Aus der Klinik für Neurologie mit Experimenteller Neurologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Zur Rolle der IL17-produzierenden Lymphozyten und natürlicher Killerzellen bei der Myasthenia gravis

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Christian Heiko Friedemann

aus Marienberg (Sachsen)

Datum der Promotion: 4. Juni 2021

Inhaltsverzeichnis

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis V

Abkürzungsverzeichnis VII

Zusammenfassung X

Abstract XII

1. Einleitung 1

1.1. Autoimmunkrankheiten 1

1.2. Myasthenia gravis 1

1.2.1. Pathophysiologie 1

1.2.2. Krankheitsbild 3

1.2.3. Kennzeichen einer Autoimmunerkrankung 3

1.2.4. Gebräuchliche Einteilung der Myasthenia gravis in verschiedene Untergruppen 4

1.2.5. Epidemiologie und Prognose 5

1.2.6. Diagnostik 5

1.2.7. Therapie 5

1.3. Beziehung zwischen Myasthenie und Thymus 6

1.4. Interleukin 17-produzierende Zellen bei der Myasthenia gravis 8

1.4.1. Th17-Zellen als Prototyp einer IL17-produzierenden Zelle 8

1.4.2. Th1/Th17-Zellen produzieren IL17 und Interferon γ (IFNγ) 9

1.4.3. CD161 als gemeinsames Merkmal der IL17-produzierenden Zellen 10

1.4.4. CD161 als Typisierungskriterium für $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen 12

1.4.5. Tc17-Zellen sind Teil der $CD8^+CD161^{high}$-Population 13

1.4.6. γδ-T-Zellen sind IL17-Produzenten 15

1.5. Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) bei der Myasthenia gravis 16

1.6. Zielstellung der Arbeit 18

2. Material und Methoden 19

2.1. Material, Reagenzien, Geräte und Software 19

2.2. Patientinnen und Patienten und Kontrollgruppe 23

2.2.1. Auswahl der Patientinnen und Patienten 23

2.2.2. Auswahl der Kontroll-Personen 25

2.3. Verarbeitung der Blutproben 25

2.3.1. Drei Probengruppen 25

2.3.2. Präparation von mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC) und Aufteilung in drei Probengruppen 26

2.3.3. Festlegung der Färbeschemata 27

2.3.4. Färbung der PBMC ohne Wärmeschrankinkubation 28

2.3.5. Stimulation und anschließende Färbung der PBMC 29

2.3.6. Zellzählung im Trucount-Verfahren 30

2.4. Durchflusszytometrische Messung 31
2.5. Auswertung mittels FlowJo-Software 31
2.6. Ausschluss einzelner Patientenproben 32
2.7. Statistik 32
3. Ergebnisse 34
3.1. Häufigkeiten der $CD8^+CD161^{high}$ Effektor-Gedächtniszellen bei Myasthenie-Patienten im Vergleich zu Gesunden 34
3.1.1. $CD8^+CD161^{high}$ Zellen sind bei MG-Patienten in Zahl und Frequenz vermindert 34
3.1.2. $CD8^+CD161^{high}$ Zellzahl ist bei MG-Patienten ohne Thymektomie vermindert 35
3.1.3. $CD8^+CD161^{high}$ Zellen sind bei MG-Patienten unter medikamentöser immunsuppressiver Therapie in Zahl und Frequenz reduziert 36
3.2. Häufigkeiten der Tc17-Zellen bei Myasthenie-Patienten im Vergleich zu Gesunden 40
3.2.1. Gesunde und MG-Patienten zeigen keine signifikant unterschiedliche Tc17-Zellzahl oder -frequenz 41
3.2.2. Tc17-Zellzahl ist bei MG-Patienten ohne Thymektomie vermindert 41
3.2.3. Tc17-Zellzahl und -frequenz sind bei MG-Patienten unter medikamentöser immunsuppressiver Therapie nicht signifikant verändert 42
3.3. Häufigkeiten der $CD4^+CD161^+$ Zellen bei Myasthenie-Patienten im Vergleich zu Gesunden 45
3.3.1. $CD4^+CD161^+$ Zellzahl ist bei MG-Patienten vermindert 45
3.3.2. $CD4^+CD161^+$ Zellzahl ist bei MG-Patienten ohne Thymektomie und bei MG-Patienten mit Thymektomie reduziert 45
3.3.3. $CD4^+CD161^+$ Zellen sind bei MG-Patienten unter medikamentöser immunsuppressiver Therapie in Zahl und Frequenz reduziert 46
3.4. Häufigkeiten der $CD3^+CD8^-IL17^+IFN\gamma^-$ Zellen bei Myasthenie-Patienten im Vergleich zu Gesunden 49
3.4.1. $CD3^+CD8^-IL17^+IFN\gamma^-$ Zellzahl ist bei MG-Patienten vermindert 49
3.4.2. $CD3^+CD8^-IL17^+IFN\gamma^-$ Zellzahl ist bei MG-Patienten ohne Thymektomie vermindert 50
3.4.3. $CD3^+CD8^-IL17^+IFN\gamma^-$ Zellzahl ist bei MG-Patienten unter medikamentöser immunsuppressiver Therapie reduziert 51
3.5. Häufigkeiten der Th1/Th17-Zellen bei Myasthenie-Patienten im Vergleich zu Gesunden 52
3.6. Häufigkeiten der γδ-T-Zellen bei Myasthenie-Patienten im Vergleich zu Gesunden 55
3.7. Häufigkeiten der NK-Zellen bei Myasthenie-Patienten im Vergleich zu Gesunden 58
3.7.1. $CD56^{bright}CD16^{dim}$ Zellen zeigen keine signifikanten Unterschiede in Zellzahl oder -frequenz 58

3.7.2. $CD56^{dim}CD16^{bright}$ Zellen zeigen keine signifikanten Unterschiede der Zellzahl oder -frequenz 62
4. Diskussion 68
4.1. Rolle der $CD8^{+}CD161^{high}$ Zellen bei der MG 69
4.2. Die Bedeutung der Tc17-Zellen für die Pathogenese der MG 71
4.3. Die Bedeutung der Th17-Zellen und deren potentiellen Vorläuferzellen ($CD4^{+}CD161^{+}$ Zellen) für die Pathogenese der MG 74
4.4. Die Rolle der Th1/Th17-Zellen für die MG-Pathogenese 76
4.5. Die Bedeutung der γδ-T-Zellen für die MG-Pathogenese 77
4.6. Die Bedeutung der NK-Zellen für die MG-Pathogenese 78
4.7. Limitationen der vorliegenden Arbeit 81
4.8. Abschließende Betrachtung 82
5. Literaturverzeichnis 85
Eidesstattliche Versicherung 109
Lebenslauf 110
Danksagung 112

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildungen:

Abbildung 1: Darstellung der NKT-Zellgruppen 11
Abbildung 2: Übersicht der genannten Zellen und Angabe der IL17-Produktion 13
Abbildung 3: Übersicht über die Verwendung der Blutproben 26
Abbildung 4a: $CD8^+CD161^{high}$ Zellen 35
Abbildung 4b: $CD8^+CD161^{high}$ Zellen 35
Abbildung 5: $CD8^+CD161^{high}$ Zellen 36
Abbildung 6a: $CD8^+CD161^{high}$ Zellen 37
Abbildung 6b: $CD8^+CD161^{high}$ Zellen 38
Abbildung 6c: $CD8^+CD161^{high}$ Zellen 39
Abbildung 6d: $CD8^+CD161^{high}$ Zellen 40
Abbildung 7a: Tc17- und $IFN\gamma^+$Tc17-Zellen 41
Abbildung 7b: Tc17- und $IFN\gamma^+$Tc17-Zellen 41
Abbildung 8: Tc17-Zellen 42
Abbildung 9a: Tc17-Zellen 43
Abbildung 9b: $IFN\gamma^+$Tc17-Zellen 43
Abbildung 9c: Tc17-Zellen 44
Abbildung 9d: $IFN\gamma^+$Tc17-Zellen 44
Abbildung 10: $CD4^+CD161^+$ Zellen 45
Abbildung 11: $CD4^+CD161^+$ Zellen 46
Abbildung 12a: $CD4^+CD161^+$ Zellen 47
Abbildung 12b: $CD4^+CD161^+$ Zellen 48
Abbildung 12c: $CD4^+CD161^+$ Zellen 49
Abbildung 13: $CD3^+CD8^-IL17^+IFN\gamma^-$ Zellen 50
Abbildung 14: $CD3^+CD8^-IL17^+IFN\gamma^-$ Zellen 51
Abbildung 15: $CD3^+CD8^-IL17^+IFN\gamma^-$ Zellen 52
Abbildung 16a: Th1/Th17-Zellen 53
Abbildung 16b: Th1/Th17-Zellen 53
Abbildung 16c: Th1/Th17-Zellen 53
Abbildung 16d: Th1/Th17-Zellen 53
Abbildung 16e: Th1/Th17-Zellen 54
Abbildung 16f: Th1/Th17-Zellen 54
Abbildung 17a: γδ-T-Zellen 56
Abbildung 17b: γδ-T-Zellen 56

Abbildung 17c: γδ-T-Zellen 56
Abbildung 17d: γδ-T-Zellen 56
Abbildung 17e: γδ-T-Zellen 57
Abbildung 17f: γδ-T-Zellen 57
Abbildung 18a: $CD56^{bright}CD16^{dim}$ Zellen 59
Abbildung 18b: $CD56^{bright}CD16^{dim}$ Zellen 59
Abbildung 18c: $CD56^{bright}CD16^{dim}$ Zellen 59
Abbildung 18d: $CD56^{bright}CD16^{dim}$ Zellen 60
Abbildung 18e: $CD56^{bright}CD16^{dim}$ Zellen 61
Abbildung 18f: $CD56^{bright}CD16^{dim}$ Zellen 62
Abbildung 19a: $CD56^{dim}CD16^{bright}$ Zellen 63
Abbildung 19b: $CD56^{dim}CD16^{bright}$ Zellen 63
Abbildung 20a: $CD56^{dim}CD16^{bright}CD62L^{+}$ Zellen 64
Abbildung 20b: $CD56^{dim}CD16^{bright}CD62L^{-}$ Zellen 65
Abbildung 20c: $CD56^{dim}CD16^{bright}CD62L^{-}$ Zellen 65
Abbildung 21a: $CD56^{dim}CD16^{bright}$ Zellen 66
Abbildung 21b: $CD56^{dim}CD16^{bright}$ Zellen 67

Tabellen:

Tabelle 1: Material, Reagenzien, Geräte und Software 19
Tabelle 2: Aufstellung der Patientinnen und Patienten 24
Tabelle 3: Färbeschemata 27
Tabelle 4: Zahl der geeigneten Proben 32
Tabelle 5: Korezeptorexpression der γδ-T-Zellen 55

Abkürzungsverzeichnis

AChI	Acetylcholinesterase-Inhibitoren
AChR-Ak	Acetylcholinrezeptor-Autoantikörper
ADCC	antibody dependent cell-mediated cytotoxicity (antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität)
AIRE	autoimmune regulator (Autoimmunregulator)
APC	Allophycocyanin
Ak	Autoantikörper
Aza	Azathioprin
BFA	Brefeldin A
BSA	bovine serum albumin (bovines Serumalbumin)
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
CCR7	CC chemokine receptor 7 (Cystein-Cystein Chemokinrezeptor 7)
CD	cluster of differentiation (Unterscheidungsgruppe)
CO_2	Kohlenstoffdioxid
Cy	Cyanin; Cy ist eine Handelsmarke von Amersham Biosciences Limited, Buckinghamshire, Vereinigtes Königreich
DAPI	4′, 6-Diamidin-2-phenylindol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPBS	Dulbecco's phosphate-buffered saline (Dulbeccos phosphatgepufferte Salzlösung)
EAMG	experimentelle autoimmune Myasthenia gravis
ED	Erstdiagnose
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetraacetat
EOMG	early onset myasthenia gravis (Myasthenia gravis mit frühem Beginn)
FACS	fluorescence activated cell sorting (fluoreszenzaktivierte Zellsortierung); geschützte Handelsmarke von Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, 07417 USA
Fc	crystallisable fragment (kristallisierbares Fragment)
Fcγ RIII	Fc fragment of IgG receptor III (Fc-Fragment des IgG-Rezeptor III)
FCS	fetal calf serum (fetales Kälberserum)

FITC	Fluoresceinisothiocyanat
g	mittlere Erdbeschleunigung
GCS	Glukokortikosteroide
G-CSF	granulocyte-colony stimulating factor (Granulozyten-Kolonie-stimulierender Faktor)
GM-CSF	granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierender Faktor)
H7	Hilite7 (Analogon zu Cy, siehe oben)
IFNγ	Interferon γ
IgG	Immunglobulin Gamma
IL	Interleukin
LOMG	late onset myasthenia gravis (Myasthenia gravis mit spätem Beginn)
LRP4	low-density lipoprotein receptor-related Protein 4 (gering dichtes Lipoproteinrezeptor-verwandtes Protein 4)
MAIT	mucosa associated invariant T cells (mukosaassoziierte invariante T-Zellen)
MAMG	Anti-MuSK-Autoantikörper-assoziierte Myasthenia gravis
MG	Myasthenia gravis
MGFA	Myasthenia Gravis Foundation of America (amerikanische Myasthenia gravis Stiftung)
MHC	major histocompatibility complex (Haupthistokompatibilitätskomplex)
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimol
MR1	major histocompatibility complex class I-related molecule (Haupthistokompatibilitätskomplex-Klasse 1-ähnliches Molekül)
mRNA	messenger ribonucleic acid (Boten-Ribonukleinsäure)
MTX	Methotrexat
MuSK	muskelspezifische Tyrosinkinase
Na^+	Natriumion
NaOH	Natriumhydroxid
NCAM	neural cell adhesion molecule (neurales Zelladhäsionsmolekül)

n	Anzahl der Proben
ng	Nanogramm
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
NKT-Zellen	natürliche Killer-T-Zellen
p	probability-value (Signifikanzwert)
PBMC	peripheral blood mononuclear cells (mononukleäre Zellen des peripheren Blutes)
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin-chlorophyll
PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Acetat
P/S	Penicillin-Streptomycin
RNA	Ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
ROR	retinoic acid receptor-related orphan receptor (Retinsäurerezeptor-verwandter Orphan-Rezeptor)
TAMG	Thymom-assoziierte Myasthenia gravis
Tbet	T-box expressed in T cells (T-box exprimiert in T-Zellen)
TCR	T-Zell-Rezeptor
TGFβ	transforming growth factor β (transformierender Wachstumsfaktor β)
Th	T-Helfer-Zelle
TNF	Tumornekrosefaktor
Vδ1-3	Variante δ1-3
VLE-RPMI	very low endotoxin-Roswell Park Memorial Institute (endotoxinarmes Nährmedium)
ZNS	zentrales Nervensystem
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter

Zusammenfassung

Die Myasthenia gravis (MG) ist eine Autoimmunerkrankung, die durch eine abnorme Schwäche der Willkürmuskulatur gekennzeichnet ist. Bei den meisten Patienten lassen sich Autoantikörper gegen den Acetylcholinrezeptor der postsynaptischen Membran oder andere Komponenten der neuromuskulären Endplatte nachweisen, welche dann zu einer Störung der neuromuskulären Erregungsübertragung führen. Als möglicher Hinweis auf eine pathophysiologische Rolle wurde im Blut von MG-Patienten ein erhöhter Spiegel des Botenstoffes Interleukin 17 (IL17) nachgewiesen. Außerdem lässt sich im Gegensatz zu Wild-Typ-Mäusen in Mäusen, die kein IL17 produzieren können, keine experimentelle autoimmune Myasthenia gravis (EAMG) auslösen. Im gleichen Mausmodell konnte gezeigt werden, dass eine EAMG nach Depletion von natürlichen Killer-Zellen (NK-Zellen) nicht nur seltener, sondern auch nur mit deutlich verminderter Krankheitsschwere induziert werden kann. Für die vorliegende Arbeit ergeben sich somit folgende Hypothesen: 1. Im Blut von MG-Patienten lassen sich im Gegensatz zu Gesunden vermehrt IL17-produzierende Zellen und NK-Zellen nachweisen. 2. Immunmodulierende Therapie, wie immunsuppressive Medikamente oder eine Thymektomie, nehmen Einfluss auf die Zahl der IL17-produzierenden Zellen oder der NK-Zellen.

Zur Überprüfung der Hypothesen wurden Blutproben von Patienten und gesunden Probanden mittels Fluoreszenzdurchflusszytometrie untersucht, um die Anzahl von IL17-produzierenden Zelltypen, wie Tc17-Zellen, T-Helfer-Zellen (Th17 und Th1/Th17), T-Zellen mit einem γδ-T-Zell-Rezeptor und Subpopulationen von NK-Zellen in beiden Gruppen zu vergleichen.

Für Th17-Zellen fand sich bei MG-Patienten eine geringere Zellzahl als bei Gesunden. Dies ist am ehesten auf den Einfluss der medikamentösen immunsuppressiven Therapie zurückzuführen. Zusätzlich ergaben sich Hinweise darauf, dass eine Thymektomie die Zahl der Th17-Zellen steigert und an die Zahl bei Gesunden annähert. Auch bei Tc17-Zellen scheint die Thymektomie eine Steigerung der Zellzahl und somit eine Annäherung an die Zellzahl bei Gesunden zu bewirken. Die Ergebnisse sprechen dafür, dass Tc17-Zellen möglicherweise eine protektive Funktion im Krankheitsgeschehen der MG einnehmen. Für Th1/Th17-Zellen und für γδ-T-Zellen ergaben sich keine Hinweise auf eine pathophysiologische Funktion dieser Zellen bei der MG. Die Zahl der $CD56^{dim}CD16^{bright}CD62L^{-}$ Zellen, eine

Subpopulation der NK-Zellen, zeigte sich bei den MG-Patienten ohne Thymektomie erhöht. Bei den Patienten nach Thymektomie entsprach die Zellzahl der bei den Gesunden. Dieser Befund kann für eine pathogenetische Rolle dieser NK-Zell-Subpopulation bei der MG sprechen.

Zusammenfassend liefert die vorliegende Arbeit Hinweise darauf, dass Tc17-Zellen und $CD56^{dim}CD16^{bright}CD62L^{-}$ Zellen im Krankheitsverlauf der MG eine wichtige Rolle spielen. Die Zellzahl beider Populationen wird durch eine Thymektomie beeinflusst. Th17-Zellen könnten als Marker für das Ansprechen auf eine immunmodulierende Therapie genutzt werden.

Abstract

Myasthenia gravis (MG) is an autoimmune disease, characterized by abnormal weakness of striated muscles. In most patients autoantibodies against acetylcholine receptor or other parts of the neuromuscular junction are detectable, leading to a disturbance of neuromuscular signal transmission. As possible indication of a pathophysiological role, an elevated level of the messenger substance interleukin 17 (IL17) was found in blood of MG patients. Furthermore, in contrast to wild-type mice, no experimental autoimmune myasthenia gravis (EAMG) can be induced in mice that cannot produce IL17. Also in mouse model it could be shown that EAMG can be induced after depletion of natural killer cells (NK cells) not only more rarely, but also with significantly reduced disease severity. Following hypotheses thus emerged for the present study: 1. In contrast to healthy individuals, blood of MG patients contains an increased number of IL17-producing cells and NK cells. 2. Immunomodulating therapy, like immunosuppressive drugs or thymectomy, influences the number of IL17-producing cells or NK cells.

Therefore, blood samples from patients and healthy donors were examined by flow cytometry to compare the cell amounts of IL17-producing cell types such as Tc17-cells, T-helper cells (Th17 and Th1/Th17), γδ-T-cells and also of NK cells.

A lower cell count was found for Th17-cells in patients than in healthy donors. This is most likely due to the influence of immunosuppressive therapy. In addition, there was evidence that a thymectomy increases the number of Th17-cells and approximates the number in healthy donors. Also for Tc17-cells thymectomy seems to cause an increase in cell count and therefore an approximation to the cell count in healthy individuals. The results suggest that Tc17-cells may have a protective function in MG. For Th1/Th17-cells and for γδ-T-cells there was no evidence for a pathophysiological function in MG. The number of $CD56^{dim}CD16^{bright}CD62L^{-}$ cells, a subpopulation of NK cells, was increased in MG patients without thymectomy. In patients after thymectomy the cell count was the same as in healthy donors. This finding could argue for a pathogenetic role of this NK-cell subpopulation in MG.

In summary, the present work provides evidence that Tc17-cells and $CD56^{dim}CD16^{bright}CD62L^{-}$ cells play an important role in the course of MG. The cell count of both populations is influenced by a thymectomy. Th17-cells could be used as indicator for the response to immunomodulating therapy.

1. Einleitung

1.1. Autoimmunkrankheiten

Von Autoimmunität spricht man, wenn das Immunsystem eine spezifische Immunantwort gegen körpereigene Strukturen ausbildet. Führt dieser Mechanismus zur Entstehung einer Krankheit, so spricht man von einer Autoimmunerkrankung. Hierzu gehören beispielsweise die Rheumatoide Arthritis (Waaler, 2007), der Systemische Lupus erythematodes (Friou et al, 1958), der Diabetes mellitus Typ 1 (Bottazzo et al, 1974; MacCuish et al, 1974), der Morbus Basedow (Kriss et al, 1964) und auch die Myasthenia gravis (MG) (siehe Abschnitt 1.2.3.).
Die Faktoren, die bei Autoimmunerkrankungen zur Entstehung der autoimmunen Reaktion führen, sind nicht vollständig bekannt. Neben genetischen Einflüssen, wie Assoziationen zu bestimmten human leucocyte antigen (HLA)-Varianten (Compston et al, 1980; Todd et al, 1987) und epigenetischen Faktoren, wie Hypo- oder Hypermethylierung der Desoxyribonukleinsäure (Jeffries et al, 2011; Richardson et al, 1990), werden auch Umweltfaktoren diskutiert. Hierzu gehören beispielsweise Erreger, wie Bakterien (Brown et al, 2011; de Goffau et al, 2013) oder Viren (Csuka et al, 2012) aber auch chemische Faktoren, wie Tabakrauch (Formica et al, 2003).

1.2. Myasthenia gravis

1.2.1. Pathophysiologie

Die Myasthenia gravis (griechisch und lateinisch: schwere Muskelschwäche) beruht auf einer Störung der neuromuskulären Erregungsübertragung durch Autoantikörper. Bei mehr als 80 % der MG-Patienten finden sich Antikörper gegen den Acetylcholinrezeptor (Lindstrom et al, 1976). Diese Patienten werden als seropositiv bezeichnet. Bei etwa 70 % der seronegativen Patienten finden sich Autoantikörper gegen die muskelspezifische Tyrosinkinase (MuSK) (Hoch et al, 2001). In der Gruppe der Seronegativen lassen sich jedoch auch andere Antikörper nachweisen. Beispielsweise der Antikörper gegen low-density lipoprotein receptor-related protein 4 (LRP4) (Higuchi et al, 2011) oder Antikörper gegen das Proteoglykan Agrin (Gasperi et al, 2014). Antikörper gegen das Protein Cortactin finden sich sowohl bei

seropositiven, wie auch bei seronegativen MG-Patienten (Gallardo et al, 2014). Durch verschiedene Mechanismen führen diese Antikörper zur Störung der neuromuskulären Erregungsübertragung.

Die Acetylcholinrezeptor-Antikörper (AChR-Ak) bewirken zum einen den vermehrten Abbau und zum anderen einen direkten pharmakologischen Block des Acetylcholinrezeptors (AChR) (Sahashi et al, 1980; Shibuya et al, 1978; Stanley & Drachman, 1978). Somit kann die präsynaptische Ausschüttung von Acetylcholin nur erschwert bzw. nicht mehr zur Depolarisation und konsekutiven Kontraktion der nachgeschalteten Muskelzellen führen, da die Zahl an funktionsfähigen und als Ionenkanal fungierenden, nikotinergen Acetylcholinrezeptoren vermindert ist. Überdies kann die Bindung des Antikörpers auch eine Komplement-vermittelte Lyse der Muskelzelle verursachen (Engel et al, 1977). Eine lokale Inflammation an der neuromuskulären Endplatte mit einer Anhäufung von proinflammatorischen Effektorzellen konnte bei der MG nicht nachgewiesen werden, anstelle dessen wurden Membranangriffskomplexe aus Komplementproteinen gesehen (Nakano & Engel, 1993).

Die Antikörper, die gegen die MuSK gerichtet sind, führen zur Auflösung der sogenannten AChR-Cluster und zu einer verringerten räumlichen Kongruenz von präsynaptischer Nervenendigung und AChR-Cluster (Cole et al, 2008). MuSK ist ein Transmembranprotein des Skelettmuskels, welches im Bereich der motorischen Endplatte in der postsynaptischen Membran lokalisiert ist (Valenzuela et al, 1995). Das während der Pränatalphase von der präsynaptischen Nervenendigung ausgeschüttete Proteoglykan Agrin bindet postsynaptisch an das Protein LRP4. Dieses bildet daraufhin mit MuSK einen Komplex und aktiviert MuSK (Kim et al, 2008; Zhang et al, 2008). MuSK vermittelt nun eine Reihe von Funktionen, die für die Entstehung einer funktionierenden motorischen Endplatte wichtig sind. Hierzu gehört die Gruppierung, das sogenannte Clustering, der Acetylcholinrezeptoren im postsynaptischen Bereich der motorischen Endplatte (DeChiara et al, 1996). Das Clustering ist für die neuromuskuläre Erregungsübertragung unabdingbar, da hierdurch eine ausreichende Sensitivität der postsynaptischen Membran für den Neurotransmitter Acetylcholin sichergestellt wird (Fertuck & Salpeter, 1976). Für eine Clusterbildung der AChR ist jedoch nicht nur MuSK von Nöten. Auch die zytoplasmatischen Proteine downstream of kinase 7 (Dok7) und Rapsyn sind hierfür essentiell. Dok7 aktiviert die MuSK und Rapsyn ist für die Verankerung der AChR im

Zytoskelett verantwortlich (Gautam et al, 1995; Okada et al, 2006). So wie MuSK bereits vor der Geburt für die Ausbildung einer funktionsfähigen neuromuskulären Synapse benötigt wird, scheint sie auch im reifen Organismus für die Aufrechterhaltung einer funktionsfähigen neuromuskulären Verbindung wichtig zu sein (Cole et al, 2008; DeChiara et al, 1996).
Antikörper gegen LRP4 stören die Interaktion von LRP4 und Agrin (Higuchi et al, 2011). Auch Cortactin scheint für die Clusterbildung der Acetylcholinrezeptoren unabdingbar zu sein, die klinische Relevanz des Antikörpers ist jedoch noch unklar (Cortes-Vicente et al, 2016; Madhavan et al, 2009).

1.2.2. Krankheitsbild

Als Folge der durch die Antikörper verursachten Störungen tritt bei den betroffenen Patienten eine abnorme Muskelschwäche von unterschiedlicher Intensität und Lokalisation auf. Die Spanne reicht hier von einer reinen okulären Myasthenie, bei der die äußeren Augenmuskeln einschließlich des Musculus levator palpebrae betroffen sind und sich in Form von Lidheberschwäche (Ptosis) und Doppelbildern äußert über eine generalisierte Myasthenie, definiert als jegliche Mitbeteiligung von Gesichts-, Schlund-, Hals/Nacken- und Skelettmuskulatur, bis hin zur sogenannten myasthenen Krise als akute Exazerbation der MG. Diese ist gekennzeichnet durch respiratorische Insuffizienz und die Notwendigkeit der mechanischen Beatmung.

1.2.3. Kennzeichen einer Autoimmunerkrankung

Die MG erfüllt die fünf Kriterien von Drachman und gilt somit als autoantikörpervermittelte Autoimmunerkrankung (Drachman, 1990). Die fünf Kriterien umfassen erstens den Nachweis eines spezifischen Antikörpers, der zweitens mit dem Zielantigen reagiert. Im Falle der MG ist dies der Acetylcholinrezeptor-Antikörper, der an den Acetylcholinrezeptor der muskulären Endplatte bindet (Lindstrom, 1977; Lindstrom et al, 1976). Drittens gehört hierzu die Auslösung der Erkrankung in einem anderen Individuum durch Transfer des Antikörpers oder viertens durch Immunsierung mit dem Antigen. Beides wurde für die Myasthenie in Tierexperimenten nachgewiesen (Patrick & Lindstrom, 1973; Toyka et al, 1977). Zuletzt zählt hierzu die Linderung der Symptome durch Entfernung des Antikörpers.

Auf diesem Prinzip beruht die therapeutische Wirksamkeit der Plasmapherese (Pinching & Peters, 1976).

1.2.4. Gebräuchliche Einteilung der Myasthenia gravis in verschiedene Untergruppen

Die Patienten mit einer autoimmunen MG werden nach epidemiologischen (Alter) und klinischen (Krankheitsverlauf und -manifestation) Aspekten, der Thymushistologie und dem Antikörperstatus in Gruppen unterteilt. Hier spricht man dann zum einen von early und late onset myasthenia gravis (EOMG und LOMG) als Formen der generalisierten MG. Über das Lebensalter, welches beide Gruppen voneinander trennt, besteht jedoch keine Einigkeit. Die Alterstrennung zwischen EOMG und LOMG wurde zunächst von Compston et al. auf das vierzigste Lebensjahr gelegt (Compston et al, 1980). Jedoch wird auch das fünfzigste oder sechzigste Lebensjahr als Unterteilungsgrenze verwendet (Maniaol et al, 2012; Somnier et al, 1991). Des Weiteren grenzt man noch die rein okuläre MG (OMG) von den anderen Manifestationsformen ab. Die okuläre Form der MG generalisiert oft im Verlauf (Bever et al, 1983). Auch die paraneoplastische Thymom-assoziierte MG (TAMG) wird als eigenständige Gruppe geführt und zeigt häufig einen generalisierten Verlauf (Pandit & Rao, 1995). Die MuSK-Antikörper-positive MG stellt eine eigene Gruppe dar und wird als Anti-MuSK-Ak-assoziierte MG oder kurz MAMG bezeichnet, die eher generalisiert verläuft (Hoch et al, 2001). Bei EOMG, LOMG und OMG lassen sich AChR-Ak nachweisen (Compston et al, 1980). Auch die TAMG ist eine AChR-Ak-positive MG, da sich hier bei den meisten Patienten AChR-Ak nachweisen lassen (Oger, 1993). Nur wenige Fälle einer MuSK-Ak-positiven (Ito et al, 2013; Saka et al, 2005) oder doppelt-seronegativen (weder AChR- noch MuSK-Ak) (Maggi et al, 2008; Rigamonti et al, 2011) TAMG wurden beschrieben.

Die Klassifikation der Myasthenia gravis nach dem Vorschlag der amerikanischen Myasthenia gravis Stiftung (Myasthenia gravis foundation, MGFA) kategorisiert Patienten mit gleichen klinischen Charakteristika (Jaretzki et al, 2000). Diese Klassifikation stellt eine Einteilung nach dem maximalen klinischen Schweregrad dar und dient weder der Messung des Behandlungserfolges noch zur Angabe des aktuellen Krankheitsstatus des Patienten.

1.2.5. Epidemiologie und Prognose

Die Prävalenz der MG wird mit einer weltweiten Spanne von 15 bis 179 Fällen in einer Million Einwohnern angegeben (Eaton et al, 2007; Okinaka et al, 1966). Die Inzidenz bewegt sich zwischen 2 bis 21 Neuerkrankungen pro einer Million Einwohner pro Jahr (Aragones et al, 2003; Garland & Clark, 1956). Für beide Geschlechter zeigt sich eine zweigipfelige Altersverteilung der jährlichen Inzidenz der MG. Ein Gipfel liegt dabei in der EOMG-Gruppe bei einem Alter von 20 bis 24 Jahren für Frauen und 10 Jahre später für Männer. Der andere Gipfel findet sich in der Gruppe der LOMG-Patienten bei einem Alter von 70 bis 74 Jahren für Frauen und Männer. Die EOMG tritt häufiger bei Frauen auf (Somnier et al, 1991). Von der LOMG sind häufiger Männer betroffen (Evoli et al, 2000; Grob et al, 1987). In einer Population von einer Million Menschen beträgt die jährliche Mortalität durch MG 1,7 (Somnier et al, 1991). Im Verlauf der Erkrankung entwickelt sich bei den meisten Patienten eine generalisierte Myasthenie. Bei bis zu 25 % der MG-Betroffenen bleibt die MG rein okulär (Robertson et al, 1998). Eine myasthene Krise tritt bei bis zu 27 % der MG-Patienten im Verlauf ihrer Erkrankung auf (Berrouschot et al, 1997). Trotz intensivmedizinischer Behandlung verläuft diese in bis zu 6 % der Fälle tödlich (Varelas et al, 2002). In einer Studie fand man bei 12 %, in einer anderen Studie bei 31 % der MG-Patienten ein Thymom (Compston et al, 1980; Robertson et al, 1998). Bis über 50 % der Thymompatienten haben eine MG (Okumura et al, 1999).

1.2.6. Diagnostik

Die Diagnostik der MG erstreckt sich von der Anamnese und der körperlichen Untersuchung über elektrophysiologische und pharmakologische Tests bis hin zu Autoantikörperdiagnostik und bildgebenden Verfahren zur Klärung der Frage nach einem Thymom. Zur Abgrenzung des Krankheitsbildes zu, je nach Symptomatik, möglichen Differentialdiagnosen kann sich noch weitere Diagnostik anschließen.

1.2.7. Therapie

Zur symptomatischen Basistherapie werden Cholinesterase-Inhibitoren verwendet (Badrising et al, 1996; Mehndiratta et al, 2014; Skeie et al, 2010). Darüber hinaus

kommen, entsprechend der autoimmunen Genese der Erkrankung, immunsuppressive Medikamente zum Einsatz. In erster Linie werden Glukokortikosteroide (Pascuzzi et al, 1984; Schneider-Gold et al, 2005; Skeie et al, 2010) und zur Kortikoideinsparung Azathioprin (Mantegazza et al, 1988; Palace et al, 1998; Skeie et al, 2010) und Mycophenolatmofetil (Hehir et al, 2010) verabreicht. Weitere Alternativen stellen Methotrexat (Heckmann et al, 2011), Ciclosporin A (Hart et al, 2007; Tindall et al, 1993) und Tacrolimus (Nagane et al, 2005) dar. Im Rahmen einer Eskalationstherapie können monoklonale Antikörper, wie beispielsweise Rituximab (Maddison et al, 2011) oder Eculizumab (Howard et al, 2017) eingesetzt oder in seltenen Fällen eine Therapie mit Cyclophosphamid (Drachman et al, 2008) oder eine Stammzelltransplantation (Bryant et al, 2016) durchgeführt werden. Zur Akuttherapie der manifesten myasthenen Krise stehen die Plasmapherese (Gajdos et al, 2002; Pinching & Peters, 1976; Skeie et al, 2010) bzw. Immunadsorption (Kohler et al, 2011) oder intravenöse Immunglobuline (Gajdos et al, 2012; Skeie et al, 2010; Zinman et al, 2007) zur Verfügung. Zusätzlich ist die operative Entfernung des Thymus ein wirksames therapeutisches Verfahren, was in einer randomisierten, kontrollierten klinischen Studie bewiesen werden konnte (Wolfe et al, 2016). Seit Blalock et al. von positiven Effekten einer Thymektomie bei MG-Patienten berichteten, entwickelte sich dieses Verfahren zu einer akzeptierten Therapieoption (Blalock et al, 1941). So ist die Thymektomie empfohlen bei Patienten mit einer generalisierten AChR-Ak-positiven MG. Für Patienten mit einer MuSK-Ak-positiven MG ist eine Thymektomie hingegen nicht empfohlen (Skeie et al, 2010). Begleitende rehabilitative Maßnahmen sind bei der Myasthenie im Allgemeinen angezeigt. (Fregonezi et al, 2005).

1.3. Beziehung zwischen Myasthenie und Thymus

Der Thymus ist ein Organ des oberen Mediastinums. Hier findet die Reifung der T-Lymphozyten statt. Die AChR-Ak-positiven MG-Patienten zeigen typischerweise Auffälligkeiten des Thymus, sodass eine pathogenetische Rolle des Thymus bei der Entstehung der AChR-Ak-positiven MG angenommen wird. Bei Patienten mit EOMG zeigt sich oft eine lymphofollikuläre Hyperplasie mit Keimzentren, in denen eine B-Zell-Vermehrung mit spezifischer Antikörperbildung gegen den AChR stattfindet (Compston et al, 1980; Sims et al, 2001; Strobel et al, 2008). Bei den Patienten mit

einer LOMG zeigt sich die, für ein höheres Lebensalter typische, Atrophie des Immunorgans. Histologisch unterscheidet sie sich jedoch nicht klar von der alterstypischen morphologischen Veränderung des Thymus beim Gesunden (Strobel et al, 2008). Der Rückgang funktionellen Thymusgewebes mit steigendem Lebensalter reicht somit als Erklärung für die Entstehung der LOMG nicht aus.
Die paraneoplastische TAMG zeigt sich im Rahmen einer Thymom-Erkrankung. Verschiedene Pathogenitätsmechanismen führen wohl zur Entstehung der TAMG. Beispielsweise ist in Thymomen die Expression des Gens autoimmune regulator (AIRE) vermindert (Suzuki et al, 2008). Für die Antigenpräsentation im Rahmen der negativen Selektion im Thymus ist AIRE jedoch von Nöten (Anderson et al, 2002), Somit könnte die Abwesenheit in Thymomen zur fehlerhaften zentralen Toleranz und Entstehung von Autoimmunität im Thymus prädisponieren.
Die Vermutung, dass pathologische Veränderungen des Thymus mit der Entstehung der MG zusammenhängen, führte zu der Idee der operativen Entfernung des Thymus als mögliche Therapieoption (siehe Abschnitt 1.2.7.). Zahlreiche Patienten profitieren, in Form von verringerter Symptomatik bis hin zur kompletten Remission, von der Thymektomie (Liu et al, 2013; Wolfe et al, 2016). Auch sind nach der Thymektomie fallende AChR-Ak-Titer feststellbar (Vincent et al, 1983). Jedoch treten sowohl die Verbesserung der Symptome, bis hin zur kompletten Remission, als auch die sinkenden Antikörpertiter oft erst nach Monaten bis Jahren nach der Thymektomie auf. Dies kann sich möglicherweise durch zeitweise Aufrechterhaltung der Immunreaktion durch AChR-Ak-produzierende Zellen außerhalb des Thymus, wie zum Beispiel im Knochenmark, erklären (Fujii et al, 1986). Die Tatsache, dass eine stabile komplette Remission möglich ist, führt zu der Annahme, dass die Entfernung des Thymus, als möglicher Initiator und Unterhalter der pathologischen Immunreaktion, den Anstoß für ein Verschwinden auch der außerhalb des Thymus liegenden Autoantikörperproduktionsstätten geben kann. In der Annahme, dass sich eine Entfernung des Thymus auf die Zahl und Eigenschaften von Immunzellen auswirkt, wurde die Thymektomie als Einteilungskriterium der Patientenproben im Rahmen dieser Arbeit mit einbezogen.

1.4. Interleukin 17-produzierende Zellen bei der Myasthenia gravis

Die Beteiligung verschiedener Zelltypen wurde im Zusammenhang mit Autoimmunerkrankungen und der Myasthenia gravis in der Literatur beschrieben. Im besonderen Interesse der vorliegenden Arbeit stehen Zelltypen, die den Botenstoff Interleukin 17 (IL17) produzieren. Bei Patienten mit MG wurden erhöhte Spiegel von IL17 im Blut nachgewiesen (Roche et al, 2011). Ein erhöhter IL17-Spiegel korreliert mit dem Schweregrad der MG (Xie et al, 2016). Für die experimentelle autoimmune Myasthenia gravis (EAMG), das MG-Krankheitsmodell bei Mäusen, konnte gezeigt werden, dass IL17-produzierende Zellen für die Entstehung der Erkrankung eine essentielle Rolle spielen (Schaffert et al, 2015).

1.4.1. Th17-Zellen als Prototyp einer IL17-produzierenden Zelle

T-Zellen sind jene Lymphozyten, die im Thymus heranreifen und als Teil ihres Antigenrezeptors das Molekül cluster of differentiation (CD) 3 exprimieren. Unter dem Einfluss unterschiedlicher Botenstoffe ist die Differenzierung einer naiven, den Korezeptor CD4 tragenden T-Zelle ($CD4^+$ T-Zelle) in mehrere Zelltypen möglich, die nach ihrem Zytokinmuster unterschieden werden. Solche sogenannten T-Helfer-Zellen (Th) sind beispielsweise Th1, Th2, Th9, Th17 und Th22 (Dardalhon et al, 2008; Del Prete et al, 1991; Eyerich et al, 2009; Harrington et al, 2005; Veldhoen et al, 2008).

Th17-Zellen wurden nach der Expression des Interleukins 17A (im Folgenden nur IL17) benannt und sind unter anderem gekennzeichnet durch die Produktion weiterer IL, wie 17F, 21, 22 sowie durch die Expression des Transkriptionsfaktors retinoic acid receptor-related orphan receptor c (RORc) und des Chemokinrezeptors CCR6 (Acosta-Rodriguez et al, 2007; Annunziato et al, 2007; Chung et al, 2006; Harrington et al, 2005; Nurieva et al, 2007; Park et al, 2005). Th17-Zellen vermitteln als Teil der Immunabwehr vorwiegend proinflammatorische Effekte. Über die Zytokine IL17A und IL17F stimulieren sie unter anderem gewebeständige Effektorzellen (Fibroblasten) zur Ausschüttung von IL6, IL8 und Granulozyten-Kolonie-stimulierendem Faktor (G-CSF) (Fossiez et al, 1996; Hymowitz et al, 2001). IL6 führt beispielsweise zur Differenzierung von B-Lymphozyten zu Immunglobulin-produzierenden Plasmazellen (Kikutani et al, 1985). IL6 vermittelt auch, im Sinne einer positiven Rückkopplung, in

Kombination mit transforming growth factor β (TGFβ) die Differenzierung von naiven $CD4^+$ T-Zellen zu IL17-produzierenden Zellen in Mäusen (Veldhoen et al, 2006). Dies geschieht über die Induktion des Transkriptionsfaktors RORγt (entspricht RORc beim Menschen), der seinerseits die Expression der mRNA für IL17A und IL17F steigert (Ivanov et al, 2006). Th17-Zellen bewirken über die Anregung der Effektorzellen indirekt die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten, denn IL8 ist ein Chemotaxin für diesen Zelltypus und auch G-CSF bewirkt die Mobilisierung von neutrophilen Granulozyten (Morstyn et al, 1988; Yoshimura et al, 1987). Zudem produzieren Th17 Zellen ihrerseits selbst IL8 und können so direkt chemotaktische Wirkung auf neutrophile Granulozyten ausüben (Pelletier et al, 2010). Somit werden Th17-Zellen und vor allem das IL17A als zentrale Akteure in akuten und chronischen Abwehr- und Entzündungsprozessen gesehen. Th17-Zellen werden mit Autoimmunkrankheiten wie Morbus Crohn, Psoriasis und Rheumatoider Arthritis in Verbindung gebracht, da sie in den entzündeten Geweben nachweisbar sind (Kleinschek et al, 2009; Lin et al, 2013; Lowes et al, 2008).
Bei der seropositiven MG fand sich ein Zusammenhang zwischen der Zahl der Th17-Zellen und der Krankheitsschwere (Yi et al, 2020). Außerdem tragen IL17-produzierende $CD4^+$ T-Zellen zur Entstehung der EAMG bei Mäusen bei (Schaffert et al, 2015). Aus diesen Ergebnissen könnte der mögliche therapeutische Ansatz einer IL-17 Blockade abgeleitet werden. Beispielsweise wurde bei der Psoriasis der monoklonale Antikörper gegen IL17A Ixekizumab bereits erfolgreich getestet (Gordon et al, 2016). Für die MG konnte gezeigt werden, dass die Hemmung des Transkriptionsfaktors RORγt den Anteil der Th17-Zellen von MG-Patienten in vitro reduziert. Dies könnte somit eine mögliche Therapieoption darstellen (Yi et al, 2020).

1.4.2. Th1/Th17-Zellen produzieren IL17 und Interferon γ (IFNγ)

IL17A wird auch von B-Zellen und neutrophilen Granulozyten freigesetzt (Bermejo et al, 2013; Ferretti et al, 2003). Zusätzlich findet sich eine $CD4^+$ T-Zellpopulation, die neben IL17 auch IFNγ produziert. Da die Sekretion von IFNγ eigentlich für Th1-Zellen typisch ist, wird dieser Zelltyp Th1/Th17-Zelle genannt (Annunziato et al, 2007; Del Prete et al, 1991). IFNγ ist ein Zytokin mit vielen Funktionen innerhalb des Immunsystems, welches beispielsweise die Expression der major histocompatibility complex-Moleküle (MHC) I und II beeinflusst und somit die Antigenpräsentation

reguliert (King & Jones, 1983). Th1/Th17-Zellen scheinen unter anderem an der Abwehr von Pilzinfektionen beim Menschen beteiligt zu sein, da sich die gleichzeitige Produktion von IL17 und IFNγ durch $CD4^+$ Zellen durch Stimulation mit Candida albicans provozieren lässt (Zielinski et al, 2012). In Th1/Th17-Zellen findet sich der Transkriptionsfaktor T-box expressed in T cells (T-bet) (Annunziato et al, 2007). Dieser ist typisch für Th1-Zellen (Szabo et al, 2000). Andererseits weist die Expression von CCR6 und RORγt durch Th1/Th17-Zellen auf eine enge Verwandtschaft zu Th17-Zellen hin. Auch die Fähigkeit zur Anregung von B-Zellen zur Produktion von Immunglobulinen und zur Expression von Granzym A haben Th1/Th17- mit Th17-Zellen gemein (Annunziato et al, 2007). Die Fähigkeit zur Produktion von Granzym A verdeutlicht das zytotoxische Potential beider Zelllinien. Sowohl Th17- als auch Th1/Th17-Zellen sind im Gegensatz zu Th1- oder Th2-Zellen für die hemmende Wirkung von regulatorischen T-Zellen relativ unempfindlich. Möglicherweise ist dies ein Mechanismus, mit dem diese Zellen die Inflammation bei autoimmunen Erkrankungen aufrechterhalten (Annunziato et al, 2007). Wie in Abschnitt 1.4.1. für IL17 schon erwähnt, wurde auch für IFNγ gezeigt, dass dieser Botenstoff für die Entstehung einer EAMG notwendig ist (Balasa et al, 1997). Entsprechend geht die Verschiebung des Immunzellprofils von Th1/Th17-Zellen hin zu Th2- und regulatorischen T-Zellen bei der EAMG mit einer Verringerung der myasthenen Symptomatik einher (Yang et al, 2010). Für Th1/Th17-Zellen von MG-Patienten wurde nachgewiesen, dass die Hemmung des Transkriptionsfaktors RORγt in vitro den Anteil dieser Zellen reduziert (Yi et al, 2020). Sollte die Hemmung dieses Transkriptionsfaktors als Therapieoption bei der MG eingesetzt werden, sind als unerwünschte Wirkung jedoch beispielsweise vermehrt Pilzinfektionen bei den Behandelten denkbar.

1.4.3. CD161 als gemeinsames Merkmal der IL17-produzierenden Zellen

Alle zur IL17-Produktion fähigen T-Lymphozyten sind innerhalb der CD161-exprimierenden Fraktion zu finden. CD161 wird auf αβ-T-Zell-Rezeptor (αβTCR)-tragenden T-Zellen exprimiert, die entweder CD4 oder CD8 auf ihrer Oberfläche tragen oder CD4/CD8-doppelt negativ sind ($CD4^-CD8^-$). Auch exprimieren $CD4^-CD8^-$ T-Zellen mit einem γδ-T-Zell-Rezeptor (γδTCR) CD161 (siehe Abbildung 2). Für all

diese Zellsubtypen finden sich in Nabelschnurblut naive Vorläuferzellen (Maggi et al, 2010).

CD161 entspricht dem Marker NK1.1 für natürliche Killerzellen der Maus. Entsprechend findet sich CD161 auch beim Menschen auf fast allen natürlichen Killerzellen (Lanier et al, 1994). Für CD161-tragende T-Zellen hat sich daher die Bezeichnung NKT-Zellen (NK1.1 T-Zellen) etabliert. Typische NKT-Zellen interagieren bei der Antigenerkennung über ihren T-Zell-Rezeptor nicht mit MHC-Molekülen auf der Oberfläche anderer Zellen sondern mit dem nicht polymorphen, antigenpräsentierenden CD1d-Molekülen (Bendelac et al, 1995). Diese T-Zell-Rezeptoren sind charakterisiert durch ein sehr eingeschränktes Repertoire der verwendeten α- und β-Ketten (Lantz & Bendelac, 1994). Die Th17-Zellen sind hingegen MHC-restringiert und unterschieden sich auch durch ihren nicht-invarianten T-Zell-Rezeptor von den typischen NKT-Zellen. Aus diesem Grund werden die Th17-Zellen nur als NKT-ähnliche Zellen angesehen (Cosmi et al, 2008) (siehe Abbildung 1). Die Expression von CD161 und letztlich die Differenzierung einer naiven $CD4^+$ T-Zelle zur Th17-Zelle scheinen von der Expression des Transkriptionsfaktors RORc entscheidend abhängig zu sein (Maggi et al, 2010).

Abbildung 1: Darstellung der NKT-Zellgruppen (für Abkürzungen und Erläuterungen siehe Abschnitt 1.4.3.)

CD161 wird eine Rolle bei der transendothelialen Migration der aktivierten T-Zelle zugesprochen und ist wohl auch an der Aktivierung von B-Zellen in Keimzentren beteiligt (Llibre et al, 2016; Poggi et al, 1997). Insofern könnte CD161 bei der Immunreaktion im Rahmen der MG direkt selbst eine Rolle spielen, da aktivierte B-Zellen (Plasmazellen) die Quelle der Autoantiköper darstellen.

1.4.4. CD161 als Typisierungskriterium für $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen

Die Zelloberflächenmoleküle CD4 und CD8 dienen als Korezeptoren bei der Bindung des T-Zell-Rezeptors (TCR) der T-Helfer-Zellen ($CD4^+$) an die MHC II-Moleküle bzw. der zytotoxischen T-Zellen ($CD8^+$) an die MHC I-Moleküle der antigenpräsentierenden Zellen. Die $CD4^+$ T-Zellen und die $CD8^+$ T-Zellen des menschlichen Blutes lassen sich entsprechend ihrer CD161-Expression in unterschiedliche Subgruppen unterteilen (siehe Abbildung 2). Unter den $CD4^+$ gibt es $CD161^-$ und $CD161^+$ Zellen (Takahashi et al, 2006). Zu Letzteren gehören die Th17-Zellen. Diese stellen jedoch nur einen sehr kleinen Anteil von unter 10 % der $CD4^+CD161^+$ Zellen dar (Billerbeck et al, 2010; Cosmi et al, 2008; Maggi et al, 2010). Nach Aktivierung von Lymphozyten verschwindet der Marker CD45RA (eine kleine Isoform einer Protein-Tyrosin-Phosphatase) von der Zelloberfläche und die Expression von CD45R0 (die größere Phosphatasen-Isoform) nimmt zu (Akbar et al, 1988). Aus diesem Zusammenhang resultiert die Nutzung dieser beiden Marker zur Unterscheidung von naiven Zellen im Gegensatz zu aktivierten bzw. Gedächtnis-Zellen, die bereits einmal in Kontakt mit einem Antigen gekommen sind. Von den $CD4^+CD161^+$ Zellen exprimieren circa 97 % zusätzlich den Marker CD45R0 und stellen somit Gedächtniszellen dar (Takahashi et al, 2006). Circa die Hälfte dieser Zellen exprimieren das Adhäsionsmolekül CD62L und den für transendotheliale Migration nötigen Chemokinrezeptor CCR7 und werden somit den central memory-Gedächtniszellen zugeordnet (Sallusto et al, 1999; Takahashi et al, 2006). Auch Th17-Zellen gehören zu den CD45R0+ Zellen (Kryczek et al, 2011). Der größte Anteil der $CD4^+CD161^-$ Zellen besteht aus naiven Zellen ($CD45RA^+$), die ebenfalls CD62L und CCR7 exprimieren (Takahashi et al, 2006).

$CD8^+$ sogenannte zytotoxische T-Zellen (Tc-Zellen) stellen, neben den $CD4^+$ T-Zellen, eine weitere große Gruppe der im Thymus heranreifenden T-Lymphozyten dar (Cerottini et al, 1970a; b; Golstein et al, 1972). Sie wirken weniger als Helfer bei der Immunantwort oder über die Produktion von Zytokinen, wie die $CD4^+$ T-Helfer-Zellen, sondern üben zytotoxische Effekte aus. Zum Beispiel bewirken sie die Zytolyse von virusinfizierten Zellen oder bekämpfen Tumorzellen (Ando et al, 1994; Freedman et al, 1972). Circa ein Fünftel der im Blut zirkulierenden $CD8^+$ Zellen ist $CD161^+$. Hier zeigt sich jedoch eine Besonderheit: Die CD161-Expression ist auf diesen Zellen unterschiedlich stark ausgeprägt. Es können $CD8^+$ Zellen mit geringer

(CD161^{low}) und solche mit hoher CD161-Expression (CD161^{high}) unterschieden werden. Drei Viertel der CD161^{low}-Population und mehr als 90 % der CD161^{high}-Population tragen zusätzlich den Marker CD45R0 und sind somit Gedächtnis-T-Zellen (Merkenschlager & Beverley, 1989; Takahashi et al, 2006). Die Population der CD8^{+}CD161^{-}-Zellen besteht hauptsächlich aus naiven T-Zellen, die nach Aktivierung proliferieren und zur Zytokinproduktion fähig sind (Takahashi et al, 2006).

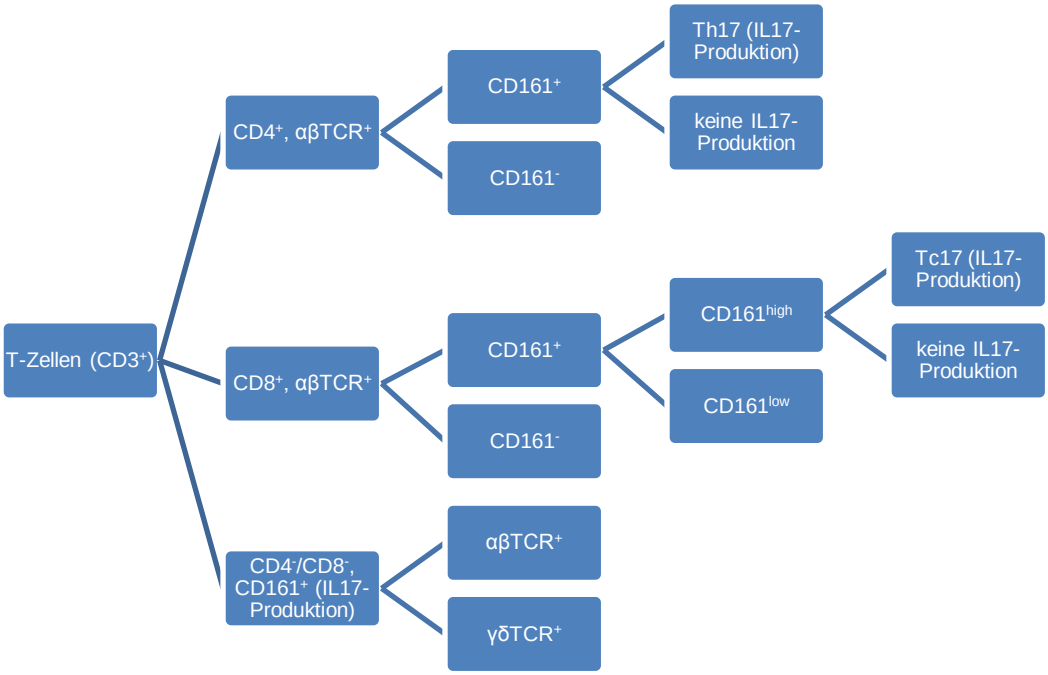


Abbildung 2: Übersicht der in den Abschnitten 1.4.3., 1.4.4. und 1.4.5. genannten Zellen und Angabe der zur IL17-Produktion fähigen Zellen (für Abkürzungen und Erläuterungen siehe Abschnitte 1.4.3., 1.4.4. und 1.4.5.)

1.4.5. Tc17-Zellen sind Teil der CD8^{+}CD161^{high}-Population

CD8^{+}CD161^{high} Zellen konnten nach Stimulation mit murinen Anti-CD3- und Anti-CD28-Antikörpern weder zur Zytokinsekretion noch zur Proliferation angeregt werden. Auch zeigten sie keine zytolytische Aktivität trotz eines hohen Gehaltes an Granzym und Perforin. Aus diesen Gründen wurden sie als terminal differenzierte, anerge Zellen angesehen (Takahashi et al, 2006). Andere Arbeiten revidierten dieses Bild der CD8^{+}CD161^{high} Zellen. Nach Stimulation der Zellproben mit Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA)/Ionomycin konnten CD8^{+}CD161^{high} Zellen sehr wohl zur Sekretion diverser Zytokine (IFNγ, Tumor-Nekrose-Faktor α (TNFα), IL17) angeregt werden (siehe Abbildung 2). Auch zeigten sie eine geringe Fähigkeit zur Proliferation nach unspezifischer Stimulation (Billerbeck et al, 2010; Northfield et al, 2008).

Zusätzlich wurde gezeigt, dass die $CD8^+CD161^{high}$-Population zum größten Teil CD45R0 exprimiert, jedoch kaum CD62L oder CCR7 (Northfield et al, 2008; Takahashi et al, 2006). Somit lässt sich diese Zellpopulation innerhalb der Gruppe der Gedächtniszellen zu den Effektor-Gedächtniszellen zuordnen, die direkt in periphere Gewebe einwandern und zur Zytokinproduktion fähig sind (Sallusto et al, 1999).

Bei Gesunden ist ein kleiner Anteil (4,5 %) der $CD8^+CD161^{high}$ Zellen zur IL17-Produktion fähig. Diese Zellen wurden Tc17-Zellen genannt (siehe Abbildung 2). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass ein Teil der Tc17-Zellen zur Produktion von IFNγ fähig ist (Billerbeck et al, 2010; Kondo et al, 2009). Die $CD8^+CD161^{high}$ Zellen zeigen sonst für Th17-Zellen typische Eigenschaften wie die Expression von RORγt und CCR6 und stellen somit möglicherweise Vorläuferzellen dar, die zu IL17-produzierenden Tc17-Zellen differenzieren können (Billerbeck et al, 2010). Da die IL17-produzierenden Tc17-Zellen aus den $CD8^+CD161^{high}$ Zellen hervorgehen, wurden in der vorliegenden Arbeit beide Zelltypen untersucht.

IL17-produzierende $CD8^+$ Zellen fanden sich beim Menschen im Zusammenhang mit entzündlichen Erkrankungen vermehrt, so zum Beispiel in entzündeten Gelenken bei Rheumatoider Arthritis und Psoriasisarthritis und in aktiven Läsionen im ZNS von Patienten mit multipler Sklerose (Billerbeck et al, 2010; Tzartos et al, 2008). Somit liegt die Vermutung nahe, dass Tc17-Zellen an der akuten Entzündungsreaktion beteiligt sind. Es fanden sich auch Tc17-Zellen in der Leber von Patienten mit einer chronischen Hepatitis C. Hier jedoch vorrangig bei den Patienten mit einer geringen entzündlichen Aktivität, sodass Tc17-Zellen in diesem Zusammenhang eher einen protektiven Effekt zu haben scheinen (Grafmueller et al, 2012).

Bei MG-Patienten wurden Tc17-Zellen in erhöhter Zahl im Blut gefunden (Hosseini et al, 2017). Als potentielle IL17-produzierende Zellen könnte auch die Reduktion der Tc17-Zellen in der MG von therapeutischem Interesse sein. Wie für die Th17- und die Th1/Th17-Zellen gezeigt, konnten auch Tc17-Zellen von MG-Patienten durch Hemmung des Transkriptionsfaktors RORγt in vitro signifikant reduziert werden (Yi et al, 2020).

1.4.6. γδ-T-Zellen sind IL17-Produzenten

Neben jenen T-Zellen, die den αβTCR tragen, finden sich im menschlichen Blut auch Lymphozyten, die stattdessen den sogenannten γδTCR tragen, der aus den gleichnamigen Proteinketten besteht. Diese γδ-T-Zellen exprimieren zum großen Teil weder CD4 noch CD8 und bilden einen Anteil von bis zu 16 % an allen T-Zellen im Blut. Sie finden sich zudem beispielsweise in der Milz, im Darm, im Thymus oder in der Haut (Groh et al, 1989). Das Fehlen der Korezeptoren CD4 und CD8 zeigt, dass viele γδ-T-Zellen im Gegensatz zu αβ-T-Zellen keine MHC-Interaktion zur Antigenerkennung benötigen. Jedoch wurden auch MHC-abhängige γδ-T-Zellaktivierungen für korezeptorpositive Varianten beschrieben (Kozbor et al, 1989). γδ-T-Zellen sind auch in der Lage unkonventionelle Antigene, wie nicht-Protein-Antigene, beispielsweise bakterielle Pyrophosphate, zu erkennen (Tanaka et al, 1995). Zudem können sie zytotoxisch wirken und darüber hinaus zahlreiche Zytokine sezernieren, wie zum Beispiel IL2, IL17, TNFα, IFNγ oder den Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierenden Faktor (GM-CSF) (Martin et al, 2009; Morita et al, 1991).

Entsprechend der Expression bestimmter δ-Ketten des TCR können die γδ-T-Zellen in drei verschiedene Subtypen unterteilt werden. Hier werden die Varianten Vδ1, Vδ2 und Vδ3 unterschieden. Vδ1-T-Zellen finden sich hauptsächlich intraepithelial im Darm und in der Haut und tragen größtenteils auch den Marker CD8 (Deusch et al, 1991). Vδ1-T-Zellen sind in vitro fähig, Melanomzellen zu lysieren (Ebert et al, 2006). Vδ2-T-Zellen finden sich vorrangig im Blut und sind $CD4^-CD8^-$ (Deusch et al, 1991). Vδ2-T-Zellen haben die Fähigkeit, als professionelle antigenpräsentierende Zellen zu agieren (Brandes et al, 2005). Anhand der Marker CD27, einem Vertreter der TNF-Rezeptor-Superfamilie, und CD45RA lassen sich die Vδ2-T-Zellen noch weiter in Subgruppen unterteilen. Hier wird zwischen naiven Zellen ($CD27^+CD45RA^+$, T_{naiv}), zentralen Gedächtniszellen ($CD27^+CD45RA^-$, T_{CM}), Effektor-Gedächtniszellen ($CD27^-CD45RA^-$, T_{EM}), und terminal differenzierten Zellen ($CD27^-CD45RA^+$, T_{EMRA}) unterschieden. T_{naiv}-Zellen und T_{CM}-Zellen finden sich eher in Lymphknoten (keine inflammatorische und zytotoxische Funktion), während T_{EM}- und T_{EMRA}-Zellen eher in entzündeten Geweben vorkommen. Außerdem stellen die vier Subtypen vier Entwicklungsstufen dar. Aus der T_{naiv}-Zelle kann eine T_{CM}-Zelle hervorgehen und aus dieser dann eine T_{EM}- oder T_{EMRA}-Zelle (Caccamo et al, 2005; Dieli et al, 2003). Vδ3-

T-Zellen finden sich hauptsächlich in der Leber und nahezu gar nicht im peripheren Blut (Kenna et al, 2004). γδ-T-Zellen sind potente Inhibitoren der T-Helfer-Zell-Proliferation (Kuhl et al, 2009). γδ-T-Zellen wurden bisher im Zusammenhang mit der MG kaum untersucht. Eine Arbeitsgruppe fand bei MG-Patienten und Gesunden gleiche Anteile dieser Zellen im Blut (Ragheb et al, 1999).

1.5. Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) bei der Myasthenia gravis

NK-Zellen sind große, granulierte Lymphozyten, die circa 10 % der Lymphozyten des peripheren Blutes umfassen (Lanier et al, 1986). Diese Zellen gehören zur angeborenen Immunabwehr. Sie vermitteln die Lyse von Tumor- oder virusinfizierten Zellen und sind in der Lage Zytokine zu sezernieren, wie zum Beispiel lFNγ, lL10, IL13, TNFα, TNFβ oder GM-CSF (Cooper et al, 2001; Ebert et al, 2006; Fitzgerald-Bocarsly et al, 1991; Lanier et al, 1986). Hierdurch kann die NK-Zelle infektiöse Mikroorganismen wirksam bekämpfen und Tumorwachstum verhindern. Die Benennung als natürliche Killerzellen rührt her von der Fähigkeit dieser Zellen gegen eine virusinfizierte oder Tumorzelle vorzugehen, ohne vorher gegen solche sensibilisiert worden zu sein und ohne Vermittlung durch Antikörper. Am ehesten lassen sich NK-Zellen als $CD3^-$ und $CD56^+$ Zellen definieren, das heißt, sie tragen das Molekül CD56 (neurales Zelladhäsionsmolekül (NCAM)) (Lanier et al, 1989). CD56 fungiert möglicherweise als ein Adhäsionsmolekül bei der Bindung an Zielzellen (Nitta et al, 1989). Zusätzlich stellt CD16 (Fcγ RIII) ein weiteres Merkmal der NK-Zelloberfläche dar. Dieses Molekül ist ein niedrig affiner Rezeptor für den Fc-Anteil von Immunglobulin G (IgG) (Perussia et al, 1983). Durch die Bindung an IgG auf einer durch dieses Immunglobulin markierten (körperfremden) Zelle werden zytotoxische Effekte der NK-Zelle aktiviert, die letztlich zur Zerstörung der Zielzelle führen (Anegon et al, 1988). Diese Vorgänge werden als antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität (ADCC) bezeichnet. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass durch eine Querverbindung (Crosslinking) der CD16-Moleküle durch Antigen-Antikörper-Komplexe unter Wirkung von IL2 oder IL12 in den CD56 Zellen eine Apoptose induziert werden kann (Ortaldo et al, 1995). Dieser Mechanismus dient möglicherweise der Begrenzung der Immunreaktion.

Anhand der Expression von CD56 und der CD16 lassen sich die NK-Zellen des Menschen in zwei Gruppen unterteilen. So exprimiert eine Gruppe eine hohe Dichte

an CD56 ($CD56^{bright}$) jedoch wenig bzw. kein CD16 ($CD16^{dim}$ auch $CD16^{neg}$) und stellt circa 10 % der NK-Zellen des peripheren Blutes dar. Die andere Gruppe besteht aus Zellen, die eine geringere CD56-Dichte aufweisen ($CD56^{dim}$), jedoch mehr CD16 exprimieren ($CD16^{bright}$). Diese Zellen umfassen circa 90 % der im Blut zirkulierenden NK-Zellen (Lanier et al, 1986; Nagler et al, 1989). Über die Beziehung beider Zelltypen zueinander besteht noch Unklarheit. Es besteht zum einen die Hypothese, beide Typen könnten unterschiedliche Entwicklungsstadien der NK-Zelle darstellen, wobei angenommen wird, dass die $CD56^{dim}CD16^{bright}$ Zelle die differenziertere Form ist und die $CD56^{bright}CD16^{dim}$ Zelle die Vorläuferzelle darstellt (Nagler et al, 1989). Hierfür spricht, dass die $CD56^{dim}CD16^{bright}$ Zellen zytotoxischer sind als die $CD56^{bright}CD16^{dim}$ Zellen und sich weniger durch IL2, einem von T-Lymphozyten sezernierten Zytokin (Morgan et al, 1976), zur Proliferation anregen lassen (Caligiuri et al, 1990; Nagler et al, 1989). Zum anderen wird diskutiert, dass beide Zellpopulationen zwei eigenständige reife Zelltypen darstellen. Hierfür spricht die höhere Zytokinproduktion nach Stimulation durch den $CD56^{bright}CD16^{dim}$ Typus im Vergleich zur $CD56^{dim}CD16^{bright}$ Zelle (Cooper et al, 2001). Zudem unterschieden sich beide Zellformen auch in der Expression des Adhäsionsmoleküls CD62L und somit auch in der Fähigkeit zur Migration in bestimmte Gewebe. In einer Studie zeigten bei zwei Drittel der Proben über 80 % der $CD56^{bright}CD16^{dim}$ Zellen eine starke Expression von CD62L auf ihrer Zelloberfläche. Nur ca. 16 % der $CD56^{dim}CD16^{bright}$ Zellen waren auch $CD62L^{+}$, jedoch schwächer als die $CD56^{bright}CD16^{dim}$ Zellen. Jedoch war bei circa einem Drittel der Proben bei den $CD56^{dim}CD16^{bright}$ Zellen ein höherer Anteil von bis zu 50 % $CD62L^{+}$, während bei den $CD56^{bright}CD16^{dim}$ Zellen nahezu 100 % CD62L exprimierten. Mit Hilfe dieses Moleküls gelingt somit vorrangig den $CD56^{bright}CD16^{dim}$ Zellen die Adhäsion an die hochendothelialen Venolen von Lymphknoten, sodass eine Migration in das umliegende, lymphatische Gewebe möglich ist (Frey et al, 1998).

Mäuse, die für NK-Zellen defizient sind, entwickeln im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen deutlich seltener und mit geringerer Krankheitsschwere eine EAMG (Shi et al, 2000). Bei Patienten mit MG wurden erhöhte Interferon-Spiegel im Serum und eine gestörte NK-Zell-Aktivität nachgewiesen. Da auch bei Patienten mit einer Virusinfektion solch erhöhte Interferon-Spiegel messbar waren, wurde eine virale Genese der MG diskutiert (Kott et al, 1990). MG-Patienten mit Thymom zeigten eine verringerte Zahl an $CD56^{dim}CD16^{bright}$ Zellen im Blut verglichen mit gesunden Probanden. Dies könnte

möglicherweise Folge eines vermehrten Einwanderns der $CD56^{dim}CD16^{bright}$ Zellen in den Bereich der neuromuskulären Endplatte sein (Suzuki et al, 2005). Zu den NK-Zellen im Zusammenhang mit der MG beim Menschen liegen bisher nur diese wenigen Ergebnisse vor. Daher werden in meiner Arbeit auch NK-Zellen untersucht.

1.6. Zielstellung der Arbeit

Im Fokus der vorliegenden Arbeit stehen IL17-produzierende T-Zellen und NK-Zellen. Für beide Zellgruppen wurde im Mausmodell gezeigt, dass sie für die Entstehung einer MG von essentieller Bedeutung sind (Schaffert et al, 2015; Shi et al, 2000). Passend dazu wurden im Blut von MG-Patienten erhöhte IL17-Spiegel nachgewiesen (Roche et al, 2011). Daraus wurden folgende Hypothesen abgeleitet: 1. Im Blut von MG-Patienten lassen sich im Gegensatz zu Gesunden vermehrt IL17-produzierende Zellen und NK-Zellen nachweisen. 2. Krankheitsmodifizierende Faktoren, wie immunsuppressive Medikamente oder eine Thymektomie, nehmen Einfluss auf die Zahl der IL17-produzierenden Zellen oder der NK-Zellen.

2. Material und Methoden

2.1. Material, Reagenzien, Geräte und Software

Name	Hersteller
Antikörper und Beads	
Alexa Fluor 647 anti-human CD45	BioLegend, San Diego, CA, 92121 USA
Alexa Fluor 647 anti-human IFN-γ	BioLegend, San Diego, CA, 92121 USA
Alexa Fluor 647 anti-human TCR γ/δ	BioLegend, San Diego, CA, 92121 USA
APC anti-human CD45RA	BioLegend, San Diego, CA, 92121 USA
APC-H7 Mouse Anti-Human CD3	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, 07417 USA
CompBeads, Anti-Mouse Ig, κ / Negative Control Compensation Particles Set	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, 07417 USA
FITC anti-human CD19	BioLegend, San Diego, CA, 92121 USA
FITC anti-human CD62L	BioLegend, San Diego, CA, 92121 USA
FITC anti-human TCR α/β	BioLegend, San Diego, CA, 92121 USA
LIVE/DEAD Fixable Dead Cell Stain Kit (Aqua fluorescent)	Thermo Fisher Scientific Incorporated, Waltham, MA, 02451 USA
Pacific Blue anti-human CD3	BioLegend, San Diego, CA, 92121 USA
PE anti-human CD56 (NCAM)	BioLegend, San Diego, CA, 92121 USA
PE anti-human CD161	BioLegend, San Diego, CA, 92121 USA
PE/Cy7 anti-human CD4	BioLegend, San Diego, CA, 92121 USA
PE/Cy7 anti-human IL-17A	BioLegend, San Diego, CA, 92121 USA
PerCP anti-human CD8	BioLegend, San Diego, CA, 92121 USA
PerCP-Cy5.5 anti-human CD16	BioLegend, San Diego, CA, 92121 USA
Chemikalien und Betriebsstoffe	
4′, 6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Thermo Fisher Scientific Incorporated, Waltham, MA, 02451 USA
Albumin Bovine Fraction V, pH 7.0 (BSA)	Serva Electrophoresis GmbH, 69115 Heidelberg, Deutschland
Ampuwa Spüllösung 1000 ml Plastipur	Fresenius Kabi Deutschland GmbH, 61352 Bad Homburg, Deutschland

Aqua ad iniectabilia	B. Braun Melsungen AG, 34212 Melsungen, Deutschland
Brefeldin A (BFA)	Merck KGaA, 64293 Darmstadt, Deutschland
Desinfektionsmittel	Paul Hartmann AG, 89522 Heidenheim, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Thermo Fisher Scientific Incorporated, Waltham, MA, 02451 USA
Ethanol	Carl Roth GmbH u. Co. KG, 76185 Karlsruhe, Deutschland
Ethylen-Diamin-Tetraacetat (EDTA)	Thermo Fisher Scientific Incorporated, Waltham, MA, 02451 USA
FACS Clean Solution	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, 07417 USA
FACS Flow Sheath Fluid	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, 07417 USA
FACS Lysing Solution 10X Concentrate	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, 07417 USA
FACS Permeabilizing Solution 2 (10X)	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, 07417 USA
FACS Shutdown Solution	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, 07417 USA
fetal calf serum (FCS)	Lonza Ltd., 4002 Basel, Schweiz
GIBCO DPBS (10x), no calcium, no magnesium	Thermo Fisher Scientific Incorporated, Waltham, MA, 02451 USA
Ionomycin	Merck KGaA, 64293 Darmstadt, Deutschland
Lymphocyte Separation Medium, LSM 1077, Ficoll	GE Healthcare Europe GmbH, 79111 Freiburg, Deutschland
Penicillin-Streptomycin	Lonza Ltd., 4002 Basel, Schweiz
Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA)	Merck KGaA, 64293 Darmstadt, Deutschland

Türk-Lösung	Merck KGaA, 64293 Darmstadt, Deutschland
very low endotoxin-Roswell Park Memorial Institute (VLE-RPMI) 1640	Thermo Fisher Scientific Incorporated, Waltham, MA, 02451 USA
Geräte	
Bottle Top Filter	Corning Incorporated, Corning, NY 14831-001, USA
CellTrics 30 µm	Partec GmbH, 02828 Görlitz, Deutschland
Combitips plus 5 ml	Eppendorf AG, 22339 Hamburg, Deutschland
Direktverdrängerspitze Eppendorf Mastertip	Eppendorf AG, 22339 Hamburg, Deutschland
epT.I.P.S. 0,1-10 µl	Eppendorf AG, 22339 Hamburg, Deutschland
epT.I.P.S. 200 µl	Eppendorf AG, 22339 Hamburg, Deutschland
epT.I.P.S. 1000 µl	Eppendorf AG, 22339 Hamburg, Deutschland
FACSCanto II System with Fluidics Cart (8-color, blue/red/violet)	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, 07417 USA
Falcon Conical Tube 15 ml	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, 07417 USA
Falcon Conical Tube 50 ml	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, 07417 USA
Falcon Round-Bottom Polystyrene Tubes	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, 07417 USA
Falcon Serological Pipets 5 ml	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, 07417 USA
Falcon Serological Pipets 10 ml	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, 07417 USA
Falcon Serological Pipets 25 ml	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, 07417 USA

Fuchs-Rosenthal-Zählkammer	Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co KG, 97647 Sondheim vor der Rhön, Deutschland
Mikroskop Leica DMIL	Leica Microsystems GmbH, 35578 Wetzlar, Deutschland
Multipette plus	Eppendorf AG, 22339 Hamburg, Deutschland
Pipetboy	Integra Biosciences AG, 7205 Zizers, Schweiz
Pipetten	Eppendorf AG, 22339 Hamburg, Deutschland
Pur-Zellin	Paul Hartmann AG, 89522 Heidenheim, Deutschland
SafeSeal Reagiergefäß 0,5ml	Sarstedt AG & Co KG, 51588 Nümbrecht, Deutschland
SafeSeal Reagiergefäß 1,5ml	Sarstedt AG & Co KG, 51588 Nümbrecht, Deutschland
Sterilbank NuAire	NuAire, Plymouth, MN, 55447 USA
Trucount Absolute Counting Tubes	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, 07417 USA
Vacutainer Heparin Tubes	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, 07417 USA
Vacutainer Holder	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, 07417 USA
Vacutainer Safety-Lok Blood Collection Set	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, 07417 USA
Waage	Kern & Sohn GmbH, 72336 Balingen-Frommern, Deutschland
Wärmeschrank Jouan Incubator IG 150	Thermo Fisher Scientific Incorporated, Waltham, MA, 02451 USA
Zentrifuge (Eppendorf)	Eppendorf AG, 22339 Hamburg, Deutschland

Zentrifuge (Hettich)	Andreas Hettich GmbH & Co.KG, 78532 Tuttlingen, Deutschland
Software	
FACS Diva Software 6.0	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, 07417 USA
FlowJo Version 9.7.2	FlowJo, LCC, Ashland, OR, 97520 USA
GraphPad Prism 5.00	GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, 92037 USA

Tabelle 1: Aufstellung der verwendeten Materialien, Reagenzien, Geräte und Software unter Angabe des Herstellers

2.2. Patientinnen und Patienten und Kontrollgruppe

Ein positives Votum der Ethikkommission für die Durchführung dieser Arbeit liegt vor (EA 1/082/08). Alle Probandinnen und Probanden haben schriftlich das Einverständnis zur Verwendung Ihrer Daten und Blutproben im Rahmen dieser Arbeit gegeben.

2.2.1. Auswahl der Patientinnen und Patienten

In die Untersuchung wurden ausschließlich Patientinnen und Patienten (In dieser Arbeit wird im Weiteren stets die männliche Form verwendet. Soweit gegeben, sind damit auch die weiblichen Personen gemeint.) der Myasthenia gravis-Hochschulambulanz der Charité - Universitätsmedizin Berlin im Zeitraum von März bis Juli 2013 eingeschlossen. Zudem wurden nur seropositive (im Blut nachgewiesener AChR-Ak) Patienten in die Studie aufgenommen. Die Patienten wurden im Rahmen einer Anamnese nach Name, Geschlecht, Geburtsdatum, dem Jahr der Erstdiagnose der Myasthenia gravis, nach der aktuellen Medikation, der aktuellen und bisherigen Symptomatik, weiteren Erkrankungen und bezüglich einer eventuellen operativen Entfernung des Thymus befragt (siehe Tabelle 2).
Speicherort der Patientendaten: Datenspeicher der Arbeitsgemeinschaft Prof. Dr. med. Andreas Meisel, Charité - Universitätsmedizin Berlin
Archivierungsort der Einwilligungsbögen: NeuroCure Clinical Research Center Berlin

Patientinnen					
Alter	**Alter bei ED**	**Dauer**	**Besinger Score**	**Medikation**	**Thymektomie**
28	24	4	1,125	AChI	ja, 0
28	22	6	1,25	AChI, GCS, Aza	ja, 2
31	29	2	0,875	AChI	ja, 1
32	25	7	0	keine	ja, 0
33	18	15	0,625	AChI, GCS, MTX	ja, 0
35	34	1	0,43	AChI, GCS, Aza	ja, 0
35	17	18	0,4	AChI, Aza	ja, 0
37	18	19	0,625	AChI	ja, 1
41	24	17	1,125	AChI, GCS, Aza	nein
41	39	2	0,375	AChI	ja, 0
43	42	1	0,5	AChI	nein
44	30	14	2	AChI, GCS, MTX	ja, 0
47	37	10	0,75	AChI, Aza	ja, 1
48	37	11	0,25	AChI, Aza	ja, 0
49	24	25	0,25	AChI	ja, 3
50	39	11	0,625	AChI, GCS	ja, 2
51	49	2	1,71	AChI	ja, 0
53	49	4	1,25	AChI	ja, 1
56	39	17	1,375	AChI	nein
59	46	13	1,5	AChI, Aza	ja, 0
61	53	8	0,875	GCS, Aza	nein
61	60	1	1	AChI, GCS, Aza	ja, 0
61	37	24	0,625	AChI, GCS	ja, 6
62	28	34	1,375	AChI, Aza	ja, 3
62	51	11	1,5	AChI, GCS, Aza	ja, 3
64	62	2	1,5	AChI, GCS	ja, 0, Thymom
66	61	5	0,75	AChI	ja, 0, Thymom
69	50	19	0,625	AChI	nein
70	24	46	0	AChI, Aza	ja, 21
71	43	28	0,875	AChI, Aza	ja, 0, Thymom
75	73	2	0,2	AChI	nein
78	76	2	0,83	AChI, GCS	nein
80	68	12	1,375	AChI, GCS, Aza	nein
Patienten					
Alter	**Alter bei ED**	**Dauer**	**Besinger Score**	**Medikation**	**Thymektomie**
20	17	3	0	AChI, GCS, Aza	ja, 0
38	30	8	0,25	AChI, GCS, Aza	ja, 1
39	37	2	0,125	AChI	nein
51	50	1	1,125	AChI	ja, 0
53	37	16	0	AChI, MTX	ja, 2
54	21	33	0,5	AChI, GCS, Aza	ja, 0
58	57	1	0,25	AChI	nein
60	46	14	0,625	AChI	nein
61	57	4	0,125	AChI, GCS	ja, 0
68	67	1	1,29	AChI, GCS, Aza	nein

69	68	1	0,125	AChI, GCS	nein
72	55	17	0,5	AChI	ja, 1, Thymom
73	64	9	0,5	AChI, GCS	ja, 5
73	72	1	0,625	AChI, GCS	nein
81	80	1	0	keine	nein
84	79	5	0,75	AChI, GCS, MTX	nein

Tabelle 2: Aufstellung der Patientinnen und Patienten mit Angabe von Alter in Jahren zum Zeitpunkt der Probeentnahme (Alter), Alter in Jahren zum Zeitpunkt der Erstdiagnose der MG (Alter bei ED), Dauer der Erkrankung in Jahren seit Erstdiagnose bis zum Zeitpunkt der Probeentnahme (Dauer), Besinger Score zum Zeitpunkt der Probeentnahme (Besinger et al, 1983), Medikation in Bezug auf die MG zum Zeitpunkt der Probeentnahme (Medikation) und Angabe über stattgehabte (ja) oder nicht stattgehabte (nein) Thymektomie und falls stattgehabt mit Angabe des Operationszeitpunktes in Jahren nach der Erstdiagnose und (falls bekannt) Angabe der Histologie des Thymuspräparates (Thymektomie), (AChI=Acetylcholinesterase-Inhibitoren, Aza=Azathioprin, GCS=Glukokortikosteroide, MTX=Methotrexat)

2.2.2. Auswahl der Kontroll-Personen

Als in Bezug auf immunologische und neurologische Erkrankungen gesunde Personen wurden Patienten des Charité Centrums Orthopädie und Unfallchirurgie und freiwillige Spenderinnen und Spender aus dem persönlichen Umfeld des Autors ausgewählt. Hier wurden eine Anamnese und die Einsicht in die Krankenakte herangezogen, um sicherzustellen, dass keine interferierenden (immunologischen) Erkrankungen vorliegen.

Speicherort der Kontroll-Personen-Daten: Datenspeicher der Arbeitsgemeinschaft Prof. Dr. med. Andreas Meisel, Charité - Universitätsmedizin Berlin

Archivierungsort der Einwilligungsbögen: NeuroCure Clinical Research Center Berlin

2.3. Verarbeitung der Blutproben

2.3.1. Drei Probengruppen

Die Weiterverarbeitung der Blutproben hatte die Zuteilung zu 3 verschiedenen Probengruppen zum Ziel. Dies wird in Abbildung 3 ersichtlich.

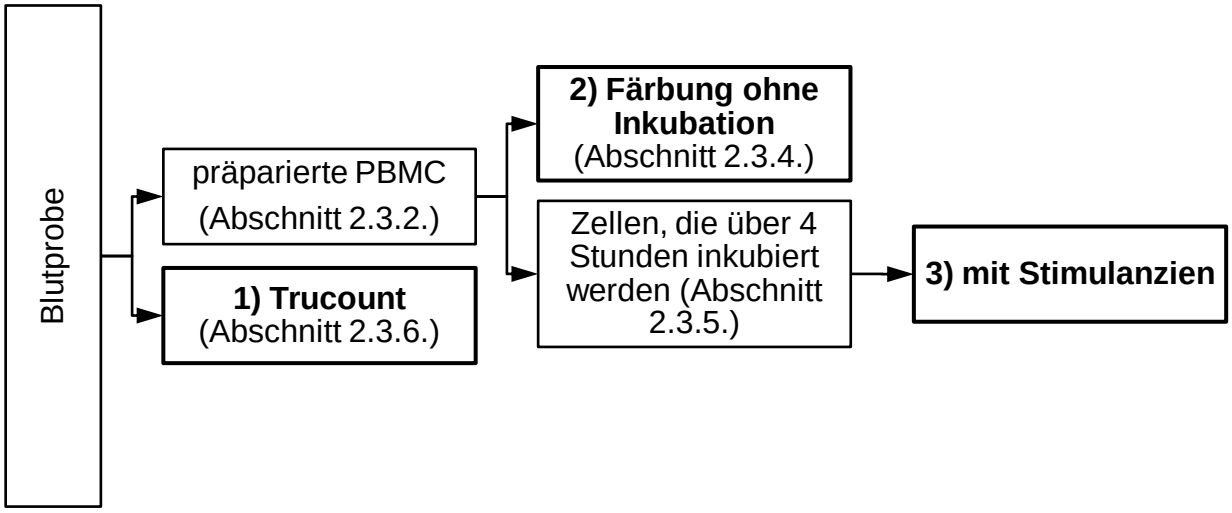


Abbildung 3: Übersicht über die Verwendung der Blutproben. Fett markiert sind die für die durchflusszytometrische Messung verwendeten drei Probengruppen. (PBMC=peripheral blood mononuclear cells (mononukleäre Zellen des peripheren Blutes); Trucount ist eine Warenmarke der Firma Becton, Dickinson and Company (USA))

2.3.2. Präparation von mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC) und Aufteilung in drei Probengruppen

Unter sterilen Bedingungen wurde das von einem Patienten bzw. einem Probanden entnommene Blut aus den 10 ml-Heparin-Probengefäßen (3 Stück pro Patient/Proband) in ein Falcon Conical Tube 50 ml überführt. Für die spätere Messung mittels Trucount-Tube wurden noch 50 µl Vollblut zurückbehalten (Probengruppe 1, siehe Abbildung 3). Mit Standardpuffer (bestehend aus 1fach Dulbeccos phosphatgepufferter Salzlösung (DPBS) mit 0,5 % bovinem Serumalbumin (BSA) und 2 mM Ethylen-Diamin-Tetraacetat (EDTA)) wird nun auf 35 ml aufgefüllt. Ein weiteres Falcon Conical Tube 50 ml wird mit 15 ml Lymphozytenseparationsmedium befüllt. Hierauf wird nun das Vollblut-Puffer-Gemisch vorsichtig aufgetragen. Anschließend wird über 20 min bei 20 °C mit 550 g zentrifugiert. Die nun entstandene lymphozytenhaltige Interphase (buffy coat) wird in ein frisches Gefäß überführt und mit Standardpuffer auf 50 ml aufgefüllt. Nun folgt eine Zentrifugation über 10 min bei 4 °C und mit 300 g als erster Waschschritt. Der Überstand wird verworfen und das Pellet am Gefäßboden in 50 ml frischer Standardpufferlösung resuspendiert. Die anschließende Zentrifugation erfolgt nun über 15 min bei 4 °C mit 300 g als zweiter Waschschritt. Nach erneutem Verwerfen des Überstandes und der Resuspension in 1 ml Nährmedium (bestehend aus 1fach Medium very low endotoxin Roswell Park Memorial Institute 1640 (VLE RPMI) mit 10

% fetalem Kälberserum (FCS) und 1 % Penicillin/Streptomycin (P/S)) erhält man die fertige Suspension mit PBMC. Um die Zellsuspension im Weiteren mit den richtigen Mengen weiterer Reagenzien zu beschicken, ist eine Auszählung der Zellen in der Suspension nötig. Hierzu wurden 20 µl Suspension abgenommen und in einem Reagiergefäß mit 20 µl Nährmedium zusammengebracht (Verdünnung 1:2). 20 µl dieses Gemisches wurden mit 80 µl Färbelösung versetzt (Verdünnung 1:5). Zur Zählung kommt also eine im Vergleich zur Ausgangssuspension 10fach verdünnte PBMC-Suspension. In einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer wurde nun im Lichtmikroskop ausgezählt und das Zählergebnis auf die Ausgangssuspension umgerechnet. Diese wurde nun so mit Nährmedium aufgefüllt, dass pro Milliliter circa 1×10^7 Zellen enthalten waren. Die Suspension wurde nun für die folgenden Probengruppen 2 und 3 aufgeteilt (siehe Abbildung 3).

2.3.3. Festlegung der Färbeschemata

Zur Abgrenzung der in dieser Arbeit untersuchten Zellpopulationen wurden bestimmte Zellmerkmale festgelegt, welche sich an Oberflächenmerkmalen und der Zytokinexpression der Zellgruppen orientierten. Geeignete Fluoreszenzantikörper wurden ausgewählt (siehe Tabelle 3).

	Zielantigen des Antikörpers	**Fluoreszenzfarbstoff**
Färbeschema 1 (für Trucount-Verfahren, siehe Abschnitt 2.3.6.)	CD3	APC-H7
	CD4	PE-Cy7
	CD56	PE
	CD19	FITC
	CD45	AlexaFluor 647
	tote Zellen wurden mit dem Farbstoff DAPI markiert	
Färbeschema 2 (für Probengruppe 2, siehe Abschnitt 2.3.4.)	CD3	APC-H7
	CD4	PE-Cy7
	CD8	PerCP
	CD161	PE
	CD45RA	APC
	CD62L	FITC
	tote Zellen wurden mit dem Farbstoff DAPI markiert	

Färbeschema 3 (für Probengruppe 2, siehe Abschnitt 2.3.4.)	CD3	APC-H7
	CD4	PE-Cy7
	CD8	PerCP
	αβTCR	FITC
	δγTCR	AlexaFluor 647
	tote Zellen wurden mit dem Farbstoff DAPI markiert	
Färbeschema 4 (für Probengruppe 2, siehe Abschnitt 2.3.4.)	CD3	PacificBlue
	CD16	PerCP-Cy5.5
	CD56	PE
	CD62L	FITC
	tote Zellen wurden mit dem Farbstoff DAPI markiert	
Färbeschema 5 (für Probengruppe 3, siehe Abschnitt 2.3.5.)	*vor Fixation und Permeabilisierung*	
	CD3	PacificBlue
	CD8	PerCP
	αβTCR	FITC
	Live/Dead Fixable Dead Cell Stain	Aqua fluorescent
	nach Fixation und Permeabilisierung	
	IFNγ	AlexaFluor 647
	IL17A	PE-Cy7

Tabelle 3: Färbeschemata zur Abgrenzung der einzelnen Zelltypen

2.3.4. Färbung der PBMC ohne Wärmeschrankinkubation

Jene Zellsuspension, die der Probengruppe 2 zugeteilt war, wurde umgehend zur Färbung durch Antikörper in vier Falcon Round-Bottom Tubes aufgeteilt (je eines für Färbeschema 2, 3 und 4 (siehe Tabelle 3) und eine Negativ-Kontrolle). Jedes Falcon Round-Bottom Tube (im Weiteren nur noch Tube bzw. Tubes genannt) erhielt 100 µl Zellsuspension. Entsprechend der in Titrationsreihen bestimmten optimalen Färbeantikörpermengen wurden die fluoreszenzfarbstofftragenden Antikörper in die jeweiligen Tubes pipettiert. Die Färbungen wurden 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden zur Waschung je 2 ml Standardpufferlösung in die Tubes gegeben und über 10 min bei 4 °C mit 300 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Die am Gefäßboden entstandenen Pellets wurden in 500 µl Standardpuffer resuspendiert. Die Proben waren nun zur Messung im Durchflusszytometer bereit (siehe Abschnitt 2.4.).

2.3.5. Stimulation und anschließende Färbung der PBMC

Für die folgenden Schritte wurde die Probengruppe 3 verwendet (siehe Abbildung 3). Mit Hilfe der unspezifischen Stimulanzien PMA und Ionomycin sollte die lFNγ- und die IL17-Produktion der Zellen stimuliert werden. Um die Ausschleusung der Zytokine aus der Zelle zu verhindern, wurde Brefeldin A (BFA) eingesetzt. Nach der Stimulation wurden die Oberflächenantigene mit Fluoreszenzantikörpern markiert (Färbeschema 5, siehe Tabelle 3). Anschließend wurden die Zellen erst fixiert und dann permeabilisiert, um die intrazellulären Zytokine zu färben.

2.3.5.1. Zellstimulation

Die folgenden Schritte wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Auf die Zellsuspension der Probengruppe 3 wurden je Milliliter Zellsuspension 1 µl PMA-Lösung (1 mg PMA pro 1 ml Ethanol, 1 : 100 verdünnt in Nährmedium), 1 µl Ionomycin-Lösung (1 mg Ionomycin pro 1 ml Dimethylsulfoxid) und 2 µl BFA-Lösung (5 mg BFA pro 1 ml Ethanol) gegeben. Zu den Zellen der Negativkontrolle wurden nur 2 µl BFA pro Milliliter Zellsuspension zugesetzt. Die Endkonzentration für PMA betrug 10 ng/ml Zellsuspension, jene für Ionomycin 1 µg/ml und für BFA 10 µg/ml. Es folgte die Inkubation für 4 Stunden in einen Wärmeschrank (37 °C, 5 % CO_2). Nach dieser Inkubation wurden die Probengruppen zur Waschung mit reichlich proteinfreiem Puffer (1fach DPBS mit 2 mM EDTA) aufgefüllt und über 10 min bei 4 °C mit 300 g zentrifugiert. Zuletzt wurde der Überstand durch Abkippen verworfen. Somit wurde die Stimulation beendet. Die in den Gefäßen zurückbleibende Menge Zellsuspension wurde dann weiterbehandelt.

2.3.5.2. Färbung vor Fixation und Permeabilisierung

Nach der Stimulation wurden nun jene Färbungen durchgeführt, die vor der Fixation stattfinden mussten (siehe Tabelle 3). Zunächst wurden die Zellsuspensionen filtriert, da diese nach dem Waschen zum Teil eine Ausflockung zeigten. Je 100 µl Zellsuspension wurden dann in je ein Tube überführt. Zusätzlich wurden je 100 µl Zellsuspension für eine Negativ-Kontrolle in je ein Tube überführt und ohne weitere Färbung belassen. In die Tubes mit zu färbender Zellsuspension wurden

entsprechend dem vorher festgelegten Färbeschema Antikörper pipettiert (siehe Tabelle 3). Danach wurden die Tubes für 20 min auf Eis inkubiert. Mit 1 ml proteinfreiem Puffer je Tube wurde unter Zentrifugation über 10 min bei 4 °C mit 300 g gewaschen. Der Überstand wurde jeweils verworfen.

2.3.5.3. Fixation und Permeabilisierung

In alle Tubes (auch die Negativ-Proben) der Probengruppe 3 wurden nun je 1 ml 1fach konzentrierte Lyselösung (Verdünnung mit Aqua ad iniectabilia) eingebracht und über 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Mit reichlich Standardpuffer je Tube wurde unter Zentrifugation über 10 min bei 4 °C mit 400 g gewaschen und der Überstand verworfen. Anschließend wurden die Zellsuspensionen mit Standardpuffer aufgefüllt und über Nacht bei 4 °C gelagert. Am nächsten Tag wurde der Pufferüberstand wieder verworfen und die Tubes mit je 1 ml 1 fach konzentrierter Permeabilisierungslösung (Verdünnung mit Aqua ad iniectabilia) beschickt. Auch hier schloss sich eine 10-minütige Inkubation bei Raumtemperatur an. Gewaschen wurde anschließend mit je 1 ml Standardpuffer unter Zentrifugation über 10 min bei 4 °C mit 550 g. Erneut konnte der Überstand verworfen werden. Die Tubes wurden mit 100 µl Standardpuffer wieder aufgefüllt. Jetzt waren die Zellen bereit für die intrazelluläre Färbung der Zytokine.

2.3.5.4. Färbung nach Fixation und Permeabilisierung

Auf die zu färbenden Zellsuspensionen (Probengruppen 3) wurden die Färbeantikörper (siehe Tabelle 3) aufgebracht. Auf Eis wurde dann über 10 min inkubiert. Mit je 1 ml Standardpuffer pro Tube wurde dann unter Zentrifugation über 10 min bei 4 °C mit 550 g gewaschen. Der Überstand wurde verworfen. Die Tubes wurden mit 300 µl Standardpuffer wieder befüllt. Nun waren die Zellen bereit zur Messung im Durchflusszytometer (siehe Abschnitt 2.4.).

2.3.6. Zellzählung im Trucount-Verfahren

Die Bezeichnung Trucount ist eine Warenmarke der Firma Becton, Dickinson and Company (USA) und wird hier aufgrund der Bekanntheit der Bezeichnung verwendet.

Mit diesem Verfahren ist es über eine definierte Menge an im Probengefäß enthaltenen Partikeln (Beads) möglich, das genaue Volumen des in der Messung erfassten Blutes und somit die tatsächlich im Blut vorhandenen absoluten Zellzahlen zu bestimmen. Für die Absolutzahlbestimmung der Zellpopulationen mittels Trucount wurden 50 µl der Vollblutprobe eines jeden Patienten/Probanden verwendet. Ein vorher in einem 0,5 ml-Reagiergefäß hergestellter Antikörper-Mix (siehe Tabelle 3) wurde hinzu pipettiert. Anschließend wurde bei Raumtemperatur 15 min in Dunkelheit inkubiert. Nach der Inkubation wurden 450 µl 1fach konzentrierte Lyselösung (Verdünnung mit Aqua ad iniectabilia) hinzugefügt. Nach erneuter Durchmischung wurde erneut bei Raumtemperatur über 15 min inkubiert. Danach waren die Proben bereit für die durchflusszytometrische Messung (siehe Abschnitt 2.4.). Mit Hilfe der über diese Messdaten erhaltenen absoluten Zellzahlen, konnten die Messergebnisse der Probengruppen 2 und 3, die stets einen Relativanteil in Prozent angeben, als absolute Zellzahlen ausgedrückt werden.

2.4. Durchflusszytometrische Messung

Für die Fluoreszenzdurchflusszytometrie wurden PBMC und Vollblutproben (Trucount) mit Fluoreszenzfarbstoff-tragenden Antikörpern markiert. Durch Laserlicht wurden die Farbstoffe zur Lichtemission angeregt. Anhand der durch die emittierten Lichtsignale und der Lichtstreuung erhaltenen Daten, lassen sich die Oberflächeneigenschaften der erfassten Zellen bestimmen. Durch die passende Auswahl der markierten Zellmerkmale lassen sich die unterschiedlichen Zelltypen in der anschließenden Analyse der Messdaten voneinander abgrenzen. Alle durchflusszytometrischen Messungen wurden am FACS Canto II durchgeführt. Kurz vor der Messung wurde auf die Proben der Probengruppen 2 je 1 µl 4′, 6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) gemäß den festgelegten Färbeschemata (siehe Tabelle 3) aufgetragen. Dies diente zur Färbung toter Zellen. Zur Bedienung des FACS-Gerätes wurde die Software FACS DIVA 6.0 verwendet.

2.5. Auswertung mittels FlowJo-Software

Mit Hilfe der FlowJo-Software (Version 9.7.2) wurden die ermittelten durchflusszytometrischen Daten ausgewertet. Im Sinne der Fragestellung dieser

Arbeit wurden die relativen Häufigkeiten bestimmter Zellpopulationen in den einzelnen Patienten- und Kontrollproben ermittelt. Zusätzlich wurden auch absolute Zellzahlen über Trucount (siehe Abschnitt 2.3.6.) erhoben.

2.6. Ausschluss einzelner Patientenproben

Einzelne Patientenproben wurden aus verschiedenen Gründen von der Auswertung ausgeschlossen. Diese Gründe waren:

- offensichtlich fehlerhaft verarbeitete Proben
- uneindeutige Färbeergebnisse
- offensichtlich aus technischen Gründen nicht verwertbare Färbungen
- Ausschluss der Proben einer Patientin bei vorliegender akuter myeloischer Leukämie

Aus diesen Gründen variiert die Zahl der nach der durchflusszytometrischen Messung letztlich zur Auswertung und Ergebniserstellung herangezogenen Proben (siehe Tabelle 4).

	Zahl der verwendbaren Proben der Patienten	**Zahl der verwendbaren Proben der Kontrollgruppe**
Färbeschema 1	44	25
Färbeschema 2	49	25
Färbeschema 3	48	24
Färbeschema 4	49	21
Färbeschema 5	39	21

Tabelle 4: Zahl der zur Auswertung geeigneten Proben für die einzelnen Färbeschemata (siehe Tabelle 3)

2.7. Statistik

Die mittels FlowJo-Software erhaltenen Ergebnisse wurden hinsichtlich signifikanter Unterschiede (Signifikanzwert (p) < 0,05) verglichen. Dies geschah mit dem Programm GraphPad Prism (Version 5.00) unter sequenzieller Verwendung des Kruskal-Wallis-Tests und eines zweiseitigen Mann-Whitney-U-Tests. Hierbei wurden jeweils die relativen und die absoluten Messergebnisse den Vergleichen unterzogen.

Die Gewinnung der Ergebnisse folgte einem explorativem Ansatz. Bei der relativ geringen Zahl an Proben wurde für diese Arbeit von einer Nicht-Normalverteilung der Messwerte ausgegangen. Bei der statistischen Auswertung wurde durch eine Biostatistikerin beraten.

3. Ergebnisse

Die Untersuchungsergebnisse werden hier unterteilt nach einzelnen Zelltypen dargelegt. Dabei wird jeweils zunächst der Vergleich aller untersuchten MG-Patientenproben mit den Proben der Gesunden geschildert. Gefolgt wird dies jeweils von den Untersuchungsergebnissen nach Einteilung der Patientenproben nach den klinischen Kriterien Medikation und durchgeführter oder nicht durchgeführter Thymektomie. Die statistische Auswertung erfolgte anhand der relativen Anteile, angegeben als Median in Prozent an übergeordneten Leukozytenpopulationen sowie anhand der absoluten Zellzahlen, angegeben als Median der Anzahl der Zellen in einem Mikroliter der untersuchten Blutprobe (Zellen/µl Blut).
Es wurden Blutproben von 54 Patienten (36 Frauen, 18 Männer) gewonnen. Die Patienten waren 19 bis 84 Jahre, im Durchschnitt 54 Jahre, alt. Die Patienten unterstanden zum Zeitpunkt der Probeentnahme teilweise einer medikamentösen immunsuppressiven Therapie, die bei der Ergebnisauswertung berücksichtigt wurde. Hierzu gehört die Einnahme von Glukokortikosteroiden und/oder Antimetaboliten, wie Azathioprin und Methotrexat.
Es wurden Blutproben von 15 gesunden Probandinnen und 10 Probanden gewonnen. In dieser Arbeit wird im Weiteren stets die männliche Form verwendet. Soweit gegeben, sind damit auch die weiblichen Personen gemeint. Die Kontroll-Personen waren 24 bis 80 Jahre, im Durchschnitt 56 Jahre, alt.

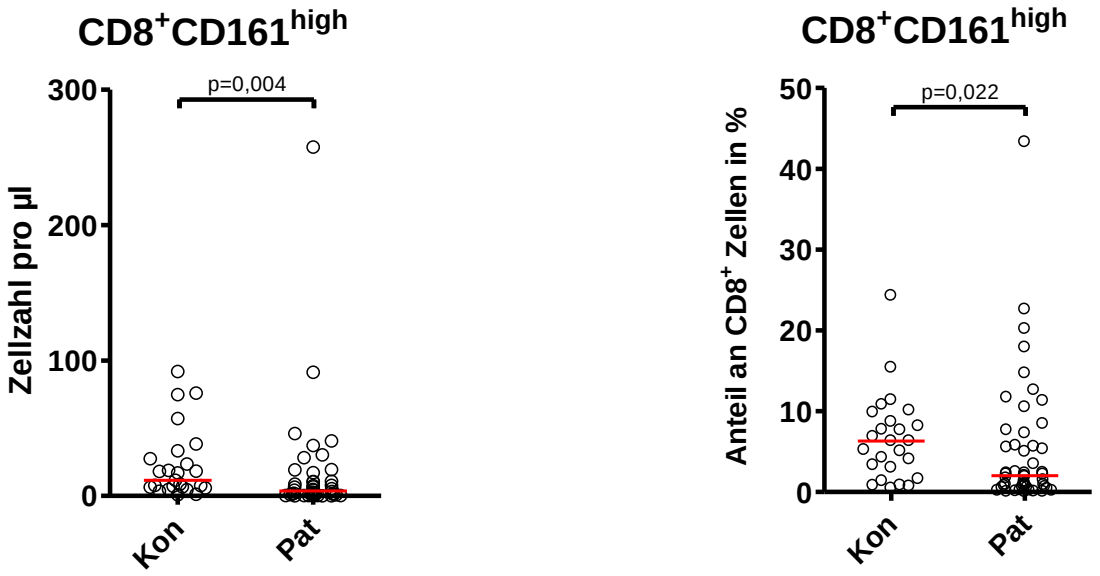
3.1. Häufigkeiten der $CD8^+CD161^{high}$ Effektor-Gedächtniszellen bei Myasthenie-Patienten im Vergleich zu Gesunden

Diese Zellen stellen Effektor-Gedächtniszellen dar, die direkt in periphere Gewebe einwandern und zur Zytokinproduktion fähig sind.

3.1.1. $CD8^+CD161^{high}$ Zellen sind bei MG-Patienten in Zahl und Frequenz vermindert

Die $CD8^+$ Zellen, die CD161 in hohem Maße exprimieren ($CD161^{high}$), machen bei den Gesunden 6,3 % aller $CD8^+$ Zellen aus, dies entspricht 11,5 Zellen/µl Blut. Patienten weisen insgesamt eine signifikant geringere Zahl von 3,7 Zellen/µl Blut und

einen signifikant geringeren Anteil von 2,2 % im Gegensatz zu den Gesunden auf (siehe Abbildungen 4a und 4b).



Abbildungen 4a und 4b: Zahl (4a, links) und Anteil (4b, rechts) der $CD8^+CD161^{high}$ Zellen unter den $CD8^+$ Zellen bei Gesunden (Kon) und bei Patienten (Pat). Die Klammern bezeichnen jeweils den signifikanten Unterschied zwischen den beiden Populationen mit Angabe des jeweiligen Signifikanzwertes p. (4a: Kon n=25, Pat n=44, Mann-Whitney-U-Test; 4b: Kon n=25, Pat n=49, Mann-Whitney-U-Test)

3.1.2. $CD8^+CD161^{high}$ Zellzahl ist bei MG-Patienten ohne Thymektomie vermindert

Patienten ohne Thymektomie zeigen eine signifikant geringere Zahl von 3,3 $CD8^+CD161^{high}$ Zellen/µl Blut im Vergleich zu den Gesunden (11,5 Zellen/µl Blut). Im Vergleich zu den Patienten nach Thymektomie (4,9 $CD8^+CD161^{high}$ Zellen/µl Blut) haben die Patienten ohne Thymektomie ebenfalls eine geringere Zellzahl, aber dieser Unterschied ist nicht signifikant. Bei den Patienten, die sich einer Thymektomie unterzogen haben, zeigt sich die Zellzahl verringert im Vergleich mit den gesunden Probanden, jedoch auch nicht signifikant (siehe Abbildung 5). Bei dem Vergleich des relativen Anteils der $CD8^+CD161^{high}$ Zellen an den $CD8^+$ Zellen zeigen sich zwischen Gesunden (n=25), Patienten ohne Thymektomie (n=16) und Patienten mit Thymektomie (n=33) keine signifikanten Unterschiede (Kruskal-Wallis-Test).

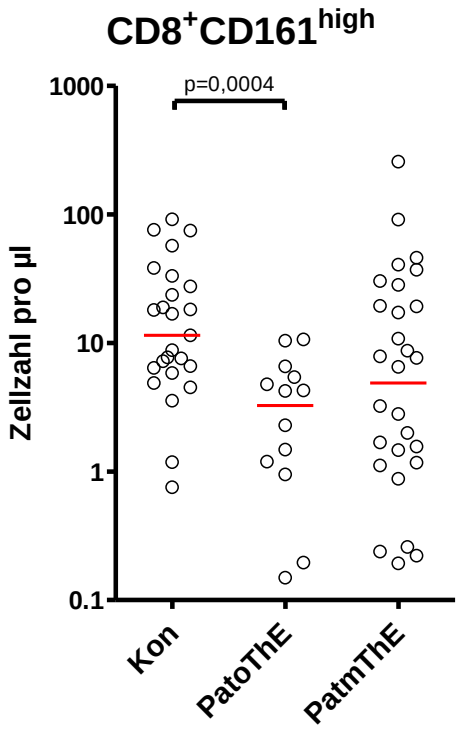


Abbildung 5: Zahl der $CD8^{+}CD161^{high}$ Zellen bei Gesunden (Kon), bei Patienten ohne (PatoThE) und bei Patienten mit Thymektomie (PatmThE). Die Klammer bezeichnet die sich signifikant unterscheidenden Gruppen mit Angabe des Signifikanzwertes p. (log^{10}-Einteilung der y-Achse; Kon n=25, PatoThE n=14, PatmThE n=30, Kruskal-Wallis-Test, Mann-Whitney-U-Test)

3.1.3. $CD8^{+}CD161^{high}$ Zellen sind bei MG-Patienten unter medikamentöser immunsuppressiver Therapie in Zahl und Frequenz reduziert

Patienten, die Immunsuppressiva einnehmen, zeigen eine signifikant geringere Zellzahl und -frequenz an $CD8^{+}CD161^{high}$ Zellen als Gesunde oder Patienten, die keine Immunsuppressiva einnehmen. Im Vergleich von Gesunden zu Patienten, die keine Immunsuppressiva einnehmen, zeigt sich kein signifikanter Unterschied (siehe Abbildungen 6a, 6b, 6c und 6d).

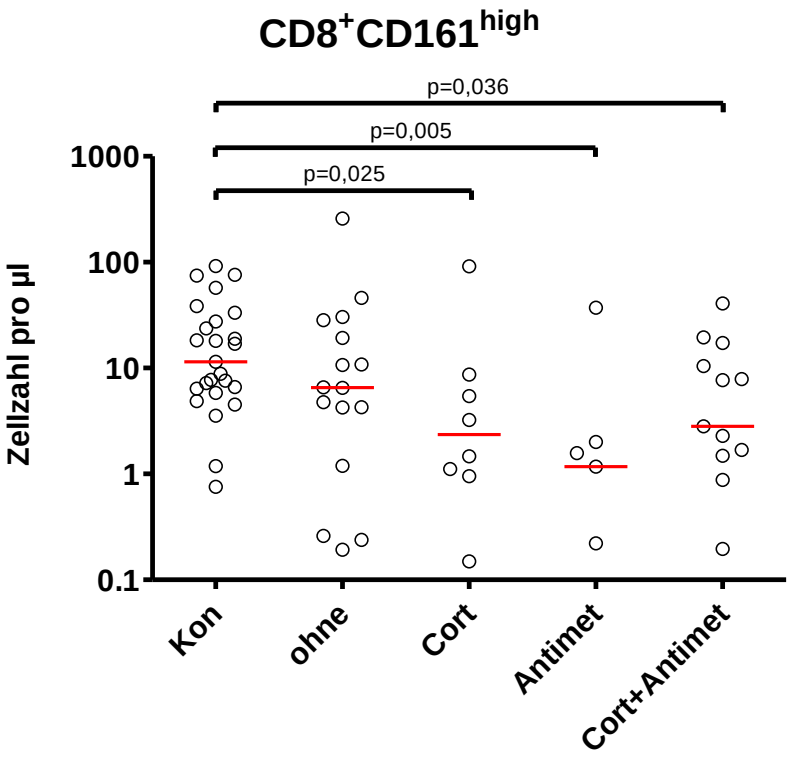


Abbildung 6a: Zahl der $CD8^{+}CD161^{high}$ Zellen bei Gesunden (Kon), bei Patienten ohne Immunsuppressiva (ohne), bei Patienten, die nur Glukokortikosteroide einnehmen (Cort), bei Patienten, die nur Antimetabolite einnehmen (Antimet) und bei Patienten, die Glukokortikosteroide und Antimetabolite zusammen einnehmen (Cort+Antimet). Die Klammern bezeichnen die sich signifikant unterscheidenden Gruppen mit Angabe des jeweiligen Signifikanzwertes p. (log^{10}-Einteilung der y-Achse; Kon n=25, ohne n=16, Cort n=8, Antimet n=7, Cort+Antimet n=13, Kruskal-Wallis-Test, Mann-Whitney-U-Test)

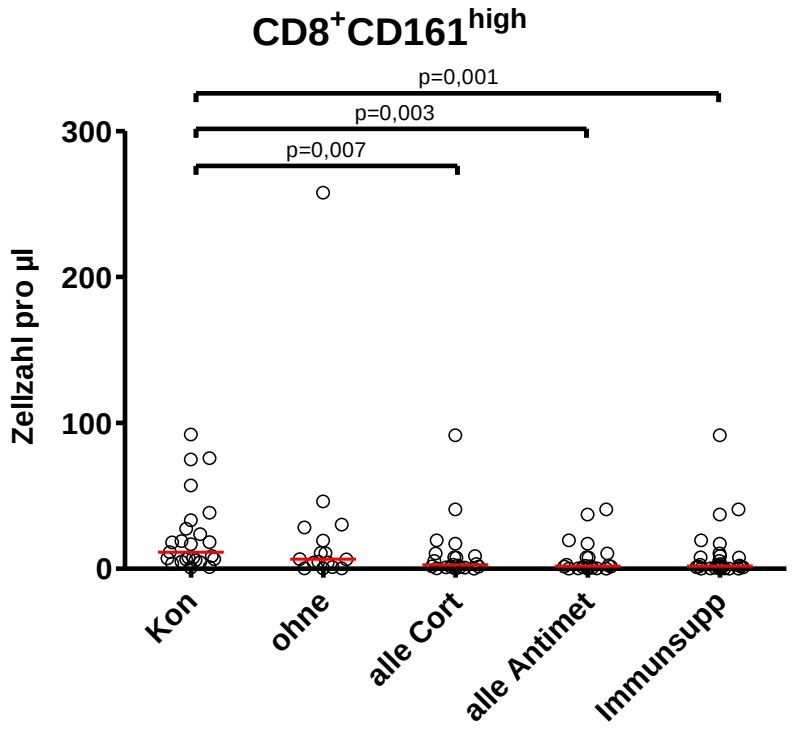


Abbildung 6b: Zahl der $CD8^{+}CD161^{high}$ Zellen bei Gesunden (Kon), bei Patienten ohne Immunsuppressiva (ohne), bei Patienten, die nur Glukokortikosteroide einnehmen, zusammengefasst mit Patienten, die Glukokortikosteroide und Antimetabolite gemeinsam einnehmen (alle Cort), bei Patienten, die nur Antimetabolite einnehmen, zusammengefasst mit Patienten, die Glukokortikosteroide und Antimetabolite gemeinsam einnehmen (alle Antimet) und bei Patienten, die nur Glukokortikosteroide einnehmen, zusammengefasst mit Patienten, die nur Antimetabolite einnehmen und zusammengefasst mit Patienten, die Glukokortikosteroide und Antimetabolite gemeinsam einnehmen (Immunsupp). Die Klammern bezeichnen die sich signifikant unterscheidenden Gruppen mit Angabe des jeweiligen Signifikanzwertes p. (Kon n=25, ohne n=16, alle Cort n=21, alle Antimet n=20, Immunsupp n=28, Kruskal-Wallis-Test, Mann-Whitney-U-Test)

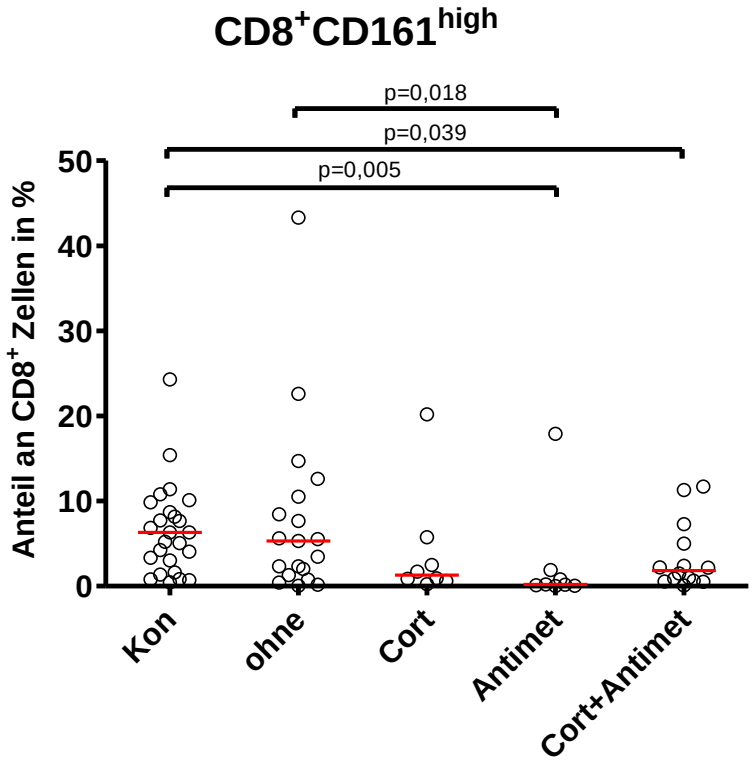


Abbildung 6c: Anteil der $CD8^{+}CD161^{high}$ Zellen unter den $CD8^{+}$ Zellen bei Gesunden (Kon), bei Patienten ohne Immunsuppressiva (ohne), bei Patienten, die nur Glukokortikosteroide einnehmen (Cort), bei Patienten, die nur Antimetabolite einnehmen (Antimet) und bei Patienten, die Glukokortikosteroide und Antimetabolite zusammen einnehmen (Cort+Antimet). Die Klammern bezeichnen die sich signifikant unterscheidenden Gruppen mit Angabe des jeweiligen Signifikanzwertes p. (Kon n=25, ohne n=19, Cort n=8, Antimet n=8, Cort+Antimet n=14, Kruskal-Wallis-Test, Mann-Whitney-U-Test)

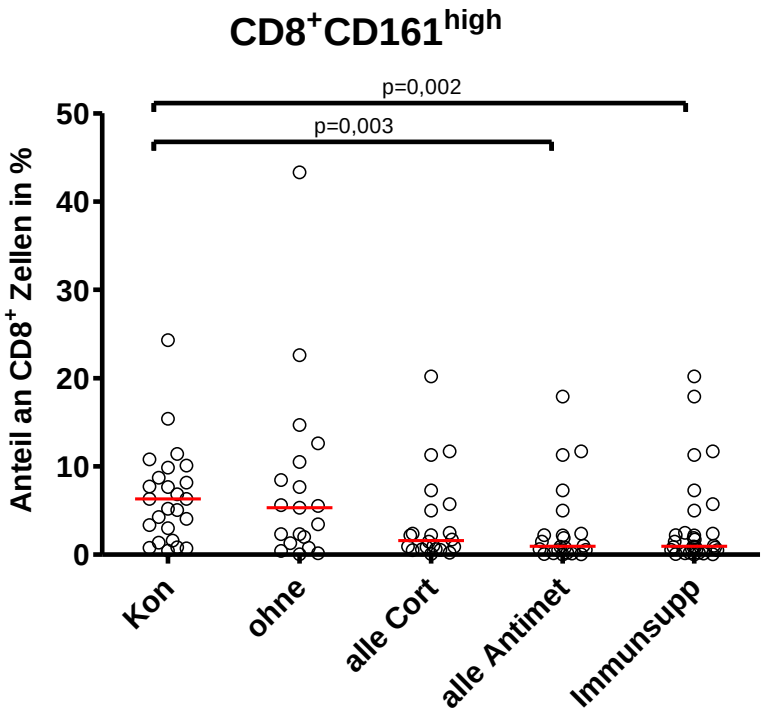


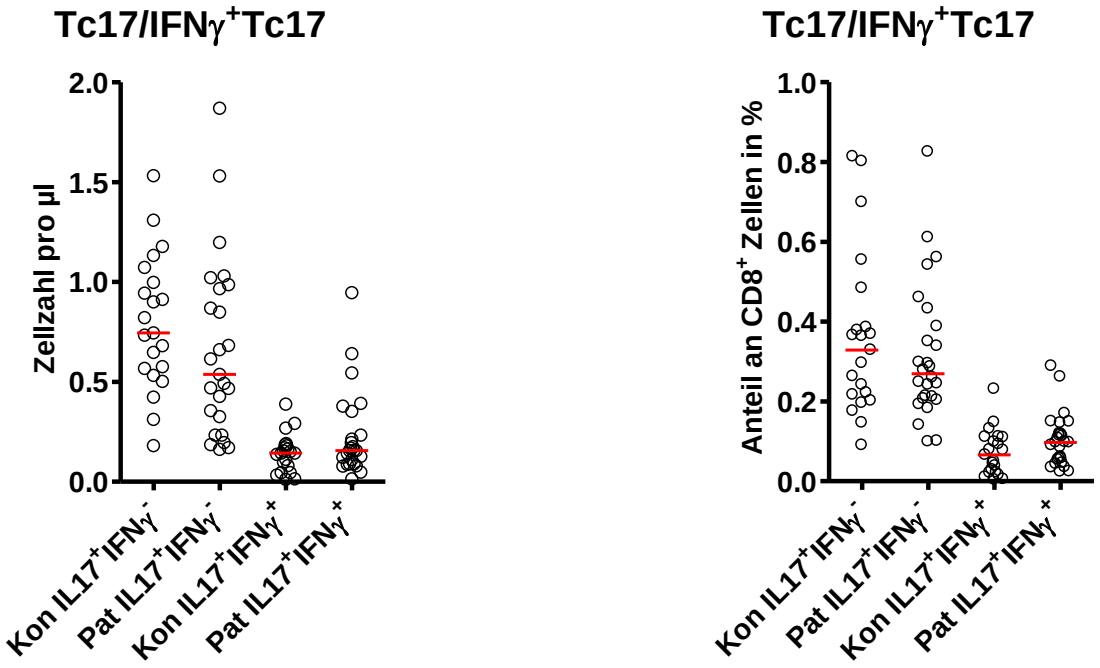
Abbildung 6d: Anteil der $CD8^+CD161^{high}$ Zellen unter den $CD8^+$ Zellen bei Gesunden (Kon), bei Patienten ohne Immunsuppressiva (ohne), bei Patienten, die nur Glukokortikosteroide einnehmen, zusammengefasst mit Patienten, die Glukokortikosteroide und Antimetabolite gemeinsam einnehmen (alle Cort), bei Patienten, die nur Antimetabolite einnehmen, zusammengefasst mit Patienten, die Glukokortikosteroide und Antimetabolite gemeinsam einnehmen (alle Antimet) und bei Patienten, die nur Glukokortikosteroide einnehmen, zusammengefasst mit Patienten, die nur Antimetabolite einnehmen und zusammengefasst mit Patienten, die Glukokortikosteroide und Antimetabolite gemeinsam einnehmen (Immunsupp). Die Klammern bezeichnen die sich signifikant unterscheidenden Gruppen mit Angabe des jeweiligen Signifikanzwertes p. (Kon n=25, ohne n=19, alle Cort n=22, alle Antimet n=20, Immunsupp n=30, Kruskal-Wallis-Test, Mann-Whitney-U-Test)

3.2. Häufigkeiten der Tc17-Zellen bei Myasthenie-Patienten im Vergleich zu Gesunden

Die Tc17-Zellen wurden in dieser Arbeit als $CD3^+CD8^+IL17^+IFN\gamma^-$ definiert. Da für CD8+ T-Zellen jedoch neben einer IL17-Produktion auch die Produktion von IFNγ beschrieben wurde ($CD3^+CD8^+IL17^+IFN\gamma^+$), sind diese Zellen im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls untersucht worden. Sie werden im Folgenden IFNγ-produzierende Tc17-Zellen genannt.

3.2.1. Gesunde und MG-Patienten zeigen keine signifikant unterschiedliche Tc17-Zellzahl oder -frequenz

Für diese Zellpopulation ergeben sich in der Betrachtung der Gesunden und der Gesamtpopulation der MG-Patienten keine signifikanten Unterschiede (siehe Abbildungen 7a und 7b).



Abbildungen 7a und 7b: Zahl (7a, links) und Anteil (7b, rechts) der Tc17-Zellen ($IL17^+IFN\gamma^-$) und der IFNγ-produzierenden Tc17-Zellen ($IL17^+IFN\gamma^+$) unter den $CD8^+$ Zellen bei Gesunden (Kon) und bei Patienten (Pat). Signifikante Unterschiede zeigten sich hier nicht. (7a: Kon n=21, Pat n=25, Mann-Whitney-U-Test; 7b: Kon n=21, Pat n=26, Mann-Whitney-U-Test)

3.2.2. Tc17-Zellzahl ist bei MG-Patienten ohne Thymektomie vermindert

Die Tc17-Zellen sind bei Patienten ohne Thymektomie in ihrer Zahl (0,36 Zellen/µl Blut) im Vergleich zu Gesunden (0,74 Zellen/µl Blut), aber auch im Vergleich zu Patienten nach Thymektomie (0,65 Zellen/µl Blut), signifikant verringert. Die Zahl der Tc17-Zellen von Gesunden, verglichen mit Patienten nach Thymektomie, unterscheidet sich jedoch nicht signifikant (siehe Abbildung 8). Bei dem Vergleich der absoluten Zellzahlen der IFNγ-produzierenden Tc17-Zellen zeigen sich zwischen Gesunden (n=21), Patienten ohne Thymektomie (n=7) und Patienten mit Thymektomie (n=18) keine signifikanten Unterschiede (Kruskal-Wallis-Test). Bei dem Vergleich des relativen Anteils der Tc17-Zellen und der IFNγ-produzierenden Tc17-Zellen an den $CD8^+$ Zellen zeigen sich zwischen Gesunden (n=21), Patienten ohne

Thymektomie (n=7) und Patienten mit Thymektomie (n=19) keine signifikanten Unterschiede (Kruskal-Wallis-Test).

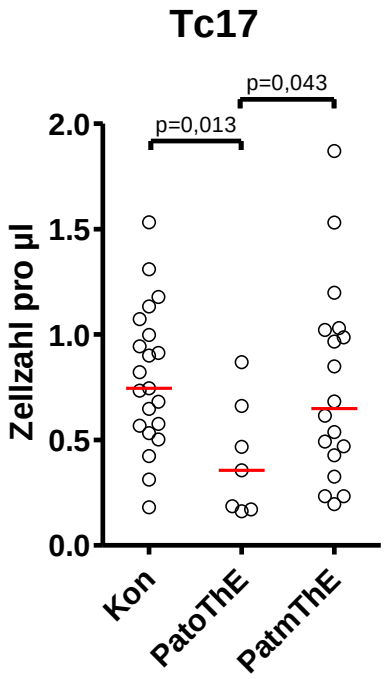


Abbildung 8: Zahl der Tc17-Zellen bei Gesunden (Kon), bei Patienten ohne (PatoThE) und bei Patienten mit Thymektomie (PatmThE). Die Klammern bezeichnen die sich signifikant unterscheidenden Gruppen mit Angabe des jeweiligen Signifikanzwertes p. (Kon n=21, PatoThE n=7, PatmThE n=18, Kruskal-Wallis-Test, Mann-Whitney-U-Test)

3.2.3. Tc17-Zellzahl und -frequenz sind bei MG-Patienten unter medikamentöser immunsuppressiver Therapie nicht signifikant verändert

In Bezug auf die unterschiedlichen Medikamente zeigten sich in dieser Arbeit für Tc17-Zellen und für IFNγ-produzierende Tc17-Zellen keine signifikanten Unterschiede (siehe Abbildungen 9a, 9b, 9c und 9d).

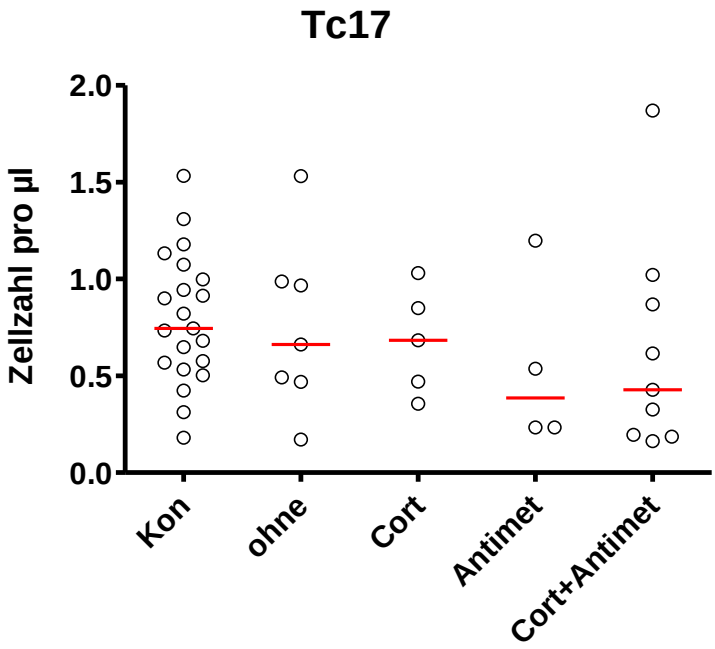


Abbildung 9a: Zahl der Tc17-Zellen bei Gesunden (Kon), bei Patienten ohne Immunsuppressiva (ohne), bei Patienten, die nur Glukokortikosteroide einnehmen (Cort), bei Patienten, die nur Antimetabolite einnehmen (Antimet) und bei Patienten, die Glukokortikosteroide und Antimetabolite zusammen einnehmen (Cort+Antimet). Signifikante Unterschiede zeigten sich hier nicht. (Kon n=21, ohne n=7, Cort n=5, Antimet n=4, Cort+Antimet n=9, Kruskal-Wallis-Test)

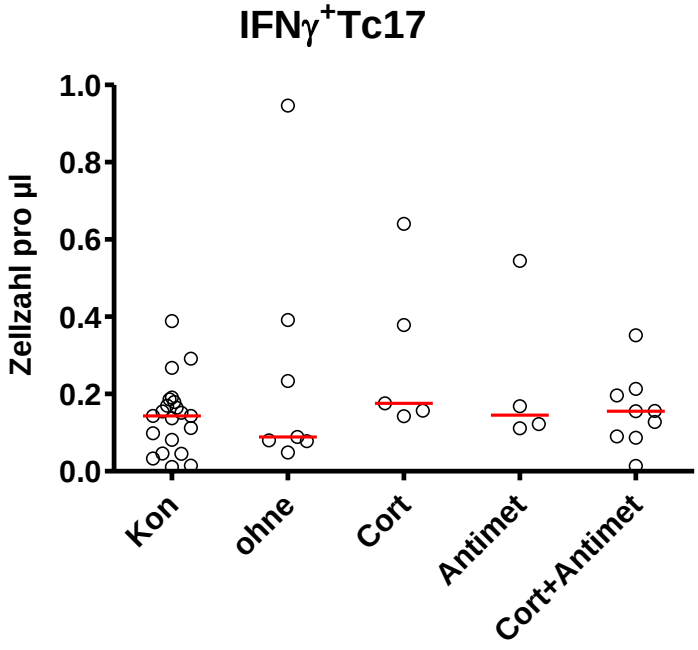


Abbildung 9b: Zahl der IFNγ-produzierenden Tc17-Zellen bei Gesunden (Kon), bei Patienten ohne Immunsuppressiva (ohne), bei Patienten, die nur Glukokortikosteroide einnehmen (Cort), bei Patienten, die nur Antimetabolite einnehmen (Antimet) und bei Patienten, die Glukokortikosteroide und Antimetabolite zusammen einnehmen (Cort+Antimet). Signifikante Unterschiede zeigten sich hier nicht. (Kon n=21, ohne n=7, Cort n=5, Antimet n=4, Cort+Antimet n=9, Kruskal-Wallis-Test)

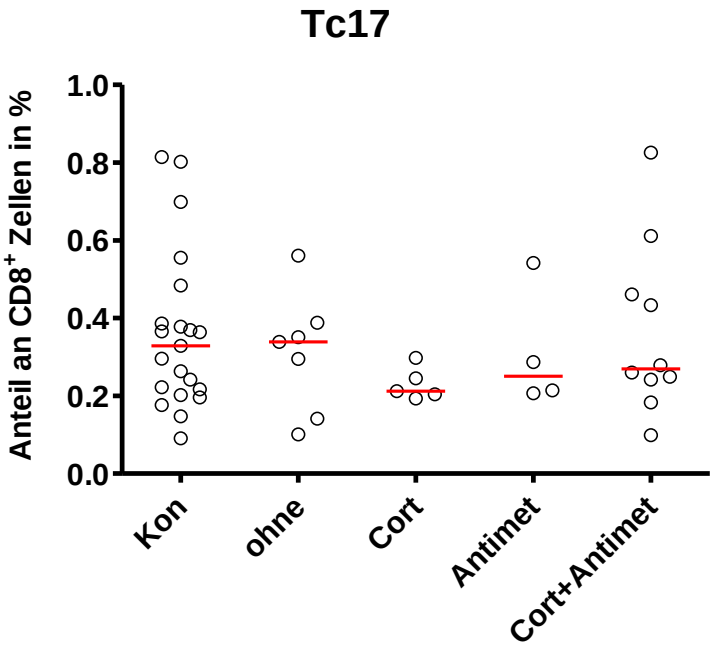


Abbildung 9c: Anteil der Tc17-Zellen unter den $CD8^+$ Zellen bei Gesunden (Kon), bei Patienten ohne Immunsuppressiva (ohne), bei Patienten, die nur Glukokortikosteroide einnehmen (Cort), bei Patienten, die nur Antimetabolite einnehmen (Antimet) und bei Patienten, die Glukokortikosteroide und Antimetabolite zusammen einnehmen (Cort+Antimet). Signifikante Unterschiede zeigten sich hier nicht. (Kon n=21, ohne n=7, Cort n=5, Antimet n=4, Cort+Antimet n=10, Kruskal-Wallis-Test)

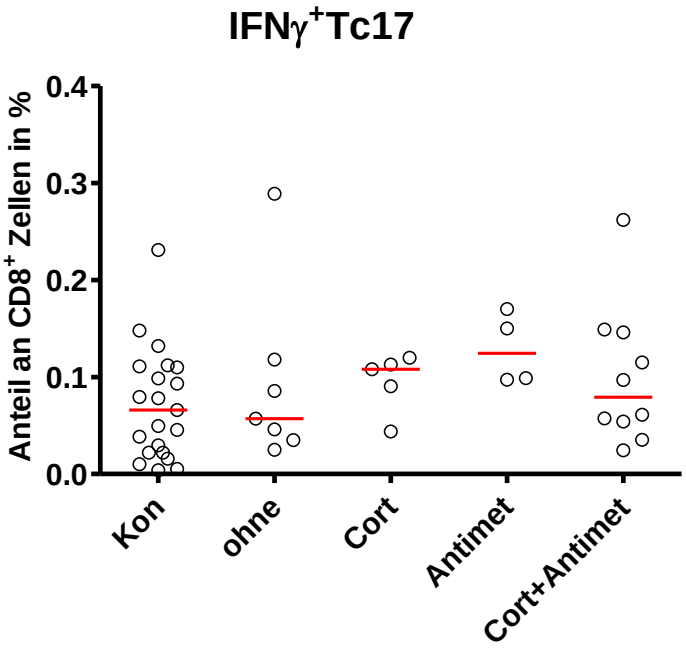


Abbildung 9d: Anteil der IFNγ-produzierenden Tc17-Zellen unter den $CD8^+$ Zellen bei Gesunden (Kon), bei Patienten ohne Immunsuppressiva (ohne), bei Patienten, die nur Glukokortikosteroide einnehmen (Cort), bei Patienten, die nur Antimetabolite einnehmen (Antimet) und bei Patienten, die Glukokortikosteroide und Antimetabolite zusammen einnehmen (Cort+Antimet). Signifikante Unterschiede zeigten sich hier nicht. (Kon n=21, ohne n=7, Cort n=5, Antimet n=4, Cort+Antimet n=10, Kruskal-Wallis-Test)

3.3. Häufigkeiten der $CD4^+CD161^+$ Zellen bei Myasthenie-Patienten im Vergleich zu Gesunden

Innerhalb der Population der $CD4^+CD161^+$ Zellen finden sich die Th17-Zellen.

3.3.1. $CD4^+CD161^+$ Zellzahl ist bei MG-Patienten vermindert

Die Zahl der $CD4^+CD161^+$ Zellen, zu denen Th17-Zellen gehören, ist bei den MG-Patienten signifikant geringer (86,3 Zellen/µl Blut) im Vergleich zu den Gesunden (117,2 Zellen/µl Blut) (siehe Abbildung 10). Bei dem Vergleich des relativen Anteils der $CD4^+CD161^+$ Zellen an den $CD4^+$ Zellen zeigen sich zwischen Gesunden (n=25) und MG-Patienten (n=49) keine signifikanten Unterschiede (Mann-Whitney-U-Test).

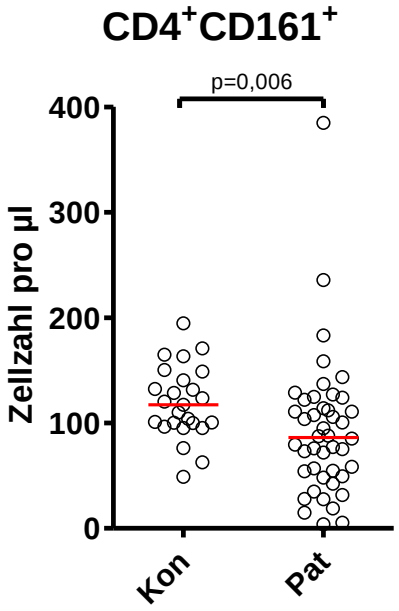


Abbildung 10: Zahl der $CD4^+CD161^+$ Zellen bei Gesunden (Kon) und bei Patienten (Pat). Die Klammer bezeichnet den signifikanten Unterschied zwischen den beiden Populationen mit Angabe des Signifikanzwertes p. (Kon n=25, Pat n=44, Mann-Whitney-U-Test)

3.3.2. $CD4^+CD161^+$ Zellzahl ist bei MG-Patienten ohne Thymektomie und bei MG-Patienten mit Thymektomie reduziert

Patienten ohne Thymektomie (71,0 Zellen/µl Blut) und Patienten nach Thymektomie (86,7 Zellen/µl Blut) haben eine signifikant verringerte Zellzahl im Vergleich zu Gesunden (117,2 Zellen/µl Blut). Patienten nach Thymektomie haben eine erhöhte Zahl an $CD4^+CD161^+$ Zellen im Vergleich zu Patienten ohne Thymektomie, dieser

Unterschied ist jedoch nicht signifikant (siehe Abbildung 11). Bei dem Vergleich des relativen Anteils der $CD4^+CD161^+$ Zellen an den $CD4^+$ Zellen zeigen sich zwischen Gesunden (n=25), Patienten ohne Thymektomie (n=16) und Patienten mit Thymektomie (n=33) keine signifikanten Unterschiede (Kruskal-Wallis-Test).

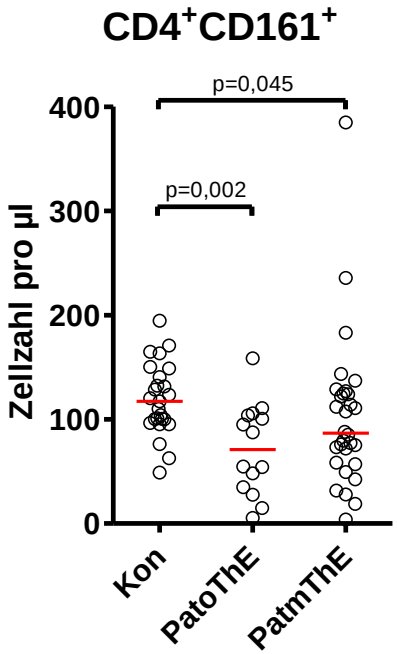


Abbildung 11: Zahl der $CD4^+CD161^+$ Zellen bei Gesunden (Kon), bei Patienten ohne (PatoThE) und bei Patienten mit Thymektomie (PatmThE). Die Klammern bezeichnen die sich signifikant unterscheidenden Gruppen mit Angabe des jeweiligen Signifikanzwertes p. (Kon n=25, PatoThE n=14, PatmThE n=30, Kruskal-Wallis-Test, Mann-Whitney-U-Test)

3.3.3. $CD4^+CD161^+$ Zellen sind bei MG-Patienten unter medikamentöser immunsuppressiver Therapie in Zahl und Frequenz reduziert

Patienten, die immunsuppressive Medikamente einnehmen, haben eine signifikant geringere Zellzahl und einen signifikant geringeren Anteil der $CD4^+CD161^+$ Zellen an den $CD4^+$ Zellen im Vergleich zu gesunden Probanden. Bei Patienten ohne Immunsuppression zeigt sich demgegenüber kein signifikanter Unterschied im Vergleich zu den Gesunden (siehe Abbildungen 12a, 12b, und 12c).

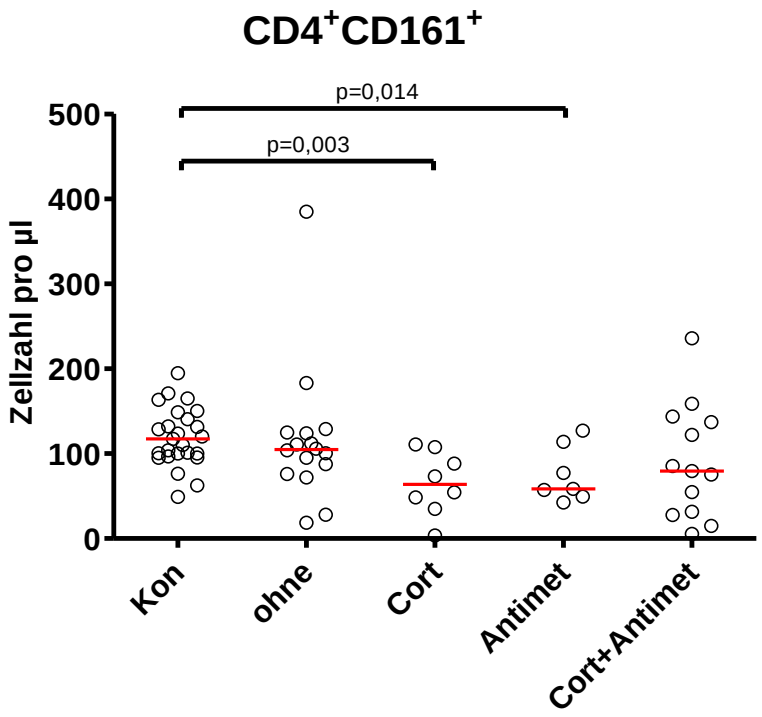


Abbildung 12a: Zahl der $CD4^+CD161^+$ Zellen bei Gesunden (Kon), bei Patienten ohne Immunsuppressiva (ohne), bei Patienten, die nur Glukokortikosteroide einnehmen (Cort), bei Patienten, die nur Antimetabolite einnehmen (Antimet) und bei Patienten, die Glukokortikosteroide und Antimetabolite zusammen einnehmen (Cort+Antimet). Die Klammern bezeichnen die sich signifikant unterscheidenden Gruppen mit Angabe des jeweiligen Signifikanzwertes p. (Kon n=25, ohne n=16, Cort n=8, Antimet n=7, Cort+Antimet n=13, Kruskal-Wallis-Test, Mann-Whitney-U-Test)

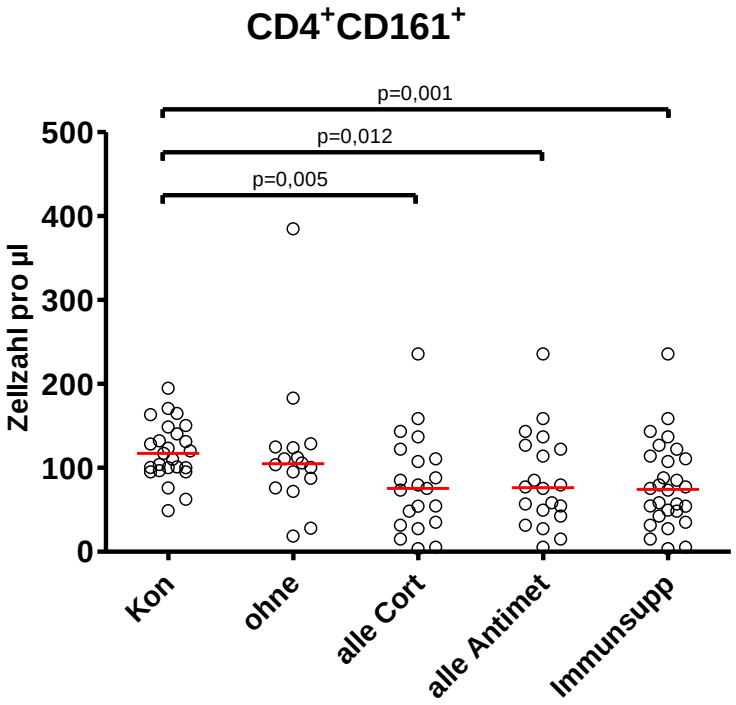


Abbildung 12b: Zahl der $CD4^+CD161^+$ Zellen bei Gesunden (Kon), bei Patienten ohne Immunsuppressiva (ohne), bei Patienten, die nur Glukokortikosteroide einnehmen, zusammengefasst mit Patienten, die Glukokortikosteroide und Antimetabolite gemeinsam einnehmen (alle Cort), bei Patienten, die nur Antimetabolite einnehmen, zusammengefasst mit Patienten, die Glukokortikosteroide und Antimetabolite gemeinsam einnehmen (alle Antimet) und bei Patienten, die nur Glukokortikosteroide einnehmen, zusammengefasst mit Patienten, die nur Antimetabolite einnehmen und zusammengefasst mit Patienten, die Glukokortikosteroide und Antimetabolite gemeinsam einnehmen (Immunsupp). Die Klammern bezeichnen die sich signifikant unterscheidenden Gruppen mit Angabe des jeweiligen Signifikanzwertes p. (Kon n=25, ohne n=16, alle Cort n=21, alle Antimet n=20, Immunsupp n=28, Kruskal-Wallis-Test, Mann-Whitney-U-Test)

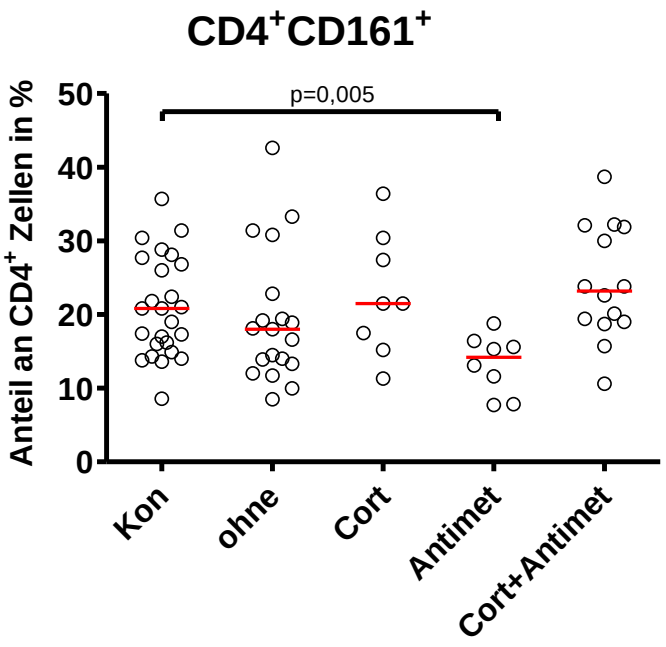


Abbildung 12c: Anteil der $CD4^+CD161^+$ Zellen unter den $CD4^+$ Zellen bei Gesunden (Kon), bei Patienten ohne Immunsuppressiva (ohne), bei Patienten, die nur Glukokortikosteroide einnehmen (Cort), bei Patienten, die nur Antimetabolite einnehmen (Antimet) und bei Patienten, die Glukokortikosteroide und Antimetabolite zusammen einnehmen (Cort+Antimet). Die Klammer bezeichnet die sich signifikant unterscheidenden Gruppen mit Angabe des Signifikanzwertes p. (Kon n=25, ohne n=19, Cort n=8, Antimet n=8, Cort+Antimet n=14, Kruskal-Wallis-Test, Mann-Whitney-U-Test)

3.4. Häufigkeiten der $CD3^+CD8^-IL17^+IFN\gamma^-$ Zellen bei Myasthenie-Patienten im Vergleich zu Gesunden

In der vorliegenden Arbeit wurde auch die Zahl und Frequenz an $CD3^+CD8^-$ Zellen bestimmt, welche zwar IL17 aber nicht IFNγ produzieren. Hierunter fallen sowohl $CD4^+IL17^+$ Zellen, wie Th17, als auch $CD4^-CD8^-IL17^+$ Zellen, wie IL17-produzierende T-Zellen mit einem γδTCR. Wobei letztere an der Population der $CD3^+CD8^-$ nur einen deutlich geringeren Anteil ausmachen.

3.4.1. $CD3^+CD8^-IL17^+IFN\gamma^-$ Zellzahl ist bei MG-Patienten vermindert

Die $CD3^+CD8^-IL17^+IFN\gamma^-$ Zellen zeigen sich in ihrer Zahl bei den MG-Patienten (4,1 Zellen/µl Blut) im Gegensatz zu den Gesunden (8,0 Zellen/µl Blut) signifikant verringert (siehe Abbildung 13). Bei dem Vergleich des relativen Anteils der $CD3^+CD8^-IL17^+IFN\gamma^-$ Zellen an den $CD8^-$ Zellen zeigen sich zwischen Gesunden

(n=21) und MG-Patienten (n=26) keine signifikanten Unterschiede (Mann-Whitney-U-Test).

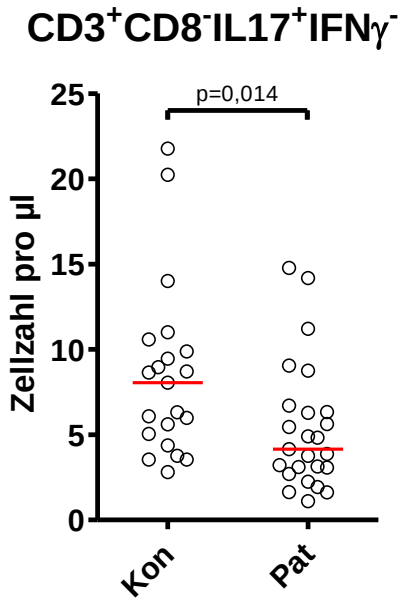


Abbildung 13: Zahl der $CD3^+CD8^-IL17^+IFN\gamma^-$ Zellen bei Gesunden (Kon) und bei Patienten (Pat). Die Klammer bezeichnet den signifikanten Unterschied zwischen den beiden Populationen mit Angabe des Signifikanzwertes p. (Kon n=21, Pat n=25, Mann-Whitney-U-Test)

3.4.2. $CD3^+CD8^-IL17^+IFN\gamma^-$ Zellzahl ist bei MG-Patienten ohne Thymektomie vermindert

Patienten ohne Thymektomie haben eine signifikant geringere Zahl der $CD3^+CD8^-IL17^+IFN\gamma^-$ Zellen (3,8 Zellen/µl Blut) im Vergleich zu Gesunden und eine nicht signifikant verringerte Zellzahl im Vergleich zu den Patienten mit Thymektomie (4,8 Zellen/µl Blut). Bei Patienten, bei denen eine Thymektomie durchgeführt wurde, zeigt sich im Vergleich zu den Gesunden kein signifikanter Unterschied (siehe Abbildung 14). Bei dem Vergleich des relativen Anteils der $CD3^+CD8^-IL17^+IFN\gamma^-$ Zellen an den $CD8^-$ Zellen zeigen sich zwischen Gesunden (n=21), Patienten ohne Thymektomie (n=7) und Patienten mit Thymektomie (n=19) keine signifikanten Unterschiede (Kruskal-Wallis-Test).

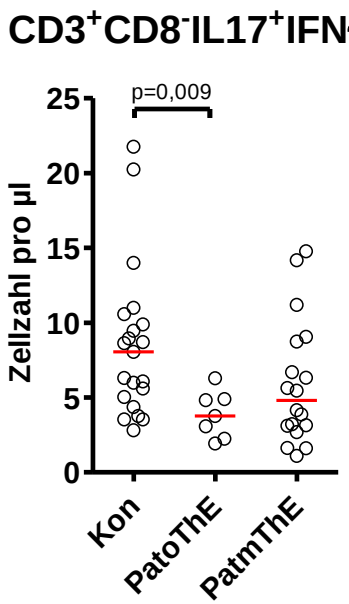


Abbildung 14: Zahl der $CD3^+CD8^-IL17^+IFN\gamma^-$ Zellen bei Gesunden (Kon), bei Patienten ohne (PatoThE) und bei Patienten mit Thymektomie (PatmThE). Die Klammer bezeichnet die sich signifikant unterscheidenden Gruppen mit Angabe des Signifikanzwertes p. (Kon n=21, PatoThE n=7, PatmThE n=18, Kruskal-Wallis-Test, Mann-Whitney-U-Test)

3.4.3. $CD3^+CD8^-IL17^+IFN\gamma^-$ Zellzahl ist bei MG-Patienten unter medikamentöser immunsuppressiver Therapie reduziert

Patienten unter medikamentöser immunsuppressiver Therapie haben eine signifikant geringere Zahl der $CD3^+CD8^-IL17^+IFN\gamma^-$ Zellen als Gesunde (siehe Abbildung 15). Bei dem Vergleich des relativen Anteils der $CD3^+CD8^-IL17^+IFN\gamma^-$ Zellen an den $CD8^-$ Zellen zeigen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen Gesunden (n=21), Patienten ohne Immunsuppressiva (n=7) und Patienten unter immunsuppressiver Therapie (Patienten, die nur Glukokortikosteroide einnehmen (n=5); Patienten, die nur Antimetabolite einnehmen (n=4); Patienten, die Glukokortikosteroide und Antimetabolite zusammen einnehmen (n=10); Patienten, die nur Glukokortikosteroide einnehmen, zusammengefasst mit Patienten, die Glukokortikosteroide und Antimetabolite gemeinsam einnehmen (n=15); Patienten, die nur Antimetabolite einnehmen, zusammengefasst mit Patienten, die Glukokortikosteroide und Antimetabolite gemeinsam einnehmen (n=14); Patienten, die nur Glukokortikosteroide einnehmen, zusammengefasst mit Patienten, die nur Antimetabolite einnehmen und zusammengefasst mit Patienten, die Glukokortikosteroide und Antimetabolite gemeinsam einnehmen (n=19); Kruskal-Wallis-Test).

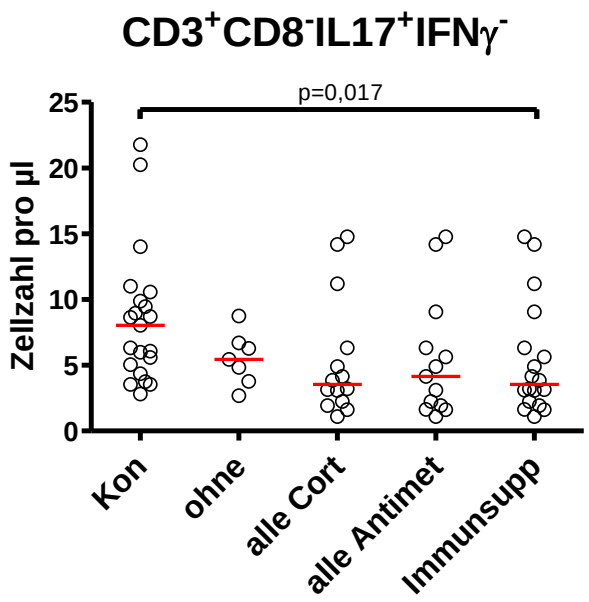
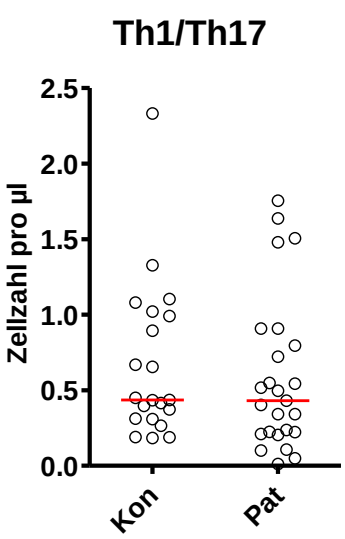
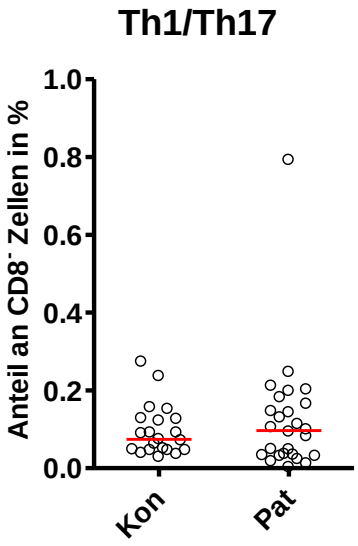


Abbildung 15: Zahl der $CD3^{+}CD8^{-}IL17^{+}IFN\gamma^{-}$ Zellen bei Gesunden (Kon), bei Patienten ohne Immunsuppressiva (ohne), bei Patienten, die nur Glukokortikosteroide einnehmen, zusammengefasst mit Patienten, die Glukokortikosteroide und Antimetabolite gemeinsam einnehmen (alle Cort), bei Patienten, die nur Antimetabolite einnehmen, zusammengefasst mit Patienten, die Glukokortikosteroide und Antimetabolite gemeinsam einnehmen (alle Antimet) und bei Patienten, die nur Glukokortikosteroide einnehmen, zusammengefasst mit Patienten, die nur Antimetabolite einnehmen und zusammengefasst mit Patienten, die Glukokortikosteroide und Antimetabolite gemeinsam einnehmen (Immunsupp). Die Klammer bezeichnet die sich signifikant unterscheidenden Gruppen mit Angabe des Signifikanzwertes p. (Kon n=21, ohne n=7, alle Cort n=14, alle Antimet n=13, Immunsupp n=18, Kruskal-Wallis-Test, Mann-Whitney-U-Test)

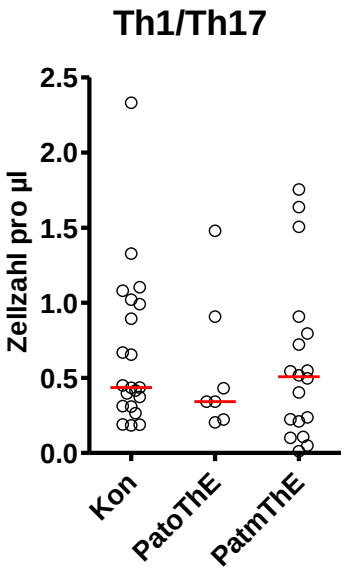
3.5. Häufigkeiten der Th1/Th17-Zellen bei Myasthenie-Patienten im Vergleich zu Gesunden

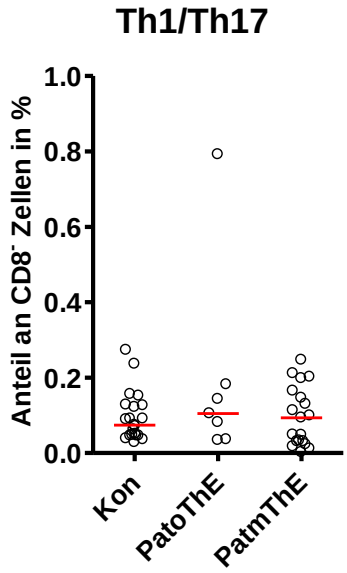
Th1/Th17-Zellen wurden in dieser Arbeit definiert als $CD3^{+}CD8^{-}IL17^{+}IFN\gamma^{+}$ Zellen. Für die Th1/Th17-Zellen fanden sich im Rahmen dieser Arbeit keine signifikanten Unterschiede in der Zellzahl und -frequenz, weder bei der Betrachtung der Gesunden und aller MG-Patienten noch bei dem Vergleich von Gesunden mit Patienten ohne Thymektomie und zu Patienten mit Thymektomie und auch nicht im Vergleich von Gesunden und Patienten in Bezug auf die unterschiedliche Medikamenteneinnahme. Diese Ergebnisse werden in den Abbildungen 16a, 16b, 16c, 16d, 16e und 16f dargestellt.





Abbildungen 16a und 16b: Zahl (16a, links) und Anteil (16b, rechts) der Th1/Th17-Zellen unter den $CD8^-$ Zellen bei Gesunden (Kon) und bei Patienten (Pat). Signifikante Unterschiede zeigten sich hier nicht. (16a: Kon n=21, Pat n=25, Mann-Whitney-U-Test; 16b: Kon n=21, Pat n=26, Mann-Whitney-U-Test)





Abbildungen 16c und 16d: Zahl (16c, links) und Anteil (16d, rechts) der Th1/Th17-Zellen unter den $CD8^-$ Zellen bei Gesunden (Kon), bei Patienten ohne (PatoThE) und bei Patienten mit Thymektomie (PatmThE). Signifikante Unterschiede zeigten sich hier nicht. (16c: Kon n=21, PatoThE n=7, PatmThE n=18, Kruskal-Wallis-Test; 16d: Kon n=21, PatoThE n=7, PatmThE n=19, Kruskal-Wallis-Test)

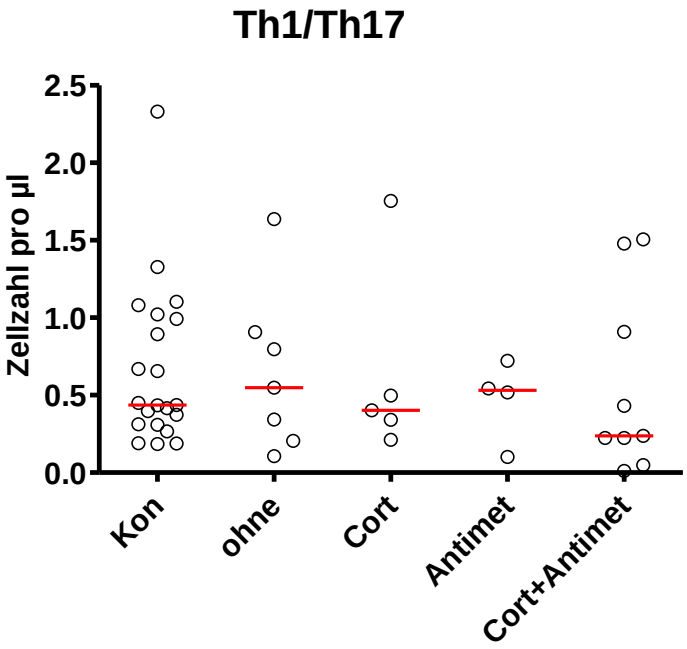


Abbildung 16e: Zahl der Th1/Th17-Zellen bei Gesunden (Kon), bei Patienten ohne Immunsuppressiva (ohne), bei Patienten, die nur Glukokortikosteroide einnehmen (Cort), bei Patienten, die nur Antimetabolite einnehmen (Antimet) und bei Patienten, die Glukokortikosteroide und Antimetabolite zusammen einnehmen (Cort+Antimet). Signifikante Unterschiede zeigten sich hier nicht. (Kon n=21, ohne n=7, Cort n=5, Antimet n=4, Cort+Antimet n=9, Kruskal-Wallis-Test)

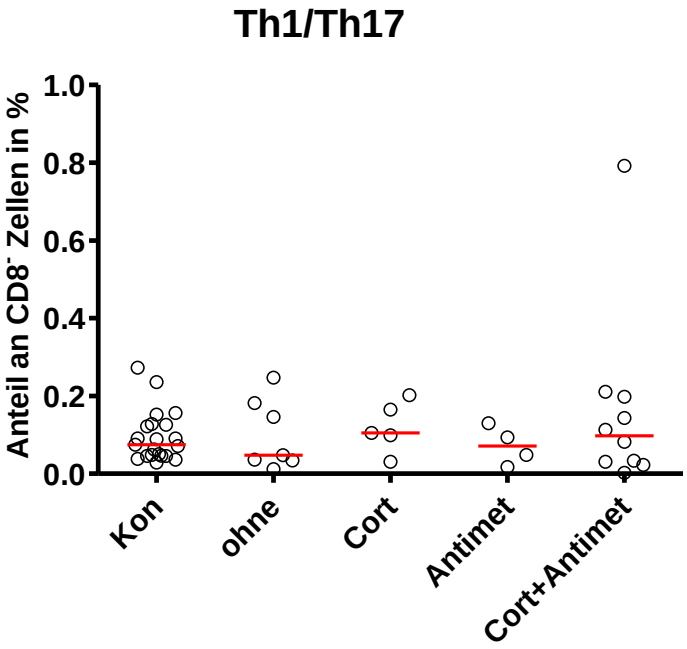


Abbildung 16f: Anteil der Th1/Th17-Zellen unter den $CD8^-$ Zellen bei Gesunden (Kon), bei Patienten ohne Immunsuppressiva (ohne), bei Patienten, die nur Glukokortikosteroide einnehmen (Cort), bei Patienten, die nur Antimetabolite einnehmen (Antimet) und bei Patienten, die Glukokortikosteroide und Antimetabolite zusammen einnehmen (Cort+Antimet). Signifikante Unterschiede zeigten sich hier nicht. (Kon n=21, ohne n=7, Cort n=5, Antimet n=4, Cort+Antimet n=10, Kruskal-Wallis-Test)

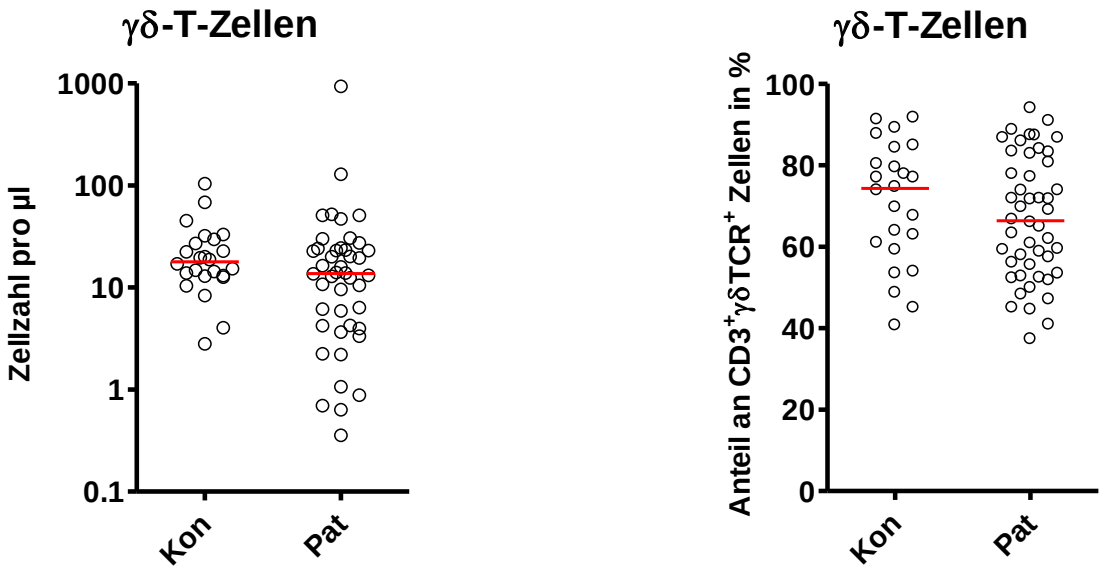
3.6. Häufigkeiten der γδ-T-Zellen bei Myasthenie-Patienten im Vergleich zu Gesunden

In Rahmen dieser Arbeit wurden $CD3^+$ T-Lymphozyten auf die Expression des γδ-TCR in Verbindung mit den Korezeptoren CD4 und CD8 untersucht. Die in den Abschnitten 3.2. und 3.4. genannten Zellpopulationen der $CD3^+CD8^+IL17^+IFN\gamma^-$ Zellen und $CD3^+CD8^-IL17^+IFN\gamma^-$ Zellen könnten prinzipiell jeweils auch γδ-T-Zellen mit einschließen. Da aber in dieser Arbeit ein eigens zur Bestimmung von γδ-T-Zellen angelegtes Zellfärbeschema benutzt wurde (siehe Abschnitt 2.3.3., Färbeschema 3), konnte diese Zellpopulation eindeutig identifiziert werden. Die Tabelle 5 zeigt die Korezeptorexpression unter den γδ-T-Zellen, wie sie in der vorliegenden Arbeit nachgewiesen wurde.

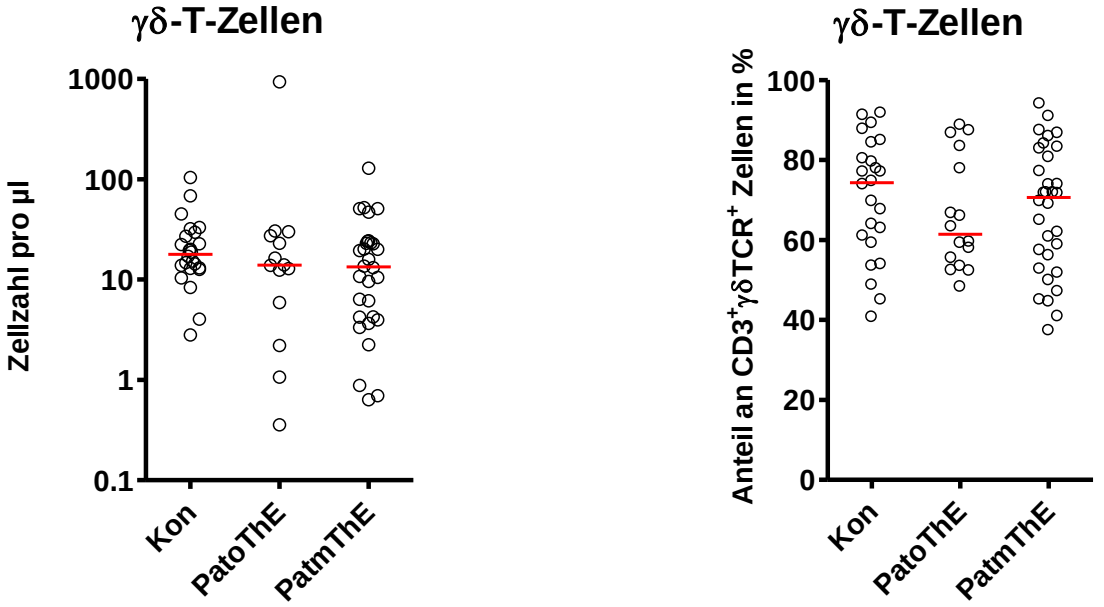
Korezeptorexpression	**$CD4^+CD8^-$**	**$CD4^-CD8^+$**	**$CD4^-CD8^-$**
Gesunde	0,2	24,4	74,3
MG-Patienten	0,5	32,7	66,4

Tabelle 5: Anteil (Median in %) der Korezeptorexpression unter den $\gamma\delta TCR^+$ Zellen bei den Gesunden und den Patienten mit MG (in dieser Aufstellung keine signifikanten Unterschiede)

Für die γδ-T-Zellen fanden sich im Rahmen dieser Arbeit keine signifikanten Unterschiede, weder bei der Betrachtung der Gesunden und aller MG-Patienten noch bei dem Vergleich von Gesunden mit Patienten ohne Thymektomie und zu Patienten mit Thymektomie und auch nicht im Vergleich von Gesunden und Patienten in Bezug auf die unterschiedliche Medikamenteneinnahme. Diese Ergebnisse werden in den Abbildungen 17a, 17b, 17c, 17d, 17e und 17f dargestellt. Dargestellt wurden nur die $CD4^-CD8^-$ γδ-T-Zellen, da diese die Mehrheit der γδ-T-Zellen repräsentieren.



Abbildungen 17a und 17b: Zahl (17a, links) und Anteil (17b, rechts) der $CD4^-CD8^-$ γδ-T-Zellen unter den $CD3^+γδTCR^+$ Zellen bei Gesunden (Kon) und bei Patienten (Pat). Signifikante Unterschiede zeigten sich hier nicht. (17a: log^{10}-Einteilung der y-Achse; Kon n=24, Pat n=44, Mann-Whitney-U-Test; 17b: Kon n=24, Pat n=48, Mann-Whitney-U-Test)



Abbildungen 17c und 17d: Zahl (17c, links) und Anteil (17d, rechts) der $CD4^-CD8^-$ γδ-T-Zellen unter den $CD3^+γδTCR^+$ Zellen bei Gesunden (Kon), bei Patienten ohne (PatoThE) und bei Patienten mit Thymektomie (PatmThE). Signifikante Unterschiede zeigten sich hier nicht. (17c: log^{10}-Einteilung der y-Achse; Kon n=24, PatoThE n=14, PatmThE n=30, Kruskal-Wallis-Test; 17d: Kon n=24, PatoThE n=16, PatmThE n=32, Kruskal-Wallis-Test)

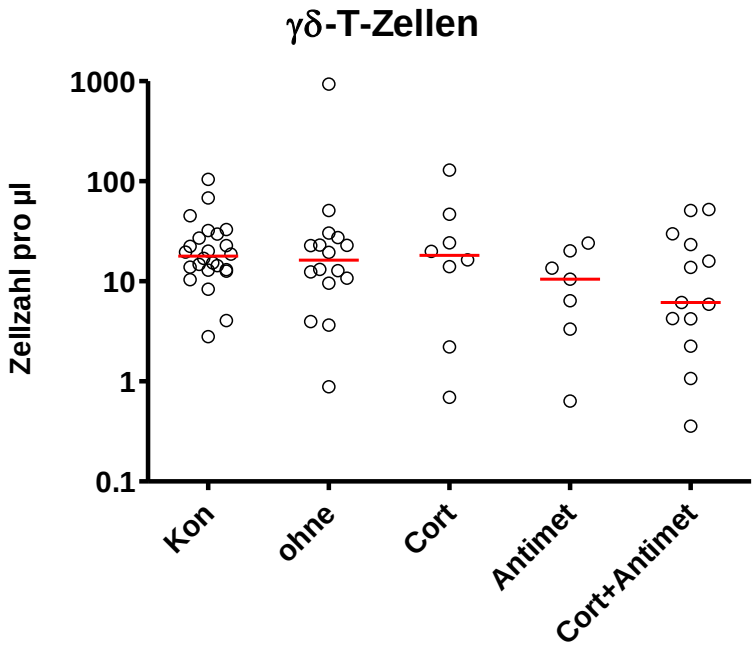


Abbildung 17e: Zahl der $CD4^-CD8^-$ γδ-T-Zellen bei Gesunden (Kon), bei Patienten ohne Immunsuppressiva (ohne), bei Patienten, die nur Glukokortikosteroide einnehmen (Cort), bei Patienten, die nur Antimetabolite einnehmen (Antimet) und bei Patienten, die Glukokortikosteroide und Antimetabolite zusammen einnehmen (Cort+Antimet). Signifikante Unterschiede zeigten sich hier nicht. (log^{10}-Einteilung der y-Achse; Kon n=24, ohne n=16, Cort n=8, Antimet n=7, Cort+Antimet n=13, Kruskal-Wallis-Test)

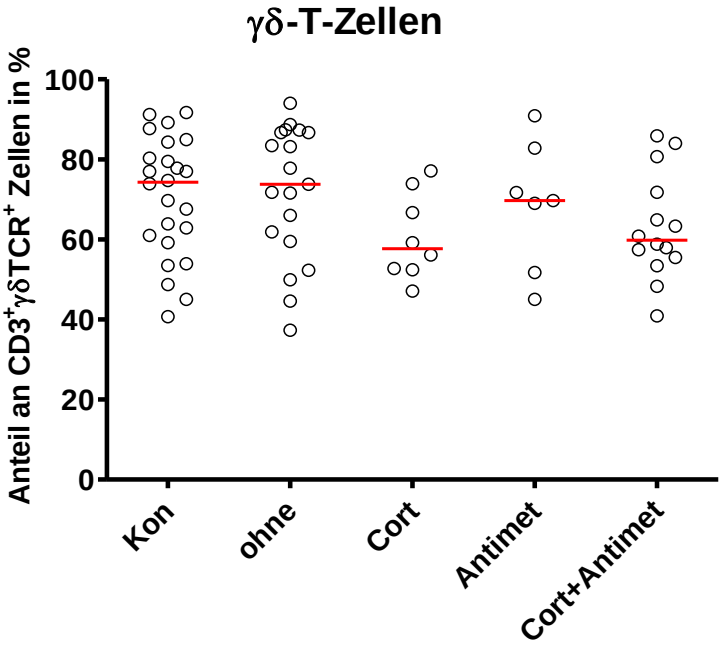


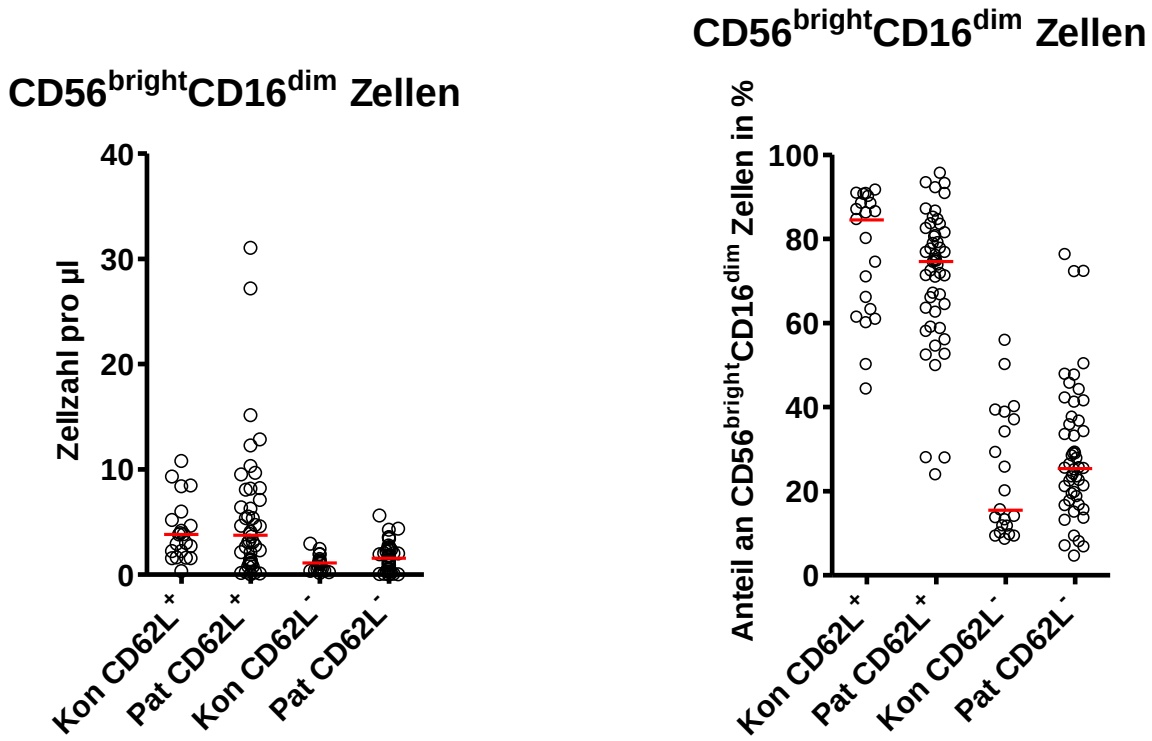
Abbildung 17f: Anteil der $CD4^-CD8^-$ γδ-T-Zellen unter den $CD3^+\gamma\delta TCR^+$ Zellen bei Gesunden (Kon), bei Patienten ohne Immunsuppressiva (ohne), bei Patienten, die nur Glukokortikosteroide einnehmen (Cort), bei Patienten, die nur Antimetabolite einnehmen (Antimet) und bei Patienten, die Glukokortikosteroide und Antimetabolite zusammen einnehmen (Cort+Antimet). Signifikante Unterschiede zeigten sich hier nicht. (Kon n=24, ohne n=19, Cort n=8, Antimet n=7, Cort+Antimet n=14, Kruskal-Wallis-Test)

3.7. Häufigkeiten der NK-Zellen bei Myasthenie-Patienten im Vergleich zu Gesunden

NK-Zellen gehören zur angeborenen Immunabwehr und können virusinfizierte oder Tumorzellen lysieren, ohne vorher gegen solche sensibilisiert worden zu sein und ohne Vermittlung durch Antikörper.

3.7.1. $CD56^{bright}CD16^{dim}$ Zellen zeigen keine signifikanten Unterschiede in Zellzahl oder -frequenz

Der Anteil der $CD56^{bright}CD16^{dim}$ Zellen unter den NK-Zellen ($CD56^{+}$) beträgt bei den Gesunden 6,1 % und bei den MG-Patienten 6,3 % und unterscheidet sich nicht signifikant. Die NK-Zellen unterteilen sich nach der Expression des Adhäsionsmoleküls CD62L in eine $CD62L^{+}$ und eine $CD62L^{-}$ Fraktion. Für die $CD56^{bright}CD16^{dim}$ Zellen (sowohl $CD62L^{+}$ als auch $CD62L^{-}$) fanden sich im Rahmen dieser Arbeit keine signifikanten Unterschiede, weder bei der Betrachtung der Gesunden und aller MG-Patienten noch bei dem Vergleich von Patienten ohne Thymektomie zu Patienten mit Thymektomie und auch nicht in Bezug auf die unterschiedliche Medikamenteneinnahme. Diese Ergebnisse werden in den Abbildungen 18a, 18b, 18c, 18d, 18e und 18f dargestellt.



Abbildungen 18a und 18b: Zahl (18a, links) und Anteil (18b, rechts) der $CD62L^+$ und $CD62L^-$ Zellen unter den $CD56^{bright}CD16^{dim}$ Zellen bei Gesunden (Kon) und bei Patienten (Pat). Signifikante Unterschiede zeigten sich hier nicht. (18a: Kon n=21, Pat n=44, Mann-Whitney-U-Test; 18b: Kon n=21, Pat n=49, Mann-Whitney-U-Test)

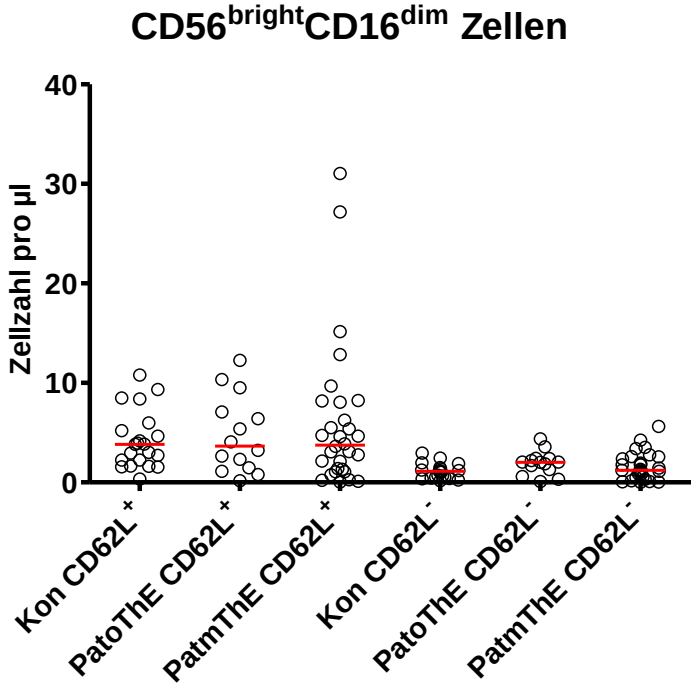


Abbildung 18c: Zahl der $CD62L^+$ und $CD62L^-$ $CD56^{bright}CD16^{dim}$ Zellen bei Gesunden (Kon), bei Patienten ohne (PatoThE) und bei Patienten mit Thymektomie (PatmThE). Signifikante Unterschiede zeigten sich hier nicht. (Kon n=21, PatoThE n=14, PatmThE n=30, Kruskal-Wallis-Test)

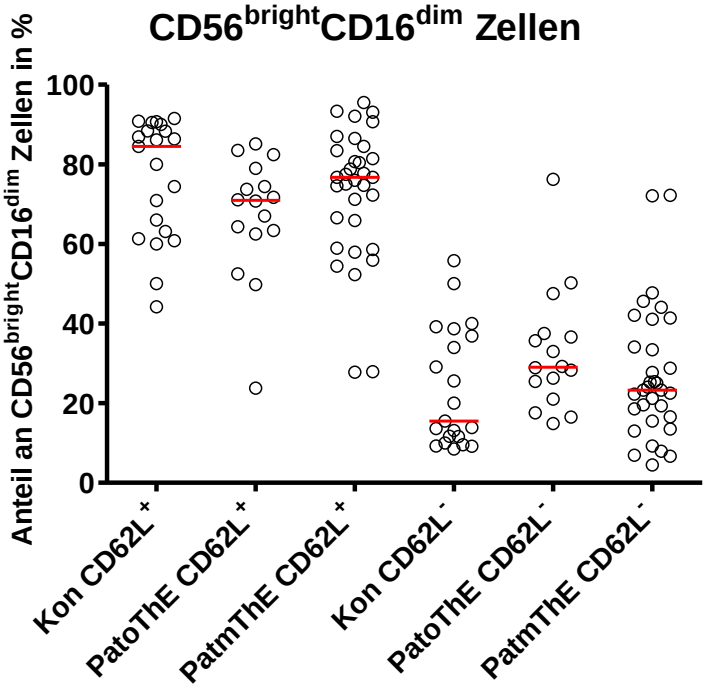


Abbildung 18d: Anteil der $CD62L^+$ und $CD62L^-$ Zellen unter den $CD56^{bright}CD16^{dim}$ Zellen bei Gesunden (Kon), bei Patienten ohne (PatoThE) und bei Patienten mit Thymektomie (PatmThE). Signifikante Unterschiede zeigten sich hier nicht. (Kon n=21, PatoThE n=16, PatmThE n=33, Kruskal-Wallis-Test)

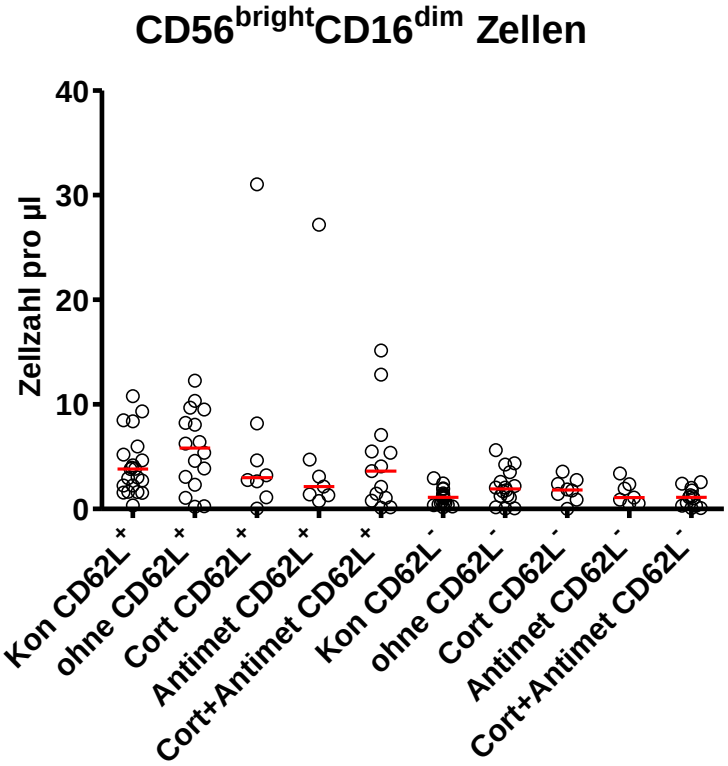


Abbildung 18e: Zahl der CD62L^{+} und CD62L^{-} CD56^{bright}CD16^{dim} Zellen bei Gesunden (Kon), bei Patienten ohne Immunsuppressiva (ohne), bei Patienten, die nur Glukokortikosteroide einnehmen (Cort), bei Patienten, die nur Antimetabolite einnehmen (Antimet) und bei Patienten, die Glukokortikosteroide und Antimetabolite zusammen einnehmen (Cort+Antimet). Signifikante Unterschiede zeigten sich hier nicht. (Kon n=21, ohne n=16, Cort n=8, Antimet n=7, Cort+Antimet n=13, Kruskal-Wallis-Test)

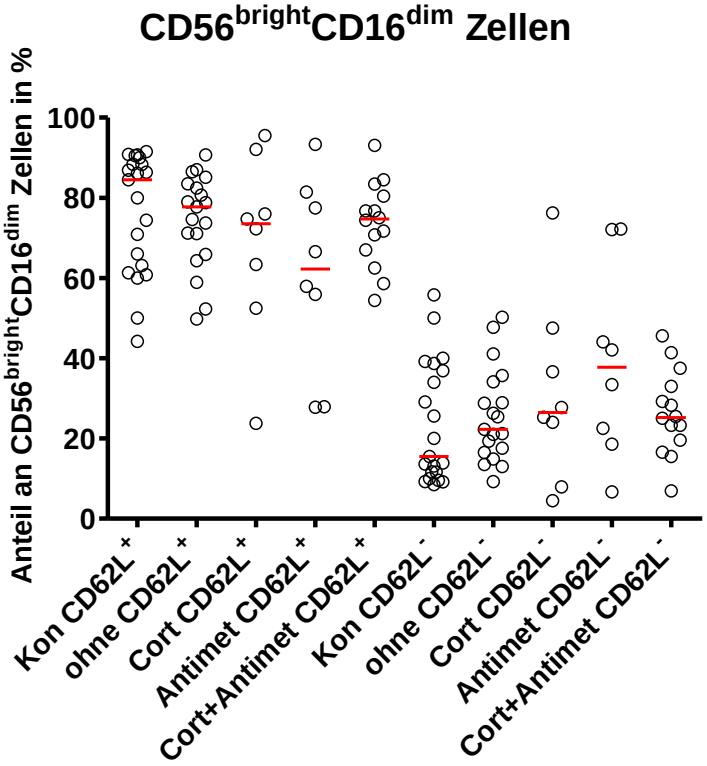
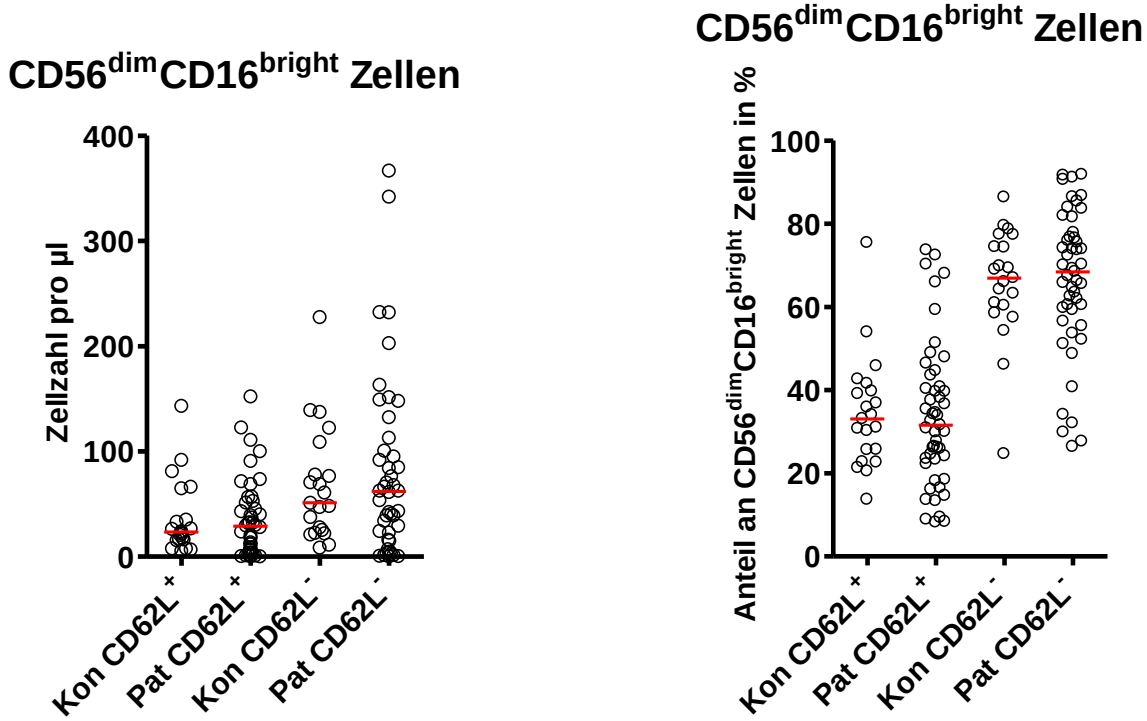


Abbildung 18f: Anteil der CD62L$^+$ und CD62L$^-$ Zellen unter den CD56^{bright}CD16^{dim} Zellen bei Gesunden (Kon), bei Patienten ohne Immunsuppressiva (ohne), bei Patienten, die nur Glukokortikosteroide einnehmen (Cort), bei Patienten, die nur Antimetabolite einnehmen (Antimet) und bei Patienten, die Glukokortikosteroide und Antimetabolite zusammen einnehmen (Cort+Antimet). Signifikante Unterschiede zeigten sich hier nicht. (Kon n=21, ohne n=19, Cort n=8, Antimet n=8, Cort+Antimet n=14, Kruskal-Wallis-Test)

3.7.2. CD56^{dim}CD16^{bright} Zellen zeigen keine signifikanten Unterschiede der Zellzahl oder -frequenz

Den größten Teil der NK-Zellen machen CD56^{dim}CD16^{bright} Zellen aus (92,1 % der CD56$^+$ bei den Gesunden und 91,7 % bei den MG-Patienten, kein signifikanter Unterschied). Auch die CD56^{dim}CD16^{bright} Zellen unterteilen sich nach der Expression des Adhäsionsmoleküls CD62L in eine CD62L$^+$ und eine CD62L$^-$ Fraktion. Für die CD56^{dim}CD16^{bright} Zellen (sowohl CD62L$^+$ als auch CD62L$^-$) fanden sich im Rahmen dieser Arbeit keine signifikanten Unterschiede bei dem Vergleich der Gesunden und aller MG-Patienten (siehe Abbildungen 19a und 19b).



Abbildungen 19a und 19b: Zahl (19a, links) und Anteil (19b, rechts) der $CD62L^+$ und $CD62L^-$ Zellen unter den $CD56^{dim}CD16^{bright}$ Zellen bei Gesunden (Kon) und bei Patienten (Pat). Signifikante Unterschiede zeigten sich hier nicht. (19a: Kon n=21, Pat n=44, Mann-Whitney-U-Test; 19b: Kon n=21, Pat n=49, Mann-Whitney-U-Test)

3.7.2.1. $CD56^{dim}CD16^{bright}$ Zellen sind bei MG-Patienten ohne Thymektomie und bei MG-Patienten mit Thymektomie in Anzahl und Frequenz signifikant verändert

Bei Patienten ohne Thymektomie beträgt der Anteil der $CD62L^+$ Zellen unter den $CD56^{dim}CD16^{bright}$ Zellen 23,35 % und ist somit signifikant geringer als der Anteil der $CD62L^+$ Zellen bei den Gesunden (33,1 %) und bei den Patienten nach Thymektomie (35,4 %). Vergleicht man Kontrollpersonen mit Patienten nach Thymektomie, so besteht kein signifikanter Unterschied (siehe Abbildung 20a). Bei dem Vergleich der absoluten Zellzahlen der $CD56^{dim}CD16^{bright}CD62L^+$ Zellen zeigen sich zwischen Gesunden (n=21), Patienten ohne Thymektomie (n=14) und Patienten mit Thymektomie (n=30) keine signifikanten Unterschiede (Kruskal-Wallis-Test).

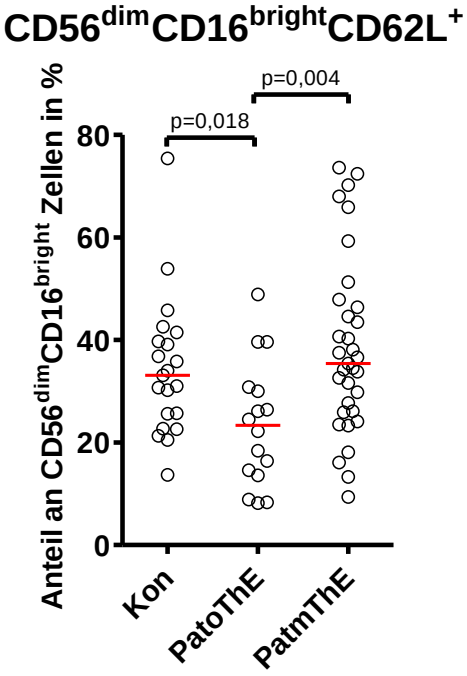
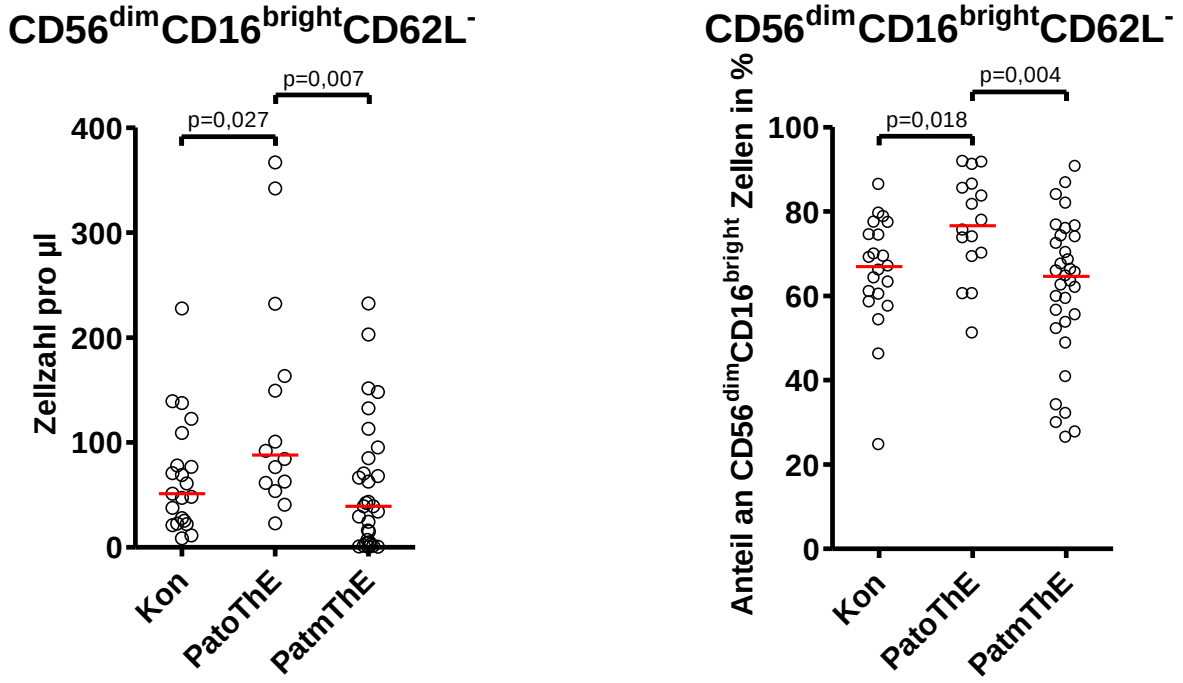


Abbildung 20a: Anteil der $CD62L^+$ Zellen unter den $CD56^{dim}CD16^{bright}$ Zellen bei Gesunden (Kon) und bei Patienten ohne (PatoThE) und bei Patienten mit Thymektomie (PatmThE). Die Klammern bezeichnen die sich signifikant unterscheidenden Gruppen mit Angabe des Signifikanzwertes p. (Kon n=21, PatoThE n=16, PatmThE n=33, Kruskal-Wallis-Test, Mann-Whitney-U-Test)

Patienten ohne Thymektomie zeigen eine signifikant höhere Zellzahl der $CD56^{dim}CD16^{bright}CD62L^-$ Zellen (88,1 Zellen/µl Blut) und einen signifikant höheren Zellanteil (76,65 % der $CD56^{dim}CD16^{bright}$ Zellen) als Gesunde (51,2 Zellen/µl Blut; 66,9 %) und Patienten mit Thymektomie (39,1 Zellen/µl Blut; 64,6 %). Zwischen Gesunden und Patienten mit Thymektomie besteht kein signifikanter Unterschied (siehe Abbildungen 20b und 20c).



Abbildungen 20b und 20c: Zahl (20b, links) und Anteil (20c, rechts) der Zellen ohne CD62L-Expression unter den $CD56^{dim}CD16^{bright}$ Zellen bei Gesunden (Kon), bei Patienten ohne (PatoThE) und bei Patienten mit Thymektomie (PatmThE). Die Klammern bezeichnen die sich signifikant unterscheidenden Gruppen mit Angabe des Signifikanzwertes p. (20b: Kon n=21, PatoThE n=14, PatmThE n=30, Kruskal-Wallis-Test, Mann-Whitney-U-Test; 20c: Kon n=21, PatoThE n=16, PatmThE n=33, Kruskal-Wallis-Test, Mann-Whitney-U-Test)

3.7.2.2. $CD56^{dim}CD16^{bright}$ Zellzahl und -frequenz sind bei MG-Patienten unter medikamentöser immunsuppressiver Therapie nicht signifikant verändert

In Bezug auf die unterschiedliche Medikamenteneinnahme zeigten sich in dieser Arbeit für $CD56^{dim}CD16^{bright}$ Zellen (weder $CD62L^-$ noch $CD62L^+$) keine signifikanten Unterschiede (siehe Abbildungen 21a und 21b).

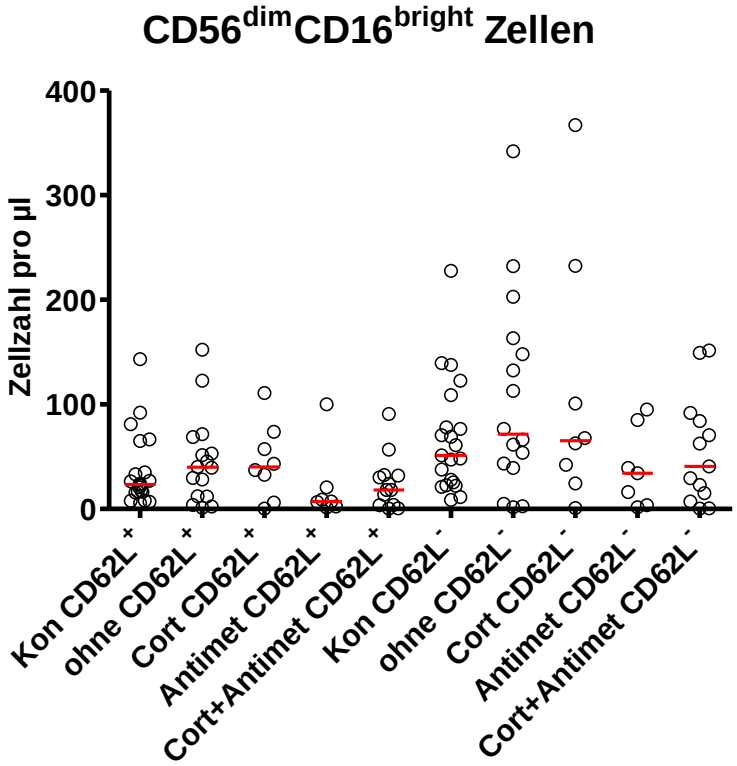


Abbildung 21a: Zahl der $CD62L^+$ und $CD62L^-$ $CD56^{dim}CD16^{bright}$ Zellen bei Gesunden (Kon), bei Patienten ohne Immunsuppressiva (ohne), bei Patienten, die nur Glukokortikosteroide einnehmen (Cort), bei Patienten, die nur Antimetabolite einnehmen (Antimet) und bei Patienten, die Glukokortikosteroide und Antimetabolite zusammen einnehmen (Cort+Antimet). Signifikante Unterschiede zeigten sich hier nicht. (Kon n=21, ohne n=16, Cort n=8, Antimet n=7, Cort+Antimet n=13, Kruskal-Wallis-Test)

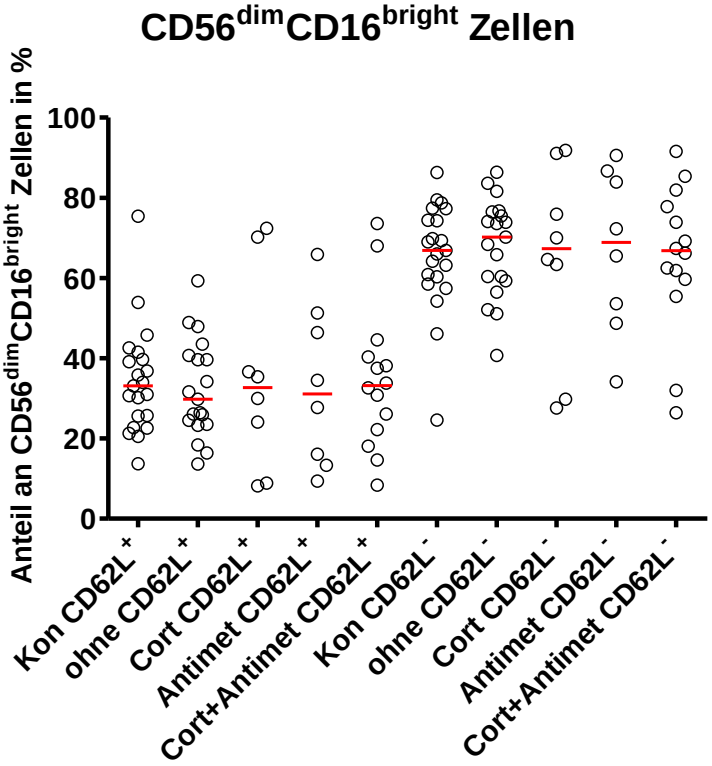


Abbildung 21b: Anteil der $CD62L^+$ und $CD62L^-$ Zellen unter den $CD56^{dim}CD16^{bright}$ Zellen bei Gesunden (Kon), bei Patienten ohne Immunsuppressiva (ohne), bei Patienten, die nur Glukokortikosteroide einnehmen (Cort), bei Patienten, die nur Antimetabolite einnehmen (Antimet) und bei Patienten, die Glukokortikosteroide und Antimetabolite zusammen einnehmen (Cort+Antimet). Signifikante Unterschiede zeigten sich hier nicht. (Kon n=21, ohne n=19, Cort n=8, Antimet n=8, Cort+Antimet n=14, Kruskal-Wallis-Test)

4. Diskussion

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung verschiedener IL17-produzierender Immunzellen und von NK-Zellen bei Patienten mit Myasthenia gravis und der Vergleich der gewonnenen Ergebnisse mit Werten bei gesunden Probanden. Dies geschah mit der Frage, ob diese Zelltypen bei MG-Patienten vermehrt im Blut nachweisbar sind und somit im Krankheitsprozess der Myasthenia gravis möglichweise eine Rolle spielen. Zudem sollte untersucht werden, ob sich die Zahl dieser Zellen durch eine Thymektomie oder immunsuppressive Medikamente beeinflussen lässt. Ausgehend von dieser Zielstellung konnte in der vorliegenden Arbeit Folgendes gezeigt werden:

1. Die Zahl der Tc17-Zellen bei MG-Patienten unterscheidet sich nicht signifikant von der Zahl bei Gesunden. Die Zahl und Frequenz der $CD8^{+}CD161^{high}$ Zellen ist hingegen bei den MG-Patienten signifikant verringert.
2. Die Zahl der Th17-Zellen ist bei den MG-Patienten, ebenso wie die Zahl der $CD4^{+}CD161^{+}$ Zellen, signifikant verringert.
3. Für die Th1/Th17-Zellen, die γδ-T-Zellen und die NK-Zellsubpopulation der $CD56^{bright}CD16^{dim}$ Zellen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Zellzahl und -frequenz zwischen MG-Patienten und Gesunden.
4. Es ergeben sich Hinweise darauf, dass eine Thymektomie bei MG-Patienten zur Angleichung der Zahl der Tc17-Zellen und deren potentiellen Vorläufern ($CD8^{+}CD161^{high}$ Zellen), der Th17-Zellen und deren potentiellen Vorläufern ($CD4^{+}CD161^{+}$ Zellen) und der NK-Zellsubpopulation der $CD56^{dim}CD16^{bright}$ Zellen an die Zellzahl bei Gesunden führt.
5. Bei MG-Patienten unter medikamentöser immunsuppressiver Therapie zeigen sich $CD8^{+}CD161^{high}$ Zellen und $CD4^{+}CD161^{+}$ Zellen sowie die Zahl der Th17-Zellen im Vergleich zu Gesunden reduziert.
6. Für Tc17-Zellen, Th1/Th17-Zellen, γδ-T-Zellen und NK-Zellen zeigten sich bei MG-Patienten unter medikamentöser immunsuppressiver Therapie keine signifikanten Zellzahlunterschiede zu Gesunden.

Im Folgenden werden die genannten, wesentlichen Ergebnisse im Detail mit den Daten der Literatur verglichen und diskutiert. Zuletzt wird die Bedeutung der Ergebnisse zusammenfassend dargestellt.

4.1. Rolle der $CD8^+CD161^{high}$ Zellen bei der MG

Die MG-Patienten zeigen im Vergleich zu gesunden Probanden weniger $CD8^+CD161^{high}$ Zellen im Blut. Da im Rahmen der vorliegenden Arbeit dieser Zelltypus erstmals bei MG-Patienten untersucht wurde, liegen in der Literatur keine vergleichbaren Angaben vor. Somit lassen sich hier nur die für Gesunde erhobenen Ergebnisse mit anderen Untersuchungen vergleichen. In meiner Arbeit fand sich bei den Gesunden ein Anteil von 6,3 % (Median) $CD161^{high}$ unter den $CD8^+$ Zellen. 8,5 % der $CD8^+$ waren $CD161^{low}$ und 84,6 % waren $CD161^-$. In einer Arbeit zu Hepatitis C fand man bei Gesunden einen Anteil von 15 % $CD161^{high}$ unter den $CD8^+$ Zellen. Die Untersuchung wurde mit 15 Probanden an einer somit geringeren Population durchgeführt (Billerbeck et al, 2010). Eine andere Arbeitsgruppe fand im Mittel 10,6 % $CD161^{high}$ unter den $CD8^+$ bei 28 gesunden Probanden (Fergusson et al, 2016). In der genannten Arbeit wurden jedoch nicht, wie in meiner Arbeit, gezielt $CD4^+$ Zellen aus der Bestimmung der $CD8^+CD161^{high}$ Zellen ausgegrenzt. Eventuell wurden somit auch $CD4^+CD161^+$ Zellen in die Bestimmung des $CD8^+CD161^{high}$ Zellgehaltes mit einbezogen.

Die Zahl der $CD8^+CD161^{high}$ Zellen wurde bei anderen Erkrankungen untersucht. In Blutproben von Patienten mit Multipler Sklerose (n=20) wurden höhere Anteile von $CD8^+CD161^{high}$ Zellen im Vergleich zu Gesunden (n=47) gefunden (Annibali et al, 2011). Die Autoren werteten ihre Ergebnisse als Hinweis für eine mögliche pathogenetische Rolle dieser Zellpopulation als ZNS-gängige Effektorzellen bei der Multiplen Sklerose. $CD8^+CD161^{high}$ Zellen werden als Effektor-Gedächtniszellen angesehen (hauptsächlich $CD45R0^+CD62L^-CCR7^-$), die sich in entzündeten Geweben finden und proinflammatorische Zytokine (IFNγ, TNFα) produzieren (Billerbeck et al, 2010; Northfield et al, 2008; Takahashi et al, 2006). Im Gegensatz zu den Ergebnissen von Annibali et al. zeigen sich in der vorliegenden Arbeit die $CD8^+CD161^{high}$ Zellen bei den MG-Patienten verringert. Hierfür lassen sich mehrere Ursachen postulieren.

Zum einen könnte die ermittelte, reduzierte Zahl der $CD8^+CD161^{high}$ Zellen bei den hier untersuchten MG-Patienten Folge der immunsuppressiven, medikamentösen Therapie sein, der ein Teil der in dieser Gruppe zusammengefassten Patienten unterlag. Patienten, die Immunsuppressiva einnehmen, zeigen in meiner Arbeit eine geringere Zahl an $CD8^+CD161^{high}$ Zellen als Gesunde oder Patienten ohne

immunsuppressive Therapie. Auch unterscheiden sich Gesunde und Patienten ohne Immunsuppressiva hinsichtlich der Zahl an $CD8^+CD161^{high}$ Zellen nicht. Somit ließe sich auch postulieren, dass die MG per se nicht zu einer Veränderung der $CD8^+CD161^{high}$ Zellzahl im Blut führt. Dies passt zu den bisherigen pathophysiologischen Modellen der Autoantikörperwirkung bei der MG (siehe Abschnitt 1.2.1.). Diese führen keine Inflammationsreaktion mit einer Anhäufung von Entzündungszellen im Bereich der neuromuskulären Endplatte als Ursache der Muskelschwäche an. Somit ist eine im Vergleich zu Gesunden unveränderte Zahl an gewebegängigen Entzündungszellen im Blut von MG-Patienten kein überraschendes Ergebnis. Möglich ist auch, dass $CD8^+CD161^{high}$ Zellen keine Rolle im Krankheitsprozess der MG spielen und die Zahl dieser Zellen deswegen anteilig verringert ist.

Es zeigt sich in meiner Arbeit außerdem, dass Patienten ohne Thymektomie weniger $CD8^+CD161^{high}$ Zellen aufweisen als Gesunde. Zudem haben Patienten ohne Thymektomie weniger $CD8^+CD161^{high}$ Zellen als Patienten, die sich einer Thymektomie unterzogen haben, auch wenn hier der Unterschied nicht signifikant ist. Somit lässt sich vermuten, dass die Entfernung des Thymus in MG-Patienten zu einem Anstieg der $CD8^+CD161^{high}$ Zellen führt. Dies könnte einerseits direkt erfolgen, zum Beispiel durch den Wegfall eines hemmenden Stimulus auf die Proliferation der $CD8^+CD161^{high}$ Zellen. Andererseits wäre auch ein indirekter Effekt der Thymektomie denkbar, der sich durch die Besserung der Symptomatik nach der Thymektomie und einem damit einhergehenden geringeren Verbrauch an Immunsuppressiva erklärt. Hierfür spricht, dass Patienten unter immunsuppressiver Therapie eine geringere $CD8^+CD161^{high}$ Zellzahl und -frequenz als Gesunde aufweisen. Interessanterweise findet sich jedoch in der Gruppe der Patienten mit erfolgter Thymektomie ein höherer Anteil an Patienten mit immunsuppressiver Therapie (66 % von 33 Proben) als in der Gruppe der Patienten ohne Thymektomie (50 % von 16 Proben). Dies könnte bedeuten, dass die Thymektomie auf die Zahl der $CD8^+CD161^{high}$ Zellen einen größeren Einfluss ausübt als die Immunsuppressiva. Es ist jedoch auch denkbar, dass insbesondere Patienten mit einer schweren Myasthenie, also einem hohen Verbrauch an Immunsuppressiva, eine Thymektomie erhalten und deswegen in dieser Gruppe mehr Patienten mit immunsuppressiver Therapie vertreten sind.

Wie eingangs erwähnt, liegen leider keine vergleichbaren Untersuchungen zur Zahl der $CD8^+CD161^{high}$ Zellen bei MG-Patienten in der Literatur vor. Suzuki et al. stellten

jedoch Untersuchungen zu $CD3^+TCRV_\alpha24^+CD161^{high}$ Zellen (reife (klassische) NKT-Zellen) an (Suzuki et al, 2005). Die Arbeitsgruppe fand für diese Zellen einen im Vergleich zu Gesunden höheren Anteil bei MG-Patienten vor Thymektomie, jedoch nur bei denjenigen Patienten, bei denen eine Thymushyperplasie vorlag. Nach der Therapie, d.h. Thymektomie und Glukokortikoid-Therapie, war der Zellanteil gleich derer der Kontrollgruppe. Suzuki et al. vermuten in der erhöhten Zahl der reifen NKT-Zellen ein Gegengewicht zur dysregulierten T-Zellfunktion. Da die NKT-Zellen aus dem Thymus stammen, sinkt ihre Zahl nach der Thymektomie (Suzuki et al, 2005). In der vorliegenden Arbeit wurde für die Bestimmung der $CD8^+CD161^{high}$ Zellen keine zusätzliche Färbung der TCR-Ketten vorgenommen. Also schließt diese hier genannte Population sowohl $\alpha\beta TCR^+$ (invariante und nicht-invariante α- und β-Ketten) als auch $\gamma\delta TCR^+$ Zellen mit ein. Somit ist der Vergleich der hier untersuchten $CD8^+CD161^{high}$ Zellen und der bei Suzuki et al. genannten $CD3^+TCRV_\alpha24^+CD161^{high}$ Zellen lediglich der Vergleich einer Schnittmenge beider Populationen. Beide Untersuchungen zeigen jedoch, dass eine Thymektomie zu einer Angleichung der Zahl der $CD161^{high}$ Zellen an die Zahl in der Kontrollgruppe führt.

Zusammenfassend sprechen die gewonnenen Ergebnisse zu den $CD8^+CD161^{high}$ Zellen gegen eine krankheitsauslösende Rolle dieser Zellen im Krankheitsprozess der MG. Dies steht im Kontrast zu den oben genannten Erkenntnissen zur Multiplen Sklerose, bei denen eine pathogenetische Rolle der $CD8^+CD161^{high}$ Zellen im Rahmen dieser Erkrankungen angenommen wird (Annibali et al, 2011). Meine Ergebnisse lassen jedoch vermuten, dass sowohl eine immunsuppressive medikamentöse Therapie als auch eine Thymektomie einen, wenn auch gegensätzlichen, Einfluss auf die Zahl dieser Zellen im Blut von MG-Patienten nehmen.

4.2. Die Bedeutung der Tc17-Zellen für die Pathogenese der MG

Die Ergebnisse meiner Arbeit zeigen geringere Zahlen der Tc17-Zellen ($CD3^+CD8^+IL17^+IFN\gamma^-$) bei den Patienten ohne Thymektomie sowohl im Vergleich zu Gesunden als auch im Vergleich zu den Patienten nach Thymektomie. Die Zellzahl der Patienten nach Thymektomie unterscheidet sich nicht signifikant von den Gesunden. Somit könnte man annehmen, dass sich nach einer Thymektomie die Zahl der Tc17-Zellen steigert und dadurch normalisiert. Das Ergebnis ähnelt dem der

$CD8^+CD161^{high}$ Zellen (Abschnitt 4.1.). Dies überrascht nicht, da angenommen wird, dass die Tc17 Zellen eine Teilpopulation der $CD8^+CD161^{high}$ Zellen darstellen (Billerbeck et al, 2010). Eine andere Arbeitsgruppe untersuchte ebenfalls Tc17-Zellen bei 12 MG-Patienten vor und nach einer Thymektomie und im Vergleich zu 12 gesunden Probanden (Hosseini et al, 2017). Man fand für die Tc17-Zellen einen höheren Anteil bei den MG-Patienten vor der Thymektomie im Vergleich zu Gesunden. Zusätzlich ließ sich bei 9 von 12 MG-Patienten 6 Monate nach der Thymektomie ein signifikanter Rückgang des Tc17-Zellanteils nachweisen, sodass dann kein signifikanter Unterschied zu den gesunden Kontrollen mehr bestand. Nur 3 von 12 MG-Patienten zeigten nach der Thymektomie einen noch höheren Tc17-Anteil als vorher. Aufgrund ihrer Ergebnisse vermuten die Autoren zusammenfassend eine mögliche pathogenetische Rolle der Tc17-Zelle bei der MG. Die Ergebnisse meiner Arbeit zeigen im Vergleich zu Hosseini et al. ein umgekehrtes Verhältnis der Tc17-Zellzahlen und lassen somit auch einen entsprechend umgekehrten Effekt der Thymektomie auf die Tc17-Zellzahl vermuten. Die Angleichung der Tc17-Zellzahl an die Zahl der Gesunden nach der Thymektomie ist jedoch beiden Arbeiten gemein. Gründe für die unterschiedlichen Ergebnisse sind möglicherweise in der unterschiedlichen Methodik beider Arbeiten zu finden. Hosseini et al. stimulierten ihre Zellproben zwar ebenfalls mit PMA und Ionomycin, schlossen aber im Gegensatz zu meiner Arbeit für ihre Definition der Tc17-Zellen eine gleichzeitige Produktion von IFNγ nicht aus. Hosseini et al. bezogen im Gegensatz zu meiner Arbeit auch 3 seronegative MG-Patienten ein. Der mögliche Einfluss einer eventuell bestehenden immunsuppressiven Medikation wurde bei Hosseini et al. nicht berücksichtigt. Patienten mit rein okulärer Myasthenie wurden, gegensätzlich zu meiner Arbeit, von der Untersuchung ausgeschlossen. Auch untersuchten Hosseini et al. stets nach einem konstanten Zeitraum von 6 Monaten nach der Thymektomie dieselben Patienten in Form einer individuellen Verlaufskontrolle. Bei meinem Patientenkollektiv bestand zwischen der Thymektomie und der Blutuntersuchung teilweise ein Zeitabstand von vielen Jahren und es wurden unterschiedliche Patientenkollektive miteinander verglichen. Es ist jedoch denkbar, dass 6 Monate nach der Thymektomie noch kein neuer stabiler Zustand des Immunsystems erreicht ist. Hierzu passt, dass sich der klinische Benefit der Thymektomie erst einige Monate bis Jahre nach der Thymektomie einstellt (Wolfe et al, 2016). Für die Untersuchung der Zellzahl bei Patienten ohne Thymektomie

standen mir nur 7 Proben zur Verfügung. Gleichwohl lassen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit einen Einfluss der Thymektomie auf die Zahl der Tc17-Zellen vermuten, zumal in Bezug auf diesen Zelltypus keine signifikanten Auffälligkeiten durch die immunsuppressiven Medikamente nachweisbar waren. Möglicherweise fällt durch die Entfernung des Thymus ein hemmender Einfluss auf die Proliferation oder Differenzierung der Tc17-Zellen weg.

In der vorliegenden Arbeit zeigte sich eine nicht signifikante Erniedrigung der Tc17-Zellzahl und -frequenz bei MG-Patienten im Vergleich zu Gesunden. In einer anderen Arbeit fand man im Gegensatz dazu einen nicht signifikant erhöhten Anteil an Tc17-Zellen bei MG-Patienten im Vergleich zu Gesunden (Yi et al, 2020). Dabei wurden im Vergleich zu meiner Arbeit mehr als doppelt so viele Patientenproben untersucht. Die Arbeitsgruppe leitet aus ihren Ergebnissen zusammenfassend eine pathogenetische Rolle der Tc17-Zellen bei der seropositiven MG ab. Für IFNγ-produzierende Tc17-Zellen wurde in der genannten Arbeit ein signifikant höherer Anteil bei MG-Patienten im Vergleich zu Gesunden nachgewiesen. In meiner Arbeit zeigte sich die Zahl und -frequenz der IFNγ-produzierenden Tc17-Zellen bei den MG-Patienten im Vergleich zu den Gesunden erhöht, der Unterschied war aber hier nicht signifikant. Eine pathogenetische Bedeutung der Tc17-Zellen im Rahmen der MG wäre aus den Ergebnissen somit höchstens für die IFNγ-produzierende Zellpopulation ableitbar. Passend dazu scheint im Mausmodell die Entwicklung einer EAMG von IFNγ abhängig zu sein (Balasa et al, 1997).

Insgesamt sprechen die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse gegen eine krankheitsfördernde Rolle der Tc17-Zellen bei der MG, da sie sich bei MG-Patienten nicht in vermehrter Zahl nachweisen lassen. Jedoch scheint eine Thymektomie auf diese Zellen einen Effekt auszuüben, der sich in Form einer Steigerung der Zellzahl im Vergleich zu MG-Patienten ohne Thymektomie, also als eine Angleichung an die Zellzahl bei Gesunden, äußert. Hier könnte eine protektive Rolle der Tc17-Zellen im Rahmen der MG angenommen werden, die sich in Form einer Symptomlinderung zeigt und auf der Steigerung der Tc17-Zellzahl durch die Thymektomie beruht. Die Ergebnisse sprechen zusätzlich dafür, dass durch eine medikamentöse immunsuppressive Therapie die Tc17-Zellzahl nicht beeinflusst werden kann. Für die IFNγ-produzierenden Tc17-Zellen können aus den Ergebnissen meiner Arbeit und aus der Literatur Hinweise für eine krankheitsfördernde Wirkung dieser Zellpopulation bei der MG abgeleitet werden.

4.3. Die Bedeutung der Th17-Zellen und deren potentiellen Vorläuferzellen ($CD4^+CD161^+$ Zellen) für die Pathogenese der MG

Die Population der $CD4^+CD161^+$ Zellen beinhaltet die Th17-Zellen ($CD3^+CD8^-IL17^+IFN\gamma^-$), also potentielle IL17-Produzenten. MG-Patienten zeigen insgesamt eine signifikant geringere Zahl der $CD4^+CD161^+$ Zellen und der Th17-Zellen als Gesunde. Es scheint jedoch so, dass diese Zellen aufgrund der immunsuppressiven Therapie bei den MG-Patienten verringert sind. Betrachtet man nämlich die Zahl der $CD4^+CD161^+$ Zellen und der Th17-Zellen in Bezug auf die nach Medikation gruppierten Patienten, so zeigen meine Ergebnisse, dass Patienten unter medikamentöser Immunsuppression eine geringere Zellzahl im Vergleich zu Gesunden haben. Patienten ohne Immunsuppression haben keinen Zellzahlunterschied zu den Gesunden. Somit ergibt sich auch hier, wie bei den $CD8^+CD161^{high}$ Zellen (siehe Abschnitt 4.1.), die Vermutung, dass nicht die Erkrankung allein zu einer Verringerung der Zahl der $CD4^+CD161^+$ Zellen und der Th17-Zellen führt.

Werden die MG-Patienten in eine Gruppe ohne Thymektomie und in eine Gruppe mit erfolgter Thymektomie eingeteilt, so ist das Ergebnis etwas differenzierter. Für $CD4^+CD161^+$ Zellen und Th17-Zellen zeigen sich bei den Patienten ohne Thymektomie im Vergleich zu den Gesunden signifikant geringere Zellzahlen. Die Patienten, die eine Thymektomie erhielten, haben im Vergleich zu Gesunden signifikant geringere Zahlen an $CD4^+CD161^+$ Zellen und nicht signifikant geringere Zahlen an Th17-Zellen. Auffällig ist, dass die Zellzahl für die Patienten, die eine Thymektomie erhielten, für beide Zellgruppen etwas höher ist als bei den Patienten ohne Thymektomie. Dieser Unterschied ist jedoch nicht signifikant, möglicherweise aufgrund der etwas geringen Probenanzahl (siehe Abschnitte 3.3.2. und 3.4.2.). Dieser Unterschied könnte jedoch ein Hinweis darauf sein, dass eine Thymektomie zu einer diskreten Steigerung der Zahl der $CD4^+CD161^+$ Zellen und Th17-Zellen bei MG-Patienten führt. Das heißt, die Thymektomie hätte eine Annäherung der Zellzahl an die Zahl bei Gesunden zur Folge. Wie bei den $CD8^+CD161^{high}$ Zellen (siehe Abschnitt 4.1.) und den Tc17-Zellen (siehe Abschnitt 4.2.) zeigt sich nun wiederholt ein solches Ergebnis, welches erneut zu der Annahme führt, dass durch die Entfernung des Thymus ein supprimierender Faktor auf die Zahl der $CD4^+CD161^+$ Zellen und der Th17-Zellen wegfällt. Ebenso wäre, wie bei den $CD8^+CD161^{high}$ Zellen

(siehe Abschnitt 4.1.), erneut auch ein indirekter Effekt der Thymektomie denkbar, der sich durch die Besserung der Symptomatik nach der Thymektomie und einem damit einhergehenden geringeren Verbrauch an Immunsuppressiva erklärt. Hierfür spricht wiederum, dass Patienten unter immunsuppressiver Therapie eine geringere Zahl der $CD4^+CD161^+$ Zellen und der Th17-Zellen als Gesunde aufweisen. Jedoch auch hier findet sich interessanterweise in der Gruppe der Patienten mit erfolgter Thymektomie ein höherer Anteil an Patienten mit immunsuppressiver Therapie (66 % von 30 Proben (für $CD4^+CD161^+$ Zellen) und 78 % von 18 Proben (für Th17-Zellen)) als in der Gruppe der Patienten ohne Thymektomie (57 % von 14 Proben und 57 % von 7 Proben). Dies könnte auch hier bedeuten, dass die Thymektomie auf die Zahl der $CD4^+CD161^+$ Zellen und Th17-Zellen einen größeren Einfluss ausübt als die Immunsuppressiva. Es ist erneut auch denkbar, dass insbesondere Patienten mit einer schweren Myasthenie, also einem hohen Gebrauch an Immunsuppressiva im Vergleich zu Patienten mit schwächeren Symptomen, eine Thymektomie erhalten und deswegen in dieser Gruppe mehr Patienten mit immunsuppressiver Therapie vertreten sind.

In einer Studie zeigten MG-Patienten ohne Thymektomie einen größeren Anteil an Th17-Zellen im Vergleich zu Gesunden (Hosseini et al, 2017). Nach der Thymektomie sank bei den meisten Probanden der Anteil der Th17-Zellen. Nur bei einem der 12 untersuchten Patienten war der Anteil der Th17-Zellen nach der Thymektomie höher als vor der Thymektomie. In der Studie wurde jedoch nicht der Einfluss einer immunsuppressiven Medikation berücksichtigt. Auch war die Zahl der untersuchten Patienten mit 12 eher gering. In einer anderen Studie fand man bei MG-Patienten nach Thymektomie einen höheren Anteil an Th17-Zellen im Blut als bei den Gesunden, signifikant bei den Patienten, bei denen ein Thymom histologisch nachgewiesen wurde und nicht signifikant bei den Patienten mit Thymushyperplasie (Wang et al, 2012). Die Arbeitsgruppe fand keinen Unterschied im Anteil der Th17-Zellen bei Gesunden im Vergleich zu Patienten ohne Thymektomie. Jedoch wurde auch in dieser Arbeit der Einfluss einer immunsuppressiven Medikation nicht berücksichtigt. In einer weiteren Studie fand man keinen Unterschied im Anteil der Th17-Zellen im Blut von MG-Patienten im Vergleich zu gesunden Probanden (Masuda et al, 2010). Hier wurden jedoch die Th17-Zellen anhand der Expression von RORγt-RNA identifiziert und nicht anhand der Expression von IL17 selbst. Zudem wurde für die Untersuchung keine erkennbare Unterscheidung nach erfolgter

oder nicht erfolgter Thymektomie oder der bestehenden immunsuppressiven Medikation vorgenommen.
Die unterschiedlichen Ergebnisse der oben genannten Arbeiten lassen sich sicherlich zum Teil mit der sehr unterschiedlichen Methodik und den unterschiedlichen Patientenkollektiven begründen. Zudem wurde aus technischen Gründen für die Bestimmung der Th17-Zellen ($CD3^+CD8^-IL17^+IFN\gamma^-$) in der vorliegenden Arbeit keine Färbung von CD161 oder CD4 vorgenommen. Hieraus ergibt sich, dass bei der Bestimmung der Th17-Subgruppe eventuell $CD4^-$ Zellen mit erfasst wurden. Auch ist eine Angabe des Anteils der Th17-Population unter den $CD4^+CD161^+$ Zellen nicht möglich.
In dieser Arbeit wurde erstmals eine bestehende immunsuppressive Medikation als möglicher Einflussfaktor auf die Zellzahl von Th17-Zellen und deren Vorläufern untersucht. Die immunsuppressive Medikation scheint, nach den hier gewonnenen Ergebnissen, einen wichtigen Einfluss auf die Th17-Zellzahl und die Zahl der $CD4^+CD161^+$ Zellen zu nehmen. Somit zeigen die verschiedenen Ergebnisse die Notwendigkeit zu weiteren Untersuchungen dieser Zelltypen bei MG-Patienten auf, da die genaue Rolle von Th17-Zellen und $CD4^+CD161^+$ Zellen bei der MG noch unklar bleibt. In diesen Untersuchungen sollte die medikamentöse immunsuppressive Therapie unbedingt berücksichtigt werden. Zusammenfassend ließ sich aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit, neben möglichen Effekten der immunsuppressiven Medikation und der Thymektomie auf die Zahl der Zellen, kein klarer Hinweis auf eine aktive Rolle dieser Zellpopulationen im Krankheitsprozess der MG ableiten.

4.4. Die Rolle der Th1/Th17-Zellen für die MG-Pathogenese

Als weitere proinflammatorische Zelllinie mit Verwandtschaft zu Th17-Zellen wurden Th1/Th17-Zellen im Rahmen meiner Arbeit untersucht. Interessanterweise zeigten sich bei den Th1/Th17-Zellen keine signifikanten Zellzahlunterschiede zwischen MG-Patienten und Gesunden. Durch ihre relative Unempfindlichkeit gegenüber der hemmenden Wirkung von regulatorischen T-Zellen, sind Th1/Th17-Zellen der Kontrolle durch das Immunsystem entzogen. Zusätzlich sind Th1/Th17-Zellen in der Lage, Plasmazellen zur Produktion von Antikörpern anzuregen (Annunziato et al, 2007). Somit könnten Th1/Th17-Zellen den wichtigen Stimulus zur Produktion der

Autoantikörper bei der MG geben. Das Ergebnis einer anderen Arbeit lässt einen solchen Mechanismus bei einer anderen Autoimmunerkrankung vermuten. Man fand in einer Arbeit zu Diabetes mellitus Typ 1 eine Korrelation in der Höhe der Blutglukosekonzentration zu der Höhe des Verhältnisses von IFNγ zu IL17 (produziert durch Th1/Th17-Zellen) bei Kindern mit Prädiabetes. Die Autoren vermuten somit eine schädigende Wirkung der Th1/Th17-Zellen auf die insulinproduzierenden Zellen der Bauchspeicheldrüse (Reinert-Hartwall et al, 2015).
Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit können eine pathogenetische Rolle der Th1/Th17-Zellen bei der MG nicht unterstützen. In einer anderen Studie zeigten sich die Th1/Th17-Zellen bei MG-Patienten anteilig nicht signifikant gering erhöht im Vergleich zu Gesunden (Yi et al, 2020). Durch Hemmung des Transkriptionsfaktors RORγt konnte eine signifikante Reduktion des Anteils an Th1/Th17-Zellen in vitro nachgewiesen werden. In einer anderen Arbeit konnte gezeigt werden, dass Th1/Th17-Zellen wohl die autoreaktiven T-Zellen bei der MG darstellen (Cao et al, 2016). Die Ergebnisse scheinen somit zunächst widersprüchlich. Da die Th1/Th17-Zellen jedoch offenbar nur in sehr geringer Zahl im Blut vertreten sind, ist die Untersuchung dieser Zellen technisch schwierig. Zudem muss man annehmen, dass nicht alle zirkulierenden Th1/Th17-Zellen auch autoreaktiv sind. Da dieser Zelltyp bedeutsam zu sein scheint und möglicherweise durch eine Hemmung des Transkriptionsfaktors RORγt direkt beeinflusst werden kann, sind weitere Untersuchungen zu dieser Zellpopulation sinnvoll.
Die Th1/Th17-Zellen wurden in dieser Arbeit als $CD3^+CD8^-IL17^+IFN\gamma^+$ Zellen definiert. Die Expression von CD4 wurde in der Untersuchung der Th1/Th17-Zellen nicht berücksichtigt. Somit war die Abgrenzung der Th1/Th17-Zellen als $CD4^+$ Population von $CD4^-$ Zellen leider nicht möglich. Die Miterfassung dieser Zelltypen könnte theoretisch das Untersuchungsergebnis beeinflusst haben, jedoch ist deren Anteil so gering, dass dies eher unwahrscheinlich ist.

4.5. Die Bedeutung der γδ-T-Zellen für die MG-Pathogenese

In der vorliegenden Arbeit fand sich mit 2,8 % $\gamma\delta TCR^+$ Zellen unter den $CD3^+$ Zellen bei den Gesunden und 2,5 % bei den MG-Patienten kein signifikanter Unterschied zwischen Gesunden und Patienten. Dies bestätigt Ergebnisse aus der Arbeit einer anderen Arbeitsgruppe. Auch hier waren sowohl bei gesunden jüngeren als auch bei

älteren Probanden unter 5 % der $CD3^+$ Zellen γδTCR$^+$ (van der Geest et al, 2018). Die Altersverteilung der Arbeit von van der Geest et al. entspricht hierbei jener in der vorliegenden Arbeit (siehe Abschnitt 3.). Der größte Teil der γδ-T-Zellpopulation in dieser Arbeit ist doppelt negativ für CD4 und CD8 ($CD4^-CD8^-$). Dies zeigte sich auch in vorangegangenen Arbeiten (Brenner et al, 1986). Der größte Teil der übrigen γδ-T-Zellen zeigt nur eine Expression von CD8 ohne CD4. Der geringste Teil der γδ-T-Zellen ist $CD4^+$ ohne Expression von CD8. Dieses Verhältnis im Expressionsmuster ist für Gesunde und MG-Patienten in dieser Arbeit nahezu gleich. Aus dieser Gleichverteilung ergibt sich die Vermutung, dass γδ-T-Zellen keine pathogene Rolle bei der MG spielen. Auch in einer anderen Studie fand man bei MG-Patienten im Vergleich zu Gesunden gleiche Zellanteile für γδ-T-Zellen. Nachdem jedoch die MG-Patienten nach klinischer Manifestation der MG gruppiert wurden, zeigte sich bei den Patienten mit generalisierter MG ein signifikant geringerer Anteil der γδ-T-Zellen im Blut im Vergleich zu Patienten mir rein okulärer Symptomatik (Ragheb et al, 1999). Möglicherweise fehlen bei der generalisierten MG die γδ-T-Zellen als regulatorisches und die Immunreaktion hemmendes Moment. Eine solche regulatorische Funktion (Hemmung der Proliferation von $CD4^+$ T-Zellen) konnte für γδ-T-Zellen nachgewiesen werden (Kuhl et al, 2009). Auch bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ 1 wurden erniedrigte Zahlen von γδ-T-Zellen im Blut gefunden. Die Autoren vermuten, dass die damit einhergehende Verringerung der immunregulativen Wirkung dieser Zellen das Individuum empfänglicher für Autoaggression macht (Zubkiewicz-Kucharska & Noczynska, 2016). Laut meinen Ergebnissen lässt sich für γδ-T-Zellen bei der MG keine krankheitsfördernde Rolle ableiten.

4.6. Die Bedeutung der NK-Zellen für die MG-Pathogenese

Da bei NK-Zell-depletierten Mäusen eine experimentelle autoimmune Myasthenia gravis signifikant später und mit geringerer Krankheitsschwere auftrat als bei Mäusen mit normaler NK-Zellfunktion, wird für die NK-Zellen eine wichtige Rolle in der Pathogenese der MG angenommen (Shi et al, 2000).
In der vorliegenden Arbeit lassen sich unter den $CD3^-$ Zellen zwei $CD56^+$ Zellgruppen abgrenzen. Zum einen eine $CD56^{bright}CD16^{dim}$ und zum anderen eine $CD56^{dim}CD16^{bright}$ Population. Erstere macht einen Anteil von ca. 6 %, die zweite macht einen Anteil von ca. 92 % der $CD56^+$ Zellen aus. Dieses Verhältnis stimmt

weitestgehend mit vorangegangenen Untersuchungen überein (Lanier et al, 1986). Ob diese beiden Zellgruppen eigenständige Zellreihen oder zwei Entwicklungsstufen derselben Zellreihe darstellen, ist noch nicht geklärt (siehe Abschnitt 1.5.). Auch die in meiner Arbeit gefundene Verteilung der CD62L-Expression ist mit den Ergebnissen anderer Autoren vergleichbar. Die Mehrzahl der $CD56^{bright}CD16^{dim}$ Zellen zeigt eine Expression des Adhäsionsmoleküls CD62L. Bei den $CD56^{dim}CD16^{bright}$ Zellen ist hingegen der Anteil ohne Expression von CD62L größer. Eine andere Arbeitsgruppe fand ein ähnliches Ergebnis (Frey et al, 1998).

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen keine signifikanten Unterschiede der $CD56^{bright}CD16^{dim}$ Zellzahl, weder im Vergleich der Gesunden zu allen untersuchten MG-Patienten noch in Bezug auf die unterschiedliche Medikamenteneinnahme und auch nicht in Bezug auf die Unterteilung in Gruppen ohne oder mit Thymektomie. Somit lässt sich aus den hier gewonnenen Ergebnissen keine wichtige Rolle dieser NK-Zell-Population im Krankheitsprozess der MG ableiten. In einer Studie fanden sich ebenfalls für $CD56^{bright}$ Zellen keine Unterschiede der Zellanteile zwischen Gesunden (n=9) und Patienten vor und nach Therapie (Thymektomie und Glukokortikoid-Therapie) (Suzuki et al, 2005). Hier wurden Patienten untersucht, die letztlich eine auffällige Thymushistologie (Hyperplasie oder Thymom) hatten. Diese Ergebnisse erscheinen plausibel, da die Reifung der NK-Zellen nicht, wie bei den T-Lymphozyten, an den Thymus gebunden ist, da die NK-Zellen als Teil der angeborenen Immunabwehr keine Selektion mittels körpereigener Antigene durchlaufen müssen. Im Gegensatz hierzu lassen die Ergebnisse einer Studie am Mausmodell einen entscheidenden Beitrag der NK-Zellen zur Entstehung der MG vermuten (Shi et al, 2000). Diese Ergebnisse sind jedoch möglicherweise nicht ohne Weiteres auf den Menschen übertragbar. Es ist denkbar, dass die $CD56^{bright}CD16^{dim}$ Zellen, befähigt durch ihre vermehrte Expression von CD62L, verstärkt in lymphatisches Gewebe einwandern und erst dort proliferieren. Solche Gewebe wurden jedoch im Rahmen meiner Arbeit nicht untersucht. Weitere vergleichbare Arbeiten bezüglich dieser NK-Zellgruppe im Zusammenhang mit der MG liegen in der Literatur nicht vor. Jedoch fanden sich in Hautläsionen bei Psoriasis vermehrt $CD56^{bright}CD16^{-}$ Zellen, die dort lFNγ freisetzen. Sie scheinen einen entscheidenden Beitrag zur Entstehung und Aufrechterhaltung der lokalen Entzündungsreaktion bei der Psoriasis zu leisten (Ottaviani et al, 2006). Ob NK-Zellen im Rahmen einer MG auch vermehrt im Bereich der neuromuskulären Endplatte vorkommen, kann in

meiner Arbeit nicht beantwortet werden, da keine Gewebeproben untersucht wurden. Da bei der Pathophysiologie der MG eine lokale Entzündungssituation aber nicht vermutet wird, wäre eine Anhäufung von NK-Zellen im Bereich der neuromuskulären Endplatte jedoch auch nicht zu erwarten.

Die Einbeziehung der CD62L-Expression in die Ergebnisauswertung dieser Arbeit führt zur Aufteilung der $CD56^{dim}CD16^{bright}$ Zellpopulation in zwei Subgruppen mit entsprechend gegensätzlichen Ergebnissen. Von den $CD56^{dim}CD16^{bright}CD62L^{+}$ Zellen haben Patienten ohne Thymektomie einen geringeren prozentualen Zellanteil als Gesunde. Vergleicht man Kontrollpersonen mit Patienten nach Thymektomie, so besteht kein signifikanter Unterschied. Patienten nach Thymektomie weisen jedoch einen höheren Zellanteil im Vergleich zu Patienten ohne Thymektomie auf. Entsprechend entgegengesetzt zeigen sich die $CD56^{dim}CD16^{bright}CD62L^{-}$ Zellen bei Patienten ohne Thymektomie im Vergleich zu Gesunden und Patienten nach Thymektomie in Zahl und Frequenz erhöht. Die Thymektomie scheint somit das Verhältnis innerhalb der Population der $CD56^{dim}CD16^{bright}$ Zellen zu Gunsten der CD62L exprimierenden Variante zu verschieben und somit dem Zustand beim Gesunden anzugleichen. Die Ursache hierfür ist nicht klar. Möglicherweise führt die Entfernung des Thymus zur Entfernung von regulatorisch wirkenden Zellen, die sonst die Differenzierung der NK-Zellen beeinflussen. Da sich die $CD56^{dim}CD16^{bright}CD62L^{-}$ Zellen bei MG-Patienten ohne Thymektomie in Zahl und Frequenz erhöht zeigen, kann für diese Zellen eine pathogenetische Rolle bei der MG abgeleitet werden. Zudem lässt sich anhand der vorliegenden Ergebnisse annehmen, dass die Thymektomie die Zahl und Frequenz dieser Zellen beeinflusst. Möglicherweise ist die Reduktion dieser Zellen eine Ursache für die symptomlindernde Wirkung einer Thymektomie bei der MG.

Suzuki et al. untersuchten ebenfalls $CD56^{dim}CD16^{+}$ Zellen bei MG-Patienten, jedoch ohne weitere Differenzierung in $CD62L^{+}$ oder $CD62L^{-}$ (Suzuki et al, 2005). Interessanterweise ähneln die Ergebnisse von Suzuki et al. eher den in der vorliegenden Arbeit gefundenen Verhältnissen für die $CD56^{dim}CD16^{bright}CD62L^{+}$ Zellen, obwohl diese, wie in Abschnitt 1.5. beschrieben, den kleineren Anteil unter den $CD56^{dim}CD16^{bright}$ Zellen ausmachen. Die Arbeitsgruppe fand für $CD56^{dim}CD16^{+}$ Zellen einen im Vergleich zu Gesunden zum Teil signifikant verringerten Zellanteil bei Patienten vor der Thymektomie (signifikant für jene mit Thymom und nicht signifikant

für jene mit Thymushyperplasie). Nach der Thymektomie waren die Zellanteile gleich hoch, wie jene der gesunden Vergleichsgruppe (Suzuki et al, 2005).
In einer anderen Arbeit fanden sich bei Patienten mit eben diagnostizierter, seropositiver Rheumatoider Arthritis ebenfalls verminderte Zellzahlen der $CD56^{dim}$ NK-Zellen im Vergleich zu gesunden Kontrollen (Chalan et al, 2016). Auch hier wurde keine Unterteilung der Ergebnisse nach CD62L-Expression vorgenommen. Die Ursache der Zellzahlminderung vermuten die Autoren in der Immunkomplex-vermittelten Apoptose der NK-Zellen durch Crosslinking der CD16-Rezeptoren (siehe auch 1.5.). Da dies zu Beginn der Erkrankung nachzuweisen ist, wird hier vermutet, dass dies möglicherweise zur Entwicklung der Erkrankung führt und weniger ein Ausdruck einer chronischen Inflammation darstellt.
Zusammenfassend lässt sich aus den für die $CD56^{dim}CD16^{bright}CD62L^{-}$ Zellen gewonnenen Ergebnissen eine wichtige Funktion dieser Zellen im Rahmen der MG annehmen. Zudem scheint eine Thymektomie die Zahl und Frequenz dieser Zellen zu reduzieren und durch diesen Mechanismus möglicherweise eine Symptomlinderung herbeizuführen. Welche genauen Funktionen diese eher als zytotoxisch anzusehende NK-Zell-Subpopulation im Rahmen der MG erfüllt, lässt sich hier nicht ableiten. Anzunehmen ist, dass sie eher während der Zirkulation im Blut auf andere Zellen einwirken, da sie ohne die Expression von CD62L nicht in lymphatische Gewebe einzuwandern können.

4.7. Limitationen der vorliegenden Arbeit

Die Aussagekraft der in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse wird durch die relativ kleine Fallzahl an Patientenproben eingeschränkt. Angemerkt sei, dass die Myasthenia gravis eine seltene Erkrankung ist und die Fallzahlen dem Vergleich mit der Literatur zumindest Stand hält. Vor allem die Einteilung in Subgruppen führte allerdings zu einer teilweise geringen Fallzahl. Die Tatsache, dass die Ergebnisse teilweise nur für die absoluten Zellzahlen oder die relativen Zellanteile signifikante Auffälligkeiten zeigen, ist wahrscheinlich auf die geringe Anzahl von Proben und auf das bei einigen Zellarten geringe Vorkommen im Probenmaterial zurückzuführen. Zudem wurde ausschließlich Blut untersucht. Möglicherweise hätte die zusätzliche Untersuchung von Thymusgewebe, Lymphknoten oder Muskelgewebe zu anderen Ergebnissen geführt. Sicherlich hat auch der Entnahmezeitpunkt der Blutprobe einen

Einfluss auf die Ergebnisse. Die Zeit zwischen der Blutentnahme und der letzten Einnahme der immunsuppressiven Medikamente und auch der Zeitraum zwischen der Blutentnahme und der Thymektomie waren nicht standardisiert.

4.8. Abschließende Betrachtung

Für die hier untersuchten IL17-produzierenden Zellpopulationen konnte keine erhöhte Zellzahl im Blut von MG-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen nachgewiesen werden. Die Zahl der Th17-Zellen war bei den MG-Patienten signifikant erniedrigt. Dies ist wahrscheinlich Folge der medikamentösen immunsuppressiven Therapie. Zusätzlich ergaben sich Hinweise darauf, dass eine Thymektomie zu einer Steigerung der Zahl an Th17-Zellen bei MG-Patienten führt. Ob einer dieser vermuteten Effekte letztlich zur Verringerung der Symptome bei der MG beiträgt, lässt sich jedoch nicht sagen. Hinweise auf eine wichtige Rolle der Th17-Zellen in der Pathogenese der MG liefern die Ergebnisse aber nicht.
Für die Tc17-Zellen lässt sich aus der gesteigerten Zellzahl bei Patienten mit Thymektomie im Vergleich zu Patienten ohne Thymektomie zum einen ein therapeutischer Effekt der Thymektomie und zum anderen eine möglicherweise protektive Rolle dieser Zellpopulation in Bezug auf die MG ableiten, da eine Thymektomie oft mit einer Symptomlinderung einhergeht (Wolfe et al, 2016). Zudem scheint die Zahl der Tc17-Zellen nicht durch eine medikamentöse immunsuppressive Therapie beeinflussbar zu sein. In einer anderen Arbeit fand man einen nicht signifikant erhöhten Anteil an Tc17-Zellen bei MG-Patienten im Vergleich zu Gesunden und leitete eine krankheitsfördernde Rolle der Tc17-Zellen bei der MG ab (Yi et al, 2020). Die IFNγ-produzierenden Tc17-Zellen zeigten sich in ihrer Zahl in meiner Arbeit bei den MG-Patienten im Vergleich zu Gesunden im Trend erhöht. Dies kann trotz fehlender Signifikanz als Hinweis auf eine pathogenetische Bedeutung dieser Zellpopulation bei der MG gewertet werden.
Die Zahlen der $CD8^{+}CD161^{high}$ Zellen und der $CD4^{+}CD161^{+}$ Zellen zeigten sich bei den MG-Patienten im Vergleich zu Gesunden signifikant verringert. Dies ist am ehesten auf die medikamentöse immunsuppressive Therapie zurückzuführen. Darüber hinaus ergaben sich Hinweise darauf, dass eine Thymektomie ebenfalls die Zahl dieser Zellen beeinflusst und zu einer Erhöhung der Zellzahl führt. Eine negative

Rolle der beiden Zellpopulationen für die Pathogenese der MG lässt sich aus diesen Ergebnissen nicht ableiten.

Anhand der erhaltenen Ergebnisse ergeben sich keine Hinweise darauf, dass Th1/Th17-Zellen am Krankheitsprozess der MG beteiligt sind. Jedoch fand sich auch hier in einer anderen Studie ein nicht signifikant erhöhter Anteil an Th1/Th17-Zellen bei MG-Patienten im Vergleich zu Gesunden (Yi et al, 2020).

Für die γδ-T-Zellen lässt sich aus den Ergebnissen keine pathogenetische Rolle dieser Zellen bei der MG ableiten. Für diese Zellpopulation wurden in anderen Arbeiten ähnliche Ergebnisse gefunden, wie in der vorliegenden Arbeit (Ragheb et al, 1999; van der Geest et al, 2018). Allerdings liegt zu γδ-T-Zellen im Zusammenhang mit der MG nur wenig Literatur vor. Zur Erweiterung der Erkenntnisse zu diesem Zelltypus speziell im Zusammenhang mit der MG ist weitere Forschung nötig.

Die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse zu den NK-Zellen sprechen bei der Subpopulation der $CD56^{dim}CD16^{bright}CD62L^{-}$ Zellen für eine wichtige Funktion dieser Zellen bei der MG, wie sie für NK-Zellen beim Mausmodell postuliert wurde (Shi et al, 2000). Somit scheint neben dem adaptiven auch das nicht-adaptive Immunsystem für die Abläufe bei der MG von Bedeutung zu sein. Aus diesem Grund sind weitere Untersuchungen zu den NK-Zellen bei der MG sinnvoll. Eine Thymektomie scheint auch die Zahl der $CD56^{dim}CD16^{bright}$ Zellen zu beeinflussen und an die Verhältnisse bei Gesunden anzunähern.

Zusammenfassend liefert die vorliegende Arbeit Hinweise darauf, dass Tc17-Zellen und $CD56^{dim}CD16^{bright}CD62L^{-}$ Zellen im Krankheitsverlauf der MG eine Rolle spielen und dass sich die Zahl dieser beiden Zellpopulationen durch eine Thymektomie und nicht durch eine medikamentöse immunsuppressive Therapie beeinflussen lässt. Auf die Zahl der Th17-Zellen scheinen vorrangig eine medikamentöse immunsuppressive Therapie und möglicherweise auch eine Thymektomie Einfluss zu nehmen. Eine wichtige Bedeutung in der Pathogenese der MG lässt sich für die Th17-Zellen jedoch nicht erkennen.

Möglicherweise kann aber die Zellzahlbestimmung der Th17-Zellen bei MG-Patienten dazu genutzt werden, das Ansprechen auf eine Thymektomie oder eine medikamentöse immunsuppressive Therapie vorauszusagen oder objektiv nachzuweisen. Therapieversuche, die über eine Hemmung des Transkriptionsfaktors RORc die Reduktion der Zahl IL17-produzierender Zellen zum Ziel haben, könnten

möglicherweise zu unspezifisch auch die Zahl jener Zellpopulationen verringern, die den Krankheitsverlauf der MG günstig beeinflussen.

5. Literaturverzeichnis

Acosta-Rodriguez, E. V., Rivino, L., Geginat, J., Jarrossay, D., Gattorno, M., Lanzavecchia, A., Sallusto, F. & Napolitani, G. (2007) Surface phenotype and antigenic specificity of human interleukin 17-producing T helper memory cells. *Nat Immunol*, 8(6), 639-46.

Akbar, A. N., Terry, L., Timms, A., Beverley, P. C. & Janossy, G. (1988) Loss of CD45R and gain of UCHL1 reactivity is a feature of primed T cells. *J Immunol*, 140(7), 2171-8.

Anderson, M. S., Venanzi, E. S., Klein, L., Chen, Z., Berzins, S. P., Turley, S. J., von Boehmer, H., Bronson, R., Dierich, A., Benoist, C. & Mathis, D. (2002) Projection of an immunological self shadow within the thymus by the aire protein. *Science*, 298(5597), 1395-401.

Ando, K., Guidotti, L. G., Wirth, S., Ishikawa, T., Missale, G., Moriyama, T., Schreiber, R. D., Schlicht, H. J., Huang, S. N. & Chisari, F. V. (1994) Class I-restricted cytotoxic T lymphocytes are directly cytopathic for their target cells in vivo. *J Immunol*, 152(7), 3245-53.

Anegon, I., Cuturi, M. C., Trinchieri, G. & Perussia, B. (1988) Interaction of Fc receptor (CD16) ligands induces transcription of interleukin 2 receptor (CD25) and lymphokine genes and expression of their products in human natural killer cells. *J Exp Med*, 167(2), 452-72.

Annibali, V., Ristori, G., Angelini, D. F., Serafini, B., Mechelli, R., Cannoni, S., Romano, S., Paolillo, A., Abderrahim, H., Diamantini, A., Borsellino, G., Aloisi, F., Battistini, L. & Salvetti, M. (2011) CD161(high)CD8+T cells bear pathogenetic potential in multiple sclerosis. *Brain*, 134(Pt 2), 542-54.

Annunziato, F., Cosmi, L., Santarlasci, V., Maggi, L., Liotta, F., Mazzinghi, B., Parente, E., Fili, L., Ferri, S., Frosali, F., Giudici, F., Romagnani, P., Parronchi, P., Tonelli, F., Maggi, E. & Romagnani, S. (2007) Phenotypic and functional features of human Th17 cells. *J Exp Med*, 204(8), 1849-61.

Aragones, J. M., Bolibar, I., Bonfill, X., Bufill, E., Mummany, A., Alonso, F. & Illa, I. (2003) Myasthenia gravis: a higher than expected incidence in the elderly. *Neurology*, 60(6), 1024-6.

Badrising, U., Brandenburg, H., van Hilten, J., Brietl, P. & Wintzen, A. (1996) Intranasal neostigmine as add-on therapy in myasthenia gravis. *J Neurol*, 243(Suppl), 59.

Balasa, B., Deng, C., Lee, J., Bradley, L. M., Dalton, D. K., Christadoss, P. & Sarvetnick, N. (1997) Interferon gamma (IFN-gamma) is necessary for the genesis of acetylcholine receptor-induced clinical experimental autoimmune myasthenia gravis in mice. *J Exp Med*, 186(3), 385-91.

Bendelac, A., Lantz, O., Quimby, M. E., Yewdell, J. W., Bennink, J. R. & Brutkiewicz, R. R. (1995) CD1 recognition by mouse NK1+ T lymphocytes. *Science*, 268(5212), 863-5.

Bermejo, D. A., Jackson, S. W., Gorosito-Serran, M., Acosta-Rodriguez, E. V., Amezcua-Vesely, M. C., Sather, B. D., Singh, A. K., Khim, S., Mucci, J., Liggitt, D., Campetella, O., Oukka, M., Gruppi, A. & Rawlings, D. J. (2013) Trypanosoma cruzi trans-sialidase initiates a program independent of the transcription factors RORgammat and Ahr that leads to IL-17 production by activated B cells. *Nat Immunol*, 14(5), 514-22.

Berrouschot, J., Baumann, I., Kalischewski, P., Sterker, M. & Schneider, D. (1997) Therapy of myasthenic crisis. *Crit Care Med*, 25(7), 1228-35.

Besinger, U. A., Toyka, K. V., Homberg, M., Heininger, K., Hohlfeld, R. & Fateh-Moghadam, A. (1983) Myasthenia gravis: long-term correlation of binding and bungarotoxin blocking antibodies against acetylcholine receptors with changes in disease severity. *Neurology*, 33(10), 1316-21.

Bever, C. T., Jr., Aquino, A. V., Penn, A. S., Lovelace, R. E. & Rowland, L. P. (1983) Prognosis of ocular myasthenia. *Ann Neurol*, 14(5), 516-9.

Billerbeck, E., Kang, Y. H., Walker, L., Lockstone, H., Grafmueller, S., Fleming, V., Flint, J., Willberg, C. B., Bengsch, B., Seigel, B., Ramamurthy, N., Zitzmann, N., Barnes, E. J., Thevanayagam, J., Bhagwanani, A., Leslie, A., Oo, Y. H., Kollnberger, S., Bowness, P., Drognitz, O., Adams, D. H., Blum, H. E., Thimme, R. & Klenerman, P. (2010) Analysis of CD161 expression on human CD8+ T cells defines a distinct functional subset with tissue-homing properties. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(7), 3006-11.

Blalock, A., Harvey, A., Ford, F. R., Lilienthal, J. L. & Jr (1941) The treatment of myasthenia gravis by removal of the thymus gland: Preliminary report. *Journal of the American Medical Association*, 117(18), 1529-1533.

Bottazzo, G. F., Florin-Christensen, A. & Doniach, D. (1974) Islet-cell antibodies in diabetes mellitus with autoimmune polyendocrine deficiencies. *Lancet*, 2(7892), 1279-83.

Brandes, M., Willimann, K. & Moser, B. (2005) Professional antigen-presentation function by human gammadelta T Cells. *Science*, 309(5732), 264-8.

Brenner, M. B., McLean, J., Dialynas, D. P., Strominger, J. L., Smith, J. A., Owen, F. L., Seidman, J. G., Ip, S., Rosen, F. & Krangel, M. S. (1986) Identification of a putative second T-cell receptor. *Nature*, 322(6075), 145-9.

Brown, C. T., Davis-Richardson, A. G., Giongo, A., Gano, K. A., Crabb, D. B., Mukherjee, N., Casella, G., Drew, J. C., Ilonen, J., Knip, M., Hyöty, H., Veijola, R., Simell, T., Simell, O., Neu, J., Wasserfall, C. H., Schatz, D., Atkinson, M. A. & Triplett, E. W. (2011) Gut Microbiome Metagenomics Analysis Suggests a Functional Model for the Development of Autoimmunity for Type 1 Diabetes. *PLoS ONE*, 6(10), e25792.

Bryant, A., Atkins, H., Pringle, C. E., Allan, D., Anstee, G., Bence-Bruckler, I., Hamelin, L., Hodgins, M., Hopkins, H., Huebsch, L., McDiarmid, S., Sabloff, M., Sheppard, D., Tay, J. & Bredeson, C. (2016) Myasthenia Gravis Treated With Autologous Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *JAMA Neurol*, 73(6), 652-8.

Caccamo, N., Meraviglia, S., Ferlazzo, V., Angelini, D., Borsellino, G., Poccia, F., Battistini, L., Dieli, F. & Salerno, A. (2005) Differential requirements for antigen or homeostatic cytokines for proliferation and differentiation of human Vgamma9Vdelta2 naive, memory and effector T cell subsets. *Eur J Immunol*, 35(6), 1764-72.

Caligiuri, M. A., Zmuidzinas, A., Manley, T. J., Levine, H., Smith, K. A. & Ritz, J. (1990) Functional consequences of interleukin 2 receptor expression on resting human lymphocytes. Identification of a novel natural killer cell subset with high affinity receptors. *J Exp Med*, 171(5), 1509-26.

Cao, Y., Amezquita, R. A., Kleinstein, S. H., Stathopoulos, P., Nowak, R. J. & O'Connor, K. C. (2016) Autoreactive T Cells from Patients with Myasthenia Gravis Are Characterized by Elevated IL-17, IFN-γ, and GM-CSF and Diminished IL-10 Production. *J Immunol*, 196(5), 2075-84.

Cerottini, J. C., Nordin, A. A. & Brunner, K. T. (1970a) In vitro cytotoxic activity of thymus cells sensitized to alloantigens. *Nature*, 227(5253), 72-3.

Cerottini, J. C., Nordin, A. A. & Brunner, K. T. (1970b) Specific in vitro cytotoxicity of thymus-derived lymphocytes sensitized to alloantigens. *Nature*, 228(5278), 1308-9.

Chalan, P., Bijzet, J., Kroesen, B. J., Boots, A. M. & Brouwer, E. (2016) Altered Natural Killer Cell Subsets in Seropositive Arthralgia and Early Rheumatoid Arthritis Are Associated with Autoantibody Status. *J Rheumatol*, 43(6), 1008-16.

Chung, Y., Yang, X., Chang, S. H., Ma, L., Tian, Q. & Dong, C. (2006) Expression and regulation of IL-22 in the IL-17-producing CD4+ T lymphocytes. *Cell Res*, 16(11), 902-7.

Cole, R. N., Reddel, S. W., Gervasio, O. L. & Phillips, W. D. (2008) Anti-MuSK patient antibodies disrupt the mouse neuromuscular junction. *Ann Neurol*, 63(6), 782-9.

Compston, D. A., Vincent, A., Newsom-Davis, J. & Batchelor, J. R. (1980) Clinical, pathological, HLA antigen and immunological evidence for disease heterogeneity in myasthenia gravis. *Brain*, 103(3), 579-601.

Cooper, M. A., Fehniger, T. A., Turner, S. C., Chen, K. S., Ghaheri, B. A., Ghayur, T., Carson, W. E. & Caligiuri, M. A. (2001) Human natural killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56(bright) subset. *Blood*, 97(10), 3146-51.

Cortes-Vicente, E., Gallardo, E., Martinez, M. A., Diaz-Manera, J., Querol, L., Rojas-Garcia, R. & Illa, I. (2016) Clinical Characteristics of Patients With Double-Seronegative Myasthenia Gravis and Antibodies to Cortactin. *JAMA Neurol*, 73(9), 1099-104.

Cosmi, L., De Palma, R., Santarlasci, V., Maggi, L., Capone, M., Frosali, F., Rodolico, G., Querci, V., Abbate, G., Angeli, R., Berrino, L., Fambrini, M., Caproni, M., Tonelli, F., Lazzeri, E., Parronchi, P., Liotta, F., Maggi, E., Romagnani, S. & Annunziato, F. (2008) Human interleukin 17-producing cells originate from a CD161+CD4+ T cell precursor. *J Exp Med*, 205(8), 1903-16.

Csuka, D., Banati, M., Rozsa, C., Fust, G. & Illes, Z. (2012) High anti-EBNA-1 IgG levels are associated with early-onset myasthenia gravis. *Eur J Neurol*, 19(6), 842-6.

Dardalhon, V., Awasthi, A., Kwon, H., Galileos, G., Gao, W., Sobel, R. A., Mitsdoerffer, M., Strom, T. B., Elyaman, W., Ho, I. C., Khoury, S., Oukka, M. & Kuchroo, V. K. (2008) IL-4 inhibits TGF-beta-induced Foxp3+ T cells and, together with TGF-beta, generates IL-9+ IL-10+ Foxp3(-) effector T cells. *Nat Immunol*, 9(12), 1347-55.

de Goffau, M. C., Luopajarvi, K., Knip, M., Ilonen, J., Ruohtula, T., Harkonen, T., Orivuori, L., Hakala, S., Welling, G. W., Harmsen, H. J. & Vaarala, O. (2013) Fecal microbiota composition differs between children with beta-cell autoimmunity and those without. *Diabetes*, 62(4), 1238-44.

DeChiara, T. M., Bowen, D. C., Valenzuela, D. M., Simmons, M. V., Poueymirou, W. T., Thomas, S., Kinetz, E., Compton, D. L., Rojas, E., Park, J. S., Smith, C.,

DiStefano, P. S., Glass, D. J., Burden, S. J. & Yancopoulos, G. D. (1996) The receptor tyrosine kinase MuSK is required for neuromuscular junction formation in vivo. *Cell*, 85(4), 501-12.

Del Prete, G. F., De Carli, M., Mastromauro, C., Biagiotti, R., Macchia, D., Falagiani, P., Ricci, M. & Romagnani, S. (1991) Purified protein derivative of Mycobacterium tuberculosis and excretory-secretory antigen(s) of Toxocara canis expand in vitro human T cells with stable and opposite (type 1 T helper or type 2 T helper) profile of cytokine production. *J Clin Invest*, 88(1), 346-50.

Deusch, K., Luling, F., Reich, K., Classen, M., Wagner, H. & Pfeffer, K. (1991) A major fraction of human intraepithelial lymphocytes simultaneously expresses the gamma/delta T cell receptor, the CD8 accessory molecule and preferentially uses the V delta 1 gene segment. *Eur J Immunol*, 21(4), 1053-9.

Dieli, F., Poccia, F., Lipp, M., Sireci, G., Caccamo, N., Di Sano, C. & Salerno, A. (2003) Differentiation of effector/memory Vdelta2 T cells and migratory routes in lymph nodes or inflammatory sites. *J Exp Med*, 198(3), 391-7.

Drachman, D. B. (1990) How to recognize an antibody-mediated autoimmune disease: criteria. *Res Publ Assoc Res Nerv Ment Dis*, 68, 183-6.

Drachman, D. B., Adams, R. N., Hu, R., Jones, R. J. & Brodsky, R. A. (2008) Rebooting the immune system with high-dose cyclophosphamide for treatment of refractory myasthenia gravis. *Ann N Y Acad Sci*, 1132, 305-14.

Eaton, W. W., Rose, N. R., Kalaydjian, A., Pedersen, M. G. & Mortensen, P. B. (2007) Epidemiology of autoimmune diseases in Denmark. *J Autoimmun*, 29(1), 1-9.

Ebert, L. M., Meuter, S. & Moser, B. (2006) Homing and function of human skin gammadelta T cells and NK cells: relevance for tumor surveillance. *J Immunol*, 176(7), 4331-6.

Engel, A. G., Lambert, E. H. & Howard, F. M. (1977) Immune complexes (IgG and C3) at the motor end-plate in myasthenia gravis: ultrastructural and light microscopic localization and electrophysiologic correlations. *Mayo Clin Proc*, 52(5), 267-80.

Evoli, A., Batocchi, A. P., Minisci, C., Di Schino, C. & Tonali, P. (2000) Clinical characteristics and prognosis of myasthenia gravis in older people. *J Am Geriatr Soc*, 48(11), 1442-8.

Eyerich, S., Eyerich, K., Pennino, D., Carbone, T., Nasorri, F., Pallotta, S., Cianfarani, F., Odorisio, T., Traidl-Hoffmann, C., Behrendt, H., Durham, S. R., Schmidt-Weber, C. B. & Cavani, A. (2009) Th22 cells represent a distinct human T cell subset involved in epidermal immunity and remodeling. *J Clin Invest*, 119(12), 3573-85.

Fergusson, J. R., Huhn, M. H., Swadling, L., Walker, L. J., Kurioka, A., Llibre, A., Bertoletti, A., Hollander, G., Newell, E. W., Davis, M. M., Sverremark-Ekstrom, E., Powrie, F., Capone, S., Folgori, A., Barnes, E., Willberg, C. B., Ussher, J. E. & Klenerman, P. (2016) CD161(int)CD8+ T cells: a novel population of highly functional, memory CD8+ T cells enriched within the gut. *Mucosal Immunol*, 9(2), 401-13.

Ferretti, S., Bonneau, O., Dubois, G. R., Jones, C. E. & Trifilieff, A. (2003) IL-17, produced by lymphocytes and neutrophils, is necessary for lipopolysaccharide-induced airway neutrophilia: IL-15 as a possible trigger. *J Immunol*, 170(4), 2106-12.

Fertuck, H. C. & Salpeter, M. M. (1976) Quantitation of junctional and extrajunctional acetylcholine receptors by electron microscope autoradiography after 125I-alpha-bungarotoxin binding at mouse neuromuscular junctions. *J Cell Biol*, 69(1), 144-58.

Fitzgerald-Bocarsly, P., Howell, D. M., Pettera, L., Tehrani, S. & Lopez, C. (1991) Immediate-early gene expression is sufficient for induction of natural killer cell-mediated lysis of herpes simplex virus type 1-infected fibroblasts. *J Virol*, 65(6), 3151-60.

Formica, M. K., Palmer, J. R., Rosenberg, L. & McAlindon, T. E. (2003) Smoking, alcohol consumption, and risk of systemic lupus erythematosus in the Black Women's Health Study. *J Rheumatol*, 30(6), 1222-6.

Fossiez, F., Djossou, O., Chomarat, P., Flores-Romo, L., Ait-Yahia, S., Maat, C., Pin, J. J., Garrone, P., Garcia, E., Saeland, S., Blanchard, D., Gaillard, C., Das Mahapatra, B., Rouvier, E., Golstein, P., Banchereau, J. & Lebecque, S. (1996) T cell interleukin-17 induces stromal cells to produce proinflammatory and hematopoietic cytokines. *J Exp Med*, 183(6), 2593-603.

Freedman, L. R., Cerottini, J. C. & Brunner, K. T. (1972) In vivo studies of the role of cytotoxic T cells in tumor allograft immunity. *J Immunol*, 109(6), 1371-8.

Fregonezi, G. A., Resqueti, V. R., Guell, R., Pradas, J. & Casan, P. (2005) Effects of 8-week, interval-based inspiratory muscle training and breathing retraining in patients with generalized myasthenia gravis. *Chest*, 128(3), 1524-30.

Frey, M., Packianathan, N. B., Fehniger, T. A., Ross, M. E., Wang, W. C., Stewart, C. C., Caligiuri, M. A. & Evans, S. S. (1998) Differential expression and function of L-selectin on CD56bright and CD56dim natural killer cell subsets. *J Immunol*, 161(1), 400-8.

Friou, G. J., Finch, S. C. & Detre, K. D. (1958) Interaction of nuclei and globulin from lupus erythematosis serum demonstrated with fluorescent antibody. *J Immunol*, 80(4), 324-9.

Fujii, Y., Hashimoto, J., Monden, Y., Ito, T., Nakahara, K. & Kawashima, Y. (1986) Specific activation of lymphocytes against acetylcholine receptor in the thymus in myasthenia gravis. *J Immunol*, 136(3), 887-91.

Gajdos, P., Chevret, S. & Toyka, K. (2002) Plasma exchange for myasthenia gravis. *Cochrane Database Syst Rev*(4).

Gajdos, P., Chevret, S. & Toyka, K. V. (2012) Intravenous immunoglobulin for myasthenia gravis. *Cochrane Database Syst Rev*(12).

Gallardo, E., Martinez-Hernandez, E., Titulaer, M. J., Huijbers, M. G., Martinez, M. A., Ramos, A., Querol, L., Diaz-Manera, J., Rojas-Garcia, R., Hayworth, C. R., Verschuuren, J. J., Balice-Gordon, R., Dalmau, J. & Illa, I. (2014) Cortactin autoantibodies in myasthenia gravis. *Autoimmun Rev*, 13(10), 1003-7.

Garland, H. & Clark, A. N. (1956) Myasthenia gravis; a personal study of 60 cases. *Br Med J*, 1(4978), 1259-62.

Gasperi, C., Melms, A., Schoser, B., Zhang, Y., Meltoranta, J., Risson, V., Schaeffer, L., Schalke, B. & Kroger, S. (2014) Anti-agrin autoantibodies in myasthenia gravis. *Neurology*, 82(22), 1976-83.

Gautam, M., Noakes, P. G., Mudd, J., Nichol, M., Chu, G. C., Sanes, J. R. & Merlie, J. P. (1995) Failure of postsynaptic specialization to develop at neuromuscular junctions of rapsyn-deficient mice. *Nature*, 377(6546), 232-6.

Golstein, P., Wigzell, H., Blomgren, H. & Svedmyr, E. A. (1972) Cells mediating specific in vitro cytotoxicity. II. Probable autonomy of thymus-processed lymphocytes (T cells) for the killing of allogeneic target cells. *J Exp Med*, 135(4), 890-906.

Gordon, K. B., Blauvelt, A., Papp, K. A., Langley, R. G., Luger, T., Ohtsuki, M., Reich, K., Amato, D., Ball, S. G., Braun, D. K., Cameron, G. S., Erickson, J., Konrad, R. J., Muram, T. M., Nickoloff, B. J., Osuntokun, O. O., Secrest, R. J., Zhao, F., Mallbris, L. & Leonardi, C. L. (2016) Phase 3 Trials of Ixekizumab in Moderate-to-Severe Plaque Psoriasis. *N Engl J Med*, 375(4), 345-56.

Grafmueller, S., Billerbeck, E., Blum, H. E., Neumann-Haefelin, C. & Thimme, R. (2012) Differential antigen specificity of hepatitis C virus-specific interleukin 17- and interferon gamma-producing CD8(+) T cells during chronic infection. *J Infect Dis*, 205(7), 1142-6.

Grob, D., Arsura, E. L., Brunner, N. G. & Namba, T. (1987) The course of myasthenia gravis and therapies affecting outcome. *Ann N Y Acad Sci*, 505, 472-99.

Groh, V., Porcelli, S., Fabbi, M., Lanier, L. L., Picker, L. J., Anderson, T., Warnke, R. A., Bhan, A. K., Strominger, J. L. & Brenner, M. B. (1989) Human lymphocytes bearing T cell receptor gamma/delta are phenotypically diverse and evenly distributed throughout the lymphoid system. *J Exp Med*, 169(4), 1277-94.

Harrington, L. E., Hatton, R. D., Mangan, P. R., Turner, H., Murphy, T. L., Murphy, K. M. & Weaver, C. T. (2005) Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol*, 6(11), 1123-32.

Hart, I. K., Sathasivam, S. & Sharshar, T. (2007) Immunosuppressive agents for myasthenia gravis. *Cochrane Database Syst Rev*(4).

Heckmann, J. M., Rawoot, A., Bateman, K., Renison, R. & Badri, M. (2011) A single-blinded trial of methotrexate versus azathioprine as steroid-sparing agents in generalized myasthenia gravis. *BMC Neurol*, 11, 97.

Hehir, M. K., Burns, T. M., Alpers, J., Conaway, M. R., Sawa, M. & Sanders, D. B. (2010) Mycophenolate mofetil in AChR-antibody-positive myasthenia gravis: outcomes in 102 patients. *Muscle Nerve*, 41(5), 593-8.

Higuchi, O., Hamuro, J., Motomura, M. & Yamanashi, Y. (2011) Autoantibodies to low-density lipoprotein receptor-related protein 4 in myasthenia gravis. *Ann Neurol*, 69(2), 418-22.

Hoch, W., McConville, J., Helms, S., Newsom-Davis, J., Melms, A. & Vincent, A. (2001) Auto-antibodies to the receptor tyrosine kinase MuSK in patients with myasthenia gravis without acetylcholine receptor antibodies. *Nat Med*, 7(3), 365-8.

Hosseini, M., Robat-Jazi, B., Shaygannejad, V., Naffisi, S., Mirmossayeb, O., Rezaei, A., Mansourian, M. & Esmaeil, N. (2017) Increased Proportion of Tc17 and Th17 Cells and Their Significant Reduction after Thymectomy May Be Related to Disease Progression in Myasthenia Gravis. *Neuroimmunomodulation*, 24(4-5), 264-270.

Howard, J. F., Jr., Utsugisawa, K., Benatar, M., Murai, H., Barohn, R. J., Illa, I., Jacob, S., Vissing, J., Burns, T. M., Kissel, J. T., Muppidi, S., Nowak, R. J., O'Brien, F., Wang, J. J. & Mantegazza, R. (2017) Safety and efficacy of eculizumab in anti-acetylcholine receptor antibody-positive refractory generalised myasthenia gravis (REGAIN): a phase 3, randomised, double-blind, placebo-controlled, multicentre study. *Lancet Neurol*, 16(12), 976-986.

Hymowitz, S. G., Filvaroff, E. H., Yin, J. P., Lee, J., Cai, L., Risser, P., Maruoka, M., Mao, W., Foster, J., Kelley, R. F., Pan, G., Gurney, A. L., de Vos, A. M. & Starovasnik, M. A. (2001) IL-17s adopt a cystine knot fold: structure and activity of a novel cytokine, IL-17F, and implications for receptor binding. *Embo j*, 20(19), 5332-41.

Ito, A., Sasaki, R., Ii, Y., Nakayama, S., Motomura, M. & Tomimoto, H. (2013) [A case of thymoma-associated myasthenia gravis with anti-MuSK antibodies]. *Rinsho Shinkeigaku*, 53(5), 372-5.

Ivanov, II, McKenzie, B. S., Zhou, L., Tadokoro, C. E., Lepelley, A., Lafaille, J. J., Cua, D. J. & Littman, D. R. (2006) The orphan nuclear receptor RORgammat directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. *Cell*, 126(6), 1121-33.

Jaretzki, A., 3rd, Barohn, R. J., Ernstoff, R. M., Kaminski, H. J., Keesey, J. C., Penn, A. S. & Sanders, D. B. (2000) Myasthenia gravis: recommendations for clinical research standards. Task Force of the Medical Scientific Advisory Board of the Myasthenia Gravis Foundation of America. *Neurology*, 55(1), 16-23.

Jeffries, M. A., Dozmorov, M., Tang, Y., Merrill, J. T., Wren, J. D. & Sawalha, A. H. (2011) Genome-wide DNA methylation patterns in CD4+ T cells from patients with systemic lupus erythematosus. *Epigenetics*, 6(5), 593-601.

Kenna, T., Golden-Mason, L., Norris, S., Hegarty, J. E., O'Farrelly, C. & Doherty, D. G. (2004) Distinct subpopulations of gamma delta T cells are present in normal and tumor-bearing human liver. *Clin Immunol*, 113(1), 56-63.

Kikutani, H., Taga, T., Akira, S., Kishi, H., Miki, Y., Saiki, O., Yamamura, Y. & Kishimoto, T. (1985) Effect of B cell differentiation factor (BCDF) on biosynthesis and secretion of immunoglobulin molecules in human B cell lines. *J Immunol*, 134(2), 990-5.

Kim, N., Stiegler, A. L., Cameron, T. O., Hallock, P. T., Gomez, A. M., Huang, J. H., Hubbard, S. R., Dustin, M. L. & Burden, S. J. (2008) Lrp4 is a receptor for Agrin and forms a complex with MuSK. *Cell*, 135(2), 334-42.

King, D. P. & Jones, P. P. (1983) Induction of Ia and H-2 antigens on a macrophage cell line by immune interferon. *J Immunol*, 131(1), 315-8.

Kleinschek, M. A., Boniface, K., Sadekova, S., Grein, J., Murphy, E. E., Turner, S. P., Raskin, L., Desai, B., Faubion, W. A., de Waal Malefyt, R., Pierce, R. H., McClanahan, T. & Kastelein, R. A. (2009) Circulating and gut-resident human Th17 cells express CD161 and promote intestinal inflammation. *J Exp Med*, 206(3), 525-34.

Kohler, W., Bucka, C. & Klingel, R. (2011) A randomized and controlled study comparing immunoadsorption and plasma exchange in myasthenic crisis. *J Clin Apher*, 26(6), 347-55.

Kondo, T., Takata, H., Matsuki, F. & Takiguchi, M. (2009) Cutting edge: Phenotypic characterization and differentiation of human CD8+ T cells producing IL-17. *J Immunol*, 182(4), 1794-8.

Kott, E., Hahn, T., Huberman, M., Levin, S. & Schattner, A. (1990) Interferon system and natural killer cell activity in myasthenia gravis. *Q J Med*, 76(281), 951-60.

Kozbor, D., Trinchieri, G., Monos, D. S., Isobe, M., Russo, G., Haney, J. A., Zmijewski, C. & Croce, C. M. (1989) Human TCR-gamma+/delta+, CD8+ T lymphocytes recognize tetanus toxoid in an MHC-restricted fashion. *J Exp Med*, 169(5), 1847-51.

Kriss, J. P., Pleshakov, V. & Chien, J. R. (1964) Isolation and Identification of the Long-Acting Thyroid Stimulator and Its Relation to Hyperthyroidism and Circumscribed Pretibial Myxedema. *J Clin Endocrinol Metab*, 24, 1005-28.

Kryczek, I., Zhao, E., Liu, Y., Wang, Y., Vatan, L., Szeliga, W., Moyer, J., Klimczak, A., Lange, A. & Zou, W. (2011) Human TH17 cells are long-lived effector memory cells. *Sci Transl Med*, 3(104), 104ra100.

Kuhl, A. A., Pawlowski, N. N., Grollich, K., Blessenohl, M., Westermann, J., Zeitz, M., Loddenkemper, C. & Hoffmann, J. C. (2009) Human peripheral gammadelta T cells possess regulatory potential. *Immunology*, 128(4), 580-8.

Lanier, L. L., Chang, C. & Phillips, J. H. (1994) Human NKR-P1A. A disulfide-linked homodimer of the C-type lectin superfamily expressed by a subset of NK and T lymphocytes. *J Immunol*, 153(6), 2417-28.

Lanier, L. L., Le, A. M., Civin, C. I., Loken, M. R. & Phillips, J. H. (1986) The relationship of CD16 (Leu-11) and Leu-19 (NKH-1) antigen expression on human peripheral blood NK cells and cytotoxic T lymphocytes. *J Immunol*, 136(12), 4480-6.

Lanier, L. L., Testi, R., Bindl, J. & Phillips, J. H. (1989) Identity of Leu-19 (CD56) leukocyte differentiation antigen and neural cell adhesion molecule. *J Exp Med*, 169(6), 2233-8.

Lantz, O. & Bendelac, A. (1994) An invariant T cell receptor alpha chain is used by a unique subset of major histocompatibility complex class I-specific CD4+ and CD4-8- T cells in mice and humans. *J Exp Med*, 180(3), 1097-106.

Lin, H., Zhou, Y. L., Li, J., Li, Y. J., Zhao, Y., Yan, B. & Liu, Y. (2013) [The role of T helper 17 cells of synovial fluid in rheumatoid arthritis]. *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*, 44(6), 907-10.

Lindstrom, J. (1977) An assay for antibodies to human acetylcholine receptor in serum from patients with myasthenia gravis. *Clin Immunol Immunopathol*, 7(1), 36-43.

Lindstrom, J. M., Seybold, M. E., Lennon, V. A., Whittingham, S. & Duane, D. D. (1976) Antibody to acetylcholine receptor in myasthenia gravis. Prevalence, clinical correlates, and diagnostic value. *Neurology*, 26(11), 1054-9.

Liu, C. W., Luo, M., Mei, J. D., Zhu, Y. K., Pu, Q., Ma, L., Che, G. W., Lin, Y. D., Wu, Z., Wang, Y., Kou, Y. L. & Liu, L. X. (2013) Perioperative and long-term outcome of thymectomy for myasthenia gravis: comparison of surgical approaches and prognostic analysis. *Chin Med J (Engl)*, 126(1), 34-40.

Llibre, A., Lopez-Macias, C., Marafioti, T., Mehta, H., Partridge, A., Kanzig, C., Rivellese, F., Galson, J. D., Walker, L. J., Milne, P., Phillips, R. E., Kelly, D. F., Freeman, G. J., El Shikh, M. E., Klenerman, P. & Willberg, C. B. (2016) LLT1 and CD161 Expression in Human Germinal Centers Promotes B Cell Activation and CXCR4 Downregulation. *J Immunol*, 196(5), 2085-94.

Lowes, M. A., Kikuchi, T., Fuentes-Duculan, J., Cardinale, I., Zaba, L. C., Haider, A. S., Bowman, E. P. & Krueger, J. G. (2008) Psoriasis vulgaris lesions contain discrete populations of Th1 and Th17 T cells. *J Invest Dermatol*, 128(5), 1207-11.

MacCuish, A. C., Irvine, W. J., Barnes, E. W. & Duncan, L. J. (1974) Antibodies to pancreatic islet cells in insulin-dependent diabetics with coexistent autoimmune disease. *Lancet*, 2(7896), 1529-31.

Maddison, P., McConville, J., Farrugia, M. E., Davies, N., Rose, M., Norwood, F., Jungbluth, H., Robb, S. & Hilton-Jones, D. (2011) The use of rituximab in myasthenia gravis and Lambert-Eaton myasthenic syndrome. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 82(6), 671-3.

Madhavan, R., Gong, Z. L., Ma, J. J., Chan, A. W. & Peng, H. B. (2009) The function of cortactin in the clustering of acetylcholine receptors at the vertebrate neuromuscular junction. *PLoS One*, 4(12), e8478.

Maggi, L., Andreetta, F., Antozzi, C., Confalonieri, P., Cornelio, F., Scaioli, V. & Mantegazza, R. (2008) Two cases of thymoma-associated myasthenia gravis without antibodies to the acetylcholine receptor. *Neuromuscul Disord*, 18(8), 678-80.

Maggi, L., Santarlasci, V., Capone, M., Peired, A., Frosali, F., Crome, S. Q., Querci, V., Fambrini, M., Liotta, F., Levings, M. K., Maggi, E., Cosmi, L., Romagnani, S. & Annunziato, F. (2010) CD161 is a marker of all human IL-17-producing T-cell subsets and is induced by RORC. *Eur J Immunol*, 40(8), 2174-81.

Maniaol, A. H., Elsais, A., Lorentzen, A. R., Owe, J. F., Viken, M. K., Saether, H., Flam, S. T., Brathen, G., Kampman, M. T., Midgard, R., Christensen, M., Rognerud, A., Kerty, E., Gilhus, N. E., Tallaksen, C. M., Lie, B. A. & Harbo, H. F. (2012) Late onset myasthenia gravis is associated with HLA DRB1*15:01 in the Norwegian population. *PLoS One*, 7(5), e36603.

Mantegazza, R., Antozzi, C., Peluchetti, D., Sghirlanzoni, A. & Cornelio, F. (1988) Azathioprine as a single drug or in combination with steroids in the treatment of myasthenia gravis. *J Neurol*, 235(8), 449-53.

Martin, B., Hirota, K., Cua, D. J., Stockinger, B. & Veldhoen, M. (2009) Interleukin-17-producing gammadelta T cells selectively expand in response to pathogen products and environmental signals. *Immunity*, 31(2), 321-30.

Masuda, M., Matsumoto, M., Tanaka, S., Nakajima, K., Yamada, N., Ido, N., Ohtsuka, T., Nishida, M., Hirano, T. & Utsumi, H. (2010) Clinical implication of peripheral CD4+CD25+ regulatory T cells and Th17 cells in myasthenia gravis patients. *J Neuroimmunol*, 225(1-2), 123-31.

Mehndiratta, M. M., Pandey, S. & Kuntzer, T. (2014) Acetylcholinesterase inhibitor treatment for myasthenia gravis. *Cochrane Database Syst Rev*(10).

Merkenschlager, M. & Beverley, P. C. (1989) Evidence for differential expression of CD45 isoforms by precursors for memory-dependent and independent cytotoxic responses: human CD8 memory CTLp selectively express CD45RO (UCHL1). *Int Immunol*, 1(4), 450-9.

Morgan, D. A., Ruscetti, F. W. & Gallo, R. (1976) Selective in vitro growth of T lymphocytes from normal human bone marrows. *Science*, 193(4257), 1007-8.

Morita, C. T., Verma, S., Aparicio, P., Martinez, C., Spits, H. & Brenner, M. B. (1991) Functionally distinct subsets of human gamma/delta T cells. *Eur J Immunol*, 21(12), 2999-3007.

Morstyn, G., Campbell, L., Souza, L. M., Alton, N. K., Keech, J., Green, M., Sheridan, W., Metcalf, D. & Fox, R. (1988) Effect of granulocyte colony stimulating factor on neutropenia induced by cytotoxic chemotherapy. *Lancet*, 1(8587), 667-72.

Nagane, Y., Utsugisawa, K., Obara, D., Kondoh, R. & Terayama, Y. (2005) Efficacy of low-dose FK506 in the treatment of Myasthenia gravis--a randomized pilot study. *Eur Neurol*, 53(3), 146-50.

Nagler, A., Lanier, L. L., Cwirla, S. & Phillips, J. H. (1989) Comparative studies of human FcRIII-positive and negative natural killer cells. *J Immunol*, 143(10), 3183-91.

Nakano, S. & Engel, A. G. (1993) Myasthenia gravis: quantitative immunocytochemical analysis of inflammatory cells and detection of complement membrane attack complex at the end-plate in 30 patients. *Neurology*, 43(6), 1167-72.

Nitta, T., Yagita, H., Sato, K. & Okumura, K. (1989) Involvement of CD56 (NKH-1/Leu-19 antigen) as an adhesion molecule in natural killer-target cell interaction. *J Exp Med*, 170(5), 1757-61.

Northfield, J. W., Kasprowicz, V., Lucas, M., Kersting, N., Bengsch, B., Kim, A., Phillips, R. E., Walker, B. D., Thimme, R., Lauer, G. & Klenerman, P. (2008) CD161 expression on hepatitis C virus-specific CD8+ T cells suggests a distinct pathway of T cell differentiation. *Hepatology*, 47(2), 396-406.

Nurieva, R., Yang, X. O., Martinez, G., Zhang, Y., Panopoulos, A. D., Ma, L., Schluns, K., Tian, Q., Watowich, S. S., Jetten, A. M. & Dong, C. (2007) Essential autocrine regulation by IL-21 in the generation of inflammatory T cells. *Nature*, 448(7152), 480-3.

Oger, J. J. (1993) Thymus histology and acetylcholine receptor antibodies in generalized myasthenia gravis. *Ann N Y Acad Sci*, 681, 110-2.

Okada, K., Inoue, A., Okada, M., Murata, Y., Kakuta, S., Jigami, T., Kubo, S., Shiraishi, H., Eguchi, K., Motomura, M., Akiyama, T., Iwakura, Y., Higuchi, O. & Yamanashi, Y. (2006) The muscle protein Dok-7 is essential for neuromuscular synaptogenesis. *Science*, 312(5781), 1802-5.

Okinaka, S., Reese, H. H., Katsuki, S., Ueki, K., Kuroiwa, Y., Araki, S., Shiraki, H. & Kurland, L. T. (1966) The prevalence of multiple sclerosis and other neurological diseases in Japan. *Acta Neurol Scand*, 42, Suppl 19:68-76.

Okumura, M., Miyoshi, S., Takeuchi, Y., Yoon, H. E., Minami, M., Takeda, S. I., Fujii, Y., Nakahara, K. & Matsuda, H. (1999) Results of surgical treatment of thymomas with special reference to the involved organs. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 117(3), 605-13.

Ortaldo, J. R., Mason, A. T. & O'Shea, J. J. (1995) Receptor-induced death in human natural killer cells: involvement of CD16. *The Journal of Experimental Medicine*, 181(1), 339-344.

Ottaviani, C., Nasorri, F., Bedini, C., de Pità, O., Girolomoni, G. & Cavani, A. (2006) CD56brightCD16– NK cells accumulate in psoriatic skin in response to CXCL10 and CCL5 and exacerbate skin inflammation. *European Journal of Immunology*, 36(1), 118-128.

Palace, J., Newsom-Davis, J. & Lecky, B. (1998) A randomized double-blind trial of prednisolone alone or with azathioprine in myasthenia gravis. Myasthenia Gravis Study Group. *Neurology*, 50(6), 1778-83.

Pandit, L. & Rao, S. N. (1995) Thymomatous myasthenia gravis. *J Assoc Physicians India*, 43(8), 543-5.

Park, H., Li, Z., Yang, X. O., Chang, S. H., Nurieva, R., Wang, Y. H., Wang, Y., Hood, L., Zhu, Z., Tian, Q. & Dong, C. (2005) A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat Immunol*, 6(11), 1133-41.

Pascuzzi, R. M., Coslett, H. B. & Johns, T. R. (1984) Long-term corticosteroid treatment of myasthenia gravis: report of 116 patients. *Ann Neurol*, 15(3), 291-8.

Patrick, J. & Lindstrom, J. (1973) Autoimmune response to acetylcholine receptor. *Science*, 180(4088), 871-2.

Pelletier, M., Maggi, L., Micheletti, A., Lazzeri, E., Tamassia, N., Costantini, C., Cosmi, L., Lunardi, C., Annunziato, F., Romagnani, S. & Cassatella, M. A. (2010) Evidence for a cross-talk between human neutrophils and Th17 cells. *Blood*, 115(2), 335-43.

Perussia, B., Acuto, O., Terhorst, C., Faust, J., Lazarus, R., Fanning, V. & Trinchieri, G. (1983) Human natural killer cells analyzed by B73.1, a monoclonal antibody blocking Fc receptor functions. II. Studies of B73.1 antibody-antigen interaction on the lymphocyte membrane. *J Immunol*, 130(5), 2142-8.

Pinching, A. J. & Peters, D. K. (1976) Remission of myasthenia gravis following plasma-exchange. *Lancet*, 2(8000), 1373-6.

Poggi, A., Costa, P., Zocchi, M. R. & Moretta, L. (1997) Phenotypic and functional analysis of CD4+ NKRP1A+ human T lymphocytes. Direct evidence that the NKRP1A molecule is involved in transendothelial migration. *Eur J Immunol*, 27(9), 2345-50.

Ragheb, S., Bealmear, B. & Lisak, R. (1999) Cell-surface expression of lymphocyte activation markers in myasthenia gravis. *Autoimmunity*, 31(1), 55-66.

Reinert-Hartwall, L., Honkanen, J., Salo, H. M., Nieminen, J. K., Luopajarvi, K., Harkonen, T., Veijola, R., Simell, O., Ilonen, J., Peet, A., Tillmann, V., Knip, M. & Vaarala, O. (2015) Th1/Th17 plasticity is a marker of advanced beta cell autoimmunity and impaired glucose tolerance in humans. *J Immunol*, 194(1), 68-75.

Richardson, B., Scheinbart, L., Strahler, J., Gross, L., Hanash, S. & Johnson, M. (1990) Evidence for impaired T cell DNA methylation in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 33(11), 1665-73.

Rigamonti, A., Lauria, G., Piamarta, F., Fiumani, A. & Agostoni, E. (2011) Thymoma-associated myasthenia gravis without acetylcholine receptor antibodies. *J Neurol Sci*, 302(1-2), 112-3.

Robertson, N. P., Deans, J. & Compston, D. A. (1998) Myasthenia gravis: a population based epidemiological study in Cambridgeshire, England. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 65(4), 492-6.

Roche, J. C., Capablo, J. L., Larrad, L., Gervas-Arruga, J., Ara, J. R., Sanchez, A. & Alarcia, R. (2011) Increased serum interleukin-17 levels in patients with myasthenia gravis. *Muscle Nerve*, 44(2), 278-80.

Sahashi, K., Engel, A. G., Lambert, E. H. & Howard, F. M., Jr. (1980) Ultrastructural localization of the terminal and lytic ninth complement component (C9) at the motor end-plate in myasthenia gravis. *J Neuropathol Exp Neurol*, 39(2), 160-72.

Saka, E., Topcuoglu, M. A., Akkaya, B., Galati, A., Onal, M. Z. & Vincent, A. (2005) Thymus changes in anti-MuSK-positive and -negative myasthenia gravis. *Neurology*, 65(5), 782-3; author reply 782-3.

Sallusto, F., Lenig, D., Forster, R., Lipp, M. & Lanzavecchia, A. (1999) Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature*, 401(6754), 708-12.

Schaffert, H., Pelz, A., Saxena, A., Losen, M., Meisel, A., Thiel, A. & Kohler, S. (2015) IL-17-producing CD4(+) T cells contribute to the loss of B-cell tolerance in experimental autoimmune myasthenia gravis. *Eur J Immunol*, 45(5), 1339-47.

Schneider-Gold, C., Gajdos, P., Toyka, K. V. & Hohlfeld, R. R. (2005) Corticosteroids for myasthenia gravis. *Cochrane Database Syst Rev*(2).

Shi, F. D., Wang, H. B., Li, H., Hong, S., Taniguchi, M., Link, H., Van Kaer, L. & Ljunggren, H. G. (2000) Natural killer cells determine the outcome of B cell-mediated autoimmunity. *Nat Immunol*, 1(3), 245-51.

Shibuya, N., Mori, K. & Nakazawa, Y. (1978) Serum factor blocks neuromuscular transmission in myasthenia gravis: electrophysiologic study with intracellular microelectrodes. *Neurology*, 28(8), 804-11.

Sims, G. P., Shiono, H., Willcox, N. & Stott, D. I. (2001) Somatic hypermutation and selection of B cells in thymic germinal centers responding to acetylcholine receptor in myasthenia gravis. *J Immunol*, 167(4), 1935-44.

Skeie, G. O., Apostolski, S., Evoli, A., Gilhus, N. E., Illa, I., Harms, L., Hilton-Jones, D., Melms, A., Verschuuren, J. & Horge, H. W. (2010) Guidelines for treatment of autoimmune neuromuscular transmission disorders. *Eur J Neurol*, 17(7), 893-902.

Somnier, F. E., Keiding, N. & Paulson, O. B. (1991) Epidemiology of myasthenia gravis in Denmark. A longitudinal and comprehensive population survey. *Arch Neurol*, 48(7), 733-9.

Stanley, E. F. & Drachman, D. B. (1978) Effect of myasthenic immunoglobulin on acetylcholine receptors of intact mammalian neuromuscular junctions. *Science*, 200(4347), 1285-7.

Strobel, P., Moritz, R., Leite, M. I., Willcox, N., Chuang, W. Y., Gold, R., Nix, W., Schalke, B., Kiefer, R., Muller-Hermelink, H. K., Jaretzki Iii, A., Newsom-Davis, J. & Marx, A. (2008) The ageing and myasthenic thymus: a morphometric study validating a standard procedure in the histological workup of thymic specimens. *J Neuroimmunol*, 201-202, 64-73.

Suzuki, E., Kobayashi, Y., Yano, M. & Fujii, Y. (2008) Infrequent and low AIRE expression in thymoma: difference in AIRE expression among WHO subtypes does not correlate with association of MG. *Autoimmunity*, 41(5), 377-82.

Suzuki, Y., Onodera, H., Tago, H., Saito, R., Ohuchi, M., Shimizu, M. & Itoyama, Y. (2005) Altered populations of natural killer cell and natural killer T cell subclasses in myasthenia gravis. *J Neuroimmunol*, 167(1-2), 186-9.

Szabo, S. J., Kim, S. T., Costa, G. L., Zhang, X., Fathman, C. G. & Glimcher, L. H. (2000) A Novel Transcription Factor, T-bet, Directs Th1 Lineage Commitment. *Cell*, 100(6), 655-669.

Takahashi, T., Dejbakhsh-Jones, S. & Strober, S. (2006) Expression of CD161 (NKR-P1A) defines subsets of human CD4 and CD8 T cells with different functional activities. *J Immunol*, 176(1), 211-6.

Tanaka, Y., Morita, C. T., Tanaka, Y., Nieves, E., Brenner, M. B. & Bloom, B. R. (1995) Natural and synthetic non-peptide antigens recognized by human gamma delta T cells. *Nature*, 375(6527), 155-8.

Tindall, R. S., Phillips, J. T., Rollins, J. A., Wells, L. & Hall, K. (1993) A clinical therapeutic trial of cyclosporine in myasthenia gravis. *Ann N Y Acad Sci*, 681, 539-51.

Todd, J. A., Bell, J. I. & McDevitt, H. O. (1987) HLA-DQ beta gene contributes to susceptibility and resistance to insulin-dependent diabetes mellitus. *Nature*, 329(6140), 599-604.

Toyka, K. V., Drachman, D. B., Griffin, D. E., Pestronk, A., Winkelstein, J. A., Fishbeck, K. H. & Kao, I. (1977) Myasthenia gravis. Study of humoral immune mechanisms by passive transfer to mice. *N Engl J Med*, 296(3), 125-31.

Tzartos, J. S., Friese, M. A., Craner, M. J., Palace, J., Newcombe, J., Esiri, M. M. & Fugger, L. (2008) Interleukin-17 production in central nervous system-infiltrating T cells and glial cells is associated with active disease in multiple sclerosis. *Am J Pathol*, 172(1), 146-55.

Valenzuela, D. M., Stitt, T. N., DiStefano, P. S., Rojas, E., Mattsson, K., Compton, D. L., Nunez, L., Park, J. S., Stark, J. L., Gies, D. R. & et al. (1995) Receptor tyrosine kinase specific for the skeletal muscle lineage: expression in embryonic muscle, at the neuromuscular junction, and after injury. *Neuron*, 15(3), 573-84.

van der Geest, K. S. M., Kroesen, B. J., Horst, G., Abdulahad, W. H., Brouwer, E. & Boots, A. M. H. (2018) Impact of Aging on the Frequency, Phenotype, and Function of CD161-Expressing T Cells. *Front Immunol*, 9, 752.

Varelas, P. N., Chua, H. C., Natterman, J., Barmadia, L., Zimmerman, P., Yahia, A., Ulatowski, J., Bhardwaj, A., Williams, M. A. & Hanley, D. F. (2002) Ventilatory care in myasthenia gravis crisis: assessing the baseline adverse event rate. *Crit Care Med*, 30(12), 2663-8.

Veldhoen, M., Hocking, R. J., Atkins, C. J., Locksley, R. M. & Stockinger, B. (2006) TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity*, 24(2), 179-89.

Veldhoen, M., Uyttenhove, C., van Snick, J., Helmby, H., Westendorf, A., Buer, J., Martin, B., Wilhelm, C. & Stockinger, B. (2008) Transforming growth factor-beta 'reprograms' the differentiation of T helper 2 cells and promotes an interleukin 9-producing subset. *Nat Immunol*, 9(12), 1341-6.

Vincent, A., Newsom-Davis, J., Newton, P. & Beck, N. (1983) Acetylcholine receptor antibody and clinical response to thymectomy in myasthenia gravis. *Neurology*, 33(10), 1276-82.

Waaler, E. (2007) On the occurrence of a factor in human serum activating the specific agglutintion of sheep blood corpuscles. 1939. *APMIS*, 115(5), 422-38; discussion 439.

Wang, Z., Wang, W., Chen, Y. & Wei, D. (2012) T helper type 17 cells expand in patients with myasthenia-associated thymoma. *Scand J Immunol*, 76(1), 54-61.

Wolfe, G. I., Kaminski, H. J., Aban, I. B., Minisman, G., Kuo, H. C., Marx, A., Strobel, P., Mazia, C., Oger, J., Cea, J. G., Heckmann, J. M., Evoli, A., Nix, W., Ciafaloni, E., Antonini, G., Witoonpanich, R., King, J. O., Beydoun, S. R., Chalk, C. H., Barboi, A. C., Amato, A. A., Shaibani, A. I., Katirji, B., Lecky, B. R., Buckley, C., Vincent, A., Dias-Tosta, E., Yoshikawa, H., Waddington-Cruz, M., Pulley, M. T., Rivner, M. H., Kostera-Pruszczyk, A., Pascuzzi, R. M., Jackson, C. E., Garcia Ramos, G. S.,

Verschuuren, J. J., Massey, J. M., Kissel, J. T., Werneck, L. C., Benatar, M., Barohn, R. J., Tandan, R., Mozaffar, T., Conwit, R., Odenkirchen, J., Sonett, J. R., Jaretzki, A., 3rd, Newsom-Davis, J. & Cutter, G. R. (2016) Randomized Trial of Thymectomy in Myasthenia Gravis. *N Engl J Med*, 375(6), 511-22.

Xie, Y., Li, H. F., Jiang, B., Li, Y., Kaminski, H. J. & Kusner, L. L. (2016) Elevated plasma interleukin-17A in a subgroup of Myasthenia Gravis patients. *Cytokine*, 78, 44-6.

Yang, H., Zhang, Y., Wu, M., Li, J., Zhou, W., Li, G., Li, X., Xiao, B. & Christadoss, P. (2010) Suppression of ongoing experimental autoimmune myasthenia gravis by transfer of RelB-silenced bone marrow dentritic cells is associated with a change from a T helper Th17/Th1 to a Th2 and FoxP3+ regulatory T-cell profile. *Inflamm Res*, 59(3), 197-205.

Yi, J. S., Russo, M. A., Raja, S., Massey, J. M., Juel, V. C., Shin, J., Hobson-Webb, L. D., Gable, K. & Guptill, J. T. (2020) Inhibition of the transcription factor ROR-gamma reduces pathogenic Th17 cells in acetylcholine receptor antibody positive myasthenia gravis. *Exp Neurol*, 325, 113146.

Yoshimura, T., Matsushima, K., Tanaka, S., Robinson, E. A., Appella, E., Oppenheim, J. J. & Leonard, E. J. (1987) Purification of a human monocyte-derived neutrophil chemotactic factor that has peptide sequence similarity to other host defense cytokines. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 84(24), 9233-7.

Zhang, B., Luo, S., Wang, Q., Suzuki, T., Xiong, W. C. & Mei, L. (2008) LRP4 serves as a coreceptor of agrin. *Neuron*, 60(2), 285-97.

Zielinski, C. E., Mele, F., Aschenbrenner, D., Jarrossay, D., Ronchi, F., Gattorno, M., Monticelli, S., Lanzavecchia, A. & Sallusto, F. (2012) Pathogen-induced human TH17 cells produce IFN-γ or IL-10 and are regulated by IL-1β. *Nature*, 484(7395), 514-8.

Zinman, L., Ng, E. & Bril, V. (2007) IV immunoglobulin in patients with myasthenia gravis: a randomized controlled trial. *Neurology*, 68(11), 837-41.

Zubkiewicz-Kucharska, A. & Noczynska, A. (2016) Abnormal Distribution of Gamma-Delta T Lymphocytes and Their Subsets in Type 1 Diabetes. *Adv Clin Exp Med*, 25(4), 665-71.

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Christian Heiko Friedemann, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: Zur Rolle der IL17-produzierenden Lymphozyten und natürlicher Killerzellen bei der Myasthenia gravis (About the role of IL17-producing lymphocytes and natural killer cells in myasthenia gravis) selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.
Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Grafiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité - Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum Unterschrift

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Lebenslauf

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. Andreas Meisel für die Vergabe der Doktorarbeit. Ich danke außerdem Herrn Dr. med. Siegfried Kohler für die Betreuung und Unterstützung bei der Anfertigung der Arbeit. Ich danke meiner Ehefrau Dr. med. Jana Friedemann für die außerordentliche moralische und inhaltliche Unterstützung und die Schaffung von Freiraum im Familienalltag für die Bearbeitung der Dissertation. Ich danke weiterhin dem Team der Experimentellen Neurologie und der AG Meisel des NeuroCure Clinical Research Centers der Charité - Universitätsmedizin Berlin für die Unterstützung. Ich danke den Patienten und den weiteren Probanden für die Bereitschaft zur Abgabe der Blutproben und Beantwortung meiner Fragen. Ich danke auch meinen Freunden, die mich ermuntert und privat unterstützt haben.