

Aus dem Institut für Klinische Neuroimmunologie
Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktoren: Professor Dr. med. Reinhard Hohlfeld und
Prof. Dr. med. Martin Kerschensteiner

**Habilitationsschrift zur Erlangung der *venia legendi*
für das Fach Neuroimmunologie
an der Fakultät für Medizin
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

**Das ZNS als B-Zell-permissives Milieu bei der Multiplen Sklerose –
molekulare Mechanismen und pharmakologische Beeinflussung**

Vorgelegt von

Dr. med. Markus Krumbholz

München, Mai 2017

Inhalt

Einleitung.....	1
1. Multiple Sklerose und B-Zellen.....	1
2. Chemokine.....	2
3. BAFF.....	4
4. Medikamente.....	5
5. IgG-Glykosylierung.....	5
Fragestellung.....	6
1. Wie entsteht im ZNS ein B-Zell-permissives Milieu?.....	6
2. Welche Auswirkung haben Medikamente zur Therapie der MS speziell auf CD20-positive Zellen und das BAFF-/B-Zell-System?.....	6
3. Lässt sich an intrathekal produziertem IgG ein inflammatorisches Glykosylierungsmuster feststellen?.....	6
Ergebnisse und Diskussion.....	7
1. Entstehung eines B-Zell-permissiven Milieus im ZNS.....	7
2. Auswirkung von Medikamenten zur Therapie der MS speziell auf CD20-positive Zellen und das BAFF-/B-Zell-System.....	13
3. Inflammatorische Glykosylierungsmuster bei intrathekalem IgG.....	17
Zusammenfassung.....	19
Referenzen.....	21
Publikationsverzeichnis.....	25
1. Originalarbeiten als Erst- oder Letztautor.....	25
2. Originalarbeiten als Koautor.....	26
3. Kasuistiken.....	28
4. Übersichtsartikel/Reviews.....	29
5. Buchkapitel.....	29
6. Sonstige Veröffentlichungen: Gruppenautorenschaften.....	29
Abdruck einer Auswahl der Publikationen.....	30
Danksagung.....	31

Einleitung

1. Multiple Sklerose und B-Zellen

Die Behandlungsmöglichkeiten der **Multiplen Sklerose** (MS) haben sich in den letzten Jahren deutlich verbessert, aber eine Heilung dieser häufigen Erkrankung, die für einen Großteil nicht-unfallbedingter bleibender Behinderung bei jungen Erwachsenen verantwortlich ist, lässt sich noch nicht erreichen. Jedoch wird die Pathogenese besser verstanden, sodass selektivere, wirksamere und nebenwirkungsärmere Medikamente entwickelt werden konnten, und sowohl das Therapieziel eines Stillstandes der Erkrankung (*no evidence of disease activity*, NEDA) in greifbare Nähe gelangt als auch Medikamente individueller verschrieben werden können anhand der nötigen Wirkstärke und möglicher Nebenwirkungen (Gold *et al.*, 2016).

Bei der Pathogenese der MS rücken zunehmend Zellen der **B-Zell-Reihe** ins Blickfeld (Meinl *et al.*, 2006, 2011; Krumbholz *et al.*, 2012; Krumbholz & Meinl, 2014). Den deutlichsten Hinweis auf deren Beteiligung an der Pathogenese stellt die therapeutische Wirksamkeit einer B-Zell-Depletion dar; diesbezügliche erst kürzlich positiv abgeschlossene Phase-3-Studien (Hauser *et al.*, 2016; Montalban *et al.*, 2016) waren von Daten zu den molekularen Mechanismen und kleineren Phase-II-Studien motiviert. Die bekannteste Funktion der B-Zell-Reihe stellt die Antikörperproduktion v.a. durch Plasmablasten und langlebige Plasmazellen dar. Die intrathekale IgG-Synthese, die sich bei der MS typischerweise im Quotientendiagramm nach Reiber, in Form liquorspezifischer oligoklonaler Banden in der isoelektrischen Fokussierung sowie in einer positiven MRZ-Reaktion darstellen lässt, zählt zu den bekanntesten und stabilsten Laborbefunden bei Patienten mit MS. Auffällig ist hier weiterhin, dass das Muster der oligoklonalen Banden über lange Zeit hinweg sehr stabil ist, was darauf hindeutet, dass langlebige Antikörper-produzierende Zellen eine Überlebensnische im ZNS gefunden haben, die ihnen dort eine Langzeit-Persistenz erlaubt. Die Mechanismen, die diesen Zellen ein Einwandern und ein Langzeit-Überleben in einem primär nicht-immunologischen Organ, das sogar eine ‚immunprivilegierte Region‘ darstellt, war unbekannt.

B-Zellen können auf sehr unterschiedliche Weisen am Entzündungsprozess teilnehmen, und verschiedene dieser Mechanismen können pharmakologisch beeinflusst werden (Abb. 1).

Da sich bei der MS erstaunlicherweise der Entzündungsprozess auf ein immunprivilegiertes Organ konzentriert, und im späteren Erkrankungsverlauf sich sogar dort eigenständig weiterentwickeln kann und zunehmend weniger abhängig vom systemischem Nachschub wird (Meinl *et al.*, 2008), haben wir untersucht, welche Faktoren das ZNS hierfür selber beiträgt, mit einem Schwerpunkt auf B-Zell-fördernde Faktoren.

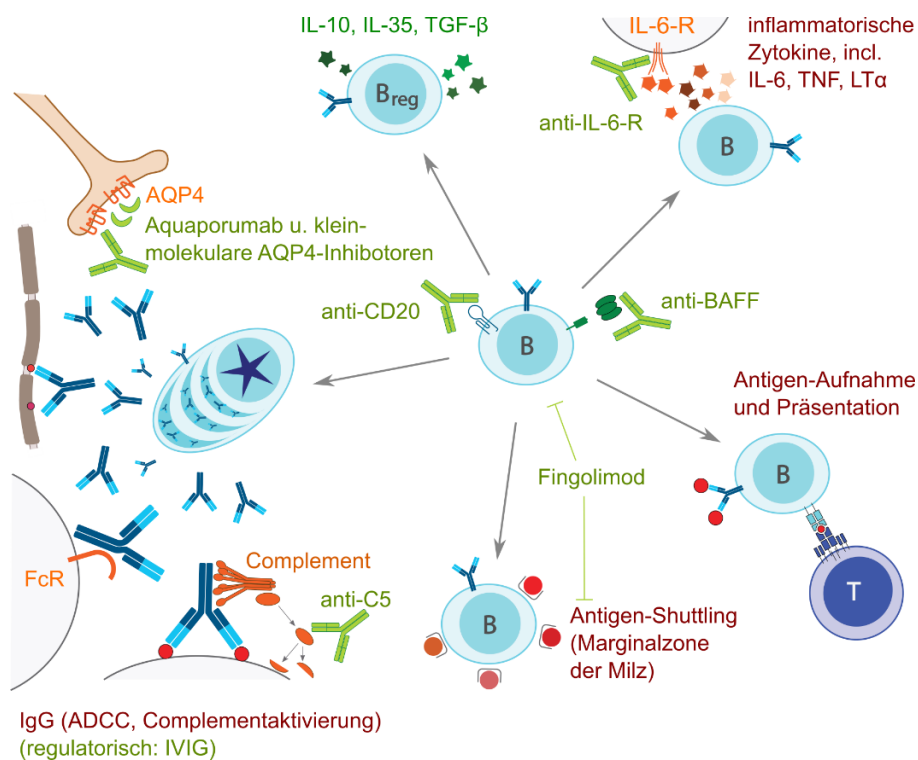


Abb. 1: Spektrum von B-Zell-Effektorfunktionen (nach Krumbholz & Meinl, 2014). B-Zellen können, neben der Aktivierung von Fc-Rezeptoren und Complement durch sezernierte Immunglobulinsynthese, auch andere immunologische Funktionen ausüben, z.B. Zytokinproduktion, Antigen-Präsentation für ihr spezifisches Antigen, sowie Antigen-Shuttling in der Milz. Regulatorische B-Zellen können z.B. TGF- β , IL-10, und/oder IL-35 produzieren. Das Verständnis dieser Funktionen ermöglicht Ansatzpunkte für eine therapeutische Beeinflussung. Dargestellt ist lediglich eine Auswahl (Details in Krumbholz & Meinl, 2014).

2. Chemokine

Zunächst müssen bei der MS Immunzellen aus dem Blutstrom in das ZNS gelangen. Wichtige Mediatoren für die Migration von Immunzellen sind Chemokine (Nelson & Krensky, 2001): Chemokine sind kleine Zytokine (8-14 kDa), die anhand von Sequenzmotiven (Anzahl und Position konservierter Cysteine, „C“) bzw. dazwischen liegenden anderen Aminosäuren in CC-, CXC-, CX₃C- und XC-Chemokine (Liganden) eingeteilt und nummeriert werden (z.B. CCL1 = CC-Chemokin-Ligand 1). Diese binden an G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, die analog der Cystein-Motive der Chemokinliganden bezeichnet und als Chemokinrezeptoren nummeriert werden (z.B. CCR1 = CC-Chemokin-Rezeptor 1, CXCR1, CX₃C1 und XC1). Hierbei herrscht keine strenge eindeutige Zuordnung der Liganden und Rezeptoren, sondern es können z.B. teilweise mehrere Chemokinliganden den gleichen Rezeptor binden oder umgekehrt. Neben dieser systematischen Nomenklatur haben Chemokine historisch gewachsene Namen, die sich z.B. aus ihrer Funktion ergeben.

B-Zellen tragen u.a. die Chemokinrezeptoren CXCR4, CXCR5 und CCR7, sodass sie auf deren Liganden CXCL12, CXCL13 bzw. CCL19/CCL21 reagieren können. Daher haben wir die Expression dieser Chemokine in MS-Läsionen untersucht und eine differentielle Expression bzgl. Aktivität der Läsionen und produzierenden Zellen gefunden.

CCL19 und CCL21 werden als homöostatische Chemokine klassifiziert und leiten beide über eine Bindung an den Chemokinrezeptor CCR7 B-Zellen, naive T-Zellen und reife dendritische Zellen in sekundäre lymphatische Organe (Nelson & Krensky, 2001). Der gemeinsame Rezeptor CCR7 kommt in MS-Läsionen vor, auf myeloiden/dendritischen Zellen, und im Liquor gesunder Spender sind fast alle T-Zellen CCR7 positiv. Ein Großteil der B-Zellen im Blut und Liquor trägt CCR7. CCL19 (= EBV-induced molecule 1 (EBI) ligand chemokine, ELC; macrophage inflammatory protein-3-beta, MIP3 β) wird von Makrophagen, dendritischen Zellen, und nicht-hämatopoetischen Zellen in den T-Zell-Arealen lymphatischer Organen exprimiert. CCL21 (= secondary lymphoid tissue chemokine, SLC; 6CKine) wird von lymphoiden Endothel- und Stromazellen in T-Zell-Arealen produziert.

CXCL12 und CXCL13 sind in lymphatischem Gewebe an der Organisation der Keimzentren in helle und dunkle Zonen beteiligt (Allen *et al.*, 2004). CXCL12 (= stromal cell-derived factor 1, SDF-1; pre-B cell growth-stimulating factor, PBSF) ist ein potentes Chemokin für verschiedene Immunzellen, wie Monozyten, T-Zellen, B-Zellen und Plasmazellen. Neben der Chemotaxis für Immunzellen reguliert es auch die Hämatopoese, während der Hirnentwicklung das Auswachsen von Neuronen, und auch Plastizität (Lazarini *et al.*, 2003; Klein & Rubin, 2004; Li & Ransohoff, 2008; Guyon, 2014). CXCL13 (= B cell-attracting chemokine 1, BCA-1) übernimmt homöostatische und inflammatorische Funktionen, gezeigt z.B. bei neolymphoider Entwicklung in der Schilddrüse (Aust *et al.*, 2004), bei *Helicobacter pylori*-induziertem Mucosa-assoziiertem lymphoidem Gewebe (MALT) und Magen-Lymphom (Mazzucchelli *et al.*, 1999), Sjögren-Syndrome (Salomonsson *et al.*, 2002), rheumatoider Arthritis (Shi *et al.*, 2001) and Colitis ulcerosa (Carlsen *et al.*, 2004). Der Rezeptor für CXCL13, CXCR5, kommt auf praktisch allen B-Zellen sowie auf einem Subset von T-Zellen im Blut und lymphatischem Gewebe vor (Kim *et al.*, 2001). Er wird nach Aktivierung transient auf T-Zellen induziert (Langenkamp *et al.*, 2003).

3. BAFF

Ein wichtiger Überlebens- und Differenzierungsfaktor für B-Zellen ist BAFF (*B cell activation factor of the TNF family*, TNFSF13b). BAFF kann von Monozyten/Makrophagen, neutrophilen Granulozyten und Stromazellen z.B. des Knochenmarks produziert werden. Die verfügbaren BAFF-Spiegel bestimmen die Größe des B-Zell-Pools. BAFF-defiziente Knock-out-Mäuse weisen eine tiefgreifend gestörte B-Zell-Entwicklung auf, die in der transitionalen (T1) Stufe blockiert ist. Während diese Mäuse normale frühe Entwicklungsstadien der B-Zell-Reihe im Knochenmark und normale B1-Zellen aufweisen, entwickeln sie kaum reife folliculäre B-Zellen und kaum Marginalzonen-B-Zellen, die dann auch nicht die normalerweise exprimierten Oberflächenmoleküle CD21 und CD23 tragen. Erhöhte BAFF-Spiegel sind demgegenüber mit Autoimmunerkrankungen wie z.B. dem systemischen Lupus Erythemathodes (SLE) assoziiert.

BAFF und ein weiterer Ligand aus der TNF-Superfamilie (a proliferation inducing ligand, APRIL) binden differenziell und mit unterschiedlicher Affinität an Rezeptoren aus der TNFRSF-Familie (BAFF-R, BCMA und TACI), die zu einem intrazellulären Signaling führen. Darüber hinaus kann APRIL an Heparansulfat-Proteoglycane binden, ohne dass dies eine direkte Signalkaskade auslöst (Abb. 2).

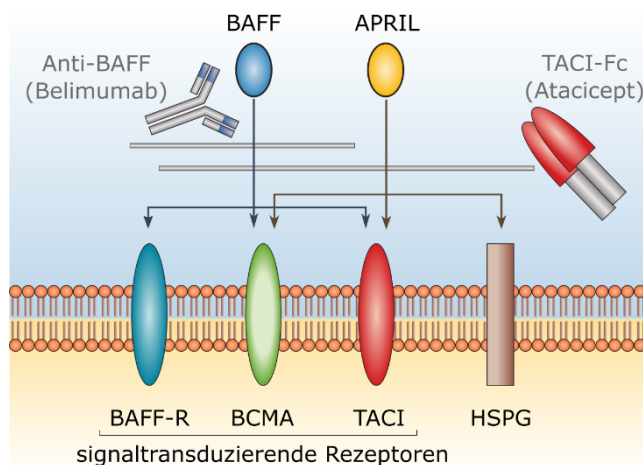


Abb. 2: Liganden und Rezeptoren des BAFF-APRIL-Systems und mögliche pharmakologische Beeinflussung (nach Krumbholz et al., 2012). Die monoklonalen Antikörper Belimumab und LY2127399 blocken nur BAFF, während der Decoy-Rezeptor TACI-Fc (Atacicept) BAFF und APRIL blockiert. Heparansulfat-Proteoglycane (HSPG) binden APRIL, was wahrscheinlich die biologische Aktivität von APRIL erhöht. Es handelt sich um eine vereinfachte Darstellung ohne Berücksichtigung von Bindungsstärke und Multimerisierung. APRIL, a proliferation-inducing ligand (TNFSF13); BAFF, B-cell-activating factor of the TNF family (TNFSF13B); BAFF-R, BAFF-Receptor (TNFRSF13C); BCMA, B-cell maturation antigen (TNFRSF17); HSPG, heparan sulphate proteoglycan; TACI, transmembrane activator and CAML interactor (TNFRSF13B).

4. Medikamente

Die pathogenetische Bedeutung der B-Zell-Reihe, die über die Produktion von Antikörpern hinausgeht (Krumbholz & Meinl, 2014), zeigt sich neben vielen Daten zur Pathophysiologie am deutlichsten in den hierdurch motivierten klinischen interventionellen Studien, die einen therapeutischen Erfolg einer B-Zell-depletierenden Therapie bei der schubförmigen wie auch primär progredienten MS beschreiben (Hauser *et al.*, 2016; Montalban *et al.*, 2016). Aufgrund dieser Daten wurde zuletzt Ocrelizumab von der FDA zugelassen. Es laufen weitere Studien mit B-Zell-gerichteten Therapien bei entzündlichen ZNS-Erkrankungen (z.B. weitere CD20-Ak wie Ofatumumab; MEDI-551: anti-CD19 bei NMOSD).

Darüber hinaus werden B-Zellen aber auch von anderen Medikamenten, die zur Schubprophylaxe bei Patienten mit MS eingesetzt werden, beeinflusst: α 4-Integrine wurden als kritischer Faktor für die T-Zell-Migration über ZNS-Endothelien identifiziert (Yednock *et al.*, 1992) und schließlich erfolgreich durch Natalizumab blockiert. Allerdings tragen B-Zellen bekanntermaßen ebenfalls Alpha-1-Integrine, sodass sie von Natalizumab ebenfalls an der Transmigration über ZNS-Endothelien gehindert werden könnten. Interferon-beta hat pleiotrope Effekte auf verschiedenste Zellen, während therapeutische Effekte auf Lymphozyten eher T-Zellen zugeschrieben wurden. Fingolimod ist lipophil, reichert sich im ZNS an, und beeinflusst vermutlich auch hirneigene Zellen, die allesamt Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptoren tragen. Wir haben die Effekte von Natalizumab, Interferon-beta und Fingolimod speziell auf das B-Zell-System untersucht.

5. IgG-Glykosylierung

B-Zellen können sich u.a. zu Antikörper-produzierenden Plasmazellen differenzieren; die intrathekale Immunglobulinsynthese durch langlebige Plasmazellen im ZNS ist ein klassisches Merkmal bei der MS. Insb. bei Patienten mit Pattern-2-Läsionen (Lucchinetti *et al.*, 2000) scheinen Immunglobuline eine pathogene Rolle zu spielen, und in einer Studie waren dies genau die Patienten, die von einer Plasmapherese zur Schubtherapie gut profitierten (Keegan *et al.*, 2005).

Die Effektormechanismen von IgG beinhalten eine Bindung an Fc-Rezeptoren sowie eine Komplementaktivierung; beides wird moduliert vom **Glykosylierungsmuster** an einer konservierten N-Glykosylierungsstelle in der C2-Region der Fc-Domäne (Abb. 8). Somit können IgG-Moleküle je nach ihrem posttranslational entstehenden Glykosylierungsmuster, das auch von den Umgebungsbedingungen abhängt, eher pro- oder eher anti-inflammatorisch wirken. Hierbei wirkt das Vorhandensein einer terminalen Sialinsäure und Galaktose anti-inflammatorisch, während das Vorhandensein von bisecting N-Acetylglucosaminen pro-inflammatorisch wirkt (z.B. vermehrte

antibody dependent cellular cytotoxicity, ADCC). Fucose führt zu vermehrter Komplement-aktivierung, aber geringerer ADCC.

Diese Mechanismen werden zum einen in der Biotechnologie für die Produktion therapeutischer monoklonaler Antikörper ausgenutzt, die je nach Einsatzzweck z.B. depletierend oder nur blockierend (ohne Immunaktivierung) wirken sollen. Es gibt zunehmend Daten, die zeigen, dass das Glykosylierungsmuster auch bei der Pathogenese von Autoimmunerkrankungen, wie z.B. rheumatoider Arthritis, Lambert-Eaton- und Guillain-Barré-Syndrom, in Richtung eines pro-inflammatorischen Musters abweicht (zusammengefasst in (Wuhrer *et al.*, 2015)). Die Annahme einer Kausalität des Glykosylierungsmusters für die Pathogenese ergibt sich aus der Beobachtung, dass das Muster sich bei der rheumatoiden Arthritis schon bereits vor Erkrankungsbeginn ändert (Rombouts *et al.*, 2015) und aus tierexperimentellen Arbeiten, die die Pathogenität transferierter Autoantikörper speziell mit einem pro-inflammatorischen Muster zeigen (Tradtrantip *et al.*, 2013). Interessanterweise konnte auch tierexperimentell gezeigt werden, dass von intravenösen Immunglobulinen die kleine Fraktion mit Sialinsäuren den eigentlichen therapeutischen Effekt vermittelt (Anthony *et al.*, 2008).

Fragestellung

- 1. Wie entsteht im ZNS ein B-Zell-permissives Milieu?**
- 2. Welche Auswirkung haben Medikamente zur Therapie der MS speziell auf CD20-positive Zellen und das BAFF-/B-Zell-System?**
- 3. Lässt sich an intrathekal produziertem IgG ein inflammatorisches Glykosylierungsmuster feststellen?**

Ergebnisse und Diskussion

1. Entstehung eines B-Zell-permissiven Milieus im ZNS

B-Zell-anlockende Chemokine werden im ZNS differentiell exprimiert

Die Migration von B-Zellen in das ZNS wird durch verschiedene Faktoren wie Integrine (siehe unten) und **Chemokine** geregelt. Wir haben Chemokine, die für die B-Zell-Migration relevant sind, in Patienten mit MS untersucht. Hierbei zeigte sich eine differenzielle Expression bzgl. Zelltyp, entzündlicher Aktivität und redundanter Ligand-Rezeptor-Paare:

Von den beiden CCR7-Liganden **CCL19** und **CCL21** konnten wir CCL19 bereits im gesunden Hirngewebe sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene (qPCR, ELISA aus Gewebelysaten und Liquor) gut nachweisen, während CCL21 mittels qPCR allenfalls grenzwertig bzw. auf Proteinebene nicht nachweisbar war. CCL19-Transkripte waren in aktiven und auch inaktiven MS-Läsionen deutlich erhöht (Abb. 3). Auch CCL19-Protein war im Liquor von Patienten mit MS oder einer anderen entzündlichen Erkrankungen erhöht. Im Liquor von Patienten mit RR-MS oder SP-MS korrelierte der CCL19-Gehalt auch mit der intrathekalen IgG-Synthese.

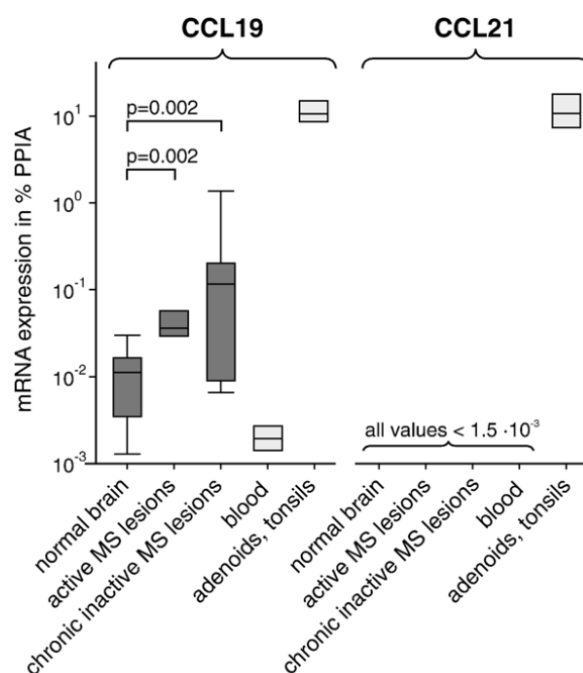


Abb. 3: CCL19- und CCL21-Expression in MS-Läsionen im Vergleich mit Blut und lymphatischem Gewebe (nach Krumbholz *et al.*, 2007). Die Genexpression wurde mittels quantitativer PCR in Prozent des Housekeeping-Genes PPIA gemessen. Die Whiskers der Boxplots geben die 10. und 90. Perzentile an.

Diese Daten lassen sich so interpretieren, dass CCL19 im gesunden ZNS die physiologische Immunsurveillance und bei der MS durch die erhöhte Expression die pathologische Entzündungsreaktion unterstützt.

CXCL12 war ebenfalls bereits im gesunden Gehirn nachweisbar, immunhistochemisch an den Wänden von Blutgefäßen (Abb. 4 A), sowie im ELISA mit Liquor von Patienten mit nicht-entzündlichen Erkrankungen. In MS-Läsionen war CXCL12 zusätzlich auch auf Astrozyten nachweisbar, und zwar sowohl in chronisch-inaktiven als auch in früh-aktiven Läsionen (Abb. 4 B bzw. C, Pfeilspitzen). Diese vermehrte Expression drückte sich auch durch einen höheren CXCL12-Gehalt im Liquor von Patienten mit unterschiedlichen Verlaufsformen einer MS aus, verglichen mit Patienten ohne entzündliche ZNS-Erkrankung (Krumbholz *et al.*, 2006).

Mögliche pathogene Funktionen von CXCL12 gehen über die Chemotaxis hinaus: es induziert bekanntermaßen in Astrozyten weitere inflammatorische Zytokine und kann unter verschiedenen Bedingungen entweder Apoptose oder das Überleben von Neuronen fördern. Matrix-Metalloprotease 2, die in MS-Läsionen vorkommt, spaltet CXCL12 in eine neurotoxische Form (zusammengefasst in Li & Ransohoff, 2008).

Im Gegensatz zu CCL19 und CXCL12, die beide bereits im gesunden Gehirn und in inaktiven Läsionen vorkommen, war **CXCL13** (BCA-1) sowohl mittels qPCR als auch mittels Immunhistochemie ausschließlich in aktiven Läsionen nachweisbar, in perivaskulären Cuffs (Abb. 4 D) und im entzündeten Parenchym auf verstreuten Zellen (Abb. 4 E, Pfeile). Auch im Liquor war der Gehalt an CXCL13 abhängig von der entzündlichen Komponente. Hier korrelierte der CXCL13-Gehalt im Liquor gut mit der Anzahl der B-Zellen, Plasmablasten, IgG-Quotient und T-Zellen, sowie auch, etwas schwächer, mit der Anzahl der Monozyten/Makrophagen.

CXCL13 stammt vermutlich von Monozyten/Makrophagen. Bei der Untersuchung der Regulation der CXCL13-Expression durch Monozyten und Makrophagen fanden wir eine erwartete Induktion von CXCL13 durch TNF in Monozyten oder durch eine Differenzierung zu Makrophagen. Dem gegenüber führte das Zytokin Interferon-gamma, das in vielen anderen Systemen synergistisch mit TNF agiert, hier zu einer Inhibition der CXCL13-Produktion. Dies war sowohl in Monozyten als auch in Makrophagen, und sowohl bzgl. der konstitutiven Expression als auch einer durch TNF induzierten Expression der Fall.

Die Analyse der Expression des CXCL13-Rezeptors CXCR5 erbrachte eine Expression wie erwartet sowohl auf CD4⁺ T-Zellen inkl. CD4⁺ Memory-T-Zellen als auch auf B-Zellen, wobei die Expression auf B-Zellen häufiger war (Abb. 4 F).

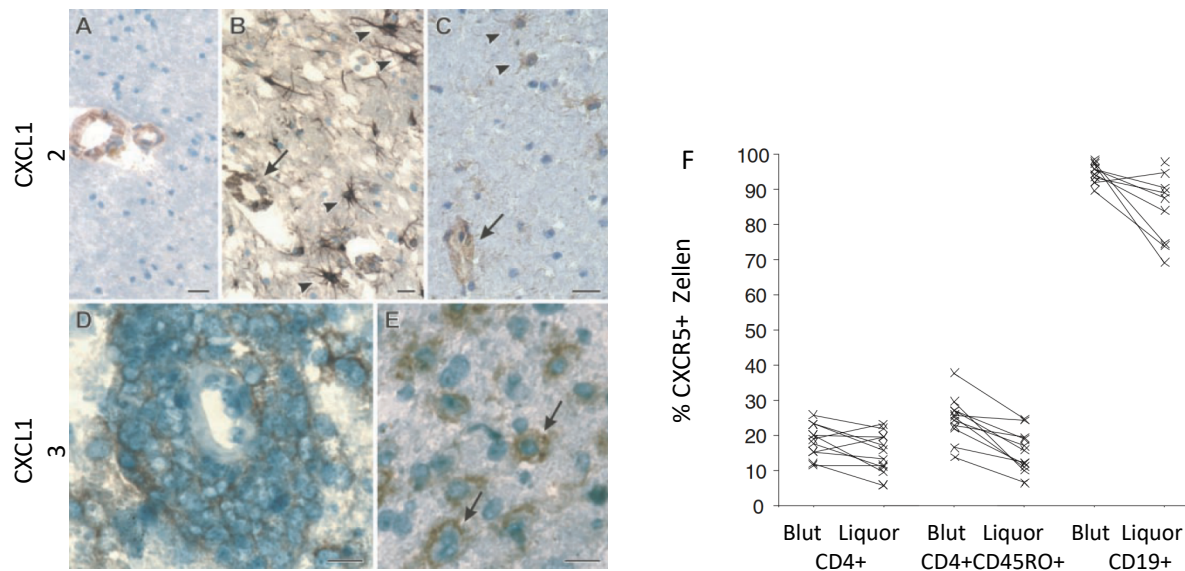


Abb. 4: CXCL12 und CXCL13 (nach Krumbholz et al., 2006). **A-E: Lokalisation von CXCL12 und CXCL13 in ZNS-Gewebe.** Immunhistochemie mit monoklonalen Antikörpern gegen CXCL12 (A u. B: MAB350; C: MAB310) und CXCL13 (D u. E: MAB801) auf Kryoschnitten von normalem Gehirn (A), chronisch inaktiven (B) und früh-aktiven (C–E) M-Läsionen. Skalierungsbalken: 20 μ m. **F: Expression des CXCL13-Rezeptors CXCR5 auf verschiedenen Lymphozyten-Subpopulationen im Liquor und Blut.** Die CXCR5-Expression wurde mittels Durchflusszytometrie gemessen und war am häufigsten auf CD19⁺ B-Zellen vorhanden.

Die Bedeutung von CXCL13 als maßgeblichen Faktor für die B-Zell-Rekrutierung in das ZNS wurde in einer späteren Arbeit bestätigt (Kowarik *et al.*, 2012), und CXCL13 wurde in Zusammenhang mit der Organisation ectoper Follikel-ähnlicher Strukturen in den Meningen bei Patienten mit MS gebracht (Aloisi *et al.*, 2008). Diese ectopen lymphatischen Strukturen scheinen eher ungünstig zu sein, u.a. wurde eine Expansion des B-Zell-Repertoires in diesen Strukturen berichtet (Lehmann-Horn *et al.*, 2016). Die CXCL13-Konzentration im Liquor erwies sich in nachfolgenden Arbeiten auch als prädiktiv für weitere Erkrankungsschübe bei Patienten mit CIS und RR-MS (Brettschneider *et al.*, 2010; Khademi *et al.*, 2011).

Der B-Zell-Überlebensfaktor BAFF wird von Astrozyten in relevantem Ausmaß produziert

Erhöhte Konzentrationen des B-Zell-Überlebensfaktors BAFF wurden in Zusammenhang mit systemischen Autoimmunerkrankungen gebracht, und mit Belimumab wurde ein BAFF-depletierender therapeutischer monoklonaler Antikörper von der FDA und EMA zur Therapie des SLE zugelassen. Wir konnten zeigen, dass Patienten mit Granulomatöser Polyangiitis (GPA, „Wegener-Granulomatose“) im Blut höhere BAFF-Konzentrationen aufweisen als gesunde Kontrollspender, und dass diese erhöhten Konzentrationen durch eine Therapie, z.B. mit Glucocorticoiden, gesenkt werden (Krumbholz *et al.*, 2005a). Daher könnte BAFF auch bei der GPA wirksam sein. Neben einem positiven

Fallbericht (Beketova *et al.*, 2016) folgte eine Phase-III-Studie („Belimumab in Remission of VASculitis (BREVAS)“), deren Ergebnis noch aussteht (www.clinicaltrials.gov, zuletzt abgerufen 26.05.2017). Bei Kleingefäßvaskulitiden konnten wir auch einen neuartigen Pathomechanismus nachweisen: Nach Aktivierung durch ANCA setzten neutrophile Granulozyten sog. *neutrophil extracellular traps* (NET) frei, die aus Chromatinfäden bestehen, die relevanten Autoantigene enthalten, und via TLR9 wiederum auch B-Zellen aktivieren können, sodass ein positiver Feedback-Loop entsteht, der die Erkrankung aufrechterhalten könnte (Kessenbrock *et al.*, 2009).

Bei der MS benötigen B-Zellen nach der Migration in das ZNS, die durch Chemokine gefördert wird, ein Milieu, das ihnen eine Überlebensnische bietet, z.B. durch BAFF. Wir haben daher das BAFF-System bei der Multiplen Sklerose untersucht. Bei der Messung von 10 MS-Patienten fiel auf, dass die BAFF-Spiegel im Liquor relativ hoch liegen (im Mittel ca. 10 % der Serumspiegel), und dass es keine Korrelation zwischen Liquor und Serum gibt (Krumbholz *et al.*, 2005b). Dies ließ vermuten, dass BAFF auch intrathekal produziert wird.

Mittels Immunhistochemie konnten wir die BAFF-Expression im ZNS auch auf Proteinebene nachweisen (Abb. 5 A-N). Zwei verschiedene monoklonale Antikörpern gegen BAFF zeigten kongruent zueinander eine Färbung von Zellen mit der Morphologie von Astrozyten, während sich Makrophagen/Mikroglia (als Zellen, die bekanntermaßen BAFF produzieren können) nicht in relevantem Ausmaß darstellen ließen. In einer Doppelfärbung mit dem sauren Gliafaserprotein (GFAP, ein Astrozytenmarker) zeigte sich eine Kollokalisierung (Abb. 5 H-J), sodass von einer BAFF-Produktion im ZNS primär durch Astrozyten auszugehen ist.

Eine BAFF-Expression im ZNS konnte weiterhin auf Transkriptionsebene mittels qPCR nachgewiesen werden. BAFF war sogar bereits in gesundem Hirngewebe gut detektierbar, und erreichte in MS-Läsionen von Patienten eine Größenordnung wie in lymphatischem Gewebe (Abb. 5 R). Mittels konventioneller PCR und Gelelektrophorese konnten wir zeigen, dass es sich hauptsächlich um Full-Length BAFF handelt, sowie einem kleiner Anteil der Splice-Variante Delta-BAFF. Hierbei war das Verhältnis dieser beiden Varianten ähnlich zwischen lymphatischen Organen und Hirngewebe, sodass kein Hinweis auf eine dysfunktionale Expression bestand.

Dieser unerwartete Befund wurde *in vitro* weiter untersucht: hier bestätigte sich in primären humanen, mikrogliafreien (Aloisi *et al.*, 1992) Astrozytenkulturen eine BAFF-Expression auf RNA-Ebene mittels quantitativer PCR sowie eine Freisetzung auf Proteinebene, gezeigt durch ELISA-Messungen in Überständen. Nach optimaler zelltypspezifischer Stimulation zeigte sich hier sogar eine deutliche höhere BAFF-Proteinsekretion pro Zelle bei Astrozyten als bei Makrophagen (Abb. 5S).

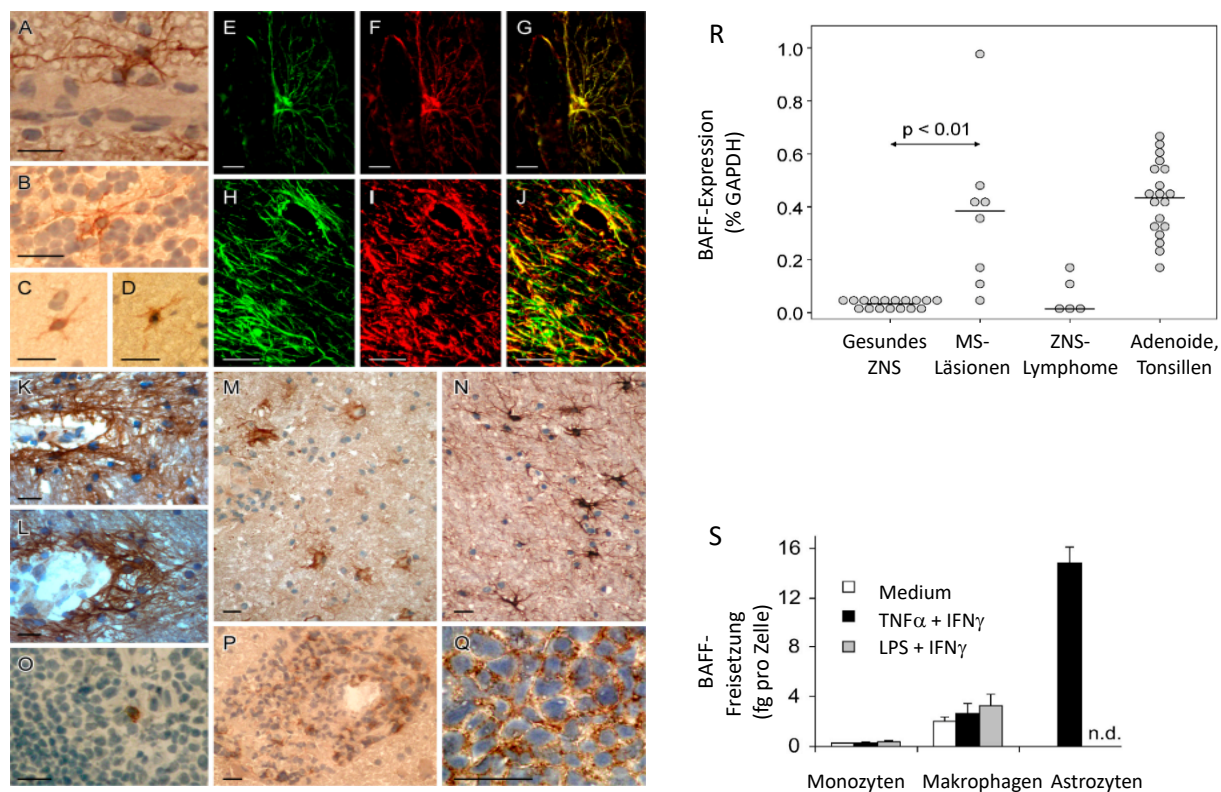


Abb. 5: BAFF und BAFF-R im ZNS (nach Krumbholz *et al.*, 2005b). **A-N: BAFF-Expression in Astrozyten** in gesundem Gehirn (A-D) und MS-Läsionen (E-N). Die Doppelfärbung (E-J) zeigt in der konfokalen Mikroskopie (H-J) eine Kolokalisation von BAFF mit dem Astrozytenmarker GFAP. **P-Q: BAFF-R-Expression in Infiltratzellen** in einer akuten MS-Läsion (P) und einem primärem ZNS-Lymphom (Q). Skalierungsbalken: 20 μ m. **R: Quantifizierung der BAFF-Expression im ZNS** mittels quantitativer PCR. Die BAFF-Expression war im gesunden Gehirn und in primären ZNS-Lymphomen nicht negativ, sondern in jeder Probe gut nachweisbar. In MS-Läsionen war sie deutlich erhöht und erreichte das Niveau sekundärer lymphatischer Organe. **S: Aktivierte Astrozyten produzierten pro Zelle deutlich mehr BAFF als maximal stimulierte Makrophagen.**

Zusammenfassend produzieren humane Astrozyten *in vitro* und *in vivo* BAFF, und zwar sowohl im gesunden Gehirn als auch deutlich induziert durch Zytokine bzw. in entzündlichen Läsionen von Patienten mit MS.

Weiterhin konnten wir BAFF-R-positive Immunzellen in räumlicher Nähe zu BAFF-positiven Astrozyten finden, was zusammen mit der bekannten Funktion von BAFF darauf hindeutet, dass B-Zellen das von Astrozyten produzierte BAFF verwerten.

Die erhöhte BAFF-Expression in MS-Läsionen war hierbei nicht auf aktive Läsionen beschränkt, sondern zeigte sich auch in remyelinierten Läsionen, möglicherweise als Ausdruck einer persistierenden Astrozytenaktivierung in diesen Läsionen (Krumbholz *et al.*, 2005b; Mohan *et al.*, 2014).

Die Expression einiger dieser Zytokine bereits im gesunden ZNS (BAFF, CXCL12, CCL19) wirft auch die Frage nach deren physiologischer Bedeutung auf. Zum einen ist eine Funktion bei der Immunsurveillance des ZNS (Galea *et al.*, 2007) plausibel, die trotz der Sonderstellung des ZNS als immunprivilegierte Region physiologisch wichtig ist. Dies wurde zuletzt deutlich, als es unter einer effektiven α 4-Blockade mit Natalizumab zu einer nicht mehr ausreichenden Immunsurveillance des ZNS und zu PML-Fällen kam, was man sonst nur bei schwer systemisch immunkompromittierten Patienten erwartet hätte.

Weiterhin wird zunehmend deutlich, dass dieselben Mediatoren unterschiedliche Aufgaben sowohl im Immunsystem als auch im Nervensystem übernehmen. Die Bedeutung von CXCL12 für die ZNS-Entwicklung ist gut dokumentiert (Guyon, 2014). Zwei nachfolgende Arbeiten beschreiben eine mögliche Bedeutung von BAFF für Neurone: BAFF hemmte die Aussprossung von Hinterhorn-Ganglienzellen durch eine Bindung an den Nogo-66-Rezeptor (Zhang *et al.*, 2009). In einer anderen Studie verbesserte BAFF das Überleben von ZNS-Neuronen *in vitro* und verlangsamte das Fortschreiten in einem Tiermodell für ALS, jeweils über BAFF-R auf Neuronen (Tada *et al.*, 2013). Weitere Arbeiten werden zeigen, unter welchen Bedingungen diese weiteren Aspekte jenseits der B-Zell-Biologie beim Menschen relevant sind.

Diese verschiedenen Aufgaben im Immun- und Nervensystem sowie die Komplexität dieser Systeme mit mehreren überlappenden, teils redundanten, teils kompetitierenden Liganden und Rezeptoren unterschiedlicher Affinität, insb. beim BAFF/APRIL-System, könnte eine Erklärung dafür sein, dass z.B. Belimumab als BAFF-Blocker beim SLE erfolgreich ist und zugelassen wurde, während eine BAFF- und APRIL-Blockade durch Atacicept bei der MS sogar zu einer paradox verstärkten Erkrankungsaktivität führte (Kappos *et al.*, 2014). Dies zeigt, dass eine sorgfältige Analyse dieser Faktoren zu einem neuen therapeutischen Ansatz führen kann (Belimumab), dass aber ähnliche Intervention in ähnlichen Situationen (z.B. Belimumab und Atacicept bei Autoimmunerkrankungen wie SLE und MS) sogar entgegengesetzte Wirkungen haben können, möglicherweise weil das betreffende Zytokinsystem im jeweiligen Zielorgan der Erkrankung noch andere Funktionen wahrnimmt, ähnlich wie es auch bei TNF mit destruktiven und protektiven Funktionen im ZNS via TNFR1 und TNFR2 beschrieben ist und TNF-Antagonisten bei verschiedenen inflammatorischen Erkrankungen hilfreich sind, jedoch eine MS verschlechtern/auslösen können.

2. Auswirkung von Medikamenten zur Therapie der MS speziell auf CD20-positive Zellen und das BAFF-/B-Zell-System

Interferon-beta

Nach der Identifikation von BAFF als im ZNS von Astrozyten exprimierten B-Zell-Überlebensfaktor haben wir dessen Regulation untersucht. Unerwarteterweise zeigte sich, dass Interferon-beta BAFF dosisabhängig induziert, und zwar sowohl in primären humanen Astrozyten *in vitro*, als auch *ex vivo* proportional zu dem Biomarker MxA im Blut in neutrophilen Granulozyten und Monozyten von Interferon-beta-behandelten Patienten. Im Serum der behandelten Patienten war auch mehr BAFF-Protein nachweisbar. Eine BAFF-Induktion durch Interferon-beta war nur bei behandelten MS-Patienten, nicht jedoch bei unbehandelten Patienten und Interferon-Nonrespondern feststellbar. Im Vergleich zu BAFF wurde der zweite Ligand, APRIL, nur minimal induziert. Eine relevante Veränderung der Rezeptoren war nicht nachweisbar (Krumbholz *et al.*, 2008a).

Fingolimod

Andererseits wurde die BAFF-Expression von Astrozyten durch Fingolimod *in vitro* gehemmt (Hoffmann *et al.*, 2015a). Während wir aus ethischen Gründen beim Menschen Astrozyten nur *in vitro* untersuchen konnten, formal aber nicht den Effekt einer Fingolimod-Therapie auf Astrozyten *in situ*, gibt es tierexperimentelle Daten, die eine Anreicherung von Fingolimod im ZNS und eine Beteiligung von Astrozyten am therapeutischen Effekt von Fingolimod nahelegen (zusammengefasst in Hunter *et al.*, 2016), sodass auch eine Hemmung der BAFF-Expression durch eine Fingolimod-Therapie beim Menschen möglich erscheint.

Rituximab

Unter einer Therapie mit Rituximab bei Patienten mit einer NMOSD stiegen die BAFF-Spiegel im Blut an, vermutlich aufgrund des mit der B-Zell-Depletion verbundenen geringeren Bedarfs dieses sonst limitierenden Zytokins (Pellkofer *et al.*, 2011).

Natalizumab

Die Migration von Immunzellen erfordert neben Chemokingradienten auch Haftmoleküle wie z.B. Integrine. Mit dem Ziel, die T-Zell-Migration in das ZNS zu hemmen, wurde $\alpha 4\beta 1$ -Integrin identifiziert, das speziell für die Migration von T-Zellen in das ZNS funktionell bedeutsam ist (Yednock *et al.*, 1992) und dessen Blockade durch Natalizumab stark schubprophylaktisch wirkt. Wir haben den Effekt von Natalizumab auf die verschiedenen $\alpha 4$ -integrin-positiven Immunzell-Typen im Blut untersucht. Hierbei führte Natalizumab wie erwartet zu einem Anstieg von T-Zellen im Blut, noch viel

mehr jedoch zu einem Anstieg von B-Zellen, und hierbei wiederum insb. zu einem Anstieg der CD19⁺CD10⁺ Prä-B-Zellen, die auch $\alpha 4\beta 1$ -Integrine verwenden (Abb. 6). Dies beruht a.e. darauf, dass $\alpha 4\beta 1$ -Integrine offenbar auch für die Migration von B-Zellen in das ZNS eine Rolle spielen, die unter Natalizumab im Liquor abnehmen (Stüve *et al.*, 2006), darüber hinaus jedoch vermutlich auch auf einer Hemmung der Anheftung von Prä-B-Zellen im Knochenmark über $\alpha 4$ -Integrine.

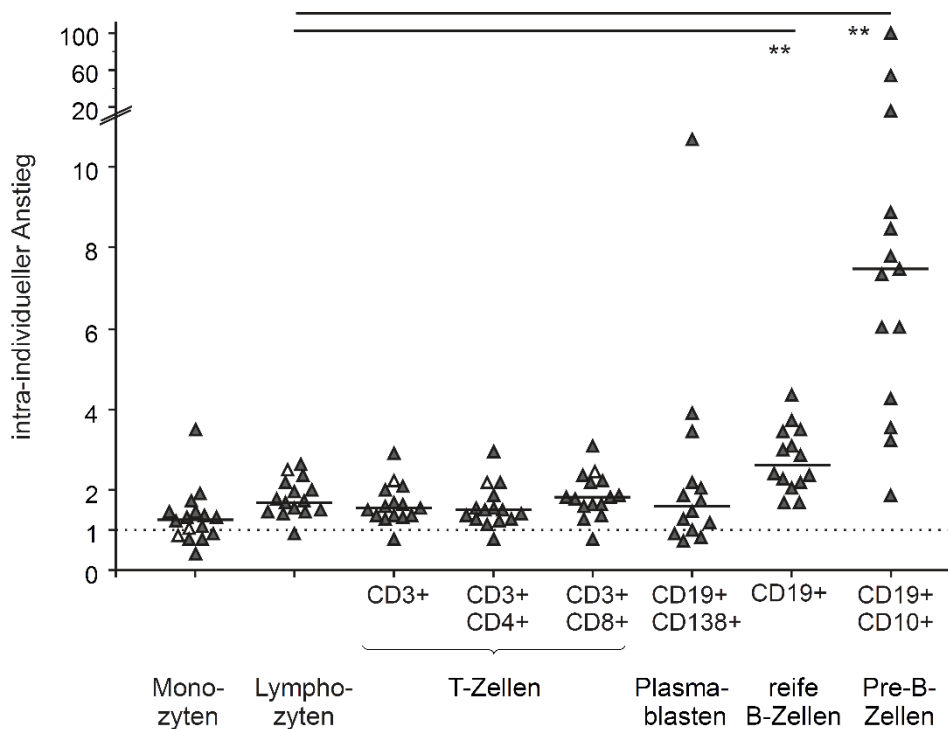


Abb. 6: Anstieg VLA4-positiver Immunzellen im Blut Natalizumab-behandelter Patienten (nach Krumbholz *et al.*, 2008b). Untersucht wurden absolute Zellzahlen der angegebenen Subpopulationen in 121 Blutproben zu verschiedenen Zeitpunkten. Der Median aller Proben eines Patienten während der Natalizumab-Therapie wurde durch den Median vor Therapie geteilt. Jeder Datenpunkt stellt somit den Anstieg des angegebenen Zelltyps bei einem Patienten dar. Hierbei zeigte sich ein überproportionaler Anstieg der CD19⁺ B-Zellen, insbesondere der CD19⁺CD10⁺ Prä-B-Zellen.

Rituximab, Natalizumab und CD3⁺CD20⁺ T-Zellen

Während Medikamente wie Rituximab, Ocrelizumab oder Belimumab gezielt das B-Zell-System adressieren, war ein solcher Effekt bei anderen Medikamenten nicht in relevantem Umfang bekannt und intendiert. Andersherum kann auch eine hochselektive Anti-CD20-Therapie, die B-Zellen-depletiert, nicht nur indirekte Auswirkungen auf T-Zellen haben, sondern es gibt auch ein kleines Subset CD20-positiver T-Zellen. Aus umfangreichen Untersuchungen war bekannt, dass es sich trotz der Expression des „B-Zell-Markers“ CD20 um CD3⁺ T-Zellen handelt, die zusätzlich auch CD20 transkribieren und auf ihrer Oberfläche tragen, ebenso wie einen T-Zell-Rezeptor. Ein Artefakt, z.B.

durch Membranaustausch oder Doubletten, konnte ausgeschlossen werden (Palanichamy *et al.*, 2014).

Wir konnten zeigen, dass diese Zellen nicht nur im Blut, sondern in ähnlicher Häufigkeit auch im Liquor, Knochenmark, Thymus und sekundärem lymphatischem Gewebe vorkommen. Die Expressionsstärke von CD20 auf CD3⁺CD20⁺ T-Zellen ist geringer als auf B-Zellen, diese werden jedoch von Rituximab ebenfalls im Blut vollständig depletiert im Rahmen der Nachweisgrenzen der Durchflusszytometrie. Wir konnten zeigen, dass im Vergleich zu regulären B-Zellen das Wiederauftreten dieser CD3⁺CD20⁺ T-Zellen im Blut wesentlich früher beginnt, und zwar schon innerhalb des üblichen 6-Monats-Intervalls zwischen den Rituximab-Infusionen, während dessen die regulären B-Zellen normalerweise durchgehend im Rahmen der FACS-Sensitivität depletiert bleiben. Dadurch könnten sie sich als Biomarker eignen; dies muss in weiteren Studien untersucht werden. Auch andere Medikamente hatten einen Einfluss auf diese Zellen; insb. Natalizumab führte zu einer absoluten und relativen Erhöhung der CD3⁺CD20⁺ T-Zellen.

Während die Funktion dieser CD3⁺CD20⁺ T-Zellen bislang unbekannt war, konnten wir zeigen, dass diese Zellen bevorzugt unter CD8⁺ Effector-Memory-Zellen auftreten (Abb. 7 oben) und leichter Zytokine wie IL4, IL17, TNF und IFN γ produzieren (Abb. 7 unten) (Schuh *et al.*, 2016).

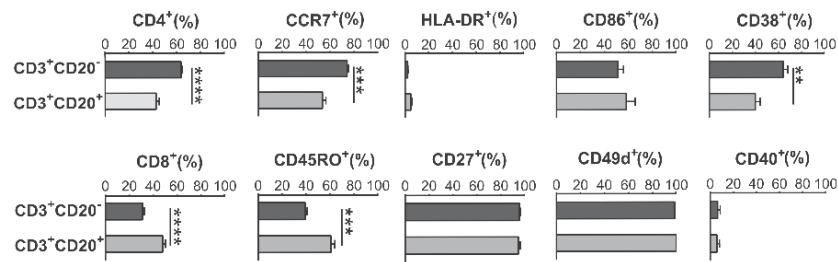
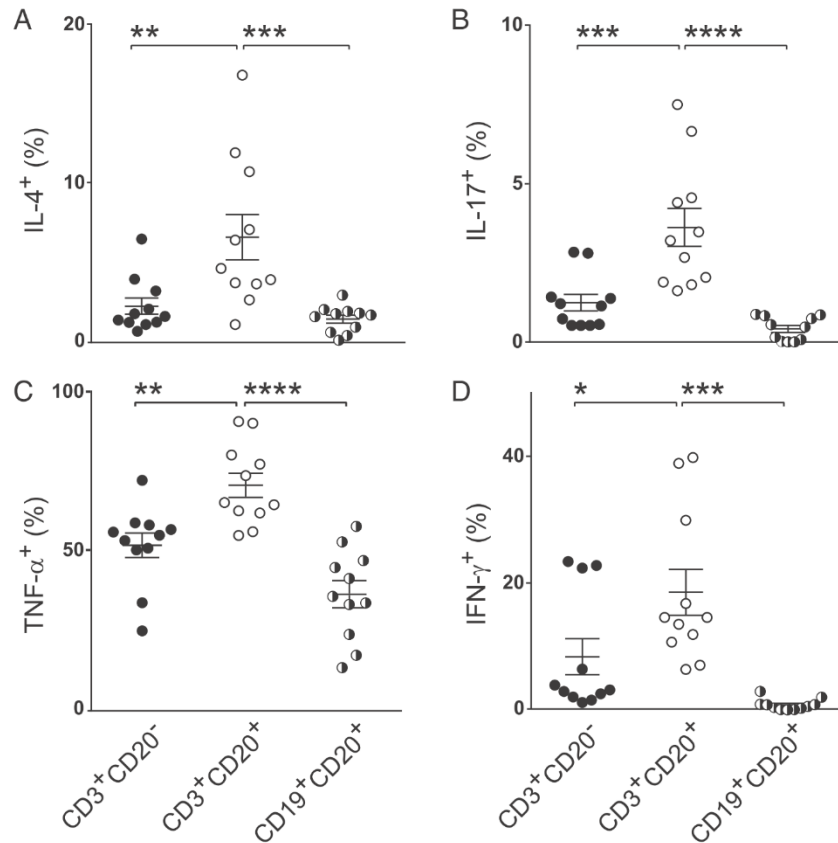
Immunphänotyp:**Zytokinproduktion:**

Abb. 7: Phänotyp (oben) und funktionelle Eigenschaften (unten) von CD3⁺CD20⁺ T-Zellen (nach Schuh *et al.*, 2016). **Immunphänotyp:** Oberflächenmarker von CD3⁺CD20⁺ T-Zellen wurden mit konventionellen CD3⁺CD20⁻ T-Zellen verglichen. Hierbei zeigte sich, dass die CD3⁺CD20⁺ T-Zellen unter den CD8⁺ Effektor-Memory-T-Zellen angereichert sind. **Zytokinproduktion:** PBMC gesunder Spender wurden für 4 h mit PMA, Ionomycin (und Brefeldin) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in der Durchflusszytometrie in CD20⁺ und CD20⁻ T-Zellen eingeteilt, und in einer intrazellulären Färbung deren Zytokinproduktion untersucht. CD3⁺CD20⁺ T-Zellen produzierten häufiger IL4, IL17, TNF und IFN γ .

3. Inflammatorische Glykosylierungsmuster bei intrathekalem IgG

Während sich die Relevanz des B-Zell-Systems bei der MS in vielerlei Hinsicht zeigt, u.a. auch im guten therapeutischen Erfolg einer B-Zell-Depletion durch z.B. Rituximab oder Ocrelizumab, ergeben sich aus folgenden Befunden weitere Hinweise auf intrathekale molekulare Mechanismen des B-Zell-Systems: Die Ektodomäne des BAFF-/APRIL-Rezeptor TACI kann durch Shedding via ADAM10 freigesetzt werden (sTACI) und wirkt als Decoy-Rezeptor (Hoffmann *et al.*, 2015b). Die Konzentration von sTACI im Blut korrelierte beim systemischem Lupus erythematodes (SLE) mit der Krankheitsaktivität, während bei der ZNS-spezifischen MS die Konzentration im Liquor mit der intrathekalen IgG-Synthese korrelierte, sodass wir erhöhte sTACI-Spiegel als systemisches (SLE) bzw. kompartimentalisiertes (MS: ZNS) Korrelat einer B-Zell-Akkumulation und -aktivierung interpretieren (Hoffmann *et al.*, 2015b).

Zum anderen haben wir IgG im Blut und Liquor von Patienten mit MS massenspektrometrisch untersucht. Hierbei konnten wir zeigen, dass im Liquor – nicht jedoch im Blut – das IgG1-Glykosylierungsmuster, verglichen mit Patienten ohne oder mit nicht-entzündlichen neurologischen Erkrankungen, einen pro-inflammatorischen Phänotyp aufweist (Abb. 8-9), und dass die Stärke dieses inflammatorischen Phänotyps sowohl mit dem Ausmaß der intrathekalen Synthese als auch der Liquorzellzahl als Surrogat für die inflammatorische Aktivität korreliert (Wuhrer *et al.*, 2015). Daher ist davon auszugehen, dass sich bei aktiverer Entzündung ein lokales Zytokinmilieu ausbildet, das die posttranslationale Modifikation des lokal produzierten IgG in Richtung eines pro-inflammatorischen Phänotyps leitet, während die systemische IgG-Produktion und die IgG-Moleküle, die aus der systemischen Zirkulation stammen, davon nicht betroffen sind.

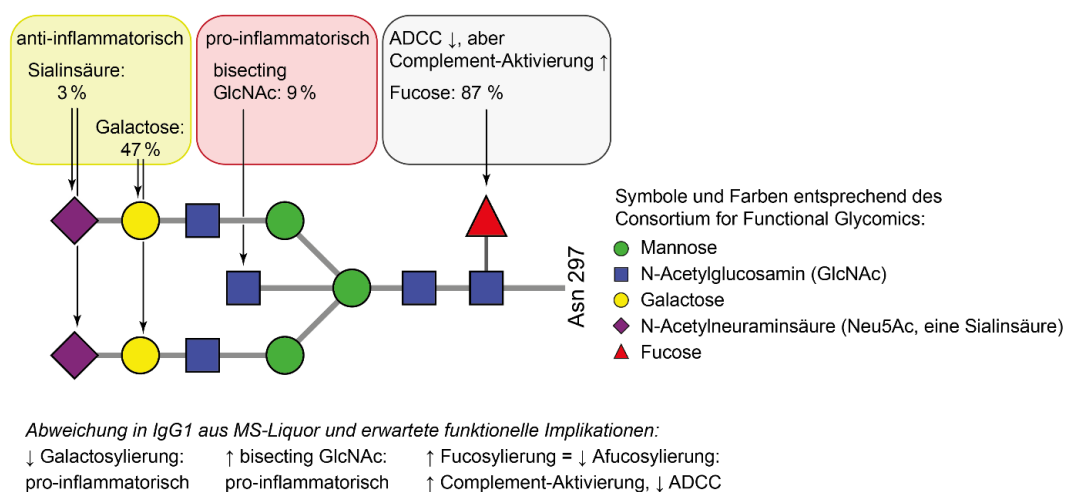


Abb. 8: Struktur des Glykosylierungsmusters von IgG und Veränderungen bei IgG1 aus Liquor von Patienten mit MS (nach Wuhrer *et al.*, 2015).

Passend zur Korrelation des Glykosylierungsmusters mit der Liquorzellzahl und intrathekalen IgG-Synthese waren die Veränderungen im IgG1-Glykosylierungsmuster am deutlichsten ausgeprägt in einer Phase nach einem Erkrankungsschub, sodass hier auch eine zeitliche Assoziation mit der Entzündungsaktivität vorliegt (Abb. 9).

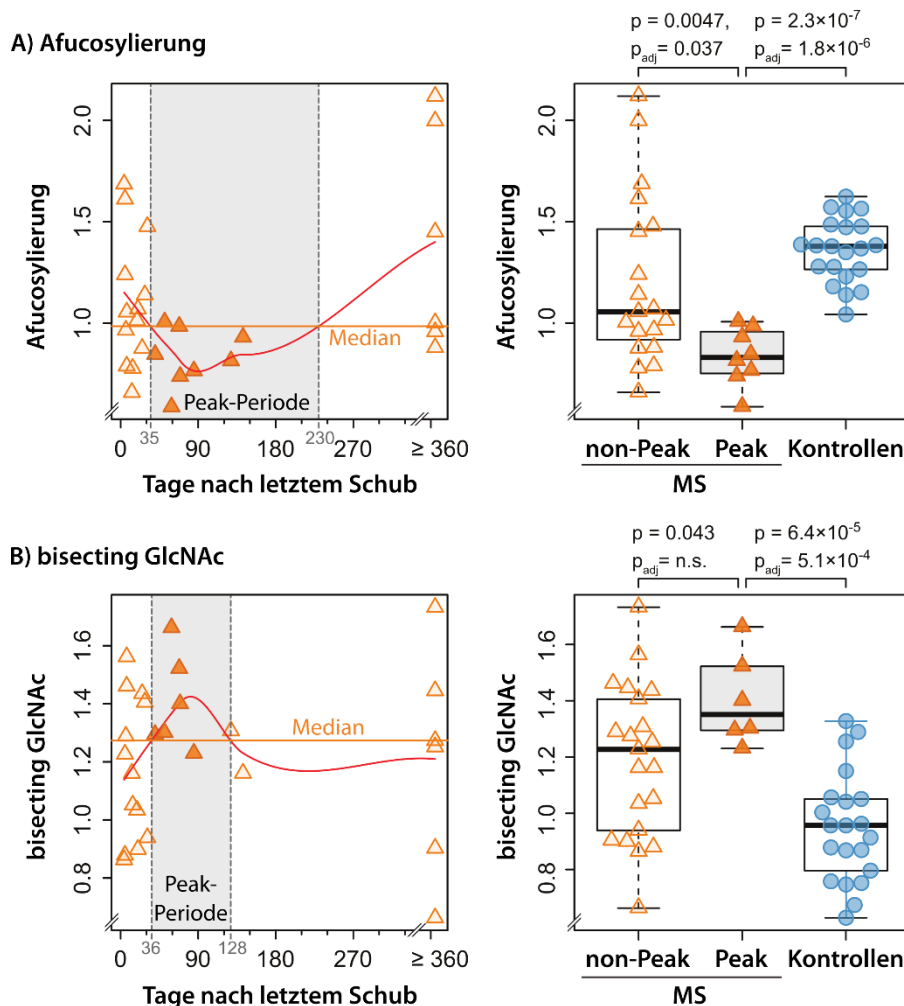


Abb. 9: Pro-inflammatorische IgG1-Glykosylierungsmuster im Liquor von MS-Patienten (nach Wuhrer *et al.*, 2015). Die Glykosylierung von IgG1 in Liquor und Serum wurde massenspektrometrisch gemessen. Dargestellt auf der Y-Achse ist jeweils die Liquor-Serum-Ratio für die jeweiligen Zuckerreste, welche sich als bester Parameter erwies. Bei MS-Patienten kam weniger afukosyliertes IgG1 (A) und vermehrt IgG1 mit bisecting GlcNAc (B) vor, und zwar insbesondere in zeitlichem Zusammenhang mit einem Erkrankungsschub. Die Peak-Periode wurde in einem hypothesenfreien Ansatz durch die Schnittpunkte des Medians aller Messwerte der MS-Patienten mit einer hypothesenfreien Regressionskurve (LOWESS) definiert.

Zusammenfassung

Bei der MS ist das ZNS nicht nur passives Zielorgan des überaktiven Immunsystems, sondern hirneigene Zellen, wie z.B. Astrozyten, greifen auch selber aktiv in den Erkrankungsprozess ein, z.B. durch die Produktion von Zytokinen.

Bzgl. der Frage „**Wie entsteht im ZNS ein B-Zell-permissives Milieu?**“ konnten wir zeigen, dass Astrozyten bereits im gesunden Gehirn BAFF produzieren. Unter entzündlichen Bedingungen steigerte sich die BAFF-Expression erheblich und erreichte *in situ* das Niveau sekundärer lymphatischer Organe, und überstieg *in vitro* sogar deutlich das Niveau optimal aktivierter Makrophagen. Daher ist anzunehmen, dass das von Astrozyten produzierte BAFF bei Patienten mit MS dazu beiträgt, dass B-Zellen eine Überlebensnische im ZNS finden.

Die Migration von B-Zellen in das ZNS wird u.a. von Chemokinen kontrolliert. B-Zellen tragen Chemokinrezeptoren insb. für CCL19 und CCL21, CXCL12 und CXCL13. Wir haben eine differentielle Expression dieser Chemokine bzgl. der Aktivität der Läsionen und der produzierenden Zellen gefunden. CCL19 und CXCL12 wurden bereits im gesunden Gehirn und verstärkt in MS-Läsionen exprimiert. Im Gegensatz zu CCL19 fanden wir CCL21, das an den gleichen Rezeptor wie CCL19, CCR7, bindet, weder in gesundem Gehirn noch in MS-Läsionen. CXCL13 fand sich ausschließlich in aktiven MS-Läsionen. Der Gehalt von sowohl CCL19 als auch CXCL13 korrelierte mit dem IgG-Quotienten, derjenige von CXCL13 zusätzlich mit der Zahl der B- und Plasmazellen im Liquor.

Neben den molekularen Faktoren, die ein B-Zell-permissives Milieu im ZNS schaffen, haben wir untersucht, **welche Auswirkung Medikamenten zur Therapie der MS speziell auf CD20-positive Zellen und das BAFF-/B-Zell-System haben**, insb. da dies oft nicht der initial intendierte Wirkmechanismus war. Hierbei zeigte sich, dass Interferon- β und Fingolimod die BAFF-Expression in Astrozyten beeinflussen. Rituximab führt – a.e. durch den Depletions-bedingt verminderten Verbrauch – zu einer Erhöhung der verfügbaren BAFF-Spiegels im Blut. Somit wird BAFF durch mehr Medikamente reguliert, als ursprünglich angenommen. Für welche Patientengruppe dieser Aspekt am relevantesten ist, wird sich in weiteren Arbeiten zeigen.

Natalizumab hatte unter den verschiedenen Lymphozytensubpopulationen im Blut den größten Effekt auf B-Zellen. Andersherum konnten wir zeigen, dass eine hochselektive Anti-CD20-Therapie nicht nur B-Zellen, sondern auch eine ungewöhnliche Subpopulation CD3⁺CD20⁺ T-Zellen depletiert, jedoch nicht so lange anhaltend wie B-Zellen. Diese CD3⁺CD20⁺ T-Zellen wiesen bevorzugt, aber nicht ausschließlich, den Phänotyp von CD8⁺ Effektor-Memory-Zellen auf.

Bzgl. der Frage „**Lässt sich an intrathekal produziertem IgG ein inflammatorisches Glykosylierungsmuster feststellen?**“ konnten wir zeigen, dass das Glykosylierungsmuster von IgG im Liquor, aber nicht im Blut, bei Patienten mit MS in Richtung eines pro-inflammatorischen Musters verschoben ist. Ursächlich ist vermutlich ein Einfluss des entzündlichen Milieus, in dem die Antikörper-produzierenden Zellen sich befinden, wobei die molekularen Regulationsmechanismen noch Gegenstand weiterer Forschung sind. Da ein solches IgG-Glykosylierungsmuster die IgG-Effektormechanismen wie CDC und ADCC moduliert, erscheint ein positiver Rückkopplungskreis plausibel.

Die Kenntnis der molekularen Mechanismen, die ein B-Zell-permissives Milieu im ZNS schaffen, und wie dies bereits jetzt durch Medikamente beeinflusst wird, kann ebenso wie Details zur Pathophysiologie der B-Zell-Antwort im ZNS, z.B. der IgG-Glykosylierung, dazu beitragen, die Erkrankung MS genauer zu verstehen und in Zukunft besser behandeln zu können.

Referenzen

- Allen CDC, Ansel KM, Low C, Lesley R, Tamamura H, Fujii N, Cyster JG (2004) Germinal center dark and light zone organization is mediated by CXCR4 and CXCR5. *Nature Immunology*, 5, 943–952.
- Aloisi F, Borsellino G, Samoggia P, Testa U, Chelucci C, Russo G, Peschle C, Levi G (1992) Astrocyte cultures from human embryonic brain: Characterization and modulation of surface molecules by inflammatory cytokines. *Journal of Neuroscience Research*, 32, 494–506.
- Aloisi F, Columba-Cabezas S, Franciotta D, Rosicarelli B, Magliozzi R, Reynolds R, Ambrosini E, Coccia E, Salvetti M, Serafini B (2008) Lymphoid chemokines in chronic neuroinflammation. *Journal of Neuroimmunology*, 198, 106–112.
- Anthony RM, Nimmerjahn F, Ashline DJ, Reinhold VN, Paulson JC, Ravetch JV (2008) Recapitulation of IVIG Anti-Inflammatory Activity with a Recombinant IgG Fc. *Science*, 320, 373–376.
- Aust G, Sittig D, Becherer L, Anderegg U, Schutz A, Lamesch P, Schmucking E (2004) The role of CXCR5 and its ligand CXCL13 in the compartmentalization of lymphocytes in thyroids affected by autoimmune thyroid diseases. *European Journal of Endocrinology*, 150, 225–234.
- Beketova TV, Volkov MY, Chikina MN, Nikonorova NO, Novoselova TM (2016) AB0552 Successful Experience with Belimumab in The Treatment of Refractory Granulomatosis with Polyangiitis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 75, 1093–1094.
- Brettschneider J, Czerwoniak A, Senel M, Fang L, Kassubek J, Pinkhardt E, Lauda F, Kapfer T, Jesse S, Lehmsiek V, Ludolph AC, Otto M, Tumani H (2010) The Chemokine CXCL13 Is a Prognostic Marker in Clinically Isolated Syndrome (CIS). *PLoS ONE*, 5.
- Carlsen HS, Baekkevold ES, Morton HC, Haraldsen G, Brandtzaeg P (2004) Monocyte-like and mature macrophages produce CXCL13 (B cell-attracting chemokine 1) in inflammatory lesions with lymphoid neogenesis. *Blood*, 104, 3021–3027.
- Galea I, Bechmann I, Perry VH (2007) What is immune privilege (not)? *Trends in Immunology*, 28, 12–18.
- Guyon A (2014) CXCL12 chemokine and its receptors as major players in the interactions between immune and nervous systems. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 8.
- Hauser SL, Bar-Or A, Comi G, Giovannoni G, Hartung H-P, Hemmer B, Lublin F, Montalban X, Rammohan KW, Selmaj K, Traboulsee A, Wolinsky JS, Arnold DL, Klingelschmitt G, Masterman D, Fontoura P, Belachew S, Chin P, Mairon N, Garren H, Kappos L (2016) Ocrelizumab versus Interferon Beta-1a in Relapsing Multiple Sclerosis. *New England Journal of Medicine*, 0, null.
- Hoffmann FS, Hofreiter J, Rübsamen H, Melms J, Schwarz S, Faber H, Weber P, Pütz B, Loleit V, Weber F, Hohlfeld R, Meinl E, Krumbholz M (2015a) Fingolimod induces neuroprotective factors in human astrocytes. *Journal of Neuroinflammation*, 12, 184.
- Hoffmann FS, Kuhn P-H, Laurent SA, Hauck SM, Berer K, Wendlinger SA, Krumbholz M, Khademi M, Olsson T, Dreyling M, Pfister H-W, Alexander T, Hiepe F, Kümpfel T, Crawford HC, Wekerle H, Hohlfeld R, Lichtenthaler SF, Meinl E (2015b) The Immunoregulator Soluble TACI Is Released by ADAM10 and Reflects B Cell Activation in Autoimmunity. *The Journal of Immunology*, 194, 542–552.
- Hunter SF, Bowen JD, Reder AT (2016) The Direct Effects of Fingolimod in the Central Nervous System: Implications for Relapsing Multiple Sclerosis. *CNS Drugs*, 30, 135–147.

- Kappos L, Hartung H-P, Freedman MS, Boyko A, Radü EW, Mikol DD, Lamarine M, Hyvert Y, Freudensprung U, Plitz T, van Beek J (2014) Atacicept in multiple sclerosis (ATAMS): a randomised, placebo-controlled, double-blind, phase 2 trial. *The Lancet Neurology*, 13, 353–363.
- Keegan M, König F, McClelland R, Brück W, Morales Y, Bitsch A, Panitch H, Lassmann H, Weinshenker B, Rodriguez M, Parisi J, Lucchinetti CF (2005) Relation between humoral pathological changes in multiple sclerosis and response to therapeutic plasma exchange. *The Lancet*, 366, 579–582.
- Kessenbrock K, Krumbholz M, Schönermarck U, Back W, Gross WL, Werb Z, Gröne H-J, Brinkmann V, Jenne DE (2009) Netting neutrophils in autoimmune small-vessel vasculitis. *Nature Medicine*, 15, 623–625.
- Khademi M, Kockum I, Andersson ML, Iacobaeus E, Brundin L, Sellebjerg F, Hillert J, Piehl F, Olsson T (2011) Cerebrospinal fluid CXCL13 in multiple sclerosis: a suggestive prognostic marker for the disease course. *Multiple Sclerosis Journal*, 17, 335–343.
- Kim CH, Rott LS, Clark-Lewis I, Campbell DJ, Wu L, Butcher EC (2001) Subspecialization of CXCR5⁺ T Cells. *Journal of Experimental Medicine*, 193, 1373–1382.
- Klein RS, Rubin JB (2004) Immune and nervous system CXCL12 and CXCR4: parallel roles in patterning and plasticity. *Trends in Immunology*, 25, 306–314.
- Kowarik MC, Cepok S, Sellner J, Grummel V, Weber MS, Korn T, Berthele A, Hemmer B (2012) CXCL13 is the major determinant for B cell recruitment to the CSF during neuroinflammation. *Journal of Neuroinflammation*, 9, 93.
- Krumbholz M, Meinl E (2014) B cells in MS and NMO: pathogenesis and therapy. *Seminars in Immunopathology*, 36, 339–350.
- Krumbholz M, Specks U, Wick M, Kalled SL, Jenne D, Meinl E (2005a) BAFF is elevated in serum of patients with Wegener's granulomatosis. *Journal of Autoimmunity*, 25, 298–302.
- Krumbholz M, Theil D, Derfuss T, Rosenwald A, Schrader F, Monoranu C-M, Kalled SL, Hess DM, Serafini B, Aloisi F, Wekerle H, Hohlfeld R, Meinl E (2005b) BAFF is produced by astrocytes and up-regulated in multiple sclerosis lesions and primary central nervous system lymphoma. *The Journal of Experimental Medicine*, 201, 195–200.
- Krumbholz M, Theil D, Cepok S, Hemmer B, Kivisäkk P, Ransohoff RM, Hofbauer M, Farina C, Derfuss T, Hartle C, Newcombe J, Hohlfeld R, Meinl E (2006) Chemokines in multiple sclerosis: CXCL12 and CXCL13 up-regulation is differentially linked to CNS immune cell recruitment. *Brain: A Journal of Neurology*, 129, 200–211.
- Krumbholz M, Theil D, Steinmeyer F, Cepok S, Hemmer B, Hofbauer M, Farina C, Derfuss T, Junker A, Arzberger T, Sinicina I, Hartle C, Newcombe J, Hohlfeld R, Meinl E (2007) CCL19 is constitutively expressed in the CNS, up-regulated in neuroinflammation, active and also inactive multiple sclerosis lesions. *Journal of Neuroimmunology*, 190, 72–79.
- Krumbholz M, Faber H, Steinmeyer F, Hoffmann L-A, Kümpfel T, Pellkofer H, Derfuss T, Ionescu C, Starck M, Hafner C, Hohlfeld R, Meinl E (2008a) Interferon-beta increases BAFF levels in multiple sclerosis: implications for B cell autoimmunity. *Brain: A Journal of Neurology*, 131, 1455–1463.
- Krumbholz M, Meinl I, Kümpfel T, Hohlfeld R, Meinl E (2008b) Natalizumab disproportionately increases circulating pre-B and B cells in multiple sclerosis. *Neurology*, 71, 1350–1354.
- Krumbholz M, Derfuss T, Hohlfeld R, Meinl E (2012) B cells and antibodies in multiple sclerosis pathogenesis and therapy. *Nature Reviews Neurology*, 8, 613–623.

- Langenkamp A, Nagata K, Murphy K, Wu L, Lanzavecchia A, Sallusto F (2003) Kinetics and expression patterns of chemokine receptors in human CD4⁺ T lymphocytes primed by myeloid or plasmacytoid dendritic cells. *European Journal of Immunology*, 33, 474–482.
- Lazarini F, Tham TN, Casanova P, Arenzana-Seisdedos F, Dubois-Dalcq M (2003) Role of the α -chemokine stromal cell-derived factor (SDF-1) in the developing and mature central nervous system. *Glia*, 42, 139–148.
- Lehmann-Horn K, Wang S, Sagan SA, Zamvil SS, von Büdingen H-C (2016) B cell repertoire expansion occurs in meningeal ectopic lymphoid tissue. *JCI Insight*, 1.
- Li M, Ransohoff RM (2008) Multiple roles of chemokine CXCL12 in the central nervous system: A migration from immunology to neurobiology. *Progress in neurobiology*, 84, 116–131.
- Lucchinetti C, Brück W, Parisi J, Scheithauer B, Rodriguez M, Lassmann H (2000) Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination. *Annals of Neurology*, 47, 707–717.
- Mazzucchelli L, Blaser A, Kappeler A, Schärli P, Laissue JA, Baggiolini M, Ugucioni M (1999) BCA-1 is highly expressed in *Helicobacter pylori*-induced mucosa-associated lymphoid tissue and gastric lymphoma. *The Journal of Clinical Investigation*, 104, R49–R54.
- Meinl E, Krumbholz M, Hohlfeld R (2006) B lineage cells in the inflammatory central nervous system environment: migration, maintenance, local antibody production, and therapeutic modulation. *Annals of Neurology*, 59, 880–892.
- Meinl E, Krumbholz M, Derfuss T, Junker A, Hohlfeld R (2008) Compartmentalization of inflammation in the CNS: a major mechanism driving progressive multiple sclerosis. *Journal of the Neurological Sciences*, 274, 42–44.
- Meinl E, Derfuss T, Krumbholz M, Pröbstel A-K, Hohlfeld R (2011) Humoral autoimmunity in multiple sclerosis. *Journal of the Neurological Sciences*, 306, 180–182.
- Mohan H, Friese A, Albrecht S, Krumbholz M, Elliott CL, Arthur A, Menon R, Farina C, Junker A, Stadelmann C, Barnett SC, Huitinga I, Wekerle H, Hohlfeld R, Lassmann H, Kuhlmann T, Lington C, Meinl E (2014) Transcript profiling of different types of multiple sclerosis lesions yields FGF1 as a promoter of remyelination. *Acta Neuropathologica Communications*, 2, 168.
- Montalban X, Hauser SL, Kappos L, Arnold DL, Bar-Or A, Comi G, de Seze J, Giovannoni G, Hartung H-P, Hemmer B, Lublin F, Rammohan KW, Selmaj K, Traboulsee A, Sauter A, Masterman D, Fontoura P, Belachew S, Garren H, Mairon N, Chin P, Wolinsky JS (2016) Ocrelizumab versus Placebo in Primary Progressive Multiple Sclerosis. *New England Journal of Medicine*, 0, null.
- Nelson PJ, Krensky AM (2001) Chemokines, Chemokine Receptors, and Allograft Rejection. *Immunity*, 14, 377–386.
- Palanichamy A, Jahn S, Nickles D, Derstine M, Abounasr A, Hauser SL, Baranzini SE, Leppert D, Büdingen H-C von (2014) Rituximab Efficiently Depletes Increased CD20-Expressing T Cells in Multiple Sclerosis Patients. *The Journal of Immunology*, 193, 580–586.
- Pellkofer HL, Krumbholz M, Berthele A, Hemmer B, Gerdes LA, Havla J, Bittner R, Canis M, Meinl E, Hohlfeld R, Kuempfel T (2011) Long-term follow-up of patients with neuromyelitis optica after repeated therapy with rituximab. *Neurology*, 76, 1310–1315.
- Ralf Gold, Reinhard Hohlfeld, Uwe Meier (2016) *Qualitätshandbuch Multiple Sklerose*, Ausgabe 2016 edn. Kastner & Callwey Medien GmbH, Forstinning, 200 pp.

- Rombouts Y, Ewing E, Stadt LA van de, Selman MHJ, Trouw LA, Deelder AM, Huizinga TWJ, Wuhrer M, Schaardenburg D van, Toes REM, Scherer HU (2015) Anti-citrullinated protein antibodies acquire a pro-inflammatory Fc glycosylation phenotype prior to the onset of rheumatoid arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 74, 234–241.
- Salomonsson S, Larsson P, Tengnér P, Mellquist E, Hjelmström P, Wahren-Herlenius M (2002) Expression of the B Cell-Attracting Chemokine CXCL13 in the Target Organ and Autoantibody Production in Ectopic Lymphoid Tissue in the Chronic Inflammatory Disease Sjögren's Syndrome. *Scandinavian Journal of Immunology*, 55, 336–342.
- Schuh E, Berer K, Mulazzani M, Feil K, Meinel I, Lahm H, Krane M, Lange R, Pfannes K, Subklewe M, Gürkov R, Bradl M, Hohlfeld R, Kümpfel T, Meinel E, Krumbholz M (2016) Features of Human CD3⁺CD20⁺ T Cells. *The Journal of Immunology*, 197, 1111–1117.
- Shi K, Hayashida K, Kaneko M, Hashimoto J, Tomita T, Lipsky PE, Yoshikawa H, Ochi T (2001) Lymphoid Chemokine B Cell-Attracting Chemokine-1 (CXCL13) Is Expressed in Germinal Center of Ectopic Lymphoid Follicles Within the Synovium of Chronic Arthritis Patients. *The Journal of Immunology*, 166, 650–655.
- Stüve O, Marra CM, Jerome KR, Cook L, Cravens PD, Cepok S, Frohman EM, Phillips JT, Arendt G, Hemmer B, Monson NL, Racke MK (2006) Immune surveillance in multiple sclerosis patients treated with natalizumab. *Annals of Neurology*, 59, 743–747.
- Tada S, Yasui T, Nakatsuji Y, Okuno T, Koda T, Mochizuki H, Sakoda S, Kikutani H (2013) BAFF Controls Neural Cell Survival through BAFF Receptor. *PLOS ONE*, 8, e70924.
- Tradtrantip L, Ratelade J, Zhang H, Verkman AS (2013) Enzymatic deglycosylation converts pathogenic neuromyelitis optica anti-aquaporin-4 immunoglobulin G into therapeutic antibody. *Annals of Neurology*, 73, 77–85.
- Wuhrer M, Selman MH, McDonnell LA, Kümpfel T, Derfuss T, Khademi M, Olsson T, Hohlfeld R, Meinel E, Krumbholz M (2015) Pro-inflammatory pattern of IgG1 Fc glycosylation in multiple sclerosis cerebrospinal fluid. *Journal of Neuroinflammation*, 12, 235.
- Yednock TA, Cannon C, Fritz LC, Sanchez-Madrid F, Steinman L, Karin N (1992) Prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis by antibodies against $\alpha 4\beta 1$ integrin. *Nature*, 356, 63–66.
- Zhang L, Zheng S, Wu H, Wu Y, Liu S, Fan M, Zhang J (2009) Identification of BLYS (B lymphocyte stimulator), a non-myelin-associated protein, as a functional ligand for Nogo-66 receptor. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 29, 6348–6352.

Publikationsverzeichnis

Die im nächsten Abschnitt einzeln abgedruckten Publikationen sind im Publikationsverzeichnis am linken Seitenrand gekennzeichnet.

1. Originalarbeiten als Erst- oder Letztautor

Krumbholz M, Theil D, Derfuss T, Rosenwald A, Schrader F, Monoranu C-M, Kalled SL, Hess DM, Serafini B, Aloisi F, Wekerle H, Hohlfeld R, Meinl E: BAFF is produced by astrocytes and up-regulated in multiple sclerosis lesions and primary central nervous system lymphoma. *J. Exp. Med.* 2005, 201:195–200. (IF: 13.965) [PubMed](#) [Volltext \(frei zugänglich\)](#)

Krumbholz M, Specks U, Wick M, Kalled SL, Jenne D, Meinl E: BAFF is elevated in serum of patients with Wegener's granulomatosis. *J. Autoimmun.* 2005, 25:298–302. (IF: 2.491)

Krumbholz M, Theil D, Cepok S, Hemmer B, Kivisäkk P, Ransohoff RM, Hofbauer M, Farina C, Derfuss T, Hartle C, Newcombe J, Hohlfeld R, Meinl E: Chemokines in multiple sclerosis: CXCL12 and CXCL13 up-regulation is differentially linked to CNS immune cell recruitment. *Brain J. Neurol.* 2006, 129:200–211. (IF: 7.617)

Krumbholz M, Theil D, Steinmeyer F, Cepok S, Hemmer B, Hofbauer M, Farina C, Derfuss T, Junker A, Arzberger T, Sinicina I, Hartle C, Newcombe J, Hohlfeld R, Meinl E: CCL19 is constitutively expressed in the CNS, up-regulated in neuroinflammation, active and also inactive multiple sclerosis lesions. *J. Neuroimmunol.* 2007, 190:72–79. (IF: 2.920)

Krumbholz M, Faber H, Steinmeyer F, Hoffmann L-A, Kümpfel T, Pellkofer H, Derfuss T, Ionescu C, Starck M, Hafner C, Hohlfeld R, Meinl E: Interferon-beta increases BAFF levels in multiple sclerosis: implications for B cell autoimmunity. *Brain J. Neurol.* 2008, 131:1455–1463. (IF: 9.603) [PubMed](#) [Volltext \(frei zugänglich\)](#)

Krumbholz M, Meinl I, Kümpfel T, Hohlfeld R, Meinl E: Natalizumab disproportionately increases circulating pre-B and B cells in multiple sclerosis. *Neurology* 2008, 71:1350–1354. (IF: 7.043)

Hoffmann FS, Hofreiter J, Rübsamen H, Melms J, Schwarz S, Faber H, Weber P, Pütz B, Loleit V, Weber F, Hohlfeld R, Meinl E, **Krumbholz M**: Fingolimod induces neuroprotective factors in human astrocytes. *J. Neuroinflammation* 2015, 12:184. (IF: 4.667)

Wuhrer M, Selman MH, McDonnell LA, Kümpfel T, Derfuss T, Khademi M, Olsson T, Hohlfeld R, Meinl E, **Krumbholz M**: Pro-inflammatory pattern of IgG1 Fc glycosylation in multiple sclerosis cerebrospinal fluid. *J. Neuroinflammation* 2015, 12:235. (IF: 4.667) [PubMed](#) [Volltext \(frei zugänglich\)](#)

Schuh E, Berer K, Mulazzani M, Feil K, Meinl I, Lahm H, Krane M, Lange R, Pfannes K, Subklewe M, Gürkov R, Bradl M, Hohlfeld R, Kümpfel T, Meinl E, **Krumbholz M**: Features of Human CD3⁺CD20⁺ T Cells. *J. Immunol.* 2016, 197:1111–1117. (IF 2015: 4.985) [PubMed](#) [Volltext \(frei zugänglich\)](#)

Stellmann JP*, **Krumbholz M***, Friede T, Gahlen A, Borisow N, Fischer K et al. Immunotherapies in neuromyelitis optica spectrum disorder: efficacy and predictors of response. *JNNP, in press.* (* geteilte Co-Erstaufbereitung; Annahmestätigung beiliegend. IF 2015: 6.431)

2. Originalarbeiten als Koautor

Strobel I, **Krumbholz M**, Menke A, Hoffmann E, Dunbar PR, Bender A, Hobom G, Steinkasserer A, Schuler G, Grassmann R: Efficient Expression of the Tumor-Associated Antigen Mage-3 in Human Dendritic Cells, Using an Avian Influenza Virus Vector. *Hum. Gene Ther.* 2000, 11:2207–2218. (IF: 6.796)

Farina C, **Krumbholz M**, Giese T, Hartmann G, Aloisi F, Meinl E: Preferential expression and function of Toll-like receptor 3 in human astrocytes. *J. Neuroimmunol.* 2005, 159:12–19. (IF: 2.824)

Vargas-Leal V, Bruno R, Derfuss T, **Krumbholz M**, Hohlfeld R, Meinl E: Expression and function of glial cell line-derived neurotrophic factor family ligands and their receptors on human immune cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 2005, 175:2301–2308. (IF: 6.387)

Meinl E, **Krumbholz M**, Hohlfeld R: B lineage cells in the inflammatory central nervous system environment: migration, maintenance, local antibody production, and therapeutic modulation. *Ann. Neurol.* 2006, 59:880–892. (IF: 8.051)

Hoffmann LA, **Krumbholz M**, Faber H, Kuempfel T, Starck M, Pöllmann W, Meinl E, Hohlfeld R: Multiple sclerosis: relating MxA transcription to anti-interferon-beta-neutralizing antibodies. *Neurology* 2007, 68:958–959. (IF: 6.014)

Hoffmann LA, Jarius S, Pellkofer HL, Schueller M, **Krumbholz M**, Koenig F, Johannis W, la Fougere C, Newman T, Vincent A, Voltz R: Anti-Ma and anti-Ta associated paraneoplastic neurological syndromes: 22 newly diagnosed patients and review of previous cases. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 2008, 79:767–773. (IF: 4.622)

Pellkofer HL, Armbruster L, **Krumbholz M**, Titulaer MJ, Verschuuren JJ, Schumm F, Voltz R: Lambert-eaton myasthenic syndrome differential reactivity of tumor versus non-tumor patients to subunits of the voltage-gated calcium channel. *J. Neuroimmunol.* 2008, 204:136–139. (IF: 3.159)

Derfuss T, Parikh K, Velhin S, Braun M, Mathey E, **Krumbholz M**, Kümpfel T, Moldenhauer A, Rader C, Sonderegger P, Pöllmann W, Tiefenthaller C, Bauer J, Lassmann H, Wekerle H, Karagogeos D, et al.: Contactin-2/TAG-1-directed autoimmunity is identified in multiple sclerosis patients and mediates gray matter pathology in animals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2009, 106:8302–8307. (IF: 9.432)

Kessenbrock K, **Krumbholz M**, Schönermarck U, Back W, Gross WL, Werb Z, Gröne H-J, Brinkmann V, Jenne DE: Netting neutrophils in autoimmune small-vessel vasculitis. *Nat. Med.* 2009, 15:623–625. (IF: 27.136) [PubMed](#) [Volltext \(frei zugänglich\)](#)

Junker A, **Krumbholz M**, Eisele S, Mohan H, Augstein F, Bittner R, Lassmann H, Wekerle H, Hohlfeld R, Meinl E: MicroRNA profiling of multiple sclerosis lesions identifies modulators of the regulatory protein CD47. *Brain J. Neurol.* 2009, 132:3342–3352. (IF: 9.490)

Schankin CJ, **Krumbholz M**, Sostak P, Reinisch VM, Goldbrunner R, Straube A: Headache in patients with a meningioma correlates with a bone-invasive growth pattern but not with cytokine expression. *Cephalalgia Int. J. Headache* 2010, 30:413–424. (IF: 4.265)

Mohan H, **Krumbholz M**, Sharma R, Eisele S, Junker A, Sixt M, Newcombe J, Wekerle H, Hohlfeld R, Lassmann H, Meinl E: Extracellular matrix in multiple sclerosis lesions: Fibrillar collagens, biglycan and decorin are upregulated and associated with infiltrating immune cells. *Brain Pathol. Zurich Switz.* 2010, 20:966–975. (IF: 4.741)

Pellkofer HL, **Krumbholz M**, Berthele A, Hemmer B, Gerdes LA, Havla J, Bittner R, Canis M, Meinl E, Hohlfeld R, Kuempfel T: Long-term follow-up of patients with neuromyelitis optica after repeated therapy with rituximab. *Neurology* 2011, 76:1310–1315. (IF: 8.312)

Pröbstel AK, Dornmair K, Bittner R, Sperl P, Jenne D, Magalhaes S, Villalobos A, Breithaupt C, Weissert R, Jacob U, **Krumbholz M**, Kuempfel T, Blaschek A, Stark W, Gärtner J, Pohl D, et al.: Antibodies to MOG are transient in childhood acute disseminated encephalomyelitis. *Neurology* 2011, 77:580–588. (IF: 8.312)

Havla J, Gerdes LA, Meinl I, **Krumbholz M**, Faber H, Weber F, Pellkofer HL, Hohlfeld R, Kümpfel T: De-escalation from natalizumab in multiple sclerosis: recurrence of disease activity despite switching to glatiramer acetate. *J. Neurol.* 2011, 258:1665–1669. (IF: 3.473)

Colombo E, Cordiglieri C, Melli G, Newcombe J, **Krumbholz M**, Parada LF, Medico E, Hohlfeld R, Meinl E, Farina C: Stimulation of the neurotrophin receptor TrkB on astrocytes drives nitric oxide production and neurodegeneration. *J. Exp. Med.* 2012, 209:521–535. (IF: 13.214)

Eisele S, **Krumbholz M**, Fischer M-T, Mohan H, Junker A, Arzberger T, Hohlfeld R, Bradl M, Lassmann H, Meinl E: Prospects of transcript profiling for mRNAs and MicroRNAs using formalin-fixed and paraffin-embedded dissected autoptic multiple sclerosis lesions. *Brain Pathol. Zurich Switz.* 2012, 22:607–618. (IF: 4.739)

Kümpfel T, Gerdes L-A, Wacker T, Blaschek A, Havla J, **Krumbholz M**, Pöllmann W, Feneberg W, Hohlfeld R, Lohse P: Familial Mediterranean fever-associated mutation pyrin E148Q as a potential risk factor for multiple sclerosis. *Mult. Scler. Houndmills Basingstoke Engl.* 2012, 18:1229–1238. (IF: 4.472)

Schankin CJ, Reifferscheid AK, **Krumbholz M**, Linn J, Rachinger W, Langer S, Sostak P, Arzberger T, Kretzschmar H, Straube A: Headache in patients with pituitary adenoma: clinical and paraclinical findings. *Cephalalgia Int. J. Headache* 2012, 32:1198–1207. (IF: 3.485)

Havla J, Tackenberg B, Hellwig K, Meinl I, **Krumbholz M**, Seitz F, Eienbröcker C, Gold R, Hohlfeld R, Kleiter I, Kümpfel T: Fingolimod reduces recurrence of disease activity after natalizumab withdrawal in multiple sclerosis. *J. Neurol.* 2013, 260:1382–1387. (IF: 3.841)

Fischer MT, Wimmer I, Höftberger R, Gerlach S, Haider L, Zrzavy T, Hametner S, Mahad D, Binder CJ, **Krumbholz M**, Bauer J, Bradl M, Lassmann H: Disease-specific molecular events in cortical multiple sclerosis lesions. *Brain J. Neurol.* 2013, 136:1799–1815. (IF: 10.226)

Mohan H, Friese A, Albrecht S, **Krumbholz M**, Elliott CL, Arthur A, Menon R, Farina C, Junker A, Stadelmann C, Barnett SC, Huitinga I, Wekerle H, Hohlfeld R, Lassmann H, Kuhlmann T, et al.: Transcript profiling of different types of multiple sclerosis lesions yields FGF1 as a promoter of remyelination. *Acta Neuropathol. Commun.* 2014, 2:168.

Waschbisch A, Sanderson N, **Krumbholz M**, Vlad G, Theil D, Schwab S, Mäurer M, Derfuss T: Interferon beta and vitamin D synergize to induce immunoregulatory receptors on peripheral blood monocytes of multiple sclerosis patients. *PLoS One* 2014, 9:e115488. (IF: 3.234)

Hoffmann FS, Kuhn P-H, Laurent SA, Hauck SM, Berer K, Wendlinger SA, **Krumbholz M**, Khademi M, Olsson T, Dreyling M, Pfister H-W, Alexander T, Hiepe F, Kümpfel T, Crawford HC, Wekerle H, et al.: The Immunoregulator Soluble TACI Is Released by ADAM10 and Reflects B Cell Activation in Autoimmunity. *J. Immunol.* 2015, 194:542–552. (IF: 4.985)

Spadaro M, Gerdes LA, Mayer MC, Ertl-Wagner B, Laurent S, **Krumbholz M**, Breithaupt C, Högen T, Straube A, Giese A, Hohlfeld R, Lassmann H, Meinl E, Kümpfel T: Histopathology and clinical course of MOG-antibody-associated encephalomyelitis. *Ann. Clin. Transl. Neurol.* 2015, 2:295–301.

Laurent SA, Hoffmann FS, Kuhn P-H, Cheng Q, Chu Y, Schmidt-Supprian M, Hauck SM, Schuh E, **Krumbholz M**, Rübsamen H, Wanngren J, Khademi M, Olsson T, Alexander T, Hiepe F, Pfister H-W, et al.: γ -secretase directly sheds the survival receptor BCMA from plasma cells. *Nat. Commun.* 2015, 6:7333. (IF: 11.329)

Schuh E, Lohse P, Ertl-Wagner B, Witt M, **Krumbholz M**, Frankenberger M, Gerdes L-A, Hohlfeld R, Kümpfel T: Expanding spectrum of neurologic manifestations in patients with NLRP3 low-penetrance mutations. *Neurol. Neuroimmunol. Neuroinflammation* 2015, 2:e109.

Ayzenberg I, Schöllhammer J, Hoepner R, Hellwig K, Ringelstein M, Aktas O, Kümpfel T, **Krumbholz M**, Trebst C, Paul F, Pache F, Obermann M, Zeltner L, Schwab M, Berthele A, Jarius S, et al.: Efficacy of glatiramer acetate in neuromyelitis optica spectrum disorder: a multicenter retrospective study. *J. Neurol.* 2016, doi:10.1007/s00415-015-7991-1. (IF 2015: 3.408)

Kleiter I, Gahlen A, Borisow N, Fischer K, Wernecke K-D, Wegner B, Hellwig K, Pache F, Ruprecht K, Havla J, **Krumbholz M**, Kümpfel T, Aktas O, Hartung H-P, Ringelstein M, Geis C, et al.: Neuromyelitis optica: Evaluation of 871 attacks and 1,153 treatment courses. *Ann. Neurol.* 2016, 79:206–216. (IF 2015: 9.638)

Spadaro M, Gerdes LA, **Krumbholz M**, Ertl-Wagner B, Thaler FS, Schuh E, Metz I, Blaschek A, Dick A, Brück W, Hohlfeld R, Meinl E, Kümpfel T: Autoantibodies to MOG in a distinct subgroup of adult multiple sclerosis [Internet]. *Neurol. Neuroimmunol. Neuroinflammation* 2016, 3.

Borisow N, Kleiter I, Gahlen A, Fischer K, Wernecke K-D, Pache F, Ruprecht K, Havla J, **Krumbholz M**, Kümpfel T, Aktas O, Ringelstein M, Geis C, Kleinschnitz C, Berthele A, Hemmer B, et al.: Influence of female sex and fertile age on neuromyelitis optica spectrum disorders. *Mult. Scler. Houndmills Basingstoke Engl.* 2016, doi:10.1177/1352458516671203. (IF 2015: 8.850)

3. Kasuistiken

Krumbholz M, Pellkofer H, Gold R, Hoffmann LA, Hohlfeld R, Kümpfel T: Delayed allergic reaction to natalizumab associated with early formation of neutralizing antibodies. *Arch. Neurol.* 2007, 64:1331–1333. (IF: 5.783)

Havla J, Berthele A, Kümpfel T, **Krumbholz M**, Jochim A, Kronsbein H, Ryschkewitsch C, Jensen P, Lippmann K, Hemmer B, Major E, Hohlfeld R: Co-occurrence of two cases of progressive multifocal leukoencephalopathy in a natalizumab “infusion group.” *Mult. Scler. Houndmills Basingstoke Engl.* 2013, 19:1213–1215. (IF: 4.863)

Krumbholz M, Hofstadt-van Oy U, Angstwurm K, Kleiter I, Jarius S, Paul F, Aktas O, Buchholz G, Kern P, Straube A, Kümpfel T: Very late-onset neuromyelitis optica spectrum disorder beyond the age of 75. *J. Neurol.* 2015, 262:1379–1384. (IF: 3.408)

4. Übersichtsartikel/Reviews

Meinl E, **Krumbholz M**, Derfuss T, Junker A, Hohlfeld R: Compartmentalization of inflammation in the CNS: a major mechanism driving progressive multiple sclerosis. *J. Neurol. Sci.* 2008, 274:42–44. (IF: 2.359)

Meinl E, Derfuss T, **Krumbholz M**, Pröbstel A-K, Hohlfeld R: Humoral autoimmunity in multiple sclerosis. *J. Neurol. Sci.* 2011, 306:180–182. (IF: 2.353)

Krumbholz M, Derfuss T, Hohlfeld R, Meinl E: B cells and antibodies in multiple sclerosis pathogenesis and therapy. *Nat. Rev. Neurol.* 2012, 8:613–623. (IF: 15.518) [PubMed](#) [Volltext \(frei zugänglich\)](#)

Krumbholz M, Meinl E: B cells in MS and NMO: pathogenesis and therapy. *Semin. Immunopathol.* 2014, 36:339–350. (IF: 7.748) [PubMed](#) [Volltext \(frei zugänglich\)](#)

5. Buchkapitel

Markus Krumbholz, Edgar Meinl. 2015. Immunpathogenese (Kapitel 5). Eds. Schmidt, Rudolf Manfred, Hoffmann, Frank, Faiss, Jürgen H., Köhler, Wolfgang, pp. 39–52. Multiple Sklerose: Elsevier. (Sechste Ausgabe)

(beginnend mit 5. Auflage; jetzt aktualisierte 7. Ausgabe im Druck)

6. Sonstige Veröffentlichungen: Gruppenautorenschaften

Radue E-W, Stuart WH, Calabresi PA, Confavreux C, Galetta SL, Rudick RA, Lublin FD, Weinstock-Guttman B, Wynn DR, Fisher E, Papadopoulou A, Lynn F, Panzara MA, Sandrock AW: Natalizumab plus interferon beta-1a reduces lesion formation in relapsing multiple sclerosis. *J. Neurol. Sci.* 2010, 292:28–35. (IF: 2.167)

Trebst C, Berthele A, Jarius S, Kümpfel T, Schippling S, Wildemann B, Wilke C, Neuromyelitis optica Studiengruppe (NEMOS): [Diagnosis and treatment of neuromyelitis optica. Consensus recommendations of the Neuromyelitis Optica Study Group]. *Nervenarzt* 2011, 82:768–777. (IF: 0.681)

Trebst C, Jarius S, Berthele A, Paul F, Schippling S, Wildemann B, Borisow N, Kleiter I, Aktas O, Kümpfel T, Neuromyelitis Optica Study Group (NEMOS): Update on the diagnosis and treatment of neuromyelitis optica: recommendations of the Neuromyelitis Optica Study Group (NEMOS). *J. Neurol.* 2014, 261:1–16. (IF: 3.377)

Abdruck einer Auswahl der Publikationen

Im Folgenden sind 5 Originalarbeiten und 2 Reviews abgedruckt.

Aus Copyrightgründen durfte leider kein Abdruck in der Online-Version erfolgen. Die Arbeiten sind jedoch allesamt über Pubmed und die Journal-Seiten zugänglich, siehe auch eingefügte Links.

Danksagung

Ich möchte mich bedanken bei Herrn Prof. Reinhard Hohlfeld, Direktor des Instituts für Klinische Neuroimmunologie an der Ludwig-Maximilians-Universität München, bei Herrn Prof. Martin Kerschensteiner, seit 2013 Co-Direktor des Instituts für Klinische Neuroimmunologie, und bei Herrn Prof. Hartmut Wekerle, Direktor der Abteilung für Neuroimmunologie am Max-Planck-Institut für Neurobiologie in Martinsried, für die wunderbare Postdoktorandenzeit und klinische Weiterbildung, die ich dort machen durfte. Sie haben durch ihre Unterstützung für junge Wissenschaftler und durch die enge Zusammenarbeit und Verzahnung der jeweiligen Gruppen eine hervorragende wissenschaftliche Umgebung und Atmosphäre geschaffen, in der eine kreative, ertragreiche und schöne Arbeit möglich war. Weiterhin möchte ich mich bedanken bei Herrn Prof. Brandt, Direktor der Klinik für Neurologie, Frau Prof. Dieterich, nachfolgende Direktorin der Klinik für Neurologie, und Herrn Prof. Holsboer, Direktor des Max-Planck-Instituts für Psychiatrie, für die Möglichkeit, dort wesentliche Teile meiner Facharztweiterbildung machen zu dürfen.

Ebenso möchte ich mich bei Herrn Prof. Edgar Meinl, Arbeitsgruppenleiter am Institut für Klinische Neuroimmunologie, bedanken, für seine fortwährende fundierte wissenschaftliche Unterstützung seit dem Beginn meiner Arbeit dort nach dem Studium. Ich habe viel von ihm lernen dürfen. Er hat immer ein offenes Ohr für die alltäglichen Schwierigkeiten der gesamten Arbeitsgruppe und hat allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe immer wertvolle Hilfe in allen Dingen geleistet. Ohne ihn wäre auch meine Arbeit in dieser ertragreichen Form nicht möglich gewesen.

Für die Begleitung und Unterstützung bei der Habilitation möchte ich mich bei meinem Fachmentorat bedanken, neben Prof. Reinhard Hohlfeld und Prof. Edgar Meinl auch Prof. Peter Nelson, Gruppenleiter am Nephrologischen Zentrum der LMU.

Gleichermaßen möchte ich mich bei Frau PD Dr. Tania Kümpfel bedanken, Oberärztin am Institut für klinische Neuroimmunologie. Sie hat durch Ihr Engagement, ihre Unterstützung und Persönlichkeit ein offenes und konstruktiv-kreatives Klima in der Neuroimmunologischen Ambulanz geschaffen, das viele Arbeiten an der Schnittstelle zwischen Klinik und Grundlagenforschung erst möglich gemacht hat. Von Ihr habe ich viel lernen dürfen.

Weiterhin möchte ich mich bei allen jetzigen und früheren Mitarbeitern im Labor bedanken, allen Postdoktoranden, Doktoranden, Studenten und technischen Assistenten, hier insb. auch Heike Rübsamen, die als immer zuverlässige und kollegiale medizinisch-technische Assistentin viele Projekte begleitet hat, Tobias Derfuß, einem wunderbaren Wissenschaftler, Arzt und Freund, ebenso wie Cinthia Farina, sowie Hans Faber, Florian Steinmeyer, Sylvia Eisele, Ilona Baumann, Verena

Loleit, Ellen Edwards, Johann Hofereiter, und weiterhin Franziska Thaler, Elisabeth Schuh, Sarah Laurent, Ramona Gerhards, Melania Spadaro, sowie alle weiteren Kollegen, die ich immer als äußerst kollegial und hilfsbereit erlebt habe.

Dieser Dank gilt auch allen jetzigen und früheren Gruppenleitern der benachbarten Arbeitsgruppen, Klaus Dornmair, Naoto Kawakami, Gurumoorthy Krishnamoorthy, Alexander Flügel und Andreas Holz, sowie deren Mitarbeitern, insb. auch Francesca Odoardi und Kerstin Berer, und allen weiteren nicht einzeln genannten Kollegen. Mit ihnen war immer eine äußerst vertrauensvolle und konstruktive Zusammenarbeit möglich. Ohne sie alle wäre Forschung in dieser wunderbaren Art nicht möglich gewesen.

Ebenso geht mein Dank an alle jetzigen und früheren Mitglieder der klinischen Arbeitsgruppe, insb. auch an Lisa Gerdes, Joachim Havla, Ingrid Meinl, Hannah Pellkofer, Sabine Pitter und Angelika Bamberger sowie alle weiteren nicht genannten Mitarbeiter für die immer gute Zusammenarbeit und gegenseitige Hilfsbereitschaft, sowohl bei Forschungsprojekten als auch in der Patientenversorgung. Bedanken möchte ich mich auch bei allen Kollegen der Klinik für Neurologie der LMU auf Station, in der Poliklinik und in den Diensten für die sehr kollegiale Zusammenarbeit. Bedanken möchte ich mich auch bei allen Kollegen, mit denen ich während meiner Psychiatrie-Zeit im MPI für Psychiatrie zusammenarbeiten durfte, und die daraus eine sehr interessante und lehrreiche Zeit gemacht haben, die ich nicht missen möchte.

Dank gebührt ebenso Frau Böhlke, Frau Josel, Frau Buchner und Frau Marks im Sekretariat. Sie haben immer ein offenes Ohr gehabt und mich bei der Arbeit unterstützt.

Auf dem Weg gab es unzählige weitere Mitarbeiter, Kooperationspartner und andere Menschen, die zum Gelingen der Arbeiten beigetragen haben, auch ihnen möchte ich danken.

Ebenso geht mein Dank an alle Patienten, die bei unseren Studien ihr Einverständnis gegeben, uns Bioproben geschenkt und bereitwillig mitgemacht haben, ohne daraus einen direkten Nutzen zu ziehen.

Nicht zuletzt möchte ich mich ganz besonders bei meinen Eltern bedanken, die mich immer bestens unterstützt, mir Rückhalt gegeben und mir die Ausbildung ermöglicht haben.