

Aus dem Institut für Neuropathologie
(Prof. Dr. med. C. Stadelmann-Nessler)
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

Multiplexing Mikroskopie für B-Zell- Differenzierung in humanen Multiple Sklerose-Läsionen

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät der
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Hanna Josephin Eisenberg

aus

Braunschweig

Göttingen 2021

Dekan:	Prof. Dr. med. W. Brück
Referent/in:	Prof. Dr. med. M. Weber und Prof. Dr. F. Wouters
Ko-Referent/in:	Prof. Dr. F. Odoardi
Drittreferent/in:	Prof. Dr. R. Drassel

Datum der mündlichen Prüfung: 16.05.2023

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "Multiplexing
Mikroskopie für B-Zell-Differenzierung in humanen Multiple
Sklerose-Läsionen" eigenständig angefertigt und keine anderen
als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet
zu haben.

Göttingen, den

.....
(Unterschrift)

Die Daten, auf denen die vorliegende Arbeit basiert, wurden teilweise publiziert:

Eisenberg HJ, Weber M, Wouters F, Bunt G: Fluorescence Lifetime Imaging as a Method for B-Cell-Classification in MS Lesions of the Human Brain. Posterpräsentation im Rahmen des 35th Congress of the European Committee for Treatment and Research in Multiple Sclerosis, Stockholm, 11.09.-13.09.2019

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Die Multiple Sklerose (MS).....	1
1.1.1	Die Pathologie der MS – ein Einblick in die Historie.....	1
1.1.2	Die Pathologie der MS – heutiger Kenntnisstand.....	1
1.1.3	Klinische Verlaufsformen der MS.....	3
1.1.4	Therapieoptionen – vom Kortison zu Ocrelizumab.....	4
1.2	Ziele der Arbeit.....	6
1.3	Das Vorgehen	7
1.3.1	Die Tonsille zum Etablieren immunhistochemischer Färbungen.....	7
1.3.2	Die Erstantikörperauswahl	7
1.3.3	Die Fluoreszenzmikroskopie: <i>Lifetime-Imaging</i>	9
1.3.4	Die Übertragbarkeit der etablierten Färbungen auf humanes ZNS-Gewebe.....	9
2	Material und Methoden	10
2.1	Material.....	10
2.1.1	Geräte und Software.....	10
2.1.2	Gewebe und Antikörper.....	11
2.1.3	Verbrauchsmaterialien und Chemikalien aus dem Laborbestand	12
2.2	Methoden.....	12
2.2.1	Die Fluoreszenzfärbung.....	12
2.2.2	Aufarbeitung der Gewebeschnitte.....	14
2.2.3	Das Mikroskopieverfahren	17
2.2.4	Formatierung und Aufarbeitung der Bilddateien	19
2.2.5	Auswertung mit ImageJ.....	20
3	Ergebnisse.....	26
3.1	Die Tonsilla palatina	26
3.1.1	Die Tonsillenanatomie – eine gute Orientierungshilfe.....	26
3.1.2	B- und T-Zellen im Follikel.....	27
3.2	FLIM	28
3.2.1	Vergleichbarkeit der Darstellung mit der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie.....	28
3.2.2	Unterscheidung von drei Zellpopulationen in einer Doppelfärbung	29
3.2.3	Kolokalisation im Vergleich: FLIM und konfokale Fluoreszenzmikroskopie	30
3.2.4	Differenzierbarkeit von zwei roten Fluoreszenzfarbstoffen durch Lebensdauer.....	34
3.3	Darstellung von Plasmazellen: CD20-negativ und CD138-positiv	34
3.4	Erstantikörper aus ungewöhnlichen Wirtstieren.....	36
3.4.1	CD38 aus der Ratte.....	36
3.4.2	CD27 aus dem armenischen Hamster	37
3.5	Zwei Erstantikörper aus demselben Wirtstier	37
3.6	Übertragbarkeit der Methodik auf humanes ZNS-Gewebe.....	38
4	Diskussion.....	40

4.1	Stand der Wissenschaft.....	40
4.2	Diskussion der Ergebnisse.....	43
4.3	Einordnung der Ergebnisse in den wissenschaftlichen Kontext.....	47
4.3.1	Die Bedeutung von FLIM für die Klassifizierung von B-Zellen in MS-Läsionen	47
4.3.2	Die Bedeutung von CD27 für die MS-Pathologie	49
4.3.3	Die Bedeutung von CD138 für die MS-Pathologie.....	50
4.3.4	B-Zellen als Biomarker in MS	50
4.4	Ausblick.....	51
5	Zusammenfassung.....	53
6	Anhang	54
7	Literaturverzeichnis	67

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Schematische Darstellung der CD-Oberflächenmoleküle auf Lymphozyten.....	8
Abbildung 2	Schematische Darstellung des Färbeverfahrens für zwei Erstantikörper aus demselben Wirt	14
Abbildung 3	Histogramme aus ImageJ zur Veranschaulichung der Funktion <i>Red/Green</i>	21
Abbildung 4	Schematische Darstellung der Bildverarbeitung in ImageJ zur Betonung des Überlagerungseffektes zweier Fluoreszenzmarker	25
Abbildung 5	Tonsillenanatomie	27
Abbildung 6	Lymphfollikel in der Tonsille.....	28
Abbildung 7	Lebensdauerdarstellung eines Lymphfollikels.....	29
Abbildung 8	Vergleich der Differenzierbarkeit von Kolokalisation.....	30
Abbildung 9	Vergleich zweier Färbungen mit und ohne zu erwartender Kolokalisation in der Tonsille	31
Abbildung 10	Bildanalyse zur Kolokalisation zweier Fluoreszenzfarbstoffe.....	33
Abbildung 11	Unterscheidung zweier Fluoreszenzfarbstoffe ähnlicher Spektralfarben in einem Tonsillendünnschnitt.....	34
Abbildung 12	Plasmazellen in der Tonsille.....	35
Abbildung 13	Erstantikörper CD38 aus der Ratte	36
Abbildung 14	Erstantikörper CD27 aus dem armenischen Hamster.....	37
Abbildung 15	Doppelfärbung mit zwei Erstantikörpern aus demselben Wirtstier.....	38
Abbildung 16	Übertragbarkeit der Färbungen ins ZNS	39

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Übersicht der CD-Oberflächenmoleküle auf Lymphozyten	8
Tabelle 2	Geräte und Software	10
Tabelle 3	Gewebe und Antikörper.....	11
Tabelle 4	Verbrauchsmaterialien und Chemikalien aus dem Laborbestand.....	12

Tabellenverzeichnis Anhang

Tabelle Anhang 1	Übersicht der angefertigten Färbungen.....	54
Tabelle Anhang 2	Übersicht der je Färbung genutzten Verdünnungen aller verwendeten Antikörper	59
Tabelle Anhang 3	Einstellungen für die Lochblende und Laserintensität	60

Abkürzungsverzeichnis

APC	Antigen-präsentierende Zellen (<i>antigen presenting cells</i>)
CD	Zelldifferenzierungsmarker (<i>cluster of differentiation</i>)
DGN	Deutsche Gesellschaft für Neurologie
EBV	Eppstein-Bar-Virus
EAE	Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis
EDSS	Erweiterte Skala für den Behinderungsstatus (<i>expanded disability status scale</i>)
FCS	Fetales Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
FLIM	Fluoreszenzlebensdauer-Mikroskopie (<i>fluorescence lifetime imaging microscopy</i>)
ha	Armenischer Hamster (<i>armenian hamster</i>)
HLA	Humanes Leukozyten Antigen (<i>human leukocyte antigen</i>)
MHC	Histologie-Kompatibilitätskomplex (<i>major histocompatibility complex</i>)
MS	Multiple Sklerose
ms	Maus (<i>mouse</i>)
MRT	Magnetresonanztomographie
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (<i>phosphate-buffered saline</i>)
PPMS	Primär progrediente Multiple Sklerose (<i>primary progressive multiple sclerosis</i>)
rb	Kaninchen (<i>rabbit</i>)
RRMS	Schubförmig remittierende Multiple Sklerose (<i>relapsing remitting multiple sclerosis</i>)
SPMS	Sekundär progrediente Multiple Sklerose (<i>secondary progressive multiple sclerosis</i>)
TCSPC	Zeitkorrelierte Einzelphotonenzählung (<i>time correlated single photon counting</i>)
ZNS	Zentrales Nervensystem

1 Einleitung

1.1 Die Multiple Sklerose (MS)

Die Multiple Sklerose (von lateinisch *multiplex* = vielfach und griechisch *skleros* = hart) ist eine chronisch-entzündliche, neurodegenerative Erkrankung des zentralen Nervensystems (ZNS). Sie ist die häufigste neurologische Ursache für bleibende Behinderung im jungen Erwachsenenalter (DGN 2012). Im Jahr 2015 betrug die Inzidenz für MS im Alter von 25 bis 29 Jahren in Deutschland fast 35 Neuerkrankungen auf 100.000 Versicherte (Holstiege et al. 2017). Dabei sind Frauen deutlich häufiger betroffen als Männer (Kingwell et al. 2013).

1.1.1 Die Pathologie der MS – ein Einblick in die Historie

Die Erforschung der Pathologie der MS steht bereits seit fast zwei Jahrhunderten im Fokus neurologischer Forschung. Trotzdem ist der genaue Pathomechanismus der Erkrankung bis dato nicht vollständig verstanden.

Die ersten MS-typischen pathologischen Veränderungen im ZNS wurden bereits in den 1840er Jahren von den beiden Pathologen Robert Carswell und Jean Cruveilhier beschrieben (Compston 1988). 25 Jahre später beobachtete Eduard von Rindfleisch (1863) entzündliche Veränderungen der Blutgefäße als Ausgangspunkt de-myelinisierender Läsionen und legte damit den Grundstein zu unserem heutigen Verständnis der MS-Pathologie. Das klinische Erscheinungsbild der MS wurde durch den Göttinger Internisten Friedrich Theodor von Frerich bereits 1849 in seiner Schrift „Über Hirnsclerose“ charakterisiert (Murray 2009). Dennoch beschrieb erst Jean Martin Charcot im Jahre 1868 die MS als eigenständige Erkrankung. Er lieferte eine detaillierte Beschreibung vieler klinischer Symptome und verknüpfte diese mit seinen histopathologischen Beobachtungen. So definierte er die Trias Nystagmus, Ataxie und Dysarthrie als Diagnosekriterien und beschrieb Gedächtnisverlust als Folge multifokaler Entmarkungen. Außerdem erkannte er, dass nicht nur Demyelinisierung und Entzündung, sondern auch Axonverlust und Remyelinisierung zu den Pathomechanismen der MS gehören und das klinische Bild prägen (Charcot 1869).

Die Entwicklung eines Tiermodells für die MS begann 1933 mit den Forschungen von Rivers et al. (1933), der durch die Injektion von ZNS-Material aus Kaninchen eine demyelinisierende Enzephalitis in Affen auslöste. Die so generierte experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis (EAE) dient bis heute als wichtiges Modell einer Autoimmunerkrankung, die dem Erscheinungsbild der MS ähnelt (Rivers und Schwentker 1935).

1.1.2 Die Pathologie der MS – heutiger Kenntnisstand

Die spezifische Immunabwehr des menschlichen Immunsystems stützt sich auf die Lymphozyten. Diese Zellen besitzen Oberflächenrezeptoren, mit denen sie spezifische Antigene

erkennen können, welche in den sekundär lymphatischen Organen präsentiert werden. Erkennt ein Lymphozyt sein spezifisches Antigen kommt es zur Proliferation und schließlich zur spezifischen Immunantwort. Unter den Lymphozyten gibt es zwei verschiedene Zelllinien: Die T- und die B-Lymphozyten. Während die T-Zellen entweder als T-Helferzellen andere Immunzellen bei der Bekämpfung von Erregern unterstützen oder als zytotoxische T-Zellen zum Untergang virusinfizierter Zellen führen, reifen die B-Zellen zu Plasmazellen heran, welche Antikörper produzieren (LeBien und Tedder 2008).

Lange Zeit galt die MS als rein T-Zell-vermittelte Autoimmunerkrankung. Spätestens aber der Erfolg B-Zell-depletierender Therapien macht die Beteiligung der B-Zellen an der Pathogenese der MS evident (Gelfand et al. 2017). Auch das Auftreten von oligoklonalen Banden im Liquor bei mehr als 90% der MS-Patienten (Stangel et al. 2013), als Zeichen einer intrathekalen Antikörperproduktion, liefert einen wichtigen Hinweis für die Beteiligung von Plasmazellen (Disanto et al. 2012; Li et al. 2018). Die Entdeckung von follikulären B-Zell-Ansammlungen in den Meningen einiger MS-Patienten unterstreicht die These einer Antigen-getriebenen Immunantwort (Serafini et al. 2004; Pender und Greer 2007).

Heute wird davon ausgegangen, dass die Interaktion von aktivierten T- und B-Zellen eine entscheidende Rolle in der Entstehung der MS spielt. Erst durch die gegenseitige, weitere Aktivierung beider Zellpopulationen im Lymphknoten kommt es zu einer Überquerung der Blut-Hirn-Schranke. Was genau zu der initialen Aktivierung führt, ist nicht bekannt. Es werden verschiedene Hypothesen diskutiert, die beispielsweise dem Mikrobiom oder einer Infektion mit Epstein-Barr-Viren eine wichtige Rolle zuschreiben (Jangi et al. 2016; Veroni et al. 2018). Im ZNS kommt es dann schlussendlich zur Erkennung hirneigener Antigene und einer erneuten Aktivierung der Immunzellen. Über die Ausschüttung von Zytokinen werden weitere Entzündungszellen ins ZNS gelockt und es kommt zur autoimmunen Entzündungsreaktion. Die zugrunde gehenden Neuronen und Oligodendrozyten setzen weitere, intrazelluläre Antigene frei und verstärken dadurch die Autoaktivierung der Immunzellen (Abdelhak et al. 2017). Diese autoimmune Entzündungsreaktion wird durch eine genetische Prädispositionen und vielfältige Umweltfaktoren beeinflusst (Okuda et al. 2009; Patsopoulos und de Bakker 2011; Correale und Gaitán 2015).

B-Zellen spielen bei dieser Entzündungsreaktion eine entscheidende Rolle; und zwar nicht nur als Antikörper-produzierende Zellen. Eine weitere wichtige Funktion der B-Zellen ist das Präsentieren von Antigenen. Als solche Antigen-präsentierende Zellen (APC: *antigen presenting cells*) aktivieren B-Zellen proinflammatorische Th1- und Th17-positive T-Zellen und führen so zu einer verstärkten Entzündungsaktivität (Molnarfi et al. 2013). Im Mausmodell konnte jedoch gezeigt werden, dass eine Depletion von CD20-positiven B-Zellen durch die Reduktion regulatorischer T-Zellen auch zu einer Exazerbation der autoimmunen Entzündungsreaktion führen kann (Weber et al. 2010). Darüber hinaus können B-Zellen durch die Sekretion von antiinflammatorischen Zytokinen, wie zum Beispiel Interleukin10 zu einer verminderten Krankheitsaktivität beitragen (Fillatreau et al. 2002). Insgesamt

erfüllen B-Zellen also sowohl eine pro- wie auch eine antiinflammatorische Funktion (Li et al. 2018).

Histopathologisch lassen sich vier verschiedene Läsionsmuster unterscheiden. Alle Muster können zu jedem Zeitpunkt der Erkrankung auftreten und variieren inter- aber nicht intra-individuell. Die ersten beiden Läsionsmuster sind überwiegend demyelinisierend, wobei das erste einer T-Zell-vermittelten Entzündungsreaktion entspricht, während das zweite ein B-Zell-, beziehungsweise Antikörper-vermitteltes Entzündungsmuster aufweist. Beide Läsionsmuster zeigen typischerweise eine perivenöse Ausbreitung. Das dritte Läsionsmuster ist überwiegend durch Apoptose und Verlust von Oligodendrozyten gekennzeichnet und entspricht einer eher diffusen Demyelinisierung. Dahingegen zeigt das vierte und letzte Läsionsmuster primär eine Degeneration der Oligodendrozyten ohne Apoptosezeichen in der Läsion. Zu betonen bleibt, dass es sich bei dem zweiten, B-Zell-vermittelten Läsionsmuster um das häufigste Läsionsmuster handelt (Lucchinetti et al. 2000; Brück 2005). Diese Diversität in der Histopathologie macht deutlich, wie komplex die Pathogenese der MS ist und dass es verschiedene Pathomechanismen gibt, die zu dem klinischen Erscheinungsbild einer MS führen.

Auch wurde in den letzten Jahrzehnten immer deutlicher, dass es sich bei der MS nicht um eine rein demyelinisierende Erkrankung der weißen Substanz handelt. Bereits in frühen Stadien der Erkrankung kommt es zu einer Schädigung der Axone und zu Läsionen der grauen Substanz. Diese neurodegenerative Komponente der MS ist wesentlich für die Behinderungsprogression während des Krankheitsverlaufs verantwortlich. Während die De- und Remyelinisierung der Entzündungsherde für die klinischen Schübe verantwortlich gemacht werden kann, scheint die degenerative Komponente eher eine schleichende Verschlechterung zu bedingen (De Stefano et al. 1998; Haines et al. 2011). Auch Symptome wie Fatigue oder progrediente kognitive Defizite werden mit Axonverlust und kortikalen Läsionen in Verbindung gebracht (van Munster et al. 2015). Diese Erkenntnisse unterstreichen die Notwendigkeit für eine neuroprotektive Therapie.

1.1.3 Klinische Verlaufsformen der MS

Das klinische Erscheinungsbild der MS ist sehr variabel und reicht von der häufigen Erstmanifestation mit Sehstörungen bei Neuritis optica, über Kribbelparästhesien und Ataxie zu Harninkontinenz und Paresen (Weinshenker 1998; Compston und Coles 2008). Auch Fatigue und kognitive Defizite gehören zu den häufigen Symptomen (Henze et al. 2006). Die häufigste Verlaufsform ist die schubförmig-remittierende MS, kurz RRMS (Oh et al. 2018). Hierbei kommt es immer wieder zu der Manifestation klinischer Schübe mit zu Beginn oftmals vollständiger Erholung. Bildmorphologisch lässt sich hierfür im MRT meist eine T2-hyperintense Läsion im Marklager finden, die initial Kontrastmittel aufnimmt, als Zeichen der gestörten Blut-Hirn-Schranke und hohen Entzündungsaktivität (Polman et al. 2011). Im Verlauf kommt es zu einem Anschwellen der Entzündung und einer Remyelinisierung, was

zumindest in den ersten Jahren der Erkrankung zur Remission führt. Auch in fortgeschrittenen Stadien der MS wird häufig noch eine Teilremission erreicht. Allerdings bleibt die Läsion als Schädigung im ZNS bestehen und so kann die Symptomatik in vulnerablen Phasen, zum Beispiel im Rahmen eines Infekts wieder zu Tage treten. Dieses Phänomen wird auch als Uhthoff-Phänomen bezeichnet. In etwa 50% der Fälle geht die schubförmige Verlaufsform in eine sekundär progrediente Verlaufsform der MS (SPMS) mit oder ohne aufgesetzte Schübe über (DGN 2012). Die Progredienz zeichnet sich durch zunehmende kognitive Defizite und eine zunehmende Behinderung aus, die sich meist primär an der unteren Extremität manifestiert und im Verlauf zum Verlust der Gehfähigkeit führt (Flachenecker et al. 2008). Der Grad der Behinderung wird klinisch mithilfe des EDSS abgebildet, einer Leistungsskala, in der sich vor allem die funktionelle Behinderung durch die Einschränkung der Gehfähigkeit widerspiegelt (Kurtzke 1983). Neben der sekundär progredienten Verlaufsform gibt es auch eine primär progrediente MS (PPMS), bei der von Anfang an eher die schleichende Verschlechterung der Gehfähigkeit im Vordergrund steht.

1.1.4 Therapieoptionen – vom Kortison zu Ocrelizumab

Die Therapie der MS ist ein sich rasant entwickelndes Feld. Die Entwicklung immer neuer Therapeutika hat zu einer Bandbreite an zugelassenen Medikamenten und Therapiemöglichkeiten geführt. Die Vielfalt an Optionen und die unterschiedlichen Effizienz- aber auch Risikoprofile der zugelassenen Medikamente machen die individuelle Therapieentscheidung oft schwierig (Kieseier und Stüve 2011). Trotz der stetigen Neuerungen und einem immer besser werdenden Verständnis der Pathologie, welches auch immer neue Ansatzpunkte für Therapeutika hervorbringt, gibt es bis heute keine Heilung von der MS (Gholamzad et al. 2018).

Mitte des 20. Jahrhunderts wurde erstmals Kortison als immunmodulatorische Therapie bei MS eingesetzt. Kortikosteroide finden heute noch in der Therapie akuter Schübe Anwendung (Andersson und Goodkin 1998). Auch immunsuppressive Therapiestrategien finden bis heute Anwendung, vor allem im Rahmen der Therapie der SPMS mit Mitoxantron (Hartung et al. 2002). Das Verständnis der MS als Autoimmunerkrankung hatte also entscheidenden Einfluss auf die Entwicklung erster Therapiemöglichkeiten.

Seit Beginn des 21. Jahrhunderts wurden viele neue Ansätze für eine effektive Immunmodulation entwickelt: Mit den Zulassungen für Interferon β (Ebers 1998) und Glatirameracetat (Bornstein et al. 1987; Johnson et al. 1995) standen die ersten, bis heute eingesetzten, immunmodulierenden Basistherapeutika für die RRMS zur Verfügung. Das Ziel der Basistherapeutika ist eine Verminderung der Schubfrequenz und dadurch eine Stabilisierung und Verlangsamung des Krankheitsverlaufes (Horowski 2002).

Je stärker jedoch der Eingriff in das körpereigene Immunsystem wird, desto schwerwiegender werden auch die Nebenwirkungen, wie Infektanfälligkeit und das Auftreten opportunistischer Infektionen (Wingerchuk 2006; Bloomgren et al. 2012). Dies

wurde vor allem durch den Einsatz monoklonaler Antikörper in der MS-Therapie relevant. Die Antikörpertherapien bieten durch eine hohe Effektivität in der Schubprophylaxe Chancen in der Behandlung der MS. Sie gehen aber auch mit einem höheren Risikoprofil einher. Daher werden sie nur zur Eskalationstherapie bei hochaktiven Krankheitsverläufen eingesetzt (Buttmann und Rieckmann 2008).

Monoklonale Antikörper greifen sehr spezifisch in das Immunsystem ein, da sie jeweils gegen eine genau definierte Zielstruktur gerichtet sind. So können sie zum Beispiel den Übertritt von bestimmten Immunzellen in andere Kompartimente hemmen. Der 2006 zugelassene monoklonale Antikörper Natalizumab gegen α 4-Integrin unterbindet das Übertreten der Blut-Hirn-Schranke von Lymphozyten und Monozyten (Polman et al. 2006). Fingolimod hingegen ist gegen den Sphingosin1-Phosphat-Rezeptor gerichtet und verhindert das Austreten von T-Gedächtniszellen aus dem Lymphsystem (Kappos et al. 2010; Grützke et al. 2015).

Ein weiterer Ansatz ist die Bindung von Oberflächenmolekülen auf bestimmten Immunzellpopulationen und die damit einhergehende Depletion dieser Zellreihe. So sorgt Alemtuzumab über die Bindung von CD52 für eine langanhaltende Suppression lympho-monozytärer Zellen (Coles et al. 2012; Menge et al. 2012). Rituximab hingegen depletiert einen Großteil der B-Zellen mit Ausnahme von Plasmazellen und B-Vorläuferzellen über die Zielstruktur CD20 (Hauser et al. 2008).

Die bis dato verwendeten MS-Therapeutika lassen sich also in eine Schubtherapie und eine Schubprophylaxe unterteilen. Zur Schubtherapie stehen intravenöse Glucocorticoide und Plasmapherese zur Verfügung (Schilling et al. 2006). Zur Schubprophylaxe wird unter anderem die oben beschriebene Bandbreite an Basistherapeutika und Eskalationstherapien verwendet. Zusätzlich finden weitere Medikamente, wie Teriflunomid oder Dimethylfumarat Anwendung (MSTKG 1999; DGN 2012; Montalban et al. 2018).

Was aber sind die Optionen für Patienten mit einer primär progredienten Verlaufsform der MS? Im März 2017 wurde in den USA erstmalig ein Medikament zur Therapie der PPMS zugelassen. Es handelt sich dabei um den gegen CD20-gerichteten monoklonalen Antikörper Ocrelizumab (Kappos et al. 2011; Montalban et al. 2017; Ziemssen et al. 2017). Im Prinzip ist Ocrelizumab die weiterentwickelte und humanisierte Variante von Rituximab, weshalb weniger allergische Reaktion zu befürchten sind (Mulero et al. 2018). Seit Beginn des Jahres 2018 ist der Antikörper auch in Europa zur Therapie sowohl der schubförmigen als auch der progredienten MS-Formen zugelassen (Syed 2018).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es in den letzten Jahrzehnten eine ermutigende Vielfalt an Neuzulassungen im Bereich der MS-Therapeutika gab. Allerdings macht es diese Vielfalt umso notwendiger, die Wirkmechanismen der einzelnen Therapeutika zu kennen, um Nutzen und Risiko für den Patienten adäquat abwägen zu können. Das bessere Verständnis der Pathologie ist für die Einordnung der therapeutischen Wirkmechanismen

und das Erarbeiten neuer Therapiekonzepte essenziell. Im Gegensatz zu dem rasanten Fortschritt im Bereich der Schubprophylaktika, fehlen weiterhin Therapieoptionen zur Neuroprotektion. Dieser Mangel schlägt sich in der schlechten Behandelbarkeit der progredienten, neurodegenerativen Komponente der MS nieder (Brück et al. 2013). Insgesamt bleibt also das bessere Verständnis der MS-Pathologie der Schlüssel zur Entwicklung neuer, effektiver und hoffentlich auch neuroprotektiver Therapien.

1.2 Ziele der Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist es, die präzise Typisierung von Immunzellen in humanen Gewebeschnitten mithilfe des quantitativen Nachweisverfahrens der Fluoreszenzlebensdauer-Mikroskopie (FLIM) zu ermöglichen, um so ein besseres Verständnis für die Rolle und das Zusammenspiel der verschiedenen Lymphozyten zum Beispiel in der Pathogenese der MS gewinnen zu können.

Die Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Weber beschäftigt sich mit der B-Zell-Klassifizierung und Pathologie bei MS. Dies ist aufgrund der großen Heterogenität der unterschiedlichen B-Zellpopulationen in den verschiedenen MS-Läsionen von großer Bedeutung, um die Pathologie der Erkrankung besser zu verstehen und neue Therapieoptionen zu schaffen (Lucchinetti et al. 2000; Brück et al. 2013). Mit der Zulassung von Ocrelizumab in Europa im Januar 2018 ist nun ein weiterer, gegen CD-20 gerichteter, monoklonaler Antikörper auf dem Markt (Gelfand et al. 2017). Gerade angesichts der Entwicklung neuer B-Zell-depletierender MS-Therapeutika, stellt sich die Frage, ob es möglich wäre, spezifischer einzelne B-Zellpopulationen zu supprimieren, um so eine höhere Wirksamkeit der Therapie zu erzielen. Insbesondere angesichts der Erkenntnisse, dass B-Zellen nicht nur negative, sondern auch protektive Auswirkungen auf den Verlauf der MS haben können (Iwata et al. 2011; Lehmann-Horn et al. 2017), erscheint eine differenziertere Therapiestrategie sinnvoll (Lehmann-Horn et al. 2011). Aus diesem Grund ist ein Nachweisverfahren, welches in der Lage ist, innerhalb aktiver Läsionen zwischen unterschiedlichen B-Zellpopulationen zu unterscheiden, gefragt.

Da MS-Biopsien als Untersuchungsmaterial nur in geringen Mengen zur Verfügung stehen, entstand die Idee, ein Verfahren zu entwickeln, mit dem möglichst viele B-Zellpopulationen in einer einzigen Färbung sicher differenziert werden können. Somit könnten die verschiedenen MS-Läsionstypen sowie Läsionen in verschiedenen Erkrankungsstadien untersucht und in Bezug auf das Vorkommen und die Verteilung von B-Zellpopulationen bewertet werden.

Diese Arbeit macht sich die Expression von CD-Molekülen auf der Oberfläche von Immunzellen zu nutze. Das Expressionsmuster variiert je nach Zellpopulation und Reifegrad der Zellen. Die Herausforderung beim Anfärben dieser CD-Moleküle ist, dass nicht jede B-Zellpopulation einem spezifischen Oberflächenmarker zuzuordnen ist. Stattdessen gilt es,

spezifische Expressionsmuster durch die Kombination mehrerer Marker darzustellen. Es muss also möglich sein, mithilfe der Färbungen und Mikroskopieverfahren nicht nur die Lokalisation einzelner Oberflächenmoleküle, sondern auch deren Koexpression spezifisch abzubilden.

Die Arbeitsgruppe von Prof. Wouters beschäftigt sich mit der Etablierung innovativer Mikroskopietechnologien für den Einsatz in pathologischem Gewebe. Die FLIM-Technologie, die im Labor mitentwickelt und erweitert wurde, bietet eine einzigartige Trennfähigkeit, die sich für die Analyse der Marker-Koexpression anbietet.

Das Ziel dieser Arbeit ist es, zu zeigen, dass mithilfe der Fluoreszenzlebensdauer-Technologie eine ebensolche spezifische Differenzierung der Expressionsmuster mehrerer humaner B-Zellpopulationen möglich ist.

1.3 Das Vorgehen

1.3.1 Die Tonsille zum Etablieren immunhistochemischer Färbungen

Für die Experimente wurden zunächst Tonsillen als humanes Gewebematerial verwendet, da diese wesentlich verfügbarer sind als ZNS-Gewebe von MS-Patienten. Des Weiteren enthält die Tonsille als sekundär lymphatisches Organ Immunzellen unterschiedlicher Reifungs- und Aktivierungsgrade (Gottesberge und Koburg 1967). Auch die stereotype anatomische Anordnung der verschiedenen B- und T-Zellpopulationen in der Tonsille helfen bei der Interpretation und Auswertung der Ergebnisse.

1.3.2 Die Erstantikörperauswahl

Die Differenzierung verschiedener Immunzellpopulationen kann über die Fluoreszenzfärbung von Oberflächenmolekülen auf der Zellmembran der Immunzellen erfolgen. Die Oberflächenstrukturen von Lymphozyten wurden im CD-System (*cluster of differentiation*) zusammengefasst und klassifiziert und können somit bestimmten Lymphozytenpopulationen zugeordnet werden (Engel et al. 2015).

Im Rahmen dieser Arbeit waren vor allem verschiedene Subgruppen der B-Lymphozyten von Interesse, die wie folgt charakterisiert sind: alle B-Lymphozyten mit Ausnahme von Plasmazellen und B-Vorläuferzellen tragen CD20 auf ihrer Oberfläche. B-Gedächtniszellen weisen zusätzlich CD27 auf. Die Keimzellen, als Zentroblasten und Zentrozyten präsentieren sowohl CD20 als auch CD27 und zusätzlich CD38. Die Plasmazellen lassen sich gut von den restlichen B-Zellen abgrenzen, da sie kein CD20, dafür aber CD138 exprimieren. Außerdem finden sich CD27 und CD38 auf ihrer Oberfläche (Baker et al. 2018). Um die B-Lymphozyten eindeutig von T-Lymphozyten abzugrenzen, wurde ein Erstantikörper gegen CD3 genutzt. CD3 ist lediglich auf der Oberfläche von T-Zellen zu finden (Zola et al. 2005; Henderson et al. 2009). Abbildung 1 und Tabelle 1 zeigen die

1.3.3 Die Fluoreszenzmikroskopie: *Lifetime-Imaging*

In der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie wird eine mit Fluoreszenzfarbstoffen gefärbte Probe mit einem Laser angeregt. Benutzt man für die Anregung einen Laser einer für jeden Farbstoff charakteristischen Wellenlänge, so emittiert der Farbstoff Licht einer anderen, längeren Wellenlänge. Der Fluoreszenzfarbstoff leuchtet also in einer bestimmten Farbe. Diese Wellenlängenverschiebung, Stokes'sche-Verschiebung genannt, macht es möglich, das streuende Anregungslicht aus dem Mikroskopiebild herauszufiltern (Stokes 1852). Der Betrachter nimmt also nur die Lichtinformation wahr, die durch die Emission der angeregten Fluoreszenzfarbstoffe entsteht. Die Fluoreszenzfarbstoffe werden an Antikörper gekoppelt und können darüber an bestimmte Zielstrukturen gebunden werden. So können in einem Gewebeschnitt Zellstrukturen farblich markiert und mithilfe eines Filters sichtbar gemacht werden.

Bei der Akquisition von Bilddaten mittels FLIM geht es aber nicht um die Farbe des jeweiligen Fluoreszenzfarbstoffs, sondern um die Lebensdauerinformation. Die Lebensdauer beschreibt die Zeit, die die Elektronen des Farbstoffes nach Anregung durch den Laser im angeregten Zustand verbringen, bevor sie auf ihr ursprüngliches Energieniveau zurückfallen und Licht emittieren (Hof et al. 2005). In dieser Arbeit geht es darum aufzuzeigen, dass durch FLIM ein zusätzlicher Informationsgewinn entsteht, welcher es zum einen ermöglicht, zwei gleichfarbige Fluoreszenzmarker anhand ihrer spezifischen Lebensdauer voneinander zu unterscheiden. Zum anderen ist es möglich, die Kollokalisierung von zwei Oberflächenmarkern auf der Zelloberfläche mittels FLIM zu erkennen, ohne diese hierzu in zwei farbgetrennten Kanälen aufnehmen zu müssen. Es kann also die Mischung zweier Farbstoffe auf der Oberfläche einer Zelle abgebildet werden. Diese beiden Effekte führen dazu, dass mittels FLIM mehr Marker gleichzeitig an einem Gewebeschnitt genutzt und differenziert werden können als mit der herkömmlichen Fluoreszenz-Mikroskopie. Es können somit mehr Zellstrukturen in einer einzigen Färbung beurteilt werden.

Daraus ergibt sich die Frage, ob dieses Verfahren neue Möglichkeiten für die Klassifizierung von B-Zellpopulationen in MS-Läsionen bietet.

1.3.4 Die Übertragbarkeit der etablierten Färbungen auf humanes ZNS-Gewebe

Um die Aussagekraft der Fluoreszenz-Färbungen auch in ZNS- und nicht nur in Tonsillengewebe zu belegen und eine Beeinträchtigung durch Autofluoreszenz im ZNS auszuschließen, wurden einige zentrale Färbungen und Kontrollen der Sekundärantikörper an Gewebeschnitten aus einem B-Zell-Lymphom des ZNS getestet.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte und Software

Tabelle 2 Geräte und Software

Geräte	Schlittenmikrotom
	Inkubator
	Mikrowelle
	Schaukel und Küvette
	Eppendorf-Pipetten, Research, 10 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl
	Life Science / Fluoreszenz-Mikroskop: BZ-X700 (Keyence)
	Slide-Scanner: VS120 Virtual Slide Microscope (Olympus)
	Konfokales Laser Scanning Mikroskop und FLIM (Laborkonstruktion)
Software	Libre Office 6.0
	Microsoft Office 2016 / Microsoft Office 365
	Microsoft Visio Professional 2013
	PT32ICS
	TRI2
	ImageJ 1.5
	OlyVIA 2.4
	Adobe Illustrator CS2
	Zotero 5.0

2.1.2 Gewebe und Antikörper

Tabelle 3 Gewebe und Antikörper

Gewebe	humanes Tonsillengewebe aus Tonsillektomien
(Ethikantrag 19/9/10)	humanes ZNS-Lymphomgewebe aus Biopsien
Primäre Antikörper	CD3 rabbit anti human (Dako A0452)
	CD4 rabbit anti human IgG (Zytomed 503-3354)
	CD20 mouse anti human (Dako M0755)
	CD27 rabbit anti human (abcam an131254)
	CD27 armenian hamster anti human (bioLegend 124202)
	CD38 rat anti human (Biozol MBS532110)
	CD38 mouse anti human (LS-B3888)
	CD138 rabbit anti human (Biozol MBS370179)
Sekundäre Antikörper	AlexaFluor488 goat anti mouse (Invitrogen A11029)
	AlexaFluor488 goat anti rabbit (Jackson 111-545-144)
	AlexaFluor488 goat anti rabbit IgG F _c -specific (Jackson 111-545-046)
	Cy3 goat anti rabbit (Jackson 111-165-144)
	Cy3 goat anti mouse (Jackson 115-165-146)
	Cy3 donkey anti rat (Jackson 712-165-153)
	Cy3 goat anti rabbit IgG F _{ab} -specific (Jackson 111-166-047)
	TRITC goat anti rabbit (Jackson 111-025-144)
	TRITC goat anti armenian hamster (Jackson 127-025-160)
	TexasRed goat anti rabbit (Jackson 111-075-144)
Antikörperblock	Block F _{ab} donkey anti rabbit IgG (Jackson 711-007-003)

2.1.3 Verbrauchsmaterialien und Chemikalien aus dem Laborbestand

Tabelle 4 Verbrauchsmaterialien und Chemikalien aus dem Laborbestand

Verbrauchsmaterialien	Objektträger
	Deckgläschen 24*24mm
	Pipettenspitzen
	Eppendorf Reaktionsgefäße
	Tupfer
Chemikalien	Xylol
	Isopropanol
	PBS (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
	H ₂ O dest.
	Citratpuffer pH6.0 → 2.1 g Citronensäure-Monohydrat (Merck 1.00244.1000) auf 1000 ml H ₂ O dest.
	10% FCS (Fetales Kälberserum)/PBS → 1 ml Fetal Bovine Serum (Biochrom S0115) auf 9 ml PBS
	<i>Fluorescence Mounting Medium</i> (Dako S3023)
	Mowiol (Roth 0713.2) → in Glycerin gelöstes Mowiol-Granulat

2.2 Methoden

2.2.1 Die Fluoreszenzfärbung

Mithilfe der Fluoreszenzfärbung soll eine spezifische Zielstruktur detektiert werden. Dafür wird zunächst ein Erstantikörper genutzt, der diese Zielstruktur oder Teile der Zielstruktur als Antigen erkennt und spezifisch an dieses bindet. Dieser wird in hohen Konzentrationen über einen langen Zeitraum auf dem Gewebe inkubiert, um sicherzustellen, dass alle Zielstrukturen mit dem Erstantikörper besetzt sind. Die überschüssigen Antikörper werden abgewaschen. Um die so entstandenen Antigen-Antikörper-Komplexe sichtbar zu machen, wird ein zweiter Antikörper eingesetzt. Dieser Zweitantikörper ist an einen Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt. Der Zweitantikörper bindet nun spezifisch an den Erstantikörper, der wiederum an der Zielstruktur haftet. Auf diese Art und Weise wird die Zielstruktur mit einem

Fluoreszenzfarbstoff markiert und kann durch Anregung unter dem Mikroskop sichtbar gemacht werden. Der Zwischenschritt über einen Zweitantikörper dient der Erhöhung der Spezifität der Färbung, da wesentlich geringere Konzentrationen des Zweitantikörpers genutzt werden. Somit treten weniger unspezifische Bindungen des an den Fluoreszenzfarbstoff gekoppelten Antikörpers an das Gewebe auf.

Die genutzten Antikörper werden aus Wirtstieren gewonnen und weisen daher Antigeneigenschaften dieser Wirtstiere auf. Diese Eigenschaften macht man sich für die Kopplung des Zweitantikörpers an den Erstantikörper zu Nutze: Der Zweitantikörper ist gegen eine bestimmte Wirtsspezies gerichtet. Diese Bindungseigenschaften sind jedoch nicht hochspezifisch. Es kann zu Kreuzreaktionen mit verwandten Spezies kommen. Daher ist innerhalb einer Färbung darauf zu achten, dass sowohl Erst-, als auch Zweitantikörper aus möglichst distinkten Wirtstieren genutzt werden.

Es gibt allerdings eine Möglichkeit, dieses Problem zu umgehen. Dies wird schematisch in Abbildung 2 gezeigt. Jeder Antikörper besteht aus einem langen Arm (F_c) und zwei kurzen Armen (F_{ab}) (Janewa et al. 2001). Es gibt nun Zweitantikörper, die spezifisch entweder an den F_{ab} - oder den F_c -Teil eines Erstantikörpers binden. So ist es möglich eine Färbung mit zwei Erstantikörpern aus demselben Wirtstier anzufertigen, indem man ein sequenzielles Färbeverfahren nutzt. Zuerst wird ein Erstantikörper inkubiert, der anschließend mit einem F_c -spezifischen Zweitantikörper gefärbt wird. Die offenen F_{ab} -Bindungsstellen des Erstantikörpers werden in einem zweiten Schritt mit einem F_{ab} -spezifischen, ungefärbten Antikörper geblockt. Erst danach kann ein weiterer Erstantikörper aufgetragen und mit einem F_{ab} -spezifischen Zweitantikörper gefärbt werden. Da alle F_{ab} -Bindungsstellen des zuerst aufgetragenen Erstantikörpers blockiert wurden, kann der nun genutzte Zweitantikörper ausschließlich an den zweiten Erstantikörper binden.

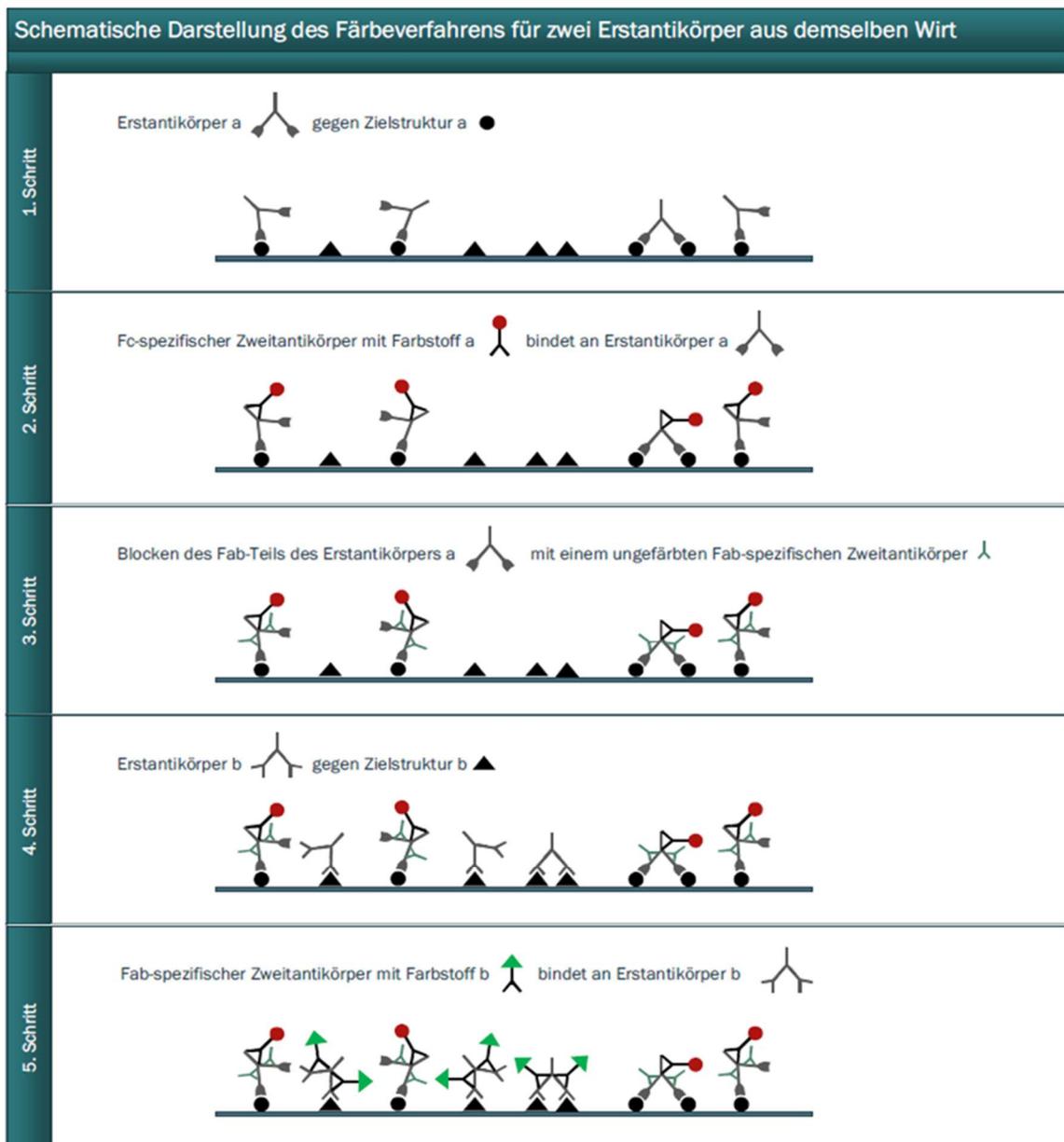


Abbildung 2 Schematische Darstellung des Färbeverfahrens für zwei Erstantikörper aus demselben Wirt

2.2.2 Aufarbeitung der Gewebeschnitte

2.2.2.1 Herstellung der Schnitte

Die Gewebeproben wurden in Form von Paraffinblöcken gelagert. Die für die Lichtmikroskopie notwendigen Dünnschnitte wurden mithilfe eines Schlittenmikrotoms angefertigt. Die 0,5 µm dicken Tonsillen- und Lymphomschnitte wurden mit einem Pinsel aufgenommen und vor dem Aufziehen auf einen Objektträger im Warmwasserbad gestreckt. Die aufgezogenen Paraffinschnitte wurden anschließend bei 60°C über eine Stunde im Inkubator abgeschmolzen und bis zur weiteren Verarbeitung bei Raumtemperatur gelagert.

2.2.2.2 Bewässerung

Vor der Färbung müssen die Schnitte über eine Xylol-/Alkoholreihe bewässert werden. Dazu wurden sie mithilfe einer Schaukel jeweils zehn Minuten in vier Xylolbädern, danach drei Minuten in einem Xylol-Isopropanol-Bad und dann je fünf Minuten in fünf Isopropanolbädern absteigender Konzentration (100%, 100%, 90%, 70%, 50%) gebadet. Anschließend wurde das Isopropanol durch gründliches Spülen mit destilliertem Wasser entfernt.

2.2.2.3 Antikörpervorbereitung

Zur Antikörpervorbereitung wurden die Gewebeschnitte fünfmal drei Minuten lang in Citratpuffer (pH = 6) gekocht. Dieser Schritt ist notwendig, um die Antigene, welche durch die Fixierung den Antikörpern nicht mehr zugänglich sind, zu demaskieren. Dazu wurden die Objektträger mit den Schnitten in einer mit Citratpuffer gefüllten Plastikkuvette platziert, diese mit einem passenden Deckel versehen und bei 800 Watt in der Mikrowelle erhitzt. Um gleiche Bedingungen für alle Schnitte zu schaffen, wurden leere Slots in der Plastikkuvette mit leeren Objektträgern aufgefüllt. Nach jedem der fünf Durchgänge musste die Kuvette wieder nachgefüllt werden, da beim Kochen Flüssigkeit verdampft. Dazu wurden abwechselnd Citratpuffer und entmineralisiertes Wasser (Aqua bidest.) verwendet. Nach den fünf Durchgängen wurden die Schnitte etwa zehn bis zwanzig Minuten abkühlen gelassen. Anschließend wurden sie mit destilliertem Wasser gespült, leicht abgetropft und in eine Glaskuvette mit 1*PBS gestellt. Da einige der Antikörper das Kochen des Gewebes in Citratpuffer zur Vorbereitung der Färbung benötigen, wurde dieses Verfahren für alle genutzten Antikörper getestet und angewendet.

2.2.2.4 Färbeprotokoll

Nach dreimaligem Spülen mit 1*PBS in der Glaskuvette wurden die Objektträger auf den Plastikstiegen einer Feuchtkammer gelagert. Nun folgte das Blocken der Schnitte mit jeweils 100 µl 10%igen FCS/PBS über mindestens zwanzig Minuten. Die Objektträger wurden nach dem Blocken gut abgetropft. Anschließend wurden je 100 µl der jeweiligen Erstantikörperlösung aufgetragen. Damit sich die Lösungen gut verteilen und die Schnitte nicht austrocknen konnten, wurden Deckgläschen aufgelegt. Die so präparierten Gewebeschnitte wurden bei 4°C in einer feuchten Kammer über Nacht inkubiert.

Vor dem Auftragen der Zweitantikörperlösung wurde wieder dreimal mit 1*PBS in einer Glaskuvette gespült. Hierbei lösten sich auch die Deckgläschen und konnten ohne Beschädigung des Tonsillengewebes entfernt werden. Dann wurden je 100 µl der jeweiligen Zweitantikörperlösung aufgetragen, wiederum mit einem Deckgläschen abgedeckt und eine Stunde bei Raumtemperatur in der dunklen, feuchten Kammer inkubiert. Zum Schluss wurde weitere drei Mal in einer dunklen Glaskuvette mit 1*PBS gespült und dann mit einem Tropfen *Fluorescence Mounting Medium* oder Mowiol unter dem Deckgläschen final fixiert. Die Deckgläschen wurden leicht angedrückt und überflüssiges Medium mit einem Tupfer

vorsichtig entfernt. Sobald das Deckglas beim Bewegen des Objektträgers nicht mehr verrutscht, können die gefärbten Gewebeschnitte mikroskopiert werden.

Alle im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Immunfärbungen wurden zunächst in humanem Tonsillengewebe getestet und etabliert. Eine Auflistung der durchgeführten Färbungen findet sich Tabelle 1 im Anhang.

2.2.2.5 Antikörpersequenz

Bei einer Färbung mit mehreren Erstantikörpern aus verschiedenen Wirtstieren wurde das Auftragen der Erstantikörper als Mischlösung bevorzugt, um den Zeitaufwand für die Färbungen zu minimieren. Ein Test dieses Verfahrens im Vergleich zu Färbungen mit sequenziellem Färbeprotokoll ergab keinen Qualitätsunterschied der erhaltenen Färbungen. Selbiges gilt für mehrere Zweitantikörper aus verschiedenen Wirtstieren.

2.2.2.6 Doppelfärbung mit zwei Erstantikörpern aus demselben Wirt

Um zwei Erstantikörper aus demselben Wirtstier zu nutzen, ist eine sequenzielle Färbung notwendig. Abbildung 2 zeigt eine schematische Darstellung dieses Färbeverfahrens. Hierfür wurde zunächst ein Erstantikörper aufgetragen im Anschluss ein F_c -spezifischer, mit einem Fluoreszenzfarbstoff markierter Zweitantikörper genutzt. Nach der Inkubation des Zweitantikörpers über eine Stunde bei Raumtemperatur und in Dunkelheit wurden ungebundene Antikörper durch dreimaliges Spülen mit 1*PBS entfernt. Nun wurden die freien Bindungsstellen am F_{ab} -Arm des Erstantikörpers durch einen F_{ab} -spezifischen Zweitantikörper ohne Fluoreszenzfarbstoff geblockt. Der Block muss über zwei Stunden ebenfalls bei Raumtemperatur inkubieren. Dieser Block soll sicherstellen, dass alle F_{ab} -Bindungsstellen des ersten Erstantikörpers belegt sind.

Nachdem wiederum dreimal mit 1*PBS gespült wurde, erfolgte das Auftragen des zweiten Erstantikörpers und eine erneute Inkubation über Nacht bei 4°C. Für diesen zweiten Erstantikörper wurde nun einen F_{ab} -spezifischer, wiederum mit einem Fluoreszenzfarbstoff markierter Zweitantikörper genutzt. Da die F_{ab} -Bindungsstellen des ersten Erstantikörpers geblockt sind, kann dieser zweite F_{ab} -spezifische Antikörper nur an den zweiten Erstantikörper binden.

2.2.2.7 Antikörperverdünnungen

Die genutzten Verdünnungen basieren auf den Erfahrungen des Labors oder auf Empfehlungen des Herstellers. Für im Labor nicht routinemäßig eingesetzte Antikörper wurde die optimale Verdünnung anhand einer Verdünnungsreihe ausgetestet. Die final verwendeten Verdünnungen finden sich in Tabelle 2 im Anhang.

2.2.2.8 Spezifitätskontrolle

Die Erstantikörper wurden im Rahmen der Verdünnungsreihe auch auf Spezifität untersucht. Dabei wurde auf die Morphologie und Lokalisation der angefärbten Strukturen geachtet. Ein Erstantikörper wurde als spezifisch angenommen, wenn er nur Zellmembranen in der zu erwartenden Lokalisation in der Tonsille angefärbt hat. Außerdem wurden soweit möglich Färbungen mit verschiedenen Zweitantikörpern durchgeführt. Für Beispielbilder siehe Abbildung 13 und Abbildung 14.

Alle Zweitantikörper wurden in der Tonsille ohne Erstantikörper getestet. Keiner der Zweitantikörper wies unspezifische Bindungen an die Tonsillenstrukturen auf.

2.2.2.9 Mowiol zum Eindeckeln

Aufgrund unterschiedlicher Erfahrungen in der Arbeitsgruppe wurden sowohl Mowiol als auch *Mounting Medium* zum Eindeckeln der Färbungen genutzt. Der visuelle Vergleich ergab eine leichte Überlegenheit von Mowiol gegenüber dem *Mounting Medium*, weshalb für die Lymphomfärbungen bevorzugt Mowiol verwendet wurde.

2.2.3 Das Mikroskopieverfahren

2.2.3.1 FLIM

Bei der Fluoreszenzmikroskopie wird die Eigenschaft der Fluoreszenzfarbstoffe genutzt, dass sie Licht absorbieren können und dieses dann in Form von Photonen niedrigerer Energie wieder emittieren. Die Elektronen des Farbstoffes werden durch Photonen angeregt und auf ein höheres Energieniveau angehoben. Beim Zurückfallen in den ursprünglichen Zustand wird diese Energie wieder frei: Und zwar in Form eines Photons, bzw. in Form von Licht niedrigerer Energie. Dabei besitzt jeder Fluoreszenzfarbstoff ein spezifisches Wellenlängenspektrum, also eine Farbe, in welcher das absorbierte Licht wieder abgegeben wird. Ebenso gibt es eine spezifische Wellenlänge, bei der der Fluoreszenzfarbstoff bestmöglich angeregt wird.

Da die Anregung immer durch Lichtphotonen höherer Energie geschieht und Lichtphotonen niedrigerer Energie, also mit längerem Wellenlängenspektrum vom Farbstoff abgegeben werden, kommt es zu einem Farbwechsel des Lichtes. Dies kann genutzt werden, um das Fluoreszenzlicht für den Betrachter sichtbar zu machen: Durch Zuhilfenahme von dielektrischen Filtern können die benötigten Wellenlängenspektren selektiert werden. Der Filter transmittiert nur einen bestimmten Wellenlängenspektralbereich, der Rest des Lichtes wird reflektiert. Somit kann zum einen während der Anregung das optimale Wellenlängenspektrum für den Farbstoff genutzt werden und zum anderen kann das recht schwache Fluoreszenzlicht für den Betrachter herausgefiltert werden. Zusätzlich benötigt man für die Fluoreszenzmikroskopie noch einen dichroitischen Spiegel. Dieser sorgt dafür, dass das

gefilterte Laserlicht auf die Probe reflektiert wird, während der Spiegel für das gefilterte Emissionslicht durchlässig ist.

Das Licht kommt also von der für die Anregung genutzten Lichtquelle und passiert zunächst den Anregungsfilter, welcher kurzwelliges Licht hoher Energie durchlässt. Dieses wird von dem dichroitischen Spiegel auf die Probe reflektiert und sorgt hier für die Anregung des Fluoreszenzfarbstoffs. Das von dem Farbstoff emittierte Licht niedrigerer Energie fällt wieder auf den dichroitischen Filter und wird hier nicht reflektiert, sondern durchgelassen. Anschließend passiert das Licht den Emissionsfilter, welcher das langwelligere Wellenlängenspektrum des Fluoreszenzfarbstoffes durchlässt. Dieses wird hierdurch für den Betrachter sichtbar. Anregungsfilter, dichroitischer Spiegel und Emissionsfilter bilden als Filterwürfel das zentrale Bauteil des Fluoreszenzmikroskops.

Bei der Konfokalmikroskopie wird zur Anregung der Probe ein monochromatischer Laser verwendet. Mit diesem werden die einzelnen Bildpunkte der Probe elektronisch im Raster abgetastet. Anschließend kann das Bild am Computer wieder zusammengesetzt und betrachtet werden. Durch die Fokussierung auf einzelne Punkte der Probe mittels Lochblende oder Glasfaser, können ein besserer Kontrast und eine bessere Auflösung erreicht werden als bei der Weitfeldmikroskopie. Außerdem besitzt das konfokale Mikroskop mit dem Strahlengang der Punktbeleuchtung die Fähigkeit, Licht aus Objektebenen außerhalb der Fokusebene zu unterdrücken, bzw. dieses herauszufiltern. Diese Eigenschaft wird im Konfokalmikroskop genutzt, um eine höhere Tiefenauflösung der Aufnahmen zu erzielen.

Man kann nun an Fluoreszenzfarbstoffe gekoppelte Antikörper nutzen, um beispielsweise bestimmte Proteine auf der Zelloberfläche von B-Zellen sichtbar zu machen. Allerdings handelt es sich bei den spezifischen Wellenlängen der Fluoreszenzfarbstoffe nicht um einen konkreten Wert, sondern um ein Wellenlängenspektrum. Dieses Spektrum deckt einen für den Farbstoff charakteristischen Bereich ab, kann aber je nach Farbstoff breiter oder schmaler sein. Da sich die Emissionsspektren der einzelnen Fluoreszenzfarbstoffe durchaus überschneiden können, ist es schwierig viele verschiedene Farbstoffe in derselben Probe zu verwenden (Lichtman und Conchello 2005).

Bei dem Einsatz von FLIM geht es nicht um die Farbe und Intensität, in der die gefärbten Zellen leuchten, sondern es wird die Lebensdauer des jeweiligen Farbstoffes bestimmt. Lebensdauer ist definiert, als die Dauer in Nanosekunden, die das Fluorophor in dem angeregten Zustand verweilt, bevor es wieder auf sein ursprüngliches Energieniveau zurückfällt und ein Photon aussendet. Diese Lebensdauer ist hoch spezifisch für die verschiedenen Farbstoffe. Auch hierbei handelt es sich um Lebensdauerspektren, diese sind aber nicht nur deutlich schmaler als die Farbspektren der Fluoreszenzfarbstoffe, sondern können sich für zwei verschiedene Farbstoffe desselben Farbtons deutlich unterscheiden (Ebrecht et al. 2014).

Die mittlere Lebensdauer τ wird über die TCSPC-FLIM ermittelt. TCSPC steht für *time correlated single photon counting*. Bei diesem Verfahren wird eine Mikroskopie-Einheit eingesetzt,

die über einen gepulsten Laser verfügt. Gemessen wird die Zeit zwischen der Anregung des Fluoreszenzfarbstoffs durch den Laserpuls und der Ankunftszeit des ersten emittierten Photons durch einen schnellen Einzelphotonendetektor. Diese Messung wird an jeder Stelle vielfach wiederholt. Daraus ergibt sich auch der Nachteil des Verfahrens: Es wird insgesamt eine relativ lange Akquisitionszeit benötigt. Die gemessenen Ankunftszeiten können in einem Histogramm abgebildet werden. Dieses Histogramm entspricht einer exponentiellen Kurve, welche durch den Faktor τ , als mittlere Ankunftszeit oder gemittelte Lebensdauer beschrieben werden kann (Becker et al. 2004; Wouters und Esposito 2008; Becker 2012).

Die so ermittelte Lebensdauer ist unabhängig von der gemessenen Intensität und der Anregungshelligkeit, sprich sie ist konzentrationsunabhängig (Suhling et al. 2015). Es handelt sich also um eine zusätzliche charakteristische Information für die spätere Bildanalyse. Diese Technik eröffnet so einen ganz neuen Blickwinkel auf die Fluoreszenzmikroskopie.

2.2.3.2 Aufnahmeeinstellungen

Für die Lebensdaueraufnahmen wurden zwei verschiedene Bandpassfilter benutzt: Für den roten Wellenlängenbereich wurde der Filter ET605/70 verwendet, welcher Licht einer zentralen Wellenlänge von 605 nm mit einer Bandbreite von 70 nm transmittiert, also von 570-640 nm. Für die FLIM-Aufnahmen wurde hier eine Expositionszeit von 500 ms festgelegt.

Entsprechend wurde im grünen Wellenlängenbereich der Filter ET520/35 mit einer Bandbreite von 35 nm um 520 nm als zentrale Wellenlänge verwendet. Hier betrug die festgelegte Expositionszeit entweder 500 ms oder 1000 ms.

Informationen zu Intensität der Laser bei Aufnahme und Größe der Lochblende sind in Tabelle 3 im Anhang zusammengefasst.

2.2.4 Formatierung und Aufarbeitung der Bilddateien

2.2.4.1 PT32ICS

Die Formatierung der Rohdaten erfolgte mit dem Programm PT32ICS. Über die Funktion *Convert* kann die entsprechende Bilddatei vom *pt3*-Format in das *ics*-Format überführt werden. Dafür muss unter Einstellungen ein Time shift von einer Nanosekunde, TRI2 als Zielausgabe, $2 * 2$ binning und die richtige Auflösung ausgewählt werden. Die so formatierte Datei ist für TRI2 lesbar und kann darin geöffnet werden (Verboogen et al. 2017).

2.2.4.2 TRI2

Um Lebensdauer (*Tau*)- sowie Intensitätsbilder (*Intensity*) zu erhalten, wurde die *Time Resolved Analysis* der TRI2-Software genutzt. Über den Menüpunkt *Pre-processing* kann mithilfe eines logarithmischen Intensitätshistogramms ein Schwellenwert (*Threshold*) gesetzt werden. Dies ist sinnvoll, um die verarbeitete Datenmenge zu reduzieren und die Analyse auf die

relevanten Zellstrukturen zu begrenzen. Mit dem Schwellenwert wurde so zwischen relevanter Information und Hintergrundrauschen differenziert. Die Lebensdauer- bzw. Intensitätsdaten wurden von einem Algorithmus in eine monoexponentiale Kurve (*Phasor*) gefittet (Wouters und Esposito 2008; Verboogen et al. 2017). Die so generierten Bilder wurden gespeichert und mithilfe von ImageJ weiter ausgewertet.

2.2.5 Auswertung mit ImageJ

2.2.5.1 Auswertung der Bilder aus der Konfokalmikroskopie

Um einen besseren Überblick und eine Vergleichsdarstellung zu haben, kann zuerst die Aufnahme der Konfokalmikroskopie geöffnet werden. Die Datei sollte im *oib*-Format vorliegen und wird als Stapel mit zwei schwarz-weiß Bildern in ImageJ geöffnet. Über die Funktion *Stack to Images* wird der Stapel in die zwei Einzelbilder des grünen und des roten Kanals aufgetrennt. Die beiden Bilder entsprechen den Intensitätsaufnahmen des Konfokalmikroskops nach Anregung durch die Laser mit den Wellenlängen 485 nm und 530 nm. Über die Funktion *Merge Channels* können die Bilder dem entsprechenden grünen, beziehungsweise roten Kanal zugeordnet und somit farblich kodiert werden.

2.2.5.2 Auswertung der Lebensdauer- und Intensitätsbilder nach FLIM

Zur Auswertung der Lebensdauer-basierten Abbildungen, wurden die mit TRI2 generierten *Tau*- und *Intensity*-Dateien geöffnet. Diese beiden Dateien lagen für jeweils jede Färbung und jeden genutzten Zweitantikörper vor.

2.2.5.3 Farbkodierung von Lebensdauer im 16-Farben-Spektrum

Die Lebensdauer in den Lebensdauerbildern *Tau* können für eine erste Visualisierung in einem 16-Farben-Spektrum kodiert werden. Um eine gute Differenzierbarkeit der im Bild enthaltenen Lebensdauerwerte zu erhalten, wurden im Menü *Brightness/Contrast* die Minimal- und Maximal-Werte angepasst. Hierfür wurden jeweils der niedrigste, beziehungsweise höchste Lebensdauerwert im Bild als Grenzwerte eingetragen. Die Werte wurden der zum Histogramm gehörigen Wertetabelle entnommen. Dieser Vorgang erlaubt die Abbildung der Lebensdauer in der vollen Bandbreite der Farbskala. Diese Darstellung entspricht einer einfachen Veranschaulichung der Lebensdauervarianz. Bei nur einem eingesetzten Fluoreszenzfarbstoff ergibt sich dementsprechend ein relativ homogenes Bild.

2.2.5.4 Farbkodierung der Lebensdauer in Rot/Grün mit visuell festgelegtem Grenzwert

Für die weitere Bildanalyse wurden die Lebensdauerbilder in Rot und Grün kodiert, im Folgenden zumeist orientiert an den entsprechenden Farben in der Konfokalmikroskopie. Es handelt sich hierbei jedoch nicht um spektrale Farben, sondern um farblich kodierte Lebensdauerwerte. Das Interessante hierbei ist, dass die Lebensdauer als Farbe dargestellt wird. Hierbei handelt es sich um eine molekulare Eigenschaft des Fluoreszenzfarbstoffes,

welche vollständig unabhängig ist von der Intensität. Dadurch wird in den Bildern ein Kontrast erzeugt, welcher es uns ermöglicht die Lebensdauer der Farbstoffe darzustellen und so sogar Fluoreszenzfarbstoffe derselben Farbe voneinander zu unterscheiden.

ImageJ legt der Darstellung der Lebensdauerbilder bereits die Zuordnung einer Grauton-Skala zugrunde. Sprich ein Lebensdauerwert von 0 wird als schwarz abgebildet und der maximale Lebensdauerwert, der in dem jeweiligen Bild enthalten ist, wird weiß dargestellt. In einem 8bit-Bild würde dies bedeuten, dass die maximale aufgezeichnete Lebensdauer des betrachteten Bildes dem Wert 255 der Grautonskala, sprich weiß, zugeordnet wird. Möchte man nun eine farbliche Darstellung des Bildes in Rot und Grün, kann die Funktion *Red/Green* genutzt werden. Hierbei wird die Skala halbiert und die erste Hälfte in die rote Farbskala umcodiert, die zweite Hälfte in die grüne Farbskala (Abbildung 3). Pixel mit einer Lebensdauer kleiner der Hälfte des maximalen Lebensdauerwert des Bildes erscheinen daher rot, Pixel mit einer längeren Lebensdauer grün. Es wird jeder Pixel im Bild einer Farbe zugeordnet. Diese Darstellungsform kann unabhängig von den Spektralfarben der Fluoreszenzfarbstoffe genutzt werden. Es spielt dabei keine Rolle, ob ein grüner und ein roter oder zwei rote Farbstoffe zur Anwendung gekommen sind.

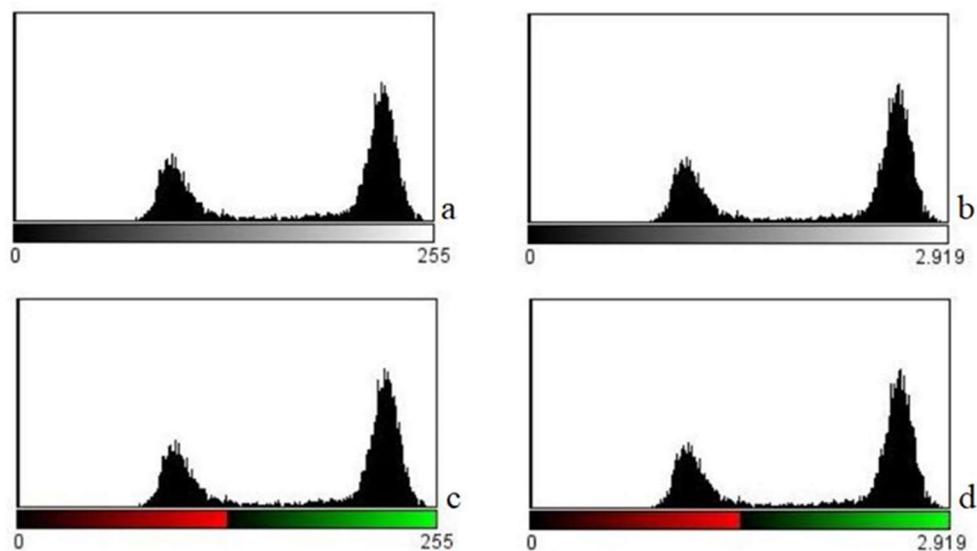


Abbildung 3 Histogramme aus ImageJ zur Veranschaulichung der Funktion *Red/Green*

Geht man von zwei Fluoreszenzfarbstoffen unterschiedlicher Spektralfarben aus, so können die in den zwei unterschiedlichen Spektralkanälen gewonnenen Lebensdauerbilder mit der Funktion *Images to Stack* in einem Stapel zusammengefügt werden. Nun folgt wie zuvor die Anwendung der Funktion *Red/Green*. Anschließend kann der Stapel wieder in zwei Einzelbilder aufgetrennt werden. Der Unterschied ist hierbei, dass sichergestellt wird, dass für beide Lebensdauerbilder dieselbe Skalierung verwendet wurde. Das ist daher relevant, da die Funktion *Red/Green* die maximale im Bild enthaltene Lebensdauer zur Ausrichtung der Skala verwendet. Dies bedeutet auch, dass zwei unterschiedliche, so dargestellte Lebensdauerbilder nicht direkt miteinander vergleichbar sind. An dieser Stelle wird eine Limitation dieser

Darstellung deutlich: Werden zwei Fluoreszenzfarbstoffe verwendet, deren Lebensdauer länger ist als die Hälfte der maximal aufgenommenen Lebensdauer, so werden beide Farbstoffe als grün dargestellt und sind nicht sicher voneinander zu unterscheiden.

2.2.5.5 Farbkodierung der Lebensdauer mit errechnetem festgelegtem Grenzwert

Um genauere und vor allem vergleichbare Bilder zu erhalten, wurde der Grenzwert für die Farbkodierung nicht visuell bestimmt, sondern aus den jeweils vorliegenden Lebensdauer-aufnahmen berechnet. Dazu wurden zunächst Histogramme der zu einem Bild gehörenden Lebensdauer-aufnahmen mit $x_{\min} = 0,01$ und $x_{\max} = 4$ erstellt. Diese Begrenzungswerte der Histogramme orientieren sich an der zu erwartenden Lebensdauer. Der minimale x-Wert darf für die Berechnung der Mittelwerte in dem Histogramm durch ImageJ nicht null sein und wurde daher auf 0,01 festgelegt. Die Mittelwerte der Lebensdauer pro Aufnahme lassen sich nun im Histogramm ablesen und werden im Folgenden als μ_{kurz} und μ_{lang} bezeichnet. Der Grenzwert μ für die farblich kodierten Darstellungen soll nun exakt in der Mitte zwischen den Mittelwerten μ_{kurz} und μ_{lang} liegen.

$$\text{Es gilt also: } \mu = \mu_{\text{kurz}} + (\mu_{\text{lang}} - \mu_{\text{kurz}}) / 2$$

Der hieraus errechnete Grenzwert μ kann nun auf die Lebensdauerbilder übertragen werden. Und zwar wurden für die Lebensdauerbilder über die Funktion *Set Threshold Levels* ein unterer und ein oberer Schwellenwert festgelegt. Das Bild mit der kürzeren Lebensdauer wurde so eingestellt, dass der untere Schwellenwert bei null liegt und der obere Schwellenwert bei dem im Vorfeld berechneten Grenzwert μ . Das Bild mit der längeren Lebensdauer beginnt bei μ und enthält Werte bis vier Nanosekunden. Alle Werte, die in dieser jeweils festgelegten Spanne nicht enthalten sind, wurden auf NaN (*not a number*) gesetzt.

Die so entstandenen Bilder wurden nun wiederum über die Funktion *Merge Channels* zu einem farbigen Bild zusammengefügt. Dieses farbige Bild kann in ein *RGB-Color*-Format umgewandelt und so für weitere Analysen und Bildbetrachtungen abgespeichert werden. In diesem Bild sind Lebensdauerwerte eindeutig einer Farbe zugeordnet. Dieses Bild enthält ausschließlich Lebensdauerinformation. Es ist keinerlei Intensitätsinformation mit eingerechnet.

2.2.5.6 Integration der Intensitätsinformation

Für eine Darstellung, die sowohl die farbkodierte Lebensdauer als auch die Intensitäten abbildet wurde wie folgt verfahren: Über den *Image Calculator* wurden die beiden jeweils zu den Lebensdauerbildern gehörenden Intensitätsbilder addiert. So entstand ein Intensitätssummenbild. Um die enthaltene Information in das zuvor erstellte farbkodierte *RGB-Color*-Lebensdauerbild einzufügen, wurde dieses in das Format *HSB-Stack* umgewandelt. Im HSB-Raum werden die Farben des Bildes in drei Achsen definiert: H steht für *Hue* und kodiert für die Farbe entsprechend der Gradzahl im Standardfarbkreis, S steht für *Saturation* und kodiert für die Farbsättigung und B steht für *Brightness* und kodiert für die Farbintensität des Bildes.

Im *HSB-Stack* können diese drei Achsen als Schwarz-Weiß-Bilder dargestellt und getrennt voneinander bearbeitet werden. Zur Integration der Intensitätsinformation wurde das zuvor errechnete Intensitätssummenbild statt dem dritten, für die Intensität kodierenden Bild B eingefügt. Der so modifizierte *HSB-Stack* wurde anschließend in das *RGB-Color*-Format zurück überführt. Unter Umständen ist dieses Bild sehr dunkel. Dies lässt sich durch eine Anpassung der Helligkeit des Intensitätssummenbildes beheben.

2.2.5.7 Darstellung von Kolo-kalisation

In den RGB-Lebensdauerbildern fällt gegebenenfalls neben einer Rot- und einer Grünfärbung eine Gelb- oder Orangefärbung auf. Diese kommt im Bild dadurch zustande, dass für ein Pixel sowohl die Information Grün als auch die Information Rot vorhanden ist. Die Farben überlagern sich und der Pixel wird gelb oder orange abgebildet. Dies kann zwei Gründe haben: Entweder es überschneiden sich die Zellmembranen zweier Zellen, die jeweils einen anderen der zwei genutzten Fluoreszenzfarbstoffe auf ihrer Oberfläche tragen. Oder aber eine einzelne Zelle ist mit beiden Fluoreszenzfarbstoffen markiert. An dieser Stelle sei noch einmal darauf hingewiesen, dass es sich bei der farblichen Darstellung nicht um die spektrale Farben der Fluoreszenzfarbstoffe handelt, sondern um farblich kodierte Lebensdauer.

Um noch besser erkennen zu können, welche Zellen, beziehungsweise Bildbereiche sich als Gelb oder Orange abbilden, wurde eine Darstellungsmethode erarbeitet, welche diesen Überlagerungseffekt verstärkt. Die hierzu nötige Bildverarbeitung ist in Abbildung 4 schematisch dargestellt. Es wurden die Lebensdauerwerte des grünen Lebensdauerbildes, also des Bildes mit der längeren Lebensdauer, an der Achse durch den eigenen Mittelwert μ_{lang} gespiegelt. Dies wurde über die Funktion *Math Macro* mit folgendem Code umgesetzt:

$$v_{\text{neu}} = v_{\text{alt}} + 2 * (\mu_{\text{lang}} - v_{\text{alt}}) \text{ oder } v_{\text{neu}} = 2 * \mu_{\text{lang}} - v_{\text{alt}} \quad \text{wobei } v \text{ der Pixelwert ist.}$$

Wichtig ist, dass die Schwellenwerte für das Bild bereits vorher festgelegt wurden, damit keine Nullwerte im Bild enthalten sind.

Das so errechnete inverse grüne Lebensdauerbild, weist nun Werte zwischen μ und dem oberen Schwellenwert auf, die in der Nähe des Grenzwertes am Höchsten und nicht wie zuvor am Niedrigsten sind. Da diese Werte als Lebensdauerwerte in der weiteren Bildverarbeitung in Farbhelligkeit umkodiert werden, führt dieser Bildverrechnungsschritt zu einem helleren Grün in der Nähe des Grenzwertes. In der Fusion aus dem roten Lebensdauerbild und dem inversen grünen Lebensdauerbild entsteht eine Abbildung, in der die Farbhelligkeiten zum gemeinsamen Grenzwert hin ansteigen. Der so erzeugte Effekt ist, dass alle Pixel, mit sich überlagernder Rot- und Grüninformation als eine eher helle Mischung beider Farben dargestellt werden und so die Farbüberschneidung bzw. die Kolo-kalisation stärker betont werden kann.

Wendet man dieselbe Formel auf das Lebensdauerbild mit den kürzeren Lebensdauerwerten an und fusioniert dieses mit dem ursprünglichen Bild mit den längeren Lebensdauerwerten,

so erhält man den gegenteiligen Effekt, da nun die Farbhelligkeiten zum gemeinsamen Grenzwert hin abnehmen.

Es kann dementsprechend eine Kollokalisierung im Bild hervorgehoben oder unterdrückt werden.



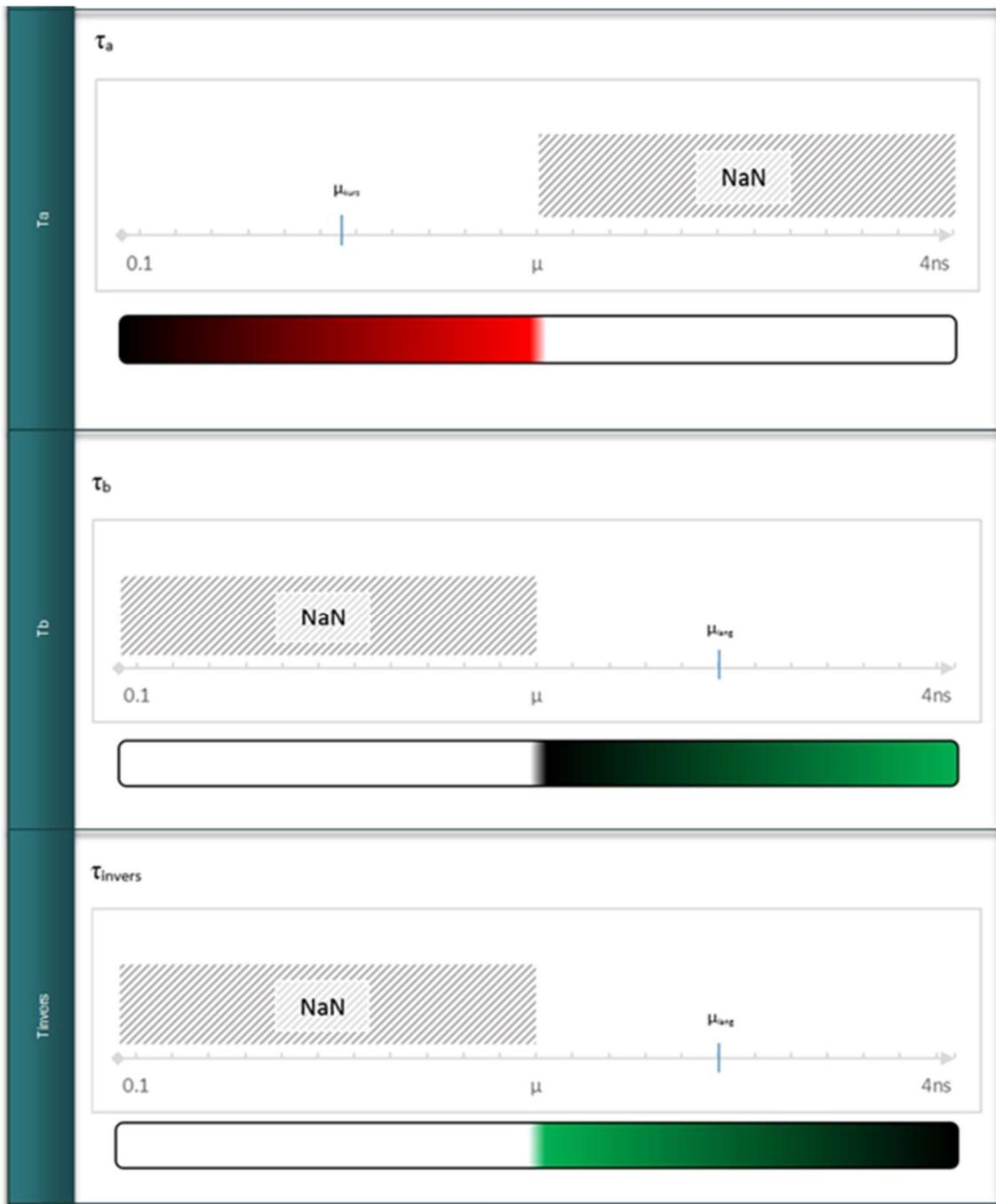


Abbildung 4 Schematische Darstellung der Bildverarbeitung in ImageJ zur Betonung des Überlagerungseffektes zweier Fluoreszenzmarker

3 Ergebnisse

3.1 Die Tonsilla palatina

3.1.1 Die Tonsillenanatomie – eine gute Orientierungshilfe

Für diese Arbeit wurde überwiegend die humane Tonsille als Gewebematerial verwendet. Diese bot einige entscheidende Vorteile: Zunächst einmal ist Tonsillengewebe gut verfügbar. Darüber hinaus enthält die Tonsille zahlreiche Lymphozyten unterschiedlicher Reifungs- und Differenzierungsstadien (Gottesberge und Koburg 1967) und bietet somit die gewünschten Zielstrukturen auf engem Raum. Weiterhin weist sie eine stereotype Anatomie auf, welche das Auffinden der Zielstrukturen vereinfacht und eine Kontrollmöglichkeit für die Spezifität der Färbungen bietet. Der histologische Aufbau der humanen Rachentonsille ließ sich in den durchgeführten Färbungen gut nachvollziehen. Abbildung 5a zeigt die schematische Zeichnung einer Tonsille. Die mit f markierten B-Zell- oder Lymphfollikel lassen sich deutlich von dem umgebenden Gewebe abgrenzen. Zentral befindet sich eine Krypte mit Schleimauflagerungen (s). Zur Mundhöhle hin lässt sich am oberen Bildrand das mehrschichtige, unverhornte Plattenepithel erkennen. Abbildung 5b zeigt die Übersichtsaufnahme eines ungefärbten Tonsillendünnschnitts, aufgenommen mit einem Weitfeldfluoreszenzmikroskop der Marke Keyence (BZ-X700). Auch in dieser Aufnahme sind die Follikelstrukturen deutlich erkennbar. Das Plattenepithel ist in dieser Aufnahme am unteren Bildrand zu finden. Zentral im Tonsillenparenchym zeichnet sich eine Gefäßstraße ab. Es wird deutlich, dass die Tonsille eine gewisse Autofluoreszenz aufweist, welche im Tonsillenparenchym, besonders um die Gefäße herum auftritt und in den Follikeln eher schwach ausgeprägt ist. Die Autofluoreszenz bietet auch in der ungefärbten Tonsille eine gute Orientierungshilfe und lässt die histologischen Strukturen erkennen. Eine besonders intensive Autofluoreszenz weisen die Erythrozyten innerhalb der Blutgefäße auf. Die Autofluoreszenz ist nach Anregung durch einen Laser mit der Wellenlänge 488 nm stärker ausgeprägt als nach Anregung durch einen Laser der Wellenlänge 559 nm. Alle verwendeten Zweitantikörper wurden respektive ihrer Abgrenzbarkeit gegenüber der Autofluoreszenz evaluiert und boten ausreichend Kontrast.

Im Folgenden konzentrieren sich die Aufnahmen dieser Arbeit vor allem auf die Randbereiche der Follikel. Hier ist der Übergang von der B-Zell-Zone im Follikel zu der T-Zell-Zone im perifollikulären Gewebe erkennbar. Anhand der Aufnahmen kann so die Spezifität der durchgeführten Färbungen respektive der zu erwartenden Lokalisation der angefärbten Immunzellen evaluiert werden.

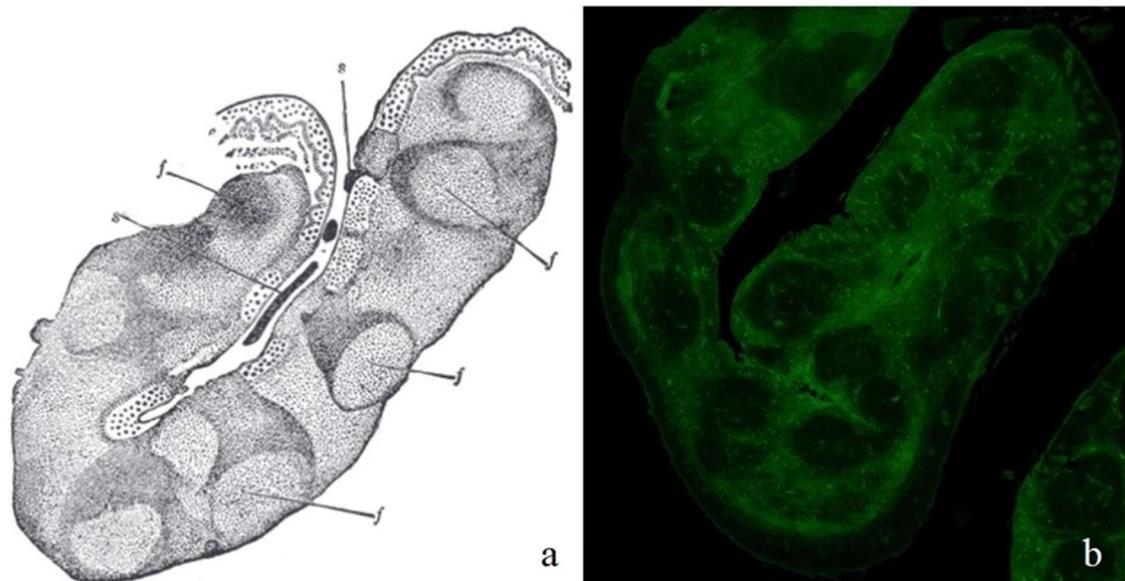


Abbildung 5 Tonsillenanatomie

a: Schematische Zeichnung einer Tonsille (Gray 1918). f: Lymphfollikel. s: Schleimauflagerung in einer Krypte b: Konfokalmikroskopische Aufnahme

3.1.2 B- und T-Zellen im Follikel

Abbildung 6 zeigt drei verschiedene Ausschnitte aus derselben Färbung. Die Bilder wurden in konfokaler Fluoreszenzmikroskopie jeweils nach Anregung des grünen Fluorophors (linke Spalte) und des roten Fluorophors (mittlere Spalte) aufgenommen. Die beiden so akquirierten Aufnahmen wurden digital zu einer Abbildung zusammengefügt (rechte Spalte). Für die hier dargestellte Färbung wurde ein dünnschichtiger Tonsillenschnitt zunächst mit einem Erstantikörper gegen CD20 behandelt. Dieser Erstantikörper wurde anschließend mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy3 markiert. Somit stellen sich B-Lymphozyten in der vorliegenden Färbung nach entsprechender Anregung rot dar. Die T-Lymphozyten hingegen wurden mithilfe eines Erstantikörpers gegen CD3 und dem Fluoreszenzfarbstoff Alexa488 grün markiert.

Die charakteristische Verteilung zwischen B- und T-Lymphozyten lässt sich in den abgebildeten Färbungen gut nachvollziehen: Es zeigt sich eine deutliche Rotfärbung der B-Zell-reichen Lymphfollikel mit einer umgebenden, etwas dunkleren Mantelzone. Ausgehend von diesen Lymphfollikeln wandern B-Zellen in die Peripherie und können somit auch im umliegenden Parenchym vorgefunden werden. Innerhalb der Follikel finden sich vor allem CD20-positive, rotgefärbte Zentrozyten und Zentroblasten. Auch CD20-negative Plasmazellen sowie antigenpräsentierende dendritische Zellen sind im Follikel zu erwarten. CD3-positive und CD20-negative T-Zellen hingegen, finden sich überwiegend im perifollikulären Gewebe und nur vereinzelt innerhalb der Follikelstrukturen (Nave et al. 2001). Die Lymphfollikel stellen sich in Abbildung 6a, d und g nach Anregung von Alexa488 entsprechend dunkel dar, während im perifollikulären Gewebe die grünen T-Zellen zu erkennen sind. Die besonders hellgrünen Konglomerate entsprechen Blutgefäßen, in denen

sich Erythrozyten angesammelt haben. Diese besitzen eine hohe Autofluoreszenz bei Anregung mit Licht der Wellenlänge 488 nm.

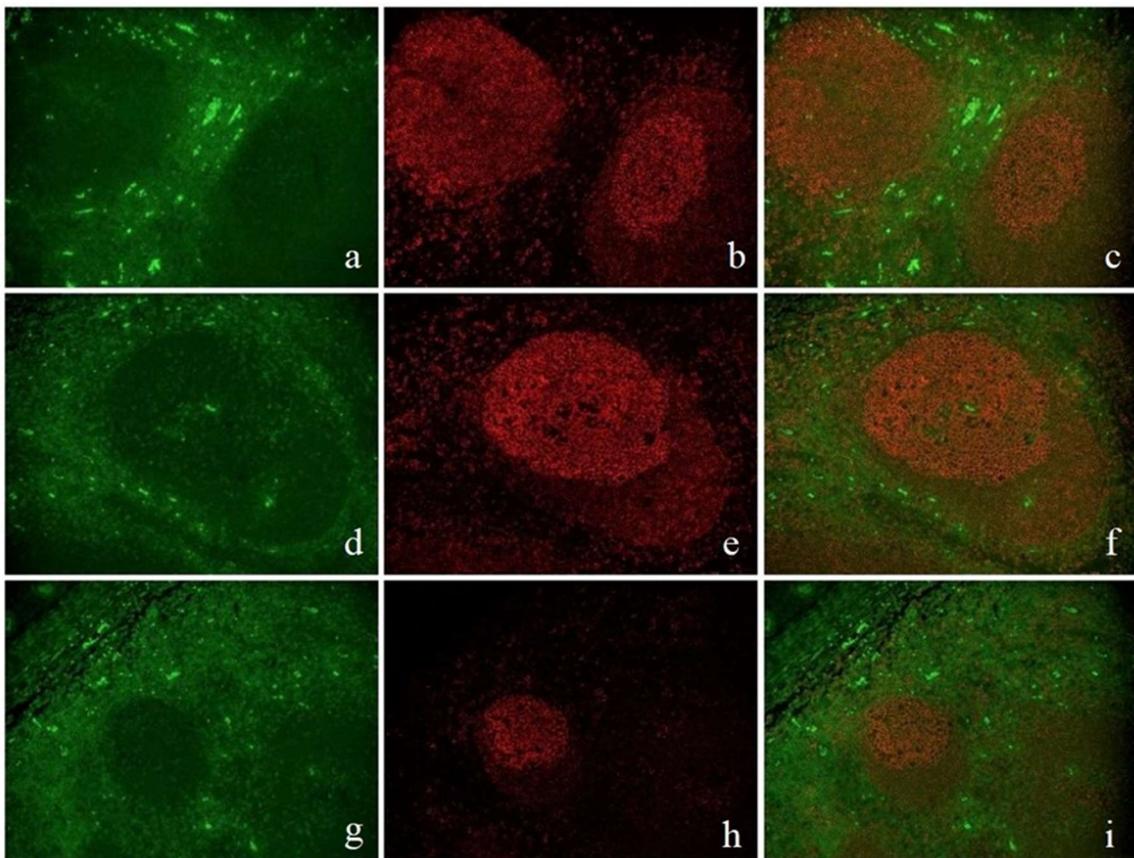


Abbildung 6 Lymphfollikel in der Tonsille
 Immunfluoreszenzfärbung mit CD20 - Cy3 und CD3 - Alexa488
 a, d, g: nach Anregung des grünen Fluorophors (Alexa488)
 b, e, h: nach Anregung des roten Fluorophors (Cy3)
 c, f, i: Digitale Zusammenführung der Aufnahmen

3.2 FLIM

3.2.1 Vergleichbarkeit der Darstellung mit der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie

Die Lymphfollikel der Tonsille lassen sich nicht nur in der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie darstellen, sondern ebenso mittels FLIM. In Abbildung 7 sind zur Veranschaulichung beide Mikroskopie-Verfahren nebeneinander dargestellt. Abgebildet ist der Anschnitt eines Lymphfollikels, gefärbt mit CD20-Cy3 für B-Zellen und CD3-Alexa488 für T-Zellen. Abbildung 7a-c zeigen rekonstruierte und in grün, beziehungsweise rot kodierte Lebensdauerbilder, während Abbildung 7d die konfokale Aufnahme zeigt. Die Aufnahmen wurden an exakt derselben Stelle nacheinander akquiriert. Hierbei bleibt zu betonen, dass es sich bei den Lebensdauerbildern nicht um spektrale Aufnahmen handelt! Das heißt, die gewonnene Information über die Lebensdauerwerte wird lediglich für lange Lebensdauer in

Grün (Abbildung 7a) und für kurze Lebensdauer in Rot (Abbildung 7b) kodiert. So lassen sich ähnliche Bilder errechnen, wie mit der konfokalen Mikroskopie. Die Lymphfollikel stellen sich ebenso deutlich abgrenzbar dar. In Abbildung 7a sind die perifollikulären T-Zellen zu sehen, in Abbildung 7b die follikulären B-Zellen. In Abbildung 7c wurden diese beiden Bildinformationen in einem Bild integriert. Zusätzlich ist in alle hier gezeigten Lebensdauerbilder die Intensitätsinformation mit eingerechnet. Vor allem in Abbildung 7c wird deutlich, dass es innerhalb der Follikel auch Zellen gibt, die weder rot noch grün angefärbt sind. Hierbei handelt es sich um Zellen, die weder CD20 noch CD3 auf ihrer Oberfläche tragen, wie zum Beispiel Plasmazellen oder dendritische Zellen. Im Vergleich von mittels FLIM akquirierter Daten (Abbildung 7c) zur klassischen konfokalmikroskopischen Darstellung (Abbildung 7d) lässt sich festhalten, dass die Bildgebung mittels FLIM im vorliegenden Fall eine gleichwertige Differenzierbarkeit von B- und T-Lymphozyten liefert.

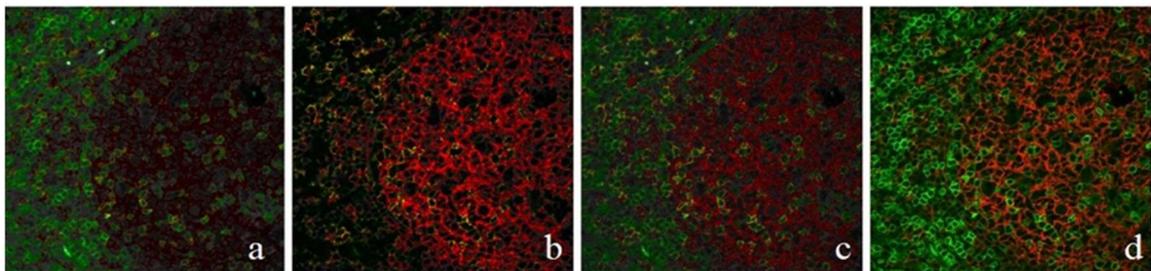


Abbildung 7 Lebensdauerdarstellung eines Lymphfollikels
Immunfluoreszenzfärbung mit CD20 - Cy3 und CD3 - Alexa488. Tonsille. Verwendete Einstellungen für FLIM: Laser mit 559 nm der Intensität 1% und Laser mit 488 nm der Intensität 6%

a: Lebensdauerdarstellung der langen Lebensdauerwerte in Grün

b: Lebensdauerdarstellung der kurzen Lebensdauerwerte in Rot

c: Lebensdauerbild mit farblich kodierten Lebensdauerwerten als Resultat der Verrechnung der Lebensdauerbilder a und b

d: Konfokalmikroskopische Aufnahme

3.2.2 Unterscheidung von drei Zellpopulationen in einer Doppelfärbung

Wie sieht aber meine Lebensdaueraufnahme aus, wenn eine Zelle nicht nur einen, sondern zwei der angefärbten Zellmarker auf ihrer Oberfläche trägt? Um diese Frage zu beantworten, wurde eine Färbung mit CD20-Cy3 und CD27-Alexa488 angefertigt und analysiert. Zu erwarten sind bei dieser Färbung CD20-positive B-Lymphozyten, CD27-positive T-Lymphozyten und sowohl CD20- als auch CD27-positive B-Gedächtniszellen.

In Abbildung 8a ist das farblich kodierte Lebensdauerbild ohne Integration der Intensitätsinformation dargestellt. Bereits hier wird deutlich, dass es in dieser Färbung Zellen gibt, die sich nicht rot oder grün, sondern eher orange darstellen. Durch die Integration der Intensitätsinformation werden diese Zellen noch deutlicher hervorgehoben. Dies liegt zum einen daran, dass sich die Zellmembranen schärfer abgrenzen lassen. Zum anderen überlagern sich hier die Intensitäten aus beiden Aufnahmekanälen für die Bildpixel, die

sowohl die grüne als auch die rote Lebensdauerinformation enthalten. Somit addieren sich die Intensitäten und die orangen Zellen erscheinen heller als der Rest. Es lassen sich nun einige Zellen ausmachen, die eindeutig eine komplett orange Zellmembran aufweisen. Eine solche Zelle ist in Abbildung 8b exemplarisch mit einem Pfeil markiert. Somit lassen sich CD20- und CD27-positive Zellen eindeutig identifizieren. Hierbei handelt es sich um die B-Gedächtniszellen. Diese lassen sich von den restlichen B-Zellen, die nur CD20-positiv und somit rot gefärbt sind, abgrenzen. Auch die grünen T-Zellen stellen sich eindeutig als eigene Population dar. Diese Abgrenzung gelingt mittels FLIM deutlich besser als in den konfokalen Aufnahmen.

Zum Vergleich ist in Abbildung 8c die konfokale Aufnahme desselben Ausschnitts des Tonsillendünnschnitts abgebildet. Hier lässt sich eine Mischung der spektralen Farben von Rot und Grün erkennen, die Abgrenzung der Farben voneinander ist jedoch undeutlicher. Es lässt sich keine sichere Aussage darüber treffen, ob eine Zelle beide Zellmarker auf ihrer Oberfläche trägt oder nicht.

FLIM bietet also die Möglichkeit sehr viel deutlicher und kontrastreicher Zellen mit zwei verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen auf ihrer Oberfläche zu identifizieren. Die Unterscheidung von drei Zellpopulationen durch die Nutzung von lediglich zwei Antikörpern ist durch FLIM möglich. Das Bildverarbeitungsverfahren zur deutlicheren Darstellung des Überlagerungseffektes zweier Farben wurde bereits in Kapitel 2.2.5. beschrieben und eigens für diese Anwendung entwickelt.

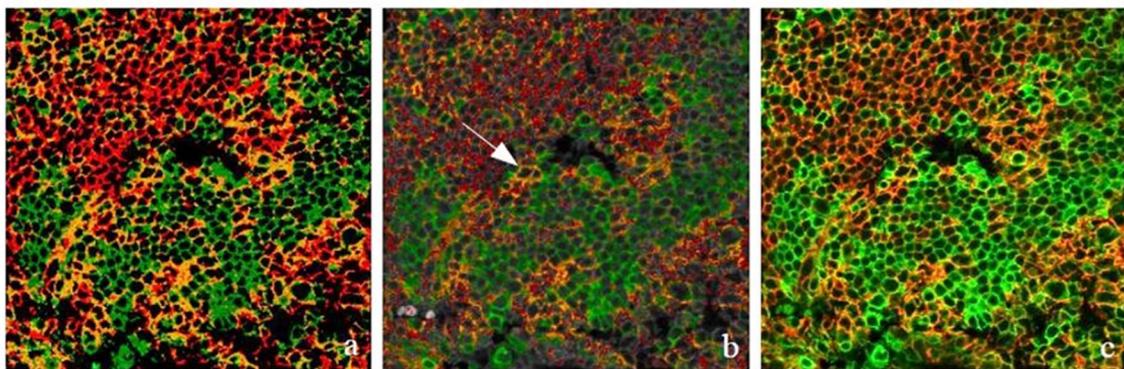


Abbildung 8 Vergleich der Differenzierbarkeit von Kolokalisation

Immunfluoreszenzfärbung mit CD20 - Cy3 und CD27 - Alexa488. Tonsille. Einstellungen für FLIM: Laser mit 559 nm der Intensität 2% und Laser mit 448 nm der Intensität 3%

a: Lebensdauerbild mit farblich kodierten Lebensdauerwerten

b: Lebensdauerbild aus a nach Integration der Intensitätsinformation. Der Pfeil zeigt exemplarisch eine Zelle deren Zellmembran CD20 und CD27 auf ihrer Oberfläche trägt. Es handelt sich somit um eine B-Gedächtniszelle.

c: Konfokalmikroskopische Aufnahme

3.2.3 Kolokalisation im Vergleich: FLIM und konfokale Fluoreszenzmikroskopie

Um die Hypothese zu überprüfen, dass sich eine Kolokalisation mittels FLIM eindeutig abgrenzen lässt, bietet sich der folgende Vergleich an: Abbildung 9 zeigt die beiden, bereits

vorgestellten Färbungen. In Abbildung 9a ist die Färbung mit CD20-Cy3 und CD27-Alexa488 zu sehen, in der zuvor eindeutig eine Kolokalisation der beiden Oberflächenmoleküle identifiziert wurde. Abbildung 9b zeigt demgegenüber die Färbung von CD20-Cy3 und CD3-Alexa488. Bei diesen beiden Oberflächenmarkern ist keine Kolokalisation zu erwarten. Auffällig ist, dass der Orangeanteil in diesem Bild wesentlich geringer ist. Bei genauer Betrachtung der Abbildung lässt sich keine Zelle identifizieren, die komplett mit einer orangen Zellmembran umgeben wäre. Der Eindruck einer Orangefärbung entsteht hier lediglich dann, wenn sich die Membranen einer CD20-positiven Zelle und einer CD3-positiven Zelle sehr nah aneinanderlagern. Dies lässt sich dadurch erklären, dass dann bei der Verrechnung der Bildinformation für ein Pixel im Grenzbereich der Membranen sowohl der kürzere als auch der längere Lebensdauerwert als Information vorliegen. Der Pixel wird dementsprechend als Orange kodiert und dargestellt. Im Vergleich der Abbildung 9a und b zeigt sich jedoch eindrücklich, dass der Orangeanteil bei einer tatsächlichen Kolokalisation deutlich kräftiger und klarer abgrenzbar ist; so lassen sich auch komplett orange Zellmembranen erkennen.

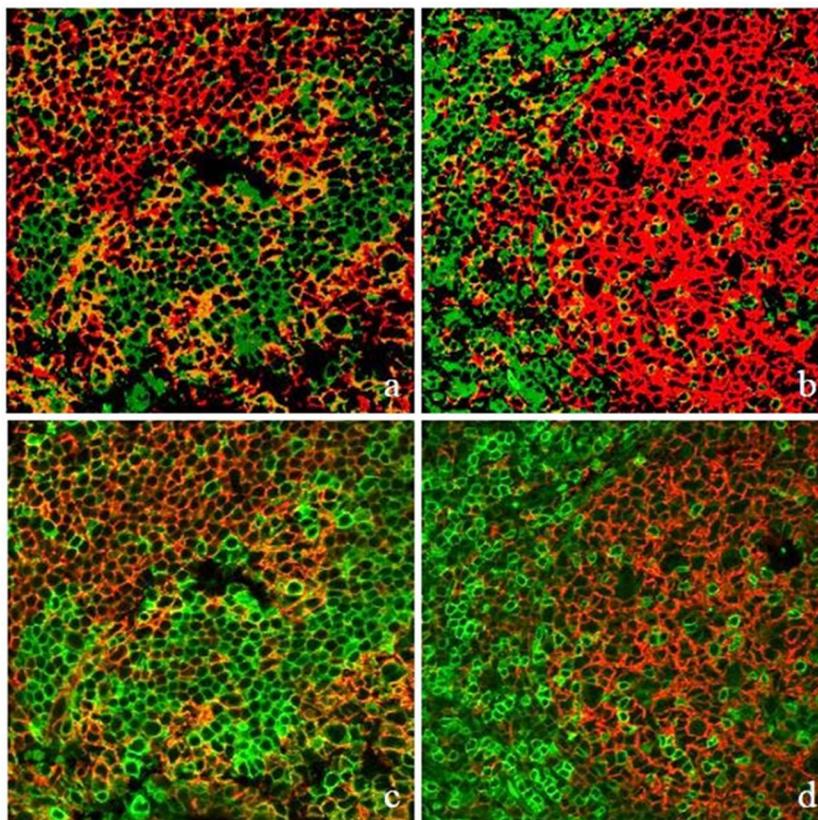


Abbildung 9 Vergleich zweier Färbungen mit und ohne zu erwartender Kolokalisation in der Tonsille
a: Lebensdauerbild mit farblich kodierten Lebensdauerwerten der Immunfluoreszenzfärbung mit CD20 - Cy3 und CD27 - Alexa488
b: Lebensdauerbild mit farblich kodierten Lebensdauerwerten der Immunfluoreszenzfärbung mit CD20 - Cy3 und CD3 - Alexa488
c: Konfokalmikroskopische Aufnahme entsprechend zu a
d: Konfokalmikroskopische Aufnahme entsprechend zu b

Im Vergleich dazu sind in Abbildung 9c und d die konfokalen Aufnahmen derselben Bildausschnitte dargestellt. Hier entsteht nicht der Eindruck, dass ein wesentlicher Unterschied im Färbemuster oder Farbspektrum vorliegt. Anhand der Konfokalmikroskopie lässt sich nicht eindeutig feststellen, ob eine Kolo-kalisation vorliegt oder nicht. Es entsteht also ein Informationsgewinn durch den Einsatz von FLIM.

Besonders deutlich wird der Unterscheid des Überlagerungseffekt zwischen den beiden Färbungen in den Histogrammen der *Hue*-Bilder. Wandelt man das *RGB-Color*-Bild in einen *HSB-Stack* um, so erhält man drei, in Graustufen kodierte Bilder. Das erste Bild *Hue* entspricht der jeweiligen Gradzahl eines Farbtons im Standardfarbkreis. In ImageJ werden die 360° des Farbkreises auf 255 Graustufen skaliert. Das bedeutet, um einen Farbton aus dem Farbkreis im Histogramm zu finden, muss die Gradzahl des Standardfarbkreises der jeweiligen Farbe mit 255 multipliziert und durch 360 geteilt werden. Für das Beispiel Grün bedeutet dies: $120 \cdot 255 / 360 = 85$. Die Farbe Grün in dem *Hue*-Bild bzw. Histogramm entspricht also dem Grauwert 85. Rot entspricht dem Grauwert 0. In Abbildung 10a und b sind die *Hue*-Bilder derselben Färbungen, wie in Abbildung 9 dargestellt. Abbildung 10c zeigt das Histogramm der Grautonverteilung in den beiden *Hue*-Bildern, wobei die blaue Kurve zu Abbildung 10a gehört und somit zu der Färbung von CD20 und CD27. Die graue Kurve zeigt die Grautonverteilung von Abbildung 10b und somit der Färbung von CD20 und CD3. Aus dem Histogramm wird ersichtlich, dass die Farben Rot und Grün in beiden Bildern häufig vorkommen. Daher stellen sich bei Grauton 0 und Grauton 85 zwei Spitzen dar. Dazwischen liegen die Grautöne, die im Farbkreis für Orange oder Gelb stehen. Diese kommen in der Färbung gegen CD20 und CD27 deutlicher häufiger vor (blaue Kurve). Dies entspricht der Erwartung, dass es bei dieser Färbung auf der Oberfläche der B-Gedächtniszellen zu einer Kolo-kalisation der beiden Fluoreszenzfarbstoffe kommt. Zur besseren Übersicht wurde die Farbskala nach dem Standardfarbkreis ergänzt. Außerdem zeigt Abbildung 10c das zu Abbildung 10b gehörige Sättigungsbild. Aus diesem wird deutlich, dass die Sättigung homogen ist und somit auf die Darstellung der Lebensdauer keinen Einfluss hat.

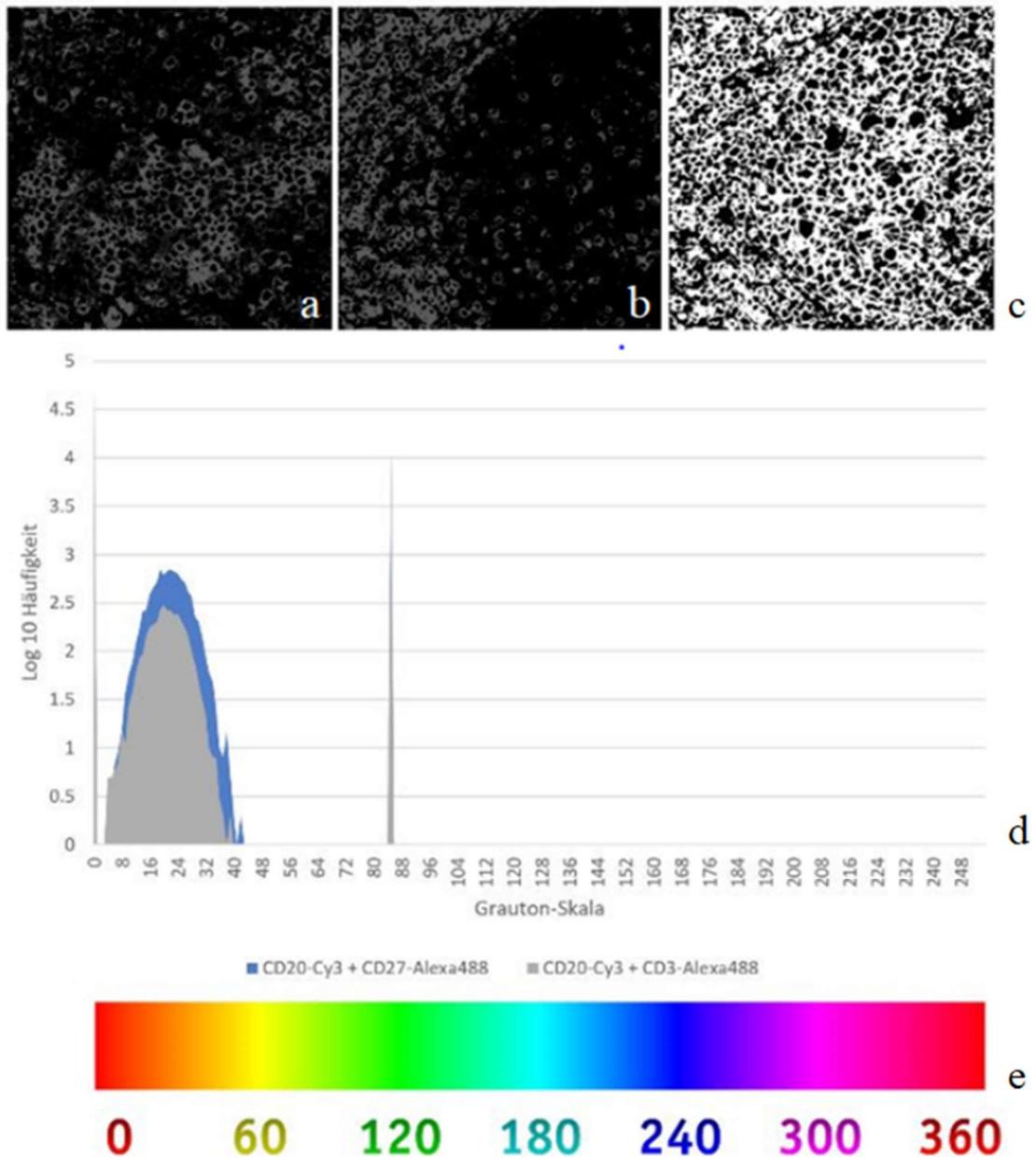


Abbildung 10 Bildanalyse zur Kolo­kalisierung zweier Fluoreszenzfarbstoffe

a: *Hue*-Bild des *HSB-Stacks* des Lebensdauerbildes der Immunfluoreszenzfärbung mit CD20 - Cy3 und CD27 - Alexa488 (zum Vergleich siehe Abbildung 9a)

b: *Hue*-Bild des *HSB-Stacks* des Lebensdauerbildes der Immunfluoreszenzfärbung mit CD20 - Cy3 und CD3 - Alexa488 (zum Vergleich siehe Abbildung 9b)

c: Sättigungsbild des *HSB-Stacks* des Lebensdauerbildes der Immunfluoreszenzfärbung mit CD20 - Cy3 und CD3 - Alexa488 (zum Vergleich siehe Abbildung 9b)

d: Histogramm der Grautonverteilung in den *Hue*-Bildern der Immunfluoreszenzfärbungen gegen CD20 und CD27 in blau und gegen CD20 und CD3 in grau

e: Farbskala nach dem Standardfarbkreis skaliert auf die Grauton-Skala (Kalan 2007)

3.2.4 Differenzierbarkeit von zwei roten Fluoreszenzfarbstoffen durch Lebensdauer

Ein weiterer Vorteil von FLIM besteht darin, dass durch die Lebensdauer ein weiterer Parameter für die Bildanalyse zur Verfügung steht. Dieser Parameter macht es möglich, aufgrund der distinkten Lebensdauerwerte der einzelnen Fluoreszenzfarbstoffe, zwei Fluoreszenzfarbstoffe ähnlicher Spektralfarben voneinander zu unterscheiden. In Abbildung 11 ist eine Färbung mit den beiden roten Fluoreszenzfarbstoffen TRITC und Cy3 dargestellt. Abbildung 11a zeigt die Färbung mit einer Kodierung der Lebensdauer in einem 16-Farben-Spektrum. Es fällt auf, dass einige Zellen eine gelbe Zellmembranfärbung aufweisen, während sich der überwiegende Anteil der Zellen blau darstellt. In Abbildung 11b ist das Histogramm zu sehen, welches die Verteilung der Lebensdauerwerte für den dargestellten Bildausschnitt zeigt. Die Farbskala unterhalb des Histogramms macht deutlich, wie die Lebensdauer im 16-Farben-Spektrum farblich kodiert wurde. Blau gefärbte Zellen weisen dementsprechend eine etwas kürzere Lebensdauer als grün-gelb gefärbte Zellen auf. Aus der Abbildung 11a wird deutlich, dass sich dieser Unterschied in der Lebensdauer visuell darstellen lässt. Es ist also möglich, zwei rote Fluoreszenzfarbstoffe mittels Lebensdauerdarstellung voneinander zu trennen.

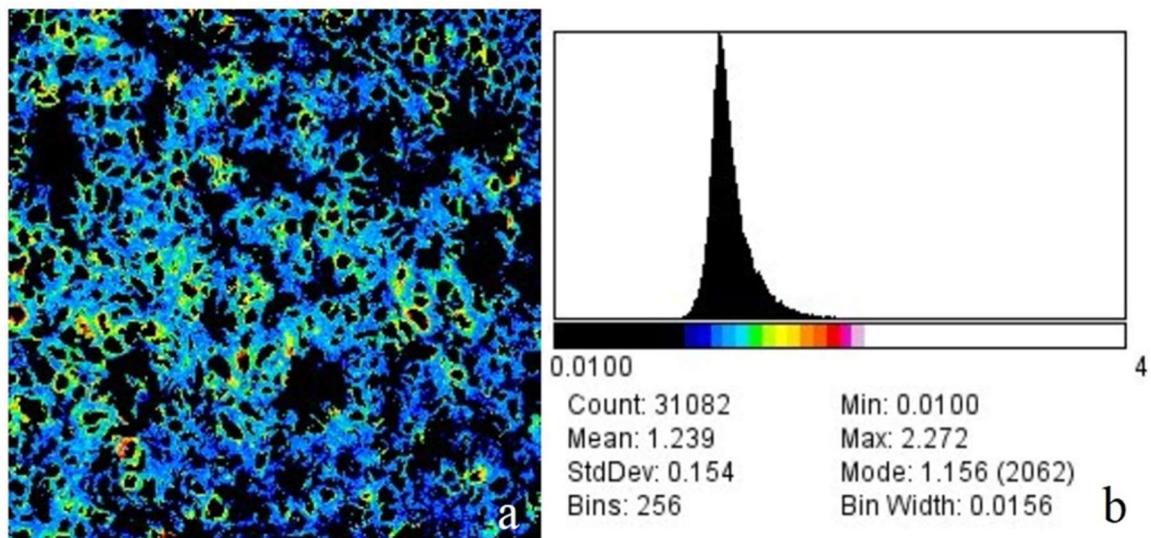


Abbildung 11 Unterscheidung zweier Fluoreszenzfarbstoffe ähnlicher Spektralfarben in einem Tonsillendünnschnitt

Immunfluoreszenzfärbung mit CD27 - TRITC und CD20 - Cy3. Einstellung für FLIM: Laser mit 559 nm der Intensität 2%

a: Lebensdauerbild mit Kodierung der Lebensdauer im 16-Farben-Spektrum

b: Histogramm des Lebensdauerbildes aus a, erstellt in ImageJ

3.3 Darstellung von Plasmazellen: CD20-negativ und CD138-positiv

Abbildung 12 zeigt eine Färbung von CD138-positiven Plasmazellen. Der Erstantikörper gegen CD138 wurde mit dem Fluoreszenzfarbstoff Alexa488 markiert. Des Weiteren wurden CD20-positive B-Lymphozyten mit TRITC rot angefärbt.

In Abbildung 12a sind die CD138-positiven Plasmazellen, die mit Alexa488 markiert wurden, zu sehen. Abbildung 12c zeigt das zugehörige Histogramm mit der Verteilung der Lebensdauerwerte für Alexa488 dieses Bildausschnitts. Abbildung 12b zeigt entsprechend die CD20-positiven B-Lymphozyten, die mit TRITC markiert wurden. Auch hier ist im Histogramm (Abbildung 12e) die Verteilung der zugehörigen Lebensdauerwerte für TRITC zu sehen. Aus den Abbildungen 12a und c wird erneut deutlich, dass es sich bei der Lebensdauer nicht um spektrale Farben handelt. In diesen beiden Bildern ist die Lebensdauer in Graustufen skaliert.

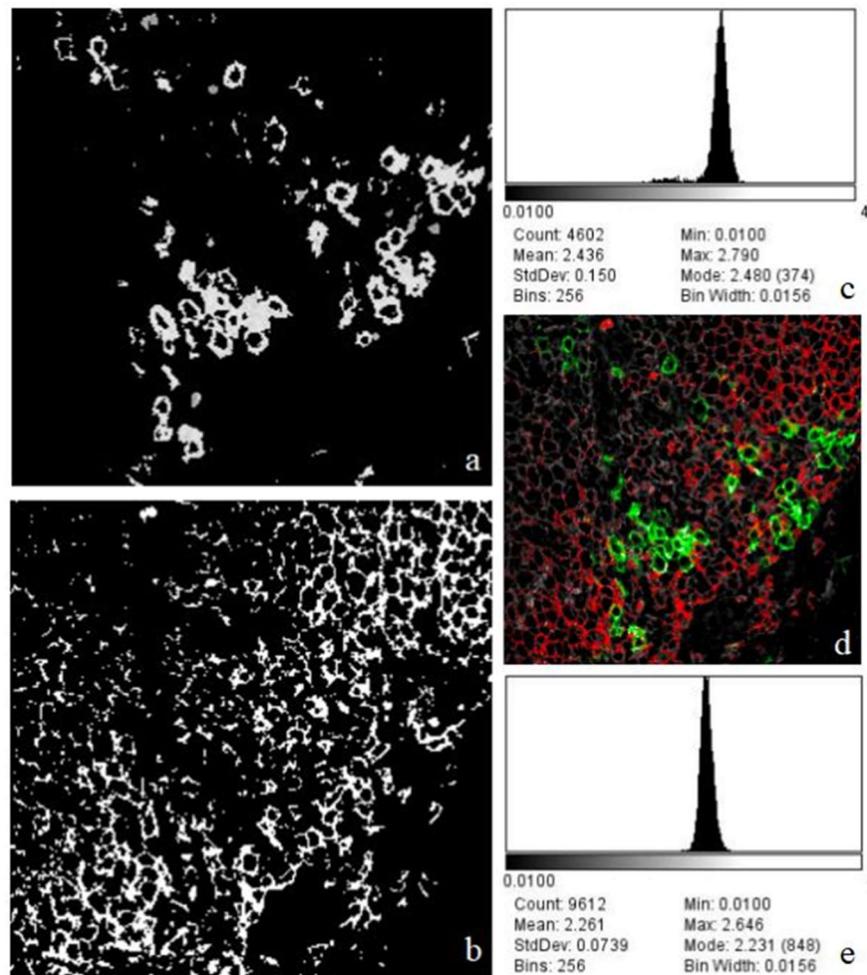


Abbildung 12 Plasmazellen in der Tonsille

Immunfluoreszenzfärbung mit CD138 - Alexa488 und CD20 – TRITC

a: Lebensdauerbild der langen Lebensdauerwerte. Zur Darstellung kommen CD138-positiv Plasmazellen

b: Lebensdauerbild der kurzen Lebensdauerwerte, Zur Darstellung kommen CD20-positiv Lymphozyten

c: Histogramm des Lebensdauerbildes der langen Lebensdauerwerte a, erstellt in ImageJ

d: Lebensdauerbild mit farblich kodierten Lebensdauerwerten. Die längeren Lebensdauerwerte sind in Grün, die kürzeren in Rot dargestellt. Entsprechend sind die CD138-positiv Plasmazellen in Grün zu sehen.

e: Histogramm zu dem Lebensdauerbild der kurzen Lebensdauerwerte b, erstellt in ImageJ

Bei der Färbung von Plasmazellen mittels CD138 und weiteren B-Zellen mittels CD20 ist keine Kolo-kalisation zu erwarten. Dies spiegelt sich in der Abbildung 12d gut wider. Hier

sind jeweils sowohl CD138-positive Plasmazellen als auch CD20-positive B-Zellen zu sehen. Die Lebensdauer wurde entsprechend der jeweils genutzten Fluoreszenzfarbstoffe farblich kodiert. Die Häufigkeitsverteilung der jeweiligen Zellen entspricht ebenfalls den Erwartungen: Es sind deutlich weniger Plasmazellen in grün als CD20-positive B-Lymphozyten in rot zu sehen. Die Färbungen lassen darauf schließen, dass der hier verwendete Antikörper gegen CD138 spezifisch ist, da er selektiv die Zellmembranen einzelner Zellen anfärbt. Mithilfe dieser Färbung ist es dementsprechend möglich CD138-positive Plasmazellen eindeutig zu identifizieren und von anderen Zellpopulationen abzugrenzen.

3.4 Erstantikörper aus ungewöhnlichen Wirtstieren

Alle bisher in dieser Arbeit gezeigten Erstantikörper stammten aus den Wirtstieren Maus oder Kaninchen. Für Doppelfärbungen wurde immer ein Erstantikörper aus der Maus und ein zweiter Erstantikörper aus dem Kaninchen gewählt. Für eine gute Kombinierbarkeit der Erstantikörper ohne Kreuzreaktionen werden Erstantikörper aus möglichst distinkten Wirtstieren benötigt. Um eine spezifische Dreifachfärbung an identischen Gewebeschnitt mit drei verschiedenen Erstantikörpern durchzuführen, wurden daher weitere Erstantikörper aus ungewöhnlicheren Wirtstieren getestet.

3.4.1 CD38 aus der Ratte

In Abbildung 13 ist die konfokale Aufnahme einer Färbung mit dem Erstantikörper gegen CD38 aus der Ratte zu sehen. Als Fluoreszenzfarbstoff wurde Cy3 verwendet. Es zeigt sich, dass die Färbung zwar selektiv einzelne Zellen anzufärben scheint, das Signal ist jedoch relativ schwach. Außerdem verteilt es sich homogen über den gesamten Zellkörper. Da es sich bei der Zielstruktur CD38 um ein membranständiges Protein handelt, sollte sich jedoch lediglich die Zellmembran anfärben (Malavasi et al. 2008). Der Erstantikörper gegen CD38 aus der Ratte wurde daher als unspezifisch verworfen.

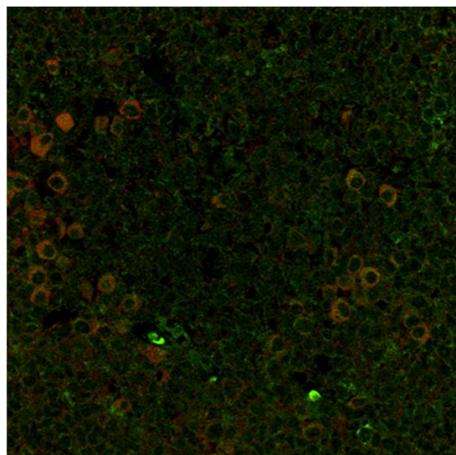


Abbildung 13 Erstantikörper CD38 aus der Ratte
Immunfluoreszenzfärbung mit CD38 - Cy3. Tonsille. Konfokalmikroskopische Aufnahme

3.4.2 CD27 aus dem armenischen Hamster

Der Erstantikörper CD27 aus dem armenischen Hamster wurde mit einem TRITC-gekoppelten Zweitantikörper markiert. In Abbildung 14 ist die Färbung jeweils in einer Verdünnung des Erstantikörpers von 1/500 gezeigt, andere Verdünnungen wurden ebenfalls getestet. Die Testungen des Erstantikörpers gegen CD27 aus dem armenischen Hamster ergaben nur dann eine spezifische Anfärbung CD27-positiver Zellen, wenn der Gewebeschnitt vorher nicht in Citrat gekocht wurde. In Abbildung 14a ist eine solche ungekochte Immunfluoreszenzfärbung abgebildet. Es zeigt sich eine deutliche Rotfärbung der Zellmembranen einzelner Zellen im ungekochten Gewebe. Im Gegensatz hierzu zeigt Abbildung 14b dieselbe Immunfluoreszenzfärbung in mit Citrat vorbehandeltem Gewebe. Hier ist keine Rotfärbung und somit keine Bindung des Erstantikörpers sichtbar. Da einige der anderen in dieser Arbeit verwendeten Erstantikörper eine Vorbehandlung des Gewebes mit Citrat benötigen, wurde der Erstantikörper gegen CD27 aus dem armenischen Hamster nicht weiterverwendet.

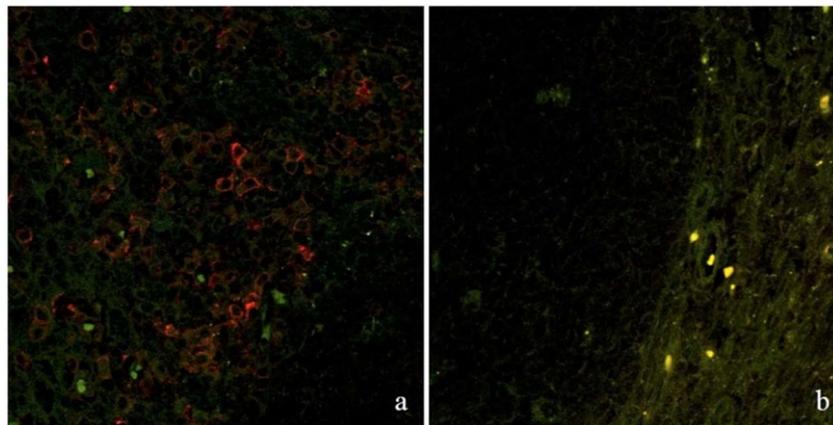


Abbildung 14 Erstantikörper CD27 aus dem armenischen Hamster
Immunfluoreszenzfärbung mit CD27 – TRITC. Tonsille. Konfokalmikroskopische Aufnahme am Rande eines Lymphfollikels

a: Vorbereitung des Tonsillendünnschnitts ohne Citrat vor der Immunfluoreszenzfärbung

b: Vorbereitung des Tonsillendünnschnitts mit Citrat vor der Immunfluoreszenzfärbung

3.5 Zwei Erstantikörper aus demselben Wirtstier

In den bisher vorgestellten Färbungen stammten die Erstantikörper für Mehrfachfärbungen aus jeweils unterschiedlichen Wirtstieren. Für die in Abbildung 15 gezeigte Färbung wurden jedoch zwei Erstantikörper aus dem Kaninchen verwendet. Ein erster gegen CD3 gerichteter Erstantikörper wurde mit einem F_c -spezifischen und mit Alexa488 markierten Zweitantikörper gefärbt. Der zweite verwendete Erstantikörper ist gegen CD27 gerichtet und wurde mit einem F_{ab} -spezifischen, mit Cy3 markierten Zweitantikörper gefärbt. Es resultiert die hier abgebildete Färbung CD3 (*rabbit anti human*) - Alexa488 und CD27 (*rabbit anti human*) -Cy3 in der Tonsille.

In Abbildung 15a ist die Lebensdaueraufnahme zu sehen. Abbildung 15b zeigt die Aufnahme aus der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie. Es wird deutlich, dass einzelne Zellen spezifisch angefärbt wurden. Es gibt sowohl Zellmembranen, die sich spezifisch grün darstellen, als auch Zellmembranen, die spezifisch rot angefärbt sind. Die Färbung erscheint insgesamt jedoch eher schwach. Vor allem angesichts der zu erwartenden hohen Anzahl von angefärbten T-Lymphozyten scheint die Färbung nicht alle Zellen mit CD27 oder CD3 auf der Zellmembran erfasst zu haben. Weiterhin auffällig ist, dass sich keinerlei Kolokalisation abbildet, obwohl diese eigentlich zu erwarten wäre, da T-Zellen sowohl CD3 als auch CD27 exprimieren.

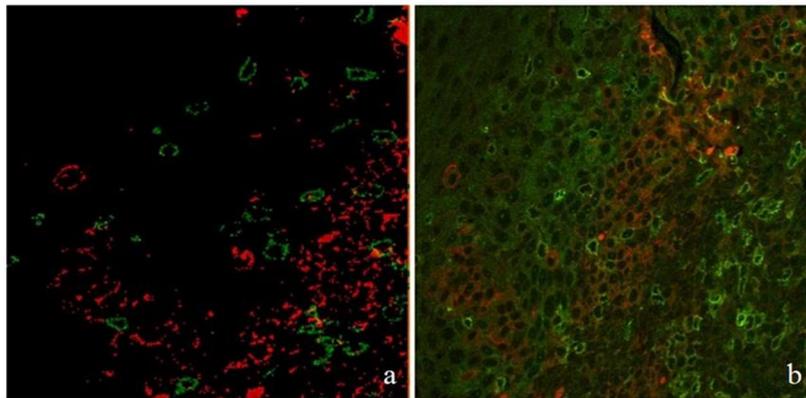


Abbildung 15 Doppelfärbung mit zwei Erstantikörpern aus demselben Wirtstier
Immunfluoreszenzfärbung mit CD27 - Cy3 und CD3 - Alexa488: Tonsille.

a: Lebensdauerbild mit farblich kodierten Lebensdauerwerten

b: Konfokalmikroskopische Aufnahme.

3.6 Übertragbarkeit der Methodik auf humanes ZNS-Gewebe

Die Darstellung von verschiedenen Immunzellen mittels Fluoreszenzfärbung und FLIM ist nicht nur in humanem Tonsillengewebe möglich. Die Färbungen lassen sich auch auf humanes ZNS-Gewebe übertragen. Beispielhaft erfolgte die Färbung eines B-Zell-Lymphoms im ZNS. Die B-Zellen wurden mit einem gegen CD20-gerichteten Antikörper markiert und mit Alexa488 grün gefärbt. Da es bei einem Lymphom pathophysiologisch zu einer monoklonalen Vermehrung einer B-Zelle kommt, sind sehr viele CD20-positive Zellen innerhalb des Lymphomgewebes zu erwarten. Außerdem erfolgte eine Darstellung CD27-positiver Zellen mittels Cy3. Da T-Zellen CD27 exprimieren sind auch einige rote Zellen im Lymphomgewebe, sowie im gesunden ZNS zu erwarten. Eine Kolokalisation wäre möglich, da B-Gedächtniszellen beide Oberflächenmarker aufweisen. Allerdings ist die Präsenz von B-Gedächtniszellen innerhalb des Lymphoms, ebenso wie in gesundem ZNS-Gewebe unwahrscheinlich.

In Abbildung 16a ist eine konfokale Übersichtsaufnahme vom Rand des ZNS-Lymphoms zu sehen. Am linken Bildrand stellen sich die CD20-positiven Lymphomzellen grün dar. Es ist zu sehen, wie das Lymphom das gesunde ZNS-Gewebe am rechten Bildrand infiltriert.

Neben der Darstellung des Lymphoms geht aus dieser Aufnahme hervor, dass das ZNS-Gewebe keine hohe Autofluoreszenz aufweist. Auch findet keine unspezifische Bindung der Zweitantikörper statt. Die in der Tonsille getesteten Immunfluoreszenzfärbungen lassen sich gut auf das ZNS-Gewebe übertragen.

In Abbildung 16b und c sind Lebensdauerbilder ohne Integration der Intensitätsinformation zu sehen. Bei den roten Zellen handelt es sich um die CD27-positiven T-Zellen, die hier vor allem in der Nähe von Gefäßen (Abbildung 16b) und am Lymphomrand (Abbildung 16c) zu finden sind. Das Konglomerat aus roten Zellen in Abbildung 16b entspricht einer Erythrozyten-Ansammlung in einem Blutgefäß. Aus den Abbildungen wird deutlich, dass FLIM-Aufnahmen auch im ZNS aussagekräftige Bilder liefern. Die Rotfärbung der Erythrozyten entspricht der starken Autofluoreszenz dieser im ZNS, ähnlich wie in der Tonsille. Durch die typische Morphologie lassen sich die Erythrozyten jedoch gut von den Lymphozyten als Zielstruktur unterscheiden.

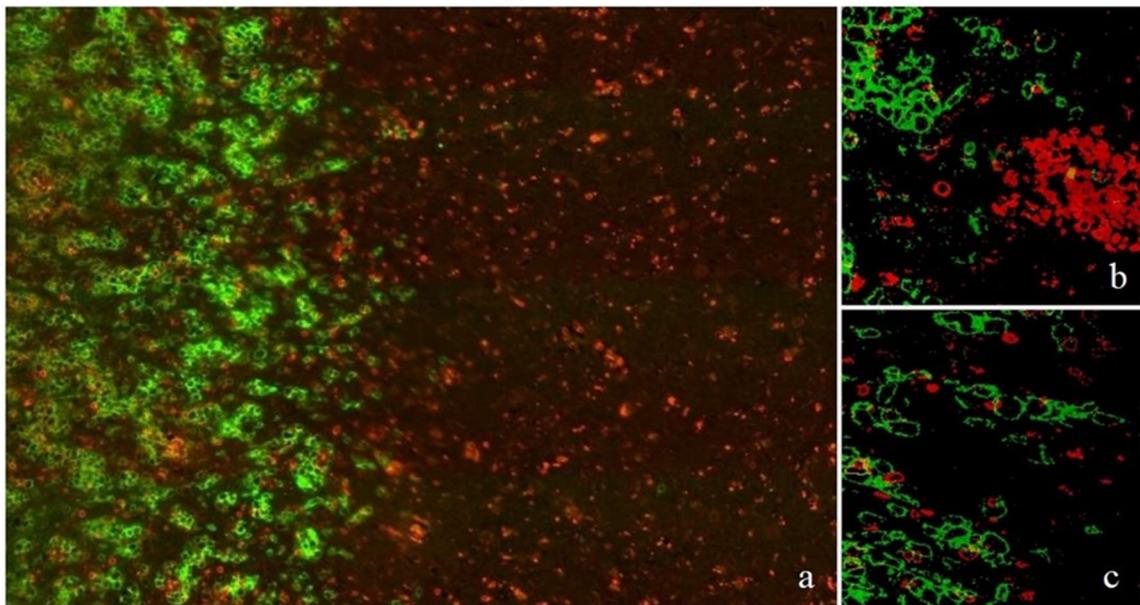


Abbildung 16 Übertragbarkeit der Färbungen ins ZNS

Immunfluoreszenzfärbung mit CD20 - Alexa488 und CD27 - Cy3. Lymphomrand.

a: Konfokalmikroskopische Aufnahme

b: Lebensdauerbild mit farblich kodierten Lebensdauerwerten eines Bildausschnittes am Rand des Lymphoms mit Abbildung eines Blutgefäßes

c: Lebensdauerbild mit farblich kodierten Lebensdauerwerten eines weiteren Bildausschnittes am Lymphomrand

4 Diskussion

4.1 Stand der Wissenschaft

Wie bereits einleitend dargestellt, spielen B-Zellen eine entscheidende Rolle in der Pathologie der MS. Wie sich diese Rolle jedoch genau definieren lässt, ist bis heute nicht gänzlich verstanden. Trotzdem gibt es einige wichtige Erkenntnisse, die die Funktion der B-Zellen und deren Wichtigkeit im Rahmen der MS näher beleuchten:

B-Zell-depletierende Therapien zeigten einen durchschlagenden Erfolg in der Behandlung der MS. Hauser et al. konnten 2008 in einer doppelblinden, Placebo-kontrollierten Phase-II-Studie die Effektivität von Rituximab bei Patienten mit RRMS zeigen (Hauser et al. 2008). Der chimäre monoklonale Antikörper gegen CD20 ist aus der Lymphomtherapie bekannt und findet in vielen Autoimmunerkrankung therapeutische Verwendung (Coiffier 2006). Der große Erfolg von Rituximab in der Schubprophylaxe in Kombination mit relativ guter Verträglichkeit und einem erstaunlich milden Risikoprofil (Vollenhoven et al. 2015), führte zur Entwicklung weiterer, stärker humanisierter monoklonaler Antikörper gegen CD20.

Im Januar 2017 wurde Ocrelizumab von der FDA in Amerika zur Therapie der RRMS und der PPMS zugelassen. Damit steht erstmals eine zugelassene Therapie auch für die primär progrediente Verlaufsform der MS zur Verfügung. Die beiden identisch konzipierten OPERA-Studien konnten die Überlegenheit von Ocrelizumab zur Reduktion der Schubrate bei RRMS im Vergleich zu Interferon- β belegen (Hauser et al. 2017). Zur Zulassung für die PPMS führte die ORATORIO-Studie, die die Wirksamkeit von Ocrelizumab im Vergleich zu Placebo bei primär progredienten MS-Verläufen zeigen konnte (Montalban et al. 2017). Es zeigten sich positive Effekte bezüglich einer Reduktion der Behinderungsprogression und eines Fortschreitens der globalen Hirnatrophie. Die Risikoreduktion für die Progredienz der Erkrankung war mit 24% nach 12 Wochen eher moderat. Dies wird hinsichtlich des Fehlens anderer Therapieoptionen in der PPMS dennoch als Erfolg gewertet.

Eine B-Zell-depletierende Therapie scheint also auch in der Behandlung primär progredienter MS-Formen durchaus wirksam. Die ORATORIO-Studie stärkt dennoch die Vermutung, dass die der Krankheitsprogression zugrunde liegende, neurodegenerative Komponente der MS durch die B-Zell-depletierende Therapie nicht, oder nicht ausreichend aufgehalten werden kann (Greenfield und Hauser 2018). Dies mag an dem zu späten Therapiebeginn liegen, wahrscheinlich aber spielen hier andere, noch unverstandene Pathomechanismen eine Rolle, die durch die B-Zell-Depletion eher unberührt bleiben. Die Suche nach einem neuroprotektiven Therapieansatz bleibt weiterhin von großer Relevanz.

Neben den monoklonalen Antikörpern Rituximab und Ocrelizumab befindet sich Ofatumumab in der Erprobung für die MS-Therapie (Bar-Or et al. 2018). Ein Vorteil dieser neueren gegen CD20 gerichteten Antikörper ist ihre noch bessere Verträglichkeit. Durch die

stärkere Humanisierung und eine Vorbehandlung mit Kortikosteroiden konnten Infusionsreaktionen nach Ocrelizumab- und Ofatumumab-Gaben im Vergleich zu Rituximab gesenkt werden. Auch kommt es unter B-Zell-depletierenden Therapien generell häufiger zu Infekten, beispielsweise der oberen Atemwege. Im Vergleich zu anderen MS-Therapeutika ist das Risiko für schwerwiegende opportunistische Infektionen jedoch nicht deutlich erhöht. Dies liegt wahrscheinlich daran, dass die Anti-CD20-Therapie zwar zu einer Depletion von B-Zellen führt, allerdings bleiben Plasmazellen und pro-B-Zellen erhalten. Die Antikörperproduzierenden Zellen und damit die erlernte Immunität des Körpers bleiben so intakt. Außerdem werden zwar die zirkulierenden Immunzellen im Blut depletiert, der Großteil der B-Zellen befindet sich jedoch im Lymphreservoir und im Knochenmark, welches weitgehend unberührt bleibt (Greenfield und Hauser 2018). Die Therapie mit monoklonalen Antikörpern gegen CD20 führt aber zu einer Elimination CD20-positiver B-Zellen aus dem Liquor (Cross et al. 2006). Die Therapie scheint also die B-Zellen im ZNS-Kompartiment zu erreichen, die vermutlich in der Pathogenese der MS eine wichtige Rolle spielen.

Fraglich bleibt, ob es nicht möglich wäre, noch spezifischer zu therapieren. CD20 befindet sich auf der Oberfläche der überwiegenden Mehrheit der B-Zellen. Es ist denkbar, dass es ausreichen würde, eine bestimmte Untergruppe der B-Zellen zu depletieren, um einen relevanten Therapieerfolg zu erzielen. Mithilfe einer noch gezielteren Therapie wäre es möglich, den Krankheitsverlauf der MS günstig zu beeinflussen, gegebenenfalls sogar effektiver als bisher. Gleichzeitig müssten möglicherweise weniger Nebenwirkungen und Risiken in Kauf genommen werden.

Eine Beispielstudie für die Suche nach neuen Zielstrukturen in der MS-Therapie ist die ATAMS-Studie, eine Phase-II-Studie zum Einsatz von Atacicept (Kappos et al. 2014). Dabei handelt es sich um einen Antikörper, der gegen BAFF und APRIL gerichtet ist, sogenannte Überlebensfaktoren für Plasmazellen (Mackay et al. 2003). Diese Faktoren sind bei MS-Patienten und Patienten mit Neuromyelitis optica intrathekal erhöht (Krumbholz et al. 2005; Wang et al. 2012). Die Hypothese lautete im Umkehrschluss, dass eine Inhibition dieser Überlebens- und Differenzierungsfaktoren, die Konzentration von Plasmazellen im ZNS senken und so zu einer verminderten Antikörperproduktion gegen ZNS-eigene Strukturen führen würde. Die Studie musste aufgrund einer Exazerbation der Schubrate unter Atacicept vorzeitig abgebrochen werden. Nach Absetzen von Atacicept normalisierten sich die Schubraten wieder. Die Studie zeigte deutlich, dass bestimmte B-Zellen in der Pathologie der MS auch eine protektive Rolle spielen. Unterschiedliche B-Zellpopulationen sind also sowohl für das Voranschreiten als auch für die Verlangsamung des Krankheitsprozesses verantwortlich. Sie haben sowohl negative als auch protektive Effekte im Verlauf der MS.

Atacicept führt zu einer Reduktion von B-Zellen, allerdings nicht von B-Gedächtniszellen (Kappos et al. 2014). Beobachtungen von MS-Patienten nach der Therapie mit Alemtuzumab, einem monoklonalen Antikörper gegen CD52, zeigen, dass CD27-positiv B-Gedächtniszellen nach einer initialen Suppression besonders langsam wiederkommen

(Thompson et al. 2010). Auch die Gabe von Rituximab führt zu einer Suppression von B-Gedächtniszellen für ein bis zwei Jahre nach Beendigung der Infusionen (Sabatino et al. 2018). Beide Therapien sind effektiv in der Reduktion der Schubrate in RRMS-Patienten. Diese Erkenntnisse weisen darauf hin, dass B-Gedächtniszellen ein gutes Ziel für die kommenden Generationen monoklonaler Antikörper sein könnten.

Jahrelang galt die chronisch-entzündliche Komponente der MS als T-Zell-vermittelt. Dies hat sich seit dem Erfolg B-Zell-depletierender Therapien geändert. Jedoch gibt es auch einen geringen Anteil an T-Zellen, die CD20 auf ihrer Oberfläche exprimieren und die unter den B-Zell-depletierenden Therapien ebenfalls zurück gehen (Schuh et al. 2016). Bisher konnte für diese T-Zellen jedoch kein Einfluss auf die Krankheitsaktivität gezeigt werden (Palanichamy et al. 2014). Sicherlich ist die Beobachtung, dass B-Zell-depletierende Therapien auch einen Effekt auf T-Zellen haben, interessant. Jedoch widerlegt das kaum die Evidenz, die für die zentrale Wichtigkeit der B-Zellen in der MS vorliegt. Im Gegenteil, diese Beobachtung macht wieder einmal deutlich, wie komplex das menschliche Immunsystem ist und mahnt uns, dass die Folgen einer Therapie oftmals nur durch gründliche Studien zu erfassen, aber nicht sicher vorherzusagen sind.

Tatsächlich lassen sich für sämtliche Therapeutika, die für die Behandlung von MS-Patienten im Einsatz sind, Mechanismen finden, wie diese die Funktion von B-Zellen beeinflussen (Sabatino et al. 2018). Obwohl der überwiegende Anteil dieser Therapien ursprünglich auf die Beeinflussung von T-Zellen zielte, liegt eine weitreichendere Affektion des Immunsystems vor. Warum sollte es bei B-Zell-depletierenden Therapien anders sein?

Neben der therapeutischen Evidenz liegen weitere Daten vor, die die Wichtigkeit der B-Zellen unterstreichen. Die oligoklonalen Banden im Liquor von über 90% der MS-Patienten wurden bereits erwähnt (siehe 1.1.2). Es handelt sich dabei um Antikörper, die intrathekal produziert werden. Wogegen diese Antikörper gerichtet sind, ließ sich bisher nicht eindeutig feststellen (Owens et al. 2009). Auch scheinen die im Einsatz befindlichen Therapien keinen Einfluss auf die Expression der oligoklonalen Banden zu haben (Confavreux et al. 1986; Petereit et al. 2008). Sie sind jedoch hochspezifisch für MS und werden seit Jahrzehnten zur Unterstützung der Diagnostik herangezogen. Seit 2017 werden die oligoklonalen Banden auch in den McDonalds-Kriterien zur Diagnosestellung der MS berücksichtigt und können zum Beleg einer zeitlichen Komponente der Erkrankung herangezogen werden (Thompson et al. 2018). Dies ist bemerkenswert, da sich die Diagnosekriterien für MS zuvor ausschließlich auf Klinik und MRT-Bildgebung stützten. Durch diese beiden Modalitäten musste eine zeitliche, sowie räumliche Dissemination der Erkrankung belegt werden. Nun steht erstmals auch ein Laborparameter zur Diagnosesicherung zur Verfügung. Zuvor konnten diese lediglich unterstützend bestimmt und für die Therapieentscheidung herangezogen werden. Ein möglicher Syntheseort für die oligoklonalen Banden sind B-Zell-reiche Follikelstrukturen, die in den Meningen einiger MS-Patienten gefunden werden konnten (Serafini et al. 2004).

Auch die fast 100%ige Prävalenz des Epstein-Bar-Virus (EBV) unter MS-Patienten spricht für einen B-Zellen-involvierenden Pathomechanismus. Das Virus befällt ausschließlich B-Zellen und führt zu einem längeren Überleben seiner Wirtszellen (Handel et al. 2010). Auch ließ sich eine erhöhte Präsenz des EBV-Antigens im Gehirn von MS-Patienten zeigen (Moreno et al. 2018).

Genetische Analysen unterstreichen die Annahme, dass die Präsentation von Antigenen durch B-Zellen über den MHCII-Komplex (*major histocompatibility index*) für die Entstehung der MS wichtig ist. Die höchste Suszeptibilität für MS ergab sich in genetischen Analysen für die HLA-Gene (*human leukocyte antigen*) der MHCII-Komplex-Region (Patsopoulos 2018).

Es liegen also eine Vielzahl von Hinweisen vor, dass es essenziell für das Verständnis der MS-Pathologie ist, sich eingehender mit den B-Zellen zu beschäftigen. Aus den bisherigen Erkenntnissen aus Therapiestudien wird deutlich, dass B-Zellen nicht nur eine erkrankungstreibende, sondern auch eine protektive Funktion erfüllen. Welche B-Zellpopulationen für diese Protektion und welche eher für eine Progredienz der MS verantwortlich sind, gilt es noch zu erforschen. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen ein wertvolles Verfahren auf, mit dem die genauere Klassifizierung von B-Zellen in MS-Läsionen in Zukunft besser gelingen kann.

4.2 Diskussion der Ergebnisse

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Färbungen haben zunächst gezeigt, dass sich die Tonsille sehr gut als Testorgan eignet, da der typische histologische Aufbau mit dem Wiedererkennungswert der B-Zell-Follikelstrukturen eine gute Orientierungshilfe im Präparat bietet (siehe Abbildung 5). Auch erleichtert die zu erwartende Lokalisation angefärbter Zellen die Beurteilung der Spezifität der Färbungen.

Als nächster Schritt konnte demonstriert werden, dass Aufnahmen mittels FLIM genauso spezifisch B- und T-Zellen darstellen, wie die herkömmliche konfokale Fluoreszenzmikroskopie. Durch die farbliche Kodierung der Lebensdauer in Anlehnung an die Farben der Fluoreszenzfarbstoffe, lassen sich zur Konfokalmikroskopie ähnliche Bilder erstellen. Wichtig hierbei ist, dass es durch FLIM zu keinem Nachteil in der Bilddarstellung kommt. Zumindest nicht hinsichtlich der Darstellung von Ausschnitten des gefärbten Präparates. Aufgrund der langen Akquisitionszeiten ist eine FLIM-Übersichtsaufnahme mit dem TCSPC Verfahren des gesamten Präparates nicht effizient. Die Orientierung und das Aufsuchen charakteristischer Follikelstrukturen erfolgte daher über Weitfeld-Lichtmikroskopie. Fluoreszenz-Übersichtsaufnahmen wurden im Keyence-Mikroskop und im Slide-Scanner angefertigt und vor allem für die Beurteilung der Spezifität der einzelnen Färbungen genutzt.

Die Auswertung der gezielten Aufnahmen unter Einbezug der Lebensdauerinformation bot keinen Nachteil bezüglich der Darstellung von Zellstrukturen, die auch in der konfokalen

Fluoreszenzmikroskopie beurteilt werden konnten. Jedoch ergaben sich einige entscheidende Vorteile von FLIM:

Anhand der Doppelfärbung mit CD20 und CD27 konnte gezeigt werden, dass es grundsätzlich möglich ist, mittels FLIM T-Zellen von B-Zellen und B-Gedächtniszellen zu unterscheiden. Eine eindeutige Differenzierung der drei Zellpopulationen mit Darstellung der Kolo-kalisation von CD20 und CD27 auf der Oberfläche von B-Gedächtniszellen ist nur durch die Integration der Lebensdauerinformation möglich. Es können also mittels FLIM nicht nur spezifische Lebensdauerwerte für die einzelnen Fluorophore gemessen werden, sondern es ist außerdem möglich, Mischwerte bei Kolo-kalisation zu detektieren. Dies macht es im Gegensatz zur Konfokalmikroskopie möglich, drei Zellpopulationen mit nur zwei Fluoreszenzfarbstoffen voneinander zu unterscheiden.

Besonders deutlich wird dies bei dem in Abbildung 9 und Abbildung 10 dargestellten Vergleich. Zunächst einmal ist es wichtig zu beurteilen, ob sich eine Kolo-kalisation deutlich von der zufälligen Überschneidung von Lebensdauerinformationen abgrenzen lässt. Dazu betrachten wir die Abbildungen 9a und b: Während Abbildung 9a eindeutig Zellen zeigt, die von einer orange gefärbten Zellmembran umgeben sind, entsteht in Abbildung 9b lediglich dann der Eindruck einer Orangefärbung, wenn zwei Zellen mit roter und grüner Zellmembran dicht aneinandergrenzen. Die Kolo-kalisation lässt sich also durch Betrachtung der gesamten Zellmembran von einer zufälligen Überschneidung der Lebensdauerinformationen in Grenzbereichen unterscheiden. Je höher die örtliche Auflösung der FLIM-Aufnahmen ist, desto besser gelingt diese Differenzierung. Das lässt sich dadurch erklären, dass bei den FLIM-Aufnahmen für jedes Pixel eine mittlere Lebensdauer bestimmt wird, die hinterher farblich kodiert wird. Wenn also in einem Pixel zwei Membranen mit unterschiedlichen Lebensdauerinformationen aneinandergrenzen, wird dieses Pixel ebenso orange kodiert, wie wenn lediglich eine Zellmembran in dem Bildpixel liegt, dessen Membran beide Fluoreszenzfarbstoffe auf ihrer Oberfläche trägt. Daher ist es bei der Beurteilung der Bilder wichtig, immer die gesamte Zellmembran einer Zelle zu betrachten und mit der Umgebung ins Verhältnis zu setzen. Eine weitere Möglichkeit der Betrachtung ist die in Abbildung 10 dargestellte Bildanalyse über das Histogramm der *Hue*-Bilder. Da hier die Farbtöne entsprechend ihrer Gradzahl auf dem Standardfarbkreis in Grauwerten dargestellt werden, lässt sich an dem Histogramm die Farbverteilung der Bilder ablesen. Hier wird deutlich, dass die Masse der Pixel im gelb-orangen Farbspektrum bei einer erwarteten Kolo-kalisation deutlich größer ist. Die blaue Kurve weist einen steileren Verlauf und ein höheres Maximum als die graue Kurve auf. Zur übersichtlicheren Darstellbarkeit der hohen Zahlenwerte für die Pixelanzahl der Farben Grün und Rot wurde eine logarithmische Darstellung gewählt. Natürlich ist die Betrachtung der Lebensdauer erst einmal unabhängig von den gewählten Farben. Die Betrachtung des Histogramms zeigt jedoch auch, dass es sinnvoll ist, zwei Farben zu wählen, die im Farbkreis weit genug voneinander entfernt liegen, wie zum Beispiel Rot und Grün, um eine Kolo-kalisation und damit eine Mischung der Farben möglichst gut abbilden zu können.

In den Lebensdauerabbildungen stellt sich die Kollokalisierung also als Mischfärbung, in den Beispielen Orange, der gesamten Zellmembran einer Zelle dar. Die Kollokalisierung lässt sich somit bestätigen oder ausschließen. Demgegenüber stehen die konfokalen Fluoreszenzaufnahmen. Diese Aufnahmen weisen in Bezug auf eine Kollokalisierung von Fluoreszenzfarbstoffen auf der Oberfläche einer Zelle eine hohe Unsicherheit auf. Die Kollokalisierung lässt sich nicht nur weder bestätigen noch ausschließen, die Abbildung verleitet sogar dazu, die Zellen entweder der rot- oder grün-fluoreszierenden Zellpopulation zuzuordnen. Im Falle der Färbung mit CD20 und CD27 lassen sich also mittels FLIM eindeutig CD20- und CD27-positive Gedächtniszellen identifizieren, während diese in der konfokalen Aufnahme entweder den CD20-positiven B-Zellen oder den CD27-positiven T-Zellen zugeordnet würden. Diese Zuordnung in der Fluoreszenzmikroskopie ist nicht zuletzt abhängig von der Konzentration der verwendeten Farbstoffe, sowie der Helligkeit der zugehörigen Fluoreszenz. Hier bietet FLIM einen weiteren entscheidenden Vorteil durch die Unabhängigkeit der Lebensdauer von Konzentration und Farbsättigung (siehe Abbildung 10c) (Suhling et al. 2015).

Einen weiteren Informationsgewinn bietet FLIM durch die Differenzierbarkeit zweier Fluoreszenzfarbstoffe mit sich überschneidenden Emissionsspektren. Bei der Bildakquise mittels FLIM haben die spektralen Farben der Fluoreszenzfarbstoffe keine Bedeutung. Entscheidend ist lediglich der Parameter der Lebensdauer. Es wird also nicht die Farbe der Fluoreszenz detektiert, sondern die Zeitspanne, die das Fluorophor im angeregten Zustand verweilt, beziehungsweise die Zeit zwischen Anregungspuls durch den Laser bis zur Emission des Photons. Es können daher auch Farbstoffe mit sich überschneidenden Emissionsspektren unterschieden und für eine Färbung genutzt werden, solange die Lebensdauer der beiden Farbstoffe ausreichend distinkt ist. Dieses Prinzip wurde in Abbildung 11 veranschaulicht. Allerdings ist es durch die sehr einfache visuelle Auftrennung der Lebensdauer mittels 16-Farben-Spektrum nicht sicher möglich, zu sagen, ob in dieser Färbung eine Kollokalisierung auftritt oder nicht. An dieser Stelle ist die Bildanalyse mittels ImageJ begrenzt. Dies liegt daran, dass die beiden roten Fluoreszenzfarbstoffe sich nicht nur hinsichtlich ihres Emissionsspektrums, sondern auch hinsichtlich des Anregungsspektrums überschneiden. Daher erhält man zur Bildauswertung lediglich ein Lebensdauerbild aus dem roten Kanal der Bildakquisition mit dem Laser der Wellenlänge 530 nm. Dieses Bild enthält zwar die unterschiedlichen Lebensdauerinformationen, die sich auch wie gezeigt auftrennen und analysieren lassen. Allerdings ist eine Kodierung in Rot und Grün mit sich überschneidender Lebensdauer insofern nicht möglich, als das jedes Bildpixel nur der einen oder der anderen Farbe zugeordnet werden würde. Die Analyse, wie hier dargestellt, erfolgt über die unterschiedliche farbliche Kodierung der Zeiten in einem Bild. Eine sichere Darstellung von Kollokalisierung ist so für zwei Fluoreszenzfarbstoffe nicht möglich. Die mathematische Bestimmung eines Grenzwertes ist in diesem Beispiel dadurch erschwert, dass die Verteilung der Lebensdauerwerte im Histogramm keine zwei distinkten Maxima aufweist. Es zeigt sich

also, dass für eine differenziertere Analyse der beiden Fluoreszenzmarker mittels ImageJ, die aufgezeichneten Lebensdauerspektren nicht weit genug auseinander liegen.

Insgesamt wurden zwei entscheidende Vorteile von FLIM gegenüber der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie herausgearbeitet: Der erste wichtige Informationszugewinn durch FLIM ist die Differenzierbarkeit von drei Zellpopulationen durch den Einsatz von lediglich zwei Fluoreszenzfarbstoffen über eine eindeutige Identifikation von Kollokalisation. Und zweitens können zwei Fluoreszenzfarbstoffe mit ähnlichen Emissionsspektren mittels Lebensdauerbestimmung voneinander unterschieden werden. Das heißt, es könnte zum Beispiel eine Dreifachfärbung angefertigt werden, in der zwei rote und ein grüner Fluoreszenzfarbstoff genutzt werden, um vier Zellpopulationen voneinander zu unterscheiden.

Im Weiteren verfolgten wir das Ziel, Erstantikörper zu etablieren, die für die Klassifizierung von B-Lymphozyten in MS eine Rolle spielen. Neben den bereits vorgestellten Erstantikörpern gegen CD3, CD20 und CD27, wurden Erstantikörper gegen CD38 und CD138 untersucht. So wurde das spezifische Anfärben von Plasmazellen möglich (Abbildung 12). Bei Mehrfachfärbungen ist nicht nur die Spezifität der einzelnen Erstantikörper entscheidend, sondern auch ihre Kombinierbarkeit untereinander. Um eine Färbung zu entwickeln, die möglichst viele B-Zellen in einem einzigen Gewebeschnitt differenzieren kann, müssen möglichst viele Erstantikörper in Kombination nutzbar sein.

Da die meisten gut erprobten Erstantikörper aus Maus oder Kaninchen vorliegen, käme es bei der Nutzung von mehr als zwei Erstantikörpern zu Kreuzreaktionen der Zweitantikörper. Um dies zu umgehen, wurde in dieser Arbeit zunächst versucht, Erstantikörper aus ungewöhnlicheren Wirtsspezies zu etablieren. Getestet wurde ein Erstantikörper gegen CD38 aus der Ratte, der leider keine spezifische Färbung CD38-positiver Zellmembranen aufwies. Außerdem wurde ein Erstantikörper gegen CD27 aus dem armenischen Hamster getestet. Dieser konnte jedoch nicht in mit Citrat vorbehandeltem Gewebe genutzt werden und war daher mit den weiteren verwendeten Erstantikörpern nicht kombinierbar.

Um dennoch eine Mehrfachfärbung zu ermöglichen, wurde eine Doppelfärbung mit zwei Erstantikörpern aus demselben Wirtstier durchgeführt. Diese Doppelfärbung mit zwei Erstantikörpern gegen CD3 und CD27 aus dem Kaninchen funktioniert über eine sequenzielle Färbung mit F_{ab} -, beziehungsweise F_c -spezifischen Zweitantikörpern. Die Färbung wies zwar in der Erprobung eine gewisse Spezifität auf, jedoch entsprach die Sensitivität nicht den Erwartungen. In Abbildung 15 zeigt sich eine relativ schwache Färbung angesichts dem zu erwartenden eher hohen Anteil CD3- und CD27-positiver T-Lymphozyten. Auch wäre eine Kollokalisation der beiden Oberflächenmoleküle zu erwarten, da sich beide auf der Oberfläche von T-Lymphozyten finden lassen. Die Sensitivität lässt sich möglicherweise noch durch eine Optimierung der Inkubationszeiten verbessern. Ob dann auch eine Darstellung der Kollokalisation möglich ist, bleibt zu evaluieren.

Als Alternative zur Doppelfärbung mit Erstantikörpern aus demselben Wirt oder die Suche nach Erstantikörpern aus ungewöhnlichen Wirtstieren bleibt die Nutzung von Erstantikörpern, die direkt mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert wurden. Hierbei wäre der Fluoreszenzfarbstoff direkt an den Erstantikörper konjugiert. Fraglich ist, ob die Färbungen mit einem solchen Erstantikörper spezifisch genug wären und ob sich die Färbung aufgrund der fehlenden Amplifikation ausreichend von der Autofluoreszenz abheben würde.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass im Rahmen dieser Arbeit spezifische Färbungen gegen CD3, CD27, CD20 und CD138 getestet wurden und für weitere Anwendungen zur Verfügung stehen. Allerdings erfolgte in erster Linie eine qualitative Betrachtung der Färbungen in Bezug auf die Kombinierbarkeit der einzelnen Antikörper untereinander und die Anwendbarkeit der Färbungen für FLIM und die folgende Bildanalyse. Einer quantitativen Untersuchung zur Sicherstellung der Reproduzierbarkeit wäre vor einem Einsatz der Färbungen insbesondere in seltenem Probenmaterial oder im Rahmen diagnostischer Routinen notwendig.

Als letzter Schritt wurde die Übertragbarkeit der FLIM-Technologie von humanem Tonsillengewebe auf ZNS-Gewebe getestet. Anhand eines zentralen B-Zell-Lymphoms konnte gezeigt werden, dass das Verfahren auch im ZNS funktioniert. Hierbei wurde besonders auf die Autofluoreszenz im ZNS geachtet. Diese ist nicht größer als in der Tonsille und schränkt somit die Spezifität der Färbungen nicht ein.

Für eine Anwendung des Verfahrens auf MS-Läsionen steht noch eine quantitative Analyse der Färbungen aus. Diese wäre sinnvoll, um die Reproduzierbarkeit zu belegen, bevor die Färbungen auf wertvolles Biopsiematerial übertragen werden. Außerdem soll die Doppelfärbung mit zwei Antikörpern aus demselben Wirt optimiert werden, um eine Dreifachfärbung gegen CD20, CD27 und CD138 zur Unterscheidung von vier Zellpopulationen zu etablieren. Mit einer solchen Dreifachfärbung könnten CD138-positive und CD20-negative Plasmazellen identifiziert werden. Außerdem könnten CD27-positive und CD20-negative T-Lymphozyten von den B-Zellen abgegrenzt werden. Innerhalb der CD20-positiven B-Zellpopulation wären noch die CD27- und CD20-positiven B-Gedächtniszellen abzugrenzen. Die Bedeutung einer solchen Färbung und des hier vorgestellten FLIM-Verfahrens wird im Folgenden in den wissenschaftlichen Kontext gestellt.

4.3 Einordnung der Ergebnisse in den wissenschaftlichen Kontext

4.3.1 Die Bedeutung von FLIM für die Klassifizierung von B-Zellen in MS-Läsionen

Die Ergebnisse dieser Arbeit haben gezeigt, dass es mittels FLIM möglich ist, einzelne Immunzellpopulationen sicher voneinander zu unterscheiden. Die Methode bietet den Vorteil, dass auch eine Kollokalisierung mehrerer Oberflächenmarker auf der Zellmembran

einer Zelle erkannt und dargestellt werden kann. So können mittels einer Färbung gegen CD20 und CD27 mit zwei Fluoreszenzfarbstoffen drei Zellpopulationen differenziert werden. Dies eröffnet neue Möglichkeiten, vor allem in der Erforschung der B-Zell-Pathologie bei MS. MS-Patienten werden nicht standardmäßig biopsiert und so liegt nur eine geringe Menge an Gewebeproben zu dieser Erkrankung vor (DGN 2012). Die Biopsien erfolgen lediglich bei diagnostischer Unsicherheit zum Ausschluss anderer ZNS-Pathologien, aber nicht routinemäßig zur Diagnosesicherung. Daher ist es besonders wichtig, mit dem Gewebe, welches zu Forschungszwecken verwendet werden kann, sparsam umzugehen. Basierend auf diesem Hintergrund bietet FLIM die Möglichkeit mit nur einer einzigen Färbung mehrere B-Zellpopulationen zu unterscheiden. Die Identifikation der verschiedenen Populationen wird erst durch die Nutzung verschiedener Marker möglich. Je mehr Fluoreszenzfarbstoffe also im selben Schnitt verwendet und auseinandergehalten werden können, desto genauer können die B-Zellen klassifiziert werden. Zudem kann sparsamer mit dem Probenmaterial gearbeitet werden. Hier liefert FLIM aufgrund der spezifischen Lebensdauer und der in dieser Arbeit gezeigten Möglichkeit zur Darstellung von Kollokalisierung einen entscheidenden Vorteil. So könnten in Zukunft die verschiedenen Läsionsmuster noch spezifischer klassifiziert werden (Lucchinetti et al. 2000). Vor allem kann die genaue Lokalisation verschiedener B-Zellpopulationen in und um MS-Läsionen, sowie in den Meningen untersucht werden.

Durch die Kombinierbarkeit von Fluoreszenzfarbstoffen mit sich überschneidenden Emissionsspektren stehen für FLIM deutlich mehr Farbstoffe zur Verfügung als bei herkömmlichen Färbeverfahren (Wouters und Esposito 2008). Die Färbung mit Cy3 und TRITC im Rahmen dieser Arbeit hat das bestätigt. Solange sich die mittlere Lebensdauer der Fluoreszenzfarbstoffe ausreichend unterscheidet, sind diese voneinander differenzierbar.

In bisherigen Analysen von B-Zellpopulationen in MS wurde vornehmlich auf immunzytochemische oder durchflusszytometrische Methoden zurückgegriffen (Cepok et al. 2005). Diese Verfahren eignen sich zwar ausgezeichnet zur quantitativen Analyse der Zellen, sie lassen jedoch keine Rückschlüsse auf die genaue Zelllokalisierung im Gewebe zu (Trapp et al. 2018). Um die Histologie von MS-Läsionen zu beurteilen werden bis dato herkömmliche Färbungen, wie Hämatoxylin-Eosin- oder Silberfärbungen genutzt (Lucchinetti et al. 2000). Diese Färbungen bilden zwar Gewebestrukturen gut ab, aber es ist nicht möglich, anhand einer solchen Färbung verschiedene B-Zellpopulationen voneinander zu unterscheiden. Außerdem kann nur eine begrenzte Anzahl an Färbungen pro Gewebeschnitt erfolgen (Barnett und Prineas 2004). Die im Rahmen der Diskussion der Ergebnisse dieser Arbeit vorgeschlagene Dreifachfärbung gegen CD20, CD27 und CD138 böte daher einen deutlichen Informationszugewinn bei gleichzeitiger ökonomischer Nutzung des Probenmaterials. Es handelt sich hierbei um eine Immunfluoreszenzfärbung, welche die Detektion von spezifischen Oberflächenmarkern aus der Immunzytochemie und eine Darstellung der Zelllokalisierung in den umliegenden Gewebestrukturen kombiniert. Besonders

hervorzuheben ist, dass die Analyse mittels FLIM die Nutzung mehrerer Fluoreszenzfarbstoffe in einem einzigen Gewebeschnitt erlaubt und nicht auf sukzessive gefärbte Schnitte zurückgegriffen werden muss. Dadurch lässt sich unter anderem das Verhältnis der einzelnen Zellen zueinander genauer beurteilen, sowohl deren Lokalisation als auch die Mengenverteilung. Eine sichere Zuweisung zu den Zellpopulationen und die Untersuchung des Verhältnisses verschiedener Zellpopulationen zueinander wird hierdurch erst ermöglicht. Daraus ergeben sich möglicherweise entscheidende Hinweise auf die Interaktion der verschiedenen Immunzellpopulationen während der Erkrankungsstadien der MS und in Bezug auf die interindividuell unterschiedlichen Läsionsmuster (Lucchinetti et al. 2000).

4.3.2 Die Bedeutung von CD27 für die MS-Pathologie

Es wurde bereits erörtert, dass CD27-positive B-Gedächtniszellen eine besondere Rolle in der MS-Pathologie spielen. Unter effektiven Therapien, wie beispielsweise Alemtuzumab oder Dimethylfumarat, tritt eine langanhaltende Suppression dieser Zellen auf (Thompson et al. 2010; Høglund et al. 2018). Der Einsatz von Atacicept, welches CD27-positive Gedächtniszellen nicht beeinträchtigt, führte hingegen zu einer Exazerbation der Schubrate (Kappos et al. 2014). CD27 könnte also ein vielversprechendes neues Target für die MS-Therapie darstellen. Allerdings wird CD27 nicht nur auf der Oberfläche von B-Gedächtniszellen exprimiert, sondern auch auf T-Zellen und Plasmazellen. Es gibt außerdem eine lösliche Form von CD27, welche von aktivierten T-Zellen freigesetzt wird. Dieses lösliche CD27 weist im Liquor von MS-Patienten erhöhte Konzentrationen auf (Hintzen et al. 1991). Wong et al fanden 2018 eine Assoziation zwischen dem Vorliegen des löslichen CD27-Antigens beim Auftreten erster demyelinisierender Läsionen und dem Entwickeln einer definitiven MS bei Kindern (Wong et al. 2018). Eine weitere wichtige Beobachtung bezüglich CD27 ist, dass CD27-positive B-Gedächtniszellen von MS-Patienten weniger anti-inflammatorisches Interleukin10 produzieren als bei gesunden Patienten (Duddy et al. 2007). Es kommt während der Erkrankung also zu einer Abnahme regulatorischer B-Zellen (Knippenberg et al. 2011). All diese Beobachtungen sprechen für eine Bedeutung CD27-positiver Zellen in der MS-Pathologie. Allerdings scheint es sich hierbei um ein komplexes Zusammenspiel verschiedener Faktoren zu handeln, die für die Entwicklung einer spezifischen Therapie besser untersucht und verstanden werden müssen. Die in dieser Arbeit vorgestellte Methodik bietet dabei die Möglichkeit, das Auftreten und die Lokalisation CD27-positiver Zellen in ZNS-Läsionen und Meningen näher zu beleuchten und diese Zellen über die gleichzeitige Färbung von CD20, CD38 und CD138 sicher den Populationen von T-Zellen, B-Gedächtniszellen und Plasmazellen zuzuordnen. Außerdem bietet sich die Möglichkeit das Auftreten von B-Gedächtniszellen mit andern Zellpopulationen ins Verhältnis zu setzen.

4.3.3 Die Bedeutung von CD138 für die MS-Pathologie

Die Betrachtung von CD138 ist besonders deshalb interessant, weil CD138 nur auf Plasmablasten und Plasmazellen vorkommt. Plasmazellen sind die Antikörper-produzierenden Zellen des Immunsystems und werden somit auch für die intrathekale Antikörperproduktion verantwortlich gemacht, die zur Ausprägung oligoklonaler Banden im Liquor führt (Correale und de los Milagros Bassani Molinas 2002). Diese Plasmazellen sollten somit intrathekal, also entweder im ZNS der MS-Patienten oder in den Meningen zu finden sein. Tatsächlich wurden bei Patienten mit oligoklonalen Banden post mortem erhöhte Plasmazellzahlen in den Meningen gefunden (Farrell et al. 1985). Hier wären weitere Untersuchungen mithilfe von FLIM interessant. Es konnte gezeigt werden, dass das Auftreten von oligoklonalen Banden im Liquor bei Krankheitsbeginn mit einer höheren kortikalen Läsionslast korreliert (Farina et al. 2017). Außerdem wird ein Zusammenhang zwischen der kortikalen Läsionslast und einer stärkeren Progression der Behinderung gemessen am EDSS hergestellt (Dobson et al. 2013). Dies legt die Vermutung nahe, dass die Behinderungsprogression ebenso mit dem frühen Auftreten oligoklonaler Banden korreliert. Insgesamt wird die Schädigung der grauen Substanz für den Übergang von der RRMS in die SPMS verantwortlich gemacht (Calabrese et al. 2013). Es ist also anzunehmen, dass die neurodegenerative Komponente der MS, die von bisherigen MS-Therapien eher unberührt bleibt, mit der Expression von oligoklonalen Banden zusammenhängt. Diese Theorie wird dadurch unterstützt, dass die Expression von oligoklonalen Banden durch B-Zell-depletierende Therapien unverändert bleibt (Krumbholz et al. 2012). Dies ließe sich dadurch erklären, dass die B-Zell-depletierenden Therapien nicht zu einer Verminderung der Plasmazellzahl führen. Auch wurden infiltrierende Plasmazellen verstärkt in Patienten mit progredienten Verlaufsformen gefunden (Frischer et al. 2009). Es ist also vorstellbar, dass eine Therapie, die direkt auf die Antikörper-produzierenden Zellen im ZNS zielt, eine bessere Neuroprotektion und somit höhere Effizienz in Bezug auf die PPMS aufweisen würde.

4.3.4 B-Zellen als Biomarker in MS

Wie in den vorangegangenen Absätzen diskutiert, ist eine nähere Betrachtung sowohl von CD27-positiven als auch CD138-positiven Zellen bei MS-Patienten interessant. CD20 ist bereits eine etablierte Zielstruktur in der MS-Therapie. Für die Therapie des Multiplen Myeloms wurde der monoklonale Antikörper Daratumumab gegen CD38 zugelassen (Weers et al. 2011). Eine Verwendung des Antikörpers in der MS-Therapie wird in Betracht gezogen (Greenfield und Hauser 2018). Vielleicht gibt uns aber nicht die Betrachtung eines einzelnen dieser Oberflächenmoleküle den entscheidenden Hinweis zum Verständnis der MS-Pathologie. Vielmehr scheint eine Interaktion verschiedener Immunzellen von Bedeutung zu sein. Daher wäre es umso wichtiger, sich diese Oberflächenstrukturen und ihre Beziehung zueinander in einer einzigen Färbung in MS-Läsionen anschauen zu können. Liegen nur einzelne dieser Zellmarker, sprich bestimmte B-Zellpopulationen in den MS-Läsionen vor und unterscheidet sich dies je nach Läsionsart? Wenn dem so ist, lassen sich daraus

möglicherweise Rückschlüsse auf erfolgreiche Therapieoptionen ziehen. Das Auftreten bestimmter B-Zellpopulationen kann möglicherweise auch einen Hinweis darauf geben, welche Therapie bei einem individuellen Patienten den größten Erfolg versprechen. Natürlich wäre hierfür besonders interessant, ob es schon im Blut der Patienten Hinweise darauf gibt, welche Therapieoptionen individuell am Geeignetsten ist. Es stellt sich also die Frage, ob die Eigenschaften der Lymphozyten im Blutsystem Rückschlüsse auf die Lymphozyteneigenschaften im ZNS und deren Beteiligung an der MS-Pathologie zulassen. Anders formuliert, bedeutet dies, dass möglicherweise bestimmte B-Zellen oder das Verhältnis bestimmter B-Zellpopulationen zueinander in Zukunft als Biomarker für MS-Patienten dienen könnten.

Ein weiterer Aspekt macht die Erforschung eines zellulären Biomarkers für die MS interessant: Bisher hat man sich viele Gedanken darüber gemacht, wann eine MS-Therapie zu eskalieren ist und was es für weitere Therapieoptionen gibt. Heute steht uns eine große Bandbreite an hochaktiven Therapeutika zur Verfügung und es kommt nicht selten unter Therapie zu einem Stillstand zumindest der schubförmigen Komponente der MS. Wann also ist der Zeitpunkt gekommen, um zu deeskalieren beziehungsweise die Zeitspanne zwischen zwei Therapiezyklen zu verlängern? Es gilt, besonders bei den nebenwirkungsreichen oder risikobehafteten Therapien eine Übertherapie zu vermeiden. Ein Biomarker, der sich in Serum oder Liquor der Patienten bestimmen ließe und anzeigt, wie lange eine Therapie erfolgreich ist und wann ein neuer Therapiezyklus aufgenommen werden muss, wäre ein Meilenstein in der MS-Therapie. Die Erforschung eines Biomarkers in der MS wäre ein essenzieller Schritt, um in Zukunft eine individuellere und effektivere MS-Therapie möglich zu machen.

4.4 Ausblick

Die FLIM-Methode könnte es in Zukunft möglich machen, B-Zellen in MS-Läsionen besser zu klassifizieren. Durch die gute Differenzierbarkeit der verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffe mittels Lebensdauermessungen stehen viele verschiedene Farbstoffe zur Verfügung, die in derselben Färbung genutzt werden können. Auf diese Weise kann anhand weniger Färbungen ein hoher Erkenntnisgewinn erzielt werden. Durch den Entfall der Notwendigkeit sequenzieller Färbungen, kann das Verhältnis von CD138-positiven Plasmazellen gegenüber CD27-positiven B-Gedächtniszellen und naiven B-Zellen sowie T-Zellen in MS-Läsionen und den Meningen von MS-Patienten untersucht werden. Dabei kann auch die jeweils genaue histologische Lokalisation der Zellen in die Betrachtungen miteinbezogen werden. Interessant wäre unter anderem die Entwicklung bestimmter B-Zellpopulationen nach Therapie. Auch die Frage, ob Patienten ein für sie selbst oder das Krankheitsstadium spezifisches Immunzell-Muster innerhalb der Läsionen aufweisen, kann mit dieser Methode untersucht werden. Perspektivisch bietet sich also mittels FLIM die Möglichkeit B-Zellen im ZNS von MS-Patienten genauer zu untersuchen und zu

klassifizieren, um spezifischere und stärker personalisierte Ansatzpunkte für neue Therapien zu definieren.

5 Zusammenfassung

Das Ziel dieses Projektes war es, zu zeigen, dass mithilfe der *Lifetime-Imaging*-Technologie eine spezifische Differenzierung von Expressionsmustern auf Immunzellen möglich ist.

Mit einer Doppelfärbung gegen CD20 und CD27 konnte gezeigt werden, dass mit nur zwei Fluoreszenzfarbstoffen drei verschiedene Zellpopulationen unterschieden werden können. CD27- und CD20-positive B-Gedächtniszellen heben sich deutlich von den CD20-positiven B-Zellen und den CD27-positiven T-Zellen ab. Eine eindeutige Differenzierung ist durch die Nutzung von FLIM somit möglich, da es diese erlaubt, nicht nur spezifische Lebensdauerwerte für die einzelnen Fluorophore zu messen, sondern auch Mischwerte bei Koexistenz zu detektieren. Die Differenzierbarkeit der Fluoreszenzfarbstoffe mittels Lebensdauer ist unabhängig von den Emissionsspektren. Somit können auch Farbstoffe mit sich überschneidenden Emissionsspektren genutzt werden, solange die Lebensdauer ausreichend distinkt ist.

In einem weiteren Schritt ging es darum, auch Färbungen gegen CD38 und CD138 zu testen und alle vier Erstantikörper auf deren Kombinierbarkeit zu prüfen. Dafür würden sich Erstantikörper gegen die CD-Moleküle aus vier verschiedenen Wirtstieren und dann jeweils wirtsspezifische, fluoreszenzgekoppelte Zweitantikörper anbieten. Leider stehen diese Erstantikörper in guter Qualität nur aus der Maus und dem Kaninchen zur Verfügung. Daher war als nächster Schritt die Etablierung eines Färbeverfahrens notwendig, mit dem es möglich ist, wenigstens zwei Erstantikörper aus demselben Wirt in einer Färbung zu nutzen. Hierbei wurde vor allem auf die Sequenz und die Kombinierbarkeit der verwendeten Antikörper geachtet, wodurch neue und höhere Ansprüche an das Färbeprotokoll entstanden.

Zuletzt wurde die Übertragbarkeit der Methode auf ZNS-Gewebe am Beispiel eines B-Zell-Lymphoms gezeigt.

Die hier erarbeitete Methodik schafft die notwendige Grundlage, B-Zellen in MS-Läsionen besser klassifizieren zu können. Durch die gute Differenzierbarkeit der verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffe mittels Lebensdauermessungen stehen viele verschiedene Farbstoffe zur Verfügung, die in demselben Gewebeschnitt genutzt werden könnten. Auf diese Weise kann auf sequenzielle Färbungen verzichtet und ein hoher Erkenntnisgewinn insbesondere in Bezug auf das Verhältnis der verschiedenen Zielstrukturen zueinander erzielt werden.

Somit bietet sich die Möglichkeit, herauszufinden, welche B-Zellpopulationen maßgeblich an der Pathogenese der MS beteiligt sind, um diese als spezifisches Ziel zukünftiger Therapien zu nutzen.

6 Anhang

Tabelle Anhang 1 Übersicht der angefertigten Färbungen

mit Datum und zugehörigen Daten der Aufnahmen an den verschiedenen Mikroskopen. Die Kürzel hinter dem genutzten Erstantikörper geben an, aus welchem Wirtstier dieser gewonnen wurde (ms für Maus, rb für Kaninchen, rat für Ratte und ha für armenischer Hamster)

Färbung	Färbe- datum	Keyence	konfokal	FLIM	Slide- Scanner
Tonsille CD3rb-Alexa488	150210 - 150211	150212			
Tonsille CD3rb-Cy3	150211 - 150212	150212			
Tonsille CD3rb-Kontrolle	150211 - 150212				
Tonsille Kontrolle PBS ungekocht	150211 - 150212	150721	150302, 150507	150302, 150507	
Tonsille Kontrolle PBS zweimal gekocht	150211 - 150212				
Tonsille Kontrolle FCS zweimal gekocht	150211 - 150212				
Tonsille CD20ms-Cy3 ungekocht	150224 - 150225				
Tonsille CD3rb-Alexa488 + CD20ms-Cy3 sequenzielle Antikörperfärbung	150224 - 150226	150721	150302, 150420	150302, 150420	
Tonsille CD3rb-TexasRed + CD20ms-Cy3	150226 - 150227		150302		
Tonsille CD3rb-TexasRed	150303 - 150304				
Tonsille CD3rb-TRITC	150303 - 150304		150305		
Tonsille CD3rb-TRITC + CD20ms-Cy3	150303 - 150304		150305		
Tonsille CD4rb-TRITC + CD20ms-Cy3	150305 - 150306		150309		
Tonsille CD3rb-TRITC + CD20ms-Cy3	150311 - 150312		150313	150313	

Färbung	Färbe- datum	Keyence	konfokal	FLIM	Slide- Scanner
Tonsille CD27rb (1/150)-TRITC	150313 - 150314		150317		
Tonsille CD27rb (1/100)-TRITC	150327 - 150328				
Tonsille CD27rb (1/250)-TRITC	150327 - 150328				
Tonsille CD27rb (1/1000)-TRITC	150327 - 150328				
Tonsille CD27rb (1/5000)- TRITC	150327 - 150328				
Tonsille CD20ms-Cy3 + CD27rb-TRITC	150409 - 150410		150413		
Tonsille CD20ms-Cy3 + CD27rb-Alexa488	150414 - 150415	150721	150415	150415	
Tonsille CD27ha (1/100)-TRITC	150427 - 150428		150918	150918	
Tonsille CD27ha (1/500)-TRITC	150427 - 150428		150429, 150918	150918	
Tonsille CD27ha (1/100)-TRITC ungekocht	150427 - 150428		150429		
Tonsille CD27ha (1/500)-TRITC ungekocht	150427 - 150428		150429		
Tonsille CD27ha (1/500)-TRITC	150505 - 150506		150507		
Tonsille CD27ha (1/1000)- TRITC	150505 - 150506		150507		
Tonsille TRITC Kontrolle	150505 - 150506		150507		
Tonsille CD38rat (1/100)-Cy3	150603 - 150604		150609		
Tonsille CD38rat (1/500)-Cy3	150603 - 150604		150609		
Tonsille CD38rat (1/100)-Cy3 ungekocht	150603 - 150604				

Färbung	Färbe- datum	Keyence	konfokal	FLIM	Slide- Scanner
Tonsille CD38rat (1/500)-Cy3 ungekocht	150603 - 150604				
Tonsille CD138rb (1/100)-TRITC	150603 - 150604		150609		
Tonsille CD138rb (1/500)-TRITC	150603 - 150604		150609		
Tonsille CD138rb (1/100)-TRITC ungekocht	150603 - 150604		150609		
Tonsille CD138rb (1/500)-TRITC ungekocht	150603 - 150604				
Tonsille CD38rat-Cy3 + CD138rb-Alexa488	150611 - 150612		150622	150622	
Tonsille CD38rat-Cy3 + CD138rb-TRITC + CD20ms-Alexa488	150611 - 150612		150622	150622	
Tonsille CD38rat (1/50)-Cy3	150625 - 150626		150629		
Tonsille CD38rat (1/25)-Cy3	150625 - 150626		150629, 151102	150918	
Tonsille CD138rb-Alexa488	150702 - 150703				
Tonsille CD138rb-Alexa488 + CD38rat-Cy3	150702 - 150703				
Tonsille CD138rb-Alexa488 + CD20ms-TRITC	150702 - 150703				
Tonsille CD38rat-Cy3 + CD20ms-Alexa488	150702 - 150703				
Tonsille CD138rb-Alexa488 + CD38rat-Cy3 + CD20ms-TRITC	150702 - 150703				
Tonsille CD138rb-Alexa488 + CD38rat-Cy3	150714 - 150715	150721			
Tonsille CD138rb-TRITC + CD20ms-Alexa488	150714 - 150715	150721		150722	

Färbung	Färbe- datum	Keyence	konfokal	FLIM	Slide- Scanner
Tonsille CD138rb-Alexa488 + CD20ms-TRITC	150714 - 150715	150721		150722	
Tonsille CD38rat-Cy3 + CD20ms-Alexa488	150714 - 150715	150721		150722	
Tonsille CD138rb-Alexa488 + CD38rat-Cy3 + CD20ms-TRITC	150714 - 150715	150721		150722	
Tonsille CD27ha (1/50)-TRITC	150928 - 150929				
Tonsille CD27ha (1/25)-TRITC	150928 - 150929				
Tonsille Kontrolle Cy3 anti rat	150928 - 150929				
Tonsille CD3rb-Alexa488 + CD27rb-Cy3	151028 - 151029		151102	151102	
Tonsille CD27rb-Alexa488 + CD3rb-Cy3	151028 - 151029		151102		
Tonsille Kontrolle Block	151028 - 151029				
Lymphom CD20ms-Alexa488	151028 - 151029		151102	151102	151202
Lymphom CD20ms-Alexa488 + CD3rb-Cy3	151104 - 151105		151109	151109	151202
Lymphom CD20ms-Alexa488 + CD27rb-Cy3	151104 - 151105		151109	151109	151202
Lymphom CD20ms-Alexa488 + CD138rb-Cy3	151104 - 151105		151109	151109	151202
Tonsille CD27rb-Alexa488 + CD27rb-Cy3	151110 - 151112				
Tonsille CD3rb-Alexa488 + CD3rb-Cy3	151110 - 151112				
Tonsille CD38ms (1/50)- Alexa488	160114 - 160115				160122
Tonsille CD38ms (1/100)- Alexa488	160114 - 160115				160122

Färbung	Färbe- datum	Keyence	konfokal	FLIM	Slide- Scanner
Tonsille CD38ms (1/200)- Alexa488	160114 - 160115				160122
Tonsille CD38ms (1/1000) - Alexa488	160114 - 160115				160122
Lymphom Kontrolle Alexa488	160118 - 160120		160203	160203	160122
Lymphom Kontrolle Cy3	160118 - 160120		160203	160203	160122
Lymphom CD20ms-Alexa488	160118 - 160120				160122
Lymphom CD27rb-Cy3	160118 - 160120				160122
Lymphom CD20ms-Alexa488 + CD27rb-Cy3 sequenzielle Antikörperfärbung	160118 - 160120				160122
Lymphom CD27rb-Cy3 + CD20ms-Alexa488 sequenzielle Antikörperfärbung	160118 - 160120				160122
Lymphom CD20ms-Alexa488 + CD27rb-Cy3 mit Mowiol	160118 - 160120		160203	160203	160122
Lymphom CD20ms-Alexa488 + CD27rb-Cy3 mit Mounting Medium	160118 - 160120		160211	160211	160122
Tonsille CD38ms-Cy3 + CD138rb-Alexa488	160208 - 160209		160211	160211	
Tonsille CD38ms-Cy3 + CD27rb-Alexa488	160208 - 160209		160211	160211	

Tabelle Anhang 2 Übersicht der je Färbung genutzten Verdünnungen aller verwendeten Antikörper

Antikörper	Verdünnung	Aufbewahrungstemperatur
CD3 rabbit anti human	1/100	4°C
CD4 rabbit anti human IgG	1/150	4°C
CD20 mouse anti human	1/100	4°C
CD27 rabbit anti human	1/150	-20°C
CD27 hamster anti human		4°C
CD38 rat anti human	1/25	-20°C
CD38 mouse anti human	1/200	-20°C
CD138 rabbit anti human	1/50	4°C
AlexaFluor488 goat anti mouse	1/200	4°C
AlexaFluor488 goat anti rabbit	1/500	-20°C
AlexaFluor488 goat anti rabbit IgG F _c -specific	1/500	-20°C
Cy3 goat anti rabbit	1/100	4°C
Cy3 goat anti mouse	1/100	4°C
Cy3 donkey anti rat	1/150	-20°C
Cy3 goat anti rabbit IgG F _{ab} -specific	1/1000	-20°C
TRITC goat anti rabbit	1/150	-20°C
TRITC goat anti hamster	1/150	-20°C
TexasRed goat anti rabbit	1/150	-20°C
Block F _{ab} donkey anti rabbit IgG	1/1000	4°C

Tabelle Anhang 3 Einstellungen für die Lochblende und Laserintensität

für die Fluoreszenzmikroskopie der Konfokalaufnahmen und FLIM-Aufnahmen mit Angabe des Datums. Die Kürzel hinter dem genutzten Erstantikörper geben an, aus welchem Wirtstier dieser gewonnen wurde (ms für Maus, rb für Kaninchen, rat für Ratte und ha für armenischer Hamster)

Färbung	Datum der Aufnahme konfokal/ FLIM	Größe der Lochblende	Laserintensität 488 nm (500-545 nm)	Laserintensität 559 nm (570-670 nm)	Gewebe
CD3rb-TRITC	150305/ x	115	4,00%	6,00%	Tonsille
CD3rb-TRITC	150305/ x	115	10,00%	10,00%	Tonsille
CD3rb-TRITC	150305/ x	115	10,00%	10,00%	Tonsille
CD3rb-TRITC	150305/ x	115	10,00%	10,00%	Tonsille
CD3rb-TRITC + CD20ms-Cy3	150305/ x	115	8,00%	3,00%	Tonsille
CD3rb-TRITC + CD20ms-Cy3	150305/ x	115	13,00%	3,00%	Tonsille
CD3rb-TRITC + CD20ms-Cy3	150305/ x	115	13,00%	2,00%	Tonsille
CD4rb-TRITC + CD20ms-Cy3	150309/ x	120		3,00%	Tonsille
CD4rb-TRITC + CD20ms-Cy3	150309/ x	120		2,00%	Tonsille
CD3rb-TRITC + CD20ms-Cy3	150130/ 150313	120		4,00%	Tonsille
CD3rb-TRITC + CD20ms-Cy3	150130/ 150313	120		4,00%	Tonsille
CD3rb-TRITC + CD20ms-Cy3	150130/ 150313	120		4,00%	Tonsille
CD3rb-TRITC + CD20ms-Cy3	150130/ 150313	120		4,00%	Tonsille
CD3rb-TRITC + CD20ms-Cy3	150130/ 150313	120		4,00%	Tonsille
CD3rb-TRITC + CD20ms-Cy3	150130/ 150313	120		4,00%	Tonsille
CD3rb-TRITC + CD20ms-Cy3	150130/ 150313	120		4,00%	Tonsille
CD27rb-TRITC	150317/ x	115	11,00%	10,00%	Tonsille
CD27rb-TRITC	150317/ x	115	2,00%	10,00%	Tonsille

Färbung	Datum der Aufnahme konfokal/ FLIM	Größe der Lochblende	Laserintensität 488 nm (500-545 nm)	Laserintensität 559 nm (570-670 nm)	Gewebe
CD3rb-Alexa488 + CD20-Cy3	150420/ 150420	110	6,00%	1,00%	Tonsille
CD3rb-Alexa488 + CD20-Cy3	150420/ 150420	110	6,00%	1,00%	Tonsille
CD3rb-Alexa488 + CD20-Cy3	150420/ 150420	110	6,00%	1,00%	Tonsille
CD27ha-TRITC (1/500) ungekocht	150429/ x		12,00%	11,00%	Tonsille
CD27ha-TRITC (1/500) ungekocht	150429/ x		14,00%	14,00%	Tonsille
CD27ha-TRITC (1/500) ungekocht	150429/ x		14,00%	16,00%	Tonsille
CD27ha-TRITC (1/100) ungekocht	150429/ x		16,00%	15,00%	Tonsille
CD27ha-TRITC (1/100) ungekocht	150429/ x		19,00%	19,00%	Tonsille
CD27ha-TRITC (1/100) ungekocht	150429/ x		16,00%	17,00%	Tonsille
CD27ha-TRITC (1/500) gekocht	150429/ x		13,00%	13,00%	Tonsille
CD27ha-TRITC (1/500)	150507/ x	140	9,00%	9,00%	Tonsille
CD27ha-TRITC (1/1000)	150507/ x	120	11,00%	9,00%	Tonsille
TRITC	150507/ x	120	9,00%	8,00%	Tonsille
ungefärbt & ungekocht	150507/ 150507	115	5,00%	5,00%	Tonsille
ungefärbt & ungekocht	150507/ 150507	115	5,00%	5,00%	Tonsille
ungefärbt & ungekocht	150507/ 150507	115	5,00%	5,00%	Tonsille
CD38rat-Cy3 (1/100) gekocht	150609/ x	120	10,00%	8,00%	Tonsille

Färbung	Datum der Aufnahme konfokal/ FLIM	Größe der Lochblende	Laserintensität 488 nm (500-545 nm)	Laserintensität 559 nm (570-670 nm)	Gewebe
CD38rat-Cy3 (1/100) gekocht	150609/ x	120	11,00%	10,00%	Tonsille
CD38rat-Cy3 (1/500) gekocht	150609/ x	120	10,00%	10,00%	Tonsille
CD38rat-Cy3 (1/500) gekocht	150609/ x	120	11,00%	10,00%	Tonsille
CD138rb-TRITC (1/100) gekocht	150609/ x	120	11,00%	9,00%	Tonsille
CD138rb-TRITC (1/100) gekocht	150609/ x	120	8,00%	7,00%	Tonsille
CD138rb-TRITC (1/100) ungekocht	150609/ x	120	10,00%	9,00%	Tonsille
CD138rb-TRITC (1/100) ungekocht	150609/ x	120	8,00%	7,00%	Tonsille
CD138rb-TRITC (1/500) gekocht	150609/ x	120	10,00%	10,00%	Tonsille
CD138rb-TRITC (1/500) gekocht	150609/ x	120	14,00%	11,00%	Tonsille
CD138rb-Alexa488 + CD38rat-Cy3	150622/ 150622	110	5,00%	5,00%	Tonsille
CD138rb-Alexa488 + CD38rat-Cy3	150622/ 150622	110	5,00%	5,00%	Tonsille
CD20ms-Alexa488 + CD138rb-TRITC + CD38rat-Cy3	150622/ x	110	2,00%	5,00%	Tonsille
CD20ms-Alexa488 + CD138rb-TRITC + CD38rat-Cy3	150622/ x	110	3,00%	5,00%	Tonsille
CD20ms-Alexa488 + CD138rb-TRITC + CD38rat-Cy3	150622/ x	110	3,00%	5,00%	Tonsille

Färbung	Datum der Aufnahme konfokal/ FLIM	Größe der Lochblende	Laserintensität 488 nm (500-545 nm)	Laserintensität 559 nm (570-670 nm)	Gewebe
CD38rat-Cy3 (1/50) gekocht	150629/ x	110	14,30%	14,20%	Tonsille
CD38rat-Cy3 (1/50) gekocht	150629/ x	110	8,30%	9,20%	Tonsille
CD38rat-Cy3 (1/50) gekocht	150629/ x	110	8,30%	9,20%	Tonsille
CD38rat-Cy3 (1/25) gekocht	150629/ x	110	6,30%	6,00%	Tonsille
CD38rat-Cy3 (1/25) gekocht	150629/ x	110	6,30%	8,00%	Tonsille
CD38rat-Cy3 (1/25) gekocht	150629/ x	110	11,30%	5,00%	Tonsille
CD27ha-TRITC (1/500)	150918/ 150908		3,00%	4,00%	Tonsille
CD27ha-TRITC (1/100)	150918/ 150908		5,00%	11,00%	Tonsille
CD38rat-Cy3 (1/25)	150918/ 150908		3,00%	2,00%	Tonsille
CD38rat-Cy3 (1/25)	150918/ 150908		3,00%	2,00%	Tonsille
CD3rb-Cy3 + CD27rb-Alexa488	151102/ x	105	1,00%	4,00%	Tonsille
CD3rb-Cy3 + CD27rb-Alexa488	151102/ x	105	1,00%	2,00%	Tonsille
CD20ms-Alexa488	151102/ 151102	105	1,00%		Lymphom
CD20ms-Alexa488	151102/ 151102	105	1,00%		Lymphom
CD3rb-Alexa488 + CD27rb-Cy3	151102/ 151102	105	1,00%	4,00%	Tonsille
CD3rb-Alexa488 + CD27rb-Cy3	151102/ 151102	105	1,00%	4,00%	Tonsille

Färbung	Datum der Aufnahme konfokal/ FLIM	Größe der Lochblende	Laserintensität 488 nm (500-545 nm)	Laserintensität 559 nm (570-670 nm)	Gewebe
CD20ms-Alexa488 + CD3rb-Cy3	151109/ 151109	110	1,00%	1,00%	Lymphom
CD20ms-Alexa488 + CD3rb-Cy3	151109/ 151109	110	2,00%	3,00%	Lymphom
CD20ms-Alexa488 + CD3rb-Cy3	151109/ 151109	110	2,00%	3,00%	Lymphom
CD20ms-Alexa488 + CD27rb-Cy3	151109/ 151109	110	1,00%	1,00%	Lymphom
CD20ms-Alexa488 + CD27rb-Cy3	151109/ 151109	110	2,00%	2,00%	Lymphom
CD20ms-Alexa488 + CD27rb-Cy3	151109/ 151109	110	2,00%	2,00%	Lymphom
CD20ms-Alexa488 + CD138rb-Cy3	151109/ 151109	110	2,00%	5,00%	Lymphom
Kontrolle Alexa488	160203/ 160203	110	0,80%	3,00%	Lymphom
Kontrolle Alexa488	160203/ 160203	110	0,80%	4,00%	Lymphom
Kontrolle Cy3	160203/ 160203	110	0,80%	4,00%	Lymphom
Kontrolle Cy3	160203/ 160203	110	0,80%	4,00%	Lymphom
CD20ms-Alexa488 + CD27rb-Cy3	160203/ 160203	110	0,80%	1,00%	Lymphom
CD20ms-Alexa488 + CD27rb-Cy3	160203/ 160203	110	0,80%	1,00%	Lymphom
CD20ms-Alexa488 + CD27rb-Cy3	160203/ 160203	110	0,80%	1,00%	Lymphom
CD20ms-Alexa488 + CD27rb-Cy3	160203/ 160203	110	0,80%	1,00%	Lymphom
CD38ms-Cy3 + CD138rb-Alexa488	160211/ 160211		0,80%	3,00%	Tonsille

Färbung	Datum der Aufnahme konfokal/ FLIM	Größe der Loch- blende	Laser- intensität 488 nm (500- 545 nm)	Laser- intensität 559 nm (570- 670 nm)	Gewebe
CD38ms-Cy3 + CD138rb-Alexa488	160211/ 160211		0,80%	3,00%	Tonsille
CD38ms-Cy3 + CD138rb-Alexa488	160211/ 160211		0,80%	2,00%	Tonsille
CD38ms-Cy3 + CD138rb-Alexa488	160211/ 160211		0,80%	2,00%	Tonsille
CD38ms-Cy3 + CD27rb-Alexa488	160211/ 160211		0,80%	1,00%	Tonsille
CD38ms-Cy3 + CD27rb-Alexa488	160211/ 160211		0,80%	1,00%	Tonsille
CD20ms-Alexa488 + CD27rb-Cy3	160211/ 160211		0,80%	1,00%	Lymphom
CD20ms-Alexa488 + CD27rb-Cy3	160211/ 160211		0,80%	1,00%	Lymphom
CD20ms-Alexa488 + CD27rb-Cy3	160211/ 160211		0,80%	1,00%	Lymphom

7 Literaturverzeichnis

- Abdelhak A, Weber MS, Tumani H (2017): Primary Progressive Multiple Sclerosis: Putting Together the Puzzle. *Front Neurol* **8**, 234
- Andersson PB, Goodkin DE (1998): Glucocorticosteroid therapy for multiple sclerosis: a critical review. *J Neurol Sci* **160**, 16–25
- Baker D, Pryce G, Amor S, Giovannoni G, Schmierer K (2018): Learning from other autoimmunities to understand targeting of B cells to control multiple sclerosis. *Brain* **141**, 2834–2847
- Barnett MH, Prineas JW (2004): Relapsing and remitting multiple sclerosis: Pathology of the newly forming lesion. *Ann Neurol* **55**, 458–468
- Bar-Or A, Grove RA, Austin DJ, Tolson JM, VanMeter SA, Lewis EW, Derosier FJ, Lopez MC, Kavanagh ST, Miller AE, Sorensen PS (2018): Subcutaneous ofatumumab in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. *Neurology* **90**, e1805–e1814
- Becker W (2012): Fluorescence lifetime imaging – techniques and applications. *J Microsc* **247**, 119–136
- Becker W, Bergmann A, Hink MA, König K, Benndorf K, Biskup C (2004): Fluorescence lifetime imaging by time-correlated single-photon counting. *Microsc Res Tech* **63**, 58–66
- Bloomgren G, Richman S, Hotermans C, Subramanyam M, Goelz S, Natarajan A, Lee S, Plavina T, Scanlon JV, Sandrock A, Bozic C (2012): Risk of natalizumab-associated progressive multifocal leukoencephalopathy. *N Engl J Med* **366**, 1870–1880
- Bornstein MB, Miller A, Slagle S, Weitzman M, Crystal H, Drexler E, Keilson M, Merriam A, Wassertheil-Smoller S, Spada V, et al. (1987): A Pilot Trial of Cop 1 in Exacerbating–Relmitting Multiple Sclerosis. *N Engl J Med* **317**, 408–414
- Brück W (2005): The pathology of multiple sclerosis is the result of focal inflammatory demyelination with axonal damage. *J Neurol* **252 Suppl 5**, v3-9
- Brück W, Ralf G, Lund BT, Celia O-G, Prat A, Spencer CM, Steinman L, Mar T, Vollmer T, Weber MS, et al. (2013): Therapeutic Decisions In Multiple Sclerosis: Moving Beyond Efficacy. *JAMA Neurol* **70**, 1315–1324
- Buttmann M, Rieckmann P (2008): Treating multiple sclerosis with monoclonal antibodies. *Expert Rev Neurother* **8**, 433–455
- Calabrese M, Romualdi C, Poretto V, Favaretto A, Morra A, Rinaldi F, Perini P, Gallo P (2013): The changing clinical course of multiple sclerosis: A matter of gray matter. *Ann Neurol* **74**, 76–83
- Cepok S, Rosche B, Grummel V, Vogel F, Zhou D, Sayn J, Sommer N, Hartung H-P, Hemmer B (2005): Short-lived plasma blasts are the main B cell effector subset during the course of multiple sclerosis. *Brain* **128**, 1667–1676
- Charcot J-M (1869): Histologie de la sclérose en plaques. *Gaz Hosp* **41**, 554–556
- Coiffier B (2006): Monoclonal antibody as therapy for malignant lymphomas. *C R Biol* **329**, 241–254

- Coles AJ, Twyman CL, Arnold DL, Cohen JA, Confavreux C, Fox EJ, Hartung H-P, Havrdova E, Selmaj KW, Weiner HL, et al. (2012): Alemtuzumab for patients with relapsing multiple sclerosis after disease-modifying therapy: a randomised controlled phase 3 trial. *The Lancet* 380, 1829–1839
- Compston A (1988): The 150th anniversary of the first depiction of the lesions of multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 51, 1249–1252
- Compston A, Coles A (2008): Multiple sclerosis. *Lancet* 372, 1502–1517
- Confavreux C, Chapuis-Cellier C, Arnaud P, Robert O, Aimard G, Devic M (1986): Oligoclonal „fingerprint“ of CSF IgG in multiple sclerosis patients is not modified following intrathecal administration of natural beta-interferon. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 49, 1308–1312
- Correale J, de los Milagros Bassani Molinas M (2002): Oligoclonal bands and antibody responses in Multiple Sclerosis. *J Neurol* 249, 375–389
- Correale J, Gaitán MI (2015): Multiple sclerosis and environmental factors: the role of vitamin D, parasites, and Epstein–Barr virus infection. *Acta Neurol Scand* 132, 46–55
- Cross AH, Stark JL, Lauber J, Ramsbottom MJ, Lyons J-A (2006): Rituximab reduces B cells and T cells in cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients. *J Neuroimmunol* 180, 63–70
- De Stefano N, Matthews PM, Fu L, Narayanan S, Stanley J, Francis GS, Antel JP, Arnold DL (1998): Axonal damage correlates with disability in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. Results of a longitudinal magnetic resonance spectroscopy study. *Brain* 121, 1469–1477
- DGN (2012): Diagnose und Therapie der Multiplen Sklerose (Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie) S2e-Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Neurologie. <https://www.dgn.org/leitlinien/2333-ll-31-2012-diagnose-und-therapie-der-multiplen-sklerose#definitionundklassifikation>; Zugriff am 15.10.2018.
- Disanto G, Morahan JM, Barnett MH, Giovannoni G, Ramagopalan SV (2012): The evidence for a role of B cells in multiple sclerosis. *Neurology* 78, 823–832
- Dobson R, Ramagopalan S, Davis A, Giovannoni G (2013): Cerebrospinal fluid oligoclonal bands in multiple sclerosis and clinically isolated syndromes: a meta-analysis of prevalence, prognosis and effect of latitude. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 84, 909–914
- Duddy M, Niino M, Adatia F, Hebert S, Freedman M, Atkins H, Kim HJ, Bar-Or A (2007): Distinct Effector Cytokine Profiles of Memory and Naive Human B Cell Subsets and Implication in Multiple Sclerosis. *J Immunol* 178, 6092–6099
- Ebers GC (1998): Randomised double-blind placebo-controlled study of interferon β -1a in relapsing/remitting multiple sclerosis. *Lancet* 352, 1498–1504
- Ebrecht R, Don Paul C, Wouters FS (2014): Fluorescence lifetime imaging microscopy in the medical sciences. *Protoplasma* 251, 293–305
- Engel P, Boumsell L, Balderas R, Bensussan A, Gattei V, Horejsi V, Jin B-Q, Malavasi F, Mortari F, Schwartz-Albiez R, et al. (2015): CD Nomenclature 2015: Human Leukocyte Differentiation Antigen Workshops as a Driving Force in Immunology. *J Immunol* 195, 4555–4563

- Farina G, Magliozzi R, Pitteri M, Reynolds R, Rossi S, Gajofatto A, Benedetti MD, Facchiano F, Monaco S, Calabrese M (2017): Increased cortical lesion load and intrathecal inflammation is associated with oligoclonal bands in multiple sclerosis patients: a combined CSF and MRI study. *J Neuroinflammation* 14, 40
- Farrell MA, Kaufmann JC, Gilbert JJ, Noseworthy JH, Armstrong HA, Ebers GC (1985): Oligoclonal bands in multiple sclerosis: clinical-pathologic correlation. *Neurology* 35, 212–218
- Fillatreau S, Sweeney CH, McGeachy MJ, Gray D, Anderton SM (2002): B cells regulate autoimmunity by provision of IL-10. *Nat Immunol* 3, 944–950
- Flachenecker P, Stuke K, Elias W, Freidel M, Haas J, Pitschnau-Michel D, Schimrigk S, Zettl UK, Rieckmann P (2008): Multiple Sclerosis Registry in Germany. *Dtsch Arztebl Int* 105, 113–119
- Frischer JM, Bramow S, Dal-Bianco A, Lucchinetti CF, Rauschka H, Schmidbauer M, Laursen H, Sorensen PS, Lassmann H (2009): The relation between inflammation and neurodegeneration in multiple sclerosis brains. *Brain* 132, 1175–1189
- Gelfand JM, Cree BAC, Hauser SL (2017): Ocrelizumab and Other CD20+ B-Cell-Depleting Therapies in Multiple Sclerosis. *Neurotherapeutics* 14, 835–841
- Gholamzad M, Ebtekar M, Ardestani MS, Azimi M, Mahmodi Z, Mousavi MJ, Aslani S (2018): A comprehensive review on the treatment approaches of multiple sclerosis: currently and in the future. *Inflamm Res* 68, 25–38
- Gottesberge AM zum, Koburg E (1967): Die Tonsille Als Lymphozytäres Organ. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 63, 229–237
- Greenfield AL, Hauser SL (2018): B-cell Therapy for Multiple Sclerosis: Entering an era. *Ann Neurol* 83, 13–26
- Grützke B, Hucke S, Gross CC, Herold MVB, Posevitz-Fejfar A, Wildemann BT, Kieseier BC, Dehmel T, Wiendl H, Klotz L (2015): Fingolimod treatment promotes regulatory phenotype and function of B cells. *Ann Clin Transl Neurol* 2, 119–130
- Haines JD, Inglese M, Casaccia P (2011): Axonal Damage in Multiple Sclerosis. *Mt Sinai J Med J Transl Pers Med* 78, 231–243
- Handel AE, Williamson AJ, Disanto G, Handunnetthi L, Giovannoni G, Ramagopalan SV (2010): An updated meta-analysis of risk of multiple sclerosis following infectious mononucleosis. *PLOS ONE* 5, e12496
- Hartung H-P, Gonsette R, König N, Kwiecinski H, Guseo A, Morrissey SP, Krapf H, Zwingers T (2002): Mitoxantrone in progressive multiple sclerosis: a placebo-controlled, double-blind, randomised, multicentre trial. *Lancet* 360, 2018–2025
- Hauser SL, Waubant E, Arnold DL, Vollmer T, Antel J, Fox RJ, Bar-Or A, Panzara M, Sarkar N, Agarwal S, et al. (2008): B-Cell Depletion with Rituximab in Relapsing–Remitting Multiple Sclerosis. *N Engl J Med* 358, 676–688
- Hauser SL, Bar-Or A, Comi G, Giovannoni G, Hartung H-P, Hemmer B, Lublin F, Montalban X, Rammohan KW, Selmaj K, et al. (2017): Ocrelizumab versus Interferon Beta-1a in Relapsing Multiple Sclerosis. *N Engl J Med* 376, 221–234

- Henderson APD, Barnett MH, Parratt JDE, Prineas JW (2009): Multiple sclerosis: Distribution of inflammatory cells in newly forming lesions. *Ann Neurol* 66, 739–753
- Henze T, Rieckmann P, Toyka KV, Multiple Sclerosis Therapy Consensus Group of the German Multiple Sclerosis Society (2006): Symptomatic treatment of multiple sclerosis. Multiple Sclerosis Therapy Consensus Group (MSTCG) of the German Multiple Sclerosis Society. *Eur Neurol* 56, 78–105
- Hintzen RQ, van Lier RenéAW, Kuijpers KC, Baars PA, Schaasberg W, Lucas CJ, Polman CH (1991): Elevated levels of a soluble form of the T cell activation antigen CD27 in cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients. *J Neuroimmunol* 35, 211–217
- Hof M, Fidler V, Hutterer R: Basics of Fluorescence Spectroscopy in Biosciences. In: Hof M, Hutterer R, Fidler V (Hrsg.): *Fluorescence Spectroscopy in Biology*. Band 3; Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg 2005, 3–29
- Høglund RA, Polak J, Vartdal F, Holmøy T, Lossius A (2018): B-cell composition in the blood and cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients treated with dimethyl fumarate. *Mult Scler Relat Disord* 26, 90–95
- Holstiege J, Steffen A, Goffrier B, Bätzing J (2017): Epidemiologie der Multiplen Sklerose – Eine populationsbasierte deutschlandweite Studie. *Versorgungsatlas Bericht Nr. 17/09*, 1–16
- Horowski R (2002): Multiple sclerosis and interferon β -1b, past, present and future. *Clin Neurol Neurosurg* 104, 259–264
- Iwata Y, Matsushita T, Horikawa M, DiLillo DJ, Yanaba K, Venturi GM, Szabolcs PM, Bernstein SH, Magro CM, Williams AD, et al. (2011): Characterization of a rare IL-10–competent B-cell subset in humans that parallels mouse regulatory B10 cells. *Blood* 117, 530–541
- Janewa CA, Travers P, Walport M, Shlomchik MJ (Hrsg.): The structure of a typical antibody molecule. In: *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*. 5. Auflage; Garland Science, New York 2001
- Jangi S, Gandhi R, Cox LM, Li N, von Glehn F, Yan R, Patel B, Mazzola MA, Liu S, Glanz BL, et al. (2016): Alterations of the human gut microbiome in multiple sclerosis. *Nat Commun* 7, 12015
- Johnson KP, Brooks BR, Cohen JA, Ford CC, Goldstein J, Lisak RP, Myers LW, Panitch HS, Rose JW, Schiffer RB (1995): Copolymer 1 reduces relapse rate and improves disability in relapsing-remitting multiple sclerosis: results of a phase III multicenter, double-blind placebo-controlled trial. The Copolymer 1 Multiple Sclerosis Study Group. *Neurology* 45, 1268–1276
- Kappos L, Radue E-W, O'Connor P, Polman C, Hohlfeld R, Calabresi P, Selmaj K, Agoropoulou C, Leyk M, Zhang-Auberson L, Burtin P (2010): A Placebo-Controlled Trial of Oral Fingolimod in Relapsing Multiple Sclerosis. *N Engl J Med* 362, 387–401
- Kappos L, Li D, Calabresi PA, O'Connor P, Bar-Or A, Barkhof F, Yin M, Leppert D, Glanzman R, Tinbergen J, Hauser SL (2011): Ocrelizumab in relapsing-remitting multiple sclerosis: a phase 2, randomised, placebo-controlled, multicentre trial. *Lancet* 378, 1779–1787

- Kappos L, Hartung H-P, Freedman MS, Boyko A, Radü EW, Mikol DD, Lamarine M, Hyvert Y, Freudensprung U, Plitz T, et al. (2014): Atacept in multiple sclerosis (ATAMS): a randomised, placebo-controlled, double-blind, phase 2 trial. *Lancet Neurol* 13, 353–363
- Kieseier BC, Stüve O (2011): A critical appraisal of treatment decisions in multiple sclerosis—old versus new. *Nat Rev Neurol* 7, 255–262
- Kingwell E, Marriott JJ, Jetté N, Pringsheim T, Makhani N, Morrow SA, Fisk JD, Evans C, Béland SG, Kulaga S, et al. (2013): Incidence and prevalence of multiple sclerosis in Europe: a systematic review. *BMC Neurol* 13, 128
- Knippenberg S, Peelen E, Smolders J, Thewissen M, Menheere P, Cohen Tervaert JW, Hupperts R, Damoiseaux J (2011): Reduction in IL-10 producing B cells (Breg) in multiple sclerosis is accompanied by a reduced naïve/memory Breg ratio during a relapse but not in remission. *J Neuroimmunol* 239, 80–86
- Krumbholz M, Theil D, Derfuss T, Rosenwald A, Schrader F, Monoranu C-M, Kalled SL, Hess DM, Serafini B, Aloisi F, et al. (2005): BAFF is produced by astrocytes and up-regulated in multiple sclerosis lesions and primary central nervous system lymphoma. *J Exp Med* 201, 195–200
- Krumbholz M, Derfuss T, Hohlfeld R, Meinl E (2012): B cells and antibodies in multiple sclerosis pathogenesis and therapy. *Nat Rev Neurol* 8, 613–623
- Kurtzke JF (1983): Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: An expanded disability status scale (EDSS). *Neurology* 33, 1444–1444
- LeBien TW, Tedder TF (2008): B lymphocytes: how they develop and function. *Blood* 112, 1570–1580
- Lehmann-Horn K, Schleich E, Hertenberg D, Hapfelmeier A, Kümpfel T, Bubnoff N von, Hohlfeld R, Berthele A, Hemmer B, Weber MS (2011): Anti-CD20 B-cell depletion enhances monocyte reactivity in neuroimmunological disorders. *J Neuroinflammation* 8, 146
- Lehmann-Horn K, Kinzel S, Weber MS (2017): Deciphering the Role of B Cells in Multiple Sclerosis—Towards Specific Targeting of Pathogenic Function. *Int J Mol Sci* 18, 2048
- Li R, Patterson KR, Bar-Or A (2018): Reassessing B cell contributions in multiple sclerosis. *Nat Immunol* 19, 696–707
- Lichtman JW, Conchello J-A (2005): Fluorescence microscopy. *Nat Methods* 2, 910–919
- Lucchinetti C, Brück W, Parisi J, Scheithauer B, Rodriguez M, Lassmann H (2000): Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination. *Ann Neurol* 47, 707–717
- Mackay F, Schneider P, Rennert P, Browning J (2003): BAFF and APRIL: A Tutorial on B Cell Survival. *Annu Rev Immunol* 21, 231–264
- Malavasi F, Deaglio S, Funaro A, Ferrero E, Horenstein AL, Ortolan E, Vaisitti T, Aydin S (2008): Evolution and Function of the ADP Ribosyl Cyclase/CD38 Gene Family in Physiology and Pathology. *Physiol Rev* 88, 841–886

- Menge T, Kieseier BC, Warnke C, Aktas O, Hartung H-P (2012): Alemtuzumab: eine weitere Chance zur Therapie der Multiplen Sklerose. *Nervenarzt* 83, 487–501
- Molnarfi N, Schulze-Toppfhoﬀ U, Weber MS, Patarroyo JC, Prod'homme T, Varrin-Doyer M, Shetty A, Linington C, Slavin AJ, Hidalgo J, et al. (2013): MHC class II-dependent B cell APC function is required for induction of CNS autoimmunity independent of myelin-specific antibodies. *J Exp Med* 210, 2921–2937
- Montalban X, Hauser SL, Kappos L, Arnold DL, Bar-Or A, Comi G, de Seze J, Giovannoni G, Hartung H-P, Hemmer B, et al. (2017): Ocrelizumab versus Placebo in Primary Progressive Multiple Sclerosis. *N Engl J Med* 376, 209–220
- Montalban X, Gold R, Thompson AJ, Otero-Romero S, Amato MP, Chandraratna D, Clanet M, Comi G, Derfuss T, Fazekas F, et al. (2018):ECTRIMS/EAN guideline on the pharmacological treatment of people with multiple sclerosis. *Eur J Neurol* 25, 215–237
- Moreno MA, Or-Geva N, Aftab BT, Khanna R, Croze E, Steinman L, Han MH (2018): Molecular signature of Epstein-Barr virus infection in MS brain lesions. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflammation* 5, e466
- MSTKG (1999): Immunmodulatorische Stufentherapie der multiplen Sklerose der MSTKG (Multiple Sklerose Therapie Konsensus Gruppe). *Nervenarzt* 70, 371–386
- Mulero P, Midaglia L, Montalban X (2018): Ocrelizumab: a new milestone in multiple sclerosis therapy. *Ther Adv Neurol Disord* 11, 1–6
- Murray TJ (2009): The history of multiple sclerosis: the changing frame of the disease over the centuries. *J Neurol Sci* 277, 3–8
- Nave H, Gebert A, Pabst R (2001): Morphology and immunology of the human palatine tonsil. *Anat Embryol (Berl)* 204, 367–373
- Oh J, Vidal-Jordana A, Montalban X (2018): Multiple sclerosis: clinical aspects. *Curr Opin Neurol* 31, 752–759
- Okuda DT, Srinivasan R, Oksenberg JR, Goodin DS, Baranzini SE, Beheshtian A, Waubant E, Zamvil SS, Leppert D, Qualley P, et al. (2009): Genotype–Phenotype correlations in multiple sclerosis: HLA genes influence disease severity inferred by 1HMR spectroscopy and MRI measures. *Brain* 132, 250–259
- Owens GP, Bennett JL, Lassmann H, O'Connor KC, Ritchie AM, Shearer A, Lam C, Yu X, Birlea M, DuPree C, et al. (2009): Antibodies produced by clonally expanded plasma cells in multiple sclerosis cerebrospinal fluid. *Ann Neurol* 65, 639–649
- Palanichamy A, Jahn S, Nickles D, Derstine M, Abounasr A, Hauser SL, Baranzini SE, Leppert D, von Büdingen H-C (2014): Rituximab efficiently depletes increased CD20-expressing T cells in multiple sclerosis patients. *J Immunol Baltim Md 1950* 193, 580–586
- Patsopoulos NA (2018): Genetics of Multiple Sclerosis: An Overview and New Directions. *Cold Spring Harb Perspect Med* 8, a028951
- Patsopoulos NA, de Bakker PIW (2011): Genomewide meta-analysis identifies novel multiple sclerosis susceptibility loci. *Ann Neurol* 70, 897–912

- Pender MP, Greer JM (2007): Immunology of multiple sclerosis. *Curr Allergy Asthma Rep* 7, 285–292
- Petereit HF, Moeller-Hartmann W, Reske D, Rubbert A (2008): Rituximab in a patient with multiple sclerosis – effect on B cells, plasma cells and intrathecal IgG synthesis. *Acta Neurol Scand* 117, 399–403
- Polman CH, O'Connor PW, Havrdova E, Hutchinson M, Kappos L, Miller DH, Phillips JT, Lublin FD, Giovannoni G, Wajgt A, et al. (2006): A randomized, placebo-controlled trial of natalizumab for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med* 354, 899–910
- Polman CH, Reingold SC, Banwell B, Clanet M, Cohen JA, Filippi M, Fujihara K, Havrdova E, Hutchinson M, Kappos L, et al. (2011): Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 Revisions to the McDonald criteria. *Ann Neurol* 69, 292–302
- Rivers TM, Schwentker FF (1935): Encephalomyelitis accompanied by myelin destruction experimentally produced in monkeys. *J Exp Med* 61, 689–702
- Rivers TM, Sprunt DH, Berry GP (1933): Observations on attempts to produce acute disseminated encephalomyelitis in monkeys. *J Exp Med* 58, 39–53
- Sabatino JJ, Zamvil SS, Hauser SL (2018): B-Cell Therapies in Multiple Sclerosis. *Cold Spring Harb Perspect Med* 19, a032037
- Schilling S, Linker RA, König FB, Koziolok M, Bähr M, Müller GA, Paulus W, Gärtner J, Brück W, Chan A, Gold R (2006): Plasmaaustausch bei steroidresistenten Multiple-Sklerose-Schüben. *Nervenarzt* 77, 430–438
- Schuh E, Berer K, Mulazzani M, Feil K, Meinel I, Lahm H, Krane M, Lange R, Pfannes K, Subklewe M, et al. (2016): Features of Human CD3+CD20+ T Cells. *J Immunol* 206, 197
- Serafini B, Rosicarelli B, Magliozzi R, Stigliano E, Aloisi F (2004): Detection of Ectopic B-cell Follicles with Germinal Centers in the Meninges of Patients with Secondary Progressive Multiple Sclerosis. *Brain Pathol* 14, 164–174
- Stangel M, Fredrikson S, Meinel E, Petzold A, Stüve O, Tumani H (2013): The utility of cerebrospinal fluid analysis in patients with multiple sclerosis. *Nat Rev Neurol* 9, 267–276
- Stokes GG (1852): On the change of refrangibility of light. *Philos Trans R Soc Lond* 142, 463–562
- Suhling K, Hirvonen LM, Levitt JA, Chung P-H, Tregidgo C, Le Marois A, Rusakov DA, Zheng K, Ameer-Beg S, Poland S, et al. (2015): Fluorescence lifetime imaging (FLIM): Basic concepts and some recent developments. *Med Photonics* 27, 3–40
- Syed YY (2018): Ocrelizumab: A Review in Multiple Sclerosis. *CNS Drugs* 32, 883–890
- Thompson AJ, Banwell BL, Barkhof F, Carroll WM, Coetzee T, Comi G, Correale J, Fazekas F, Filippi M, Freedman MS, et al. (2018): Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria. *Lancet Neurol* 17, 162–173
- Thompson SAJ, Jones JL, Cox AL, Compston DAS, Coles AJ (2010): B-Cell Reconstitution and BAFF After Alemtuzumab (Campath-1H) Treatment of Multiple Sclerosis. *J Clin Immunol* 30, 99–105

- Trapp BD, Vignos M, Dudman J, Chang A, Fisher E, Staugaitis SM, Battapady H, Mork S, Ontaneda D, Jones SE, et al. (2018): Cortical neuronal densities and cerebral white matter demyelination in multiple sclerosis: a retrospective study. *Lancet Neurol* 17, 870–884
- van Munster CEP, Jonkman LE, Weinstein HC, Uitdehaag BMJ, Geurts JJG (2015): Gray matter damage in multiple sclerosis: Impact on clinical symptoms. *Neuroscience* 303, 446–461
- Verboogen DRJ, González Mancha N, ter Beest M, van den Bogaart G (2017): Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy reveals rerouting of SNARE trafficking driving dendritic cell activation. *eLife* 6, e23525
- Veroni C, Serafini B, Rosicarelli B, Fagnani C, Aloisi F (2018): Transcriptional profile and Epstein-Barr virus infection status of laser-cut immune infiltrates from the brain of patients with progressive multiple sclerosis. *J Neuroinflammation* 15, 18
- Vollenhoven RF van, Fleischmann RM, Furst DE, Lacey S, Lehane PB (2015): Longterm Safety of Rituximab: Final Report of the Rheumatoid Arthritis Global Clinical Trial Program over 11 Years. *J Rheumatol* 42, 1761–1766
- von Rindfleisch E (1863): Histologisches Detail zu der grauen Degeneration von Gehirn und Rückenmark. (Zugleich ein Beitrag zu der Lehre von der Entstehung und Verwandlung der Zelle.). *Arch Für Pathol Anat Physiol Für Klin Med* 26, 474–483
- Wang H, Wang K, Zhong X, Qiu W, Dai Y, Wu A, Hu X (2012): Cerebrospinal Fluid BAFF and APRIL Levels in Neuromyelitis Optica and Multiple Sclerosis Patients During Relapse. *J Clin Immunol* 32, 1007–1011
- Weber MS, Prod'homme T, Patarroyo JC, Molnarfi N, Karnezis T, Lehmann-Horn K, Danilenko DM, Eastham-Anderson J, Slavin AJ, Linington C, et al. (2010): B-cell activation influences T-cell polarization and outcome of anti-CD20 B-cell depletion in central nervous system autoimmunity. *Ann Neurol* 68, 369–383
- Weers M de, Tai Y-T, Veer MS van der, Bakker JM, Vink T, Jacobs DCH, Oomen LA, Peipp M, Valerius T, Slootstra JW, et al. (2011): Daratumumab, a Novel Therapeutic Human CD38 Monoclonal Antibody, Induces Killing of Multiple Myeloma and Other Hematological Tumors. *J Immunol* 186, 1840–1848
- Weinshenker BG (1998): The natural history of multiple sclerosis: update 1998. *Semin Neurol* 18, 301–307
- Wingerchuk DM (2006): Multiple sclerosis disease-modifying therapies: adverse effect surveillance and management. *Expert Rev Neurother* 6, 333–346
- Wong YYM, van der Vuurst de Vries RM, van Pelt ED, Ketelslegers IA, Melief M-J, Wierenga AF, Catsman-Berrevoets CE, Neuteboom RF, Hintzen RQ (2018): T-cell activation marker sCD27 is associated with clinically definite multiple sclerosis in childhood-acquired demyelinating syndromes. *Mult Scler J* 24, 1715–1724
- Wouters FS, Esposito A (2008): Quantitative analysis of fluorescence lifetime imaging made easy. *HFSP J* 2, 7–11

- Ziemssen T, Arnold DL, Bar-Or A, Comi G, Hartung HP, Hauser SL, Kappos L, Lublin F, Selmaj K, Traboulsee A, et al. (2017): P 1 Effect of ocrelizumab on magnetic resonance imaging markers of neurodegeneration in patients with relapsing multiple sclerosis – analysis of the phase III, double-blind, double-dummy, interferon beta-1a- controlled OPERA I and OPERA II studies. *Clin Neurophysiol* 128, e326
- Zola H, Swart B, Nicholson I, Aasted B, Bensussan A, Boumsell L, Buckley C, Clark G, Drbal K, Engel P, et al. (2005): CD molecules 2005: human cell differentiation molecules. *Blood* 106, 3123–3126
- Gray H. <https://www.bartleby.com/107/illus1027.html>; Zugriff am 11.10.2018
- Kalan. <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:HueScale.svg>; Zugriff am 07.02.2021

Danksagung

Während dieses Projektes habe ich viel über das Erstellen einer wissenschaftlichen Arbeit gelernt: Begonnen mit der Projektplanung über die Umsetzung bis hin zur Einbettung in den klinischen Kontext. Ich durfte mir die nötigen Arbeitsschritte zum Anfertigen von Immunfluoreszenzfärbungen selbst erarbeiten. Es hat mir viel Freude bereitet, zu sehen, wie aus den in Paraffin eingebetteten Tonsillen Immunfluoreszenzschnitte wurden, welche ich dann mit den verschiedenen Mikroskopietechniken aufnehmen konnte. An dieser Stelle möchte ich besonders Dr. G. Bunt danken, die mich mit Immunfluoreszenzfärbungen vertraut gemacht und mich in die verschiedenen Mikroskopietechniken eingewiesen hat.

Nach Erhebung der Rohdaten ging es an die Bildverarbeitung und Analyse, inklusive der Darstellung der Überlagerungseffekte. Hier danke ich vor allem meinem Doktorvater Prof. Dr. F. Wouters für seine ansteckende Begeisterung. Er hat mir die Vorteile von FLIM nahegebracht und mir ein Verständnis für die Abbildungsmöglichkeiten von Lebensdauer vermittelt.

Bereits zu Beginn des Projektes suchte ich die Verbindung und Einbettung der Forschung in den klinischen Kontext. Schon 2015, als ich die ersten Färbungen für die Arbeit anfertigte, faszinierte mich die Neurologie. Durch die Einbettung in den Kontext der MS-Pathologie und die intensive Beschäftigung nicht nur mit der Pathologie, sondern auch den Therapieoptionen dieser Erkrankung, bot sich mir die Möglichkeit dieses spannende Fach intensiver kennen zu lernen. Nicht zuletzt deshalb habe ich mich nach Abschluss meines Studiums für die Neurologie entschieden! Hierfür danke ich meinem Doktorvater Prof. Dr. med. M. Weber, der mich immer wieder mit seinen treffenden metaphorischen Erklärungen beeindruckt. Auch für die Möglichkeit einen Teil meiner Ergebnisse als ePoster bei dem europäischen Kongress für Multiple Sklerose (ECTRIMS) vorstellen zu können, möchte ich mich bedanken.

Es geht also mein herzliches Dankeschön an meine beiden Doktorväter Prof. Dr. F. Wouters und Prof. Dr. med. M. Weber und an Dr. G. Bunt, dafür dass sie mir diese spannende Arbeit ermöglicht haben und mir bei meinen ersten Schritten in der Welt der Wissenschaft zur Seite standen.

