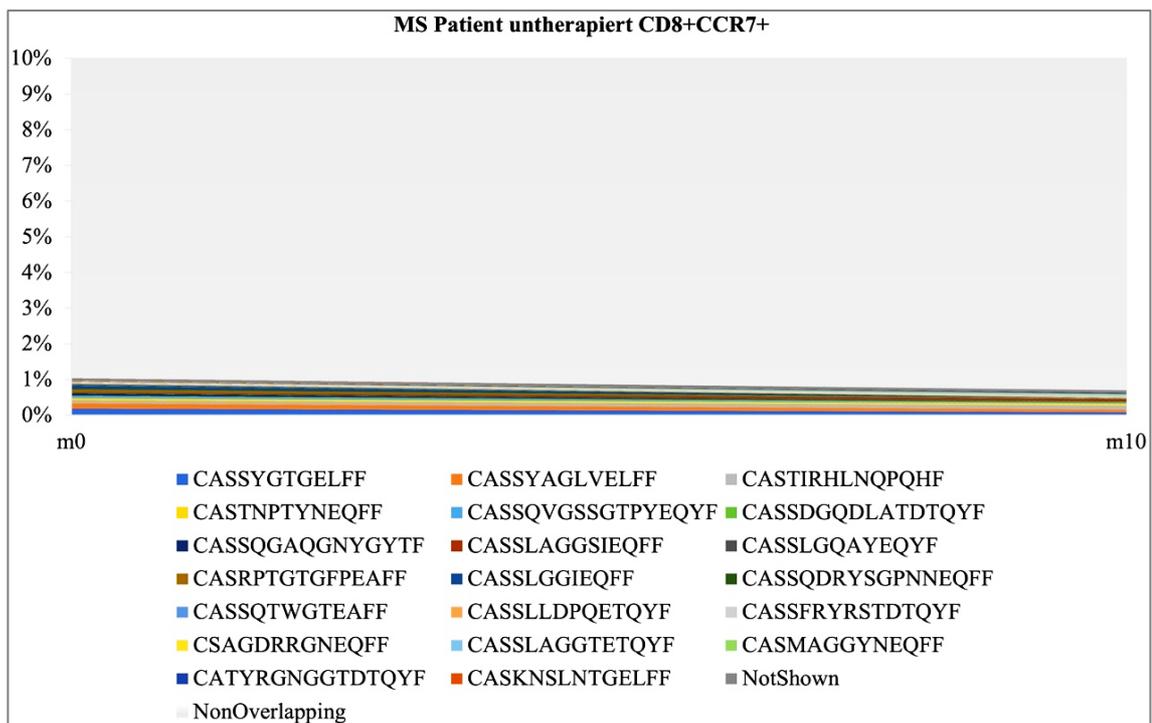


Abb. 29: Overlap Analyse der CD8+CCR7+ T-Zellen des MS-Patienten ohne Therapie mit einer Persistenz des CD8+CCR7+ TZR- β -Repertoires von <1 % im Zehnmonatsverlauf.

In den Farben dargestellt sind die Klone, die zur Baseline (m_0) und zehn Monate später (m_{10}) im CD8+CCR7+ TZR- β -Repertoires nachweisbar waren und somit persistierten. In grau markiert sich der Bereich der „nicht-überlappenden“ Sequenzen (NonOverlapping), der deutlich mit 99 % des CD8+CCR7+ TZR- β -Repertoires überwiegt. Aus Darstellungsgründen, um die niedrigfrequenten Persistenzen sichtbar zu machen, werden auf der Ordinate (y-Achse) nur 10 % des CD8+CCR7+ TZR- β -Repertoires dargestellt. Die restlichen nicht dargestellten 90 % bestanden auch aus NonOverlapping Sequenzen. Auf der Abszisse (x-Achse) wird der gesamte longitudinale Verlauf der Analyse zu den Zeitpunkten m_0 und m_{10} dargestellt. NotShown-Klonotypen sind Klonotypen, die in ihrer monoklonalen Expansion zu wenig prozentualen Anteil am Gesamtrepertoire zeigen, dass sie grafisch nicht erfasst werden können und daher in ihrer Gesamtheit zusammengefasst werden.

3.5.2.2 CD8+CCR7- Subpopulation

Im Allgemeinen konnte in den CD8+CCR7- Subpopulationen aller Proben eine deutlich höhere Persistenz als in den CD8+CCR7+ Subpopulationen nachgewiesen werden. Das CD8+CCR7- TZR- β -Repertoire zeigte sich demnach im Zwölfmonatsverlauf deutlich stabiler.

In der Analyse der CD8+CCR7- Subpopulation von Patient C konnten nach zwölf Monaten unter Therapie mit Fingolimod 39,4 % aller Klonotypen vom Zeitpunkt m_0 im CD8+CCR7- TZR- β -Repertoire wieder gefunden werden. Zudem zeigten diese Klonotypen eine höhere klonale Expansion als zu Beginn der Beobachtung (*Abbildung 30*). Die Auswertung der Daten der CD8+CCR7- Subpopulation von Patient D zeigte eine noch größere Persistenz als bei Patient C. Es waren 70,6 % des Ausgangs CD8+CCR7- TZR- β -Repertoires nach zwölf Monaten stabil nachweisbar. Anders als bei Patient C jedoch zeigte sich eine geringe Abnahme der klonalen Expansion (*Abbildung 31*).

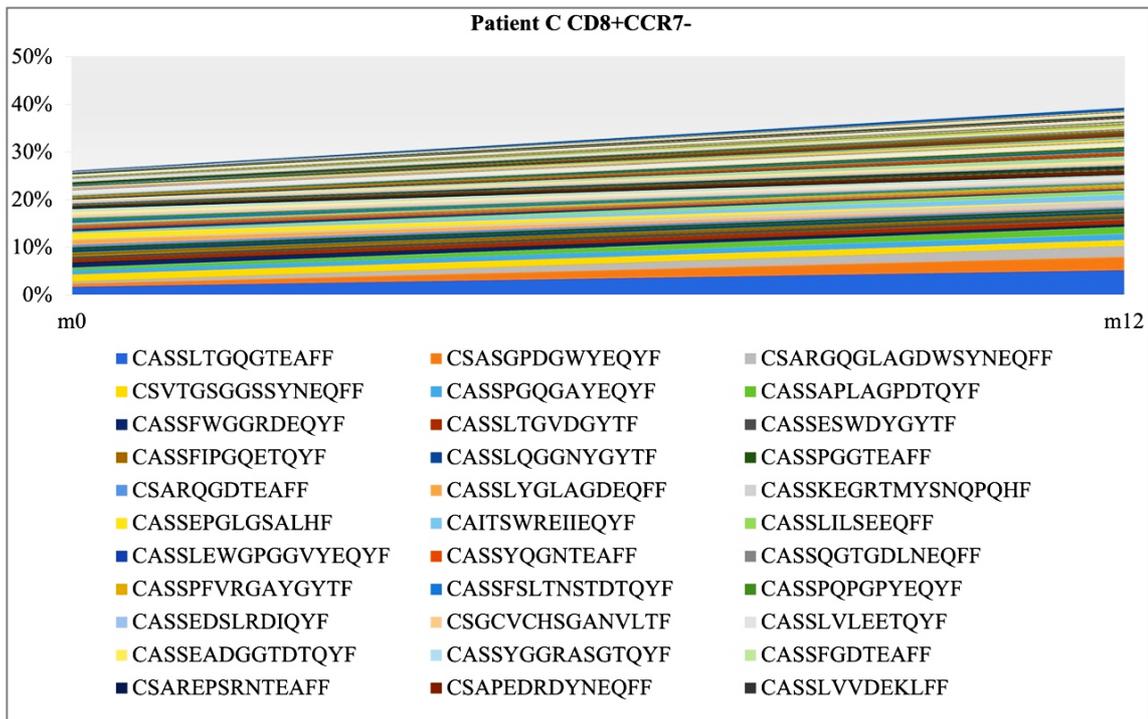


Abb. 30: Overlap Analyse der CD8+CCR7- T-Zellen von Patient C mit einer Persistenz des CD8+CCR7- TZR- β -Repertoires von $\pm 40\%$ unter Fingolimodtherapie.

In den Farben dargestellt sind die Klone, die vor Therapie mit Fingolimod (m_0) und zwölf Monate nach Therapie mit Fingolimod (m_{12}) im CD8+CCR7- TZR- β -Repertoire nachweisbar waren und somit persistierten. In grau markiert sich der Bereich der „nicht-überlappenden“ Sequenzen (NonOverlapping), der mit 60,4 % des CD8+CCR7+ TZR- β -Repertoires überwog. Aus Darstellungsgründen, um die niedrigfrequenten Persistenzen sichtbar zu machen, werden auf der Ordinate (y -Achse) nur 50 % des CD8+CCR7+ TZR- β -Repertoires dargestellt. Die restlichen nicht dargestellten 50 % bestanden auch aus NonOverlapping Sequenzen. Zudem sind in der Legende aufgrund eines vielfältigen CD8+CCR7+ TZR- β -Repertoires mit >100 Klonotypen nur die anteilig frequentesten Klonotypen gelistet. Auf der Abszisse (x -Achse) wird der gesamte longitudinale Verlauf der Analyse zu den Zeitpunkten m_0 und m_{12} dargestellt.

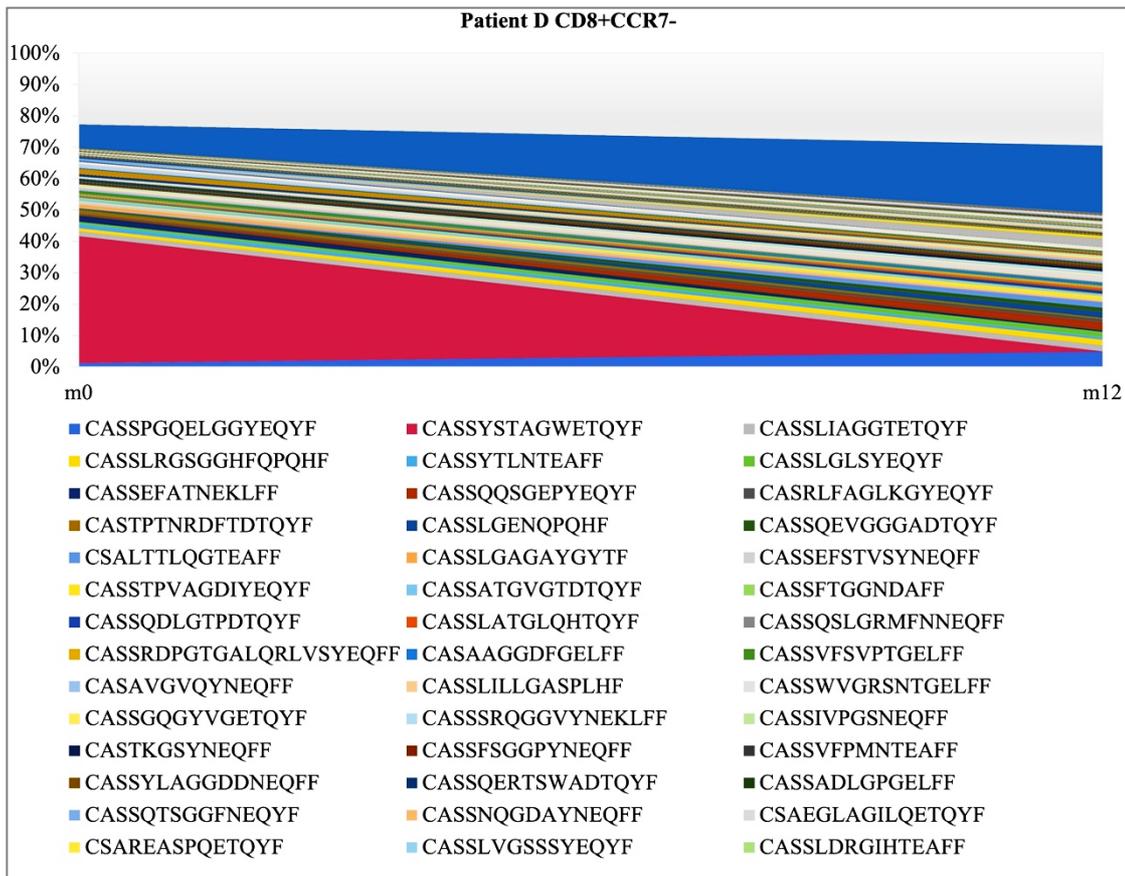


Abb. 31: Overlap Analyse der CD8+CCR7- T-Zellen von Patient D mit einer Persistenz des CD8+CCR7- TZR- β -Repertoires von ± 70 % unter Fingolimodtherapie.

In den Farben dargestellt sind die Klone, die vor Therapie mit Fingolimod (m0) und zwölf Monate nach Therapie mit Fingolimod (m12) im CD8+CCR7- TZR- β -Repertoire nachweisbar waren und somit persistierten. In grau markiert sich der Bereich der „nicht-überlappenden“ Sequenzen (NonOverlapping), der mit 29,4 % des CD8+CCR7+ TZR- β -Repertoires weniger als ein Drittel ausmachte (Persistenz überwiegt). In der Legende sind aufgrund eines vielfältigen CD8+CCR7+ TZR- β -Repertoires mit >100 Klonotypen (hohe Klonalität) nur die anteilig frequentesten Klonotypen gelistet. Auf der Abszisse (x-Achse) wird der gesamte longitudinale Verlauf der Analyse zu den Zeitpunkten m0 und m12 dargestellt. Auf der Ordinate (y-Achse) kommen die Frequenzen zur Darstellung.

In den CD8+CCR7- Subpopulationen beider Kontrollproben ließ sich ein eher stabiles CD8+CCR7- TZR- β -Repertoire nachweisen. In der Probe der gesunden Kontrolle zeigten sich nach zwölf Monaten Beobachtung zum zweiten Analysezeitpunkt noch 65,7 % der vorliegenden Klonotypen identisch zu denen der Baseline Untersuchung (Zeitpunkt m0).

Die monoklonale Expansion innerhalb dieser Klonotypen nahm leicht ab (*Abbildung 32*). In der Analyse der CD8+CCR7- Subpopulation des MS-Patienten ohne Therapie zeigte sich nach zehn Monaten mit 93,9 % eine nahezu vollständige Persistenz des CD8+CCR7- TZR- β -Repertoire (*Abbildung 33*).

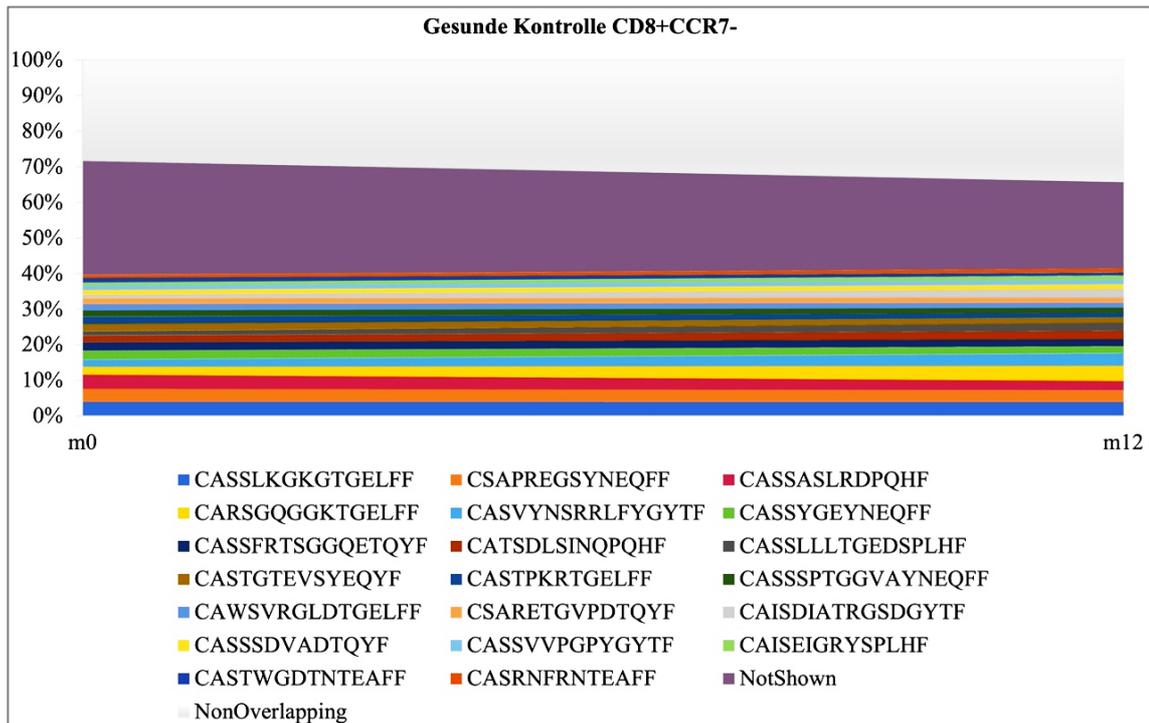


Abb. 32: Overlap Analyse der CD8+CCR7- T-Zellen der gesunden Kontrolle mit einer Persistenz des CD8+CCR7- TZR- β -Repertoires von 65,7 % im Zwölfmonatsverlauf.

In den Farben dargestellt sind die Klone, die zur Baseline (m_0) und zwölf Monate später (m_{12}) im CD8+CCR7+ TZR- β -Repertoire nachweisbar waren und somit persistierten. In grau markiert sich der Bereich der „nicht-überlappenden“ Sequenzen (NonOverlapping), der mit 34,3 % des CD8+CCR7+ TZR- β -Repertoires ein Drittel ausmachte (Persistenz überwiegt). NotShown- Klonotypen sind Klonotypen, die in ihrer monoklonalen Expansion zu wenig prozentualen Anteil am Gesamtrepertoire zeigen, dass sie grafisch nicht erfasst werden können und daher in ihrer Gesamtheit zusammengefasst werden. Auf der Abszisse (x-Achse) wird der gesamte longitudinale Verlauf der Analyse zu den Zeitpunkten m_0 und m_{12} dargestellt. Auf der Ordinate (y- Achse) kommen die Frequenzen zur Darstellung.

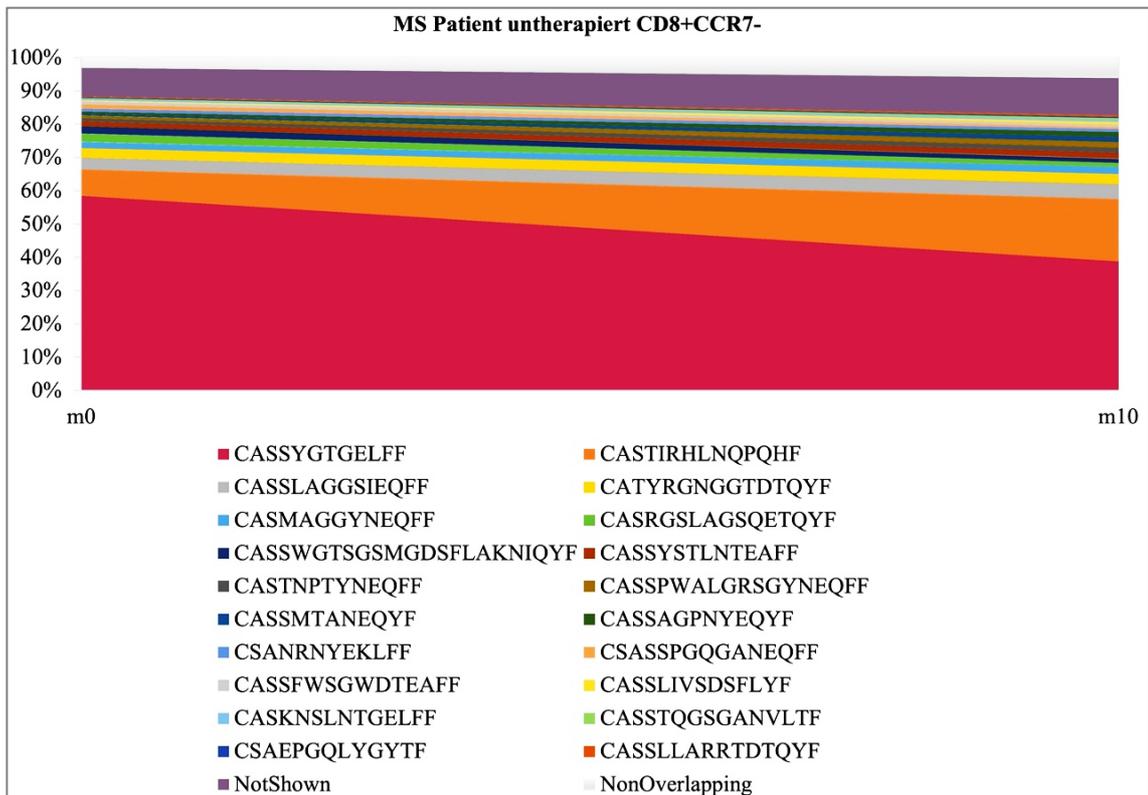


Abb. 33: Overlap Analyse der CD8+CCR7+ T-Zellen des MS-Patienten ohne Therapie mit einer Persistenz des CD8+CCR7+ TZR- β -Repertoires von 93,9 % im Zehnmonatsverlauf.

In den Farben dargestellt sind die Klone, die zur Baseline (m_0) und zehn Monate später (m_{10}) im CD8+CCR7+ TZR- β -Repertoire nachweisbar waren und somit persistierten. In grau markiert sich der Bereich der „nicht-überlappenden“ Sequenzen (NonOverlapping), der mit <10 % des CD8+CCR7+ TZR- β -Repertoires gering ist. NotShown- Klonotypen sind Klonotypen, die in ihrer monoklonalen Expansion zu wenig prozentualen Anteil am Gesamtrepertoire zeigen, dass sie grafisch nicht erfasst werden können und daher in ihrer Gesamtheit zusammengefasst werden. Auf der Abszisse (x-Achse) wird der gesamte longitudinale Verlauf der Analyse zu den Zeitpunkten m_0 und m_{10} dargestellt. Auf der Ordinate (y- Achse) kommen die Frequenzen zur Darstellung.

3.6 Identifizierung gemeinsamer interindividueller Klone

3.6.1 CD8+CCR7+ Subpopulation

Im Folgenden wurde analysiert, ob es Klonotypen gibt die womöglich von MS-Patienten geteilt werden und wenn ja, ob diese longitudinal unter Fingolimodtherapie persistieren. Im allgemeinen Sprachgebrauch werden Klonotypen, die nur jeweils in einem Individuum identifiziert werden als *private Klone* bezeichnet, wohingegen die Klonotypen, die von ≥ 2 Individuen geteilt werden als *öffentliche Klone* bezeichnet werden.

In der CD8+CCR7+ T-Zellpopulation zum Zeitpunkt m_0 konnten insgesamt 27.564 Klonotypen identifiziert werden, wovon 27.378 private Klone darstellten. Somit waren nur etwa 0,7 % aller Klonotypen geteilte öffentliche Klonotypen (*Abbildung 34*). Nur ein einziger Klon *CASSLGDTEAFF* war von diesen 0,7 % in allen MS-Patienten und nicht in der gesunden Kontrolle zu finden. Dieser Klon befand sich nach zwölf Monaten Therapie mit Fingolimod nicht mehr in den Patientenproben, wurde als öffentlicher Klon allerdings nun vom untherapierten MS-Patienten und der gesunden Kontrolle geteilt. Generell konnten nach zwölf Monaten insgesamt noch 22.390 Klonotypen identifiziert werden, von denen weiterhin 99,7 % private Klone darstellten. Kein einziger Klon der öffentlich zum Zeitpunkt m_0 identifiziert wurde und von zwei der drei MS-Patienten geteilt wurde, wurde zum Zeitpunkt m_{12} noch geteilt.

3.6.2 CD8+CCR7- Subpopulation

In der CD8+CCR7- T-Zellpopulation zum Zeitpunkt m_0 wurden insgesamt 10.465 Klonotypen identifiziert, wovon 99,7 % private Klone darstellten. Somit waren nur etwa 0,3 % aller Klonotypen geteilte öffentliche Klonotypen (*Abbildung 35*). Kein einziger Klon wurde zu diesem Zeitpunkt von allen MS-Patienten geteilt. Nach zwölf Monaten Therapie mit Fingolimod konnten insgesamt noch 8.015 Klonotypen identifiziert werden, von denen weiterhin 99,6 % private Klone darstellten. Innerhalb der Klonpopulation der 0,4 % an öffentlichen Klonen konnte ein Klon *CASSDRDTGELFF* identifiziert werden, der von allen MS-Patienten und nicht von der Kontrolle geteilt wurde. Dieser Klon wurde

tatsächlich auch bereits zum Zeitpunkt m_0 von Patient C und dem untherapierten MS-Patienten geteilt und persistierte somit in beiden Individuen. Darüber hinaus ließen sich in der CD8+CCR7- T-Zellpopulation insgesamt drei Klonotypen nachweisen, die von zwei Individuen zu beiden Zeitpunkten m_0 und m_{12} bzw. m_{10} geteilt wurden: zwischen Patient C und dem untherapierten MS-Patienten *CASSFPGELFF* und zwischen Patient D und dem untherapierten MS-Patienten *CSARLADNEQFF* und *CASSPAGDAGELFF*. Auch wenn im nächsten Kapitel auf die Identifizierung der Epitop-Spezies noch eingegangen wird, soll an dieser Stelle dennoch erwähnt sein, dass nach Abgleich mit der *VDJdb*-Datenbank fast alle genannten öffentlichen Klone den Epitopen des Cytomegalievirus zugeordnet werden können. Allein nur für *CASSPAGDAGELFF* ist das Epitop nach Abgleich mit *VDdb* noch nicht identifizierbar.

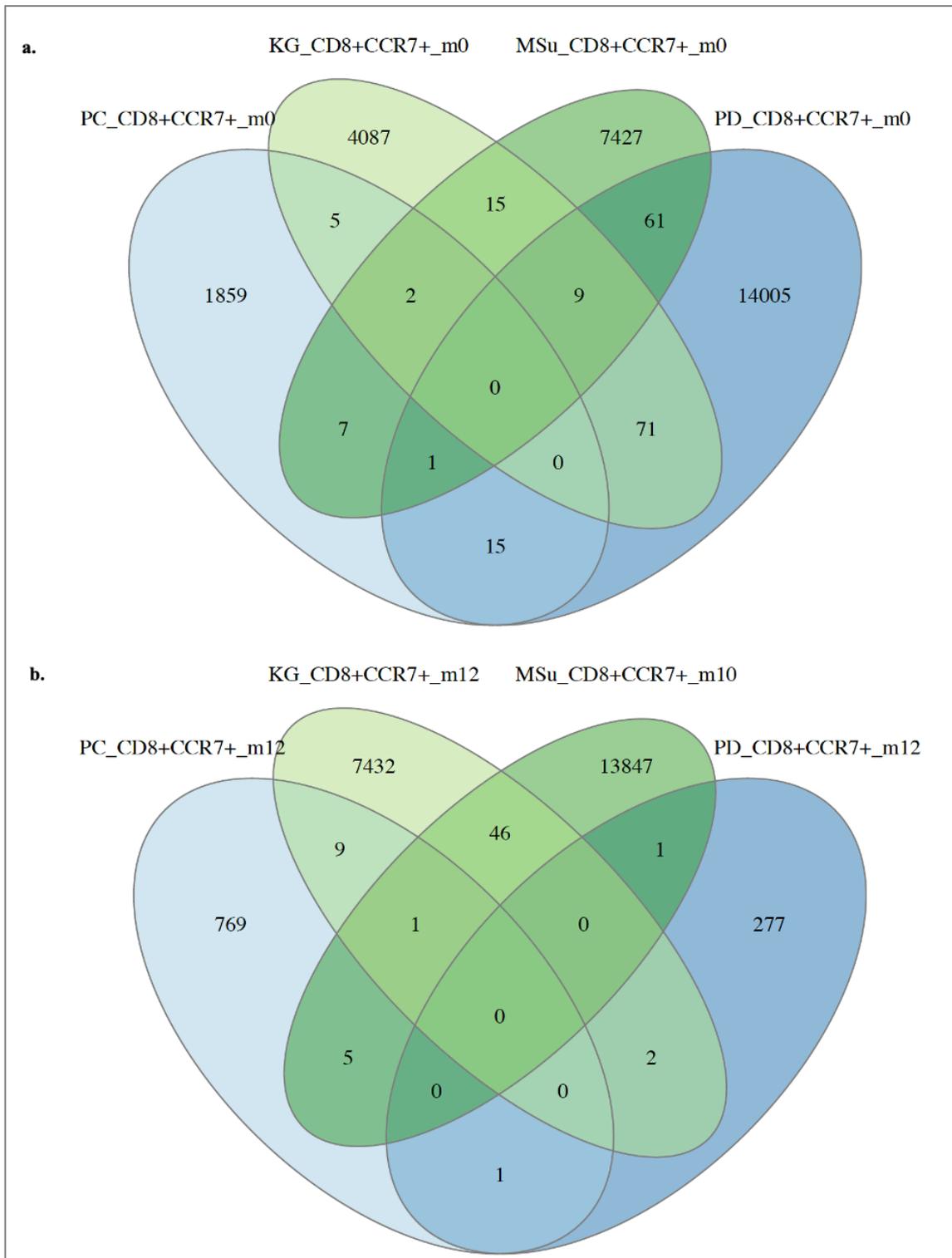


Abb. 34: Venn-Diagramm zur Darstellung privater (nicht geteilter) und öffentlicher (geteilter) Klone des TZR- β -Repertoires der CD8+CCR7+ T-Zellen zwischen Patient C (PC), Patient D (PD), dem untherapierten MS-Patienten (MSu)* und der gesunden Kontrolle (KG) zum Zeitpunkt m0 vor

Therapie mit Fingolimod (a.) und im Beobachtungszeitraum von zehn* bzw. zwölf Monaten ($m_{10/12}^*$) mit Therapie (b.).

Zu beiden Zeitpunkten wird kein einziger Klon (0) von allen Individuen geteilt, allerdings kann zum Zeitpunkt m_0 ein Klon identifiziert werden, der von allen drei MS-Patienten (inkl. untherapierter MS-Patient) geteilt wird. Generell ist ersichtlich, dass die meisten Klonotypen zu beiden Zeitpunkten nicht geteilt werden (m_0 : 99,3 %; m_{12} : 99,7 %).

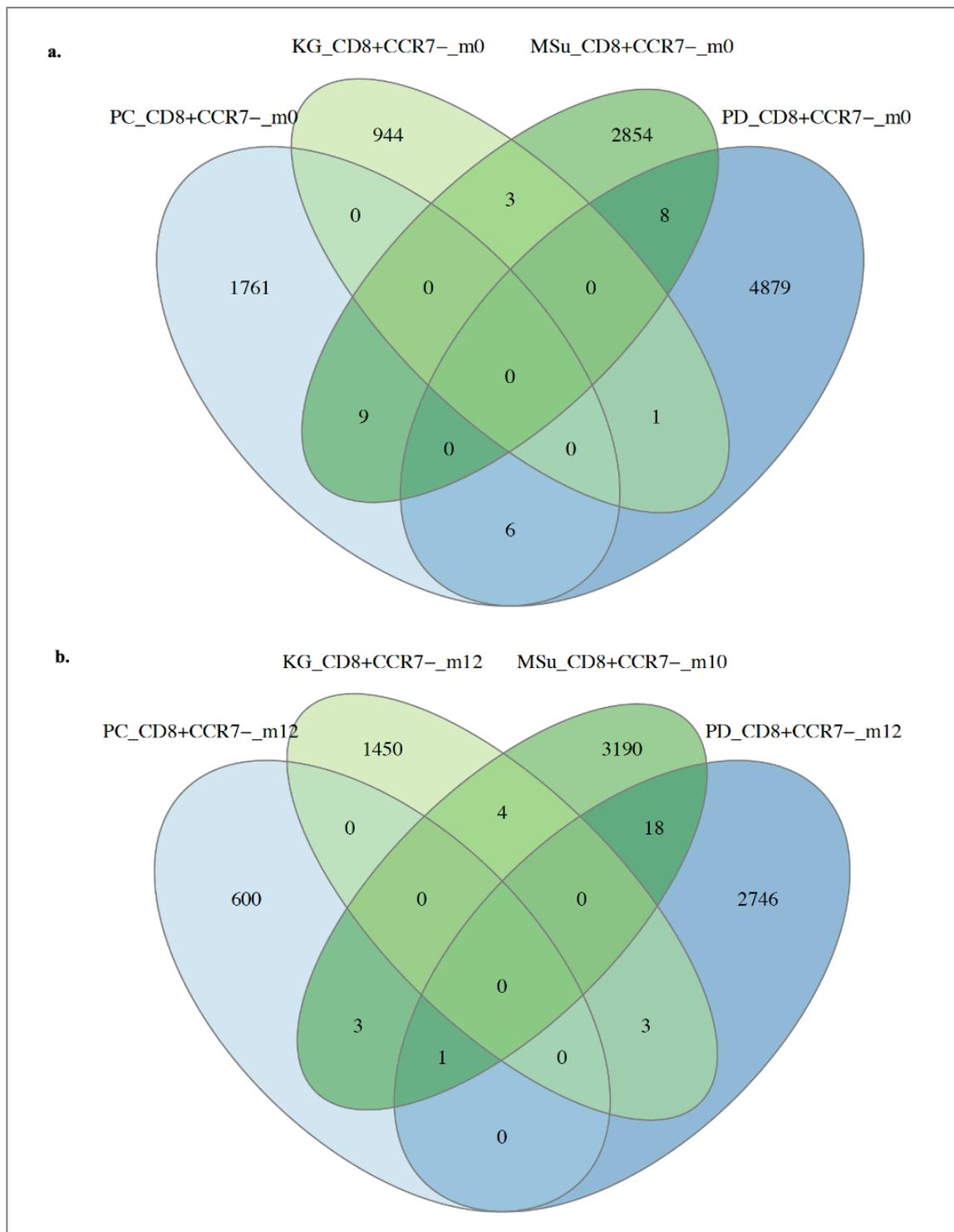


Abb. 35: Venn-Diagramm zur Darstellung privater (nicht geteilter) und öffentlicher (geteilter) Klone des TZR- β -Repertoires der CD8+CCR7- T-Zellen zwischen Patient C (PC), Patient D (PD), dem untherapierten MS-Patienten (MSu)* und der gesunden Kontrolle (KG) zum Zeitpunkt m0 vor

Therapie mit Fingolimod (a.) und im Beobachtungszeitraum von zehn* bzw. zwölf Monaten (m_{10/12}*) mit Therapie (b.).

Zu beiden Zeitpunkten wird kein einziger Klon (0) von allen Individuen geteilt, allerdings kann zum Zeitpunkt m₁₂ ein Klon identifiziert werden, der von allen drei MS-Patienten (inkl. untherapierter MS-Patient) geteilt wird. Generell ist ersichtlich, dass die meisten Klonotypen zu beiden Zeitpunkten nicht geteilt werden (m₀: 99,7 %; m₁₂: 99,6 %).

3.7 Identifizierung der Epitop-Spezies

3.7.1 CD8+CCR7+ Subpopulation

Um abschließend einordnen zu können, ob die Klonotypen (CDR3-Sequenzen) gezielten Epitopen zugeordnet werden können, erfolgte ein Abgleich der NGS-Rohdaten mit der Datenbank *VDJdb* [130] deren visualisierter Abgleich der Top fünf Epitope im Folgenden dargestellt werden soll.

Im TZR- β -Repertoire der CD8+CCR7+ T-Zell-Subpopulationen aller Proben zeigten sich zur Baseline (Zeitpunkt m₀) die meisten CDR3-Sequenzen passend zu Cytomegalievirus-(CMV)-Epitopen mit einer Frequenz von <2,2 %. Zudem waren die zweithäufigsten Epitope mit einer Frequenz von <1 % in allen vier Proben die des Epstein-Barr-Virus (EBV). Weitere Epitop-Spezies mit wechselnden Frequenzen waren neben gängigen Homo Sapiens Epitopen die des Influenza Virus A, des Humanen Immundefizienz Virus Typ I (HIV-I), des Hepatitis Virus C (HCV) und des schweren akuten respiratorischen Syndroms (*engl.severe acute respiratory syndrome coronavirus type 2*, SARS CoV2). Letzteres ist aufgrund der Blutentnahmezeitpunkte aus dem Jahr 2014 am ehesten als ein molekulares Mimikry zu werten. Zu den Zeitpunkten m₁₀ bzw. m₁₂ konnten die meisten CDR3-Sequenzen des TZR- β -Repertoires der CD8+CCR7+ T-Zell-Subpopulationen auch dem CMV mit einem Anteil von <3 % zugeordnet werden. War das EBV in den Kontrollproben weiterhin wie auch schon zum Zeitpunkt m₀ die zweithäufigste Epitop-Spezies mit <0,4 %, so reduzierte sich dieser Anteil in den mit Fingolimod therapierten Patientenproben (bei Patient C <0,2%, Patient D nicht mehr nachweisbar). Weitere Epitop-Spezies mit wechselnden Frequenzen waren neben

gängigen Homo Sapiens Epitopen die des Influenza Virus A, HIV-I, HCV, des Dengue Virus Typ-1 (DENV1), des Gelbfiebertvirus (YFV) und des SARS CoV2. Zusammenfassend konnten keine relevanten Epitop-Shifts unter Fingolimodtherapie beobachtet werden (*Abbildung 36*).

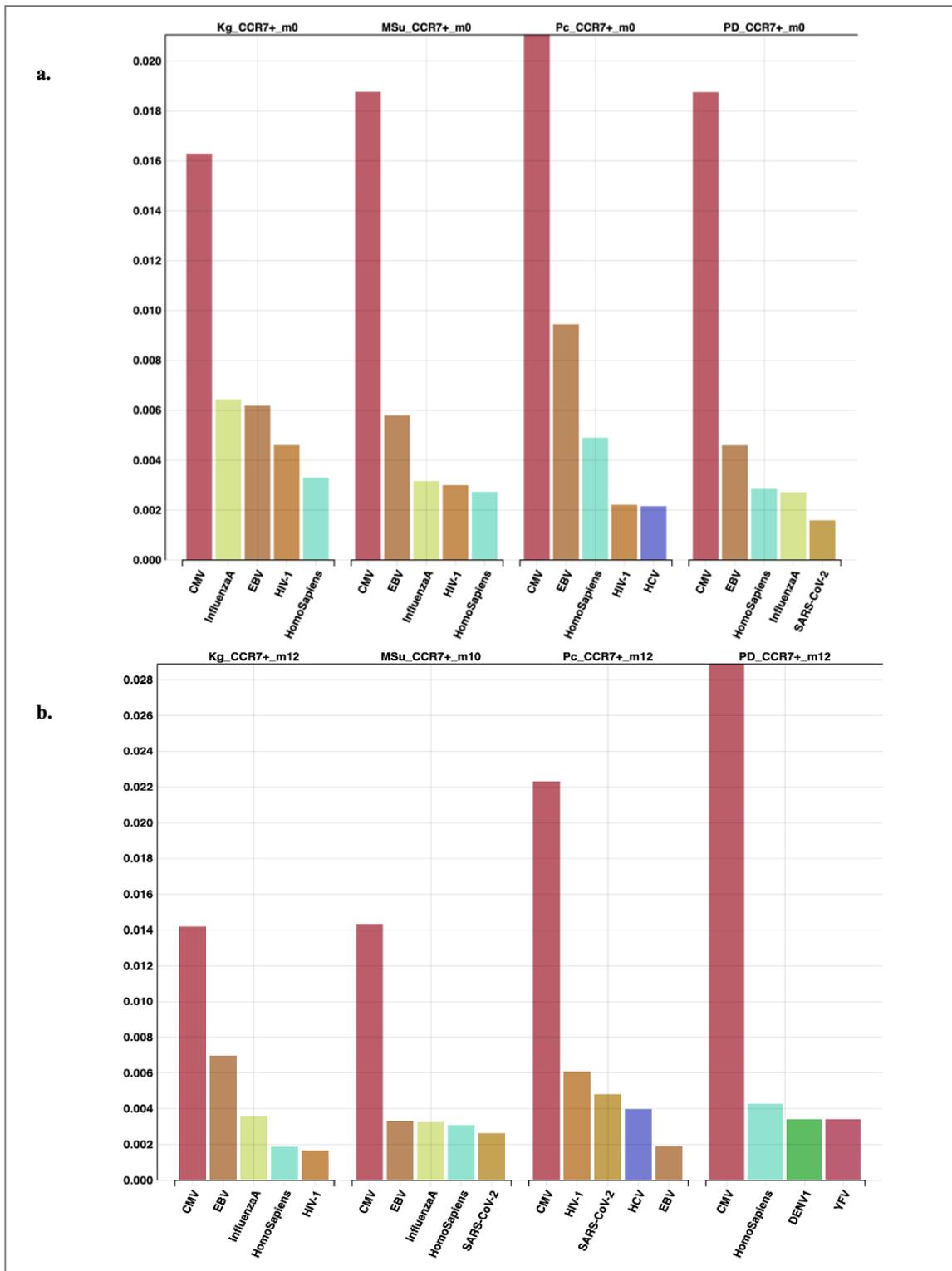


Abb. 36 a.-b.: Grafische Darstellung der Top fünf Epitop-Spezies des TZR- β -Repertoires der CD8+CCR7+ T-Zellen von Patient C (PC), Patient D (PD), der gesunden Kontrolle (Kg) und des untherapierten MS-Patienten (MSu)* vor Therapie mit Fingolimod (Zeitpunkt m_0) (a.) und im

Beobachtungszeitraum von zehn* bzw. zwölf Monaten ($m_{10/12}^*$) mit Therapie (b.) nach Abgleich mit der VDJdb-Datenbank.

Auf der Abszisse (x-Achse) aufgetragen werden die Epitop-Spezies, auf der Ordinate (Y-Achse) kommen die Frequenzen der Epitop-Spezies anteilig am TZR- β -Repertoire der CD8+CCR7+ T-Zellen zur Darstellung. Zu allen Zeitpunkten zeigte sich das Epitop des Cytomegalievirus (CMV) führend. Weitere hochfrequente Epitop-Spezies mit wechselnden Frequenzen waren neben den Epstein-Barr-Virus (EBV) und gängigen Homo Sapiens Epitopen die des Influenza Virus A, des Humanen Immundefizienz Virus Typ I (HIV-I), des Hepatitis Virus C (HCV) und des schweren akuten respiratorischen Syndroms (engl. severe acute respiratory syndrome coronavirus type 2, SARS CoV2). Zum Zeitpunkt m_{12} konnten bei Patient D auch Epitope dem Gelbfiebertvirus (YFV) und dem DengueVirusTyp1 (DENV-1) zugeordnet werden.

3.7.2 CD8+CCR7- Subpopulation

Im TZR- β -Repertoire der CD8+CCR7+ T-Zell-Subpopulationen aller Proben zeigten sich zur Baseline (Zeitpunkt m_0) und im Zwölfmonatsverlauf (m_{12}) ähnliche Epitopanalysen mit ähnlichen Frequenzen wie schon in der Analyse der CD8+CCR7+ Subpopulationen, allerdings mit deutlich mehr Schwankungen innerhalb der relativen Anteile zueinander. Die Epitope ließen sich wie zuvor neben gängigen Homo Sapiens Epitopen denen des Influenza Virus A, HCV, DENV3/4, YFV und SARS-COV-2 zuordnen (*Abbildung 36*). Auffällig war in der Analyse der Epitop-Spezies des MS-Patienten ohne Therapie, dass mehr als die Hälfte an CDR3-Sequenzen dem Epitop des HIV-I zugeordnet werden konnten. Zum Zeitpunkt m_0 waren dies etwa 60 % des TZR- β -Repertoires der CD8+CCR7- T-Zell-Subpopulationen, zum Zeitpunkt m_{10} noch etwa 40 %. Dies ist insofern interessant, als dass bei dem Patienten nach aktuellem Kenntnisstand keine HIV-Erkrankung bekannt ist und sich diesbezüglich auch die CD4+/CD8+ Ratio in der Durchflusszytometrie zu beiden Zeitpunkten unauffällig zeigte.

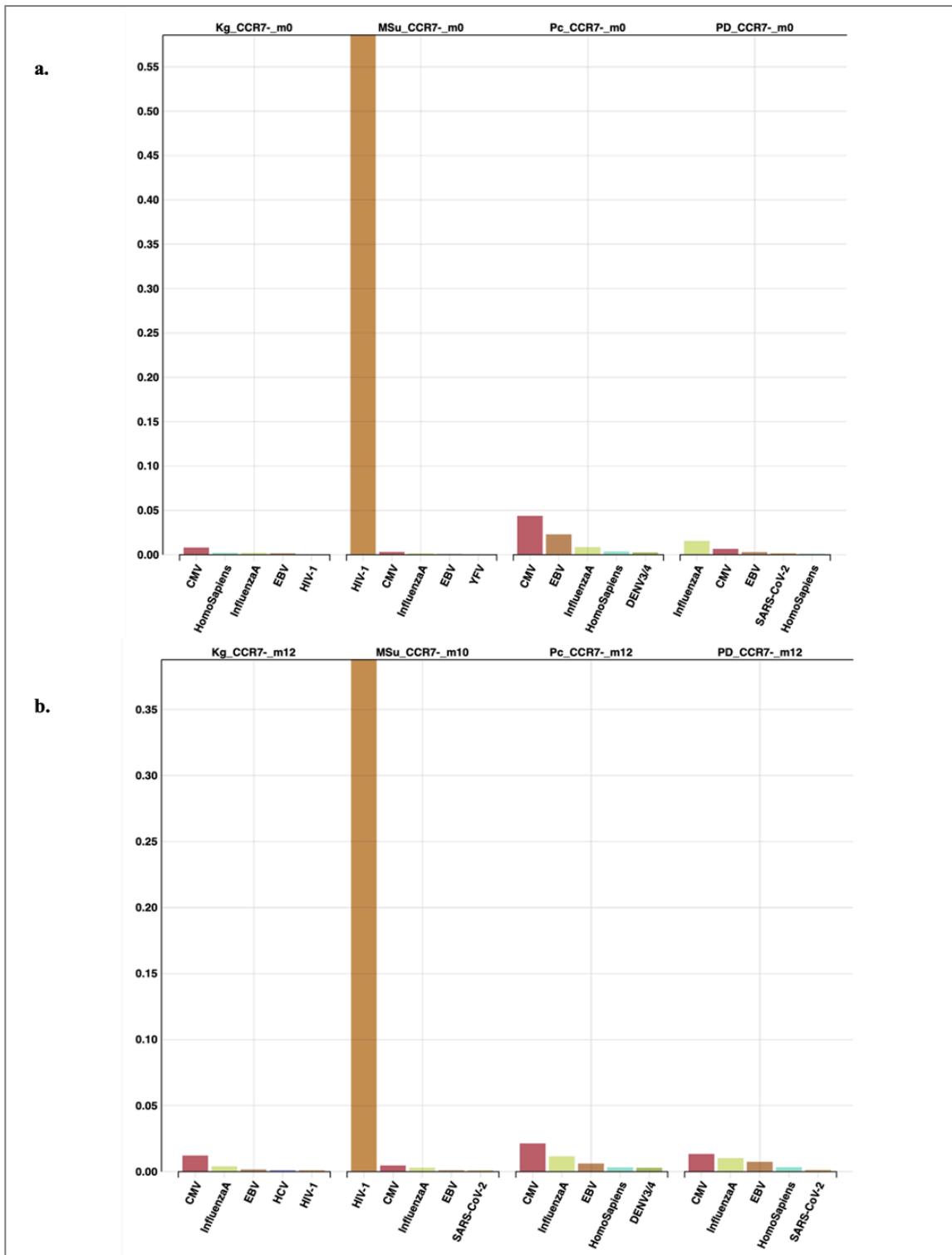


Abb. 37 a.-b.: Grafische Darstellung der Top fünf Epitop-Spezies des TZR- β -Repertoires der CD8+CCR7- T-Zellen von Patient C (PC), Patient D (PD), der gesunden Kontrolle (Kg) und des untherapierten MS-Patienten (MSu)* vor Therapie mit Fingolimod (Zeitpunkt m₀) (a.) und im

Beobachtungszeitraum von zehn* bzw. zwölf Monaten ($m_{10/12}^*$) mit Therapie (b.) nach Abgleich mit der VDJdb-Datenbank.

Auf der Abszisse (x-Achse) aufgetragen werden die Epitop-Spezies, auf der Ordinate (Y-Achse) kommen die Frequenzen der Epitop-Spezies anteilig am TZR- β -Repertoire der CD8+CCR7- T-Zellen zur Darstellung. Hochfrequente Epitop-Spezies mit wechselnden Frequenzen im Beobachtungszeitraum waren neben dem Epstein-Barr-Virus (EBV) und gängigen Homo Sapiens Epitopen die des Influenza Virus A, des Humanen Immundefizienz Virus Typ I (HIV-I), des Hepatitis Virus C (HCV), des schweren akuten respiratorischen Syndroms (engl.severe acute respiratory syndrome coronavirus type 2, SARS CoV2), des Gelbfieberevirus (YFV) und des Dengue Virus Typ 3/4 (DENV-3/4). Auffällig war in der Analyse der Epitop-Spezies des MS-Patienten ohne Therapie, dass viele CDR3-Sequenzen dem Epitop des HIV-I zugeordnet werden konnten. Zum Zeitpunkt m_0 waren dies etwa 60 % des TZR- β -Repertoires der CD8+CCR7- T-Zell-Subpopulationen, zum Zeitpunkt m_{10} 40 %.

4 Diskussion

4.1 Quantitativer Kontext von CD8+ T-Lymphozyten und Fingolimod

Ziel dieser Arbeit war die methodische Entwicklung eines Stufenplans via *NGS* zur qualitativen Deskription des CD8+ TZR- β -Repertoires von MS-Patienten unter Fingolimodtherapie anhand der Parameter Diversität, Klonalität und klonaler Persistenzen im longitudinalen Verlauf von einem Jahr. Da bis dato die meisten wissenschaftlichen Arbeiten zu den quantitativen Zusammenhängen zwischen Fingolimod und den peripheren T-Lymphozyten im longitudinalen Verlauf veröffentlicht wurden, galt es zunächst eine Prüfung der Methodik mittels Abgleichs der durchflusszytometrischen Daten mit der aktuellen Datenlage anzustreben. Dies war insofern wichtig, als dass die quantitativen Zusammenhänge die Basis zur Einordnung der qualitativen Deskriptionen darstellten.

Die durchflusszytometrischen Daten führten zu drei wesentlichen Beobachtungen:

1. Bei unterschiedlichen Ausgangspopulationsgrößen an PBMC reduzierte sich in allen drei Patientenproben unter Therapie mit Fingolimod im Vergleich zu den Kontrollen die

absolute CD3⁺ T-Zellzahl. Die relativen Anteile zeigten eine CD3⁺ T-Zellzahl Reduktion in allen Proben, allerdings mehr als doppelt so stark unter Therapie mit Fingolimod als in den Kontrollen.

2. Unter Therapie mit Fingolimod verschob sich der CD4⁺/CD8⁺ Quotient zu Ungunsten der CD4⁺ T-Zellen in Richtung der CD8⁺ T-Zellen (zytotoxischen T-Zellen).

3. Unter Therapie mit Fingolimod verschob sich der CCR7⁺/CCR7⁻ Quotient zu Ungunsten der CD8⁺CCR7⁺ T-Zellen in Richtung der CD8⁺CCR7⁻ T-Zellen (T_{EM}/EMRA).

Da Fingolimod den Lymphozyten Egress aus den Lymphknoten reduziert, war eine Reduktion der CD3⁺ T-Zellzahl im peripheren Blut unter einem Jahr Therapie mit Fingolimod erwartungsgemäß. Ein diesbezüglich klarer Richtwert der zu erwartenden prozentualen Reduktion zwecks Abgleichs mit den eigenen Ergebnissen fand bisher nach aktuellem Kenntnisstand keinen Einzug in die Literatur, unterliegen die durchflusszytometrisch isolierten Zellpopulationen in ihrer Größe vielen Störfaktoren sowohl methodischer als auch immunologischer Natur. Anfang der 2000-er Jahre, vor Markteinführung von Fingolimod, waren Analysen der Lymphozytenkompartimente dosisabhängig von Fingolimod von großem Interesse, hier zeigten sich teilweise bei Dosen bis 5 mg/d von Fingolimod CD3⁺ T-Zellzahl Reduktionen um bis zu 88 %. Zielten diese Studien darauf ab ein grundsätzliches Verständnis zur dosisabhängigen Entwicklung der generellen Lymphopenie zu erhalten, begann man sich kurz vor der Markteinführung (Deutschland 2011) zunehmend für die Zusammensetzung der Lymphozytenkompartimente im Therapieverlauf zu interessieren. Zu den ersten Analysen diesbezüglich gehörte eine kleine Kohortenuntersuchung (n=16) von *Mehling et al.* im Jahr 2008, die nicht nur eine generelle CD3⁺ T-Zellzahlreduktion identifizierte, sondern in dieser Arbeit eine von CD4⁺ T-Zellen dominierte Reduktion der CD4⁺ und CD8⁺ Subpopulationen herausstellte. Zudem beobachteten die Wissenschaftler, dass innerhalb dieser Subpopulationen sich vorrangig die naiven T-Zellen (T_{NC}) und die zentralen Gedächtniszellen (T_{CM}) reduzierten, sodass anteilig die Effektor-(Gedächtnis) - T-Zellen (T_{EM}/EMRA) die Populationen dominierten [89]. Diese Erkenntnisse ließen sich

2014 durch die Ergebnisse von *Song et al.* in einer kleinen Arbeit mit 23 RRMS-Patienten in einem Beobachtungszeitraum von zwölf Monaten reproduzieren [131]. *Rudnicka et al.* kam 2015 zu ähnlichen Ergebnissen mit einer Reduktion der CD3+ T-Zellen um etwa ein Drittel innerhalb von sechs Monaten und einer deutlichen Reduktion der CD4+ T-Zellen bei nahezu stabilen CD8+ T-Zellzahlen, sodass sich eine Verschiebung des CD4+/CD8+ Quotienten zu Ungunsten der CD4+ T-Zellen einstellte (Ratio sank von 3,6 auf 0,35) [132]. Gleiches zeigten *Hjorth et al.* 2020 [133].

Zunehmendes Interesse bestand fortan darin herauszufinden, ob zu einem gewissen Zeitpunkt nach Behandlung mit Fingolimod aufgrund der quantitativen Subpopulationsanalysen eine Aussage über das klinische Therapieansprechen getroffen werden kann. In zwei unterschiedlichen kleineren durchflusszytometrischen Arbeiten mit jeweils 14 und 40 RRMS-Patienten aus den Jahren 2016 und 2018 beobachtete man zu unterschiedlichen Monatszeitpunkten, dass sich nach einem Monat Therapie mit Fingolimod die größtmögliche Reduktion der T-Zellen einstellte, die im Verlauf eines Jahres keinen größeren Schwankungen unterlag. Zudem kamen beide Studien zu den Ergebnissen, dass niedrige *Baseline*-Zellzahlen an jungen naiven T-Zellen (RTE, engl. *recent thymic emigrants*) und B-Zellen, sowie eine höhere Verschiebung des CD4+/CD8+ Quotienten zu Ungunsten der CD4+ T-Zellen auf Basis einer anteiligen Erhöhung der CD8+ T-Zellen unter Fingolimodtherapie als prädiktiver (Bio-)Marker einer guten Therapieresponsivität dienen könnte [91, 92]. Eine Arbeitsgruppe um *Moreno-Torres et al.* fand 2018 in einer kleinen Arbeit mit 40 RRMS-Patienten Anhaltspunkte, dass ein multifaktorielles Konzept aus zellulären (Subpopulationsanalysen), molekularen (Genexpressionen) und klinischen Markern (z.B. *EDSS*) einen besseren Prädiktor für die Therapieresponsivität von Fingolimod darstellen könnte [134].

Die drei weiter oben postulierten Beobachtungen in der Auswertung der durchflusszytometrischen Daten dieser Arbeit entsprechen in allen Punkten somit den in der Literatur beschriebenen durchflusszytometrischen Analysen von T-Zell Populationen im longitudinalen Verlauf unter Therapie mit Fingolimod. Die Einordnung der Ergebnisse in die bereits allgemein anerkannten Populationsanalysen war wichtig, um

methodisch den richtigen Weg anzuzeigen, wenngleich die Ableitung von Erkenntnissen aus dieser Arbeit großen Schwächen unterliegt. Vorrangig ist hier stellvertretend für die gesamte Arbeit zu nennen, dass das ausgewählte Patienten- und Kontrollkollektiv wenig vergleichbar gewählt wurde (Patientinnen mit und ohne zuvor erhaltene Basistherapie, longitudinale Verlaufskontrolle des untherapierten MS-Patienten nach zehn Monaten statt nach zwölf Monaten, Geschlecht, MS-Form) und bei einer Kollektivgröße von drei bzw. zwei Patienten keine sinnvolle statistische Auswertung mit Ableitung signifikanter Ergebnisse möglich war. Zur Qualitätssteigerung der Arbeit wäre zudem eine klinische (bspw. *EDSS*) und bildmorphologische (Verlaufs-MRT) Korrelation der Patienten- und Kontrollkohorten interessant gewesen. Zudem gelang bedauerlicherweise durch die Durchflusszytometrie bei mangelnder Kapazität des *MoFlo XDPs* von Beckmann Coulter bei nur vier möglichen Auffanggefäßen für Zellpopulationen (sortiert nach CD4+CCR7+; CD4+CCR7-; CD8+CCR7+; CD8+CCR7-) keine weitere Subanalyse anhand des CD45RA+ Oberflächenproteins zur weiterführenden Differenzierung zwischen T_{NC}, T_{CM}, T_{EM} und T_{EMRA}. Ansatzpunkt für weitere Untersuchungen wäre hier die Sortierung in CD8+CCR7+CD45RA+, CD8+CCR7+CD45RA-, CD8+CCR7-CD45RA- und CD8+CCR7-CD45RA+ T-Lymphozyten, um ergänzende qualitative TZR-β-Repertoire Analysen durchführen zu können.

Betrachtet man die durchflusszytometrischen Daten dieser Arbeit und die der erwähnten wissenschaftlichen Publikationen so kommt perspektivisch die Frage auf, auf welcher pathophysiologischen Basis eine Therapie mit Fingolimod zu einer präferierten Reduktion von T-Helferzellen (CD4+) und einer präferierten Reduktion von T_{NC/CM} im peripheren Blut führt, weshalb der Lymphozytenegress aus den Lymphknoten besonders diesen Zellen erschwert wird. Interessant wäre zudem die Beantwortung der Frage, ob die Effekte der Therapie mit Fingolimod allein auf die generelle starke Reduktion der CD3+ T-Zellen zurückzuführen ist oder ob die spezifische Reduktion von T-Helferzellen, naiven T-Zellen und zentralen Gedächtniszellen den klinischen Effekt von Fingolimod bedingt, um weitere Therapieansätze zu identifizieren und die pathophysiologische Relevanz von T_{NC} und T_{CM} in der MS zu untersuchen.

Es bleibt weiterhin unbeantwortet, weshalb trotz Dominanz von CD8+CCR7- (terminalen) T-Effektor-(Gedächtnis)-zellen ($T_{EM/EMRA}$) im peripheren Blut unter Therapie mit Fingolimod es offenbar zu einer reduzierten Anzahl an klinischen Schüben kommt, wenngleich neben IgG-Zellen doch nach aktuellem Kenntnisstand (siehe Punkt 1.1.4.2) sich fast ausschließlich CD8+ T-Zellen in aktiven entzündlichen Läsionen befinden und die CD4+ Zellen sich vermehrt „nur“ im perivaskulären, meningealen Raum finden lassen. Womöglich könnte dies ein weiterer Hinweis dafür sein, dass die CD4+ vermittelte B-Zell Aktivierung eine höhere pathophysiologische Relevanz in der aktiven Läsion vor Ort haben könnte als die Anwesenheit der CD8+ T-Lymphozyten. Darüber hinaus scheint es unklar, weshalb die durch Fingolimod hervorgerufene Dominanz der $T_{EM/EMRA}$ einen positiven Effekt auf den Krankheitsverlauf hat, da interessanterweise bereits 2007 beobachtet wurde, dass die Therapie mit Interferon- β zu einer Hochregulierung von CCR7 auf den T-Lymphozyten führt und somit eine Dominanz der $T_{NC/CM}$ gegenüber den $T_{EM/EMRA}$ hervorgerufen wird (somit genau gegenteilig zu den Effekten von Fingolimod) [135, 136]. Weiter wird dies gestützt durch einige Arbeiten die in RRMS- und SPMS-Patienten eine Hochregulation von spannungsabhängigen Kaliumkanälen Kv1.3 auf aktivierten CCR7- T_{EMs} beobachteten [137-139], deren selektive Blockierung oder genetischer Knockout zumindest im experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis Model (*EAE-Model*) einen positiven Einfluss auf den Krankheitsverlauf bot [140-143]. Somit wird einer hochregulierten CCR7- T_{EM} Zellpopulation eine relevante Rolle in der Pathogenese der MS zugeschrieben und als möglicher Therapieansatz gewertet und es bleibt zu klären, inwieweit die $T_{EM/EMRA}$ -Dominanz unter Fingolimod Therapie in dieses Model passt. Da alle hier genannten Arbeiten der vergangenen Jahre rein quantitative Populationsanalysen unter Therapie mit Fingolimod beschrieben, ohne sich genauer mit diesen Fragestellungen zu beschäftigen, gewinnen qualitative TZR- β -Repertoire Analysen in diesem Kontext an Bedeutung.

4.2. Qualitativer Kontext des CD8+ TZR- β -Repertoires und Fingolimod

4.2.1 *Next Generation Sequencing*: Ein allgemeines Interpretationsproblem für die Zukunft

Um die folgenden Diskussionen bezüglich Diversität, Klonalität und longitudinalen Persistenz richtig einordnen zu können, ist vorab ein Blick auf die generelle *NGS*-Rohdatenprozessierung notwendig. *NGS* ist ein mächtiges methodisches Werkzeug und aktueller denn je. Es wird allerdings durch Zunahme an *NGS*-basierten Studien aufgrund zunehmender Kostenreduktion, flächendeckender Geräteverbreitung sowie immer neuen Anwendungsmöglichkeiten zunehmend wichtiger Studienvergleichbarkeiten auf Basis einheitlicher qualitativer *NGS*-Standards zu schaffen bzw. *NGS*-basierte Ergebnisinterpretationen im technischen Rohdatenkontext zu beleuchten. Grund hierfür ist eine relevante Fehleranfälligkeit der Methodik, die sich sowohl im prä-Datenprozessierenden *Workflow* als auch im Sequenzierungsvorgang selbst abspielt. Eine Arbeit von *Ma et al.* zeigte 2019 in einer Fehleranalyse von tiefen Sequenzierungsvorgängen, dass in der laborchemischen Probenverarbeitung (vorrangig reverse Transkription und Amplifikation) und Probenaufbewahrung aufgrund falscher Basenpaarungen (Insertion, Deletion, Mutation) Schäden in der DNA entstehen können, die teils zu signifikanten Fehlern (Signifikanz abhängig von der jeweiligen Basen Substitution) in der *NGS*-Auswertung führen [144]. Bereits 2011 beschäftigten sich erste Arbeiten mit diesen sogenannten Nukleotid-*Mismatches* und sahen die Lösung in einer Filteretablierung für niedrig frequente CDR3-Sequenzen, die sich in einem Nukleotid-*Mismatch* zu anderen hoch frequenten CDR3-Sequenzen unterschieden oder für generell niedrig frequente CDR3-Sequenzen, die im gesamten 4 % der totalen Sequenzanzahl, ausmachten. Da niedrigfrequente CDR3-Sequenzen ein Ausdruck von Diversität des TZR- β -Repertoires sind, hoffte man durch den etablierten Filter eine artifizielle Erhöhung der Diversität vermeiden zu können [145, 146]. Allerdings postulierten *Warren et al.* und *Nguyen et al.* 2011, dass nicht nur damit das Problem des Verlustes an niedrigfrequenten, aber relevanten einzigartigen Klonen (bspw. tatsächliches Vorkommen von Mutationen in der Onkologie) einherginge, sondern auch mit dem Ausschließen von Sequenzen mit schlechter Tiefe und somit Qualität. Damit ist das Verhältnis von Zellzahl zu eigentlicher

Read-Anzahl gemeint, das im besten Fall im Verhältnis 1:1 durch die Sequenzierung abgebildet werden sollte. Nach *Bolotin et al. (2012)* würden mit starken Filtern bspw. bis zu 50 % aller von Illumina® generierten Daten verloren gehen. Deshalb schlugen die Autoren einen Algorithmus vor, in dem mitunter eine partielle Einbeziehung von einzigartigen niedrigfrequenten Klonotypen mit bis zu drei Nukleotid-Mismatches erlaubt sei. Hochfrequente CDR3-Sequenzen würden demnach zu Kern-Klonotypen (*Core Clonotypes*) zusammengefasst werden, die Kriterien-erfüllenden-Nukleotid-*Mismatches*-beinhaltenden Klone würden im nächsten Schritt den nahestehenden hochfrequenten CDR3-Klonotyp zugeordnet werden. Gleiches würde mit Klonotypen schlechter Sequenzierertiefen durchgeführt werden. Zudem postulierten die Autoren, dass *Mismatches* im V-J-Rekombinationsraster definitiv ein Ergebnis von PCR-Fehlern sein müssten, da „TZR keiner somatischen Hypermutation unterliegen“, sodass diese vollständig durch einen Filter von der NGS-Datenprozessierung ohne relevanten Datenverlust ausgeschlossen werden könnten [147]. Das Problem unterschiedlicher Sequenzierertiefen und somit schwerer interindividueller Vergleichbarkeiten griffen *Greiff et al. (2015)* auf, indem sie anhand der Korrelation vom *Shannon Index* (mathematische Größe der Biometrie zur Beschreibung einer Diversität) und der Anzahl an Zellen, *Reads* und Klonotypen Sequenzierertiefen einzelner TZR- β -Repertoires verglichen [148]. *Alves Sousa et al. (2019)* ergänzten dies durch Normalisierung der Entropie und Vielfältigkeit (*Richness*) anhand der Berechnung der maximalen *Shannon* Entropie und der maximalen Kombinationsvielfalt für jedes Repertoire basierend auf der Indexzellzahl [149].

Die für diese Arbeit angestrebten Sequenzierertiefen von 1:1 konnten, wie bereits im Ergebnisteil aufgezeigt, bei durchweg diversen Probenrepräsentationen nicht erreicht werden. Allerdings zeigte sich zumindest bei den Patientenproben eine gute Sequenzierqualität bei einer Repräsentation von durchschnittlich 1:1,2 und 1:0,7. Die Kontrollen zeigten vermeintlich schlechtere Qualitäten durch Unterrepräsentation (1:0,3) oder Überrepräsentation (1:3,3). Allerdings zeigte sich weiterführend, dass nach Abschluss der Datenprozessierung durch *VDJtools* nach Durchlaufen diverser Filter allenfalls im besten Fall nur 50 % der *Reads* als Klonotypen identifiziert werden konnten und vereinzelt sogar nur 0,7 % (Patient C, CD8+CCR7- m12).

Die gezielten methodischen Probleme dieser Arbeit und neuere Lösungsansätze werden unter 4.3 *Grenzen der Methodik* noch Erwähnung finden. Dieses Kapitel diene allein dazu ein allgemeines Verständnis nach aktueller Datenlage dafür zu bekommen, wie schwierig abseits der allgemeinen Störfaktoren (bspw. Studiendesign) die Interpretation von NGS-basierten Daten ist. Demnach ist eine valide Beurteilbarkeit der folgenden Sachverhalte kaum möglich.

4.2.2 V-J-Rekombinationsraster: Longitudinale Rekombinationsreduktion unter Fingolimodtherapie in T_{NC}, T_{CM} und T_{EM/EMRA}

Die V-J-Rekombinationsmöglichkeiten der jeweiligen TZR- β -Repertoires der naiven T_{NC}, der T_{CM} und T_{EM/EMRA} der CD8⁺ T-Zellen nahmen unter Fingolimodtherapie im longitudinalen Verlauf in beiden Patientenproben ab, wohingegen die der Kontrollen zunahmen. Hochfrequente Gensegment-Rekombinationen in den MS-Patienten zum Zeitpunkt der Baseline waren dabei *TRBV7-9/TRBJ1-2*, *TRBV6-5/TRBJ2-5* und *TRBV6-3/TRBJ2-2*. Nach aktuellem Kenntnisstand finden sich in der Literatur weder Beschreibungen über das Verhalten quantitativer V-J Rekombinationsmöglichkeiten der jeweiligen TZR- β -Repertoires von CD8⁺ T-Zellen unter Fingolimodtherapie im longitudinalen Verlauf noch darüber, ob Fingolimod zu einer Eliminierung bestimmter Rekombinationen führt.

In der Literatur wurden bereits Assoziationen bestimmter Gensegmente mit der MS-Erkrankung beschrieben, darunter führend *TRBV5-6* und *TRBV5-1* [150]. *Shugay et al.*, maßgebliche Mitgestalter der Programme *MiXCR* und *VDJtools*, veröffentlichten 2015 zur Vorstellung von *VDJtools* eine kontrollierte TZR- β -Repertoire-Analyse von dreizehn jungen MS-Patienten (6-15 Jahre) und stellten ein signifikant erhöhtes Auftreten von *TRBV5-6*, *TRBV5-1*, *TRBV5-8*, *TRBV7-6* und *TRBV20-1* in den MS-erkrankten Patienten fest [129]. Diese V-Segmente entsprechen zwar nicht den drei in dieser Arbeit hochfrequentesten V-Segmenten, dennoch lassen sie sich in den jeweilige Top fünf Rekombinationsmöglichkeiten der MS-Patienten und nicht der gesunden Kontrolle wiederfinden. Interessanterweise ist in dieser Arbeit das frequente Vorkommen von *TRBV5-1* in der CD8⁺CCR7⁺ T-Zellpopulation in allen an MS-erkrankten-Patienten (P_C,

P_D und MS_u) auffällig, wohingegen sich in den Top Fünf der Rekombinationen in der $CD8+CCR7-$ T-Zellpopulation teils *TRBV20-1* führend zeigte. Für letzteres Gensegment sahen *Fozza et al.* 2012 in einer kleinen sizilianischen Populationsstudie keine Assoziation mit MS [151]. Womöglich könnte dies darauf hindeuten, dass sich die mögliche genetische Assoziation zu MS auf Basis von *TRBV5-1* in $T_{NC/CM}$ darstellt, die $T_{EM/EMRA}$ jedoch dominierend antigen-getriggert agieren. Eine relevante Reduktion der *TRBV5-1* Segmente unter Fingolimodtherapie konnte man in dieser Arbeit nicht beobachten, was womöglich ein weiterer Hinweis für die genetische Assoziation zu MS ist.

4.2.3 Diversität des $CD8+$ TZR- β -Repertoires: Höhere Diversität in T_{NC} und T_{CM} als in T_{EM} , Fingolimodtherapie reduziert Diversität

Basis der menschlichen Immunabwehr ist unter anderem eine hohe Diversität und Vielfalt (*Richness*) des menschlichen TZR- β -Repertoires. *Qi et al.* werteten 2014 mittels NGS diverse Repertoires von $CD4+$ und $CD8+$ T-Zellen aus und kamen zu der Erkenntnis, dass bis zu etwa 100 Millionen einzigartige TZR- β -Sequenzen existieren. Wichtig, vor allem im longitudinalen Vergleich von Sequenzen, ist das Bewusstsein dafür, dass die Immunabwehr und somit die TZR- β -Repertoires vor allem in den ersten zwanzig Lebensjahren des Menschen, basierend auf teils noch existentem Thymusgewebe, das höchste Maß an Diversität und Vielfalt bieten. Die Thymusinvolution ist vorrangig ursächlich für die zunehmende Immunschwäche im hohen Alter, allerdings postulierten *Qi et al.* in ihrer Arbeit, dass die TZR- β -Repertoires von älteren Menschen sich dennoch überraschend divers zeigte [152]. Die Vielfältigkeit des TZR- β -Repertoires nimmt bereits ab dem 40.-ten Lebensjahr ab, das Repertoire der naiven T-Zellen ab dem 70.-ten Lebensjahr dabei signifikant. *Britanova et al.* identifizierten 2014 in 70-jährigen Probanden 8-57 Millionen und in jungen Erwachsenen im Alter von 20-35 Jahren 60-120 Millionen unterschiedliche Nukleotid-Sequenzen [153]. Analog zu *Qi et al.* zeigten auch *Li et al.* 2015, dass die Diversität der $CD8+$ T-Zellen deutlich geringer ist als die der $CD4+$ Zellen, *Li et al.* postulierten eine 5-fach höhere Diversität der $CD4+$ T-Zellen gegenüber den $CD8+$ T-Zellen [154]. Wenn auch weniger divers, beobachteten *Miconnet et al.* 2011 bereits, dass sich das $CD8+$ TZR- β -Repertoire nach viralem Antigenkontakt

zu etwa $\leq 80\%$ erneuerte und betonte somit nicht nur die Wichtigkeit der Diversität, sondern auch die der adaptiven Fluidität der Diversität in CD8⁺ T-Zellen nach Antigenkontakt [155].

Daten zur Diversität des TZR- β -Repertoires in MS-Patienten zeigten sich zunächst widersprüchlich, nachdem *Shugay et al.* 2015 beobachteten, dass in MS-Erkrankten eine niedrigere Diversität als bei gesunden Kontrollen nachzuweisen war und *Alves Sousa et al.* 2019 genau das Gegenteil aufzeigten. Im Jahr 2021 kamen *Hayashi et al.* mit ihren Daten zwar zu den gleichen Erkenntnissen wie *Alves Sousa et al.*, allerdings führte diese Arbeitsgruppe eine Alterskorrektur durch und stellte fest, dass in der Kohorte älterer Menschen kein signifikanter Unterschied in der Diversität von MS-Patienten zu gesunden Kontrollen zu finden war [156]. *Oakes et al.* untersuchten 2017 die Diversität der CD8⁺ T-Zellen und beobachteten eine höhere Diversität in T_{NC/CM} als in T_{EM} [157].

In dieser Arbeit zeigte sich, ähnlich wie in der Arbeit von *Shugay et al.*, sowohl in der CD8⁺CCR7⁺ als auch in der CD8⁺CCR7⁻ T-Zellpopulation grundsätzlich bei allen MS-Erkrankten (P_C, P_C, MS_u) zu beiden Analysezeitpunkten eine geringere Diversität als bei der gesunden Kontrolle. Da keine Alterskorrektur erfolgte ist dies möglicherweise die Konsequenz des Altersunterschiedes zwischen den MS-Erkrankten (Median: 36) und der gesunden Kontrolle (23). Generell kam zu beiden Zeitpunkten in allen Proben in den T_{NC} und T_{CM} eine höhere Diversität als in den T_{EM/EMRA} zur Darstellung und entsprach somit den Daten von *Oakes et al.* Unter Fingolimodtherapie zeigten zudem fast alle Proben der Patienten (außer P_C: CD8⁺CCR7⁺ Population von Patient C) im Vergleich zum untherapierten MS-Patienten eine Abnahme der Diversität nach zwölf Monaten Therapie mit Fingolimod. Dabei zeigte die Therapie mit Fingolimod bei allen T-Zellpopulationen einen ähnlichen Effekt auf die Diversitätsreduktion (nach zwölf Monaten Reduktion um den Faktor 3).

Das Ausmaß an Diversität des untherapierten MS-Patienten zeigte sich im Vergleich zur gesunden Kontrolle nach zehn Monaten stabil, was womöglich Ausdruck eines kontinuierlich antigen-getriggerten Prozess im untherapierten MS-Patienten ist.

4.2.4 Klonalität und longitudinale Persistenz des CD8⁺ TZR- β -Repertoires: Hinweise für dominante monoklonal expandierte T_{EM/EMRA} mit starker Persistenz

Bereits Anfang der 2000-er Jahre identifizierten MS-Forscher auf Basis von *CDR-Spectratyping* teils identische monoklonale und oligoklonale Klone in CD8⁺ T-Zellen, die sowohl in MS-Läsionen [53, 54], im Liquor [54, 158] und im peripheren Blut persistierten (teils >5 Jahre) [54]. Mit zunehmendem Aufkommen neuerer Sequenzierungsverfahren konnten diese Ergebnisse auch mittels dieser Methoden reproduziert werden. *Salou et al.* untersuchten 2015 sowohl mittels *CDR-Spectratyping* als auch mittels *High-Throughput-Sequencing (HTS)* ZNS-Läsionen, Liquor und PBMC von drei MS-Patienten und konnten zusätzlich aufzeigen, dass die dominanten oligoklonalen CD8⁺ T-Zellen im Blut der RRMS-Patienten vorrangig den Phänotyp der T_{CM} und der T_{EMRA} boten [159]. Zudem verglichen *Planas et al.* 2018 mittels *High-Throughput-Sequencing (HTS)* CD8⁺ Klone aus drei Läsionen der weißen Substanz mit den CD8⁺ Klonen des peripheren Blutes und fanden heraus, dass die häufigsten CD8⁺ Klonotypen in den Läsionen den häufigsten Klonotypen im peripheren Blut entsprachen [160]. Basierend auf diesen Beobachtungen veröffentlichten *Amoriello et al.* 2020 eine Arbeit, die der Frage nachging, ob mittels immunrestituierender autologer Stammzelltransplantation (n=7) und/oder immunsuppressiver Therapie mit Natalizumab (n=8) häufige Klonotypen aus dem CD8⁺ TZR- β -Repertoire verschwanden oder ob diese longitudinal (nach 24 Monaten) persistierten. Interessanterweise zeigten ihre Ergebnisse, dass frequente Klone von T_{CM} und T_{EM} sowohl nach autologer Stammzelltransplantation als auch nach kontinuierlicher Therapie mit Natalizumab persistierten, wenn auch nach Therapie mit Natalizumab frequenter [161]. Studien zu Persistenzen und longitudinalen klonalen Expansionen unter Fingolimodtherapie liegen nach aktueller Kenntnis und Literaturrecherche nicht vor, somit sind diesbezüglich folgende Beschreibungen erste Beobachtungen.

In dieser Arbeit ließen sich aus den unterschiedlichen T-Zellpopulationen unterschiedliche quantitative Klonalitätsbeobachtungen im longitudinalen Verlauf unter Fingolimodtherapie ableiten. Wie auch schon in der Diversitätsanalyse zeigte sich hierbei

die quantitative Klonalitätsanalyse des untherapierten MS-Patienten als einzige in allen Populationen durchweg stabil.

Die T_{NC} und T_{CM} zeigten ein uneinheitliches Ergebnis in den Proben der therapierten Patienten, sodass sich hier nicht klar ableiten ließ, ob die Klonalität unter Fingolimod zu- oder abnahm. Dennoch zeigten alle MS-Proben eine deutlich höhere Klonalität als die gesunde Kontrolle. Zudem zeigte sich bei den $T_{EM/EMRA}$ ein sehr einheitliches Ergebnis, da Fingolimod in keiner Probe einen Einfluss auf das Ausmaß an Klonalität bot. Somit war die quantitative Klonalität in allen MS-Patienten im Vergleich zur gesunden Kontrolle unabhängig von der Fingolimodtherapie im longitudinalen Verlauf stabil.

Zur qualitativen Bewertung der Klonalität warf diese Arbeit einen Blick auf die Persistenz der zehn häufigsten Klone im Zwölfmonatsverlauf und auf die Persistenz des gesamten $CD8+CCR7+$ TZR- β -Repertoires, um einzuordnen, ob es sich bei der zuvor beobachteten stabilen quantitativen Klonalität im longitudinalen Verlauf um eine mono-/oligo- oder polyklonale Persistenz handelte. In der Population der T_{NC} und T_{CM} konnten in allen Proben/Kontrollen unabhängig von der Fingolimodtherapie keine hochfrequenten dominanten Klone (keine monoklonale Expansion) im gesamten Beobachtungszeitraum identifiziert werden, zudem erneuerte sich > 90 % des gesamten $CD8+CCR7+$ TZR- β -Repertoire nach zwölf bzw. zehn Monaten. Somit zeigten sich polyklonale instabile fluide TZR- β -Repertoires der T_{NC} und T_{CM} unabhängig von der MS-Erkrankung und unabhängig von der Fingolimodtherapie.

In der $T_{EM/EMRA}$ -Population kamen völlig konträre Beobachtungen zur Darstellung. Generell zeigten sich die hochfrequenten Klonotypen in allen Proben/Kontrollen teilweise deutlich monoklonaler bzw. oligoklonaler expandiert als in den naiven T-Zellen und T_{CM} . Zum Zeitpunkt der Baseline, ohne Therapie, bestand das $CD8+CCR7+$ TZR- β -Repertoire ($T_{EM/EMRA}$) in allen drei MS-Patienten im Mittel zu 50 % aus den zehn häufigsten Klonotypen und deren monoklonaler Expansion. Somit zeigte sich in den $T_{EM/EMRA}$ im Durchschnitt eine 25-fach erhöhte Mono-/Oligoklonalität als in den $T_{NC/CM}$ zu beobachten war. Die Fingolimodtherapie zeigte auf beide Patienten einen unterschiedlichen Effekt bezüglich der qualitativen Klonalität. Die zehn häufigsten

$T_{EM/EMRA}$ -Zellen waren bei dem einen Patienten nach zwölf Monaten Therapie mit Fingolimod monoklonaler, bei dem anderen Patienten eher weniger monoklonal. Der untherapierte MS-Patient zeigte ein nahezu identisches, äußerst monoklonales T_{EM} -TZR- β -Repertoire nach zehn Monaten. Die unterschiedlichen Effekte der Fingolimodtherapie auf die monoklonale Expansion in den Patientenproben gehen möglicherweise darauf zurück, dass Patient C zuvor bereits eine Immuntherapie erhalten hatte.

Die Analyse der Persistenz ergab vier wesentliche Beobachtungen:

- 1) In allen drei MS-Patienten und der gesunden Kontrolle, unabhängig davon ob therapiert oder nicht, zeigte sich eine höhere Persistenz der hochfrequenten Top zehn Klone als auch eine generell höhere Persistenz ($\sim +57\%$) des gesamten $T_{EM/EMRA}$ -TZR- β -Repertoire über den Beobachtungszeitraum von zwölf Monaten als im TZR- β -Repertoire der $T_{NC/CM}$.
- 2) Die Fingolimodtherapie führte in den zehn häufigsten Klonotypen vorrangig der $T_{EM/EMRA}$ der behandelten Patientenproben im longitudinalen Verlauf zu einer geringeren Persistenz als in den Kontrollen.
- 3) Der an MS-erkrankte Patient, der keine Therapie erhalten hatte, bot nach zehn Monaten eine relevante monoklonal dominierte Persistenz der $T_{EM/EMRA}$ von fast 94 %.
- 4) $T_{EM/EMRA}$ zeigten sich grundsätzlich monoklonal expandierter als $T_{NC/CM}$.

Im Abgleich mit der genannten Literatur zeigt sich also auch in dieser Arbeit eine relevante longitudinale Persistenz der zytotoxischen CD8⁺ T-Zellen im peripheren Blut allerdings vorrangig abgebildet durch das Kompartiment der Effektorzellen $T_{EM/EMRA}$.

Anders als bei *Salou et al. (2015)*, zeigten sich die monoklonalen Expansionen und oligklonalen Klone nicht in den T_{CM} und T_{EMRA} sondern in den T_{EM} und T_{EMRA} . Es ergaben sich Hinweise dafür, dass Fingolimod zu einer qualitativen Reduktion der monoklonalen Expansion und Persistenz der $T_{EM/EMRA}$ -Klone führt. Signifikante Ergebnisse diesbezüglich erfordern weitere Arbeiten mit einer größeren Kohorte.

4.2.5 Private vs. öffentliche Klone: > 99 % private Klone in MS-Patienten

Mit Einführung des *HTS* wurden in der Wissenschaft bereits früh Hoffnungen geweckt, unbekannte Antigene von autoimmunvermittelten Erkrankungen mittels Suche nach identischen interindividuellen öffentlichen Klonotypen (*Fingerprints, Signatures*) in TZR-Repertoires von Erkrankten zu entschlüsseln. Allerdings zeigte sich dieser Ansatz als nicht zielführend. *Venturi et al.* waren ab 2006 die Ersten, die das Model der *konvergenten Rekombination* einführten [162-164] und dieses als großes Problem der Antigenentschlüsselung auf Basis identifizierter öffentlicher Klonotypen entgegenstellten. Unter *konvergenter Rekombination* versteht man die Möglichkeit individueller TZR-Repertoires unabhängig voneinander und von Wahrscheinlichkeiten abhängig identische Klonotypen hervorbringen zu können. Weiter postulierten sie, dass bestimmte Gensegmente häufiger in der somatischen Rekombination gewählt werden als andere. Diese Erkenntnisse deckten sich zunehmend mit Ergebnissen von *HTS*-basierten Analysen [165-167]. *Elhanati et al.* entwickelten 2018 ein Model, um das Ausmaß von natürlichen TZR-Overlaps auf Basis von *konvergenter Rekombination* vorherzusagen [168]. Darauf hinweisend, dass dieses Ausmaß maßgeblich von Sequenzertiefen und Kohorten abhängt, berechnete das datenbasierte Model etwa 15 % natürlichen interindividuellen Overlaps an Klonotypen [168, 169]. *Alves Sousa et al.* konnten 2019 in ihrer TZR- β -Repertoire Analyse von 34 MS-Patienten keinen einzigen übereinstimmenden öffentlichen Klonotypen im peripheren Blut identifizieren, allerdings fanden sich in 18 der 34 MS-Patienten CDR3-Sequenzen, die sich stark ähnelten und in Clustern zusammengefasst werden konnten [149]. *Amoriello et al.* identifizierten 2021 in einer groß angelegten bioinformatischen Datenanalyse mehrerer Kohorten/Register zwar die Anwesenheit öffentlicher Klonotypen im peripheren Blut, fanden aber heraus, dass diese im Liquor signifikant häufiger zu finden waren [169].

Auch in dieser Arbeit konnte in beiden Subpopulationen kein „verdächtiger“ öffentlicher Klon zwischen den MS-Patienten zum Zeitpunkt der Baseline identifiziert werden. In der CD8+CCR7+ T-Zellpopulation gab es vor Therapie einen einzigen Klon, den alle MS-Patienten teilten, dieser kodierte auf das CMV-Epitop. In der CD8+CCR7- T-Zellpopulation gab es vor Therapie keinen einzigen öffentlichen Klon, den alle MS-

Patienten miteinander teilten. Nach Therapie mit Fingolimod konnte allerdings ein gemeinsamer öffentlicher Klon identifiziert werden, der auch auf CMV kodierte. Generell waren über >99 % aller Klonotypen private Klonotypen. In Anbetracht des Modells der *konvergenten Rekombination*, die einen natürlichen Overlap von bis zu 15 % bedingt, ist bei den <1% öffentlicher Klonotypen in den MS-Erkrankten in dieser Arbeit, ähnlich wie bei *Alves Sousa et al.* und *Amoriello et al.*, ein deutlich geringeres Ausmaß an *konvergenter Rekombination* zu beobachten. Studien, zum Verhalten der *konvergenten Rekombination* in MS-Patienten liegen nach aktuellem Kenntnisstand nicht vor, sodass diese Arbeit womöglich erste Hinweise liefern könnte, dass diese in MS-Patienten deutlich reduzierter sein könnte als in Gesunden. Dies wäre allerdings zunächst mit einer größeren Kohorten zu validieren. Möglicherweise liegt der Sinn der *konvergenten Rekombination* darin, eine Art „Basisimmunität“ in allen menschlichen Individuen gegen dominante Pathogene sicherzustellen. Sollte sich in weiteren Studien der Verdacht erhärten, dass MS-Patienten eine geringere „Basisimmunität“ als Gesunde haben, wäre die Beantwortung der folgenden Frage interessant: Ist die verringerte „Basisimmunität“ in MS-Patienten mit Hang zur Spezifizierung individueller privater Klone ein pathophysiologischer Treiber oder viel mehr als Konsequenz der Erkrankung zu betrachten?

4.2.6 Epitop-Spezies: CMV-/EBV-Epitope führend sowohl in MS-Patienten als auch in gesunder Kontrolle, dominantes HIV-Epitop im untherapierten MS-Patienten

Wie bereits zu Beginn dieser Dissertation Schrift angedeutet, ist die Untersuchung von CD8+ T-Zellen aufgrund von zwei Beobachtungen so besonders interessant. Zum einen das dominante Vorkommen dieser Zellen in aktiven inflammatorischen ZNS-Läsionen, zum anderen der immunologische Kontext zwischen CD8+ T-Zellen und Viren.

Viren und deren ätiologische Bedeutung für die MS-Erkrankung beherrschten in den letzten Jahren wieder vermehrt die Blätter der großen wissenschaftlichen Journals. Große Bedeutung wurde hierbei zuletzt erneut dem Epstein-Barr-Virus (EBV) zugedacht. Maßgeblichen Anteil hieran haben einige großartige Publikationen der letzten Monate. *Bjornevik et al.* veröffentlichten 2022 eine große Datenanalyse von über zehn Millionen

jungen U.S. Militärangehörigen, von denen 955 an MS erkrankt waren. Sie postulierten, dass das Risiko an MS zu erkranken, wenn zuvor eine EBV-Infektion stattfand, um das 32-fache im Vergleich zu anderen Viren (CMV inkludiert) erhöht war [170]. Zudem betonten *Lanz et al.* 2022 mit ihren Forschungsergebnissen die Wichtigkeit von Kreuzreaktivität von Antikörpern in autoimmunen Erkrankungen, indem sie in einer MS-Kohorte nachwiesen, dass klonal expandierte B-Zellen sowohl EBV-EBNA1 (Epstein-Barr-Virus nukleäres Antigen 1) als auch GlialCAM (engl. glial cell adhesion molecule) im ZNS als Antigen erkannten [171]. Die Bedeutung dieser EBNA1-Epitope hatten bereits *Lunemann et al.* 2006 in einer Arbeit dargestellt, da sie aufzeigten, dass T-Zellen (vorrangig CD4+) auf EBNA1-Epitope mit einer gesteigerten Zytokinantwort reagierten [172] und diese möglicherweise eine Kreuzreaktivität zu Myelin boten [173]. Auf Basis der angenommenen „veränderten“ T-Zellreaktion in MS und im Licht der neu aufgefundenen Sequenzierungsmöglichkeiten und Analysen von TZR-Repertoires in den letzten Jahren, gingen *Schneider-Hohendorf et al.* 2022 der Frage nach, ob sich das TZR- β -Repertoire von T-Zellen gegenüber EBV-Epitopen ebenfalls verändert zeigte. Sie analysierten Daten von TZR- β -Repertoires von 1.395 MS-Patienten und 887 Kontrollen und konnten ihre Hypothese bestätigen [174].

Amoriello et al. analysierten 2015 mittels Datenbankabgleich (u.a. *VDJtools*) CDR3-Sequenzen des TZR- β -Repertoires von 15 RRMS-Patienten und untersuchten deren Epitop-Zugehörigkeit. Unter den viralen Epitopen fanden sich führend CMV, EBV, Influenza und HIV [161]. Dies deckte sich weitestgehend mit den Ergebnissen dieser Arbeit. Interessanterweise waren in den T_{NC} und T_{CM} aller Proben und Kontrollen zum Zeitpunkt der Baseline CMV-Epitope führend und EBV-Epitope am zweithäufigsten, was sich bei den Kontrollen nach zwölf bzw. zehn Monaten immer noch so zeigte, allerdings in den therapierten Patienten EBV unter den Top fünf Epitopen verschwand oder sich stark marginalisierte. Dies konnte in den $T_{EM/EMRA}$ so nicht beobachtet werden, die EBV-Epitop-Frequenzen zeigten sich in den therapierten MS-Patienten im Beobachtungszeitraum stabil.

Nachdem sich durch die gesamte Arbeit hinweg das TZR- β -Repertoire der $T_{EM/EMRA}$ des untherapierten Patienten auffällig monoklonal expandiert, stabil klonal/divers sowie

äußerst persistent zeigte, konnte diese monoklonale Expansion auf das Epitop des HIV zugeordnet werden. Dabei scheint nach aktueller Datenlage eine inverse Korrelation zwischen HIV und MS zu bestehen. *Gold et al.* zeigten 2015 auf, dass HIV-Patienten ein signifikant niedrigeres Risiko boten an MS zu erkranken [175]. Nachdem einige vereinzelte Patientenfälle von HIV-Patienten, die an MS erkrankt waren, aufzeigten, dass unter Einnahme antiviraler Medikamente die neuroinflammatorische Krankheitsaktivität regredient war, konnte eine Phase IIa Studie (INSPIRE) dies nicht belegen. *Gold et al.* konnten 2018 in dieser Studie keinen signifikanten Effekt der Einnahme von Raltegravir auf die MS-Krankheitsaktivität beobachten [176].

Wie kann es also sein, dass in einem HIV-negativen MS-Patienten etwa 60 % seiner CD8⁺ T_{EM}-Zellen auf einen einzigen monoklonal expandierten dominanten Klon zurückgehen, der sich gegen das HIV-Epitop richtet?

Bereits 1991 veröffentlichten *Perron et al.* eine Arbeit, in der sie mittels HIV1- und HIV2- Western Blot Seren von MS-Patienten und Kontrollen untersuchten und feststellten, dass die MS-Patienten eine hohe Kreuzreaktivität zu retroviralen Proteinen zeigten, da diese nicht an HIV erkrankt waren [177]. HIV gehört, wie auch die unter 1.1.3. *Ätiologie* erwähnten HERVs, zu den Retroviren. Diese können eine Kreuzreaktivität auslösen. Explizit finden Forscher immer mehr Anhaltspunkte für Homologien zwischen HIV und HERVs [178, 179] und es wäre denkbar, dass der dominante T_{EM/EMRA}-Klon Ausdruck einer eigentlichen HERV-Antigenerkennung ist. Dies wäre wiederum plausibel, da HERVs, wie bereits beschrieben, mit der MS-Erkrankung im Zusammenhang stehen. Stellvertretend ist diesbezüglich noch eine weitere Arbeit von Relevanz. *Dembny et al.* untersuchten 2020 am Mausmodell (*Alzheimer Mausmodell*), nach zuvor bereits ersten wissenschaftlichen Hinweisen, die Wirkung von HERV-K-RNA auf das zentrale Nervensystem. Sie injizierten HERV-RNA in den Liquor der Mäuse und beobachteten eine Neurodegeneration und Akkumulation von Mikroglia in den Gehirnen der Mäuse. Zudem untersuchten sie den Liquor von Alzheimer Patienten und fanden darin im Vergleich zu gesunden Kontrollen häufiger HERV-RNA [180]. Sie zeigten somit einen Zusammenhang zwischen HERVs und Neurodegeneration.

Möglicherweise verstecken sich HERVs als Antigentreiber der Neurodegeneration hinter der Kreuzreaktivität zu HIV und wurden daher in den Repertoire-Epitopanalysen bisher „übersehen“. Das könnte womöglich auch erklären, weshalb in einigen Case Reports HIV-positive MS-Patienten bezüglich ihre MS-Erkrankung von der Behandlung mit anti-retroviralen Medikamenten profitierten.

4.3 Grenzen der Methodik

Wie bereits in 2.5.5 *cDNA- Synthese* erwähnt, basiert die Erstellung der *Library* in dieser Arbeit auf der Verwendung von cDNA. Einige Vorteile, wie der Ausschluss von Introns in der Amplifizierung und somit Ausschluss von unbrauchbaren Sequenzen in der Analyse und der leichtere Umgang mit mRNA, fanden bereits Erwähnung. Da diese Arbeit auf Zellpopulationen unter zellreduzierender Therapie (Fingolimod) basierte, war es wichtig, ein Ausgangsmaterial zu haben, das viele Kopien in der Zelle enthält. *Johansen et al. (2015)*, von *Budingen et al. (2012)* und *Carlson et al. (2013)* zeigten in ihren Arbeiten, dass aufgrund vieler Kopien von RNA-Transkripten in einer Zelle der Gebrauch von cDNA statt gDNA (genomische DNA) sensitiver ist [181, 182], allerdings eine bessere Korrelation zwischen Zellzahl und Sequenzen-*Reads* (Merkmal einer guten Sequenzierqualität) zur besseren quantitativen und somit qualitativen Abbildung des TZR- β -Repertoires durch die Verwendung von gDNA gelingt [183]. Da die cDNA-Synthese in dieser Arbeit auf Basis von mRNA generiert wird, beginnt die Fehleranalyse der Methodik bereits hier. Aufgrund wechselnder mRNA-Expressionslevel, während der TZR-Aktivierung können falsche quantitative Zusammenhänge in der Sequenzauswertung „vorgetäuscht werden“ [184], vor allem bzgl. Genfrequenzen und monoklonalen Expansionen [185, 186].

Wesentliches Problem der Methodik ist, wie in 4.2.1 *Next Generation Sequencing: Ein allgemeines Interpretationsproblem für die Zukunft* dargestellt, das Erreichen einer guten Sequenziertiefe. Der Lösungsansatz bedingte sich in dieser Arbeit in einer äquivalenten Repräsentation der einzelnen Proben anteilig an der TZR-*Library*. Dies wurde dadurch erreicht, dass zunächst alle Proben vor den Sequenzierungsvorgängen auf eine gleiche Molarität konzentriert wurden und anschließend auf Basis der berechneten totalen

Zellzahl aller zu sequenzierenden Proben die Subpopulationen in gleicher Molarität proportional zu der Ausgangszellzahl zu der TZR-*Library* hinzugefügt wurden. In den letzten Jahren fand diesbezüglich einer anderer, zunehmend verbreiteter, Lösungsansatz Einzug in die *Library*-Präparation: die Verwendung von einzigartigen molekularen Kennungen (*unique molecular identifiers, UMI*) [187]. Durch den Einbau von UMIs in die cDNA gelang trotz unterschiedlicher Ausgangszellzahl und Sequenziertiefe eine Normalisierung verschiedener TZR-Libraries [153]. In der bereits zitierten Arbeit von *Alves Sousa (2019)* gelang die Identifikation ähnlicher CDR3-Sequenzen in MS-Patienten und deren Clusterzusammenführung auf Basis integrierter *UMIs*. Dadurch wurde eine Reduktion der Amplifikationsartefakte erzielt, da diese dementsprechend in den gebildeten Clustern aufgingen [149]. Auch wenn *UMIs* somit einen neuen und vielversprechenden Lösungsansatz zur Reduktion von Artefakten liefern, stellen sie dennoch eine neue Herausforderung in der Analyse dar, da sie durch PCR-Fehler in der eigenen Sequenz Mismatches hervorrufen können [188]. Trotzdem hätte die in dieser Arbeit verwendete Methodik von der Verwendung von *UMIs* profitiert, um eine besserer Vergleichbarkeit der Analyseparameter und eine bessere Sequenzierqualität zu erzielen.

5 Schlussfolgerung

In der MS-Forschung gab und gibt es heutzutage unterschiedliche Strategien, dem großen Rätsel des möglichen „Super-Antigens“ in der MS auf die Spur zu kommen. Einige Forscher nähern sich dem Thema in Erarbeitung kleiner Mikrokosmen, indem jeweils einzelne Zellpopulationen und ihr Mitwirken in der Pathogenese untersucht werden, um aus vielen kleinen Puzzleteilen am Ende ein großes Bild zusammensetzen. Andere Wissenschaftler wagen einen Schritt zurück und blicken aus einem sehr ganzeinheitlichen Blickwinkel auf die Erkrankung als ein großes gesamtes immunregulatorisches Neuronetzwerk, um vom Großen auf das Kleine zu schließen und sich den Blick nicht von kleinen Randphänomenen verschleiern zu lassen. Ein anderer Forschungsansatz bedient sich einem Lösungsvorteil, den es so in anderen Erkrankungen mit unbekanntem

Antigen teilweise noch nicht gibt: den etablierten Therapien. Die Idee dahinter beruht darauf, den Anfang vom Ende herzuleiten. Wir wissen mittlerweile von einer Bandbreite an Medikamenten, die einen positiven Effekt auf den Krankheitsverlauf haben. Das Verständnis über bestehende Wirkungen und Defizite dieser Therapien auf molekulargenetischer Ebene, kann womöglich helfen Rückschlüsse auf das fehlende Antigen zu ermöglichen. Letzterer Lösungsansatz steht im Zentrum dieser Dissertationsschrift mit Frage nach Wirkung von Fingolimod auf die kleinsten Bauelemente (Diversität, Klonalität und longitudinale Persistenz) der CD8⁺ TZR- β -Repertoire-Architektur von MS-Patienten und der Frage, ob sich zwischen MS-Patienten, MS-Patienten mit und ohne Therapie und gesunden Kontrollen in der Bauplan-Architektur der CD8⁺-Zellen etwas verändert.

Unter Fingolimodtherapie zeigte sich eine longitudinale V-J-Segment-Rekombinationsreduktion in allen T_{NC}, T_{CM} und T_{EM/EMRA}. Die Verwendung des *TRBV5-1*- Segmentes mit genetischer Assoziation an MS zu erkranken, fand sich vor allem in T_{NC} und T_{CM} aber nicht in T_{EM/EMRA}. Zudem zeigten sich auch höhere Diversitäten in T_{NC} und T_{CM} als in T_{EM/EMRA}, was möglicherweise ein Ausdruck dessen ist, dass T_{EM/EMRA} bereits weiter differenziert sind. Grundsätzlich führte die Fingolimodtherapie in allen Zellpopulationen zu einer reduzierteren Diversität. In T_{EM/EMRA} kamen die hochfrequenten Klonotypen teilweise deutlich monoklonaler bzw. oligoklonaler expandierter vor als in den T_{NC} und T_{CM} und sie zeigten starke longitudinalen Persistenzen. Fingolimod reduzierte hierbei die Persistenzen der zehn häufigsten Klone aller Populationen im Blut. Allein anhand dieser Bauelemente lässt sich ableiten, dass T_{EM/EMRA} einen besonderen Stellenwert in den MS-Patienten boten, was interessant ist, wenn man bedenkt, dass Fingolimod zu einem prozentualen Shift der CD3⁺ T-Zell-Populationszusammensetzung von T_{NC} und T_{CM} zu T_{EM/EMRA} hervorruft. Es bleibt zu klären, ob die insuffiziente Suppression der womöglich schädlicheren Effektor-T-Zellen (da weniger divers, monoklonal expandierter und persistenter) dazu führt, dass trotz Therapie mit Fingolimod neue Läsionen entstehen können.

Wie auch bisher in allen anderen Forschungsarbeiten, gelang auch mit dieser etablierten Methodik keine Identifizierung relevanter öffentlicher Klone als reziproker Hinweis auf

das Antigen. Um weitere zukünftige Repertoireanalysen besser interpretieren zu können bleibt zu klären, ob die *konvergente Rekombination* in MS-Patienten, wie in dieser Arbeit beobachtet, eine deutlich geringere ist, als in gesunden Menschen und auf welchen pathophysiologischen Mechanismen dies beruht.

Die Epitop-Analysen dieser Arbeit stellten EBV und HERVs in den ätiologischen Mittelpunkt. Die Multiple Sklerose wird in den letzten Jahren zunehmend mehr als neuroinflammatorische und neurodegenerative Erkrankung verstanden. Es wäre daher denkbar, dass sich in den unterschiedlichen klinischen Verlaufsformen und der *Silent Progression* unterschiedliche Wichtungen dieser Pathophysiologien finden lassen. Zudem wäre es möglich, dass es vielleicht nicht *das eine Antigen* gibt bzw. unterschiedliche Erkrankungen auf Basis unterschiedlicher Antigene vorliegen (bspw. RRMS vs. PPMS). So könnte das EBV in der RRMS und die HERVs in der PPMS (wie bei MS_u) bevorzugt antigenrelevant sein.

Möglicherweise liegt der Grund, dass nicht jeder serologisch positive EBV-Patient auf der Welt an MS erkrankt, darin, dass eben nicht gleichzeitig auch eine fehlregulierte Autoimmunantwort gegen HERVs vorliegt. Perspektivisch wären somit Studien interessant, die mittels HTS von Immunzell-Repertoires von Blut, Liquor, ZNS-Gewebe und Lymphknoten groß angelegte Immunzell-Epitop-Analysen in unterschiedlichen MS-Formen durchführen, um mögliche Frequenz-Unterschiede von HERV- und EBV Epitopen zu identifizieren. Dabei erscheint es in Anlehnung an diese Arbeit womöglich essenziell identifizierten HIV-Epitopen mehr Aufmerksamkeit zu widmen und das Potenzial an Kreuzreaktivität zwischen HIV und HERVs besser zu erforschen.

6 Interessenkonflikt

Es erfolgte durch die Firma Novartis eine partielle Unterstützung in Form von Geldmitteln für Labormaterialien. Es fand zu keinem Zeitpunkt eine Einflussnahme auf den Aufbau oder

Ablauf der Experimente oder die Interpretation der Ergebnisse statt. Es bestehen somit keine Interessenkonflikte.

7 Literaturverzeichnis

1. Landtblom, A.M., et al., *The first case history of multiple sclerosis: Augustus d'Este (1794-1848)*. *Neurol Sci*, 2010. **31**(1): p. 29-33.
2. Koch-Henriksen, N. and P.S. Sorensen, *The changing demographic pattern of multiple sclerosis epidemiology*. *Lancet Neurol*, 2010. **9**(5): p. 520-32.
3. Dobson, R. and G. Giovannoni, *Multiple sclerosis - a review*. *Eur J Neurol*, 2019. **26**(1): p. 27-40.
4. Tullman, M.J., et al., *Clinical characteristics of progressive relapsing multiple sclerosis*. *Mult Scler*, 2004. **10**(4): p. 451-4.
5. Lublin, F.D., et al., *Defining the clinical course of multiple sclerosis: the 2013 revisions*. *Neurology*, 2014. **83**(3): p. 278-86.
6. Torkildsen, O., K.M. Myhr, and L. Bo, *Disease-modifying treatments for multiple sclerosis - a review of approved medications*. *Eur J Neurol*, 2016. **23 Suppl 1**: p. 18-27.
7. Walton, C., et al., *Rising prevalence of multiple sclerosis worldwide: Insights from the Atlas of MS, third edition*. *Mult Scler*, 2020. **26**(14): p. 1816-1821.
8. Compston, A. and A. Coles, *Multiple sclerosis*. *Lancet*, 2008. **372**(9648): p. 1502-17.
9. Fasbender, P. and H.W. Kolmel, *Incidence of multiple sclerosis in the urban area of Erfurt, Thuringia, Germany*. *Neuroepidemiology*, 2008. **30**(3): p. 147-51.
10. Kingwell, E., et al., *Incidence and prevalence of multiple sclerosis in Europe: a systematic review*. *BMC Neurol*, 2013. **13**: p. 128.
11. Reich, D.S., C.F. Lucchinetti, and P.A. Calabresi, *Multiple Sclerosis*. *N Engl J Med*, 2018. **378**(2): p. 169-180.
12. Meier, U.C., et al., *Cumulative Roles for Epstein-Barr Virus, Human Endogenous Retroviruses, and Human Herpes Virus-6 in Driving an Inflammatory Cascade Underlying MS Pathogenesis*. *Front Immunol*, 2021. **12**: p. 757302.
13. Ramagopalan, S.V., et al., *Multiple sclerosis: risk factors, prodromes, and potential causal pathways*. *Lancet Neurol*, 2010. **9**(7): p. 727-39.
14. Belbasis, L., et al., *Environmental risk factors and multiple sclerosis: an umbrella review of systematic reviews and meta-analyses*. *Lancet Neurol*, 2015. **14**(3): p. 263-73.

15. Tarlinton, R.E., et al., *Role of Viruses in the Pathogenesis of Multiple Sclerosis*. Viruses, 2020. **12**(6).
16. Tao, C., et al., *Association between human herpesvirus & human endogenous retrovirus and MS onset & progression*. J Neurol Sci, 2017. **372**: p. 239-249.
17. Iizasa, H., et al., *Role of Viral and Host microRNAs in Immune Regulation of Epstein-Barr Virus-Associated Diseases*. Front Immunol, 2020. **11**: p. 367.
18. Baglio, S.R., et al., *Sensing of latent EBV infection through exosomal transfer of 5'pppRNA*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2016. **113**(5): p. E587-96.
19. Sutkowski, N., et al., *Epstein-Barr virus transactivates the human endogenous retrovirus HERV-K18 that encodes a superantigen*. Immunity, 2001. **15**(4): p. 579-89.
20. Hsiao, F.C., et al., *EBV LMP-2A employs a novel mechanism to transactivate the HERV-K18 superantigen through its ITAM*. Virology, 2009. **385**(1): p. 261-6.
21. Mameli, G., et al., *Activation of MSRV-type endogenous retroviruses during infectious mononucleosis and Epstein-Barr virus latency: the missing link with multiple sclerosis?* PLoS One, 2013. **8**(11): p. e78474.
22. Morandi, E., R.E. Tarlinton, and B. Gran, *Multiple Sclerosis between Genetics and Infections: Human Endogenous Retroviruses in Monocytes and Macrophages*. Front Immunol, 2015. **6**: p. 647.
23. Palacios, N., et al., *Smoking and increased risk of multiple sclerosis: parallel trends in the sex ratio reinforce the evidence*. Ann Epidemiol, 2011. **21**(7): p. 536-42.
24. Wingerchuk, D.M., *Smoking: effects on multiple sclerosis susceptibility and disease progression*. Ther Adv Neurol Disord, 2012. **5**(1): p. 13-22.
25. Willer, C.J., et al., *Twin concordance and sibling recurrence rates in multiple sclerosis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(22): p. 12877-82.
26. Nielsen, N.M., et al., *Familial risk of multiple sclerosis: a nationwide cohort study*. Am J Epidemiol, 2005. **162**(8): p. 774-8.
27. Compston, A. and A. Coles, *Multiple sclerosis*. Lancet, 2002. **359**(9313): p. 1221-31.
28. Kim, W. and N.A. Patsopoulos, *Genetics and functional genomics of multiple sclerosis*. Semin Immunopathol, 2022.
29. Compston, D.A., J.R. Batchelor, and W.I. McDonald, *B-lymphocyte alloantigens associated with multiple sclerosis*. Lancet, 1976. **2**(7998): p. 1261-5.

30. Olerup, O. and J. Hillert, *HLA class II-associated genetic susceptibility in multiple sclerosis: a critical evaluation*. Tissue Antigens, 1991. **38**(1): p. 1-15.
31. Hollenbach, J.A. and J.R. Oksenberg, *The immunogenetics of multiple sclerosis: A comprehensive review*. J Autoimmun, 2015. **64**: p. 13-25.
32. Marrosu, M.G., et al., *HLA-DQB1 genotype in Sardinian multiple sclerosis: evidence for a key role of DQB1 *0201 and *0302 alleles*. Neurology, 1992. **42**(4): p. 883-6.
33. Gale, C.R. and C.N. Martyn, *Migrant studies in multiple sclerosis*. Prog Neurobiol, 1995. **47**(4-5): p. 425-48.
34. Ahlgren, C., A. Oden, and J. Lycke, *A nationwide survey of the prevalence of multiple sclerosis in immigrant populations of Sweden*. Mult Scler, 2012. **18**(8): p. 1099-107.
35. Munk Nielsen, N., et al., *Multiple sclerosis among first- and second-generation immigrants in Denmark: a population-based cohort study*. Brain, 2019. **142**(6): p. 1587-1597.
36. Romanelli, R.J., et al., *Multiple sclerosis in a multi-ethnic population from Northern California: a retrospective analysis, 2010-2016*. BMC Neurol, 2020. **20**(1): p. 163.
37. Charcot and T. Oliver, *Sclerosis in Scattered Patches*. Edinb Med J, 1876. **22**(5): p. 414-421.
38. Brownell, B. and J.T. Hughes, *The distribution of plaques in the cerebrum in multiple sclerosis*. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 1962. **25**: p. 315-20.
39. Kidd, D., et al., *Cortical lesions in multiple sclerosis*. Brain, 1999. **122** (Pt 1): p. 17-26.
40. Cifelli, A., et al., *Thalamic neurodegeneration in multiple sclerosis*. Ann Neurol, 2002. **52**(5): p. 650-3.
41. Haider, L., et al., *Multiple sclerosis deep grey matter: the relation between demyelination, neurodegeneration, inflammation and iron*. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 2014. **85**(12): p. 1386-95.
42. Lucchinetti, C.F., et al., *Inflammatory cortical demyelination in early multiple sclerosis*. N Engl J Med, 2011. **365**(23): p. 2188-97.
43. Kutzelnigg, A., et al., *Widespread demyelination in the cerebellar cortex in multiple sclerosis*. Brain Pathol, 2007. **17**(1): p. 38-44.
44. Mahad, D.H., B.D. Trapp, and H. Lassmann, *Pathological mechanisms in progressive multiple sclerosis*. Lancet Neurol, 2015. **14**(2): p. 183-93.

45. Lassmann, H., *Multiple Sclerosis Pathology*. Cold Spring Harb Perspect Med, 2018. **8**(3).
46. Frischer, J.M., et al., *The relation between inflammation and neurodegeneration in multiple sclerosis brains*. Brain, 2009. **132**(Pt 5): p. 1175-89.
47. Haider, L., et al., *The topography of demyelination and neurodegeneration in the multiple sclerosis brain*. Brain, 2016. **139**(Pt 3): p. 807-15.
48. Esiri, M.M., *Multiple sclerosis: a quantitative and qualitative study of immunoglobulin-containing cells in the central nervous system*. Neuropathol Appl Neurobiol, 1980. **6**(1): p. 9-21.
49. Booss, J., et al., *Immunohistological analysis of T lymphocyte subsets in the central nervous system in chronic progressive multiple sclerosis*. J Neurol Sci, 1983. **62**(1-3): p. 219-32.
50. Hayashi, T., J.S. Burks, and S.L. Hauser, *Expression and cellular localization of major histocompatibility complex antigens in active multiple sclerosis lesions*. Ann N Y Acad Sci, 1988. **540**: p. 301-5.
51. Hayashi, T., et al., *Dual-label immunocytochemistry of the active multiple sclerosis lesion: major histocompatibility complex and activation antigens*. Ann Neurol, 1988. **24**(4): p. 523-31.
52. Franciotta, D., et al., *B cells and multiple sclerosis*. Lancet Neurol, 2008. **7**(9): p. 852-8.
53. Babbe, H., et al., *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, 2000. **192**(3): p. 393-404.
54. Skulina, C., et al., *Multiple sclerosis: brain-infiltrating CD8+ T cells persist as clonal expansions in the cerebrospinal fluid and blood*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(8): p. 2428-33.
55. Hohlfeld, R., et al., *The search for the target antigens of multiple sclerosis, part 1: autoreactive CD4+ T lymphocytes as pathogenic effectors and therapeutic targets*. Lancet Neurol, 2016. **15**(2): p. 198-209.
56. Hohlfeld, R., et al., *The search for the target antigens of multiple sclerosis, part 2: CD8+ T cells, B cells, and antibodies in the focus of reverse-translational research*. Lancet Neurol, 2016. **15**(3): p. 317-31.
57. Lassmann, H., W. Bruck, and C. Lucchinetti, *Heterogeneity of multiple sclerosis pathogenesis: implications for diagnosis and therapy*. Trends Mol Med, 2001. **7**(3): p. 115-21.

58. Vogel, D.Y., et al., *Macrophages in inflammatory multiple sclerosis lesions have an intermediate activation status*. J Neuroinflammation, 2013. **10**: p. 35.
59. Wekerle, H., *Immune pathogenesis of multiple sclerosis. Brain autoimmune reactivity and its control by neuronal function*. Mult Scler, 1998. **4**(3): p. 136-7.
60. Fischer, M.T., et al., *NADPH oxidase expression in active multiple sclerosis lesions in relation to oxidative tissue damage and mitochondrial injury*. Brain, 2012. **135**(Pt 3): p. 886-99.
61. Trapp, B.D., et al., *Axonal transection in the lesions of multiple sclerosis*. N Engl J Med, 1998. **338**(5): p. 278-85.
62. Frischer, J.M., et al., *Clinical and pathological insights into the dynamic nature of the white matter multiple sclerosis plaque*. Ann Neurol, 2015. **78**(5): p. 710-21.
63. Kutzelnigg, A., et al., *Cortical demyelination and diffuse white matter injury in multiple sclerosis*. Brain, 2005. **128**(Pt 11): p. 2705-12.
64. Kornek, B., et al., *Multiple sclerosis and chronic autoimmune encephalomyelitis: a comparative quantitative study of axonal injury in active, inactive, and remyelinated lesions*. Am J Pathol, 2000. **157**(1): p. 267-76.
65. Aharoni, R., R. Eilam, and R. Arnon, *Astrocytes in Multiple Sclerosis-Essential Constituents with Diverse Multifaceted Functions*. Int J Mol Sci, 2021. **22**(11).
66. Brinkmann, V., et al., *Fingolimod (FTY720): discovery and development of an oral drug to treat multiple sclerosis*. Nat Rev Drug Discov, 2010. **9**(11): p. 883-97.
67. Sofroniew, M.V., *Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation*. Trends Neurosci, 2009. **32**(12): p. 638-47.
68. Prineas, J.W., et al., *Multiple sclerosis. Pathology of recurrent lesions*. Brain, 1993. **116** (Pt 3): p. 681-93.
69. Chang, A., et al., *Premyelinating oligodendrocytes in chronic lesions of multiple sclerosis*. N Engl J Med, 2002. **346**(3): p. 165-73.
70. Tafti, D., M. Ehsan, and K.L. Xixis, *Multiple Sclerosis*, in StatPearls. 2022: Treasure Island (FL).
71. McDonald, W.I., et al., *Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the diagnosis of multiple sclerosis*. Ann Neurol, 2001. **50**(1): p. 121-7.
72. Thompson, A.J., et al., *Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria*. Lancet Neurol, 2018. **17**(2): p. 162-173.

73. Kurtzke, J.F., *Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS)*. Neurology, 1983. **33**(11): p. 1444-52.
74. Hagens, M.H.J., et al., *Three-Tesla MRI does not improve the diagnosis of multiple sclerosis: A multicenter study*. Neurology, 2018. **91**(3): p. e249-e257.
75. *Drugs for multiple sclerosis*. Med Lett Drugs Ther, 2021. **63**(1620): p. 42-48.
76. *Multiple Sclerosis Agents*, in *LiverTox: Clinical and Research Information on Drug-Induced Liver Injury*. 2012, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases: Bethesda (MD).
77. Lunemann, J.D., et al., *Immune reconstitution therapies: concepts for durable remission in multiple sclerosis*. Nat Rev Neurol, 2020. **16**(1): p. 56-62.
78. Derfuss, T., *Personalized medicine in multiple sclerosis: hope or reality?* BMC Med, 2012. **10**: p. 116.
79. Berger, J.R., *Classifying PML risk with disease modifying therapies*. Mult Scler Relat Disord, 2017. **12**: p. 59-63.
80. Fujita, T., et al., *Fungal metabolites. Part 11. A potent immunosuppressive activity found in Isaria sinclairii metabolite*. J Antibiot (Tokyo), 1994. **47**(2): p. 208-15.
81. Brinkmann, V., *Sphingosine 1-phosphate receptors in health and disease: mechanistic insights from gene deletion studies and reverse pharmacology*. Pharmacol Ther, 2007. **115**(1): p. 84-105.
82. Scott, L.J., *Fingolimod: a review of its use in the management of relapsing-remitting multiple sclerosis*. CNS Drugs, 2011. **25**(8): p. 673-98.
83. Allende, M.L. and R.L. Proia, *Sphingosine-1-phosphate receptors and the development of the vascular system*. Biochim Biophys Acta, 2002. **1582**(1-3): p. 222-7.
84. Mizugishi, K., et al., *Essential role for sphingosine kinases in neural and vascular development*. Mol Cell Biol, 2005. **25**(24): p. 11113-21.
85. Allende, M.L., et al., *Expression of the sphingosine 1-phosphate receptor, SIP1, on T-cells controls thymic emigration*. J Biol Chem, 2004. **279**(15): p. 15396-401.
86. Schwab, S.R., et al., *Lymphocyte sequestration through SIP lyase inhibition and disruption of SIP gradients*. Science, 2005. **309**(5741): p. 1735-9.
87. Choi, J.W., et al., *FTY720 (fingolimod) efficacy in an animal model of multiple sclerosis requires astrocyte sphingosine 1-phosphate receptor 1 (SIP1) modulation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(2): p. 751-6.

88. Coelho, R.P., et al., *The immunomodulator FTY720 has a direct cytoprotective effect in oligodendrocyte progenitors*. J Pharmacol Exp Ther, 2007. **323**(2): p. 626-35.
89. Mehling, M., et al., *FTY720 therapy exerts differential effects on T cell subsets in multiple sclerosis*. Neurology, 2008. **71**(16): p. 1261-7.
90. Miyazaki, Y., et al., *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, 2014. **151**(2): p. 127-35.
91. Quirant-Sanchez, B., et al., *Predicting therapeutic response to fingolimod treatment in multiple sclerosis patients*. CNS Neurosci Ther, 2018. **24**(12): p. 1175-1184.
92. Teniente-Serra, A., et al., *Baseline Differences in Minor Lymphocyte Subpopulations may Predict Response to Fingolimod in Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis Patients*. CNS Neurosci Ther, 2016. **22**(7): p. 584-92.
93. Kahan, B.D., et al., *Pharmacodynamics, pharmacokinetics, and safety of multiple doses of FTY720 in stable renal transplant patients: a multicenter, randomized, placebo-controlled, phase I study*. Transplantation, 2003. **76**(7): p. 1079-84.
94. Kovarik, J.M., et al., *Multiple-dose FTY720: tolerability, pharmacokinetics, and lymphocyte responses in healthy subjects*. J Clin Pharmacol, 2004. **44**(5): p. 532-7.
95. Cohen, J.A., et al., *Fingolimod versus intramuscular interferon in patient subgroups from TRANSFORMS*. J Neurol, 2013. **260**(8): p. 2023-32.
96. Calabresi, P.A., et al., *Safety and efficacy of fingolimod in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis (FREEDOMS II): a double-blind, randomised, placebo-controlled, phase 3 trial*. Lancet Neurol, 2014. **13**(6): p. 545-56.
97. Kappos, L., et al., *A placebo-controlled trial of oral fingolimod in relapsing multiple sclerosis*. N Engl J Med, 2010. **362**(5): p. 387-401.
98. Cohen, J.A., et al., *Oral fingolimod or intramuscular interferon for relapsing multiple sclerosis*. N Engl J Med, 2010. **362**(5): p. 402-15.
99. Berger, J.R., et al., *Progressive multifocal leukoencephalopathy after fingolimod treatment*. Neurology, 2018. **90**(20): p. e1815-e1821.
100. Alcover, A., B. Alarcon, and V. Di Bartolo, *Cell Biology of T Cell Receptor Expression and Regulation*. Annu Rev Immunol, 2018. **36**: p. 103-125.
101. Meuer, S.C., et al., *Evidence for the T3-associated 90K heterodimer as the T-cell antigen receptor*. Nature, 1983. **303**(5920): p. 808-10.

102. Blum, J.S., P.A. Wearsch, and P. Cresswell, *Pathways of antigen processing*. Annu Rev Immunol, 2013. **31**: p. 443-73.
103. Shores, E.W. and P.E. Love, *TCR zeta chain in T cell development and selection*. Curr Opin Immunol, 1997. **9**(3): p. 380-9.
104. Chien, Y., et al., *A third type of murine T-cell receptor gene*. Nature, 1984. **312**(5989): p. 31-5.
105. Hedrick, S.M., et al., *Isolation of cDNA clones encoding T cell-specific membrane-associated proteins*. Nature, 1984. **308**(5955): p. 149-53.
106. Hedrick, S.M., et al., *Sequence relationships between putative T-cell receptor polypeptides and immunoglobulins*. Nature, 1984. **308**(5955): p. 153-8.
107. Saito, H., et al., *Complete primary structure of a heterodimeric T-cell receptor deduced from cDNA sequences*. Nature, 1984. **309**(5971): p. 757-62.
108. Saito, H., et al., *A third rearranged and expressed gene in a clone of cytotoxic T lymphocytes*. Nature, 1984. **312**(5989): p. 36-40.
109. Royer, H.D., et al., *Genes encoding the Ti beta subunit of the antigen/MHC receptor undergo rearrangement during intrathymic ontogeny prior to surface T3-Ti expression*. Cell, 1984. **39**(2 Pt 1): p. 261-6.
110. Swain, S.L., K.K. McKinstry, and T.M. Strutt, *Expanding roles for CD4(+) T cells in immunity to viruses*. Nat Rev Immunol, 2012. **12**(2): p. 136-48.
111. Liechti, T. and M. Roederer, *OMIP-060: 30-Parameter Flow Cytometry Panel to Assess T Cell Effector Functions and Regulatory T Cells*. Cytometry A, 2019. **95**(11): p. 1129-1134.
112. Kaech, S.M. and E.J. Wherry, *Heterogeneity and cell-fate decisions in effector and memory CD8+ T cell differentiation during viral infection*. Immunity, 2007. **27**(3): p. 393-405.
113. Kaech, S.M., E.J. Wherry, and R. Ahmed, *Effector and memory T-cell differentiation: implications for vaccine development*. Nat Rev Immunol, 2002. **2**(4): p. 251-62.
114. Kaech, S.M., et al., *Molecular and functional profiling of memory CD8 T cell differentiation*. Cell, 2002. **111**(6): p. 837-51.
115. Sallusto, F., et al., *Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions*. Nature, 1999. **401**(6754): p. 708-12.
116. Geginat, J., A. Lanzavecchia, and F. Sallusto, *Proliferation and differentiation potential of human CD8+ memory T-cell subsets in response to antigen or homeostatic cytokines*. Blood, 2003. **101**(11): p. 4260-6.

117. Gunn, M.D., et al., *A chemokine expressed in lymphoid high endothelial venules promotes the adhesion and chemotaxis of naive T lymphocytes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(1): p. 258-63.
118. Campbell, J.J., et al., *6-C-kine (SLC), a lymphocyte adhesion-triggering chemokine expressed by high endothelium, is an agonist for the MIP-3beta receptor CCR7*. J Cell Biol, 1998. **141**(4): p. 1053-9.
119. Sallusto, F., J. Geginat, and A. Lanzavecchia, *Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance*. Annu Rev Immunol, 2004. **22**: p. 745-63.
120. Pham, T.H., et al., *SIP1 receptor signaling overrides retention mediated by G alpha i-coupled receptors to promote T cell egress*. Immunity, 2008. **28**(1): p. 122-33.
121. Mehling, M., L. Kappos, and T. Derfuss, *Fingolimod for multiple sclerosis: mechanism of action, clinical outcomes, and future directions*. Curr Neurol Neurosci Rep, 2011. **11**(5): p. 492-7.
122. Hawke, S., et al., *Selective modulation of trans-endothelial migration of lymphocyte subsets in multiple sclerosis patients under fingolimod treatment*. J Neuroimmunol, 2020. **349**: p. 577392.
123. Roch, L., et al., *High-Resolution Expression Profiling of Peripheral Blood CD8(+) Cells in Patients with Multiple Sclerosis Displays Fingolimod-Induced Immune Cell Redistribution*. Mol Neurobiol, 2017. **54**(7): p. 5511-5525.
124. van Heijst, J.W., et al., *Quantitative assessment of T cell repertoire recovery after hematopoietic stem cell transplantation*. Nat Med, 2013. **19**(3): p. 372-7.
125. Vollmers, C., et al., *Genetic measurement of memory B-cell recall using antibody repertoire sequencing*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(33): p. 13463-8.
126. Scheffler, A., *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*, in Medizinische Fakultät. 2020, Heinrich-Heine-Universität: Düsseldorf.
127. Schüttfort, P.H., *Effekt von Fingolimod (FTY720/Gilenya®) auf das periphere Immunrepertoire von CD4+ T-Zellen und deren CCR7+ und CCR7-Subpopulationen bei Multiple Sklerose Patienten*, in Medizinische Fakultät. 2022, Heinrich-Heine-Universität: Düsseldorf.
128. Bolotin, D.A., et al., *MiXCR: software for comprehensive adaptive immunity profiling*. Nat Methods, 2015. **12**(5): p. 380-1.

129. Shugay, M., et al., *VDJtools: Unifying Post-analysis of T Cell Receptor Repertoires*. PLoS Comput Biol, 2015. **11**(11): p. e1004503.
130. Bagaev, D.V., et al., *VDJdb in 2019: database extension, new analysis infrastructure and a T-cell receptor motif compendium*. Nucleic Acids Res, 2020. **48**(D1): p. D1057-D1062.
131. Song, Z.Y., et al., *Peripheral blood T cell dynamics predict relapse in multiple sclerosis patients on fingolimod*. PLoS One, 2014. **10**(4): p. e0124923.
132. Rudnicka, J., et al., *Influence of fingolimod on basic lymphocyte subsets frequencies in the peripheral blood of multiple sclerosis patients - preliminary study*. Cent Eur J Immunol, 2015. **40**(3): p. 354-9.
133. Hjorth, M., N. Dandu, and J. Mellergard, *Treatment effects of fingolimod in multiple sclerosis: Selective changes in peripheral blood lymphocyte subsets*. PLoS One, 2020. **15**(2): p. e0228380.
134. Moreno-Torres, I., et al., *Immunophenotype and Transcriptome Profile of Patients With Multiple Sclerosis Treated With Fingolimod: Setting Up a Model for Prediction of Response in a 2-Year Translational Study*. Front Immunol, 2018. **9**: p. 1693.
135. Vallittu, A.M., M. Saraste, and L. Airas, *CCR7 expression on peripheral blood lymphocytes is up-regulated following treatment of multiple sclerosis with interferon-beta*. Neurol Res, 2007. **29**(8): p. 763-6.
136. Krakauer, M., et al., *Dynamic T-lymphocyte chemokine receptor expression induced by interferon-beta therapy in multiple sclerosis*. Scand J Immunol, 2006. **64**(2): p. 155-63.
137. Wulff, H., et al., *The voltage-gated Kv1.3 K(+) channel in effector memory T cells as new target for MS*. J Clin Invest, 2003. **111**(11): p. 1703-13.
138. Cahalan, M.D. and K.G. Chandy, *The functional network of ion channels in T lymphocytes*. Immunol Rev, 2009. **231**(1): p. 59-87.
139. Markakis, I., et al., *Kv1.3 Channel Up-Regulation in Peripheral Blood T Lymphocytes of Patients With Multiple Sclerosis*. Front Pharmacol, 2021. **12**: p. 714841.
140. Beeton, C., et al., *Selective blockade of T lymphocyte K(+) channels ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis, a model for multiple sclerosis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(24): p. 13942-7.
141. Beeton, C., et al., *Kv1.3 channels are a therapeutic target for T cell-mediated autoimmune diseases*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(46): p. 17414-9.

142. Gocke, A.R., et al., *Kv1.3 deletion biases T cells toward an immunoregulatory phenotype and renders mice resistant to autoimmune encephalomyelitis*. J Immunol, 2012. **188**(12): p. 5877-86.
143. Li, Z., et al., *Selective inhibition of CCR7(-) effector memory T cell activation by a novel peptide targeting Kv1.3 channel in a rat experimental autoimmune encephalomyelitis model*. J Biol Chem, 2012. **287**(35): p. 29479-94.
144. Ma, X., et al., *Analysis of error profiles in deep next-generation sequencing data*. Genome Biol, 2019. **20**(1): p. 50.
145. Nguyen, P., et al., *Identification of errors introduced during high throughput sequencing of the T cell receptor repertoire*. BMC Genomics, 2011. **12**: p. 106.
146. Warren, R.L., et al., *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, 2011. **21**(5): p. 790-7.
147. Bolotin, D.A., et al., *Next generation sequencing for TCR repertoire profiling: platform-specific features and correction algorithms*. Eur J Immunol, 2012. **42**(11): p. 3073-83.
148. Greiff, V., et al., *A bioinformatic framework for immune repertoire diversity profiling enables detection of immunological status*. Genome Med, 2015. **7**(1): p. 49.
149. Alves Sousa, A.P., et al., *Comprehensive Analysis of TCR-beta Repertoire in Patients with Neurological Immune-mediated Disorders*. Sci Rep, 2019. **9**(1): p. 344.
150. Oksenberg, J.R., et al., *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, 1993. **362**(6415): p. 68-70.
151. Fozza, C., et al., *TCRBV20S1 polymorphism does not influence the susceptibility to type 1 diabetes and multiple sclerosis in the Sardinian population*. Immunogenetics, 2012. **64**(2): p. 153-4.
152. Qi, Q., et al., *Diversity and clonal selection in the human T-cell repertoire*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014. **111**(36): p. 13139-44.
153. Britanova, O.V., et al., *Age-related decrease in TCR repertoire diversity measured with deep and normalized sequence profiling*. J Immunol, 2014. **192**(6): p. 2689-98.
154. Li, H.M., et al., *TCRβ repertoire of CD4+ and CD8+ T cells is distinct in richness, distribution, and CDR3 amino acid composition*. J Leukoc Biol, 2016. **99**(3): p. 505-13.

155. Miconnet, I., et al., *Large TCR diversity of virus-specific CD8 T cells provides the mechanistic basis for massive TCR renewal after antigen exposure.* J Immunol, 2011. **186**(12): p. 7039-49.
156. Hayashi, F., et al., *A new clustering method identifies multiple sclerosis-specific T-cell receptors.* Ann Clin Transl Neurol, 2021. **8**(1): p. 163-176.
157. Oakes, T., et al., *Quantitative Characterization of the T Cell Receptor Repertoire of Naïve and Memory Subsets Using an Integrated Experimental and Computational Pipeline Which Is Robust, Economical, and Versatile.* Front Immunol, 2017. **8**: p. 1267.
158. Matsumoto, Y., et al., *Complementarity-determining region 3 spectratyping analysis of the TCR repertoire in multiple sclerosis.* J Immunol, 2003. **170**(9): p. 4846-53.
159. Salou, M., et al., *Expanded CD8 T-cell sharing between periphery and CNS in multiple sclerosis.* Ann Clin Transl Neurol, 2015. **2**(6): p. 609-22.
160. Planas, R., et al., *Detailed Characterization of T Cell Receptor Repertoires in Multiple Sclerosis Brain Lesions.* Front Immunol, 2018. **9**: p. 509.
161. Amoriello, R., et al., *The TCR Repertoire Reconstitution in Multiple Sclerosis: Comparing One-Shot and Continuous Immunosuppressive Therapies.* Front Immunol, 2020. **11**: p. 559.
162. Quigley, M.F., et al., *Convergent recombination shapes the clonotypic landscape of the naive T-cell repertoire.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(45): p. 19414-9.
163. Venturi, V., et al., *TCR beta-chain sharing in human CD8+ T cell responses to cytomegalovirus and EBV.* J Immunol, 2008. **181**(11): p. 7853-62.
164. Venturi, V., et al., *Sharing of T cell receptors in antigen-specific responses is driven by convergent recombination.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(49): p. 18691-6.
165. Venturi, V., et al., *A mechanism for TCR sharing between T cell subsets and individuals revealed by pyrosequencing.* J Immunol, 2011. **186**(7): p. 4285-94.
166. Robins, H.S., et al., *Overlap and effective size of the human CD8+ T cell receptor repertoire.* Sci Transl Med, 2010. **2**(47): p. 47ra64.
167. Elhanati, Y., et al., *Quantifying selection in immune receptor repertoires.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2014. **111**(27): p. 9875-80.
168. Elhanati, Y., et al., *Predicting the spectrum of TCR repertoire sharing with a data-driven model of recombination.* Immunol Rev, 2018. **284**(1): p. 167-179.

169. Amoriello, R., et al., *TCR repertoire diversity in Multiple Sclerosis: High-dimensional bioinformatics analysis of sequences from brain, cerebrospinal fluid and peripheral blood*. EBioMedicine, 2021. **68**: p. 103429.
170. Bjornevik, K., et al., *Longitudinal analysis reveals high prevalence of Epstein-Barr virus associated with multiple sclerosis*. Science, 2022. **375**(6578): p. 296-301.
171. Lanz, T.V., et al., *Clonally expanded B cells in multiple sclerosis bind EBV EBNA1 and GlialCAM*. Nature, 2022. **603**(7900): p. 321-327.
172. Lunemann, J.D., et al., *Increased frequency and broadened specificity of latent EBV nuclear antigen-1-specific T cells in multiple sclerosis*. Brain, 2006. **129**(Pt 6): p. 1493-506.
173. Lunemann, J.D., et al., *EBNA1-specific T cells from patients with multiple sclerosis cross react with myelin antigens and co-produce IFN-gamma and IL-2*. J Exp Med, 2008. **205**(8): p. 1763-73.
174. Schneider-Hohendorf, T., et al., *Broader Epstein-Barr virus-specific T cell receptor repertoire in patients with multiple sclerosis*. J Exp Med, 2022. **219**(11).
175. Gold, J., et al., *HIV and lower risk of multiple sclerosis: beginning to unravel a mystery using a record-linked database study*. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 2015. **86**(1): p. 9-12.
176. Gold, J., et al., *A phase II baseline versus treatment study to determine the efficacy of raltegravir (Isentress) in preventing progression of relapsing remitting multiple sclerosis as determined by gadolinium-enhanced MRI: The INSPIRE study*. Mult Scler Relat Disord, 2018. **24**: p. 123-128.
177. Perron, H., et al., *Antibody to reverse transcriptase of human retroviruses in multiple sclerosis*. Acta Neurol Scand, 1991. **84**(6): p. 507-13.
178. Jones, R.B., et al., *HERV-K-specific T cells eliminate diverse HIV-1/2 and SIV primary isolates*. J Clin Invest, 2012. **122**(12): p. 4473-89.
179. O'Carroll, I.P., et al., *Structural Mimicry Drives HIV-1 Rev-Mediated HERV-K Expression*. J Mol Biol, 2020. **432**(24): p. 166711.
180. Dembny, P., et al., *Human endogenous retrovirus HERV-K(HML-2) RNA causes neurodegeneration through Toll-like receptors*. JCI Insight, 2020. **5**(7).
181. Johansen, J.N., et al., *Intrathecal BCR transcriptome in multiple sclerosis versus other neuroinflammation: Equally diverse and compartmentalized, but more mutated, biased and overlapping with the proteome*. Clin Immunol, 2015. **160**(2): p. 211-25.

182. von Budingen, H.C., et al., *B cell exchange across the blood-brain barrier in multiple sclerosis*. J Clin Invest, 2012. **122**(12): p. 4533-43.
183. Carlson, C.S., et al., *Using synthetic templates to design an unbiased multiplex PCR assay*. Nat Commun, 2013. **4**: p. 2680.
184. Paillard, F., et al., *Lymphokine mRNA and T cell multireceptor mRNA of the Ig super gene family are reciprocally modulated during human T cell activation*. Eur J Immunol, 1988. **18**(10): p. 1643-6.
185. Benichou, J., et al., *Rep-Seq: uncovering the immunological repertoire through next-generation sequencing*. Immunology, 2012. **135**(3): p. 183-91.
186. Lossius, A., et al., *High-throughput sequencing of immune repertoires in multiple sclerosis*. Ann Clin Transl Neurol, 2016. **3**(4): p. 295-306.
187. Kivioja, T., et al., *Counting absolute numbers of molecules using unique molecular identifiers*. Nat Methods, 2011. **9**(1): p. 72-4.
188. Brodin, J., et al., *Challenges with using primer IDs to improve accuracy of next generation sequencing*. PLoS One, 2015. **10**(3): p. e0119123.

Danksagung

Ich danke der gesamten Arbeitsgruppe um Universitätsprofessor Dr. med. Norbert Goebels, insbesondere gilt mein Dank Sumanta Barman, Armin Scheffler und Pia Schüttfort für eine gute Zusammenarbeit.

Ein besonderer Dank gilt meinem Chefarzt der Neurologischen Klinik der Universitätsklinik Düsseldorf, Herrn Universitätsprofessor Dr. med. Dr. rer. nat. Sven Meuth, ohne den die Vollendung dieser Dissertation niemals möglich gewesen wäre.

Abschließend danke ich meiner Familie, allen voran meiner Großmutter Christa Coordt für Herz & Seele, meinem Bruder Jonas für Stunden voller Format und dir: Carsten. Du bist mein Fels in der Brandung.