

Aus der Klinik für Neurologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf,
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Dr. h. c. Sven G. Meuth

**Einfluss der Anti-CD20-Antikörpertherapie auf die Immunzellodynamik bei schubförmig
remittierender Multipler Sklerose**

Dissertation

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

vorgelegt von

Alice Grizzel Willison

2025

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

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. Dr. Dr. med. Sven Meuth

Zweitgutachter: Prof. Dr. Philipp Lang

Dies ist denen gewidmet, die sich nicht von Schwierigkeiten definieren lassen, sondern sich selbst neu definieren.

Zusammenfassung: Deutsch

Multiple Sklerose (MS) ist eine immunvermittelte entzündliche Erkrankung des zentralen Nervensystems mit einem breiten Spektrum an Krankheitsverläufen. Die MS ist eine häufige Erkrankung im jungen Erwachsenenalter, die mit einer relevanten Behinderung einhergehen kann. Die häufigste Verlaufsform ist die schubförmig-remittierende MS (RRMS), die durch Phasen eines akuten Symptombeginns (Schub) und Intervalle einer teilweisen oder vollständigen Erholung (Remission) gekennzeichnet ist. Erkenntnisse aus Tiermodellen – insbesondere der murinen experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis – haben dazu beigetragen, dass die MS lange Zeit als T-Zell-vermittelte Erkrankung angesehen wurde. Der innovative Einsatz von B-Zell-depletierenden Therapien, welche durch Professor Stephen Hauser bei Patientinnen und Patienten mit RRMS eingeführt wurden, veränderte jedoch unser Verständnis der Krankheitsentstehung grundlegend. Die monoklonalen Antikörper Ocrelizumab (OCR) und Ofatumumab (OFA), welche gegen das auf nahezu allen B-Zellen vorhandene Cluster of Differentiation 20 (CD20) gerichtet sind, verdeutlichten durch eine relevante Reduktion der Schubraten bei RRMS-Patienten in klinischen Studien die Relevanz von B-Zellen im Krankheitsverlauf. Es bleibt unklar, wie genau die CD20-Depletion und die anschließende Rekonstitution des Immunsystems zum therapeutischen Effekt von OCR und OFA beitragen. Zudem könnte das Verständnis darüber, wie lange diese Veränderungen nach einer Behandlung mit OCR oder OFA anhalten, helfen, Therapieansätze weiter zu verbessern.

Diese Dissertation stellt eine Zwischenanalyse aus einer nicht-invasiven, prospektiven, Beobachtungsstudie (long-term reconstitution following **B-cell depletion in multiple sclerosis (REBELLION-MS)**) dar. Das Ziel der Studie ist es, eine detaillierte Charakterisierung der peripheren Immunzellpopulationen von RRMS-Patienten, die mit OCR und OFA behandelt werden, durchzuführen. Hierzu wurden die B-Zellen, T-Zellen, natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) und natürlichen Killer-T-Zellen (NKT-Zellen) sowie ihre Subpopulationen vor Beginn der Therapie, nach einem Monat und nach zwölf Monaten unter Therapie mittels multidimensionaler Durchflusszytometrie analysiert. Die Daten wurden sowohl mit traditionellen Gating-Strategien als auch mit unsupervidierten Computer-basierten Analysen ausgewertet. Parallel dazu wurden verschiedene klinische Parameter wie die Expanded Disability Status Scale (EDSS) und die jährliche Schubrate longitudinal erfasst.

Die Therapie mit OCR und OFA führte zu einer signifikanten Reduktion der peripheren CD20⁺ B-Zellen und deren Subpopulationen. Darüber hinaus zeigte sich eine Zunahme von CD5⁺CD19⁺CD20⁻ B-Zellen, insbesondere bei OCR-behandelten Patienten nach zwölf Monaten. Die Korrelationsanalysen deuteten auf einen regulatorischen Effekt der CD5-exprimierenden B-Zellen hin. Des Weiteren konnte eine vermehrte Expression von Erschöpfungsmarkern (CTLA-4, PD-1, TIGIT, TIM-3) auf T-Zellen, B-Zellen, NK-Zellen und NKT-Zellen festgestellt werden. Die Korrelation mit den klinischen Parametern verdeutlichte die pathophysiologische Relevanz dieser Veränderungen. Zudem zeigte sich eine prozentuale Zunahme von regulatorischen T-Zellen (T_{REG}S), insbesondere bei OCR-behandelten Patienten und eine Reduktion von doppelt-negativen (CD4⁻CD8⁻) T-Zellen (DN-T-Zellen), welche durch eine höhere CD20-Expression auf DN-T-Zellen als auf CD4- und/oder CD8-positiven T-Zellen bedingt sein könnte. Der prozentuale Anteil der DN-T-Zellen korrelierte positiv mit der Schubfrequenz. Die TIGIT-Expression auf CD8⁺- und CD4⁺CD8⁺-T-Zellen korrelierte positiv mit der Zeit seit Krankheitsmanifestation. Die TIGIT-Expression auf T-, B-, NK- und NKT-Zellen korrelierte in behandlungsnaiven OCR- und OFA-Patienten negativ mit dem EDSS-Wert. Die CTLA-4-Expression auf NKT-Zellen zeigte eine

negative Korrelation mit dem EDSS. PD-1- und TIM-3-Expressionen auf B- und NKT-Zellen korrelierten interessanterweise positiv mit dem EDSS.

Unsere Zwischenergebnisse stützen die Hypothese, dass Erschöpfungs-/Aktivierungsmarker, insbesondere TIGIT, für die Pathogenese der MS relevant sein könnten. Wir konnten einen potenziell interessanten Anstieg der CD5-Expression auf B-Zellen nachweisen, welcher möglicherweise regulatorische Effekte vermittelt. Schließlich identifizierten wir eine Population doppelt-negativer T-Zellen (insbesondere KLRG1⁺HLADR⁺), die eine Assoziation mit klinischer Krankheitsaktivität zeigte und durch die CD20-Depletion reduziert wurde. Auch wenn diese Daten in einer vergleichsweise kleinen Patientenkohorte erhoben wurden und einer Validierung in größeren Kohorten bedürfen, sind veröffentlichte Daten zu diesen Aspekten der MS-Pathogenese in der Literatur bislang nicht umfassend und diese Ergebnisse liefern somit neue Hinweise auf eine potenzielle Rolle dieser bisher weniger gut charakterisierten Zellpopulationen bei der MS.

Zusammenfassung: Englisch

Multiple sclerosis (MS) is an immune-mediated inflammatory disorder of the central nervous system with a broad spectrum of severity and the potential to cause early-onset long-term disability in a cohort of predominantly young patients. The commonest form of disease is relapsing-remitting MS (RRMS), characterised by cycles of acute symptom onset (relapse) and intervals of partial or complete recovery (remission). For many years, animal models – namely the murine experimental autoimmune encephalomyelitis – had led us to understand MS as a T-cell-mediated disease. However, the innovative use of B-cell-depleting therapies pioneered by Professor Stephen Hauser in patients with RRMS transformed our perception of disease pathogenesis. The monoclonal antibodies ocrelizumab (OCR) and ofatumumab (OFA) against cluster of differentiation 20 (CD20), which is present on almost all B cells, proved the relevance of B cells in driving disease through dramatically reducing relapse rates of RRMS patients in clinical trials. It remains unclear exactly how CD20 depletion and subsequent immune system reconstitution contributes to amelioration of disease. Additionally, understanding how long these changes persist after treatment with OCR or OFA may aid in our refining treatment approaches.

This dissertation presents an interim analysis from a non-invasive, prospective, observational study (long-term reconstitution following **B-cell depletion** in **multiple sclerosis** (REBELLION-MS)) designed to generate deep immune profiling data of RRMS patients treated with OCR and OFA. Immune profiling of B cells, T cells, natural killer (NK) cells, and natural killer T (NKT) cells was conducted at baseline, month 1, and month 12 of treatment using multidimensional flow cytometry. Data were analysed using both traditional gating strategies and unsupervised computational methods. In parallel, different clinical parameters, such as the Expanded Disability Status Scale (EDSS) and annual relapse rate, were longitudinally assessed.

B cell depletion by OCR and OFA resulted in significant reductions in CD20⁺ B cells and subsets, alongside an expansion of CD5⁺CD19⁺CD20⁻ B cells, particularly in OCR-treated patients at 12 months, while also elevating exhaustion markers (CTLA-4, PD-1, TIGIT, TIM-3) across T cells, B cells, NK cells, and NKT cells. Additionally, the percentage of regulatory T cells (T_{REGS}) increased, especially in OCR-treated patients, and reductions in double-negative (CD4⁻CD8⁻) T cells (DN T cells) were observed with these DN T cells having higher CD20 expression compared to CD4 or CD8 positive T cells. TIGIT expression on CD8⁺ and CD4⁺CD8⁺ T cells positively correlated with time since disease onset. TIGIT expression on T, B, NK, and NKT cells negatively correlated with EDSS in treatment-naïve OCR and OFA patients. CTLA-4 expression on NKT cells was negatively correlated with EDSS. Interestingly, PD-1 and TIM-3 expression on B and NKT cells showed positive correlations with EDSS.

Our interim data add weight to the argumentation that the exhaustion/activation markers, notably TIGIT, may be relevant to the pathogenesis of MS. We identify a potentially interesting increase in the expression of CD5⁺ on B cells. Finally, we identified a population of double-negative T cells (KLRG1⁺HLADR⁺, in particular) that is associated with MS activity and decreased with CD20 depletion. While we appreciate the preliminary nature of these data, published data detailing these aspects of MS pathogenesis are not extensive in the literature and these data provide new evidence for the potential role of these in MS less well characterised cell populations.

Abkürzungsverzeichnis

OFA – Ofatumumab

OCR – Ocrelizumab

EBV – Epstein Barr Virus

ZNS – zentrales Nervensystem

CSF – Liquor cerebrospinalis (engl. cerebrospinal fluid)

m0 – Ausgangspunkt (vor Behandlungsbeginn): Monat 0

m1 – Monat 1 der Behandlung

m12 – Monat 12 der Behandlung

TREG – regulatorische T-Zelle

NK cell – natürliche Killerzelle

NK T cell – natürliche Killer-T-Zelle

ADCC – antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität (antibody-dependent cellular cytotoxicity)

CDC – komplementabhängige Zytotoxizität (complement-dependent cytotoxicity)

PBMC – periphere mononukleäre Blutzellen (peripheral blood mononuclear cells)

mFC – multidimensionale Durchflusszytometrie (multidimensional flow cytometry)

RRMS – schubförmig-remittierende Multiple Sklerose

SPMS – sekundär progrediente Multiple Sklerose

PPMS – primär progrediente Multiple Sklerose

PRMS – primary relapsing Multiple Sklerose

EBV – Epstein Barr Virus

DMT – disease modifying therapy

JCV – John Cunningham Virus

eLF – ektopische lymphoide Follikel

EAE – experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis

EBNA1 - EBV-Transkriptionsfaktor EBV-Kernantigen 1

EB12 - EBV-induzierte G-Protein-gekoppelte Rezeptor-2

HHV-6A – Humanes Herpesvirus 6A

BHS – Bluthirnschranke

tnRRMS – therapienaive schubförmig-remittierende Multiple Sklerose

IgG – Immunglobulin G

HIV – Humanes Immundefizienz-Virus

SLE – Systemischer Lupus erythematoses

BCR – B-Zell-Rezeptor

NMOSD – Neuromyelitis-optica-Spektrum-Erkrankung

FACS – Fluorescence Activated Cell Sorting

IgM – Immunglobulin M

EDSS – Expanded Disability Status Scale

CTLA-4 – cytotoxic T-lymphocyte-associated Protein 4

TIM-3 – T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3

PD-1 – programmed cell death protein 1

TIGIT – anti-human T cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains

RIS – Radiologisch Isoliertes Syndrom

DN-T-Zellen – doppelt negative T-Zellen

MHC – Haupthistokompatibilitätskomplex

KLRG1 – killer cell lectin-like receptor subfamily G member 1

HLADR – human leukocyte antigen – DR isotype

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung (3 – 9)	
1.1. Die klinische Präsentation der Multiple Sklerose.....	3
1.2. Die Pathogenese der Multiple Sklerose	3
1.2.1. Die Rolle des humoralen Immunsystems.....	3
1.2.2. Ektopische lymphoide follikelartige Strukturen.....	4
1.2.3. Die Relevanz der Epstein-Barr-Virus-Infektion.....	5
1.3. Die Relevanz Immun-Checkpoint-Proteine bei Multiple Sklerose.....	7
1.4. Therapie der Multiple Sklerose.....	7
1.4.1. Krankheitsmodifizierende Therapien.....	7
1.4.2. Therapien der Kategorie 1	7
1.4.3. Therapien der Kategorie 2.....	8
1.4.4. Therapien der Kategorie 3.....	8
1.5. Ethikvotum.....	10
1.6. Ziele der Arbeit	11
2. Effects of Anti-CD20 Antibody Therapy on Immune Cell Dynamics in Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis. Willison, A. G., Hagler, R., Weise, M., Elben, S., Huntemann, N., Masannek, L., Pfeuffer, S., Lichtenberg, S., Golombeck, K. S., Preuth, L.-M., Rolfes, L., Öztürk, M., Ruck, T., Melzer, N., Korsen, M., Hauser, S. L., Hartung, H.-P., Lang, P. A., Pawlitzki, M., Räuber, S., Meuth, S. G., Cells, 14(7):552, 2025 (10).....	12
3. Erweiterte Diskussion (33 – 41)	
3.1. Die Relevanz von CD5 ⁺ -B-Zellen bei Multipler Sklerose.....	33
3.2. CTLA-4, TIGIT, TIM-3, und PD-1 Expression in MS.....	35
3.3. Regulatorische T-Zellen und doppelt negative T-Zell-Subpopulationen.....	39
3.4. Schlussfolgerungen.....	40
4. Literatur- und Quellenverzeichnis (42 – 45)	
5. Anhang (46 – 56)	
5.1. Abbildung Supplementary 1.....	46
5.2. Abbildung Supplementary 2.....	47
5.3. Abbildung Supplementary 3.....	48
5.4. Abbildung Supplementary 4.....	49
5.5. Abbildung Supplementary 5.....	50

5.6. Tabelle Supplementary 1	51
5.7. Tabelle Supplementary 2	52

1. Einleitung

1.1. Die klinische Präsentation der Multiple Sklerose

Multiple Sklerose (MS) ist eine chronische entzündliche Erkrankung des zentralen Nervensystems (ZNS). Die charakteristischen Merkmale der MS sind die autoimmun gesteuerte Destruktion der Myelinscheide der Nervenzellaxonen des Gehirns, Sehnervs und Rückenmarks sowie reaktive Gliose und Neurodegeneration [1]. Das klinische Bild der MS kann in erster Linie aus Episoden neurologischer Symptome („Schübe“) bestehen, häufig zunächst in Form einer Optikusneuritis, die sich mit oder ohne eine entzündungshemmende Behandlung bessern und über die Jahre hinweg unabhängig von diesen Episoden zu einer langsamen Zunahme der Behinderung führen. Dies wird als schubförmig-remittierende MS (RRMS) bezeichnet. Das andere klinische Bild ist das einer fortschreitenden, stetigen Zunahme neurologischer Symptome, die klassischerweise weniger gut auf eine Behandlung ansprechen und sich nicht bessern, sondern kontinuierlich verschlechtern. Dies wird als primär progrediente MS bezeichnet (PPMS). Bei vielen Patient:innen mit zunächst RRMS geht die Erkrankung nach einigen Jahren in eine sekundär progrediente MS (SPMS) über, die durch eine kontinuierliche Zunahme neurologischer Behinderung mit oder ohne weitere Schubaktivität gekennzeichnet ist. Es gibt auch seltenere Fälle von Patienten mit einer primär progredienten Erkrankung, die ebenfalls Schübe erleiden (PRMS).

In der Vergangenheit wurden MS-Patienten nach diesem Modell (RRMS, SPMS, PPMS, PRMS) klassifiziert. Moderne Klassifikationen betrachten MS jedoch zunehmend als ein Kontinuum von Schüben und Progression. Die Symptome der MS variieren je nach Lage und Schweregrad der Läsionen im Zentralnervensystem und können aufgrund ihres scheinbar zufälligen Auftretens sehr unterschiedlich sein und von sensorischen oder motorischen Ausfällen über Blasen- und Darmprobleme bis hin zu Müdigkeit, Konzentrationsschwierigkeiten und Vergesslichkeit reichen. Die Prävalenz der MS ist in Nordamerika, Westeuropa und Australasien am höchsten und in den Ländern um den Äquator am niedrigsten [1]. Bei RRMS sind Frauen fast dreimal häufiger betroffen als Männer, und das durchschnittliche Erkrankungsalter liegt bei etwa 30 Jahren, während bei PPMS die Erkrankungsrate von Männern und Frauen ähnlich sind und das durchschnittliche Erkrankungsalter bei etwa 40 Jahren liegt [1].

1.2. Die Pathogenese der Multiple Sklerose

1.2.1. Die Rolle des humoralen Immunsystems

Die Pathogenese der MS ist komplex und multifaktoriell. Zahlreiche prädisponierende Faktoren tragen zur Krankheitsentstehung bei, wobei sowohl genetische Dispositionen als auch umweltbedingte Einflussfaktoren eine Rolle spielen [2, 3]. Lange Zeit wurde die MS als eine primär T-Zell-vermittelte Erkrankung angesehen. Diese Ansicht basierte im Wesentlichen auf Daten aus tierexperimentellen MS-Modellen wie der murinen experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE). Ein Paradigmenwechsel wurde durch den klinischen Einsatz der B-Zell-depletierenden Therapien (nämlich der monoklonalen Antikörper gegen CD20: Ocrelizumab und Ofatumumab) ausgelöst. Darüber hinaus wird die Rolle von Myelin-reaktiven Antikörpern seit vielen Jahren intensiv diskutiert, da sie sowohl bei gesunden Menschen als auch bei Erkrankungen im Zusammenhang mit MS, wie beispielsweise der Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein-Antikörper-assoziierten Erkrankung und der Neuromyelitis-optica-Spektrum-Erkrankung, gefunden werden können.

Der Nachweis Myelin-reaktiver Antikörper ist aufgrund der hydrophoben Eigenschaften vieler Myelinantigene technisch schwierig, und bislang konnte ihre pathogenetische Relevanz in der MS nicht eindeutig belegt werden [4]. Die intrathekale (oder ZNS-intrinsische) Produktion von oligoklonalen IgG und IgM wird klassischerweise bei Patienten mit MS festgestellt, und es lässt sich argumentieren, dass zumindest einige dieser intrathekalen Antikörper mit Antigenen im ZNS reagieren könnten, beispielsweise mit Myelin-Antigenen – dies muss jedoch noch bewiesen werden, und die Relevanz intrathekaler oligoklonaler Banden bleibt unklar. In Bezug auf den Ursprung dieser oligoklonalen Antikörper hat die jüngste Fokussierung auf die Hirngrenzen – Schädelknochenmark, Hirnhäute, lymphatisches System und Hirnparenchym [5] – und die hier regulierte lokale Immunnische eine Frage hinsichtlich einer lokalen Immunreaktion aufgeworfen. Es wurde jedoch nachgewiesen, dass die Hirnhäute ein eindeutiges Reservoir für die B-Zell-Entwicklung sind, gewährleistet die in situ negative Selektion ein lokal nicht selbstreaktives Immunrepertoire [6]. Alternativ lässt sich vermuten, dass tiefe zervikale oder vielleicht sogar lumbale Lymphknoten, die Antigene aus dem ZNS enthalten, die Quelle für periphere B-Zellen gegen diese ZNS-Antigene, einschließlich Myelin-bezogener Antigene, sein könnten, wobei hier möglicherweise eine Verbindung zu darmmikrobiom-assoziierten Myelin-spezifischen CD4⁺ T-Zellen besteht [7-9]. Somit ist es möglich, dass periphere B-Zellen in das ZNS gelangen und dort persistieren können – eventuell als ektopische Follikel [10].

1.2.2. Ektopische lymphoide follikelartige Strukturen

Dass ektopische lymphoide Follikel (eLF)-ähnliche Strukturen in den Leptomeningen von Patienten mit progressiver MS sowie bereits in frühen Stadien der RRMS auftreten, ist erst seit kurzem in seiner pathogenetischen Bedeutung besser verstanden. Ihr Vorhandensein korreliert mit der Schwere der Erkrankung, dem Erkrankungsalter, irreversiblen Behinderungen, der Mortalität sowie mit einer ausgeprägteren kortikalen Pathologie im angrenzenden Gewebe [10-12]. Häufig finden sich eLFs in den meningealen Sulci, seltener auch in den Meningen des Rückenmarks [10, 13]. Morphologisch ähneln eLFs den Keimzentren sekundärer lymphatischer Organe, in denen B-Zellen ihre Reifung durchlaufen [11, 13]. Sie weisen unterschiedliche Entwicklungsstadien auf und enthalten Ansammlungen proliferierender B-Zellen, T-Zellen, Plasmazellen und follikulärer dendritischer Zellen.

Eine detaillierte Analyse im TH17-Adoptivtransfer-EAE-Mausmodell durch Kolz et al. lieferte neue Einblicke in die Entstehung und Funktion dieser Strukturen [10]. Demnach können eLFs chronische Entzündungen direkt im ZNS aufrechterhalten oder verschärfen. Kolz et al. konnten zeigen, dass die in eLFs enthaltenen B-Zellen aktiviert sind, für Keimzentrumreaktionen bereitstehen und eine gesteigerte Fähigkeit zur Antigenpräsentation besitzen. Innerhalb der eLFs bilden T- und B-Zellen langlebige, antigenspezifische Kontakte. Dabei vermitteln die B-Zellen einen Reaktivierungsreiz für T-Zellen, der erforderlich ist, um ein proinflammatorisches Zytokinmilieu aufrechtzuerhalten. Darüber hinaus sind eLFs in der Lage, MOG-spezifische B-Zellen zu rekrutieren und damit sowohl das initiale Priming als auch die Reifung und Expansion autoreaktiver B-Zellen zu fördern [10]. Bei schweren Krankheitsverläufen könnten eLFs auch der Eindämmung überschießender Entzündungsreaktionen dienen. Dafür spricht die Beobachtung, dass sie follikuläre regulatorische T-Zellen und/oder regulatorische B-Zellen enthalten können, die entzündungshemmende Zytokine freisetzen [10].

1.2.3. Die Relevanz der Epstein-Barr-Virus-Infektion

Insgesamt hat sich das Verständnis der Rolle von B-Zellen in der Pathophysiologie der MS zunehmend verbessert, insbesondere in den letzten Jahren im Zusammenhang mit der Infektion von B-Zellen durch das Epstein-Barr-Virus (EBV). Einen wesentlichen Beitrag lieferte 2022 die Arbeit von Ascherio et al., die überzeugend darlegte, dass das Risiko, an MS zu erkranken, bei Personen ohne EBV-Infektion äußerst gering ist, während es nach einer Infektion mit EBV um mehr als das Dreißigfache ansteigt [14]. Die genetische Mutation in HLA-DRB1*1501 – die den deutlichsten Zusammenhang mit dem Risiko einer MS-Erkrankung aufweist – begünstigt eine EBV-Infektion [4, 15]. Eine prominente Hypothese besagt, dass EBV durch das zyklische Durchlaufen latenter und lytischer Infektionsphasen die MS-Aktivität und -Pathologie vorantreiben könnte [16]. Schneider-Hohendorf et al. konnten kürzlich eine neuartige, MS-spezifische EBV-B-Zell-Antwort identifizieren, die durch bestimmte DMTs modulierbar ist [17]. Diese Erkenntnisse sowie die Beobachtung, dass die meisten zugelassenen MS-Therapien vor allem gegen Gedächtnis-B-Zellen – dem Hauptreservoir für latentes EBV – gerichtet sind, stützen die sogenannte „driver hypothesis“: die Vorstellung, dass die EBV-Replikation zentral für dessen pathogenetische Rolle bei MS ist und eine überschießende anti-EBV-Immunantwort die Krankheitsaktivität fördert [16]. Darüber hinaus konnte die Dura mater als bislang unbekanntes Reservoir und als möglicher Ort der EBV-infizierte B Zellen sowohl im gesunden als auch im entzündlich veränderten ZNS identifiziert werden [18]. Immunzellen, die ins ZNS rekrutiert werden, sind teilweise nicht in der Lage, EBV-infizierte B-Zellen effektiv zu eliminieren [19, 20]. In der Folge kann EBV in eLF persistieren und reaktiviert werden, wie sie in den Meningen von MS-Patient:innen nachgewiesen wurden. Solche eLF stellen vermutlich „immunologisch privilegierte Nischen“ dar, die das Überleben des Virus begünstigen und vor dem Immunsystem schützen [19, 20].

Eine zweite interessante Hypothese zur Rolle des EBVs in der Pathogenese der MS ist die Induktion des kleinen Hitzeschockproteins α B-Kristallin in infizierte B Zellen [4, 21]. α B-Kristallin fungiert in EBV-infizierte Zellen als antiapoptotisches molekulares Chaperon, um der durch das Virus induzierten Apoptose entgegenzuwirken, wodurch sich α B-Kristallin in B Zellen akkumuliert. Infolgedessen löst die T-Zell-Präsentation eine starke zytotoxische Immunantwort durch CD4⁺- und CD8⁺-Zellen im Gedächtnis-T-Zell-Repertoire aus, nicht nur gegen das EBV-Antigen auf infizierten B-Zellen, sondern auch gegen α B-Kristallin [4]. Im Thymus, das Zentrum der T-Zell-Reifung, wo T-Zellen, die Selbst und Antigene erkennen können, entstehen, werden α B-Kristallin-Transkripte nicht exprimiert, sodass diese α B-Kristallin-reaktiven T-Zellen der negativen Selektion entgehen können. Dies führt zur Bildung eines α B-Kristallin-reaktiven Immunrepertoires [4]. Durch die Freisetzung von inflammatorischen Zytokinen können periphere Entzündungsereignisse wie Virusinfektionen die Blut-Hirn-Schranke (BHS) an bestimmten Stellen vorübergehend schwächen, wodurch die BHS undicht wird. Dies fördert den Transport von ZNS-reaktiven Antikörpern und B-Zellen in das ZNS. Dies führt zu Stress für die Oligodendrozyten und zur Expression von α B-Kristallin, was wiederum zur Aktivierung der Mikroglia führt. Zu den durch α B-Crystallin induzierten Mikroglia-Mediatoren gehören Chemokine wie CCL4 und CCL5, die wahrscheinlich maßgeblich an der Bildung der Mikroglia-Aggregate beteiligt sind, die präaktive MS-Läsionen bilden. Wenn die Konzentration des von Oligodendrozyten produzierten α B-Crystallins einen kritischen Wert überschreitet, kann es das Gedächtnis-T-Zell-Repertoire aktivieren, das Jahre zuvor durch eine EBV-Infektion aufgebaut wurde, was zur Freisetzung von IFN- γ führt. Aufgrund der Anhäufung von Zytokinen und Chemokinen, die unter diesen Bedingungen die BHS destabilisieren und die Leukozytenrekrutierung fördern, kommen weitere pathogene Faktoren ins Spiel, darunter IL-17,

das von einigen T-Zellen produziert wird [4]. Diese Produkte vermischen sich mit lokal produzierten Zytokinen sowie lokalen Antigenen, die alle die Persistenz von B-Zellen in lokalisierten Nischen innerhalb des ZNS und die Antikörperproduktion einschließlich der Entwicklung ektopischer Follikel fördern. Diese sich selbst erhaltende Entzündung spiegelt dann die Chronizität der MS wider [4]. Die Validierung dieser komplexen Hypothese bleibt offen, sie stellt jedoch einen zusammenhängenden Zeitstrahl kritischer Ereignisse in der MS-Literatur dar.

Weitere Theorien, die den Zusammenhang zwischen EBV und MS untersuchen, werden ebenfalls in der Literatur diskutiert. Erstens, dass die hochaffine molekulare Mimikry zwischen dem EBV-Transkriptionsfaktor EBV-Kernantigen 1 (EBNA1) und dem Protein Glialzell-Adhäsionsmolekül (GlialCAM) des Zentralnervensystems die Ursache für die zentrale Demyelinisierung ist [22]. Bei etwa 20 bis 25 % der MS-Patienten wurden kreuzreaktive EBV-EBNA1- und GlialCAM-Antikörper identifiziert, und die Co-Immunisierung von Mäusen mit diesem EBNA1-Epitop verschlimmert die autoimmune Demyelinisierung [22]. Zweitens die Pender-Hypothese, wonach EBV-infizierte autoreaktive B-Zellen sich im ZNS ansammeln, wo sie pathogene Antikörper produzieren und autoreaktiven T-Zellen, die andernfalls im ZNS durch Apoptose absterben würden, kostimulatorische Überlebenssignale senden [23]. Der Verlust der EBV-Kontrolle ist auf eine gestörte EBV-spezifische CD8⁺-T-Zell-Reaktion zurückzuführen, wobei Sonnenlicht und Vitamin D möglicherweise durch die Erhöhung der EBV-spezifischen zytotoxischen T-Zellen eine schützende Wirkung gegen MS haben [24-26]. Drittens, dass sowohl Humanes Herpesvirus 6A (HHV-6A) als auch EBV für die pathogenetischen Prozesse bei MS von grundlegender Bedeutung sein könnten, da eine Infektion mit neurotropem HHV-6A zur Transformation latenter EBV-infizierter B-Zellen im ZNS führt [24, 27]. Viertens die EBV-induzierte G-Protein-gekoppelte Rezeptor-2 (EBI2) Hypothese, wonach EBI2 die frühe ZNS-Migration von encephalitogenen CD4⁺-T-Zellen und die B-Zell-Migration innerhalb sekundärer lymphatischer Organe fördert [24, 28].

1.3. Die Relevanz Immun-Checkpoint-Proteine bei Multiple Sklerose

In der Onkologieforschung sind in den vergangenen Jahrzehnten eine Reihe inhibitorischer Immunrezeptoren als zentrale Regulatoren der Immunantwort identifiziert worden – darunter der Programmed cell death 1 receptor (PD-1), Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4 (CTLA-4), T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3 (TIM-3) sowie der T-Zell-Immunrezeptor mit Ig- und ITIM-Domänen (TIGIT). Diese sogenannten Immun-Checkpoints bilden Rezeptor-Ligand-Paare, die entweder hemmend oder stimulierend in immunologische Signalwege eingreifen [29]. Ihre Bindungspartner sind vielfältig und wirken im Zusammenspiel mit anderen Checkpoint-Proteinen stark immunsuppressiv. PD-1 interagiert mit den Liganden PD-L1 und PD-L2 [30]. Diese Bindungen hemmen die Proliferation und Aktivierung von T-Zellen, dämpfen die Zytokinproduktion, verändern den zellulären Stoffwechsel, schwächen die zytotoxische Funktion der T-Lymphozyten (CTLs) und können letztlich den programmierten Zelltod aktivierter T-Zellen auslösen [30]. CTLA-4 wiederum wird vor allem in aktivierten T-Zellen exprimiert und spielt eine Schlüsselrolle in der Regulation entzündlicher Prozesse [31]. Durch sein Zusammenspiel mit CD28 trägt es wesentlich zur Aufrechterhaltung des Gleichgewichts der T-Zell-Immunität bei – insbesondere nach Infektionen sowie beim Auftreten und Fortschreiten von Autoimmunerkrankungen [31].

Auch Tim-3 wirkt als Immun-Checkpoint-Inhibitor und fördert die Immuntoleranz, indem es entweder Apoptose in T-Zellen induziert oder die Aktivierung angeborener Immunzellen unterdrückt [32]. TIGIT wiederum trägt zur immunologischen Toleranz bei, indem es autoreaktive T-Zellen hemmt, tolerogene dendritische Zellen fördert und regulatorische T-Zellen

in ihrer Entstehung wie auch in ihrer Suppressionskapazität unterstützt [33]. Die Immun-Checkpoint-Therapie (ICT) macht sich diese Mechanismen zunutze: Sie wurde entwickelt, um inhibitorische Signale in der T-Zell-Aktivierung gezielt zu blockieren und so die anti-tumorale Immunantwort zu verstärken [29]. Gleichzeitig bleibt das Risiko immunologischer Nebenwirkungen nicht unumstritten. So finden sich widersprüchliche Hinweise darauf, dass ICT das Auftreten von MS-Schüben begünstigen könnte – ein Aspekt, der in 3. *Diskussion*, 3.2. *CTLA-4, TIGIT, TIM-3 und PD-1-Expression bei der MS* eingehender erörtert wird.

1.4. Therapie der Multiple Sklerose

1.4.1. Krankheitsmodifizierende Therapien

Die Behandlung der MS orientiert sich maßgeblich am Krankheitsverlauf. Da insbesondere die progressive Form bislang nur schwer therapierbar ist, wird zwischen Ansätzen für Patienten mit RRMS und solchen für primär progressive Verläufe unterschieden. Für die RRMS konnten in den vergangenen Jahren zahlreiche krankheitsmodifizierende Therapien (disease-modifying therapies, DMTs) entwickelt werden, die das therapeutische Spektrum erheblich erweitert haben. In Deutschland werden diese DMTs nach ihrer Wirksamkeit in drei Kategorien eingeteilt: Plattformtherapien (Kategorie 1), Kategorie 2-Therapien und hochwirksame Kategorie 3-Therapien. Trotz ihrer Unterschiede verfolgen alle dasselbe Ziel: den Krankheitsverlauf abzumildern, indem sie die Immunfunktion gezielt unterdrücken oder modulieren. Besonders wirksam sind sie in der schubförmigen Phase der Erkrankung, wo sie die Schubrate senken, die Entstehung neuer MRT-Läsionen begrenzen und die durch MS bedingte Behinderung stabilisieren oder zumindest hinauszögern können.

1.4.2. Therapien der Kategorie 1

Die Plattformtherapien reduzieren die Häufigkeit von MS-Schüben geringfügig und bestehen aus Glatirameracetat, Interferon beta, Teriflunomid, Dimethylfumarat und Diroximelfumarat [1]. Glatirameracetat ist das Acetatsalz einer Polypeptidmischung, die zufällig aus den vier Aminosäuren Glutamat, Lysin, Alanin und Tyrosin zusammengesetzt ist. Sein Wirkmechanismus beruht vermutlich darauf, das Gleichgewicht zwischen proinflammatorischen und regulatorischen Zytokinen zugunsten einer antiinflammatorischen Immunantwort zu verschieben [34]. Interferon beta ist ein Interferon der Klasse I, dessen Wirkmechanismus wahrscheinlich eine Immunmodulation durch Herunterregulierung der Expression von MHC-Molekülen auf Antigen-präsentierenden Zellen, Verringerung proinflammatorischer und Erhöhung antiinflammatorischer Zytokine, Hemmung der T-Zell-Proliferation und Blockierung des Transports von Entzündungszellen zum ZNS umfasst [35]. Teriflunomid hemmt die Dihydroorotat-Dehydrogenase, ein Enzym, das an der Pyrimidinsynthese beteiligt ist und hemmt die Proliferation von aktivierten Lymphozyten, von denen angenommen wird, dass sie autoreaktiv sind [36]. Dimethylfumarat und Diroximelfumarat wirken beide über denselben aktiven Metaboliten, Monomethylfumarat, und entfalten dadurch entzündungshemmende und zellschützende Effekte über Nuclear Factor (erythroid-derived 2)-like 2 (Nrf2)-abhängige und -unabhängige Signalwege [37, 38]. Plattformtherapien werden in der Regel Patienten mit einem milden Krankheitsverlauf verordnet. Dieser ist meist gekennzeichnet durch wenige entzündliche Läsionen im Gehirn und einen geringen Grad an Behinderung. Aufgrund ihres vergleichsweise günstigen Nebenwirkungsprofils können Plattformtherapien bei stabilem Krankheitsverlauf und

guter Verträglichkeit über viele Jahre hinweg kontinuierlich eingesetzt werden. Treten hingegen neue Läsionen auf oder sind zentrale Strukturen wie das Rückenmark betroffen – ein Befund, der mit einem erhöhten Risiko für einen schwereren Verlauf einhergeht –, erfordert dies in der Regel eine Eskalation der Behandlung hin zu einer Kategorie-2- oder Kategorie-3-Therapie.

1.4.3. Therapien der Kategorie 2

Diese Behandlungen können bei Patienten mit einer moderaten Krankheitsschwere angewendet werden. Die DMTs der Kategorie 2 gelten als wirksamer als die Plattformtherapien und umfassen Cladribin sowie die Sphingosin-1-Phosphat (S1P)-Rezeptormodulatoren Fingolimod, Siponimod, Ozanimod und Ponesimod. Cladribin ist ein Nukleosidanalogen, das die Synthese und Reparatur von DNA beeinträchtigt [39]. Die Behandlung mit Cladribin führt zu einer bevorzugten Reduktion der Lymphozyten, was zu einer starken Verringerung der B-Zellen mit einer schnellen Erholung der naiven B-Zellen führt, während die T-Zellen eine geringere, aber lang anhaltende Verringerung aufweisen [39]. Die S1P-Modulatoren hemmen den Zugang der Lymphozyten zum ZNS, indem sie die Lymphozyten in den primären lymphatischen Organen sequestrieren [1, 40]. Bei Fortschreiten der Erkrankung unter einer Therapie der Kategorie 2, manifestiert durch häufige Schübe oder neue Läsionen, wird in vielen Fällen eine Eskalation auf eine Behandlung der Kategorie 3 vorgenommen.

1.4.4. Therapien der Kategorie 3

Zu den hochwirksamen Therapien der Kategorie 3 gehören Natalizumab, Alemtuzumab und CD20-positive B-Zell-depletierende Therapien wie Ofatumumab und Ocrelizumab. Natalizumab, ein humanisierter monoklonaler Antikörper, ist ein Inhibitor des $\alpha 4 \beta 1$ -Integrins, eines Adhäsionsmoleküls, das auf der Oberfläche von Lymphozyten exprimiert wird, und verhindert die Transmigration von entzündlichen peripheren Immunzellen über das Endothel in das ZNS [41]. Alemtuzumab ist ein humanisierter Anti-CD52-Antikörper, der gegen B- und T-Lymphozyten gerichtet ist, die CD52 exprimieren, was zu einer selektiven Depletion und Repopulation von Lymphozyten führt [42]. Natalizumab ist mit dem Risiko einer potenziell tödlich verlaufenden Virusinfektion, der progressiven multifokalen Leukoenzephalopathie (PML), assoziiert. Diese entsteht durch eine eingeschränkte T-Zell-Migration ins Gehirn und eine Reaktivierung des John-Cunningham-Virus (JCV) im ZNS. Bei Patienten mit positivem JCV-Antikörperstatus ist die Anwendung von Natalizumab mit einem deutlich erhöhten PML-Risiko verbunden. Daher wird es hier nur mit strenger Nutzen-Risiko-Abwägung und engmaschigem Monitoring eingesetzt. Alemtuzumab stellt eine hochwirksame Therapieoption dar, ist jedoch mit dem Risiko schwerwiegender Nebenwirkungen, insbesondere sekundärer Autoimmunerkrankungen (z.B. Schilddrüsenerkrankungen) und Infektionen assoziiert. Aufgrund dieses ungünstigen Sicherheitsprofils wird Alemtuzumab überwiegend als Reservetherapie eingesetzt, insbesondere bei Patienten, die unter anderen Eskalationstherapien der Kategorie 3 eine Krankheitsprogression aufweisen.

B-Zell-depletierende Therapien zeichnen sich durch ein insgesamt günstiges Sicherheitsprofil aus und werden deshalb häufig als Eskalationstherapien der Kategorie 3 bei Multipler Sklerose eingesetzt. OCR und OFA richten sich gegen CD20-positive B-Zellen und zerstören diese. OCR und OFA sind beide IgG-anti-CD20-monoklonale Antikörper mit jeweils zwei leichten und zwei schweren Ketten [43]. Beide gehören zur Antikörperklasse Typ I, das heißt, sie können zwei CD20-Tetramere vernetzen und CD20 in Lipid Rafts verlagern, wodurch eine antikörperabhängige zellvermittelte Phagozytose (ADCC) und eine komplementabhängige

Zytotoxizität (CDC) gegen CD20-exprimierende B-Zellen ausgelöst wird [43]. Der primäre Effektormechanismus bei OCR ist ADCC und bei OFA CDC. OFA zeigt den stärksten CDC-Effekt der Anti-CD20-Antikörper, der selbst bei niedriger CD20-Expression erhalten bleibt [43]. Die genauen Auswirkungen der Depletion CD20-positiver B-Zellen auf die einzelnen Immunkompartimente sind bislang unzureichend verstanden. Diese neuen Erkenntnisse der letzten Jahre haben unser Verständnis der Funktion von B Zellen bei der Pathogenese der Multiple Sklerose deutlich verbessert. Die Anwendung der Therapien Ocrelizumab und Ofatumumab wird in der klinischen Praxis weiter zunehmen und damit pathologische B Zellen weiter in den Fokus nehmen. Ziel dieser Arbeit ist es, durch Analysen der Immunzellpopulationen im peripheren Blut von RRMS-Patient:innen zu einem besseren Verständnis der Therapie-induzierten Veränderungen der Immunantwort und deren nachhaltigen Effekte beizutragen. Hierdurch sollen potenzielle neue therapeutische Perspektiven identifiziert werden.

1.5. Ethikvotum

Studennummer: 2021-1475

1.6. Ziele der Arbeit

Ziel dieser nicht-interventionellen, prospektiven Beobachtungsstudie ist es, die periphere Immunrekonstitution infolge der Anti-CD20-Therapie mit OCR oder OFA longitudinal zu untersuchen und festzustellen, wie die Immunrekonstitution mit klinischer Krankheitsstabilität assoziiert ist und wie lange diese Immunzellveränderungen anhalten. Im Detail sollen folgende Fragestellungen im Rahmen dieser Arbeit beantwortet werden:

1. Welche Effekte hat eine Anti-CD20-Therapie auf die peripheren Immunzellpopulationen bei RRMS-Patient:innen?
2. Welche Auswirkungen haben Veränderungen in der zellulären Immunantwort auf den klinischen Krankheitsverlauf?
3. Können bestimmte Immunzellpopulationen als prognostische Biomarker dienen?
4. Kann die Analyse der peripheren Immunzellen neue Erkenntnisse hinsichtlich der Pathogenese der MS liefern?

2. Publierte Originalarbeiten

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Willison, A.G.; et al. Effects of Anti-CD20 Antibody Therapy on Immune Cell Dynamics in Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis. *Cells* **2025**, *14*, 552.

Article

Effects of Anti-CD20 Antibody Therapy on Immune Cell Dynamics in Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis

Alice G. Willison ^{1,*} , Ramona Hagler ¹, Margit Weise ¹, Saskia Elben ¹ , Niklas Huntemann ¹ , Lars Masannek ¹ , Steffen Pfeuffer ², Stefanie Lichtenberg ^{1,3} , Kristin S. Golombeck ¹, Lara-Maria Preuth ¹, Leoni Rolfes ¹, Menekse Öztürk ¹, Tobias Ruck ⁴ , Nico Melzer ¹ , Melanie Korsen ¹, Stephen L. Hauser ⁵, Hans-Peter Hartung ^{6,7,8} , Philipp A. Lang ⁹, Marc Pawlitzki ¹, Saskia Räuber ^{1,†}  and Sven G. Meuth ^{1,†} 

¹ Department of Neurology, Medical Faculty and University Hospital, Heinrich Heine University Düsseldorf, 40225 Düsseldorf, Germany

² Department of Neurology, University Hospital Giessen and Marburg, Justus-Liebig-University Giessen, 35392 Giessen, Germany

³ Core Facility Flow Cytometry, Medical Faculty, Heinrich Heine University Düsseldorf, 40225 Düsseldorf, Germany

⁴ Department of Neurology with Heimer Institute for Muscle Research, University Hospital Bergmannsheil, 44789 Bochum, Germany

⁵ UCSF Weill Institute for Neurosciences, Department of Neurology, University of California, San Francisco, CA 94107, USA

⁶ Department of Neurology, Medical University of Vienna, 1090 Vienna, Austria

⁷ Brain and Mind Center, University of Sydney, Sydney, NSW 2050, Australia

⁸ Department of Neurology, Palacky University, 771 46 Olomouc, Czech Republic

⁹ Department of Molecular Medicine II, Medical Faculty, Heinrich Heine University, 40225 Düsseldorf, Germany

* Correspondence: alicegrizzel.willison@med.uni-duesseldorf.de

† These authors contributed equally to this work.



Academic Editor: Lars Ove Brandenburg

Received: 17 January 2025

Revised: 28 March 2025

Accepted: 2 April 2025

Published: 6 April 2025

Citation: Willison, A.G.; Hagler, R.; Weise, M.; Elben, S.; Huntemann, N.; Masannek, L.; Pfeuffer, S.; Lichtenberg, S.; Golombeck, K.S.; Preuth, L.-M.; et al. Effects of Anti-CD20 Antibody Therapy on Immune Cell Dynamics in Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis. *Cells* **2025**, *14*, 552. <https://doi.org/10.3390/cells14070552>

Copyright: © 2025 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Introduction: The efficacy of anti-CD20 antibodies has significantly contributed to advancing our understanding of disease pathogenesis and improved treatment outcomes in relapsing-remitting multiple sclerosis (RRMS). A comprehensive analysis of the peripheral immune cell profile, combined with prospective clinical characterization, of RRMS patients treated with ocrelizumab (OCR) or ofatumumab (OFA) was performed to further understand immune reconstitution following B-cell depletion. Methods: REBELLION-MS is a longitudinal analysis of RRMS patients treated with either OCR (n = 34) or OFA (n = 25). Analysis of B, T, natural killer (NK) and natural killer T (NKT) cells at baseline, month 1, and 12 was performed by multidimensional flow cytometry. Data were analyzed by conventional gating and unsupervised computational approaches. In parallel, different clinical parameters were longitudinally assessed. Twenty treatment-naïve age/sex-matched RRMS patients were included as the control cohort. Results: B-cell depletion by OCR and OFA resulted in significant reductions in CD20⁺ T and B cells as well as B-cell subsets, alongside an expansion of CD5⁺CD19⁺CD20[−] B cells, while also elevating exhaustion markers (CTLA-4, PD-1, TIGIT, TIM-3) across T, B, NK, and NKT cells. Additionally, regulatory T-cell (T_{REG}) numbers increased, especially in OCR-treated patients, and reductions in double-negative (CD3⁺CD4[−]CD8[−]) T cells (DN T cells) were observed, with these DN T cells having higher CD20 expression compared to CD4 or CD8 positive T cells. These immune profile changes correlated with clinical parameters, suggesting pathophysiological relevance in RRMS. Conclusions: Our interim data add weight to the argumentation that the exhaustion/activation markers, notably TIGIT, may be relevant to the pathogenesis of MS. In addition, we identify a potentially interesting increase in the expression of CD5⁺ on B cells. Finally, we identified a population of double-negative T cells (KLRG1⁺HLADR⁺, in particular) that is associated with MS activity and decreased with CD20 depletion.

Keywords: multiple sclerosis; autoimmunity; ocrelizumab; ofatumumab; immune reconstitution

1. Introduction

Multiple sclerosis (MS) is an immune-mediated inflammatory disorder of the central nervous system with a broad spectrum of severity and the potential to cause early-onset long-term disability in a cohort of predominantly young patients. For many years, MS was considered a primarily T-cell-mediated disease. However, the rise in the use of B-cell-depleting therapies for patients with more active disease, specifically monoclonal antibodies against CD20 like ocrelizumab (OCR) and ofatumumab (OFA), has significantly advanced our understanding of the complexity of RRMS pathogenesis and improved treatment outcomes [1]. Both therapies target the CD20 transmembrane protein expressed on the surface of B cells and have demonstrated high efficacy in clinical trials, decreasing disease activity and slowing disease progression [2,3]. Both OCR and OFA are IgG anti-CD20 monoclonal antibodies, with two light and two heavy chains, and both are type I antibodies, meaning they can crosslink two CD20 tetramers and translocate CD20 into lipid rafts, triggering antibody-dependent cellular phagocytosis (ADCC) and complement-dependent cytotoxicity (CDC) against CD20-expressing B cells [4]. OCR primarily induces ADCC, while OFA has a stronger CDC effect, which remains potent even with low CD20 expression [4]. It remains unclear exactly how CD20 depletion and subsequent immune system reconstitution contributes to amelioration of disease in RRMS. Additionally, understanding how long these changes last after treatment with OCR or OFA may aid in refining treatment approaches. This interim analysis from a non-invasive, prospective, observational study (Long-term reconstitution following B-cell depletion in multiple sclerosis (REBELLION-MS; this study is registered at ClinicalTrials.gov under the identifier NCT06586177)) reports peripheral immune reconstitution in the first 12 months of treatment following OCR and OFA therapy and how these changes are associated with the clinical disease course.

2. Materials and Methods

2.1. Study Population

Patients with a diagnosis of RRMS according to the 2017 McDonald criteria [5] were prospectively included in this study and divided into three groups: ocrelizumab, ofatumumab, and treatment-naïve relapsing-remitting multiple sclerosis (tnRRMS). The exclusion criteria were as follows: prior treatment with B cell-modulating therapies; any previous use of alemtuzumab, cyclophosphamide, mitoxantrone, azathioprine, mycophenolate mofetil, cyclosporine, methotrexate, total body irradiation, or bone marrow transplantation; impaired decision-making or consent capacity; ongoing immunosuppressive treatment for conditions other than RRMS; confirmed human immunodeficiency virus (HIV) or active/chronic hepatitis B/C infection. The decision to start OCR or OFA treatment was made independently of study inclusion. According to the Summary of Product Characteristics (SmPC), the dosage of subcutaneous ofatumumab is as follows: 20 mg at weeks 0, 1, and 2 followed by subsequent doses of 20 mg every 4 weeks, starting at week 4 and the dosage of intravenous ocrelizumab as follows: 300 mg with a repeat dose of 300 mg 2 weeks later, then 600 mg every 6 months. A simplified study design is depicted in Figure 1. At month 1 of treatment (m1), 16 patients from the OCR group and 22 from the OFA group were assessed. At the time of data analysis, 24 patients in the OCR group and 17 patients in the OFA group had reached the 12-month (m12) follow-up point for assessment and were included in this interim analysis.

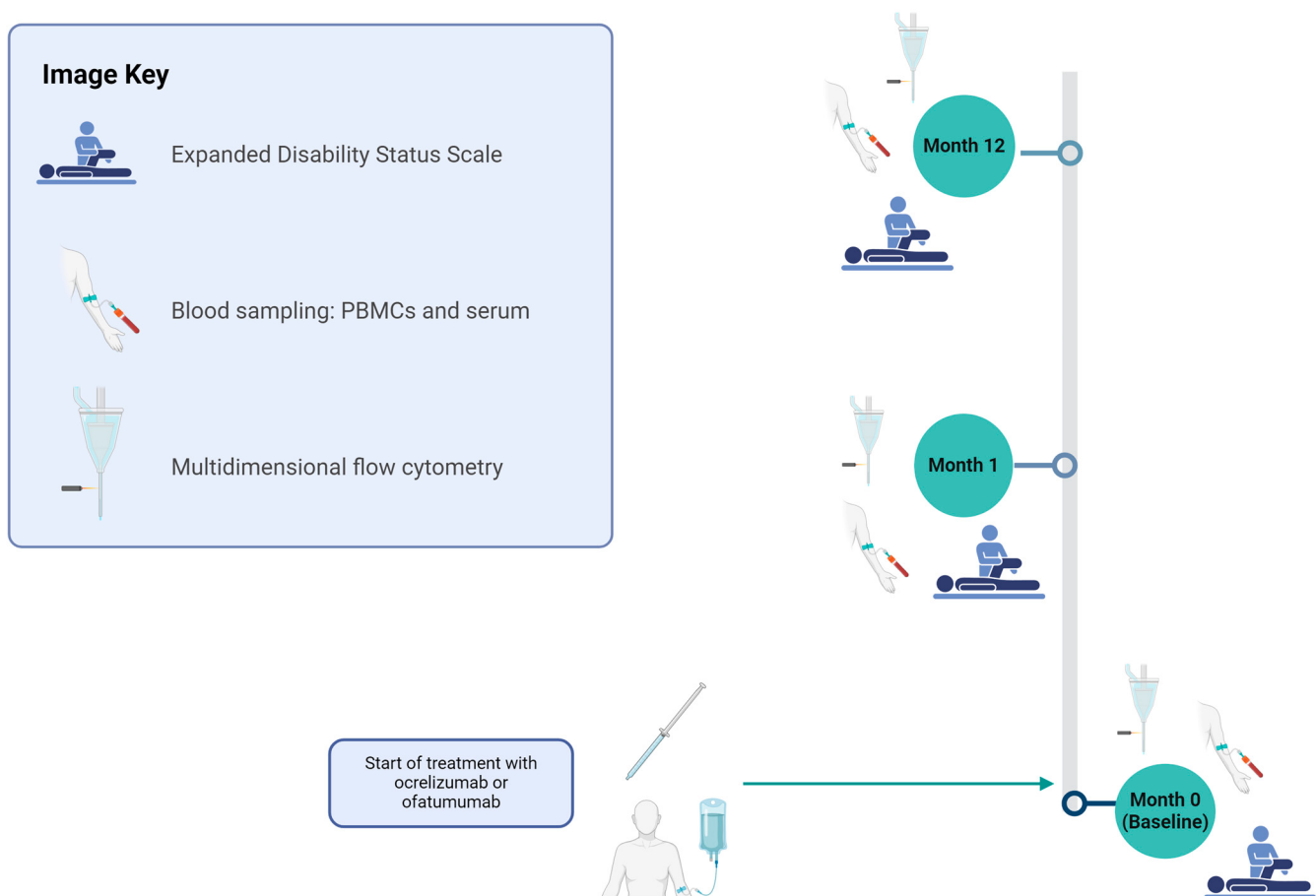


Figure 1. Study design for evaluating OCR and OFA therapies in RRMS patients. The cohort was assessed at months 0, 1, and 12 for the following parameters: basic disease characteristics (only month 0), EDSS, relapse documentation, and immunological analyses using PBMCs. Figure 1 was created in BioRender (<https://biorender.com/>, last accessed on 27 March 2025) Willison, A. (2024) BioRender.com/n12e680 [6]. EDSS—expanded disability status scale; OCR—ocrelizumab; OFA—ofatumumab; PBMCs—peripheral blood mononuclear cells.

2.2. Isolation of PBMCs and mFC Analysis (In-Depth mFC Cohort)

Blood samples for the study were collected concurrently with routine clinical blood draws. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated from whole blood by Ficoll gradient with SepMate isolation tubes (StemCell Technologies, Vancouver, Canada) and were cryopreserved in liquid nitrogen. The samples were prepared for multidimensional flow cytometry (mFC) per standard protocol [7] using the fluorochrome-conjugated antibodies detailed in Supplementary Table S1. For intracellular staining (FoxP3), the Foxp3/Transcription Factor Staining Buffer Set (eBioscience, San Diego, CA, USA) was used following cell surface marker staining according to the manufacturer's instructions.

A CytoFLEX-S (Beckman Coulter) was used to acquire data. Manual gating was performed with the software 'Kaluza Flow Cytometry Analysis' version 2.1 (Supplementary Table S1, Supplementary Figures S1–S5). The percentage of all living cells was calculated for every cell population and was compared among groups. Furthermore, unsupervised analysis was performed using the platform OMIQ from Dotmatics (www.omic.ai, www.dotmatics.com, last accessed on 27 March 2025) [8]. For this, compensated, pre-gated event data (CD19⁺ B cells or CD3⁺ lymphocytes) were exported as .csv files with the software 'Kaluza Flow Cytometry Analysis'. The gating strategies employed for cell identification were as follows: CD19⁺ B cells were identified using the sequence: singlets → living cells → lineage-negative (CD3[−]/CD14[−]/CD56[−]) → CD19⁺. For CD3⁺ T cells, the gating

sequence was singlets → living cells → CD3+ lymphocytes. To maximize sensitivity and ensure comprehensive data acquisition, the CytoFLEX-S flow cytometer was manually monitored during data collection, and the flow rate was adjusted to a low setting to ensure optimal detection and minimize cell loss, allowing, insofar as possible, the entire prepared sample volume to pass through the laser for analysis. The event data and the corresponding metadata were uploaded to the platform OMIQ. Optimized t-distributed Stochastic Neighbor Embedding (Opt-SNE) plots using the mFC data from all three groups were created using the default parameters (max iterations = 1000, opt-SNE end = 5000, perplexity = 30, theta = 0.5, components = 2, random seed = 1759, verbosity = 25). The algorithm FlowSOM (xdim = 12, ydim = 12, rlen = 10, distance metric euclidean) was used for cluster identification. A clustered heatmap of concatenated files was created to visualize the median marker expression of each cluster.

2.3. Data Analysis

RStudio (2023.06.1) was used for data analysis and visualization. *p*-values were calculated using analysis of variance (ANOVA) with post-hoc Tukey Honestly Significant Difference (HSD), if normality could be assumed based on the Shapiro–Wilk test, otherwise, the Kruskal–Wallis test was used with the Dunn post hoc test (p-adjustment method: Benjamini–Hochberg). A *p*-value of < 0.05 was considered statistically significant. Violin plots were created with the R package ‘ggplot2’ (v3.4.4). R packages ‘umap’ (v0.2.10.0) and ‘ggplot2’ (v3.4.4) were used to create UMAPs (uniform manifold approximation and projection for dimension reduction). To perform correlation analyses, Spearman correlation coefficients were calculated as normality of data could not be assumed. Correlation plots were created with ‘ggplot2’ (v3.4.4). Correlation was performed between the CD5 mean fluorescent intensity (MFI) of B cells, TIM-3, TIGIT, PD-1, and CTLA-4 MFIs of B cells, T cells, NK cells, and NKT cells, as well as percentages of regulatory T cells (T_{REG}), B cell cluster 16, T cell cluster 8, 11, 13, 15, and different clinical parameters (the Expanded Disability Status Scale (EDSS)), time since disease manifestation, time since last relapse, the annual relapse rate prior to sampling, and the total number of previous relapses). The graphical data were processed and refined for presentation using Inkscape (Harrington, B. et al., 2004–2005), a vector graphics software, to create the figures (Inkscape, <http://www.inkscape.org/>, last accessed on 27 March 2025) [9].

3. Results

3.1. Study Population

34 OCR-treated patients, 25 OFA-treated patients, and 20 tnRRMS patients were included in the analysis. The median age of participants was 36 years (range 19–55) in the OCR group, 37 years (range 22–54) in the OFA group, and 37 years (range 19–57) in the tnRRMS group. The percentage of female patients was 71% in the OCR group, 80% in the OFA group, and 90% in the treatment-naïve group. The median disease duration was 3.42 years in both the OCR (range 0.17–22.08) and OFA (range 0.08–25.33) groups, while it was 0.63 years (range 0.00–19.67) in the treatment-naïve group. Baseline EDSS scores had a median of 2.00 (range 0.0–6.5) in the OCR group, 2.00 (range 0.0–3.5) in the OFA group, and 1.25 (range 0.0–5.0) in the treatment-naïve group. The median annualized relapse rate (ARR) at baseline (the number of relapses in the year prior to treatment) was 1 (range 0–2) for OCR, 1 (range 0–3) for OFA, and 1 (range 0–3) for the treatment-naïve group. The median number of previous disease-modifying therapies (DMTs) was 1 (range 0–4) in the OCR group, 1 (range 0–5) in the OFA group, and 0 (range 0) in the tnRRMS group (Table 1). The last previous DMTs were glatiramer acetate in six patients (four OFA, two OCR), dimethyl fumarate in four patients (one OFA, three OCR), interferon in four patients (one OFA, three

OCR), cladribine in one OFA patient, teriflunomide in six patients (three OFA, three OCR), natalizumab in eight patients (three OFA, five OCR), and fingolimod in five patients (two OFA, three OCR). A total of 25 patients (10 OFA, 15 OCR) were treatment-naïve prior to OFA or OCR initiation (Supplementary Table S2).

Table 1. Basic demographic and disease characteristics of OCR, OFA, and treatment-naïve RRMS patients.

	OCR	OFA	tnRRMS
Total n.o. patients	34	25	20
N.o. patients at m1	16	22	NA
N.o. patients at m12	24	17	NA
Age (median [range])	36 [19–55]	37 [22–54]	37 [19–57]
Sex (% female)	71	80	90
Disease duration (median [range]) (Y)	3.42 [0.17–22.08]	3.42 [0.08–25.33]	0.63 [0.00–19.67]
EDSS at BL (median [range])	2.00 [0.0–6.5]	2.00 [0.0–3.5]	1.25 [0.0–5.0]
ARR at BL (median [range])	1 [0–2]	1 [0–3]	1 [0–3]
N.o. previous DMTs (median [range])	1 [0–4]	1 [0–5]	0 [0]

Basic demographic and disease characteristics of OCR, OFA, and treatment-naïve RRMS patients. Baseline characteristics of ocrelizumab (OCR)-receiving ($n = 34$), ofatumumab (OFA)-treated ($n = 25$), and treatment-naïve relapsing-remitting multiple sclerosis patients (tnRRMS) ($n = 20$). Median ages were 36, 37, and 37 years, respectively. Female patients comprised 71% (OCR), 80% (OFA), and 90% (tnRRMS) of each group. Median disease duration was 3.42 years for both OCR-treated and OFA-treated patients, and 0.63 years for tnRRMS. Median baseline EDSS scores were 2.00 (OCR), 2.00 (OFA), and 1.25 (tnRRMS). Median baseline annualized relapse rate (ARR) was 1 in all groups. Median prior disease-modifying therapies (DMTs) were 1 (OCR, OFA) and 0 (tnRRMS). Further details are in Supplementary Table S2. ARR—Annualized Relapse Rate; BL—Baseline; DMTs—Disease Modifying Therapies; EDSS—Expanded Disability Status Scale; N.o.—Number of; OCR—ocrelizumab; OFA—ofatumumab; tnRRMS—treatment-naïve relapsing remitting multiple sclerosis; Y—years.

3.2. Effective Depletion of B-Cell Subsets and CD20⁺ T Cells Occurs Following Treatment with Anti-CD20-Antibodies

We first explored the effect of OCR and OFA on different B-cell subsets and CD20⁺ T cells, compared to the tnRRMS patients. UMAP analysis demonstrated longitudinal clustering of OFA- and OCR-treated patients, indicating similarities in the peripheral immune cell profile, distinct from tnRRMS (Figure 2A). Compared to the tnRRMS patients at m1 and m12, a significant reduction in CD20⁺ B cells and all analyzed B-cell subsets (naïve B cells, CD24⁺CD27⁺ regulatory B cells (Bregs), CD38⁺CD24⁺ Bregs, HLADR⁺ B cells, marginal zone B cells, memory B cells, transitional B cells), as well as in plasmablasts occurred (Figure 2B–K). Plasma cell populations were expectedly not dramatically affected by B-cell depletion (Figure 2L). In addition, the percentage of CD3⁺CD20⁺ T cells significantly decreased at m1 and m12 (Figure 2M).

3.3. CD5⁺CD19⁺ B Cell Population Increases Following Anti-CD20 Antibody Treatment

A significant increase in CD5 expression was observed on the remaining B cells at m1 and m12 in OCR- and OFA-treated RRMS patients compared to tnRRMS (Figure 2N). Unsupervised clustering was performed on the B-cell population (Figure 2O), which identified the expansion of a CD19⁺CD20[−]CD5⁺ B-cell population in OCR- and OFA-treated patients at m1 and m12 compared to tnRRMS patients (Figure 2P). A significantly larger population expansion was observed in the OCR- compared to OFA-treated and tnRRMS patients at m12, which was not observed at m1. We found a negative correlation between CD5 expression on B cells and EDSS at m0 (correlation coefficient $r = -0.496$, $p = 0.001$) and a positive correlation with the time since the last relapse ($r = 0.456$; $p = 0.004$) in tnRRMS patients (Figure 2Q). In addition, we observed a negative correlation between

CD5 expression on B cells in treatment-naïve OCR and OFA patients at m0 and EDSS at m1 ($r = -0.577$, $p = 0.0494$) (Figure 2Q).

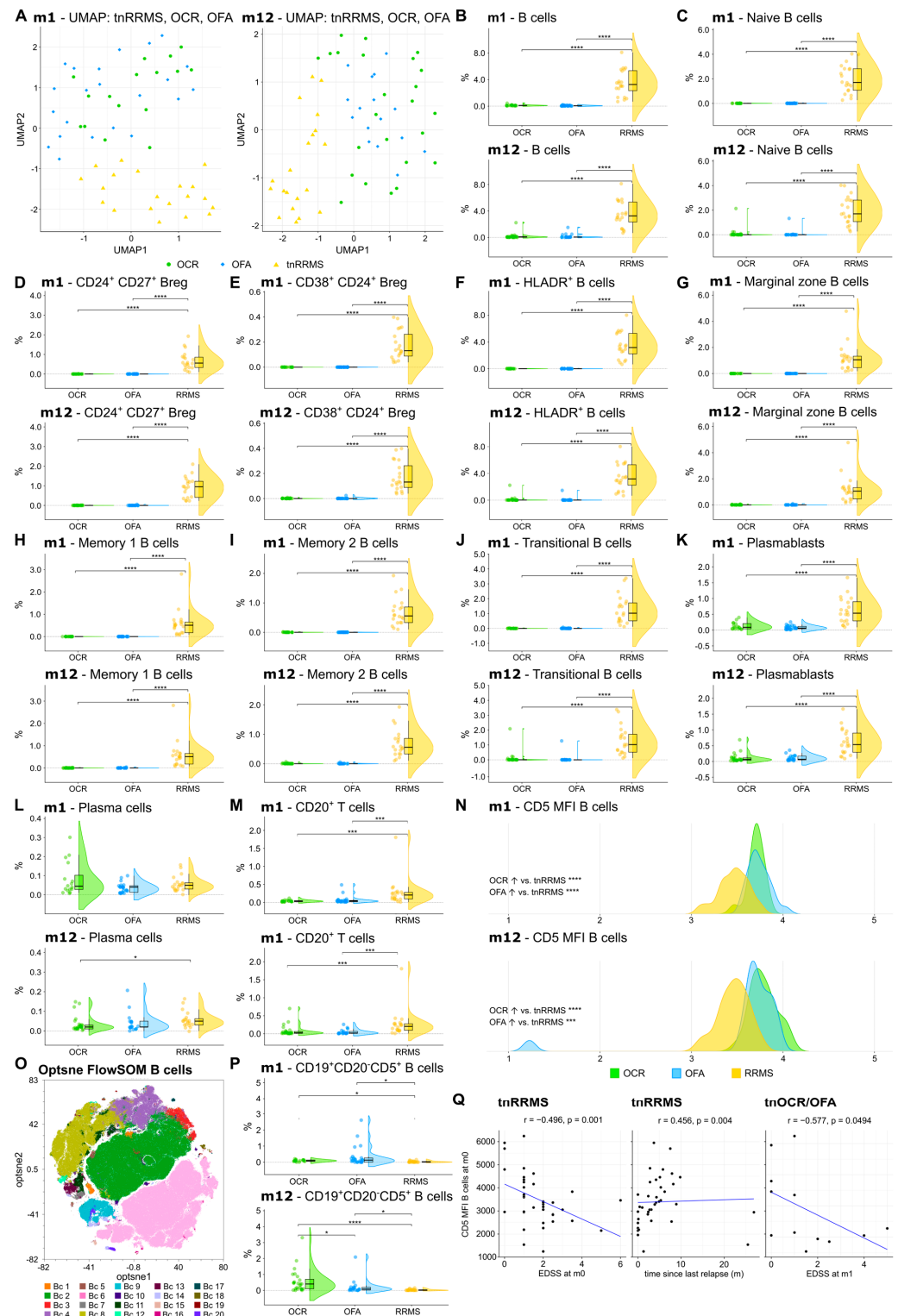


Figure 2. Reduction in CD20⁺ B and T cells, while CD5 expression was increased on B cells of OCR- and OFA-treated compared to treatment-naïve RRMS patients. (A) UMAP analysis including the PB immune cell subsets assessed by mFC. Each colored symbol presents an individual patient. (B–M) Violin

plots with overlaying boxplots illustrating CD20⁺ B cells, CD20⁺ T cells, and various B cell subsets (% of living cells) in the PB of OCR-treated, OFA-treated, and treatment-naïve RRMS patients. Boxes show the median and the 25th as well as the 75th percentiles. The whiskers extend from the hinge to the largest and smallest values, respectively, but no further than 1.5 * IQR from the hinge. *p*-values were calculated using analysis of variance (ANOVA) with post hoc Tukey Honestly Significant Difference (HSD), if normality could be assumed based on the Shapiro–Wilk test, otherwise the Kruskal–Wallis test was used with the Dunn post hoc test (p-adjustment method: Benjamini–Hochberg). (N) Ridge plots illustrating the MFI of CD5 on B cells of OCR- and OFA-treated compared to treatment-naïve RRMS patients. *p*-values were calculated using the Kruskal–Wallis test with the Dunn post hoc test (p-adjustment method: Benjamini–Hochberg) as normality could not be assumed based on the Shapiro–Wilk test. (O) Opt-SNE plots with B-cell clusters identified by FlowSOM. Opt-SNE plot including mFC data from OCR-treated, OFA-treated, and treatment-naïve RRMS patients were created with the platform OMIQ from Dotmatics (www.omiq.ai, www.dotmatics.com, last accessed on 27 March 2025) [8] using the default parameters (max iterations = 1000, opt-SNE end = 5000, perplexity = 30, theta = 0.5, components = 2, random seed = 1759, verbosity = 25). The algorithm FlowSOM (xdim = 12, ydim = 12, rlen = 10, distance metric euclidean) was used for cluster identification. (P) Violin plots with overlaying box plots depicting CD19⁺CD20[−]CD5⁺ B cells (% of living cells) identified by FlowSOM. Boxes show the median and the 25th as well as the 75th percentiles. The whiskers extend from the hinge to the largest and smallest values, respectively, but no further than 1.5 * IQR from the hinge. *p*-values were calculated using the Kruskal–Wallis test with the Dunn post hoc test (p-adjustment method: Benjamini–Hochberg) as normality could not be assumed based on the Shapiro–Wilk test. (Q) Correlation analysis between the CD5 MFI of B cells and EDSS as well as time since last relapse. Spearman correlation coefficients were calculated as normality of data could not be assumed. Bc—B cell; Breg—regulatory B cells; EDSS—expanded disability status scale; m—month(s); MFI—mean fluorescent intensity; OCR—ocrelizumab; OFA—ofatumumab; PB—peripheral blood; tnRRMS—treatment-naïve relapsing-remitting multiple sclerosis; tnOCR/OFA—OCR- and OFA-treated RRMS patients who were treatment-naïve at m0, UMAP: Uniform Manifold Approximation and Projection for Dimension Reduction. Statistical significance: $p \leq 0.05$ (*), $p \leq 0.001$ (**), $p \leq 0.0001$ (***)

3.4. Increased Expression of Exhaustion/Activation Marker on Immune Cells Following Anti-CD20 Antibody Treatment

Moreover, we identified an increase in TIM-3, TIGIT, and CTLA-4 expression on T cells in B-cell-depleted patients, particularly in the OCR group, with correlations observed between these markers and clinical parameters in tnRRMS patients. At m1, TIM-3 expression on CD8⁺ T cells was higher in B-cell-depleted patients compared to tnRRMS (Figure 3A). At m12, this increase was more pronounced in the OCR group than OFA but remained significant for both (Figure 3B). TIGIT expression on CD8⁺ T cells also increased in the OCR group compared to tnRRMS at m12 (Figure 3C). On CD4⁺ T cells at m12, significantly higher expression of CTLA-4, TIM-3, and TIGIT in the OCR group compared to tnRRMS was observed, with TIM-3 expression in the OFA group also reaching significantly higher expression at m12 (Figure 3D–F). This pattern was also seen in CD3⁺ T cells (Figure 3G–I). At m12 on CD4⁺CD8⁺ T cells, TIM-3 expression in the OCR group was markedly increased compared to tnRRMS and to a lesser extent when compared to the OFA group; comparing OFA to tnRRMS, the increase in TIM-3 expression was also observed (Figure 3J). TIGIT expression on CD4⁺CD8⁺ T cells increased in the OCR group compared to tnRRMS at m12 (Figure 3K). At baseline in tnRRMS patients, TIM-3 expression on CD4⁺ T cells and TIGIT expression on CD8⁺ T cells correlated negatively with EDSS ($r = -0.393$, $p = 0.013$ and $r = -0.35$, $p = 0.029$) (Figure 4A,B). In addition, TIGIT expression on CD8⁺ T cells and on CD4⁺CD8⁺ T cells was positively correlated with the time since disease manifestation ($r = 0.422$, $p = 0.007$ and $r = 0.341$, $p = 0.034$) (Figure 4C,D). Furthermore, we observed a negative correlation between TIGIT expression on T cells (CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD4⁺CD8⁺)

in treatment-naïve OCR und OFA patients at baseline and EDSS at m1 ($r = -0.663$, $p = 0.0187$; $r = -0.71$, $p = 0.0097$; $r = -0.678$, $p = 0.0155$; $r = -0.595$, $p = 0.0412$) (Figure 4E–H).

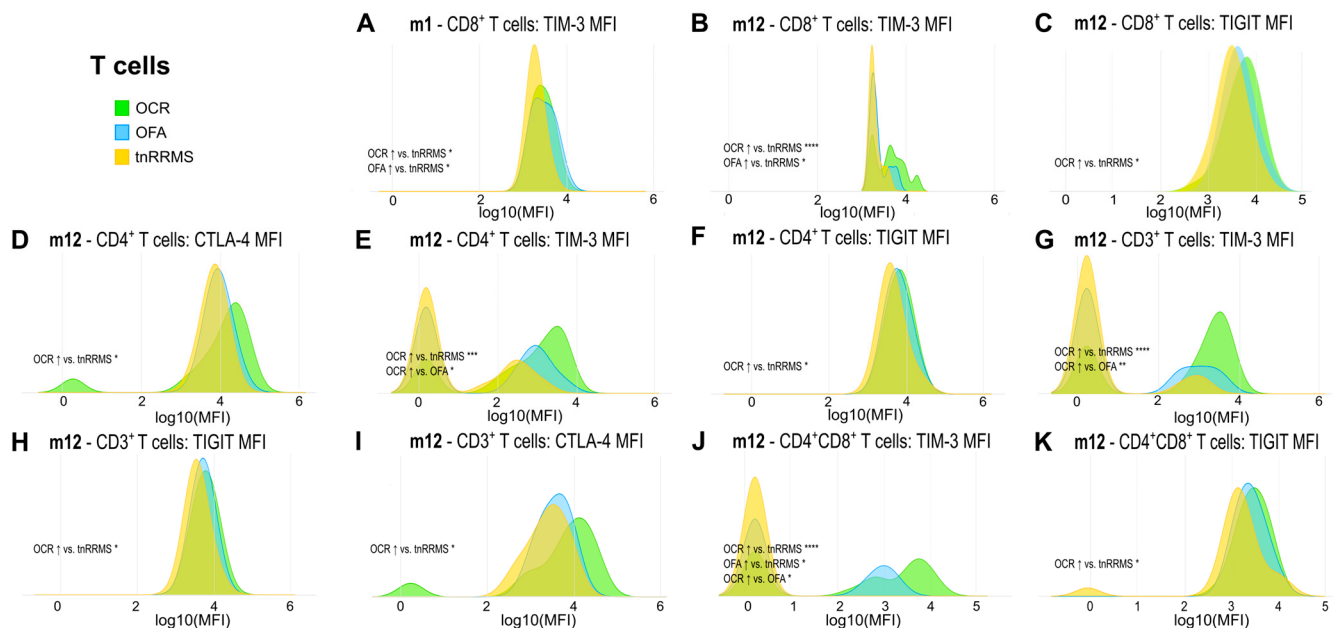


Figure 3. Increased expression of exhaustion/activation markers on T cells of OCR- and OFA-treated RRMS patients. Ridge plots illustrating the MFIs of different exhaustion/activation markers on T cells (A–K) of OCR- and OFA-treated compared to treatment-naïve RRMS patients. p -values were calculated using analysis of variance (ANOVA) with post-hoc Tukey Honestly Significant Difference (HSD), if normality could be assumed based on the Shapiro–Wilk test, otherwise the Kruskal–Wallis test was used with the Dunn post hoc test (p -adjustment method: Benjamini–Hochberg). m—month(s); MFI—mean fluorescent intensity; OCR—ocrelizumab; OFA—ofatumumab; RRMS—relapsing-remitting multiple sclerosis; tnRRMS—treatment-naïve relapsing-remitting multiple sclerosis. Statistical significance: $p \leq 0.05$ (*), $p \leq 0.01$ (**), $p \leq 0.001$ (***), $p \leq 0.0001$ (****).

Beyond the increased expression of exhaustion/activation marker on T cells of B-cell-depleted patients, we observed significant changes in their expression levels on B, NK, and NKT cells. At m1, expression of TIGIT, PD-1, and CTLA-4 on B cells was increased in both OCR- and OFA-treated patients compared to tnRRMS (Figure 5A–C). This was also observed at m12, with expression of TIM-3 also significantly increased at this time point (Figure 5D–G). On NKT cells at m12, expression of TIM-3, PD-1, TIGIT, and CTLA-4 was higher in OCR-treated patients compared to tnRRMS (Figure 5H–K), with PD-1 expression also higher than in OFA-treated patients (Figure 5I). Expression of TIM-3 and TIGIT was also higher on NK cells in OCR-treated patients compared to tnRRMS at m12 (Figure 5L,M), with TIM-3 expression higher in OCR- compared to OFA-treated patients (Figure 5L). At baseline in tnRRMS patients, TIGIT expression on B cells negatively correlated with EDSS ($r = -0.552$, $p = 0.0003$) (Figure 4I). In the treatment naïve OCR- and OFA-treated patients, TIGIT expression on B cells at m0 negatively correlated with EDSS at m1 ($r = -0.602$, $p = 0.0382$) (Figure 4J). In OCR- and OFA-treated patients, EDSS at m1 positively correlated with PD-1 expression on B cells at m1 ($r = 0.37$, $p = 0.0341$) (Figure 4K). EDSS at m1 also correlated positively with TIM-3 expression on B cells at m1 in OFA-treated patients ($r = 0.49$, $p = 0.039$) (Figure 4L). TIGIT expression on NKT cells at baseline positively correlated with time since disease manifestation ($r = 0.327$, $p = 0.042$) (Figure 4M). In OFA-treated patients, PD-1 expression on NKT cells at m1 positively correlated with EDSS at m1 ($r = 0.524$, $p = 0.0256$) (Figure 4N). EDSS at m1 negatively correlated with CTLA-4 expression on NKT cells at m1 in OCR-treated patients ($r = -0.516$, $p = 0.0487$) (Figure 4O).

In OFA-treated patients, TIM-3 expression at m12 positively correlated with EDSS at m12 ($r = 0.538$, $p = 0.0258$) (Figure 4P). TIGIT expression on NK cells at baseline negatively correlated with EDSS at baseline ($r = -0.461$, $p = 0.003$) (Figure 4Q).

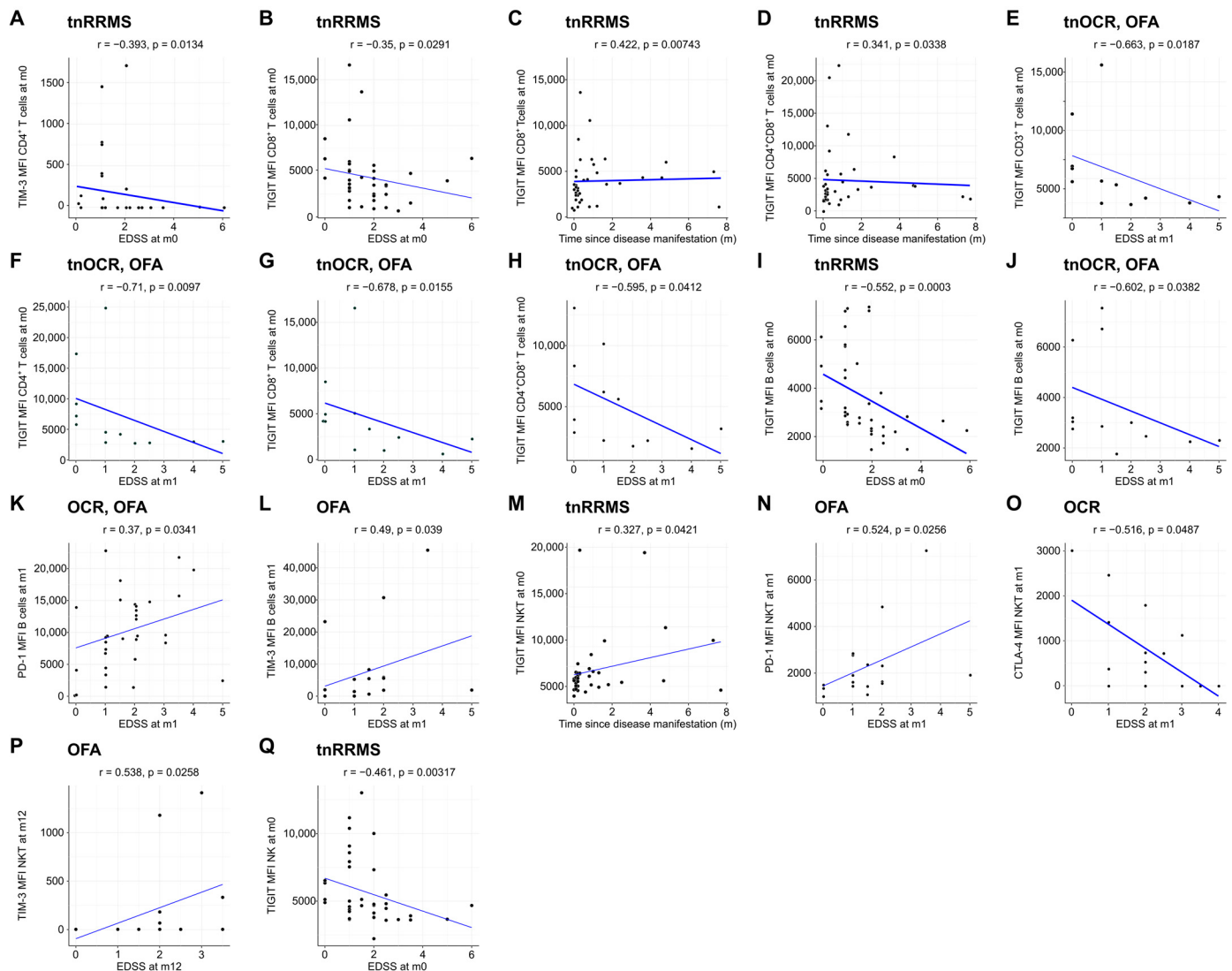


Figure 4. Expression of exhaustion/activation markers on immune cells correlates with clinical parameters of RRMS patients. Correlation analysis between different exhaustion/activation markers on T cells (A–H), B cells (I–L), NKT cells (M–P), and NK cells (Q) and EDSS as well as time since disease manifestation. Spearman correlation coefficients were calculated as normality of data could not be assumed. EDSS—expanded disability status scale; m—month(s); MFI—mean fluorescent intensity; NK—natural killer cells; OCR—ocrelizumab; OFA—ofatumumab; RRMS—relapsing-remitting multiple sclerosis; tnOCR/OFA—OCR- and OFA-treated RRMS patients who were treatment-naïve at m0; tnRRMS—treatment-naïve relapsing-remitting multiple sclerosis.

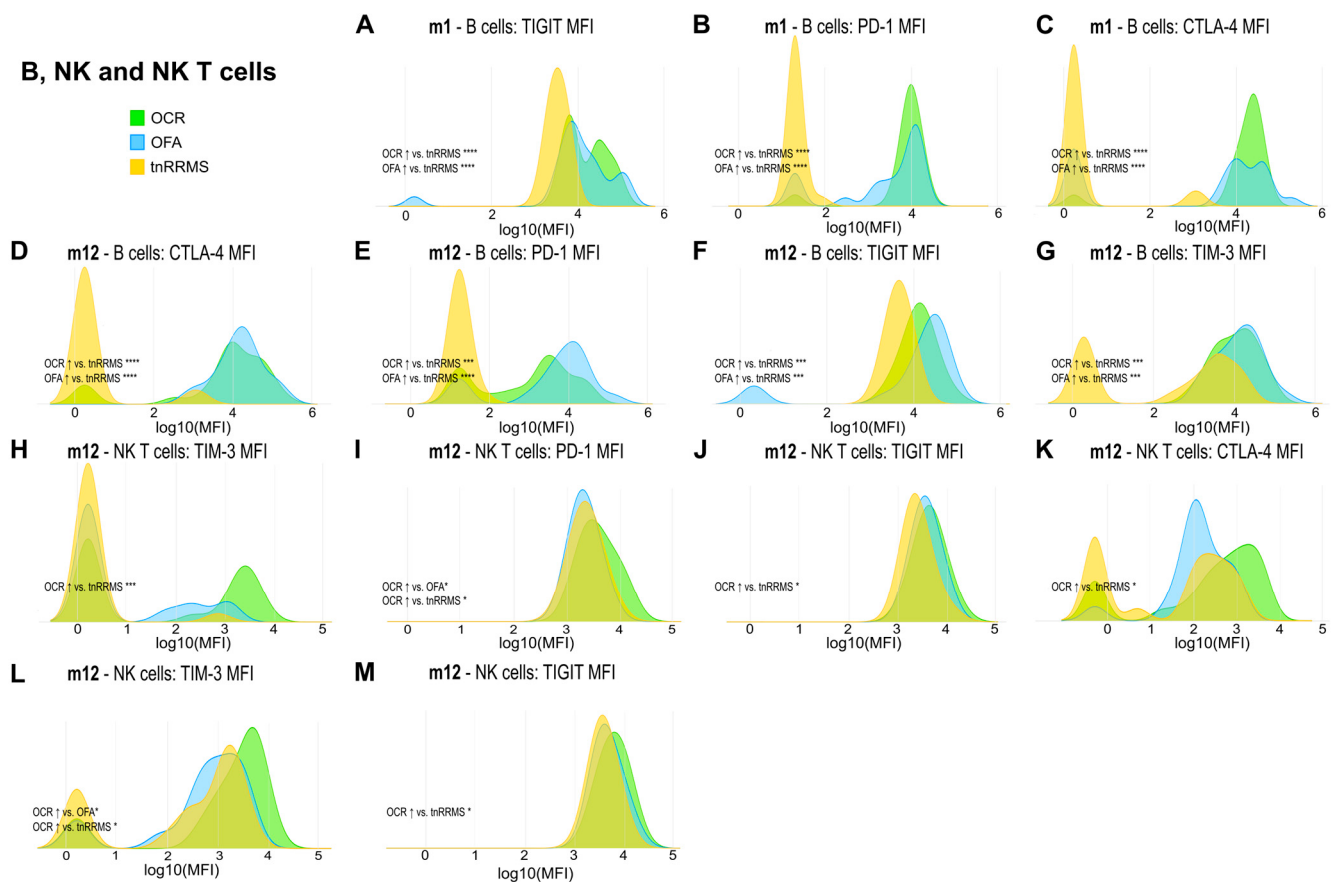


Figure 5. Higher expression of exhaustion/activation markers on B, NK, and NKT cells of OCR- and OFA-treated RRMS patients. Ridge plots illustrating the MFIs of different exhaustion/activation markers on B, NK, and NKT cells (A–M) of OCR- and OFA-treated compared to treatment-naïve RRMS patients. *p*-values were calculated using analysis of variance (ANOVA) with post hoc Tukey Honestly Significant Difference (HSD), if normality could be assumed based on the Shapiro–Wilk test, otherwise the Kruskal–Wallis test was used with the Dunn post hoc test (*p*-adjustment method: Benjamini–Hochberg). m—month(s); MFI—mean fluorescent intensity; NK—natural killer cells; OCR—ocrelizumab; OFA—ofatumumab; RRMS—relapsing-remitting multiple sclerosis; tnRRMS—treatment-naïve relapsing-remitting multiple sclerosis. Statistical significance: $p \leq 0.05$ (*), $p \leq 0.001$ (**), $p \leq 0.0001$ (****).

3.5. An Increase in Regulatory T Cells and Decrease in Double Negative T Cell Subsets in OCR- and OFA-Treated RRMS Patients

An increase in regulatory T cells (T_{REG}) at m1 was observed in OFA-treated patients compared to tnRRMS (Figure 6A). At m12, T_{REG} were higher in both OCR- and OFA-treated patients compared to those with tnRRMS; however, significance was only reached in the OCR-treated patients (Figure 6A). Unsupervised clustering was performed on the $CD3^+$ T cell population (Figure 6B), allowing for the identification of three subsets of double negative ($CD4^-CD8^-$) T cells (DN T cells), which were reduced in OCR- and OFA-treated RRMS compared to tnRRMS patients. The percentage of $KLRG1^-HLADR^+$ DN T cells decreased in OFA-treated patients compared to tnRRMS at m12 (Figure 6C). The percentage of $KLRG1^+HLADR^-$ DN T cells and $KLRG1^+HLADR^+$ DN T cells in patients treated with B cell depletion decreased significantly compared to tnRRMS patients at both m1 and m12 (Figure 6D,E). Compared to $CD4$ and/or $CD8$ positive T cells, significantly more DN T cells expressed $CD20$ (Figure 6F). Furthermore, we observed a positive correlation between T_{REG} in treatment-naïve OCR and OFA patients at baseline and EDSS at m1 ($r = 0.627$, $p = 0.029$) (Figure 6G). The percentage of $KLRG1^-HLADR^+$ DN T cells correlated positively

with the number of relapses prior to baseline ($r = 0.322$, $p = 0.01$) (Figure 6H). In addition, we observed a negative correlation between KLRG1⁺HLADR⁺ DN T cells in OFA-treated patients at m12 and EDSS in this group at m12 ($r = -0.573$, $p = 0.0161$) (Figure 6I).

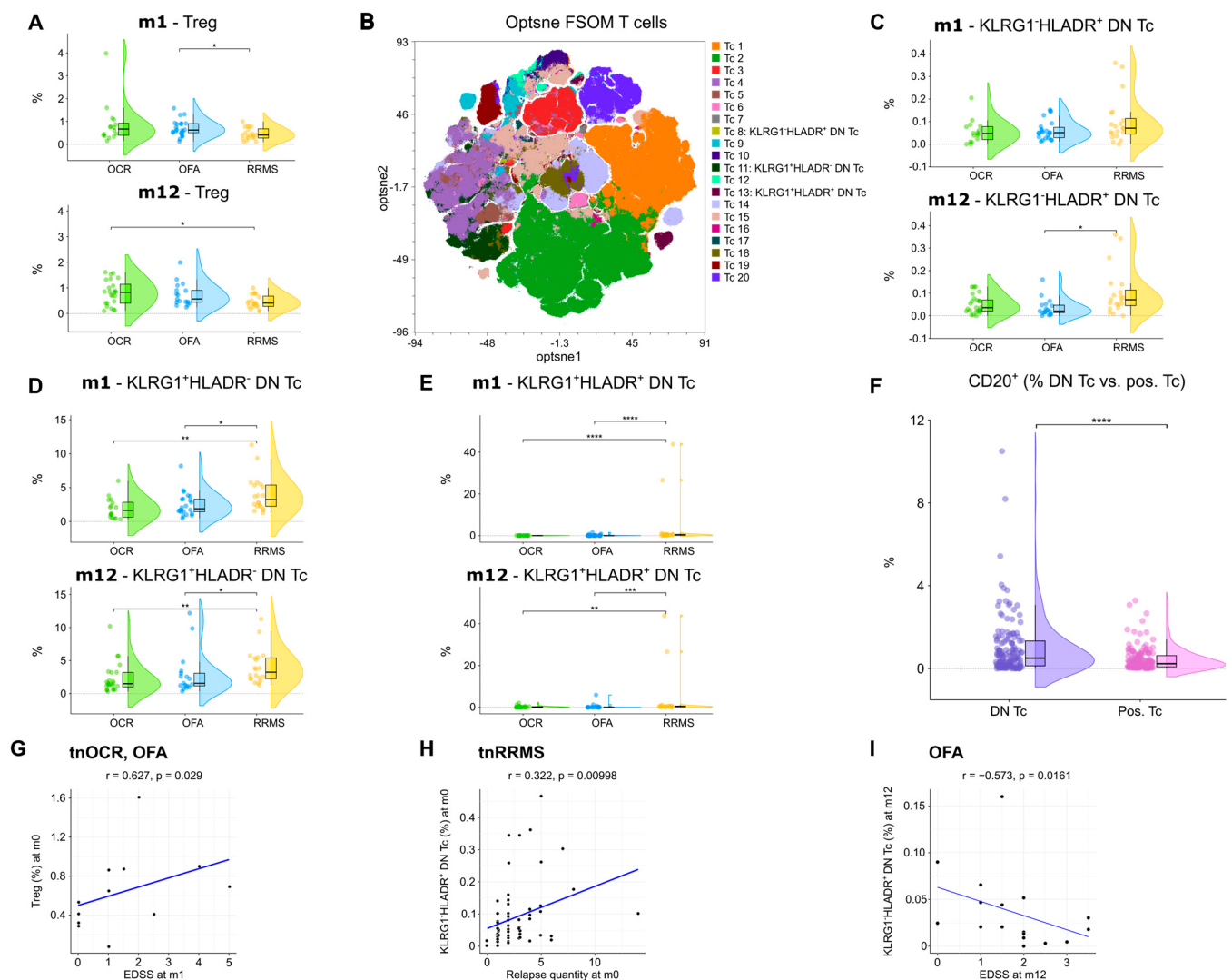


Figure 6. Increase in regulatory T cells and reduction in double negative T cells in OCR- and OFA-treated RRMS patients. (A) Violin plots with overlaying boxplots showing T_{REGS} (% of living cells) in the PB of OCR-treated, OFA-treated, and treatment-naïve RRMS patients. Boxes show the median and the 25th as well as the 75th percentiles. The whiskers extend from the hinge to the largest and smallest values, respectively, but no further than 1.5 * IQR from the hinge. p -values were calculated using the Kruskal–Wallis test with the Dunn post hoc test (p-adjustment method: Benjamini–Hochberg) as normality could not be assumed based on the Shapiro–Wilk test. (B) Opt-SNE plots with T cell clusters identified by FlowSOM. Opt-SNE plot including mFC data from OCR-treated, OFA-treated, and treatment-naïve RRMS patients were created with the platform OMIQ from Dotmatics (www.omiq.ai, www.dotmatics.com) using the default parameters (max iterations = 1000, opt-SNE end = 5000, perplexity = 30, theta = 0.5, components = 2, random seed = 1759, verbosity = 25). The algorithm FlowSOM (xdim = 12, ydim = 12, rlen = 10, distance metric euclidean) was used for cluster identification. (C–E) Violin plots with overlaying box plots depicting KLRG1⁺HLADR⁺ DN T cells (C), KLRG1⁺HLADR⁻ DN T cells (D), and KLRG1⁺HLADR⁺ DN T cells (E). Boxes show the median

and the 25th as well as the 75th percentiles. The whiskers extend from the hinge to the largest and smallest values, respectively, but no further than $1.5 \times \text{IQR}$ from the hinge. p -values were calculated using analysis of variance (ANOVA) with post hoc Tukey Honestly Significant Difference (HSD), if normality could be assumed based on the Shapiro–Wilk test, otherwise the Kruskal–Wallis test was used with the Dunn post hoc test (p-adjustment method: Benjamini–Hochberg). (F) Violin plots with overlaying boxplots illustrating the percentage of $\text{CD}20^+$ T cells among all DN T cells compared to the percentage of $\text{CD}20^+$ T cells among all $\text{CD}4^+$ and/or $\text{CD}8^+$ T cells. Boxes show the median and the 25th as well as the 75th percentiles. The whiskers extend from the hinge to the largest and smallest values, respectively, but no further than $1.5 \times \text{IQR}$ from the hinge. p -values were calculated with paired Wilcoxon’s rank-sum test. (G–I) Correlation analysis between T_{REGS} and EDSS at m1 (G), $\text{KLRG1}^-\text{HLADR}^+$ DN T cells and relapse quantity at m0 (H), as well as $\text{KLRG1}^-\text{HLADR}^+$ DN T cells and EDSS at m12 (I). Spearman correlation coefficients were calculated as normality of data could not be assumed. DN Tc— $\text{CD}4^-\text{CD}8^-$ T cells; EDSS—expanded disability status scale; m—month(s); OCR—ocrelizumab; OFA—ofatumumab; pos. Tc— $\text{CD}4^+$ and/or $\text{CD}8^+$ T cells; PB—peripheral blood; RRMS—relapsing-remitting multiple sclerosis; tnRRMS—treatment-naïve relapsing-remitting multiple sclerosis; tnOCR/OFA—OCR- and OFA-treated RRMS patients who were treatment-naïve at m0; Tc—T cells; Treg—regulatory T cells. Statistical significance: $p \leq 0.05$ (*), $p \leq 0.01$ (**), $p \leq 0.001$ (***), $p \leq 0.0001$ (****).

4. Discussion

Previous studies have characterized the repopulation of immune cells following B-cell depletion, with a particular focus on how the T-cell compartment repopulates [10–14]. Expanding on these observations, we used a comprehensive panel of antibodies to characterize immune reconstitution in detail following B-cell depletion. We found that B-cell depletion by OCR and OFA resulted in significant reductions in $\text{CD}20^+$ T and B cells, alongside an expansion of $\text{CD}5^+\text{CD}19^+\text{CD}20^-$ B cells, particularly in OCR-treated patients at 12 months. Exhaustion/activation markers (CTLA-4, PD-1, TIGIT, TIM-3) across T, B, NK, and NKT cells were increased in anti-CD20 treated individuals. Expression of TIGIT generally demonstrated correlations with disease parameters that indicate a positive effect on disease course. Clinical correlations of PD-1, TIM-3, and CTLA-4 expression did not demonstrate a clear effect on disease course. Additionally, T_{REGS} increased, particularly in OCR-treated patients, and a reduction in potentially disease-relevant double-negative ($\text{CD}4^-\text{CD}8^-$) T-cell subsets were observed.

4.1. The Relevance of $\text{CD}5^+$ B Cells in MS

The $\text{CD}5$ -expressing B-cell subsets are considered a complex, heterogeneous population of human B cells involved in ‘natural’ or polyreactive innate immunity, B-cell stimulation and autoreactive antibody production [15,16]. $\text{CD}5^+$ murine B-1 cells have been defined as innate, natural-antibody-producing immature cells with a limited repertoire of V genes and less junctional diversity than bone marrow-derived B-2 cells. Human B1-like $\text{CD}5^+$ cells have been found in human fetal lymph nodes [17], spleen [18], and umbilical vein cord blood [19], but due to the phenotypical overlap with activated B cells, this natural population of B-1-like cells is difficult to characterize in humans. $\text{CD}5^+$ B cells have, however, been implicated in the pathogenesis and regulation of MS as detailed below.

In mouse models, a protective role of $\text{CD}5^+$ B cells has been observed. Yanaba et al. identified a distinct regulatory subset of $\text{CD}1d(\text{hi})\text{CD}5^+$ B cells that modulated T cell-mediated inflammation [20]. Interleukin (IL)-10 production was restricted to this subset and diminished in $\text{CD}19$ -deficient mice. Adoptive transfer of this B-cell population to the $\text{CD}19$ -deficient and wild-type mice normalized T-cell-mediated inflammation, supporting the regulatory potency of IL-10-producing $\text{CD}5^+$ B cells [20]. Niino et al. demonstrated that in patients with MS, the percentage of $\text{CD}5^+$ cells in the memory B cell ($\text{CD}27^+$) subset is

significantly higher during the remitting stage compared to the relapsing stage [21]. In a later publication, Niino et al. observed that CD5 expression on B cells decreases notably in secondary progression MS (SPMS) patients [22].

However, CD5 expression on B cells has also been demonstrated to be significantly higher in patients with active MS compared to those with stable disease, correlating with active lesions and myelin basic protein (MBP) antibodies [23]. Villar et al. investigated the role of oligoclonal immunoglobulin M (IgM) bands in cerebrospinal fluid (CSF) as a prognostic marker in MS and identified CD5⁺ B cells as the subpopulation responsible for secreting IgM antibodies, particularly against non-protein molecules like myelin lipids. They found that patients with these anti-lipid IgM antibodies experienced more aggressive disease [24]. Fluorescence-activated cell sorting (FACS) analysis of CSF and peripheral blood by Correale et al. demonstrated that CD5⁺CD19⁺ B cells were increased intrathecally in MS compared to control and that HLA-DR expression was lower in CD5⁺ B cells than CD5[−] B cells. The authors therefore viewed the function of CD5⁺ B cells to be intrathecal autoantibody production and not presentation [25].

The increase in CD5 expression on B cells at both m1 and m12 after B-cell depletion that we observed in our analysis suggests a compensatory or adaptive role for this population following B cell-targeted therapies. The more significant expansion observed in OCR-treated patients at m12 could indicate a differential effect of OCR compared to OFA on the B cell compartment. The negative correlation between CD5 expression and EDSS suggests that higher CD5 expression on B cells might be associated with less disability. This could indicate a protective or regulatory role for CD5⁺ B cells. The positive correlation between CD5 expression and the time since the last relapse suggests that CD5 positivity on B cells might contribute to disease quiescence. These findings resonate with previous studies that have highlighted the complex role of CD5⁺ B cells in MS. The expansion of this cell population following B cell depletion suggests that they could be involved in re-establishing immune balance after such therapies, and our population may represent B10 cells or B regulatory cells [26].

4.2. CTLA-4, TIGIT, TIM-3, and PD-1 Expression in MS

CTLA-4, TIGIT, TIM-3, and PD-1 are markers of immune cell exhaustion and activation [27–31]. We found significant increases in CTLA-4, TIGIT, TIM-3, and PD-1 across CD4⁺, CD8⁺ T cells, B cells, NK cells, and NKT cells following B cell-depleting therapies compared to tnRRMS patients.

In MS patients, compared to healthy controls, expression of CTLA-4, PD-1, and TIM-3 has been found to be downregulated [32]. Asashima et al. explored the role of B-cell function in RRMS and found that impaired TIGIT expression may drive disease pathogenesis [33]. Trabattoni et al. investigated costimulatory molecule expression and cytokine production in patients with RRMS, finding that PD-1-expressing T cells and PD-L1-expressing B cells and monocytes were significantly elevated in stable MS compared to acute MS. This upregulation of the PD-1/PD-L1 pathway during stable phases of MS was linked to enhanced IL-10 production and reduced proliferation of MBP-specific CD4⁺ and CD8⁺ T cells [34]. Yang et al. found that TIM-3 is dysregulated in untreated MS patients, leading to impaired TIM-3-mediated immunoregulation. Blocking TIM-3 in healthy controls increased IFN- γ secretion, but this effect was absent in untreated MS patients, indicating a defect that was reversed by treatment with glatiramer acetate or IFN- β , implying that patients with MS have impaired TIM-3 expression. The restoration of TIM-3 expression and function in treated patients suggests that these therapies may partially work by restoring TIM-3-mediated regulation of T-cell function [35]. Koguchi et al. generated 104 T cell clones from the CSF of six patients with MS. They found that

MS CSF clones, despite secreting higher levels of IFN- γ , paradoxically exhibited lower TIM-3 and T-bet expression compared to controls. IL-12 polarization further increased IFN- γ secretion while reducing TIM-3 levels in MS clones, indicating dysregulated TIM-3 expression. Reduced TIM-3 expression was linked to resistance to tolerance and enhanced T-cell proliferation and IFN- γ secretion, suggesting that impaired upregulation of TIM-3 in inflammatory sites may be an intrinsic defect contributing to MS pathogenesis [36]. The literature in this field of research raises interesting questions, and further characterization of immune checkpoint proteins in MS is ongoing—and necessary.

Relapse or first presentation of MS is a rare but serious complication following immune checkpoint inhibitor (ICI) treatment. In an analysis of the FDA Adverse Event Reporting System (FAERS) database and additional case reports, 14 cases of MS were identified in patients who had received an ICI for metastatic cancer [37]. In all cases, ICI therapy was discontinued upon clear clinical diagnosis of MS or MS relapse. One patient was re-treated with the CTLA-4-blocking antibody ipilimumab after a mild MS relapse due to the favorable cancer response and experienced significantly worsened MS symptoms, leading to discontinuation of the retreatment. In two cases, the MS relapse was severe, marked by rapid progression and poor response to MS therapy [38]. Gerdes et al. presented a case study of a patient who developed MS during treatment with ipilimumab. After two courses of ipilimumab, the patient experienced clinical episodes of MS, with one episode showing a marked increase in MRI activity. A brain biopsy confirmed active, T cell-mediated MS [39]. However, the ACCLAIM study did not demonstrate an effect of abatacept (CTLA-4-Ig) on the number of new gadolinium-enhancing MRI lesions, or clinical measures of disease activity in RRMS [40].

Our findings contribute to the growing body of evidence that immune checkpoint markers, particularly CTLA-4, TIGIT, TIM-3, and PD-1, may be significant in the immunopathology of MS. Clinical correlations demonstrated a possibly protective effect of TIGIT expression. A clear effect of CTLA-4, TIM-3, and PD-1 on disease course was not observed in this study. Impaired expression of these markers, notably TIGIT, may impact MS severity.

4.3. CD20⁺ T Cells, Regulatory T Cells, and Double Negative T-Cell Subsets

CD20⁺ T cells have been implicated in the pathogenesis of MS through cytokine production, reduction under disease-modifying therapies, association with white matter injury, and presence intrathecally [41–43]. We demonstrate that CD20⁺ T cells are depleted by both OFA and OCR, which may contribute to their therapeutic efficacy. T_{REG}s regulate the number and function of autoreactive T cells, with clear relevance to the pathophysiology of MS. In line with our findings, increased T_{REG} frequencies following CD20⁺ depletion have been reported, indicating a shift towards an anti-inflammatory state [44,45]. The positive correlation between T_{REG} in treatment-naïve OCR and OFA patients at baseline and EDSS at m1 in our cohort could indicate that the OCR- or OFA-mediated increase in T_{REG}s might be especially beneficial for patients with low T_{REG} counts at baseline.

DN T cells, which lack CD4 and CD8 molecules necessary for stabilizing T-cell receptor-major histocompatibility complex (TCR-MHC) interactions, are involved in non-classical antigen presentation primarily through CD1 molecules [43]. These cells exhibit natural suppressor activity that is not MHC-restricted, and their activation and regulatory functions are thought to be influenced by direct cell-to-cell contact and TCR signaling, rather than cytokine mediation [46]. DN T cells are highly activated in autoimmune diseases and have been implicated in conditions such as SLE, rheumatoid arthritis, type 1 diabetes, and Sjögren's syndrome [44,45]. These cells are associated with increased inflammation and tissue damage, particularly in systemic lupus erythematosus (SLE) [47–50]. Using

unsupervised clustering of the CD3⁺ T-cell population, we identified three distinct subsets of DN T cells, which were notably reduced in OCR- and OFA-treated RRMS patients compared to tnRRMS patients. Specifically, the percentage of KLRG1[−]HLADR⁺ DN T cells decreased significantly in OFA-treated patients at m12 compared to tnRRMS patients. Additionally, both KLRG1⁺HLADR[−] DN T cells and KLRG1⁺HLADR⁺ DN T cells were significantly reduced in patients treated with B-cell depletion therapy at both m1 and m12, suggesting a sustained impact on these DN T cell subsets over time. Moreover, we found that a significantly higher proportion of DN T cells expressed CD20 compared to CD4⁺ and CD8⁺ T cells, providing a potential explanation for their reduction following OCR and OFA treatment. The reduction in DN T cells in our study aligns with an anti-inflammatory reconstitution of the immune system following B-cell depletion, with therapies possibly directly or indirectly reducing pathogenic DN T-cell populations in RRMS. Furthermore, the percentage of KLRG1[−]HLADR⁺ DN T cells was positively correlated with the number of relapses prior to baseline and negatively correlated with EDSS in ofatumumab-treated patients at m12, suggesting that this specific DN T-cell subset may be involved in disease activity and relapse frequency in MS. The reduction in this subset following B-cell depletion may therefore contribute to the overall clinical efficacy of OCR and OFA in reducing MS relapse rates.

5. Conclusions

Our 12-month interim analysis provides insight into immune reconstitution following B-cell depletion with OCR and OFA in MS. Apart from the expected decrease in CD20⁺ B and T cells, we observed an expansion of CD5⁺CD19⁺ B cells and an increase in exhaustion/activation markers like CTLA-4, PD-1, TIGIT, and TIM-3 across various immune cell types. Furthermore, OCR- and OFA-treatment led to an increase in T_{REG} and a reduction in DN T cells. The correlations we found between CD5⁺ B cells and clinical parameters, such as reduced disability scores and longer periods since the last relapse, suggest a potentially protective role for these cells in the disease course. The increased expression of exhaustion markers across various immune cells following B-cell depletion indicates a shift towards an immunological state characterized by reduced inflammatory potential. The significant reduction in DN T cells following treatment suggests that OCR and OFA may help diminish a potentially pathogenic cell population involved in MS progression. A better understanding of the specific functions and regulatory mechanisms of DN T cells and CD5⁺ B-cell subsets, as well as the implications of increased exhaustion marker expression, could optimize treatment strategies. Additionally, exploring how these therapies influence the balance between pro-inflammatory and regulatory roles in these cell populations could provide valuable insights toward improving the treatment of MS patients.

6. Limitations

Our study is limited by the small patient cohort. Due to the small sample size of patients with available multidimensional flow cytometry data from all three time points (m0, m1, and m12) no longitudinal analyses were performed. The aim of this current study was to provide an exploratory analysis of how the immune system reconstitutes following B-cell depletion, and future data will address in a larger and statistically higher-powered cohort why these changes occur. Moreover, the expression of CD5 and the exhaustion/activation markers CTLA-4, PD-1, TIM-3, and TIGIT on B cells is measured against the entire B-cell population, and not subpopulations of B cells due to the limited number of channels in conventional flow cytometry. Therefore, it is possible that the depletion of CD20⁺ B cells artificially increases other B-cell populations.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/cells14070552/s1>, Figure S1: Exemplary gating of panel 1 B cell; Figure S2: Exemplary gating of panel 2 exhaustion; Figure S3: Exemplary gating of panel 3 T cell I; Figure S4: Exemplary gating of panel 4 ILC & NK; Figure S5: Exemplary gating of panel 5 T cell II; Table S1: Overview of the used mFC panels; Table S2: Additional clinical data of OCR, OFA, and treatment-naïve RRMS patients.

Author Contributions: Conceptualization, A.G.W., L.R., T.R., M.K., M.P., S.R. and S.G.M.; Methodology, A.G.W., S.L., T.R., M.K., S.R. and S.G.M.; Software, A.G.W. and S.R.; Formal analysis, A.G.W., S.R. and S.G.M.; Investigation, A.G.W., M.P., S.R. and S.G.M.; Resources, A.G.W., T.R., M.K., M.P., S.R. and S.G.M.; Data curation, A.G.W., R.H., M.W., S.E., L.M., S.L., K.S.G., L.-M.P., M.Ö., T.R., M.K., M.P., S.R. and S.G.M.; Writing—original draft, A.G.W., S.R. and S.G.M.; Writing—review and editing, A.G.W., N.H., L.M., S.P., S.L., L.-M.P., M.Ö., T.R., N.M., S.L.H., H.-P.H., P.A.L., M.P., S.R. and S.G.M.; Visualization, A.G.W., S.R. and S.G.M.; Supervision, M.P., S.R. and S.G.M.; Project administration, A.G.W., M.K., P.A.L., S.R. and S.G.M.; Funding acquisition, S.P., L.R., M.K. and S.G.M. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This project was partially funded by a grant from Novartis Deutschland GmbH (Project number: MOMB157A_FVSP002).

Institutional Review Board Statement: The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and approved by the ethics committees of Heinrich-Heine University Duesseldorf (Study Number 2021-1475, date of approval: 11 August 2021). All patients signed written informed consent.

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Data Availability Statement: Data underlying this study are registered with the ABCD-J data catalog at <https://data.abcd-j.de/dataset/b611539b-02f7-5008-bc21-3f3bb4a3dfcd/1.0>, accessed on 27 March 2025. Further information, resources, anonymized clinical and flow cytometry data can be requested via the catalog item and will be fulfilled by Saskia Räuber (saskiajanina.raeuber@med.uni-duesseldorf.de).

Acknowledgments: We thank Annette Heß, Julia Jadasz, Mary Bayer, Andrea Issberger, Zippora Kohne, Birgit Blumenkamp, Katharina Wagner-Berres, and Annette Laufer for assistance in sample collection and Christina Berg for assistance with clinical assessments.

Conflicts of Interest: AGW reports personal fees from Merck, travel reimbursements and meeting attendance fees from Novartis, Merck, and Sanofi; RH declares no relevant competing interests; MW declares no relevant competing interests; SE declares no relevant competing interests; NH reports personal fees from ArgenX, Merck, Novartis, and Viartis, travel reimbursements and meeting attendance fees from Alexion, ArgenX, Merck, and Novartis, research support by the UKD FUTURE program of the Deutsche Forschungsgesellschaft outside the scope of this study; LM reports no conflicts of interest related to this study; he has received honoraria for lecturing, consulting, and travel expenses for attending meetings from Biogen, Merck, Sanofi, ArgenX, Roche, Alexion, and Novartis, all outside the scope of this work, his research is funded by the German Multiple Sclerosis Foundation (DMSG) and the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG, German Research Foundation)-493659010; SP received travel grants from Sanofi–Aventis, Alexion, Novartis, and Merck, lecturing honoraria or compensation for consulting from Alexion, Hexal, Merck, Novartis, Sanofi–Aventis, Mylan Healthcare, Roche, and Biogen, and research support from Diamed, Merck, Biogen, Novartis, and the German Multiple Sclerosis Society North-Rhine-Westphalia; SL declares no relevant competing interests; LMP declares no relevant competing interests; LR received travel reimbursements from Merck Serono and Sanofi–Aventis; MÖ declares no relevant competing interests; TR reports grants from German Ministry of Education, Science, Research and Technology, grants from the German Research Foundation (DFG), grants and personal fees from Sanofi, Argenx, and Alexion, personal fees from Biogen, Roche, UCB, Novartis, and Teva, personal fees and nonfinancial support from Merck, outside the submitted work; NM has received honoraria for lecturing and travel expenses for attending meetings from Biogen Idec, GlaxoSmith Kline, Teva, Novartis Pharma, Bayer Healthcare, Genzyme, Alexion Pharmaceuticals, Fresenius Medical Care, Diamed, UCB Pharma, AngeliniPharma, Bial, and

Sanofi–Aventis, has received royalties for consulting from UCB Pharma, Alexion Pharmaceuticals, and Sanofi–Aventis, and has received financial research support from Euroimmun, Fresenius Medical Care, Diamed, Alexion Pharmaceuticals, and Novartis Pharma; MK received honoraria for lecturing and consulting and travel expenses for attending meetings from Biogen, Hexal, Merck Healthcare Germany, Neuraxpharm, Novartis, and Sanofi, and research support from Merck Healthcare Germany, Novartis, Viartis, and the German Multiple Sclerosis Society; SLH currently serves on the scientific advisory board of Accure, Alektor, Annexon, and Hinge Therapeutics, he has previously consulted for BD, Moderna, NGM Bio, Nurix Therapeutics, Pheno Therapeutics, and previously served on the Board of Directors of Neurona, Dr. Hauser also has received travel reimbursement and writing support from F. Hoffmann–La Roche and Novartis AG for anti-CD20-therapy-related meetings and presentations; HPH received fees for serving on steering and data monitoring committees from Aurinia Pharma, BMS Celgene, Boehringer Ingelheim, Hoffmann–La Roche, Merck, Novartis, Octapharma, TG Therapeutics; PAL contributes to the development of LCMV for clinical application in oncology in cooperation with, as founder of and as advisor to, Abalos Therapeutics GmbH; MP received honoraria for lecturing and travel expenses for attending meetings from Alexion, ArgenX, Bayer Health Care, Biogen, Hexal, Merck Serono, Novartis, Roche, Sanofi–Aventis, Takeda, and Teva, his research is funded by ArgenX, Biogen, Demecan, Hexal, Horizon Merck Serono, Novartis, Roche, Viartis, Takeda, and Teva; SR received travel grants from Merck Healthcare Germany GmbH, Alexion Pharmaceuticals, and Bristol Myers Squibb, she served on a scientific advisory board from Merck Healthcare Germany GmbH and received honoraria for lecturing from Roche and Merck Healthcare Germany GmbH, her research was supported by Novartis, ‘Stiftung zur Förderung junger Neurowissenschaftler’, and ‘Else Kröner-Fresenius-Stiftung’; SGM receives honoraria for lecturing, and travel expenses for attending meetings from Academy 2, Argenx, Alexion, Almirall, Amicus Therapeutics Germany, Bayer Health Care, Biogen, BioNtech, BMS, Celgene, Datamed, Demecan, Desitin, Diamed, Diaplan, DIU Dresden, DPmed, Gen Medicine and Healthcare products, Genzyme, Hexal AG, IGES, Impulze GmbH, Janssen Cilag, KW Medipoint, MedDay Pharmaceuticals, Merck Serono, MICE, Mylan, Neuraxpharm, Neuropoint, Novartis, Novo Nordisk, ONO Pharma, Oxford PharmaGenesis, QuintilesIMS, Roche, Sanofi–Aventis, Springer Medizin Verlag, STADA, Chugai Pharma, Teva, UCB, Viartis, Wings for Life international and Xcenda, his research is funded by the German Ministry for Education and Research (BMBF), Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR), Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG), Else Kröner Fresenius Foundation, Gemeinsamer Bundesausschuss (G-BA), German Academic Exchange Service, Hertie Foundation, Interdisciplinary Center for Clinical Studies (IZKF) Muenster, German Foundation Neurology and Alexion, Almirall, Amicus Therapeutics Germany, Biogen, Diamed, DGM e.v., Fresenius Medical Care, Genzyme, Gesellschaft von Freunden und Förderern der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf e.V., HERZ Burgdorf, Merck Serono, Novartis, ONO Pharma, Roche, and Teva.

Abbreviations

tnRRMS	treatment-naïve relapsing-remitting multiple sclerosis
OFA	ofatumumab
OCR	ocrelizumab
CSF	cerebrospinal fluid
m0	baseline, prior to treatment
m1	month 1 of treatment
m12	month 12 of treatment
TREG	T regulatory cell
NK cell	natural killer cell
NKT cell	natural killer T cell
ADCC	antibody-dependent cellular cytotoxicity

CDC	complement-dependent cytotoxicity
PBMC	peripheral blood mononuclear cell
mFC	multidimensional flow cytometry
RRMS	relapsing-remitting multiple sclerosis
IgG	immunoglobulin G
HIV	human immunodeficiency virus

References

- Gelfand, J.M.; Cree, B.A.C.; Hauser, S.L. Ocrelizumab and Other CD20(+) B-Cell-Depleting Therapies in Multiple Sclerosis. *Neurotherapeutics* **2017**, *14*, 835–841. [CrossRef] [PubMed]
- Hauser, S.L.; Bar-Or, A.; Cohen, J.A.; Comi, G.; Correale, J.; Coyle, P.K.; Cross, A.H.; de Seze, J.; Leppert, D.; Montalban, X.; et al. Ofatumumab versus Teriflunomide in Multiple Sclerosis. *N. Engl. J. Med.* **2020**, *383*, 546–557. [CrossRef] [PubMed]
- Hauser, S.L.; Bar-Or, A.; Comi, G.; Giovannoni, G.; Hartung, H.-P.; Hemmer, B.; Lublin, F.; Montalban, X.; Rammohan, K.W.; Selmaj, K.; et al. Ocrelizumab versus Interferon Beta-1a in Relapsing Multiple Sclerosis. *N. Engl. J. Med.* **2017**, *376*, 221–234. [CrossRef] [PubMed]
- Frisch, E.S.; Pretzsch, R.; Weber, M.S. A Milestone in Multiple Sclerosis Therapy: Monoclonal Antibodies Against CD20—Yet Progress Continues. *Neurotherapeutics* **2021**, *18*, 1602–1622. [CrossRef]
- Thompson, A.J.; Banwell, B.L.; Barkhof, F.; Carroll, W.M.; Coetzee, T.; Comi, G.; Correale, J.; Fazekas, F.; Filippi, M.; Freedman, M.S.; et al. Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria. *Lancet Neurol.* **2018**, *17*, 162–173. [CrossRef]
- Willison, A. 2024. Available online: <https://app.biorender.com/citation/6710dafd1080fddf8320d27d> (accessed on 27 March 2025).
- Räuber, S.; Korsen, M.; Huntemann, N.; Rolfes, L.; Müntefering, T.; Dobelmann, V.; Hermann, A.M.; Kölsche, T.; von WnuckLipinski, K.; Schroeter, C.B.; et al. Immune response to SARS-CoV-2 vaccination in relation to peripheral immune cell profiles among patients with multiple sclerosis receiving ocrelizumab. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **2022**, *93*, 978–985. [CrossRef]
- Available online: www.omiq.ai (accessed on 27 March 2025).
- Harrington, B. et al., 2004–2005. Inkscape, a Vector Graphics Software, to Create the Figures. Available online: <http://www.inkscape.org/> (accessed on 27 March 2025).
- Curran, C.; Vaitaitis, G.; Waid, D.; Volmer, T.; Alvarez, E.; Wagner, D.H. Ocrevus reduces TH40 cells, a biomarker of systemic inflammation, in relapsing multiple sclerosis (RMS) and in progressive multiple sclerosis (PMS). *J. Neuroimmunol.* **2022**, *374*, 578008. [CrossRef]
- D’amico, E.; Zanghì, A.; Fantozzi, R.; Centonze, D.; Avolio, C. Ofatumumab and Early Immunological Cells Subset Characterization in Naïve Relapsing Multiple Sclerosis Patients: A Real-World Study. *Curr. Neuropharmacol.* **2023**, *21*, 2563–2566.
- Garcia, A.; Dugast, E.; Shah, S.; Morille, J.; Lebrun-Frenay, C.; Thouvenot, E.; De Sèze, J.; Le Page, E.; Vukusic, S.; Maurousset, A.; et al. Immune Profiling Reveals the T-Cell Effect of Ocrelizumab in Early Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis. *Neurol. Neuroimmunol. Neuroinflamm.* **2023**, *10*, e200091. [CrossRef]
- Mathias, A.; Pantazou, V.; Perriot, S.; Canales, M.; Jones, S.; Oberholster, L.; Moulin, M.; Fenwick, C.; Bernard-Valnet, R.; Théaudin, M. Ocrelizumab Impairs the Phenotype and Function of Memory CD8(+) T Cells: A 1-Year Longitudinal Study in Patients with Multiple Sclerosis. *Neurol. Neuroimmunol. Neuroinflamm.* **2023**, *10*, e200084. [CrossRef]
- Shinoda, K.; Li, R.; Rezk, A.; Mexhitaj, I.; Patterson, K.R.; Kakara, M.; Zuroff, L.; Bennett, J.L.; von Büdingen, H.-C.; Carruthers, R.; et al. Differential effects of anti-CD20 therapy on CD4 and CD8 T cells and implication of CD20-expressing CD8 T cells in MS disease activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2023**, *120*, e2207291120. [PubMed]
- Dalloul, A. CD5: A safeguard against autoimmunity and a shield for cancer cells. *Autoimmun. Rev.* **2009**, *8*, 349–353. [CrossRef] [PubMed]
- Ahmed, R.; Omidian, Z.; Donner, T.; Hamad, A.R.A. Hiding in plain sight: Time to unlock autoimmune clues in human CD5+ B cells by using nextgen technology. *Discov. Med.* **2018**, *26*, 79–83. [PubMed]
- Westerga, J.; Timens, W. Immunohistological analysis of human fetal lymph nodes. *Scand. J. Immunol.* **1989**, *29*, 103–112.
- Antin, J.H.; Emerson, S.G.; Martin, P.; Gadol, N.; Ault, K.A. Leu-1+ (CD5+) B cells. A major lymphoid subpopulation in human fetal spleen: Phenotypic and functional studies. *J. Immunol.* **1986**, *136*, 505–510. [CrossRef]
- Brennan, F.; Platerzyberk, C.; Maini, Feldmann, M. Coordinate expansion of ‘fetal type’ lymphocytes (TCR gamma delta+T and CD5+B) in rheumatoid arthritis and primary Sjogren’s syndrome. *Clin. Exp. Immunol.* **1989**, *77*, 175–178.
- Yanaba, K.; Bouaziz, J.-D.; Haas, K.M.; Poe, J.C.; Fujimoto, M.; Tedder, T.F. A regulatory B cell subset with a unique CD1dhiCD5+ phenotype controls T cell-dependent inflammatory responses. *Immunity* **2008**, *28*, 639–650.
- Niino, M.; Hirotani, M.; Miyazaki, Y.; Sasaki, H. Memory and naive B-cell subsets in patients with multiple sclerosis. *Neurosci. Lett.* **2009**, *464*, 74–78.

22. Niino, M.; Fukazawa, T.; Minami, N.; Amino, I.; Tashiro, J.; Fujiki, N.; Doi, S.; Kikuchi, S. CD5-positive B cell subsets in secondary progressive multiple sclerosis. *Neurosci. Lett.* **2012**, *523*, 56–61.
23. Seidi, O.A.; Semra, Y.K.; Sharief, M.K. Expression of CD5 on B lymphocytes correlates with disease activity in patients with multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol.* **2002**, *133*, 205–210.
24. Villar, L.M.; Sádaba, M.C.; Roldán, E.; Masjuan, J.; González-Porqué, P.; Villarrubia, N.; Espiño, M.; García-Trujillo, J.A.; Bootello, A.; Álvarez-Cermeño, J.C. Intrathecal synthesis of oligoclonal IgM against myelin lipids predicts an aggressive disease course in MS. *J. Clin. Investig.* **2005**, *115*, 187–194. [\[PubMed\]](#)
25. Correale, J.; Mix, E.; Olsson, T.; Kostulas, V.; Fredrikson, S.; Höjeberg, B.; Link, H. CD5+ B cells and CD4-8-T cells in neuroimmunological diseases. *J. Neuroimmunol.* **1991**, *32*, 123–132. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
26. Watanabe, R.; Ishiura, N.; Nakashima, H.; Kuwano, Y.; Okochi, H.; Tamaki, K.; Sato, S.; Tedder, T.F.; Fujimoto, M. Regulatory B cells (B10 cells) have a suppressive role in murine lupus: CD19 and B10 cell deficiency exacerbates systemic autoimmunity. *J. Immunol.* **2010**, *184*, 4801–4809. [\[PubMed\]](#)
27. Noel, P.J.; Boise, L.H.; Thompson, C.B. Regulation of T cell activation by CD28 and CTLA4. *Adv. Exp. Med. Biol.* **1996**, *406*, 209–217.
28. Huang, Y.-H.; Zhu, C.; Kondo, Y.; Anderson, A.C.; Gandhi, A.; Russell, A.F.; Dougan, S.K.; Petersen, B.-S.; Melum, E.; Pertel, T.; et al. CEACAM1 regulates TIM-3-mediated tolerance and exhaustion. *Nature* **2015**, *517*, 386–390. [\[CrossRef\]](#)
29. Schade, H.; Sen, S.; Neff, C.P.; Freed, B.M.; Gao, D.; Gutman, J.A.; Palmer, B.E. Programmed Death 1 Expression on CD4 + T Cells Predicts Mortality after Allogeneic Stem Cell Transplantation. *Biol. Blood Marrow Transplant.* **2016**, *22*, 2172–2179. [\[CrossRef\]](#)
30. Davies, D.; Kamdar, S.; Woolf, R.; Zlatareva, I.; Iannitto, M.L.; Morton, C.; Haque, Y.; Martin, H.; Biswas, D.; Ndagire, S. PD-1 defines a distinct, functional, tissue-adapted state in Vdelta1(+) T cells with implications for cancer immunotherapy. *Nat. Cancer* **2024**, *5*, 420–432.
31. Canaday, D.H.; Parker, K.E.; Aung, H.; Chen, H.E.; Nunez-Medina, D.; Burant, C.J. Age-dependent changes in the expression of regulatory cell surface ligands in activated human T-cells. *BMC Immunol.* **2013**, *14*, 45. [\[CrossRef\]](#)
32. Mohammadzadeh, A.; Rad, I.A.; Ahmadi-Salmasi, B. CTLA-4, PD-1 and TIM-3 expression predominantly downregulated in MS patients. *J. Neuroimmunol.* **2018**, *323*, 105–108.
33. Asashima, H.; Axisa, P.-P.; Pham, T.H.G.; Longbrake, E.E.; Ruff, W.E.; Lele, N.; Cohen, I.; Raddassi, K.; Sumida, T.S.; Hafler, D.A. Impaired TIGIT expression on B cells drives circulating follicular helper T cell expansion in multiple sclerosis. *J. Clin. Investig.* **2022**, *132*, e156254.
34. Trabattoni, D.; Saresella, M.; Pacei, M.; Marventano, I.; Mendozzi, L.; Rovaris, M.; Caputo, D.; Borelli, M.; Clerici, M. Costimulatory pathways in multiple sclerosis: Distinctive expression of PD-1 and PD-L1 in patients with different patterns of disease. *J. Immunol.* **2009**, *183*, 4984–4993. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
35. Yang, L.; Anderson, D.E.; Kuchroo, J.; Hafler, D.A. Lack of TIM-3 immunoregulation in multiple sclerosis. *J. Immunol.* **2008**, *180*, 4409–4414. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
36. Koguchi, K.; Anderson, D.E.; Yang, L.; O'Connor, K.C.; Kuchroo, V.K.; Hafler, D.A. Dysregulated T cell expression of TIM3 in multiple sclerosis. *J. Exp. Med.* **2006**, *203*, 1413–1418. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
37. Khademi, M.; Illés, Z.; Gielen, A.W.; Marta, M.; Takazawa, N.; Baecher-Allan, C.; Brundin, L.; Hannerz, J.; Martin, C.; Harris, R.A.; et al. T Cell Ig- and mucin-domain-containing molecule-3 (TIM-3) and TIM-1 molecules are differentially expressed on human Th1 and Th2 cells and in cerebrospinal fluid-derived mononuclear cells in multiple sclerosis. *J. Immunol.* **2004**, *172*, 7169–7176. [\[CrossRef\]](#)
38. Garcia, C.R.; Jayswal, R.; Adams, V.; Anthony, L.B.; Villano, J.L. Multiple sclerosis outcomes after cancer immunotherapy. *Clin. Transl. Oncol.* **2019**, *21*, 1336–1342. [\[CrossRef\]](#)
39. Gerdes, L.A.; Held, K.; Beltrán, E.; Berking, C.; Prinz, J.C.; Junker, A.; Tietze, J.K.; Ertl-Wagner, B.; Straube, A.; Kümpfel, T.; et al. CTLA4 as Immunological Checkpoint in the Development of Multiple Sclerosis. *Ann. Neurol.* **2016**, *80*, 294–300. [\[CrossRef\]](#)
40. Khoury, S.J.; Rochon, J.; Ding, L.; Byron, M.; Ryker, K.; Tosta, P.; Gao, W.; Freedman, M.S.; Arnold, D.L.; Sayre, P.H.; et al. ACCLAIM: A randomized trial of abatacept (CTLA4-Ig) for relapsing-remitting multiple sclerosis. *Mult. Scler. J.* **2017**, *23*, 686–695. [\[CrossRef\]](#)
41. Schuh, E.; Berer, K.; Mulazzani, M.; Feil, K.; Meinel, I.; Lahm, H.; Krane, M.; Lange, R.; Pfannes, K.; Subklewe, M.; et al. Features of Human CD3+CD20+ T Cells. *J. Immunol.* **2016**, *197*, 1111–1117. [\[CrossRef\]](#)
42. von Essen, M.R.; Talbot, J.; Hansen, R.H.H.; Chow, H.H.; Lundell, H.; Siebner, H.R.; Sellebjerg, F. Intrathecal CD8(+)CD20(+) T Cells in Primary Progressive Multiple Sclerosis. *Neurol. Neuroimmunol. Neuroinflamm.* **2023**, *10*, e200140.
43. von Essen, M.R.; Ammitzbøll, C.; Hansen, R.H.; Petersen, E.R.; McWilliam, O.; Marquart, H.V.; Damm, P.; Sellebjerg, F. Proinflammatory CD20+ T cells in the pathogenesis of multiple sclerosis. *Brain* **2019**, *142*, 120–132. [\[CrossRef\]](#)
44. Howlett-Prieto, Q.; Feng, X.; Kramer, J.F.; Kramer, K.J.; Houston, T.W.; Reder, A.T. Anti-CD20 therapy corrects a CD8 regulatory T cell deficit in multiple sclerosis. *Mult. Scler.* **2021**, *27*, 2170–2179. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

45. Lovett-Racke, A.E.; Gormley, M.; Liu, Y.; Yang, Y.; Graham, C.; Wray, S.; Racke, M.K.; Shubin, R.; Twyman, C.; Alvarez, E.; et al. B cell depletion with ublituximab reshapes the T cell profile in multiple sclerosis patients. *J. Neuroimmunol.* **2019**, *332*, 187–197. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Velikkakam, T.; Gollob, K.J.; Dutra, W.O. Double-negative T cells: Setting the stage for disease control or progression. *Immunology* **2021**, *165*, 371–385. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Wu, Z.; Zheng, Y.; Sheng, J.; Han, Y.; Yang, Y.; Pan, H.; Yao, J. CD3(+)CD4(-)CD8(-) (Double-Negative) T Cells in Inflammation, Immune Disorders and Cancer. *Front. Immunol.* **2022**, *13*, 816005. [[CrossRef](#)]
48. Crispín, J.C.; Oukka, M.; Bayliss, G.; Cohen, R.A.; Van Beek, C.A.; Stillman, I.E.; Kytтары, V.C.; Juang, Y.T.; Tsokos, G.C. Expanded double negative T cells in patients with systemic lupus erythematosus produce IL-17 and infiltrate the kidneys. *J. Immunol.* **2008**, *181*, 8761–8766. [[CrossRef](#)]
49. Shivakumar, S.; Tsokos, G.C.; Datta, S.K. T cell receptor alpha/beta expressing double-negative (CD4-/CD8-) and CD4+ T helper cells in humans augment the production of pathogenic anti-DNA autoantibodies associated with lupus nephritis. *J. Immunol.* **1989**, *143*, 103–112. [[CrossRef](#)]
50. Sieling, P.A.; Porcelli, S.A.; Duong, B.T.; Spada, F.; Bloom, B.R.; Diamond, B.; Hahn, B.H. Human Double-Negative T Cells in Systemic Lupus Erythematosus Provide Help for IgG and Are Restricted by CD1c. *J. Immunol.* **2000**, *165*, 5338–5344. [[CrossRef](#)]

Disclaimer/Publisher’s Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

3. Diskussion

Dieser Abschnitt stellt eine Erweiterung der Diskussion in der Publikation dar.

3.1. Die Relevanz von CD5⁺ B-Zellen bei der Multiplen Sklerose

Wir konnten eine vermehrte Expression von CD5 (gemessen an der mittleren Fluoreszenzintensität) auf der Gesamt-B-Zell-Population sowie eine Expansion einer CD5⁺CD19⁺CD20⁻ B-Zellpopulation nach Therapie mit einem anti-CD20 Antikörper (OCR oder OFA) im Vergleich zu Patient:innen mit therapienaiver schubförmiger MS (tnRRMS) identifizieren. Diese Expansion war bei mit OCR-behandelten ausgeprägter als bei mit OFA-behandelten Patient:innen. CD5-exprimierende B-Zell-Subpopulationen gelten als eine polyreaktive, komplexe Gruppe humaner B-Zellen, die mit der Produktion autoreaktiver Antikörper in Verbindung gebracht wurde [44, 45]. CD5⁺ murine B-1-Zellen wurden als unreife, polyreaktive Antikörper-produzierende Zellen beschrieben, die ein eingeschränktes Repertoire an V-Genen und eine geringere junktionale Diversität aufweisen als aus dem Knochenmark stammende B-2-Zellen. Humane, B1-ähnliche CD5⁺ Zellen wurden sowohl in fetalen Lymphknoten [46] und der Milz [47] als auch im Blut aus der Nabelschnurvene [48] nachgewiesen. Aufgrund der phänotypischen Überlappung mit aktivierten B-Zellen ist diese Population B-1-ähnlicher Zellen beim Menschen jedoch schwer zu charakterisieren. Die sowohl protektiven als auch pathogenen Eigenschaften CD5-exprimierender, humaner B-Zellpopulationen haben ihre therapeutische Relevanz bislang stark eingeschränkt. CD5⁺ B-Zellen werden jedoch mit der Pathogenese und Regulation der MS sowie anderer Autoimmunerkrankungen in Verbindung gebracht.

In Mausmodellen wurde eine protektive Rolle von CD5⁺ B-Zellen beobachtet. Yanaba et al. konnte in einer Studie zur Analyse der T-Zell-vermittelten Immunantwort bei CD19-defizienten Mäusen im Vergleich zu CD20-depletierten Wildtyp-Mäusen und Mäusen mit hyperaktiven B-Zellen infolge einer CD19-Überexpression eine distinkte regulatorische Subpopulation von CD1d^{hi}CD5⁺-B-Zellen identifizieren, die T-Zell-vermittelte Entzündungsprozesse modulierte [49]. Diese CD1d^{hi}CD5⁺ B-Zellpopulation war in CD19-defizienten Mäusen nicht nachweisbar, machte 1–2 % der B220⁺-Milzzellen in Wildtyp-Mäusen aus und war in Mäusen mit hyperaktiven B-Zellen auf bis zu 10 % erhöht. Die Produktion von IL-10 war auf diese Subpopulation beschränkt und in CD19-defizienten Tieren vermindert. Der adoptive Transfer dieser B-Zellen in CD19-defiziente sowie Wildtyp-Mäuse normalisierte die T-Zell-vermittelte Entzündung, was die regulatorische Wirkung IL-10-produzierender CD5⁺ B-Zellen belegt [49]. In einem murinen Modell des Typ-1-Diabetes konnte ebenfalls eine protektive Funktion von IL-10-produzierenden CD19⁺CD5⁺ B-Zellen

gezeigt werden. Diese schützten vor der Infiltration pankreatischer Inselzellen durch „diabetogene“ T-Zellen. Die gezielte Deletion IL-10-produzierender CD5⁺ B-Zellen beeinträchtigte die Selbsttoleranz gegenüber Inselzellautoantigenen [50, 51]. Auch beim systemischen Lupus erythematoses (SLE) wird den CD5⁺ B-Zellen eine protektive Rolle zugeschrieben. Diese Schutzfunktion wird hauptsächlich durch die volle Länge des CD5-Proteins vermittelt, die vom *E1A*-Gen codiert wird. Diese Variante transloziert SHP-1 – einen zentralen negativen Regulator immunologischer Signalwege – zum B-Zell-Rezeptor (BCR), was die Aktivierungsschwelle für den BCR erhöht und die autoreaktive B-Zell-Antworten begrenzt. Im Gegensatz dazu verbleibt die durch das *E1B*-Gen codierte, verkürzte CD5-Variante zusammen mit SHP-1 im Zytoplasma. Wird *E1B* nicht durch Methylierung adäquat stillgelegt, persistiert die verkürzte Variante, was die regulatorische Funktion von SHP-1 stört. Diese Störung begünstigt die Entstehung des SLE, da sie eine unkontrollierte Expansion autoreaktiver B-Zellen ermöglicht [52]. Niino et al. zeigten bei MS-Patient:innen, dass der Anteil CD5-positiver Zellen innerhalb der Gedächtnis-B-Zellpopulation (CD27⁺) in der Remissionsphase signifikant höher ist als während eines Krankheitsschubs [53]. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass die CD5-Expression auf B-Zellen bei Patient:innen mit sekundär progredienter MS (SPMS) deutlich vermindert ist [54].

Allerdings wurde auch eine pathogene Rolle von CD5⁺ B-Zellen bei MS nachgewiesen. In Vorarbeiten konnte eine signifikant höhere CD5-Expression auf B-Lymphozyten von Patient:innen mit aktiver MS als auf B-Lymphozyten von Patient:innen mit stabiler Erkrankung nachgewiesen werden. Villar et al. untersuchten darüber hinaus die Rolle oligoklonaler Immunoglobulin M (IgM)-Banden im Liquor cerebrospinalis (CSF) als prognostischen Marker bei MS und identifizierten CD5⁺ B-Lymphozyten als die Subpopulation, die für die Sekretion von IgM-Antikörpern – insbesondere gegen nicht-proteinhaltige Moleküle wie Myelinlipide – verantwortlich ist. Sie stellten fest, dass Patient:innen mit diesen anti-Lipid-IgM-Antikörpern eine höhere Schubfrequenz zeigten, früher einen zweiten Schub erlitten und eine stärkere Behinderungsprogression aufwiesen. Daraus leiteten sie ab, dass diese Antikörper einen starken Prädiktor für einen aggressiven Krankheitsverlauf und eine ungünstige Prognose darstellen [55]. Eine FACS-Analyse von Liquor und peripherem Blut bei insgesamt 45 MS-Patient:innen, 14 Patient:innen mit aseptischer Meningitis und einer Kontrollgruppe von 36 Patient:innen mit Spannungskopfschmerz durch Correale et al. zeigte, dass CD5⁺CD19⁺ B-Zellen bei MS vermehrt intrathekal auftraten. Zudem war die HLA-DR-Expression in CD5⁺ B-Zellen im Vergleich zu CD5⁻ B-Zellen reduziert. Die Autor:innen schlossen daraus, dass die Funktion CD5⁺ B-Zellen im CSF weniger in der Antigenpräsentation als vielmehr in der intrathekalen Autoantikörperproduktion liegt, was auf eine potenziell pathogene Rolle dieser B-Zellpopulation hindeutet [56].

Der in unserer Analyse beobachtete Anstieg der CD5-Expression auf B-Zellen sowohl einen Monat (m1) als auch zwölf Monate (m12) nach Beginn einer Therapie mit einem Anti-CD20-Antikörper könnte ein Hinweis für eine relevante Rolle dieser Zellpopulation sein. Die ausgeprägtere Expansion bei mit OCR-behandelten Patient:innen zu m12 könnte auf einen differenziellen Effekt von OCR im Vergleich zu OFA auf das B-Zell-Kompartiment hindeuten und möglicherweise einen nachhaltigeren oder tiefgreifenderen Einfluss von OCR auf die B-Zell-Population widerspiegeln. Darüber hinaus liefern die in unserer Untersuchung beobachteten Korrelationen zwischen der CD5-Expression auf B-Zellen zu Baseline und klinischen Parametern bei Patient:innen mit therapienaiver schubförmiger MS (tnRRMS) weitere Evidenz für einen potenziellen pathophysiologischen Stellenwert dieser Zellen. Die negative Korrelation zwischen der CD5-Expression zur Baseline und dem EDSS-Grad zur Baseline und m1 legt nahe, dass eine höhere Ausgangs-Expression von CD5 auf B-Zellen mit einem geringeren Behinderungsgrad assoziiert sein könnte. Dies deutet auf eine mögliche protektive oder regulatorische Funktion der CD5⁺ B-Zellen im Sinne der Aufrechterhaltung einer immunologischen Homöostase und einer potenziellen Prävention weiterer neurologischer Schäden hin. Umgekehrt zeigt die positive Korrelation zwischen CD5-Expression und der Zeit seit dem letzten Schub, dass CD5-Positivität auf B-Zellen möglicherweise mit Krankheitsremission assoziiert ist. Hierbei ist eine Verringerung der Schubaktivität durch regulatorische Mechanismen denkbar. Diese Beobachtungen stehen im Einklang mit früheren Studien, die die komplexe Rolle von CD5⁺-B-Zellen bei MS betont haben. Es wird angenommen, dass CD5⁺ B-Zellen zur Autoimmunität und Krankheitsprogression beitragen könnten, insbesondere durch die Produktion von Autoantikörpern. Gleichzeitig scheint diese Subpopulation jedoch auch regulatorische Funktionen ausüben zu können. Die Expansion dieser Zellpopulation unter einer B-Zell-depletierenden Therapie deutet darauf hin, dass sie an der Wiederherstellung des immunologischen Gleichgewichts beteiligt sein könnten. Die in unserer Kohorte beobachtete Population könnte hierbei dem Subtyp der B10-Zellen bzw. regulatorischen B-Zellen (CD5⁺CD19⁺CD1d^{hi}) entsprechen [2]. Die beobachtete Expansion von CD5⁺CD19⁺ B-Zellen unter einer B-Zell-depletierenden Therapie – insbesondere bei OCR-behandelten Patient:innen – sowie die Korrelationen mit klinischen Parametern unterstreichen die Notwendigkeit einer weiterführenden Charakterisierung dieser dynamischen Zellpopulation, um die Bedeutung der CD5-Expression auf B-Zellen besser zu verstehen.

3.2. CTLA-4, TIGIT, TIM-3, und PD-1 Expression bei der MS

CTLA-4, TIGIT, TIM-3 und PD-1 sind Marker für Erschöpfung und Aktivierung von Immunzellen. Während die Rolle dieser Erschöpfungs- und Aktivierungsmarker im

onkologischen Kontext gut beschrieben ist, ist ihre Bedeutung bei Autoimmunerkrankungen wie der Multiplen Sklerose deutlich weniger untersucht worden. In unserer Analyse fanden wir signifikante Anstiege der Marker CTLA-4, TIGIT, TIM-3 und PD-1 unter einer B-Zell-depletierenden Therapie im Vergleich zu Patient:innen mit tnRRMS. Diese Marker waren nicht nur auf CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen erhöht, sondern auch auf B-Zellen, NK-Zellen und NK-T-Zellen. Bereits zum Zeitpunkt m1 zeigte sich eine erhöhte TIM-3-Expression auf CD8⁺ T-Zellen, die bis m12 weiter zunahm – insbesondere in der OCR-behandelten Gruppe. Ähnliche Anstiege beobachteten wir bei der TIGIT-Expression auf CD4⁺ T-Zellen, CD4⁺CD8⁺ T-Zellen sowie NK-T-Zellen; auch die Spiegel von PD-1 und CTLA-4 stiegen im Therapieverlauf an. Die Expression von TIM-3 und TIGIT auf B-Zellen, NK-Zellen und NK-T-Zellen blieb bis m12 signifikant erhöht, mit einem besonders ausgeprägten Effekt bei Patient:innen unter OCR-Therapie. Korrelationen mit klinischen Daten zeigten, dass die TIM-3-Expression auf CD4⁺ T-Zellen sowie TIGIT auf CD8⁺ T-Zellen zu Baseline negativ mit dem EDSS-Wert assoziiert waren. Im Gegensatz dazu korrelierte die TIGIT-Expression auf CD8⁺, CD4⁺CD8⁺ T-Zellen, B-Zellen und NK-Zellen positiv mit der Krankheitsdauer. Es ist denkbar, dass eine durch chronische Inflammation induzierte T-Zell-Erschöpfung im Verlauf zunimmt und so zu einer allmählichen Reduktion der Entzündungsaktivität beiträgt. Die von uns beobachtete positive Korrelation zwischen Krankheitsdauer und TIGIT-Expression sowie negative Korrelationen zwischen TIGIT-Expression und EDSS-Wert könnte diesen Prozess widerspiegeln.

Die Expression von Erschöpfungs- und Aktivierungsmarkern ist bei MS-Patient:innen im Vergleich zu gesunden Kontrollen überwiegend herunterreguliert [57]. Asashima et al. untersuchten die Rolle der B-Zell-Funktion bei schubförmig remittierender MS (RRMS) und stellten fest, dass eine veränderte B-Zell-Aktivität – insbesondere eine gestörte TIGIT-Expression infolge einer Dysregulation des Transkriptionsfaktors TCF4 – zur Pathogenese der Erkrankung beitragen könnte [58]. Die Autoren identifizierten eine differenzielle Genexpression in mehreren B-Zell-Signalwegen bei MS-Patient:innen im Vergleich zu gesunden Kontrollen, mit einem besonderen Fokus auf der Interaktion zwischen TIGIT⁺ B-Zellen und CD155-exprimierenden zirkulierenden follikulären T-Helferzellen (cTfh-Zellen). Die Studie zeigte, dass TIGIT auf B-Zellen in der Lage ist, IL-17-produzierende cTfh-Zellen zu unterdrücken – eine Regulation, die bei MS-Patient:innen gestört ist, bei denen zudem ein Anstieg CCR6⁺ cTfh-Zellen festgestellt wurde. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass eine Dysregulation des TIGIT/CD155-Rückkopplungssystems zwischen Gedächtnis-B-Zellen und cTfh-Zellen zur immunologischen Aktivierung bei MS beiträgt [58]. Trabattoni et al. untersuchten die Expression kostimulatorischer Moleküle sowie die Zytokinproduktion bei Patient:innen mit RRMS und fanden, dass PD-1-exprimierende T-Zellen sowie PD-L1-exprimierende B-Zellen und Monozyten bei stabiler MS im Vergleich zur akuten Phase

signifikant erhöht waren [59]. Die höchsten Spiegel von CD19⁺PD-L1⁺-Zellen wurden bei Patient:innen mit stabiler Erkrankung gemessen und korrelierten mit einer gesteigerten IL-10-Produktion. Analysen von IL-10-produzierenden und PD-L1-exprimierenden CD19⁺- und CD14⁺-Zellen in MBP-stimulierten Kulturen zeigten signifikante Anstiege bei stabiler im Vergleich zu akuter MS. Diese Hochregulation des PD-1/PD-L1-Signalwegs während stabiler Krankheitsphasen wurde mit einer verstärkten IL-10-Produktion, erhöhter Apoptose sowie reduzierter Proliferation MBP-spezifischer CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen in Verbindung gebracht [59]. In einer Studie mit 72 Patient:innen mit aggressiver Multipler Sklerose, charakterisiert durch die Bildung lipidspezifischer oligoklonaler IgM-Banden (LS-OCMB), wurde ein altersabhängiger Anstieg der TIM-3-Expression sowie ein korrespondierender Anstieg des PD-L1-Spiegels im CSF nachgewiesen, was auf eine potenzielle Rolle dieser Marker im Prozess der Immunesenzienz hinweist [60]. Kroner et al. zeigten, dass die Kombination aus genetischem PD-1-Mangel und einer Myelinopathie (primäre Oligodendrozytenschädigung im PLP_{tg}-Mausmodell) zu einem früheren Krankheitsbeginn, einer erhöhten Krankheitsaktivität und verstärkter Immunzellinfiltration führte [61].

Yang et al. zeigten, dass TIM-3 bei unbehandelten MS-Patient:innen dysreguliert ist, was zu einer beeinträchtigten TIM-3-vermittelten Immunregulation führt. Eine Blockade von TIM-3 bei gesunden Kontrollpersonen führte zu einer gesteigerten IFN- γ -Sekretion – ein Effekt, der bei unbehandelten MS-Patient:innen ausblieb, was auf einen funktionellen Defekt hinweist [62]. Dieser Defekt konnte jedoch durch eine Behandlung mit Glatirameracetat oder Interferon- β rückgängig gemacht werden. Die Wiederherstellung der TIM-3-Expression und -Funktion bei behandelten Patient:innen deutet darauf hin, dass diese Therapien zumindest teilweise durch die Reaktivierung der TIM-3-vermittelten Regulation der T-Zell-Funktion wirken könnten [62]. Koguchi et al. generierten insgesamt 104 T-Zell-Klone aus dem CSF von sechs MS-Patient:innen [63]. Sie stellten fest, dass die MS-Klone trotz erhöhter IFN- γ -Sekretion paradoxerweise eine geringere Expression von TIM-3 und T-bet aufwiesen als Kontrollklone. Eine Polarisierung mit Interleukin-12 führte zu einer weiteren Steigerung der IFN- γ -Produktion und gleichzeitig zu einer Abnahme der TIM-3-Expression in den MS-Klonen – ein Hinweis auf eine gestörte TIM-3-Regulation. Die reduzierte TIM-3-Expression war mit einer Resistenz gegenüber Toleranzinduktion sowie mit erhöhter T-Zell-Proliferation und IFN- γ -Sekretion assoziiert. Dies deutet darauf hin, dass eine beeinträchtigte TIM-3-Hochregulation einen intrinsischen Defekt darstellen könnte, der zur Pathogenese der MS beiträgt [63]. In unserer Population korrelierte PD-1- und TIM-3-Expression auf B- und NKT-Zellen jedoch positiv mit dem EDSS, was von der Literatur abweicht.

Einen Schub oder das erstmalige Auftreten einer Multiplen Sklerose stellt eine seltene, jedoch schwerwiegende Komplikation im Zusammenhang mit einer Immun-Checkpoint-Inhibitor (ICI)-Therapie dar. In einer Analyse der Datenbank des FDA Adverse Event

Reporting System (FAERS) sowie zusätzlicher Fallberichte wurden 14 Fälle von MS bei Patient:innen identifiziert, die eine ICI-Therapie aufgrund metastasierter Krebserkrankungen erhalten hatten [64]. In 57,1 % dieser Fälle lag eine gesicherte MS-Vorgeschichte vor. Drei dieser Patient:innen hatten während der Therapie Glatirameracetat und eine Person Interferon- β erhalten. Vier Patient:innen erhielten während der ICI-Therapie keine MS-spezifische Behandlung. Das mediane Intervall bis zum Auftreten neurologischer Symptome betrug 29 Tage nach Beginn der ICI-Therapie, wobei in mehreren Fällen eine rasche Krankheitsprogression beobachtet wurde. In sämtlichen Fällen wurde die ICI-Therapie nach gesicherter klinischer MS-Diagnose abgebrochen. Eine Patientin, bei der nach einem milden MS-Schub aufgrund eines günstigen onkologischen Ansprechens eine Re-Therapie mit Ipilimumab erfolgte, entwickelte eine signifikante Verschlechterung der MS-Symptomatik, was zum endgültigen Abbruch der Behandlung führte. In zwei weiteren Fällen kam es zu einem schweren Schubverlauf mit rascher Progression und unzureichendem Ansprechen auf die MS-Therapie. Bei fünf Patient:innen bildeten sich die Symptome zurück, während drei andere eine fortschreitende MS mit signifikanter Behinderung erlitten. Die mediane Gesamtdauer des unerwünschten Ereignisses betrug 56 Tage. Die mediane Symptombdauer bei PD-Achsen-Inhibitoren lag bei vier Wochen, während sie unter CTLA-4-Inhibitoren tendenziell länger war (zwölf Wochen gegenüber vier Wochen), jedoch ohne statistische Signifikanz ($p = 0,700$) [64]. Gerdes et al. berichteten über einen Fall, bei dem sich während einer Behandlung mit dem CTLA-4-blockierenden Antikörper Ipilimumab, zur Therapie eines metastasierten Melanoms, eine MS manifestierte. Die Patientin wies initial subklinische MRT-Veränderungen auf, die als radiologisch isoliertes Syndrom (RIS) klassifiziert wurden. Nach zwei Ipilimumab-Zyklen kam es zu klinischen MS-Schüben, darunter einem mit deutlicher MRT-Aktivität. Eine Hirnbiopsie bestätigte eine aktive, T-Zell-vermittelte MS [65]. Im Gegensatz dazu zeigte die ACCLAIM-Studie keinen signifikanten Einfluss von Abatacept (CTLA-4-Ig) auf die Anzahl neuer Gadolinium-anreichernder MRT-Läsionen oder auf klinische Aktivitätsparameter bei RRMS [66].

Unsere Ergebnisse tragen zur zunehmenden Evidenz bei, dass CTLA-4, TIGIT, TIM-3 und PD-1 eine bedeutende Rolle bei der Immunpathologie der MS spielen könnten. Wir konnten eine erhöhte Expression dieser Marker auf verschiedenen Immunzelltypen unter B-Zell-depletierenden Therapien beobachten. Die klinischen Korrelationen deuten zudem auf eine klinische Relevanz dieser Veränderungen hin. Diese Befunde stehen im Einklang mit früheren Studien, die gezeigt haben, dass eine beeinträchtigte Expression dieser Marker negative Auswirkungen auf den Verlauf der MS hat, und legen nahe, dass ihre Dysregulation zur Krankheitsentstehung beitragen könnte. Diese Hypothese wird zusätzlich durch die beobachtete Zunahme der Krankheitsaktivität nach ICI-Therapie untermauert.

3.3. Regulatorische T-Zellen und CD4/CD8-negative T-Zell-Subpopulationen

T_{REG} regulieren Anzahl und Funktion autoreaktiver T-Zellen und sind somit unmittelbar relevant für die Pathophysiologie der Multiplen Sklerose. Sie sind essenziell für die Aufrechterhaltung der peripheren Toleranz und haben im murinen EAE-Modell protektive Effekte gezeigt [67-70]. Ein Anstieg der T_{REG}-Frequenzen nach CD20-Depletion wurde in der Literatur berichtet und deutet auf eine Verschiebung zu einem antiinflammatorischen Zustand hin [71, 72]. Unsere Beobachtung, dass T_{REG} sowohl bei mit OFA als auch mit OCR behandelten Patient:innen signifikant erhöht waren – mit stärkerem Anstieg unter OCR –, steht im Einklang mit klinischen Daten, denen zufolge Ocrelizumab möglicherweise eine tiefgreifendere Depletion von CD20⁺ Zellen bewirkt und dadurch einen ausgeprägteren Einfluss auf die Immunrekonstitution im Vergleich zu OFA ausübt.

Doppelt negative (DN) T-Zellen, die weder CD4- noch CD8-Korezeptoren exprimieren, welche für die Stabilisierung der TCR-MHC-Interaktion notwendig sind, sind vorwiegend an der nichtklassischen Antigenpräsentation über CD1-Moleküle beteiligt [73]. Diese Zellen weisen eine natürliche suppressive Aktivität auf, die nicht MHC-restringiert ist. Ihre Aktivierung und regulatorische Funktion werden vermutlich hauptsächlich durch direkten Zell-Zell-Kontakt und TCR-Signale, weniger durch Zytokine, vermittelt [74]. DN-T-Zellen sind in Autoimmunerkrankungen aktiviert und wurden mit Krankheitsbildern wie SLE, rheumatoider Arthritis, Typ-1-Diabetes und Sjögren-Syndrom in Verbindung gebracht [75, 76]. Insbesondere bei SLE sind sie mit verstärkter Inflammation und Gewebeschädigung assoziiert, da sie betroffene Organe infiltrieren und zur Krankheitsprogression beitragen [77]. Durch unüberwachtes Clustering der CD3⁺ T-Zellpopulation identifizierten wir drei distinkte Subpopulationen von DN-T-Zellen (CD4⁻CD8⁻), die bei OCR- und OFA-behandelten RRMS-Patient:innen im Vergleich zu therapienaiven RRMS-Patient:innen (tnRRMS) deutlich reduziert waren. Besonders auffällig war ein signifikanter Rückgang der KLRG1⁻HLADR⁺ DN-T-Zellen bei OFA-behandelten Patient:innen zu m12 im Vergleich zu tnRRMS. Zudem waren sowohl KLRG1⁺HLADR⁻ als auch KLRG1⁺HLADR⁺ DN-T-Zellen bei beiden Therapiegruppen (OCR und OFA) zu m1 und m12 signifikant reduziert, was auf einen anhaltenden Therapieeffekt auf diese Subpopulationen im Zeitverlauf hinweist. Darüber hinaus fanden wir, dass ein signifikant höherer Anteil der DN-T-Zellen CD20 exprimierte im Vergleich zu CD4⁺ und/oder CD8⁺ T-Zellen. Diese Beobachtung könnte eine potenzielle Erklärung für deren Reduktion unter OCR- und OFA-Therapie liefern. Der Rückgang der DN-T-Zellen in unserer Studie deutet auf eine antiinflammatorische Immunrekonstitution durch B-Zell-depletierende Therapien hin, wobei die Therapien möglicherweise direkt oder indirekt zur Reduktion pathogener DN-T-Zellpopulationen bei RRMS beitragen.

Zudem korrelierte der Anteil der KLRG1⁺HLADR⁺ DN-T-Zellen positiv mit der Anzahl der Schübe vor Studienbeginn, was darauf hinweist, dass diese spezifische DN-T-Zell-Subpopulation an Krankheitsaktivität und Schubfrequenz beteiligt sein könnte. Die beobachtete Reduktion dieser Zellen unter B-Zell-depletierenden Therapien könnte daher einen Beitrag zur klinischen Wirksamkeit von OCR und OFA hinsichtlich der Reduktion von MS-Schüben leisten.

3.4. Schlussfolgerungen

Unsere 12-Monats-Analyse liefert interessante Einblicke in die Immunzellveränderungen unter OCR- und OFA-Therapie bei RRMS. Wir konnten eine Expansion von CD5⁺CD19⁺ B-Zellen, insbesondere bei OCR-behandelten Patient:innen, sowie eine erhöhte Expression der Marker CTLA-4, PD-1, TIGIT und TIM-3 auf verschiedenen Immunzelltypen beobachten. Zudem zeigte sich ein Anstieg der T_{REG}. Wie erwartet führte die B-Zell-Depletion zu einer signifikanten Reduktion der CD20⁺ B-Zellen, allerdings unter der Depletion wurde auch eine Abnahme DN-T-Zellen beobachtet. Die deutliche Reduktion der DN-T-Zellen nach Therapie legt nahe, dass OCR und OFA zur Verringerung einer potenziell pathogenen Zellpopulation beitragen, die mit der Progression der MS in Verbindung gebracht werden kann. Die Expansion von CD5⁺CD19⁺ B-Zellen nach B-Zell-Depletion – besonders unter OCR – ist vor dem Hintergrund ihrer komplexen Rolle in der Immunregulation bemerkenswert. Diese Expansion könnte eine adaptive Reaktion darstellen, die auf die Wiederherstellung des immunologischen Gleichgewichts abzielt und möglicherweise zur Kontrolle überschießender Immunaktivität beiträgt.

Die von uns beobachteten Korrelationen zwischen CD5⁺ B-Zellen und klinischen Parametern, wie niedrigeren EDSS-Werten und längeren Zeiträumen seit dem letzten Schub, deuten auf eine potenziell protektive Rolle dieser Zellen im Krankheitsverlauf hin. Der Anstieg der Expression von Erschöpfungs-/Aktivierungsmarkern in verschiedenen Immunzellpopulationen unter OCR- und OFA-Therapie weist auf einen immunologischen Zustand mit vermindertem inflammatorischem Potenzial hin. Ein tieferes Verständnis der spezifischen Funktionen und regulatorischen Mechanismen von DN-T-Zellen und CD5⁺ B-Zellen sowie der Bedeutung der erhöhten Immuncheckpoint-Expression könnte zur Optimierung therapeutischer Strategien beitragen.

Zusammenfassend konnten unsere Daten Veränderungen der peripheren Immunzellpopulationen nachweisen, welche über eine isolierte Depletion von CD20⁺ B-Zellen hinausgehen. Diese Veränderungen der peripheren Immunantwort liefern einen wichtigen Beitrag zum mechanistischen Verständnis B-Zell-depletierender Therapien und deren Effekte auf den klinischen Verlauf von Patient:innen mit RRMS. Weitergehende Analysen der Kohorte nach

Studienabschluss sind vorgesehen, um unser Verständnis der langanhaltenden Effekte der B-Zell-depletierenden Therapien bei MS noch zu erweitern.

4. Literatur- und Quellenverzeichnis

1. Hauser, S.L. and B.A.C. Cree, *Treatment of Multiple Sclerosis: A Review*. Am J Med, 2020. **133**(12): p. 1380-1390 e2.
2. Barrie, W., et al., *Elevated genetic risk for multiple sclerosis emerged in steppe pastoralist populations*. Nature, 2024. **625**(7994): p. 321-328.
3. Breuer, J., et al., *Does the environment influence multiple sclerosis pathogenesis via UVB light and/or induction of vitamin D?* J Neuroimmunol, 2019. **329**: p. 1-8.
4. van Noort, J.M., et al., *The pathogenesis of multiple sclerosis: a series of unfortunate events*. Clin Exp Immunol, 2023. **214**(1): p. 1-17.
5. Kim, M.W. and J. Kipnis, *Glymphatics and meningeal lymphatics unlock the brain-immune code*. Immunity, 2025. **58**(5): p. 1040-1051.
6. Wang, Y., et al., *Early developing B cells undergo negative selection by central nervous system-specific antigens in the meninges*. Immunity, 2021. **54**(12): p. 2784-2794 e6.
7. van Zwam, M., et al., *Brain antigens in functionally distinct antigen-presenting cell populations in cervical lymph nodes in MS and EAE*. J Mol Med (Berl), 2009. **87**(3): p. 273-86.
8. Stern, J.N., et al., *B cells populating the multiple sclerosis brain mature in the draining cervical lymph nodes*. Sci Transl Med, 2014. **6**(248): p. 248ra107.
9. Berer, K., et al., *Commensal microbiota and myelin autoantigen cooperate to trigger autoimmune demyelination*. Nature, 2011. **479**(7374): p. 538-41.
10. Kolz, A., et al., *T-B cell cooperation in ectopic lymphoid follicles propagates CNS autoimmunity*. Sci Immunol, 2025. **10**(106): p. eadn2784.
11. Magliozzi, R., et al., *Meningeal B-cell follicles in secondary progressive multiple sclerosis associate with early onset of disease and severe cortical pathology*. Brain, 2007. **130**(Pt 4): p. 1089-104.
12. Reali, C., et al., *B cell rich meningeal inflammation associates with increased spinal cord pathology in multiple sclerosis*. Brain Pathol, 2020. **30**(4): p. 779-793.
13. Magliozzi, R., et al., *Meningeal inflammation as a driver of cortical grey matter pathology and clinical progression in multiple sclerosis*. Nat Rev Neurol, 2023. **19**(8): p. 461-476.
14. Bjornevik, K., et al., *Longitudinal analysis reveals high prevalence of Epstein-Barr virus associated with multiple sclerosis*. Science, 2022. **375**(6578): p. 296-301.
15. Agostini, S., et al., *HLA alleles modulate EBV viral load in multiple sclerosis*. J Transl Med, 2018. **16**(1): p. 80.
16. Giovannoni, G., *EBV-specific T-cell responses are telling us something important about multiple sclerosis*. Brain, 2025. **148**(3): p. 692-694.
17. Schneider-Hohendorf, T., et al., *Broader anti-EBV TCR repertoire in multiple sclerosis: disease specificity and treatment modulation*. Brain, 2025. **148**(3): p. 933-940.
18. Schafflick, D., et al., *Single-cell profiling of CNS border compartment leukocytes reveals that B cells and their progenitors reside in non-diseased meninges*. Nat Neurosci, 2021. **24**(9): p. 1225-1234.
19. Serafini, B., et al., *EBV infected cells in the multiple sclerosis brain express PD-L1: How the virus and its niche may escape immune surveillance*. J Neuroimmunol, 2024. **389**: p. 578314.

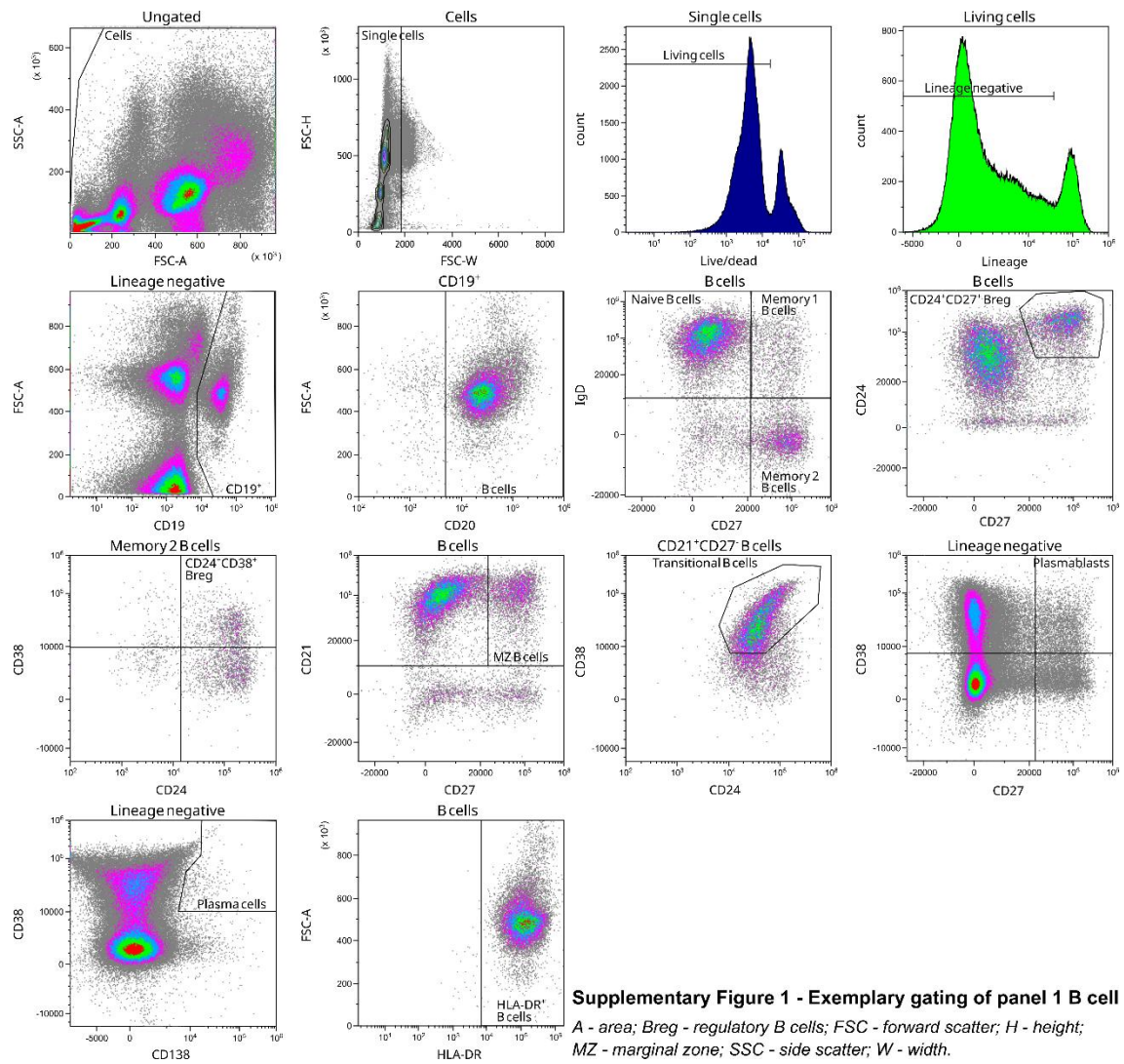
20. Bjornevik, K., et al., *Epstein-Barr virus as a leading cause of multiple sclerosis: mechanisms and implications*. Nat Rev Neurol, 2023. **19**(3): p. 160-171.
21. van Noort, J.M., et al., *The small heat-shock protein alpha B-crystallin as candidate autoantigen in multiple sclerosis*. Nature, 1995. **375**(6534): p. 798-801.
22. Lanz, T.V., et al., *Clonally expanded B cells in multiple sclerosis bind EBV EBNA1 and GlialCAM*. Nature, 2022. **603**(7900): p. 321-327.
23. Pender, M.P., *The essential role of Epstein-Barr virus in the pathogenesis of multiple sclerosis*. Neuroscientist, 2011. **17**(4): p. 351-67.
24. Bar-Or, A., et al., *Epstein-Barr Virus in Multiple Sclerosis: Theory and Emerging Immunotherapies*. Trends Mol Med, 2020. **26**(3): p. 296-310.
25. Pender, M.P., et al., *Epstein-Barr virus-specific T cell therapy for progressive multiple sclerosis*. JCI Insight, 2018. **3**(22).
26. Pender, M.P., et al., *Deficiency of CD8⁺ effector memory T cells is an early and persistent feature of multiple sclerosis*. Mult Scler, 2014. **20**(14): p. 1825-32.
27. Wood, H., *Additive effects of EBV and HHV-6A on MS risk*. Nat Rev Neurol, 2024. **20**(8): p. 456.
28. Wanke, F., et al., *EBI2 Is Highly Expressed in Multiple Sclerosis Lesions and Promotes Early CNS Migration of Encephalitogenic CD4 T Cells*. Cell Rep, 2017. **18**(5): p. 1270-1284.
29. Shiravand, Y., et al., *Immune Checkpoint Inhibitors in Cancer Therapy*. Curr Oncol, 2022. **29**(5): p. 3044-3060.
30. Chen, R.Y., et al., *The role of PD-1 signaling in health and immune-related diseases*. Front Immunol, 2023. **14**: p. 1163633.
31. Hossen, M.M., et al., *Current understanding of CTLA-4: from mechanism to autoimmune diseases*. Front Immunol, 2023. **14**: p. 1198365.
32. Tang, L., et al., *Tim-3 Relieves Experimental Autoimmune Encephalomyelitis by Suppressing MHC-II*. Front Immunol, 2021. **12**: p. 770402.
33. Yue, C., et al., *TIGIT as a Promising Therapeutic Target in Autoimmune Diseases*. Front Immunol, 2022. **13**: p. 911919.
34. Johnson, K.P., et al., *Extended use of glatiramer acetate (Copaxone) is well tolerated and maintains its clinical effect on multiple sclerosis relapse rate and degree of disability*. Copolymer 1 Multiple Sclerosis Study Group. Neurology, 1998. **50**(3): p. 701-8.
35. *Interferon beta-1b is effective in relapsing-remitting multiple sclerosis. I. Clinical results of a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. The IFNB Multiple Sclerosis Study Group*. Neurology, 1993. **43**(4): p. 655-61.
36. O'Connor, P., et al., *Randomized trial of oral teriflunomide for relapsing multiple sclerosis*. N Engl J Med, 2011. **365**(14): p. 1293-303.
37. Scannevin, R.H., et al., *Fumarates promote cytoprotection of central nervous system cells against oxidative stress via the nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 pathway*. J Pharmacol Exp Ther, 2012. **341**(1): p. 274-84.
38. Linker, R.A., et al., *Fumaric acid esters exert neuroprotective effects in neuroinflammation via activation of the Nrf2 antioxidant pathway*. Brain, 2011. **134**(Pt 3): p. 678-92.
39. Sorensen, P.S., et al., *Real-world experience of cladribine treatment in relapsing-remitting multiple sclerosis: A Danish nationwide study*. Mult Scler Relat Disord, 2023. **70**: p. 104491.
40. 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.
41. Rodriguez de Castro, B., et al., *Natalizumab: safety and risk in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis*. Eur J Hosp Pharm, 2021. **28**(2): p. 112-114.

42. Ziemssen, T., et al., *Long-term efficacy and safety of alemtuzumab in participants with highly active MS: TOPAZ clinical trial and interim analysis of TREAT-MS real-world study*. Ther Adv Neurol Disord, 2025. **18**: p. 17562864241306575.
43. Frisch, E.S., R. Pretzsch, and M.S. Weber, *A Milestone in Multiple Sclerosis Therapy: Monoclonal Antibodies Against CD20-Yet Progress Continues*. Neurotherapeutics, 2021. **18**(3): p. 1602-1622.
44. Ahmed, R., et al., *Hiding in plain sight: time to unlock autoimmune clues in human CD5+ B cells by using nextgen technology*. Discov Med, 2018. **26**(142): p. 79-83.
45. Dalloul, A., *CD5: a safeguard against autoimmunity and a shield for cancer cells*. Autoimmun Rev, 2009. **8**(4): p. 349-53.
46. Westerga, J. and W. Timens, *Immunohistological analysis of human fetal lymph nodes*. Scand J Immunol, 1989. **29**(1): p. 103-12.
47. Antin, J.H., et al., *Leu-1+ (CD5+) B cells. A major lymphoid subpopulation in human fetal spleen: phenotypic and functional studies*. J Immunol, 1986. **136**(2): p. 505-10.
48. Brennan, F., et al., *Coordinate expansion of 'fetal type' lymphocytes (TCR gamma delta+T and CD5+B) in rheumatoid arthritis and primary Sjogren's syndrome*. Clin Exp Immunol, 1989. **77**(2): p. 175-8.
49. Yanaba, K., et al., *A regulatory B cell subset with a unique CD1dhiCD5+ phenotype controls T cell-dependent inflammatory responses*. Immunity, 2008. **28**(5): p. 639-50.
50. Saxena, A., et al., *Interleukin-10 paradox: A potent immunoregulatory cytokine that has been difficult to harness for immunotherapy*. Cytokine, 2015. **74**(1): p. 27-34.
51. Xiao, Z., et al., *Inhibition of Fas ligand in NOD mice unmasks a protective role for IL-10 against insulinitis development*. Am J Pathol, 2011. **179**(2): p. 725-32.
52. Youinou, P. and Y. Renaudineau, *CD5 expression in B cells from patients with systemic lupus erythematosus*. Crit Rev Immunol, 2011. **31**(1): p. 31-42.
53. Niino, M., et al., *Memory and naive B-cell subsets in patients with multiple sclerosis*. Neurosci Lett, 2009. **464**(1): p. 74-8.
54. Niino, M., et al., *CD5-positive B cell subsets in secondary progressive multiple sclerosis*. Neurosci Lett, 2012. **523**(1): p. 56-61.
55. Villar, L.M., et al., *Intrathecal synthesis of oligoclonal IgM against myelin lipids predicts an aggressive disease course in MS*. J Clin Invest, 2005. **115**(1): p. 187-94.
56. Correale, J., et al., *CD5+ B cells and CD4-8-T cells in neuroimmunological diseases*. J Neuroimmunol, 1991. **32**(2): p. 123-32.
57. Mohammadzadeh, A., I.A. Rad, and B. Ahmadi-Salmasi, *CTLA-4, PD-1 and TIM-3 expression predominantly downregulated in MS patients*. J Neuroimmunol, 2018. **323**: p. 105-108.
58. Asashima, H., et al., *Impaired TIGIT expression on B cells drives circulating follicular helper T cell expansion in multiple sclerosis*. J Clin Invest, 2022. **132**(20).
59. Trabattoni, D., et al., *Costimulatory pathways in multiple sclerosis: distinctive expression of PD-1 and PD-L1 in patients with different patterns of disease*. J Immunol, 2009. **183**(8): p. 4984-93.
60. Picon, C., et al., *Identification of the Immunological Changes Appearing in the CSF During the Early Immunosenescence Process Occurring in Multiple Sclerosis*. Front Immunol, 2021. **12**: p. 685139.

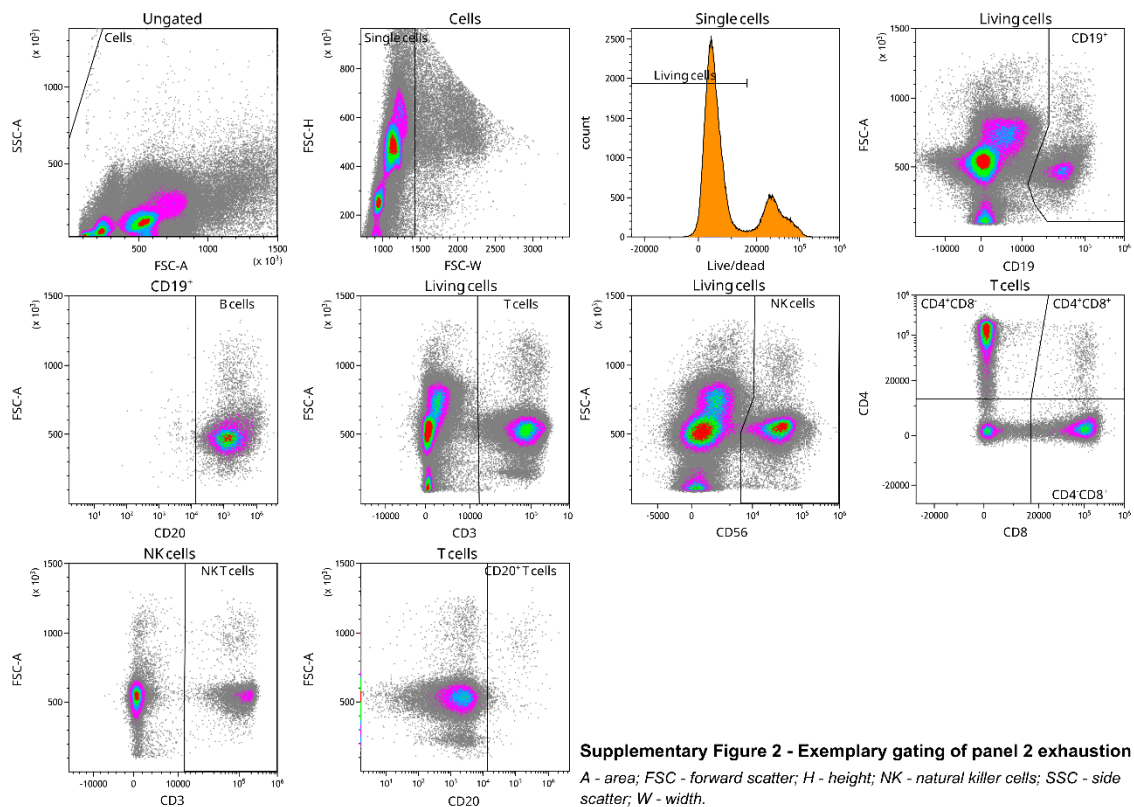
61. Kroner, A., et al., *Accelerated course of experimental autoimmune encephalomyelitis in PD-1-deficient central nervous system myelin mutants*. Am J Pathol, 2009. **174**(6): p. 2290-9.
62. Yang, L., et al., *Lack of TIM-3 immunoregulation in multiple sclerosis*. J Immunol, 2008. **180**(7): p. 4409-14.
63. Koguchi, K., et al., *Dysregulated T cell expression of TIM3 in multiple sclerosis*. J Exp Med, 2006. **203**(6): p. 1413-8.
64. Garcia, C.R., et al., *Multiple sclerosis outcomes after cancer immunotherapy*. Clin Transl Oncol, 2019. **21**(10): p. 1336-1342.
65. Gerdes, L.A., et al., *CTLA4 as Immunological Checkpoint in the Development of Multiple Sclerosis*. Ann Neurol, 2016. **80**(2): p. 294-300.
66. Khoury, S.J., et al., *ACCLAIM: A randomized trial of abatacept (CTLA4-Ig) for relapsing-remitting multiple sclerosis*. Mult Scler, 2017. **23**(5): p. 686-695.
67. Zozulya, A.L. and H. Wiendl, *The role of regulatory T cells in multiple sclerosis*. Nat Clin Pract Neurol, 2008. **4**(7): p. 384-98.
68. Kohm, A.P., et al., *Cutting edge: CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells suppress antigen-specific autoreactive immune responses and central nervous system inflammation during active experimental autoimmune encephalomyelitis*. J Immunol, 2002. **169**(9): p. 4712-6.
69. Yu, P., et al., *Specific T regulatory cells display broad suppressive functions against experimental allergic encephalomyelitis upon activation with cognate antigen*. J Immunol, 2005. **174**(11): p. 6772-80.
70. Zhang, X., et al., *IL-10 is involved in the suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis by CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells*. Int Immunol, 2004. **16**(2): p. 249-56.
71. Howlett-Prieto, Q., et al., *Anti-CD20 therapy corrects a CD8 regulatory T cell deficit in multiple sclerosis*. Mult Scler, 2021. **27**(14): p. 2170-2179.
72. Lovett-Racke, A.E., et al., *B cell depletion with ublituximab reshapes the T cell profile in multiple sclerosis patients*. J Neuroimmunol, 2019. **332**: p. 187-197.
73. Velikkakam, T., K.J. Gollob, and W.O. Dutra, *Double-negative T cells: Setting the stage for disease control or progression*. Immunology, 2022. **165**(4): p. 371-385.
74. Wu, Z., et al., *CD3(+)CD4(-)CD8(-) (Double-Negative) T Cells in Inflammation, Immune Disorders and Cancer*. Front Immunol, 2022. **13**: p. 816005.
75. Crispin, J.C., et al., *Expanded double negative T cells in patients with systemic lupus erythematosus produce IL-17 and infiltrate the kidneys*. J Immunol, 2008. **181**(12): p. 8761-6.
76. Sieling, P.A., et al., *Human double-negative T cells in systemic lupus erythematosus provide help for IgG and are restricted by CD1c*. J Immunol, 2000. **165**(9): p. 5338-44.
77. Shivakumar, S., G.C. Tsokos, and S.K. Datta, *T cell receptor alpha/beta expressing double-negative (CD4-/CD8-) and CD4⁺ T helper cells in humans augment the production of pathogenic anti-DNA autoantibodies associated with lupus nephritis*. J Immunol, 1989. **143**(1): p. 103-12.

5. Anhang

5.1. Abbildung Supplementary 1



5.2. Abbildung Supplementary 2

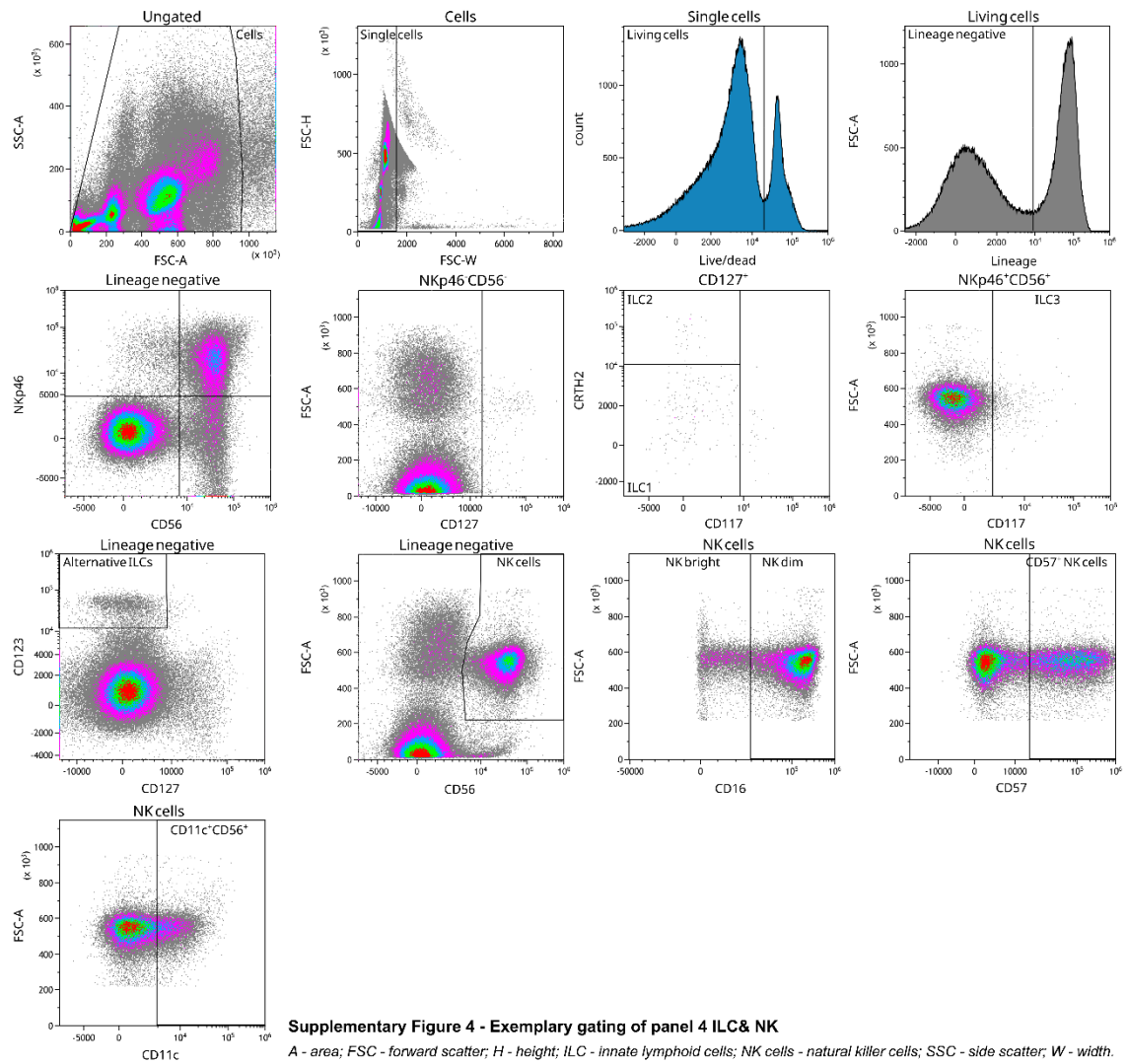


5.3. Abbildung Supplementary 3

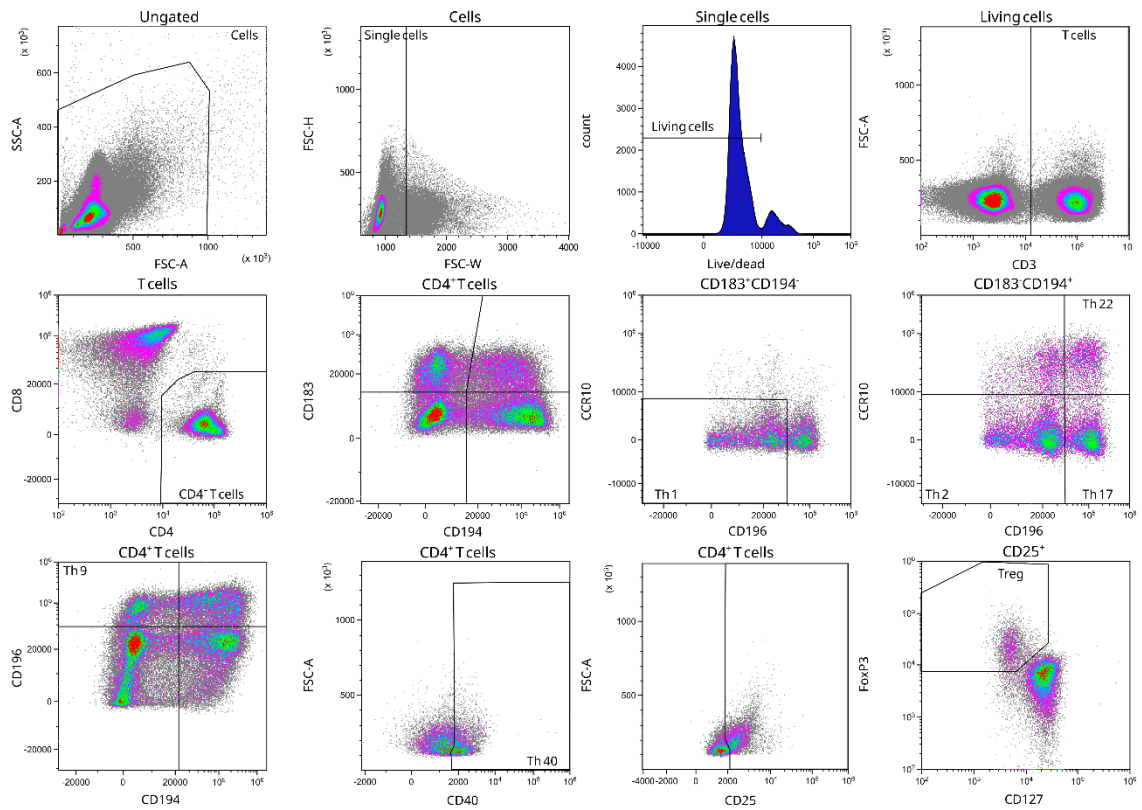


A - area; FSC - forward scatter; H - height; Lymphos - lymphocytes; SSC - side scatter; TCM - central memory T cells; TEM - effector memory T cells; TSCM - T memory stem cells; TTE - terminal effector T cells; TTM - transitional memory T cells; W - width.

5.4. Abbildung Supplementary 4



5.5. Abbildung Supplementary 5



Supplementary Figure 5 - Exemplary gating of panel 5 T cell II

A - area; FSC - forward scatter; H - height; SSC - side scatter; Th - T helper cells; Treg - regulatory T cells; W - width.

5.6. Tabelle Supplementary 1

Panel	Tissue	Antibodies (Clone, company)	Analyzed cell population & gating strategy
1 - B cell	PBMCs	CD3 (SK7, Biolegend), CD56 (HCD56, Biolegend), CD14 (M5E2, Biolegend), HLA-DR (L243, Biolegend), CD19 (HIB19, Biolegend), IgD (IA6- 2, Biolegend), CD5 (UCHT2, Biolegend), CD38 (HB-7, Biolegend), CD138 (DL-101, Biolegend), CD20 (2H7, Biolegend), CD21 (Bu32, Biolegend), CD27 (M-T271, Biolegend), CD24 (ML5, Biolegend)	Bc: CD3-/CD14-/CD56- → CD19+ → CD20+ naive Bc: CD3-/CD14-/CD56- → CD19+/CD20+ → IgD+/CD27- memory Bc: CD3-/CD14-/CD56- → CD19+/CD20+ → CD27+/IgD +/- CD24+/CD27+ Breg: CD3-/CD14-/CD56- → CD19+/CD20+ → CD24+/CD27+ CD24+/CD38+ Breg: CD3-/CD14-/CD56- → CD19+/CD20+ → IGD-/CD27+ → CD38+/CD24+ MZB: CD3-/CD14-/CD56- → CD19+/CD20+ → CD21+/CD27+ TZB: CD3-/CD14-/CD56- → CD19+/CD20+ → CD21+/CD27- → CD38+/CD24+ plasmablasts: CD3-/CD14-/CD56- → CD38+/CD27+ plasma cells: CD3-/CD14-/CD56- → CD38+/CD138+ HLA-DR+ Bc: CD3-/CD14-/CD56- → CD19+/CD20+ → HLA-DR+ MFIs: CD5 on Bc
2 - Exhaustion	PBMCs	CD3 (SK7, Biolegend), CD8 (SK1, Biolegend), CD4 (SK3, Biolegend), CD19 (HIB19, Biolegend), CD20 (2H7, Biolegend), CD56 (HCD56, Biolegend), PD-1 (EH12.2H7, Biolegend), Tim-3 (F38-2E2, Biolegend), CTLA-4 (BNI3, Biolegend), TIGIT (A15153G, Biolegend)	NK: CD3- → CD56+ NKT: CD3+ → CD56+ CD4+CD8+ Tc: CD3+ → CD4+/CD8+ CD20+ Tc: CD3+ → CD20+ MFIs: TIGIT, Tim-3, PD-1, CTLA-4 on CD3+ Tc, CD4+ Tc, CD8+ Tc, CD4+CD8+ Tc, NK, NKT
3 - T cell I	PBMCs	CD3 (SK7, Biolegend), HLA-DR (L243, Biolegend), CD28 (CD28.2, Biolegend), CD27 (M-T271, Biolegend), KLRG1 (14C2A07, Biolegend), CD8 (SK1, Biolegend), CD4 (SK3, Biolegend), CD197 (G043H7, Biolegend), CD57 (QA17A04, Biolegend), CD45RA (HI100, Biolegend), CD95 (DX2, Biolegend)	CD3+ Tc: CD3+ CD4+ Tc: CD3+ → CD4+ CD8+ Tc: CD3+ → CD8+ CD4+ naive Tc: CD3+ → CD4+ → CD45RA-/CD197+ → CD27+/CD95- CD4+ TSCM: CD3+ → CD4+ → CD45RA-/CD197+ → CD27+/CD95+ CD4+ TCM: CD3+ → CD4+ → CD45RA-/CD197+ → CD27+ CD4+ TEM: CD3+ → CD4+ → CD45RA-/CD197- → CD27- CD4+ TTM: CD3+ → CD4+ → CD45RA-/CD197- → CD27+ CD4+ TTE: CD3+ → CD4+ → CD45RA-/CD197- → CD27- CD8+ naive Tc: CD3+ → CD8+ → CD45RA-/CD197+ → CD27+/CD95- CD8+ TSCM: CD3+ → CD8+ → CD45RA-/CD197+ → CD27+/CD95+ CD8+ TCM: CD3+ → CD8+ → CD45RA-/CD197+ → CD27+ CD8+ TEM: CD3+ → CD8+ → CD45RA-/CD197- → CD27- CD8+ TTM: CD3+ → CD8+ → CD45RA-/CD197- → CD27+ CD8+ TTE: CD3+ → CD8+ → CD45RA-/CD197- → CD27- senescent Tc: CD3+ → CD27lo/CD28lo → CD57+/KLRG1+ senescent CD4+ Tc: CD3+ → CD4+ → CD27lo/CD28lo → CD57+/KLRG1+ senescent CD8+ Tc: CD3+ → CD8+ → CD27lo/CD28lo → CD57+/KLRG1+ MFIs: HLA-DR on CD3+ Tc, CD4+ Tc, CD8+ Tc, CD4+CD8+ Tc
4 - ILC & NK	PBMCs	CD3 (SK7, Biolegend), CD14 (M5E2, Biolegend), CD19 (HIB19, Biolegend), CD335 (Nkp46) (9E2, Biolegend), CD127 (A019D5, Biolegend), CD294 (CRTH2) (BM16, Biolegend), CD117 (104D2, Biolegend), CD11c (Bu15, Biolegend), CD16 (3G8, Biolegend), CD56 (HCD56, Biolegend), CD57 (QA17A04, Biolegend), CD123 (6H6, Biolegend)	ILC1: CD3, CD14, CD19 → Nkp46-/CD56- → CD127+ → CRTH2-/CD117- ILC2: CD3, CD14, CD19 → Nkp46-/CD56- → CD127+ → CRTH2+/CD117- ILC3: CD3, CD14, CD19 → Nkp46+/CD56+ → CD117+ alternative ILC: CD3, CD14, CD19 → CD123+/CD117low NK cells: CD3-, CD14-, CD19- → CD56+ NK bright: CD3-, CD14-, CD19- → CD56+ → CD16- NK dim: CD3-, CD14-, CD19- → CD56+ → CD16+ CD57+ NK: CD3-, CD14-, CD19- → CD56+ → CD57+ CD11c+CD56+: CD3-, CD14-, CD19- → CD56+ → CD11c+ Th1: CD3+ → CD4+/CD8- → CD183 (CXCR3)+/CD194 (CCR4)- → CCR10-/CD196 (CCR6)- Th2: CD4+/CD8- → CD183 (CXCR3)-/CD194 (CCR4)+ → CCR10-/CD196 (CCR6)- Th17: CD3+ → CD4+/CD8- → CD183 (CXCR3)-/CD194 (CCR4)+ → CCR10-/CD196 (CCR6)+ Th22: CD3+ → CD4+ → CD183 (CXCR3)-/CD194 (CCR4)+ → CCR10+/CD196 (CCR6)+ Th9: CD3+ → CD4+/CD8- → CD194 (CCR4)-/CD196 (CCR6)+ Th40: CD3+ → CD4+ → CD40+ Treg: CD3+ → CD4+/CD8- → CD25+ → FoxP3+/CD127lo
5 - T cell II	PBMCs	CD3 (SK7, Biolegend), CD8 (SK1, Biolegend), CD4 (SK3, Biolegend), CD183 (G025H7, Biolegend), CD25 (BC96, Biolegend), CCR10 (1B5, BD Biosciences), FoxP3 (PCH101, eBioscience), CD196 (G034E3, Biolegend), CD194 (L291H4, Biolegend), CD127 (A019D5, Biolegend), CD40 (5C3, Biolegend)	

Supplementary table 1 - Overview of the used mFC panels

Altern - alternative; *Bc* - B cells; *Breg* - B regulatory cells; *CSF* - cerebrospinal fluid; *DC* - dendritic cells; *ILC* - innate lymphoid cells; *Lympho* - lymphocytes; *mFC* - multidimensional flow cytometry; *MFI* - mean fluorescence intensity; *MZB* - Marginal zone like B cells; *NK* - natural killer cells; *NK bright* - CD56bright NK cells, *NK dim* - CD56dim NK cells; *NKT* - Natural killer T cells; *PBMCs* - peripheral blood mononuclear cells; *Sen* - senescent; *Tc* - T cells; *TCM* - Central memory T cells; *TEM* - Effector memory T cells; *Th* - T helper cells; *Treg* - Regulatory T cells; *TSCM* - Stem memory T cells; *TTE* - terminal effector T cells; *TZB* - Transitional B cells.

5.7. Tabelle Supplementary 2

Patienten-ID	G ruppe	Alter	Geschlecht	EDSS zu Beginn	Gesamtanzahl der Schübe	Schubrate (ARR) zu Beginn	Zeit seit Krankheitsmanifestation (Jahre)	Zeit seit Erstdiagnose (Jahre)	Zeit seit letztem Schub (Monate)	Vorherige Anzahl an DMTs	Letzte DMT	Grund für Therapieumstellung
OFA-1	OFA	39	F	1.0	14	2	6.50	6.1	1.7	1	GLAT	Escalation
OFA-2	OFA	23	F	1.0	3	1	3.00	3.0	3.4	1	GLAT	Escalation
OFA-3	OFA	36	F	2.0	5	1	7.25	6.3	5.9	5	CLAD	Escalation
OFA-4	OFA	38	F	1.0	3	2	1.33	1.0	1.8	1	DMF	Escalation
OFA-5	OFA	45	F	3.5	2	1	3.33	0.2	6.2	0	None	First DMT
OFA-6	OFA	27	F	1.5	2	1	3.42	1.6	1.0	0	None	First DMT
OFA-7	OFA	54	F	2.0	NA	1	25.33	22.8	10.7	1	IFN	Escalation
OFA-8	OFA	39	F	2.0	7	1	19.42	18.4	9.0	3	NAT	Escalation
OFA-9	OFA	43	M	1.0	3	2	0.08	0.0	1.3	1	TFL	Escalation
OFA-10	OFA	25	F	2.0	5	0	8.75	8.8	18.0	5	NAT	Positive JCV ab index
OFA-11	OFA	24	F	1.5	4	1	4.75	4.8	6.7	1	NAT	Escalation
OFA-12	OFA	32	F	2.0	2	1	8.58	8.6	11.1	4	FINGO	escalation
OFA-13	OFA	29	F	0.0	2	1	9.50	0.2	3.7	0	None	First DMT
OFA-14	OFA	51	F	2.0	4	1	6.75	4.7	4.2	2	FINGO	Escalation

OFA-15	OFA	24	M	2.0	4	1	5.50	4.5	2.8	1	GLAT	Escalation
OFA-16	OFA	53	F	2.0	2	1	1.25	0.2	2.7	3	TFL	Escalation
OFA-17	OFA	37	F	2.5	1	1	0.58	0.3	7.8	0	None	First DMT
OFA-18	OFA	39	F	2.5	1	1	0.33	0.3	4.2	0	None	First DMT
OFA-19	OFA	26	F	1.0	1	1	2.25	1.9	26.9	0	None	First DMT
OFA-20	OFA	26	F	2.0	1	1	0.33	0.3	3.9	0	None	First DMT
OFA-21	OFA	38	M	0.0	1	1	0.42	0.0	5.8	0	None	First DMT
OFA-22	OFA	37	F	2.0	2	1	12.00	0.1	3.1	0	None	First DMT
OFA-23	OFA	22	F	1.0	2	1	0.33	0.3	4.2	0	None	First DMT
OFA-24	OFA	NA	M	2.5	5	3	2.92	2.9	1.2	1	TFL	Escalation
OFA-25	OFA	47	M	1.0	2	0	12.17	5.2	9.8	2	GLAT	NA
OCR-1	OCR	23	F	3.5	2	2	0.58	0.5	3.1	0	None	First DMT
OCR-2	OCR	24	F	0.0	3	0	2.25	2.1	27.8	1	DMF	Positive JCV ab index
OCR-3	OCR	45	M	1.5	1	1	0.58	0.3	7.9	0	None	First DMT
OCR-4	OCR	36	F	1.0	3	1	6.33	0.2	4.3	0	None	First DMT
OCR-5	OCR	32	F	1.5	3	1	5.33	5.3	12.3	2	TFL	Escalation
OCR-6	OCR	41	F	2.0	4	1	21.42	21.4	3.7	3	DMF	Adverse effects
OCR-7	OCR	42	F	2.0	5	2	17.58	16.6	5.2	1	IFN	Escalation
OCR-8	OCR	28	F	2.0	1	1	0.67	0.7	8.9	0	None	First DMT
OCR-9	OCR	28	F	NA	1	1	1.17	1.2	14.1	0	None	First DMT

OCR-10	OCR	30	F	1.0	0	1	NA	0.8	NA	0	None	First DMT
OCR-11	OCR	38	F	3.5	6	1	14.75	10.0	2.5	2	IFN	Escalation
OCR-12	OCR	32	M	1.0	1	0	3.42	3.4	41.8	2	NAT	Positive JCV ab index
OCR-13	OCR	53	M	6.0	2	1	4.17	0.3	5.3	0	None	First DMT
OCR-14	OCR	52	F	3.0	2	2	0.17	0.1	2.7	0	None	First DMT
OCR-15	OCR	33	F	2.5	8	1	11.92	7.8	4.0	4	NAT	Escalation
OCR-16	OCR	45	F	3.5	3	0	8.83	8.8	52.4	1	IFN	Adverse effects
OCR-17	OCR	39	F	4.0	NA	0	20.83	20.8	46.8	2	NAT	Positive JCV ab index
OCR-18	OCR	34	F	2.0	6	2	3.33	3.3	3.2	1	TFL	Escalation
OCR-19	OCR	38	F	0.0	3	0	10.67	10.6	46.4	3	FINGO	Escalation
OCR-20	OCR	27	F	1.0	1	0	4.00	2.0	48.9	1	NAT	Escalation
OCR-21	OCR	31	F	3.0	2	1	1.17	0.5	2.8	1	GLAT	NA
OCR-22	OCR	44	M	2.0	2	2	0.50	0.4	4.8	1	NAT	NA
OCR-23	OCR	52	M	2.0	5	0	12.83	12.3	5.4	2	DMF	NA
OCR-24	OCR	26	F	2.5	2	1	0.17	0.2	2.3	0	None	0
OCR-25	OCR	30	M	1.0	1	1	0.42	0.4	5.1	0	None	0
OCR-27	OCR	40	M	6.5	5	1	11.50	11.5	7.0	4	GLAT	Escalation
OCR-28	OCR	22	M	1.0	2	1	2.50	0.2	2.4	0	None	First DMT
OCR-29	OCR	44	F	6.0	4	1	12.75	2.5	2.4	3	FINGO	Escalation

OCR-30	OCR	55	F	1.0	1	0	1.08	0.3	13.2	0	None	First DMT
OCR-31	OCR	19	F	1.0	1	1	0.00	12.5	0.8	0	None	NA
OCR-32	OCR	39	M	NA	2	1	2.50	0.3	4.1	0	None	First DMT
OCR-33	OCR	36	F	2.0	1	1	1.17	0.0	1.4	0	None	First DMT
OCR-34	OCR	43	F	5.5	7	1	22.08	12.1	5.6	2	FINGO	Escalation
OCR-35	OCR	31	M	2.0	7	2	5.08	5.1	1.5	2	TFL	Escalation
RRMS-1	RRMS	39	M	5.0	2	1	1.58	1.6	0.0	0	None	NA
RRMS-2	RRMS	39	F	2.0	3	2	0.58	0.6	4.9	0	None	NA
RRMS-3	RRMS	57	F	2.0	NA	NA	18.67	18.7	0.0	0	None	NA
RRMS-4	RRMS	34	F	2.0	2	1	1.33	1.3	NA	0	None	NA
RRMS-5	RRMS	38	F	1.5	1	1	0.67	0.7	8.2	0	None	NA
RRMS-6	RRMS	36	F	NA	3	2	0.00	0.0	0.1	0	None	NA
RRMS-7	RRMS	33	F	1.0	2	1	0.00	0.0	0.2	0	None	NA
RRMS-8	RRMS	24	M	2.0	NA	NA	0.17	0.2	0.4	0	None	NA
RRMS-9	RRMS	35	F	2.0	1	0	0.08	0.1	1.3	0	None	NA
RRMS-10	RRMS	20	F	1.0	NA	NA	2.08	2.1	0.0	0	None	NA
RRMS-11	RRMS	39	F	1.0	4	0	19.67	19.7	25.5	0	None	NA
RRMS-12	RRMS	19	F	1.0	1	1	0.42	0.4	5.3	0	None	NA
RRMS-13	RRMS	22	F	1.0	1	0	0.25	0.3	2.8	0	None	NA
RRMS-14	RRMS	45	F	NA	NA	NA	0.17	0.2	0.0	0	None	NA

RRMS-16	RRMS	29	F	0.0	2	2	0.75	0.8	7.5	0	None	NA
RRMS-15	RRMS	38	F	2.5	0	0	4.50	4.5	NA	0	None	NA
RRMS-17	RRMS	44	F	0.0	1	0	2.17	2.2	2.4	0	None	NA
RRMS-18	RRMS	30	F	2.0	1	0	0.00	0.0	0.0	0	None	NA
RRMS-19	RRMS	44	F	1.0	2	2	2.00	2.0	2.8	0	None	NA
RRMS-20	RRMS	46	F	1.0	1	0	0.33	0.3	0.0	0	None	NA

An erster Stelle gilt mein tief empfundener Dank meinem Doktorvater, Professor Dr. Dr. Sven Meuth, für seine wertvolle Betreuung, seine kontinuierliche Unterstützung sowie seine stets offene Tür für wissenschaftliche (und manchmal auch weltliche) Diskussionen. Sein Vertrauen in meine Arbeit und seine fachliche Expertise haben diese Dissertation in entscheidender Weise geprägt. Ebenso möchte ich mich herzlich bei Dr. Saskia Räuber für ihre engagierte Mitbetreuung, ihre fachlichen Impulse und ihre Freundschaft bedanken, die wesentlich zum Fortschritt dieser Arbeit beigetragen haben. Mein Dank gilt auch Professor Dr. Lang, dessen konstruktives Feedback und inhaltliche Begleitung die Arbeit in wichtigen Aspekten bereichert haben. Mein besonderer Dank geht auch an das gesamte Team für die kollegiale Zusammenarbeit, die angenehme Arbeitsatmosphäre und die zahlreichen anregenden Gespräche im Labor- und Klinikalltag. Ohne eure Unterstützung wäre diese Arbeit in dieser Form nicht möglich gewesen. Ich danke außerdem allen Patient:innen, ohne deren Teilnahme diese Forschung nicht hätte durchgeführt werden können. Ein herzlicher Dank gilt auch meinem Freund Tobi, meinen Freund:innen und meiner Familie für ihre Geduld, ihr Verständnis und ihren unerschütterlichen Rückhalt in allen Phasen dieses Promotionsprojekts.