

Aus der Klinik für Neurologie
der Medizinischen Fakultät Charité - Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Chronisch Inflammatorische Demyelinisierende Polyneuropathie - Immunmarker für
Diagnose, Therapiestrategien und Prognose

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät

Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Maximilian Staudt

aus Berlin

Datum der Promotion: 10.03.2017

INHALTSVERZEICHNIS

1	ZUSAMMENFASSUNG	1
2	EINLEITUNG.....	5
2.1	Klinische Manifestation und Diagnostik	5
2.2	Differentialdiagnosen.....	6
2.3	Therapie.....	7
2.4	Immunpathogenese.....	8
2.4.1	Pathogenese immunvermittelter Neuropathien	8
2.4.2	T-Lymphozytensubpopulationen	9
2.4.3	T-Lymphozytensubpopulationen in der Immunpathogenese der CIDP	11
2.4.4	Periphere Myelinantigene	12
2.5	Hypothesen und Ziele der Studie	14
2.5.1	PMP-22, P2, P0 180-199 und MBP 82-100 als Autoantigene der CIDP	14
2.5.2	Stärker aktiviertes Immunsystem in klinisch-instabiler Anfangsphase der CIDP und Reduktion im Verlauf	14
2.5.3	Immunologisch nachweisbare Unterschiede zwischen typischen und atypischen CIDP-Verläufen	14
3	METHODIK	15
3.1	Studiendesign	15
3.2	Patienten und gesunde Kontrollprobanden.....	16
3.3	Erhebung klinischer Patientendaten	17
3.4	Isolierung von PBMC aus peripherem Blut.....	17
3.5	Kryokonservierung von PBMC	18
3.6	Auftauen der PBMC nach Kryokonservierung	18
3.7	Enzyme Linked Immunosorbent Spot Assay (ELISPOT)	19
3.7.1	Zielantigene	20
3.7.2	Unterscheidung von Antigen-spezifischen und –unspezifischen SFU	21
3.7.3	ELISPOT-Ablauf	21
3.7.4	Mathematische Normierung der ELISPOT-Ergebnisse	23
3.8	Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS)	24
3.9	Statistik und graphische Darstellung	24
3.10	Material	25
3.10.1	Geräte	25
3.10.2	Verbrauchsmaterialien	26
3.10.3	ELISPOT-Antigene	27
3.10.4	ELISPOT-Antikörper und -Reporterenzyme	27
3.10.5	Puffer und Medien	28
3.10.6	Software	28
3.10.7	Reagenzien und Chemikalien	29

4	ERGEBNISSE	30
4.1	Charakterisierung der Kohorte und Subgruppenbildung	30
4.2	Auswertung der T-Lymphozyten-Immunreaktionen auf periphere Myelinantigene	33
4.2.1	CIDP-Patienten haben signifikant erhöhte Antigen-spezifische T-Lymphozyten-Antworten	33
4.2.2	CIDP-Patienten zeigen signifikant erhöhte Myelinantigen-spezifische T-Lymphozyten-Antworten gegenüber gesunden Kontrollen ohne signifikante Veränderungen im Krankheitsverlauf	36
4.2.3	Geringere Krankheitsgravität (INCAT \leq 2) geht mit höheren Myelinantigen-spezifischen T-Lymphozyten-Antworten einher	41
4.2.4	Höhere Myelinantigen-spezifische T-Lymphozyten-Antworten im Frühstadium der CIDP	42
4.2.5	Patienten mit atypischen CIDP-Varianten haben höhere Myelinantigen-spezifische T-Lymphozyten-Antworten	43
4.2.6	Vergleich „therapienaiv“ vs. „anbehandelt“ zeigt keine Unterschiede der Myelinantigen-spezifischen T-Lymphozyten-Antworten	44
4.3	Quantitative Analyse der Lymphozytenpopulationen im peripheren Blut.....	46
4.3.1	Unterschiede in den Frequenzen der Lymphozytenpopulationen bei CIDP-Patienten im Verlauf von 12 Monaten	46
4.3.2	Patienten mit geringerer Krankheitsgravität haben signifikant erhöhte Frequenzen der naiven CD4+ T-Lymphozyten	51
4.3.3	Erhöhte Frequenzen der CD4+ und CD8+ Memory T-Lymphozyten im Frühstadium der Erkrankung	55
4.3.4	Atypische CIDP-Varianten weisen signifikant höhere Frequenzen der CD4+ T-Lymphozyten auf, vor allem Memory T-Lymphozyten	59
4.3.5	Anbehandelte Patienten zeigen erniedrigte Frequenzen der NK-Zellen	63
5	DISKUSSION	68
5.1	Methodische Aspekte der Arbeit.....	69
5.1.1	ELISPOT zur Messung von T-Lymphozyten-Immunreaktionen auf periphere Myelinantigene	69
5.1.2	FACS zur Messung von Lymphozytenpopulationen	72
5.2	Myelinantigen-spezifische T-Lymphozyten-Antworten in der CIDP.....	72
5.3	Unterschiede in den Frequenzen der Lymphozytenpopulationen bei CIDP-Patienten.....	75
5.4	Klinische und immunologische Charakterisierung der CIDP-Subgruppen.....	81
5.4.1	Anbehandelte CIDP-Patienten haben erniedrigte NK-Zell-Frequenzen	82
5.4.2	Aktiviertes Immunsystem im Frühstadium der Erkrankung	82
5.4.3	Hohes inflammatorisches Milieu bei atypischen CIDP-Verläufen ermöglicht die Definition diagnostischer Schwellenwerte	84
5.5	Limitationen der Arbeit	86
5.6	Schlussfolgerung und Ausblick.....	89
6	SCHRIFTENVERZEICHNIS.....	91

7	EIDESSTÄTTLICHE ERKLÄRUNG	97
8	LEBENS LAUF	99
9	DANKSAGUNG.....	100

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
A	atypisch
AB	anbehandelt
Abb.	Abbildung
abs.	absolut
AIDP	Akut Inflammatorische Demyelinisierende Polyneuropathie
ANOVA	engl. <i>Analysis of Variance</i>
APZ	Antigen-präsentierende Zelle
Aqua dest.	destilliertes Wasser
ASZ	Antikörper-sezernierende Zelle
BAFF	engl. <i>B-Cell Activating Factor</i>
BSA	engl. <i>Bovine Serum Albumine</i>
bspw.	beispielsweise
bzgl.	bezüglich
bzw.	beziehungsweise
C	engl. <i>Control</i>
CCR2	engl. <i>C-C Chemokine Receptor Type 2</i>
CD	engl. <i>Cluster of Differentiation</i>
CIDP	Chronisch Inflammatorische Demyelinisierende Polyneuropathie
CMV	Cytomegalievirus
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CPT	engl. <i>Cell Preparation Tube</i>
DADS	engl. <i>Distal Acquired Demyelinating Symmetric Polyneuropathy</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
EAE	Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis
EAN	engl. <i>Experimental Autoimmune Neuritis</i>
EBV	Epstein-Barr-Virus
EDTA	Di-Natrium-Ethylendiamintetraessigsäure

EFNS	engl. <i>European Federation of Neurological Sciences</i>
ELISPOT	engl. <i>Enzyme Linked Immunosorbent Spot Assay</i>
engl.	englisch
et al.	lat. <i>et alii</i>
etc.	lat. <i>et cetera</i>
FACS	engl. <i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i>
Fc	engl. <i>Fragment Crystallisable</i>
FCS	engl. <i>Fetal Calf Serum</i>
g	Gramm
g	Schwerebeschleunigung
GBS	Guillain-Barré-Syndrom
ggf.	gegebenenfalls
GS	Glukokortikosteroid
h	Stunde
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HRP	engl. <i>Horseradish Peroxidase</i>
IFN-γ	Interferon-γ
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
INCAT	engl. <i>Inflammatory Neuropathy Cause And Treatment</i>
iv	intravenös
IVIG	intravenöse Immunglobuline
l	Liter
lat.	lateinisch
M	engl. <i>Mean</i>
M	männlich
MADSAM	engl. <i>Multifocal Acquired Demyelinating Sensory And Motor Polyneuropathy</i>
MBP	engl. <i>Myelin Basic Protein</i>
mg	Milligramm
MGUS	Monoklonale Gammopathie Unklarer Signifikanz
MHC	engl. <i>Major Histocompatibility Complex</i>
min	Minuten
ml	Milliliter

MMN	Multifokale Motorische Neuropathie
MRC	engl. <i>Medical Research Council</i>
MS	Multiple Sklerose
N	engl. <i>Number</i>
N	engl. <i>non-responder</i>
NPW	negativ prädiktiver Wert
ON	engl. <i>Other Neuropathy</i>
p.o.	lat. <i>per os</i>
P/S	Penicillin und Streptomycin
P0	Peripheres Myelinprotein 0
PBMC	engl. <i>Peripheral Blood Mononuclear Cell</i>
PBS	engl. <i>Phosphate Buffered Saline</i>
PMP-22	Peripheres Myelinprotein 22
PNS	peripheres Nervensystem
PPW	positiv prädiktiver Wert
R	engl. <i>responder</i>
RPMI	engl. <i>Roswell Park Memorial Institute Medium</i>
RT	Raumtemperatur
s	Sekunden
SAP	Spontane Autoimmune Polyneuropathie
SD	engl. <i>Standard Deviation</i>
SEB	engl. <i>Staphylococcal Enterotoxin B</i>
SFU	engl. <i>Spot Forming Units</i>
T	typisch
Tab.	Tabelle
TCM	engl. <i>Central Memory T-cell</i>
TCR	engl. <i>T-cell Receptor</i>
TEM	engl. <i>Effector Memory T-cell</i>
TEMRA	engl. <i>Terminally Differentiated Effector Memory RA+ T-cells</i>
TGF	engl. <i>Tumor Growth Factor</i>
TH	T-Helferzelle
TN	therapienaiv
TNF	engl. <i>Tumor Necrosis Factor</i>

TREG	engl. <i>Regulatory T-cell</i>
V	Visite
vs.	lat. <i>versus</i>
W	weiblich
ZNS	Zentrales Nervensystem

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 4.2.1:	Myelinantigen-spezifische IFN- γ -Antworten der CIDP-Patienten im T-Zell-ELISPOT an Visite 1 im Vergleich zur Negativ-Kontrolle.....	34
Abbildung 4.2.2:	IFN- γ -Antworten der CIDP-Patienten auf Positiv-Kontrollen im T-Zell-ELISPOT an Visite 1 im Vergleich zur Negativ-Kontrolle	35
Abbildung 4.2.3:	Myelinantigen-spezifische IFN- γ -Antworten der CIDP-Patienten im T-Zell-ELISPOT im Verlauf Visite 1-5.....	37
Abbildung 4.2.4:	Myelinantigen-spezifische IFN- γ -Antworten auf PO 180-199 und MBP 82-100 der CIDP-Patienten im T-Zell-ELISPOT im Verlauf Visite 1-5 ...	38
Abbildung 4.2.5:	CFT- und CEF-spezifische IFN- γ -Antworten der CIDP-Patienten im T-Zell-ELISPOT im Verlauf Visite 1-5 vs. gesunde Kontrollen.....	39
Abbildung 4.2.6:	Myelinantigen-spezifische IFN- γ -Antworten der CIDP-Patienten im T-Zell-ELISPOT im Vergleich Visite 1 mit V5	40
Abbildung 4.2.7:	Subgruppenvergleich „INCAT>2“ vs. „INCAT \leq 2“ der Myelinantigen-spezifischen IFN- γ -Antworten der CIDP-Patienten im T-Zell-ELISPOT an Visite 1	41
Abbildung 4.2.8:	Subgruppenvergleich „Zeit seit Diagnosestellung>2 Jahre“ vs. „Zeit seit Diagnosestellung \leq 2 Jahre“ der Myelinantigen-spezifischen IFN- γ -Antworten der CIDP-Patienten im T-Zell-ELISPOT an Visite 1	42
Abbildung 4.2.9:	Subgruppenvergleich „typisch“ vs. „atypisch“ der Myelinantigen-spezifischen IFN- γ -Antworten der CIDP-Patienten im T-Zell-ELISPOT an Visite 1	43
Abbildung 4.2.10:	Subgruppenvergleich „therapienaiv“ vs. „anbehandelt“ der Myelinantigen-spezifischen IFN- γ -Antworten der CIDP-Patienten im T-Zell-ELISPOT an Visite 1	45
Abbildung 4.3.1:	Quantitative Analyse der Lymphozytenpopulationen der CIDP-Kohorte mittels FACS an Visite 1 und V5 vs. gesunde Kontrollen	47
Abbildung 4.3.2:	Quantitative Analyse der CD4+ Subpopulationen der CIDP-Kohorte mittels FACS an Visite 1 und V5 vs. gesunde Kontrollen	49
Abbildung 4.3.3:	Quantitative Analyse der CD8+ Subpopulationen der CIDP-Kohorte mittels FACS an Visite 1 und V5 vs. gesunde Kontrollen	50
Abbildung 4.3.4:	Quantitative Analyse der Lymphozytenpopulationen der Subgruppe „INCAT>2/ \leq 2“ vs. gesunde Kontrollen an Visite 1 mittels FACS	51
Abbildung 4.3.5:	Quantitative Analyse der CD4+ Subpopulationen der Subgruppe „INCAT>2/ \leq 2“ vs. gesunde Kontrollen an Visite 1 mittels FACS	53
Abbildung 4.3.6:	Quantitative Analyse der CD8+ Subpopulationen der Subgruppe „INCAT>2/ \leq 2“ vs. gesunde Kontrollen an Visite 1 mittels FACS	54

Abbildung 4.3.7:	Quantitative Analyse der Lymphozytenpopulationen der Subgruppe „Zeit seit Diagnosestellung>2 Jahre/≤2 Jahre“ vs. gesunde Kontrollen an Visite 1 mittels FACS.....	56
Abbildung 4.3.8:	Quantitative Analyse der CD4+ Subpopulationen der Subgruppe „Zeit seit Diagnosestellung>2 Jahre/≤2 Jahre“ vs. gesunde Kontrollen an Visite 1 mittels FACS.....	57
Abbildung 4.3.9:	Quantitative Analyse der CD8+ Subpopulationen der Subgruppe „Zeit seit Diagnosestellung>2 Jahre/≤2 Jahre“ vs. gesunde Kontrollen an Visite 1 mittels FACS.....	58
Abbildung 4.3.10:	Quantitative Analyse der Lymphozytenpopulationen der Subgruppe „typisch/atypisch“ vs. gesunde Kontrollen an Visite 1 mittels FACS.....	60
Abbildung 4.3.11:	Quantitative Analyse der CD4+ Subpopulationen der Subgruppe „typisch/atypisch“ vs. gesunde Kontrollen an Visite 1 mittels FACS.....	61
Abbildung 4.3.12:	Quantitative Analyse der CD8+ Subpopulationen der Subgruppe „typisch/atypisch“ vs. gesunde Kontrollen an Visite 1 mittels FACS.....	62
Abbildung 4.3.13:	Quantitative Analyse der Lymphozytenpopulationen der Subgruppe „therapienaiv/anbehandelt“ vs. gesunde Kontrollen an Visite 1 mittels FACS.....	64
Abbildung 4.3.14:	Quantitative Analyse der CD4+ Subpopulationen der Subgruppe „therapienaiv/anbehandelt“ vs. gesunde Kontrollen an Visite 1 mittels FACS.....	65
Abbildung 4.3.15:	Quantitative Analyse der CD8+ Subpopulationen der Subgruppe „therapienaiv/anbehandelt“ vs. gesunde Kontrollen an Visite 1 mittels FACS.....	66

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 3.7.1:	Antigene im ELISPOT.....	20
Tabelle 3.10.1:	Geräte	25
Tabelle 3.10.2:	Verbrauchsmaterialien.....	26
Tabelle 3.10.3:	ELISPOT-Antigene	27
Tabelle 3.10.4:	ELISPOT-Antikörper und -Reporterenzyme.....	27
Tabelle 3.10.5:	Puffer und Medien	28
Tabelle 3.10.6:	Software	28
Tabelle 3.10.7:	Reagenzien und Chemikalien	29
Tabelle 4.1.1:	Klinische Informationen der CIDP-Kohorte	32
Tabelle 4.3.1:	Signifikanzwerte für die quantitative Analyse der Lymphozytenpopulationen an Visite 1, V5 vs. gesunde Kontrollen	48
Tabelle 4.3.2:	Signifikanzwerte für die quantitative Analyse der CD4+ und CD8+ Subpopulationen an Visite 1, V5 vs. gesunde Kontrollen	50
Tabelle 4.3.3:	Signifikanzwerte für die quantitative Analyse der Lymphozytenpopulationen aus dem Subgruppenvergleich „INCAT>2/≤2“ vs. gesunde Kontrollen an Visite 1.....	52
Tabelle 4.3.4:	Signifikanzwerte für die quantitative Analyse der CD4+ und CD8+ Subpopulationen aus dem Subgruppenvergleich „INCAT>2/≤2“ vs. gesunde Kontrollen an Visite 1	55
Tabelle 4.3.5:	Signifikanzwerte für die quantitative Analyse der Lymphozytenpopulationen aus dem Subgruppenvergleich „Zeit seit Diagnosestellung>2/≤2 Jahre“ vs. gesunde Kontrollen an Visite 1	56
Tabelle 4.3.6:	Signifikanzwerte für die quantitative Analyse der CD4+ und CD8+ Subpopulationen aus dem Subgruppenvergleich „Zeit seit Diagnosestellung>2/≤2 Jahre“ vs. gesunde Kontrollen an Visite 1	59
Tabelle 4.3.7:	Signifikanzwerte für die quantitative Analyse der Lymphozytenpopulationen aus dem Subgruppenvergleich „typisch/atypisch“ vs. gesunde Kontrollen an Visite 1.....	60
Tabelle 4.3.8:	Signifikanzwerte für die quantitative Analyse der CD4+ und CD8+ Subpopulationen aus dem Subgruppenvergleich „typisch/atypisch“ vs. gesunde Kontrollen an Visite 1	63
Tabelle 4.3.9:	Signifikanzwerte für die quantitative Analyse der Lymphozytenpopulationen aus dem Subgruppenvergleich „therapienaiv/anbehandelt“ vs. gesunde Kontrollen an Visite 1.....	64

Tabelle 4.3.10:	Signifikanzwerte für die quantitative Analyse der CD4+ und CD8+ Subpopulationen aus dem Subgruppenvergleich „therapienaiv/anbehandelt“ vs. gesunde Kontrollen an Visite 1.....	67
-----------------	--	----

1 ZUSAMMENFASSUNG

Die Chronisch Inflammatorische Demyelinisierende Polyneuropathie (CIDP) ist die häufigste autoimmune periphere Neuropathie und führt bei mehr als 50% der Patienten zu gravierender Behinderung. Mit einer Prävalenz von 0,8-8,9:100.000 bleibt sie eine seltene Erkrankung, die aber aufgrund variabler klinischer Manifestationsformen und fehlender Diagnosemarker wahrscheinlich unterdiagnostiziert ist.

Ziel der Studie war es, Immunmarker zu identifizieren, die prädiktiv Aussagen über den individuellen Krankheitsverlauf erlauben sowie als Diagnoseparameter herangezogen werden können. Zu diesem Zweck erhoben wir prospektiv bei 28 klinisch-instabilen CIDP-Patienten zu 5 Untersuchungszeitpunkten über 12 Monate immunologische Parameter (mittels *Enzyme Linked Immunosorbent Spot Assay-ELISPOT*, *Fluorescence Activated Cell Sorting-FACS*). Wir formulierten anhand der aktuellen Literatur Arbeitshypothesen, unterteilten unsere Kohorte in Subgruppen und verglichen sie mit 28 gesunden Kontrollprobanden. Im Ergebnis konnten wir sowohl signifikant erhöhte T-Lymphozyten-Antworten auf periphere Myelinantigene als auch signifikant höhere Frequenzen einzelner Lymphozytenpopulationen (vor allem CD4+ *Memory T-Lymphozyten*) beobachten. Erstmals war es möglich, signifikant erhöhte P0 180-199- und MBP 82-100-spezifische T-Lymphozyten-Antworten zu messen, was für die immunpathogenetische Relevanz dieser peripheren Myelinantigene sprechen könnte.

In der Subgruppenanalyse zeigten sich bei atypischen CIDP-Verläufen tendenziell höhere T-Lymphozyten-Antworten auf PMP-22, P0 180-199 und MBP 82-100 sowie signifikant erhöhte Frequenzen der T-Lymphozyten, insbesondere der CD4+ *Effector Memory T-cells* (TEM) und der CD4+ *Central Memory T-cells* (TCM). Dies nutzten wir *post-hoc* zur Definition von Schwellenwerten, die zukünftig in Studien überprüft werden müssen und dann gegebenenfalls (ggf.) zur Diagnosestellung bei atypischen Krankheitsverläufen herangezogen werden können.

Da die CIDP meist chronisch-progredient verläuft und Patienten mit einer gravierenderen klinischen Beeinträchtigung daher häufig schon länger betroffen sind, verglichen wir die Subgruppen „Zeit seit Diagnosestellung“ und „*Inflammatory Neuropathy Cause And Treatment (INCAT) Score*“ miteinander. Interessanterweise

1 Zusammenfassung

zeigten Patienten mit kürzerer Krankheitsdauer (≤ 2 Jahre) und auch Patienten mit geringerem Schweregrad ($\text{INCAT} \leq 2$) tendenziell höhere Myelinantigen-spezifische T-Lymphozyten-Antworten sowie signifikant erhöhte Frequenzen der CD4+ und CD8+ naive T-Lymphozyten. Damit konnten wir erstmals nachweisen, dass Patienten im Frühstadium der CIDP ein starkes inflammatorisches Milieu aufweisen können. Diese Ergebnisse könnten nach Bestätigung in weiteren Studien für die Empfehlung von immunmodulatorischen oder –suppressiven Therapien bereits im frühen Krankheitsstadium sprechen. Dies würde die aktuellen Richtlinien ergänzen, die erst ab gravierender klinischer Beeinträchtigung oder Krankheitsprogression zu solchen Therapien raten.

Zur Bestätigung unserer explorativen Ergebnisse bedarf es zukünftig groß angelegter, multizentrischer Studien. Wir empfehlen, dass diese einerseits die von uns untersuchten diagnostischen Schwellenwerte prüfen und ggf. etablieren. Andererseits wäre es nützlich, diese Schwellenwerte in Bezug zu CIDP-Subgruppen zu setzen, um prädiktiv eine individuelle Aussage über den Krankheitsverlauf geben zu können.

Abstract

Chronic Inflammatory Demyelinating Polyneuropathy (CIDP) is the most common autoimmune peripheral neuropathy leading to severe disability in more than 50% of the patients. CIDP remains rare with a prevalence of 0,8-8,9:100.000 but is probably underdiagnosed due to different clinical phenotypes and missing diagnostic markers.

The goal of our study was to identify immune markers which would possibly allow us to predict individual course of disease and which could serve as future diagnostic parameters. Therefore, we evaluated 28 patients with active-unstable CIDP over 12 months using 5 immunological examinations (via *Enzyme Linked Immunosorbent Spot Assay-ELISPOT*, *Fluorescence Activated Cell Sorting-FACS*). To gain insight into the pathomechanisms of CIDP, we divided our cohort in subgroups, developed hypotheses and compared the results to 28 healthy controls.

We could not only find significantly elevated T lymphocyte-immune responses to peripheral myelin antigens but also significantly higher frequencies of lymphocyte subpopulations (especially Memory T cell subsets). For the first time, we showed significantly increased T lymphocyte-responses to P0 180-199 und MBP 82-100 in CIDP-patients which could indicate the immunopathogenic relevance of these two peripheral myelin antigens.

Via subgroup-analysis, we described a stronger activated immune system in atypical CIDP based on high myelin antigen-specific T lymphocyte responses as well as significantly elevated frequencies of T lymphocytes, especially CD4+ effector memory T cells (TEM) and CD4+ central memory T cells (TCM). These findings led us to the definition of immunological cut-off parameters which after validation could prospectively be used to diagnose atypical CIDP.

Since CIDP mostly progresses chronically, patients with severe disability usually suffered several years from this disease. Therefore we compared the subgroups “time since diagnosis” and “INCAT-score” in order to investigate the autoimmune potential in the early stage of CIDP. Interestingly, we could demonstrate higher auto-inflammatory T lymphocyte-responses to myelin antigens and significantly elevated levels of CD4+ and CD8+ naïve T cells early after diagnosis and in mildly affected patients suggesting an aggressive immune environment. These results should be evaluated in future studies and could after validation recommend early immunosuppressive or –modulating therapies to prevent irreversible axonal

1 Zusammenfassung

degeneration. This recommendation would be an addition to current guidelines which indicate these interventions only in stages of severe clinical disability or disease progression.

To confirm our results, further long-term multi-center studies are needed which should confirm our suggested diagnostic cut-off values. Furthermore, a correlation between clinical stage and immunological results is needed to predict the individual's course of disease.

2 EINLEITUNG

2.1 Klinische Manifestation und Diagnostik

Die CIDP stellt die häufigste autoimmune periphere Neuropathie dar und ist eine erworbene Erkrankung, die in mehr als der Hälfte der betroffenen Patienten zu schwerer körperlicher Behinderung führt [1]. Die Prävalenz dieser Erkrankung liegt bei 0,8-8,9:100.000 [2]. Damit gehört die CIDP zu den seltenen Erkrankungen. Allerdings ist davon auszugehen, dass die Erkrankung immer noch unterdiagnostiziert ist. Der Grund hierfür liegt einerseits in der sehr variablen klinischen Manifestation und andererseits daran, dass es zum jetzigen Zeitpunkt noch keine verlässlichen Marker für die Diagnose gibt. Daraus ergibt sich auch die hohe Fehldiagnosequote von 47% [3]. Die CIDP kann in jedem Lebensalter auftreten; der Erkrankungsgipfel liegt im sechsten bis siebenten Lebensjahrzehnt [2, 4]. Insgesamt sind etwas mehr Männer als Frauen von der Erkrankung betroffen [4]. Bis heute sind die pathogenetischen Mechanismen nicht vollständig bekannt. Ursächlich ist der aktuellen Literatur zufolge der Verlust der immunologischen Toleranz gegenüber Myelin und Axon beziehungsweise (bzw.) den Schwannzellen und Neuronen selbst, sodass es zu einer autoimmunen Entzündung kommt. Es gibt Hinweise darauf, dass diese vor allem gegen periphere Myelinantigene der Nerven gerichtet ist und durch aktivierte Makrophagen, T-Lymphozyten und Autoantikörper vermittelt wird [5-7].

Durch diese Entzündungsreaktion kommt es zu einer segmentalen Demyelinisierung, welche die Vorder- und Hinterwurzeln der Spinalnerven, Nervenplexi sowie Nerven betreffen kann. Hieraus erklärt sich auch die unterschiedliche klinische Manifestation [7, 8]. Bei der CIDP unterscheidet man verschiedene Phänotypen: Mehr als 50% der Patienten weisen eine typische CIDP auf, die klassischerweise einen chronisch-progredienten oder auch schubförmig-remittierenden Verlauf hat und sich in einer proximal und distal symmetrisch betonten Schwäche, distal betonten Hyp- und Parästhesien (Taubheit, Missempfindungen) und einer generalisierten Verminderung der Reflexantwort manifestiert. Die Diagnosestellung wird erschwert durch die Vielzahl an weiteren klinischen Manifestationen, die als atypische Varianten bezeichnet werden. Dazu gehören DADS (25-35%), *Distal Acquired Demyelinating Polyneuropathy*, mit einem distalen Befall motorischer und sensibler Nerven sowie MADSAM (15%),

Multifocal Acquired Demyelinating Sensory And Motor Polyneuropathy, mit einem sensomotorisch asymmetrischen Befall, der mehr die Arme als die Beine betrifft [9]. Weitere seltenere Formen sind die rein sensible CIDP (10-13%), die rein motorische CIDP (<10%) und die fokale CIDP (2%) [10]. Die typische CIDP oder ihre Varianten können chronisch-progredient, monophasisch oder schubförmig-remittierend verlaufen. Am häufigsten tritt sie mit chronisch-progredientem Verlauf auf.

Elektrophysiologisch lässt sich die Demyelinisierung durch verminderte Nervenleitgeschwindigkeit, verlängerte distale Latenzen, verlängerte F-Wellen-Latenzen oder einen F-Wellen-Verlust darstellen. Nachdem lange verschiedene elektrophysiologische Diagnosekriterien parallel existierten, wurden 2010 durch die *European Federation of Neurological Sciences* (EFNS) einheitliche Richtlinien zur Diagnose der CIDP veröffentlicht [11].

Weiteres typisches Kennzeichen der CIDP ist die isoliert erhöhte Proteinkonzentration im Liquor (zytalbuminäre Dissoziation), die über eine Lumbalpunktion bestimmt wird. Bei sehr atypischem Verlauf der Erkrankung ist auch eine Nervenbiopsie indiziert, die in aktiven Läsionen eine Einwanderung von Lymphozyten und eine Makrophagen-vermittelte Demyelinisierung zeigt. Die Biopsie ist wichtig für die Abgrenzung gegenüber anderen Polyneuropathien, wie im Rahmen einer Vaskulitis oder einer Amyloidose [12]. Zusätzlich zu den beschriebenen Untersuchungen lässt sich die Diagnose einer CIDP auch an der positiven Therapieantwort auf die bei der CIDP eingesetzten Behandlungsmöglichkeiten erkennen (*diagnosis ex juvantibus*). So erklärt sich auch der ursprüngliche Name der CIDP, „Steroid-responsive Polyneuropathie“ [13].

Zu den derzeitigen Behandlungsstrategien zählen anti-inflammatorische, immunmodulatorische und –suppressive Maßnahmen [14]. Ungefähr 80% der behandelten Patienten zeigen ein Ansprechen auf die Therapie und 20% bleiben therapierefraktär bezüglich (bzgl.) der aktuell zur Verfügung stehenden Behandlungsoptionen [15].

2.2 Differentialdiagnosen

Die Diagnose einer CIDP zu stellen, ist eine Herausforderung an den Arzt. Gleichzeitig ist es wichtig, CIDP-Patienten möglichst früh zu identifizieren und von anderen Polyneuropathien abzugrenzen, um eine sofortige Therapie einleiten zu können und einer weiteren sekundären axonalen und damit irreversiblen

Schädigung der Nerven vorzubeugen [16]. Hierbei präsentiert sich die klassische Form der CIDP als symmetrische sensomotorische Polyneuropathie mit distaler und proximaler Schwäche und allseits verminderter Reflexantwort [7]. Andere Neuropathien müssen diagnostisch ausgeschlossen werden. Dazu zählen hereditäre Formen, sonstige autoimmune Prozesse sowie toxische, metabolische und infektiöse Genesen. Erschwerend kommt hinzu, dass sich die CIDP auch bei Patienten mit bestehendem Diabetes mellitus, Alkoholmissbrauch oder HIV-Infektion manifestieren kann und dadurch eine Abgrenzung der konkurrierenden Ursachen für die demyelinisierende Polyneuropathie kompliziert wird [16].

2.3 Therapie

Zur Behandlung der CIDP sind drei verschiedene Therapien zugelassen: intravenöse Immunglobuline (IVIG), Kortikosteroide und Plasmapherese (*Plasma Exchange*, PE) [11, 15]. Die Wirksamkeit dieser drei Therapieoptionen konnte in randomisierten, kontrollierten Studien bewiesen werden [7, 12, 15, 17]. Die Ansprechraten sowie das Nebenwirkungsprofil der unterschiedlichen Therapien unterscheiden sich und bestimmen letztlich, welche Therapieform individuell angewandt wird. Laut Cocito et al. sind die Ansprechraten für IVIG mit 78% am höchsten, gefolgt von der Glukokortikosteroid-Therapie mit 64%. Auf eine PE sprechen 56% der Patienten an [15]. In der aktuellen Literatur zählen IVIG und Kortikosteroide zur *first-line* Dauertherapie der CIDP [18]. Sollte eine dieser Therapien nicht anschlagen, wird ein Therapiewechsel durchgeführt, der die Ansprechraten auf insgesamt 81% erhöht [15]. Wann genau ein solcher Therapiewechsel vorgenommen werden sollte, unterliegt gegenwärtig noch der fachlichen Diskussion und bedarf weiterer klinischer Langzeitstudien. Zusätzlich ist zu beachten, dass die Varianten der CIDP unterschiedlich auf die Therapieoptionen ansprechen können [19-21]. Unerwünschte Arzneimittelwirkungen traten vor allem bei PE (25%) und Kortikosteroiden (13%) auf, wohingegen IVIG (4%) eine relativ sichere Therapiealternative bieten [15].

Patienten werden als Therapie-responder klassifiziert, wenn sie eine Verbesserung von 2 oder mehr Punkten des *Medical Research Council* (MRC) *Sum Score* in zwei verschiedenen Muskelgruppen zeigen [22], sich um 1 oder mehr Punkte im INCAT *Score* verbessern (ausgenommen ist eine Verschlechterung der oberen Extremität von 0 auf 1) [23] oder ihre Gehstrecke um mehr als 50% im

Vergleich zur *baseline*-Untersuchung steigern können, um auch einen sensibel-ataktischen Befall mit einzubeziehen [5].

Therapieziel bei der Behandlung der CIDP ist es, eine Besserung der bestehenden Symptome zu erreichen. Vor allem eine Verbesserung der motorischen Fähigkeiten, des Gleichgewichtes und damit der Lebensqualität sind die Parameter für einen Therapieerfolg. Diese klinische Linderung des Krankheitsbildes lässt sich anhand von verschiedenen Scores wie INCAT Score [24], MRC Sum Score [25], Gehstrecke [5] und Vigorimeter (Handkrafttest) [26] bewerten. Elektrophysiologische Parameter lassen sich nur schwer zur Verifizierung eines Therapieerfolgs heranziehen, da sie sich trotz klinischer Besserung des Patienten nicht oder nur inkonsistent bessern [16]. Derzeitig stehen keine Immunmarker zur Verfügung, um einen Therapieerfolg zu evaluieren. Sie sind allerdings Bestandteil aktueller Forschung, auch in unserer Arbeitsgruppe.

2.4 Immunpathogenese

Die genaue Ursache der CIDP ist bis heute nicht geklärt. Von dem guten Ansprechen der Betroffenen auf IVIG-Therapie und Plasmapheresen lässt sich einerseits auf die wichtige Rolle von Autoantikörpern in der Pathogenese schließen. Andererseits deutet der Therapieerfolg durch den Einsatz von Kortikosteroiden auf eine zellvermittelte Autoimmunität hin. In Biopsien der betroffenen Nerven ließen sich sowohl Ablagerungen von Immunglobulinen und Komplementfaktoren als auch aktivierte Makrophagen und T-Lymphozyten nachweisen [27-29]. Demnach scheinen sowohl T-Lymphozyten als auch die Autoantikörperproduktion von B-Lymphozyten eine essentielle Rolle zu spielen.

2.4.1 Pathogenese immunvermittelter Neuropathien

Bei der Entstehung autoimmuner Erkrankungen ist der Verlust der immunologischen Toleranz gegenüber körpereigenen Strukturen ursächlich. Im Wesentlichen können zwei Mechanismen unterschieden werden: die zelluläre und die humorale Immunantwort. Die zelluläre Immunantwort beginnt mit der Präsentation körpereigener und fremder Proteinstrukturen über *Major Histocompatibility Complex* (MHC)-Moleküle auf der Oberfläche antigenpräsentierender Zellen (APZ), wie interdigitierenden dendritischen Retikulumzellen (IDZ), Makrophagen oder Schwannzellen [28, 30]. Diese werden durch CD4+ und CD8+ T-Lymphozyten erkannt. Die nun aktivierten CD4+ T-

Lymphozyten sezernieren Zytokine, die zu einer Stimulation der Makrophagen führen. Aktivierte Makrophagen können durch die Freisetzung von reaktiven Sauerstoffradikalen, Metalloproteinasen und weiteren proinflammatorischen Zytokinen zur Schädigung und Zerstörung von Zellen führen. So können Demyelinisierung und axonale Schäden entstehen. Wenn CD8⁺ T-Lymphozyten über Antigenpräsentation mittels MHC I aktiviert werden, so führt dies zur direkten Lyse der Zielzelle [31].

Die humorale Antwort basiert auf der Aktivierung von antigenspezifischen B-Lymphozyten durch T-Lymphozyten. Diese aktivierten B-Lymphozyten werden zur Proliferation und Differenzierung in Plasmazellen stimuliert, die daraufhin mit der antigenspezifischen Antikörperproduktion beginnen. Diese Antikörper führen über die Bindung an Antigene zu einer Aktivierung des Komplementsystems mit folgender Lyse und Phagozytose der Zelle durch Monozyten und Granulozyten [31].

T-Lymphozyten spielen in der Pathogenese der CIDP eine zentrale Rolle. Offensichtlich wird dies durch den Therapieerfolg von Kortikosteroiden und bei der histologischen Betrachtung von Nervenbiopsien aus autoimmun-inflammatorischen Läsionen. Hier lässt sich eine Infiltration von T-Lymphozyten feststellen [29]. Die T-Lymphozyten in den entzündeten Nervenläsionen üben eine lokal proinflammatorische Funktion aus, denn sie produzieren und sezernieren Differenzierungs- und Wachstumssignale, wie Interferon- γ (IFN- γ), TNF- α und Interleukin-2 (IL-2) [32]. Die T-Zell-Hilfe ist eine essentielle Bedingung für die B-Zell-Reifung und Antikörperproduktion. Die im Serum von CIDP-Patienten nachgewiesenen erhöhten Konzentrationen der pro-inflammatorischen Zytokine IFN- γ , TNF- α und IL-2 sprechen für eine allgemein systemische Aktivierung von T-Lymphozyten [33, 34].

2.4.2 T-Lymphozytensubpopulationen

Grundlegend lassen sich T-Lymphozyten in CD4⁺ und CD8⁺ unterscheiden. CD4⁺ T-Lymphozyten werden auch als T-Helferzellen (TH) bezeichnet. Hier werden TH1- und TH2-Lymphozyten differenziert. Die TH1-Lymphozyten sind die klassischen T-Helferzellen und üben über die IFN- γ Produktion einen proinflammatorischen Effekt aus. Die TH2-Lymphozyten sind über die Zytokine IL-2 und IL-4 eher immunsuppressiv [35]. CD4⁺ T-Lymphozyten erkennen durch den T-Zell-Rezeptor (TCR) Antigene, die über MHC II Moleküle durch APZ, wie Makrophagen,

2 Einleitung

Monozyten, B-Lymphozyten oder IDZ präsentiert werden. Weiterhin ist ein kostimulatorisches Signal nötig, um CD4+ T-Lymphozyten zu aktivieren. Dieses kann durch die APZ über einen B7-Oberflächenproteinkomplex und CD28 auf der CD4+ T-Zelle entstehen. Eine aktivierte CD4+ T-Zelle beginnt mit der Sekretion von Zytokinen und führt so zur klonalen T-Zell-Expansion. Aktivierte T-Lymphozyten transmigrieren nach Expression von Adhäsionsmolekülen in die Myelinschicht der betroffenen Nerven und aktivieren dort mittels IFN- γ lokale Makrophagen, die zur Demyelinisierung der Nerven führen [16].

Im Gegensatz dazu erkennen CD8+ T-Lymphozyten Antigene, die über MHC I präsentiert werden. Sie werden auch als zytotoxische T-Lymphozyten bezeichnet. Auf MHC I präsentiert fast jede Körperzelle zelleigene Proteine. Während der Differenzierung zu CD8+ T-Lymphozyten werden diese selektiert, sodass sie eine körpereigene Toleranz besitzen und physiologisch nur körperfremde Proteine erkennen. Erfolgt nun die Bindung zwischen einem auf MHC I präsentierten Protein und dem TCR eines CD8+ T-Lymphozyt, ist ebenfalls ein kostimulatorisches Signal nötig, um den CD8+ T-Lymphozyten zu aktivieren. Dieses erfolgt durch IDZ oder einen weiteren aktivierten TH1-Lymphozyten über die Präsentation von B7 mit konsekutiver Bindung zu CD28 des CD8+ T-Lymphozyten. Aktivierte CD8+ T-Lymphozyten bringen nun über die Sezernierung von Zytokinen, wie IFN- γ , TNF- β , TNF- α , und Zytotoxinen, wie Perforin-1 und Granzymen, die Zielzelle zur Apoptose [30, 36].

Wichtig, um die Entwicklung einer autoimmunen Reaktion zu verhindern, ist die Funktion von T-regulatorischen Lymphozyten (TREG). TREG entstehen vor allem im Thymus und üben über die Sezernierung von IL-10 und *Tumor Growth Factor*- β (TGF- β) einen immunsuppressiven Effekt auf CD4+, CD8+ T-Lymphozyten und Makrophagen aus [37].

Das immunologische Gedächtnis besteht aus sehr langlebigen *Memory* B-Lymphozyten und *Memory* T-Lymphozyten. Es ermöglicht eine schnelle humorale und adaptive Immunantwort bei erneuter Exposition mit einem Antigen, das bereits zu einem früheren Zeitpunkt zu einer Immunantwort geführt hat. Zusätzlich können diese *Memory* Lymphozyten eine erneute Aktivierung von naiven Lymphozyten verhindern. Es konnte gezeigt werden, dass antigenspezifische *Memory* T-Lymphozyten so schnell eine Immunreaktion auf ein bekanntes Antigen einleiten

können, dass einer erneuten Aktivierung von naiven T-Lymphozyten vorgebeugt wird [38].

Es lassen sich mindestens 4 verschiedene T-Lymphozytensubpopulationen unterscheiden. Naive T-Lymphozyten (CCR7⁺CD45RA⁺) und *Central Memory* (TCM CCR7⁺CD45RA⁻) T-Lymphozyten haben ein großes proliferatives Potential bei geringer sofortiger zytotoxischer Funktion [39]. *Effector Memory* (TEM CCR7⁻CD45RA⁻) T-Lymphozyten hingegen können innerhalb weniger Stunden durch Antigenpräsentation zur Sekretion von IFN- γ , IL-4 und IL-5 angeregt werden [38]. CD45RA⁺ *Effector Memory* (TEMRA CCR7⁻CD45RA⁺) T-Lymphozyten sind die am weitesten differenzierten *Memory* T-Lymphozyten. Sie weisen über die Expression von Perforin und *Fas Ligand* eine hohe zytotoxische Aktivität auf [39]. Da TCM den Oberflächenrezeptor CCR7 exprimieren, befinden sie sich vorrangig in Lymphknoten, wohingegen TEM (CCR7⁻) in peripheren, entzündeten Geweben persistieren [38].

2.4.3 T-Lymphozytensubpopulationen in der Immunpathogenese der CIDP

Die Charakterisierung der T-Lymphozytensubpopulationen für die CIDP ist in der Literatur teilweise widersprüchlich und nicht zufriedenstellend geklärt. Einerseits konnten in einer Studie bereits mittels einer quantitativen Analyse der T-Lymphozytensubpopulationen bei unbehandelten CIDP-Patienten unveränderte Frequenzen von CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten im Vergleich zu gesunden Kontrollen gezeigt werden [40]. Andererseits wurden von uns und in weiteren Studien erhöhte Frequenzen von CD4⁺ T-Lymphozyten bei unbehandelten CIDP-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen nachgewiesen [12, 41-43]. Ebenso wurde bei der CIDP eine größere Anzahl von CD8⁺ zytotoxischen T-Lymphozyten und ein verstärkte Aktivierung dieser Zellen im Vergleich zu CD4⁺ T-Lymphozyten gefunden, was einen Hinweis auf die Bedeutung der CD8⁺ T-Lymphozyten in der Pathogenese der CIDP gibt [44].

Bzgl. der *Memory* Subpopulationen konnten in verschiedenen Studien erhöhte Aktivitäten und Frequenzen bei Patienten mit granulomatöser Polyangiitis, Systemischem Lupus Erythematoses oder Multipler Sklerose (MS) gezeigt werden, dies weist auf die pathogenetische Relevanz bei chronischen Autoimmunerkrankungen hin [45-47]. Vor allem CD4⁺ TEM scheinen in der Ausbildung von Autoimmunerkrankungen eine wichtige Rolle zu spielen [48]. Für

die *Memory* Subpopulationen der CIDP liegen auch teils widersprüchliche Ergebnisse in der aktuellen Literatur vor, da einerseits erhöhte TEM und TCM im peripheren Blut [5, 43, 44] und im Liquor [49] und andererseits gleiche Frequenzen im peripheren Blut von CIDP-Patienten und gesunden Kontrollen gezeigt werden konnten [40]. In diesem Zusammenhang fanden wir in unserer Arbeitsgruppe bei IVIG-Therapie-*respondern* gegenüber gesunden Kontrollen signifikant erhöhte CD4+ TEM sowie TCM und tendenziell erhöhte CD8+ TEM [5].

2.4.4 Periphere Myelinantigene

Periphere Myelin-Proteine sind neben dem Hauptbestandteil der Lipide wichtige strukturgebende Komponenten der Myelinschicht von Nerven des peripheren Nervensystems (PNS). Da es bei der CIDP zu einer Demyelinisierung der peripheren Nerven kommt und in der Myelinschicht monozytäre und T-lymphozytäre Infiltrate nachgewiesen werden konnten, ist eine Beteiligung dieser Proteine in der Immunpathogenese von demyelinisierenden Autoimmunneuropathien wahrscheinlich [29]. In der Literatur konnten einige periphere Myelinantigene identifiziert werden, die als autoimmune Antigene für die Entstehung der CIDP verantwortlich sein könnten:

So konnten sowohl in Patientenstudien als auch im *Experimental autoimmune neuritis* (EAN)-Mausmodell der CIDP die maßgebliche Bedeutung einer T-Zell-spezifischen Immunantwort auf periphere Myelinantigene, wie PMP-22, P0 und P2, gezeigt werden [35, 40, 50, 51]. Das EAN-Mausmodell gilt als das Mausmodell der humanen CIDP. EAN kann in Mäusen und Lewis-Ratten durch Immunisierung mit den drei genannten peripheren Myelinproteinen induziert werden und führt zu einer segmentalen Demyelinisierung sowie T-Zell- und Makrophageninfiltraten in peripheren Nerven [12, 42, 52]. Somit erlaubt dieses Mausmodell Studien zur Pathogenese der verschiedenen Stadien der autoimmunen Nervenentzündung, wie sie vergleichbar auch bei der CIDP auftritt. Neben diesen Hinweisen auf eine T-Zell-vermittelte Immunantwort gibt es Studien, die die Existenz von Autoantikörpern gegen periphere Myelinantigene belegen und auf eine humorale, B-Zell-vermittelte Immunpathogenese der CIDP hinweisen [50, 53]. Für P2 konnten in einigen Studien sowohl T-Zell spezifische Immunreaktionen als auch erhöhte Antikörper gefunden werden [53-56]. Auch konnten wir in unserer Arbeitsgruppe bei IVIG-Therapie-

respondern für P2 und auch für PMP-22 spezifische T-Zell-Immunantworten nachweisen, die auf die pathogenetische Relevanz dieser Antigene hinweisen [5].

In der aktuellen Literatur findet sich jedoch kein Antigen, das beständig eine humorale oder adaptive Immunantwort bei CIDP-Patienten auslöst. Obwohl in vorangegangenen Studien jeweils lediglich bei einer Minderheit der CIDP-Patienten Autoantikörper oder T-Lymphozyten-Reaktionen auf Myelinantigene gezeigt werden konnten, bleiben periphere Myelinantigene das wahrscheinlichste autoimmune Ziel bei der CIDP [40, 57].

Von besonderem Interesse für unsere Studie waren die Peptide P0 180-199 und MBP 82-100, da diese sowohl in Patientenstudien wie auch in Tiermodellen Hinweise auf eine wichtige Rolle in der Pathogenese von autoimmunen demyelinisierenden Neuropathien lieferten und eine ausführliche Darstellung ihrer Bedeutung in der Immunpathogenese der CIDP noch aussteht.

P0 180-199 konnte sowohl eine Spontane Autoimmune Polyneuropathie (SAP), die neben der EAN als CIDP-Tiermodell gilt, induzieren [58] als auch als Ziel von Autoantikörpern nachgewiesen werden [50] und signifikante spezifische T-Zell-Immunantworten bei 3 von 16 Patienten mit Guillain-Barré-Syndrom (GBS) auslösen. Das GBS lässt sich als akut verlaufende Immunneuropathie beschreiben und zeigt damit trotz unterschiedlichen klinischen Verlaufes pathogenetische Ähnlichkeiten zur CIDP auf. Sowohl bei der CIDP als auch beim GBS kommt es zu einer peripheren Demyelinisierung und Makrophagen- sowie T-Zell-Infiltrationen in den neuroinflammatorischen Läsionen [12, 35].

MBP ist ein wichtiges Strukturprotein für die Ausbildung der Myelinschicht von Nerven des zentralen Nervensystems (ZNS) und ebenfalls des PNS. MBP mit dem immundominanten Anteil 82-100 konnte schon früh als Autoantigen in der Pathogenese der MS gezeigt werden [59, 60]. Da es sich bei der MS ebenfalls um eine autoimmune demyelinisierende Erkrankung handelt und MBP sowohl zentral als auch peripher exprimiert wird, ist die Suche nach gemeinsamen Autoantigenen Gegenstand aktueller Forschung. Ziel unserer Studie war es unter Anderem, die Frage nach dem autoantigenen Potential von MBP 82-100 für die Immunpathogenese der CIDP zu klären.

2.5 Hypothesen und Ziele der Studie

Übergeordnetes Ziel der Studie war es, CIDP-Patienten unserer sehr gut charakterisierten Kohorte hinsichtlich ihrer adaptiven Immunantworten mit Schwerpunkt auf Myelinantigen-spezifischen T-Lymphozyten-Antworten und Frequenzen der Lymphozytenpopulationen zu untersuchen. Wir formulierten dafür drei wesentliche Hypothesen:

2.5.1 PMP-22, P2, P0 180-199 und MBP 82-100 als Autoantigene der CIDP

Erstens wollten wir die Ergebnisse der wahrscheinlichsten Autoantigene der CIDP, PMP-22 und P2, durch spezifische T-Lymphozyten-Antworten reproduzieren. Dabei nahmen wir uns ebenfalls zum Ziel, erstmals autoimmune T-Lymphozyten-Reaktionen gegen die bisher bei CIDP-Patienten nicht bestätigten peripheren Myelinantigene, P0 180-199 und MBP 82-100, zu zeigen. Es war uns wichtig, diese Ergebnisse in Korrelation zu den Lymphozytenpopulationen, insbesondere CD4+ *Memory* T-Lymphozyten zu setzen, um eine Aussage über das inflammatorische Milieu treffen zu können.

2.5.2 Stärker aktiviertes Immunsystem in klinisch-instabiler Anfangsphase der CIDP und Reduktion im Verlauf

Zweitens vermuteten wir ein stärkeres autoreaktives Potential mit höheren T-Lymphozyten-Reaktionen und Lymphozytenfrequenzen in der klinisch-instabilen Anfangsphase der Erkrankung, welches im Verlauf der 12 Monate Beobachtungszeit unter Therapie reduziert sein würde.

2.5.3 Immunologisch nachweisbare Unterschiede zwischen typischen und atypischen CIDP-Verläufen

Drittens erstellten wir die Hypothese, dass es sich im Gegensatz zur typischen CIDP bei den atypischen Varianten um andere Krankheitsentitäten handeln könnte, die sich auch immunologisch unterscheiden lassen würden.

Um diese Fragestellungen klären zu können, beobachteten wir die klinischen und immunologischen Veränderungen im Verlauf eines Jahres. Zur genaueren Charakterisierung und Klassifizierung der CIDP unterteilten wir unsere Kohorte in Subgruppen.

3 *METHODIK*

3.1 *Studiendesign*

Die vorliegende Studie ist Teil unserer Kohortenstudie. Diese stellt eine systematische prospektive Beobachtungsstudie über 10 Jahre dar, in der sowohl klinische als auch immunologische Parameter der CIDP-Patienten kontinuierlich erhoben werden. Die Arbeit im Rahmen dieser Dissertation umfasst die Auswertung der Daten von Beginn bis 12 Monate nach Einschluss in die Studie. Dies beinhaltet 5 Visiten (V) (V1 bei Einschluss in die Studie, V2 nach 1,5 Monaten, V3 nach 3 Monaten, V4 nach 6 Monaten, V5 nach 12 Monaten), zu denen jeweils definierte klinische Tests durchgeführt und immunchemische Parameter (ELISPOT, FACS) erhoben wurden.

Die Einschlusskriterien für CIDP-Patienten waren Volljährigkeit, eine typische CIDP oder Varianten (DADS, MADSAM, rein motorisch, rein sensorisch, fokal). Ausschlusskriterien stellten Polyneuropathien anderer Ätiologie, wie beispielsweise (bspw.) ethyltoxisch, diabetogen und angeboren sowie Erkrankungen des Immunsystems und Neoplasien dar. Die Einschlusskriterien für die Kontrollen waren Volljährigkeit, altersentsprechende Gesundheit und zu unserer Kohorte passende Altersstruktur. Ausschlusskriterien für die Kontrollen stellten Neoplasien, Erkrankungen des Immunsystems und immunsuppressive oder –modulierende Interventionen dar.

Jeder Teilnehmer, CIDP-Patienten und gesunde Kontrollen, unterschrieb nach ärztlicher Aufklärung eine Einverständniserklärung. Die Studie hatte keinen Einfluss auf Therapie oder diagnostische Routineuntersuchungen der Patienten. Zur Generierung von Vergleichsdaten wurden die Kontrollprobanden nach den gleichen Parametern evaluiert. Um einen adäquaten Datenschutz gewährleisten zu können, wurden alle erhobenen Daten pseudonymisiert.

Durchgeführt wird die Studie am *Neurocure Research Center* und dem Institut für Immunologie der Charité Universitätsmedizin Berlin. Die Studie wurde durch die Ethikkommission der Charité Berlin bestätigt und in Einverständnis mit der *Declaration of Helsinki* und den Prinzipien des *Good Clinical Practice* durchgeführt.

3.2 Patienten und gesunde Kontrollprobanden

Alle 28 untersuchten CIDP-Patienten wurden über die Neurologische Ambulanz der Charité akquiriert und mussten die CIDP-Diagnosekriterien der EFNS *Guidelines* erfüllen [11]. Vorrangig wurden Patienten in die Studie aufgenommen, deren CIDP-Diagnose erst seit kurzer Zeit bestand, die sich demnach, empirisch betrachtet, im klinisch-instabilen und aktiven Zeitfenster der Erkrankung befanden. Teilweise wurden Patienten mit längerer Krankheitsdauer eingeschlossen, wenn sie sich ebenfalls in einem klinisch-instabilen Stadium der CIDP befanden. Die Auswahl der Patienten erfolgte durch Frau Dr. Juliane Klehmet. Die eingeschlossenen CIDP-Patienten und gesunden Kontrollen gaben nach ärztlicher Aufklärung eine Einverständniserklärung ab. Anschließend wurden die Patienten prospektiv über einen Zeitraum von zwölf Monaten betreut und bei bestehender Therapieindikation, wie mäßiger bis schwerer Behinderung im Alltag oder Krankheitsprogression, auf eine Therapie mit IVIG eingestellt. In diesen zwölf Monaten fanden insgesamt 5 Visiten (V1 nach Einschluss in die Studie, V2 nach 1,5 Monaten, V3 nach 3 Monaten, V4 nach 6 Monaten, V5 nach 12 Monaten) jeweils mit einer definierten klinischen Evaluation und Blutentnahmen für die immunchemische und immunzytologische Diagnostik (ELISPOT, FACS) statt. Die klinische Einschätzung des Schweregrades, des Verlaufs und der Therapie erfolgte durch Frau Dr. Juliane Klehmet. Evaluiert wurde die Patientenkohorte nach klinisch-etablierten Tests wie *Disease Activity Status*[61], *INCAT Score* [24] und *MRC Sum Score*[25]. Der *Disease Activity Status* bei CIDP lässt sich durch Betrachtung der aktuellen Medikation, Therapiedauer, Therapieansprechen, *Follow-up* Zeit und der Befunde der neurologischen Untersuchung bestimmen. Hier wird zwischen „cured“ (Symptomfreiheit über 5 Jahre), „remission“, „stable-active“, „improving“ oder „unstable-active“ unterschieden [61]. Der *INCAT Score* wird durch ärztliche Befragung der funktionellen Behinderung des Patienten erhoben. Jeweils für untere wie für obere Extremitäten wird ein Punktwert erhoben und die Summe ermittelt. Werte zwischen 0 (gesund) bis 10 (unfähig, willkürliche Bewegungen mit Armen oder Beinen auszuführen) sind möglich [24]. Der *MRC Sum Score* liegt bei 0 bis 70 und beschreibt Einschränkungen der Schulterabduktion, Ellenbogenflexion, Handextension, Hüftflexion, Knieextension, Fußdorsalextension und Großzehenextension [25]. Gemeinsam mit dem *MRC Sum Score* ermittelten wir

auch die maximale Gehstrecke der Patienten, um eine genauere Aussage über das Therapieansprechen im Verlauf der 12 Monate treffen zu können.

Die Blutentnahme umfasste insgesamt 40 ml peripheres Blut. 8 ml wurden in EDTA-Vakuumbloodentnahmeröhrchen am selben Tag an das Labor Berlin zur FACS-Analyse geschickt. 32 ml Blut wurden in *Cell Preparation Tube* (CPT)-Natriumcitrat-Vakuumbloodentnahmeröhrchen entnommen, ein bis zwei Stunden später labortechnisch aufbereitet und die enthaltenen PBMC kryokonserviert. Zu einem späteren Zeitpunkt konnten so gleichzeitig die PBMC mehrerer Patienten in einem ELISPOT-Ansatz untersucht werden. Nicht bei allen Patienten konnten sämtliche Untersuchungen zu jeder Visite durchgeführt werden.

Die Auswahl der Kontrollen zum Erheben von Vergleichsdaten erfolgte nach Altersverteilung und Verfügbarkeit. Es standen 15 Kontrollen für die ELISPOT-Analyse und 28 Kontrollen für die FACS-Analyse zur Verfügung. Zur Analyse wurde von den Kontrollen 40ml peripheres Blut gewonnen.

Die Aufarbeitung des Blutes und die folgenden Experimente erfolgten in einem klinischen Forschungslabor unter sterilen Bedingungen.

3.3 Erhebung klinischer Patientendaten

Zur Erhebung der klinischen Daten der 28 CIDP-Patienten wurde auf die ärztliche und laborchemische Dokumentation sowie auf die CIDP-Datenbank der Neurologischen Ambulanz zurückgegriffen. Diese Daten wurden im Verlauf der Behandlung der Patienten in der Neurologischen Ambulanz der Charité-Universitätsmedizin Berlin erhoben. Zusätzlich wurden klinische sowie immunchemische Daten der Informationssoftware SAP und Patientenakten entnommen. Bei der Analyse der Patientendaten standen Diagnosezeitpunkt, Krankheitsjahre vor Diagnose, Verlaufsform, Schweregrad, Diagnosesicherheit, Therapie und Therapieansprechen im Vordergrund.

3.4 Isolierung von PBMC aus peripherem Blut

Die Gewinnung von peripheren mononukleären Zellen (PBMC) erfolgte durch Dichtegradientenzentrifugation mit Hilfe der CPT-Röhrchen. Es wurden jeweils 32ml peripheres Blut in CPT-Röhrchen abgenommen. Das in den CPT-Röhrchen enthaltene Citratmedium verhindert die Antikoagulation und der enthaltene Polyester-Filter in Kombination mit der Polysaccharid FICOLL-Trennlösung (Saccharose-Epichlorhydrin-Copolymer) ermöglicht die Isolierung der PBMC über

Dichtegradientenzentrifugation. Hierfür wurden die CPT-Röhrchen für 20min bei 1500g, Beschleunigungs-, Dezelerationsparameter von 5 und Raumtemperatur zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand mit einer Transferpipette abgenommen und verworfen, bevor die PBMC-Schicht vorsichtig in ein zuvor mit 10ml PBS gefüllten 50ml-Zentrifugiergefäß-Falcon überführt wurde. Dieser wurde zum Waschen der Zellen für 10min mit 1300rpm, Beschleunigungs-, Dezelerationsparameter von 5 und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abdekantiert und das Zellpellet für den folgenden Waschschrift erneut in PBS resuspendiert. Die Zentrifugation für den zweiten Waschschrift erfolgte für 10min mit 1100rpm, Beschleunigungs-, Dezelerationsparameter von 5 und 4°C. Der Überstand wurde erneut abdekantiert und verworfen. Das entstandene Zellpellet wurde nun mit Einfriermedium/Lösung 1 (60% FCS, 40% RPMI) resuspendiert.

Die Zählung der Zellen erfolgte mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer (0,1mm/0,0025mm²) unter einem Lichtmikroskop. 10µl der Zellsuspension wurden im Verhältnis 1:20 mit 190µl des Zellzählmediums (Trypanblau 1:10 mit PBS verdünnt) vermengt auf die Zählkammer aufgetragen und unter dem Mikroskop ausgezählt. Das Prinzip der Trypanblauanfärbung erlaubt eine Unterscheidung zwischen vitalen Zellen und Detritus, da es bei beschädigten Zellmembranen zu einer starken Blaufärbung führt, wohingegen lebende Zellen ungefärbt, also weiß bleiben. Anschließend wurden die PBMC auf eine Konzentration von 2×10^7 Zellen/ml eingestellt.

3.5 Kryokonservierung von PBMC

Für die Kryokonservierung der PBMC im Stickstoff wurde die Zellsuspension mit 2×10^7 Zellen/ml im Verhältnis 1:1 mit eiskaltem Kryomedium (80% FCS, 20% DMSO) vermischt und anschließend in die 1,6ml Kryotubes pipettiert. Die Kryotubes wurden in eine bei 4°C vorgekühlte Nalgene-Isopropanol-Einfrierbox (1°C Temperaturabnahme/Minute) gestellt und bei -80°C über Nacht gelagert. Am nächsten Tag erfolgte die Überführung in flüssigen Stickstoff. Diese Art der Kryokonservierung erlaubte uns die Lagerung der Zellen über einen langen Zeitraum (bis zu sechs Monaten).

3.6 Auftauen der PBMC nach Kryokonservierung

Um eine kollektive und effiziente ELISPOT-Analyse der gesammelten PBMC zu ermöglichen, wurde auf das Prinzip der Kryokonservierung zurückgegriffen. Für die

Analyse wurden die PBMC zellschonend wieder aufgetaut. Dazu wurde bereits vorher ein Nalgene-Isopropanol-Einfriercontainer bei -80°C gelagert und die Kryoröhrchen aus dem Stickstoff in diesen überführt. Über den Luftstrom der Abzugshaube gelegt, tauten die eingefrorenen PBMC auf und ließen sich in eisgekühltes steriles PBS überführen, welches vorher zu 20-30ml in einem 50ml-Zentrifugiergefäß-Falcon vorgelegt wurde. Nach einer Zentrifugation bei 330g über 10min mit Beschleunigungs-, Dezelerationsparameter von 5 und 4°C wurde der Überstand abdekantiert und das Zellpellet mit Medium (RPML, 10% FCS, 1% P/S, 1% Glutamin) resuspendiert. Mithilfe einer Neubauer Zählkammer, Trypanblauanfärbung und Lichtmikroskop wurde die Zellzahl ermittelt und die Zellen auf eine Konzentration von 4×10^6 Zellen/ml eingestellt. In diesem Schritt wurden ebenfalls die toten, blau angefärbten Zellen gezählt und dokumentiert, um einen einwandfreien Auftauprozess zu gewährleisten. Die PBMC wurden im Verlauf der ELISPOT-Analyse mit dem Stimulans gemeinsam in ein *well* (engl. „Loch“) pipettiert.

3.7 Enzyme Linked Immunosorbent Spot Assay (ELISPOT)

Der ELISPOT ermöglicht die sehr sensitive Darstellung von aktivierten Immunzellen durch den Nachweis der Produktion von Antikörpern oder Zytokinen auf Einzellebene *in vitro* [62, 63]. Das Grundprinzip besteht in der Bindung und anschließenden Detektion der entsprechenden Sekretionsprodukte. Initial werden Primärantikörper auf der Polyvinylidenfluorid-Membran fixiert, welche im Verlauf spezifisch die Sekretionsprodukte binden und immobilisieren. Die zu untersuchenden Immunzellen werden über der Membran aufgebracht und lagern sich darauf ab, sodass ihre Zytokine, die bei Immunaktivierung sezerniert werden, ortsspezifisch gebunden werden. Anschließend werden die Zellen wieder entfernt und es wird ein für den immobilisierten Primärantikörper-Sekretionsprodukt-Komplex spezifischer Sekundärantikörper aufgebracht. Dieser Sekundärantikörper ermöglicht über die Biotin-Konjugation die visuelle Detektion durch Streptavidin-Farbumschlag. Somit lässt sich die Immunaktivierung sehr sensitiv auf Einzellebene beziehungsweise in Form von *Spot Forming Units* (SFU, kleine Zellgruppen) nachweisen und selbst seltene Immunzellaktivierungen in einer großen Zellpopulation sind spezifisch nachweisbar.

3.7.1 Zielantigene

Alle getesteten Zielantigene wurden in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst, mit Ausnahme von P0 180-199 und MBP 82-100, bei denen Ampuwa-Wasser verwendet wurde. Die Konzentrationen der *Stocks* (engl. „Vorrat“) sind in der unten stehenden Tabelle angegeben. Alle verwendeten Peptide wurden mit Medium (RPMI, 10% FCS, 1% P/S, 1% Glutamin, anti-CD 28-Antikörper (4µg/ml)) vermischt und auf folgende Konzentrationen eingestellt:

Tabelle 3.7.1: Antigene im ELISPOT

Stock (Konzentration)	Konzentration des Antigens im well
PMP-22 32–51 (10mg/ml)	40µg/ml
PMP-22 51–64 (10mg/ml)	40µg/ml
PMP-22 120–133 (10mg/ml)	40µg/ml
P2 14–25 (10mg/ml)	40µg/ml
P2 61–70 (10mg/ml)	40µg/ml
P0 180-199 (1mg/ml)	20µg/ml
MBP 82-100 (1mg/ml)	20µg/ml
CFT (1mg/ml)	9µg/ml
CEF (1mg/ml)	9µg/ml
SEB (1mg/ml)	0,25µg/ml

Um einen zelltoxischen Effekt zu vermeiden, lag die maximale Konzentration an DMSO bei 18,2µl/ml und einer absoluten DMSO Menge von 1,82µl/well. Zu den Antigenen setzten wir jeweils 4µl/ml Anti-CD 28-Antikörper zu, um ein zusätzliches kostimulatorisches Signal für die T-Lymphozyten-Aktivierung zu bieten [64].

CFT, CEF und SEB wurden als Positiv-Kontrollen verwendet. CFT stimuliert spezifisch CD4+ T-Lymphozyten und besteht aus 9 Antigenepitopen des CMV, EBV und Influenza-Virus. CEF ist ein Peptidpool mit 23 Antigenepitopen, die ebenfalls dem CMV, EBV, Influenza-Virus und zusätzlich dem Tetanus-Toxin entstammen und vorwiegend CD8+ T-Lymphozyten stimulieren. SEB fungiert als Superantigen, welches über die unspezifische Aktivierung des TCR zu einer antigenunabhängigen

T-Lymphozyten-Aktivierung und massiver Zytokinfreisetzung führt. Es wurden jeweils 100µl jedes Stimulus pro *well* pipettiert.

3.7.2 Unterscheidung von Antigen-spezifischen und –unspezifischen SFU

Ziel unserer immunologischen Arbeit war es, T-Zell-Immunantworten auf periphere Myelinantigene bei CIDP-Patienten spezifisch nachweisen zu können und diese in Relation zu klinischem Befund, Verlauf und Therapieansprechen zu setzen. Daraus möchten wir Aufschlüsse über die Existenz von Autoantigenen gewinnen, die eine bessere Aussage über die Diagnose und Prognose der CIDP zulassen.

In unserem ELISPOT-Ansatz wurden hierfür die PBMC mit verschiedenen in der aktuellen Literatur beschriebenen vermutlichen Autoantigenen inkubiert und die IFN- γ Sekretion nach 24h detektiert. Um eine Vergleichbarkeit zu erreichen, wurden den PBMC ebenfalls in weiteren Ansätzen Positiv-Kontrollen (CFT, CEF, SEB) sowie eine Negativ-Kontrolle (RPMI, 10% FCS, 1% P/S, 1% Glutamin, anti-CD 28-Antikörper (4µg/ml)) zugesetzt. Die Anzahl von SFU der Negativ-Kontrolle entspricht hierbei der spontanen IFN- γ -Sekretion und wird daher von der Anzahl der SFU bei den Peptidproben subtrahiert, um Antigen-spezifische Werte zu erhalten. Alle Ansätze wurden in Triplikaten pipettiert.

3.7.3 ELISPOT-Ablauf

1. Tag

Am ersten Tag erfolgte die Vorbereitung der ELISPOT-96 *well*-Mikrotiter-Platte durch „*Coating*“. Dies umfasst das Aufbringen des Primärantikörpers auf die ELISPOT-Membran, welcher fest an diese bindet und spezifisch für humanes IFN- γ ist. Pro Platte wurde zu 10ml sterilem PBS 30µl des IFN- γ Antikörpers gemischt und 100µl/*well* pipettiert.

2.Tag

Nach mindestens 24h Lagerung bei 4°C war der Antikörper auf der Membran immobilisiert und überschüssiges Material wurde zu Beginn des zweiten Tages durch dreimalige Waschung mit sterilem PBS (200µl/*well*) abgetragen. Anschließend wurde die Platte mit Medium (RPMI, 10% FCS, 1% P/S, 1% Glutamin) für mindestens 30min bis zu 3h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert, um unspezifische Bindungen zu blocken. Nach der Inkubationszeit wurde das Medium durch Ausklopfen der Platte wieder entfernt. Nach dieser Vorbereitung wurden die

3 Methodik

Zellen, wie oben beschrieben, aufgetaut und auf eine Konzentration von 4×10^6 Zellen/ml eingestellt. Je *well* wurden 100µl der Zellsuspension pipettiert, sodass die finale Menge der Zellen pro *well* 4×10^5 Zellen betrug. Zusätzlich zu 100µl der Zellsuspension wurden in jedes *well* die entsprechenden zu untersuchenden Antigene beziehungsweise Positiv- und Negativ-Kontrollen mit je 100µl/*well* gemischt. Alle Ansätze wurden in Triplikaten pipettiert. Die Platte wurde nun bei 37°C und 5% CO₂ für 24h inkubiert.

3.Tag

Nach 24h Inkubationszeit konnte unsteril weitergearbeitet werden, da die Phase der Immunzellstimulation abgeschlossen war. Am dritten Tag wurde die Mischung aus Zellen, Stimulanzien und ungebundenen Sekretionsprodukten wieder entfernt und der Biotin-konjugierte Sekundärantikörper aufgebracht, der spezifisch für den Primärantikörper-IFN-γ-Komplex ist. Dazu wurde die Platte erst dreifach mit PBS (200µl/*well*) und anschließend dreifach mit PBS-Tween (200µl/*well*) gewaschen, um verbliebendes Material restlos zu entfernen. Daraufhin wurde eine Mischung aus 10ml PBS-Tween-BSA und 40µl des Sekundärantikörpers (Anti-human-IFN-γ) hergestellt und zu 100µl/*well* pipettiert. Durch eine weitere Lagerung bei 4°C für 8-24h erfolgte die Bindung des Sekundärantikörpers an das durch den Primärantikörper auf der Membran fixierte IFN-γ-Sekretionsprodukt.

4.Tag

Der abschließende 4. Tag des ELISPOT besteht aus der Anfärbung und visuellen Detektion des Sekundärantikörper-IFN-γ-Primärantikörper-Komplexes. Dies gelingt durch die Biotin-Konjugation des Sekundärantikörpers, die durch Meerrettichperoxidase-(HRP)-Streptavidin zu einem sichtbaren Farbumschlag führt. Hierfür wurden zu Beginn des 4. Tages verbliebene ungebundene Sekundärantikörper in 4 Waschschrritten mit PBS-Tween (200µl/*well*) entfernt. Jetzt wurde ein Ansatz mit 10ml PBS-Tween-BSA und 10µl HRP-Streptavidin hergestellt und dieser zu je 100µl/*well* auf die Platte aufgebracht. Die darauf folgenden 2-4h Lagerung bei Raumtemperatur in Dunkelheit erlaubten die Anlagerung des HRP-Streptavidins an das Biotin des Sekundärantikörpers. Für die Entwicklung der Platte wurde erneut überschüssiges Material durch drei PBS-Tween (200µl/*well*)- und drei PBS (200µl/*well*)-Waschschrritte entfernt. Als Entwicklungslösung wurden 24ml AEC-Puffer mit 0,8ml AEC-Lösung gemischt und anschließend sterilfiltriert (0,22µm), um die über die Lagerungszeit der AEC-Lösung entstandenen Fest- und

Schwebstoffe zu entfernen. Der sterilfiltrierten Lösung wurden nun 12µl H₂O₂ (30%) zugesetzt und diese Lösung als AEC-Puffer zu 200µl/well auf die Platte pipettiert. Die durch den Streptavidin-Biotin-Komplex spezifische Bindung zu HRP führte in 3-5min zu einem roten Farbumschlag. Die Reaktion wurde durch mehrmaliges Abspülen der Platte und Entfernung der rückseitigen Plastikabdeckung unter fließendem Kondenswasser gestoppt. Vor der Auswertung wurde die Platte für 45min unter dem Luftstrom der Abzugshaube getrocknet. Die Detektion und Zählung sämtlicher SFU wurden am ELISPOT Reader Immunospot (CTL Analyzers) durchgeführt, unter Ausnahme der letzten 4 ELISPOT-Platten, da hier das Gerät defekt war und auf das Alternativgerät von AID (ELISPOT Reader AID classic) ausgewichen werden musste. Verwendet wurden die *Softwares* Immunospot 5.1 Professional, ImmunoCapture 6.4.81, CTL Switchboard 2.5.5 und AID ELISPOT 7.0 iSpot.

3.7.4 Mathematische Normierung der ELISPOT-Ergebnisse

Um interindividuell und über 5 Visiten auch intraindividuell vergleichbare Datensätze zu erhalten, führten wir mehrere Normierungsschritte standardisiert für alle Messwerte durch. Jedes getestete Antigen wurde in Triplikaten mit den jeweiligen PBMC versetzt. Zusätzlich verwendeten wir eine Negativ- und drei Positiv-Kontrollen, um eine antigenunabhängige und patienteneigene Überaktivierung bzw. Suppression des Immunsystems ausschließen zu können. Hierbei entfernten wir Datensätze, die entweder extrem hohe SFU-Werte in allen Ansätzen einschließlich Negativ-Kontrolle oder extrem niedrige SFU-Werte (bspw. CEF<15 SFU) für die Positiv-Kontrollen zeigten. Aufgrund der Messgenauigkeit der verwendeten *Software* bei sehr großen SFU-Werten, begrenzten wir die Maximalwerte für CEF bei 1000 und für SEB bei 2160. Aus den erhaltenen Messwerten der Triplikate errechneten wir den Mittelwert, mussten allerdings vereinzelt einen Wert der Triplikate entfernen, wenn dieser extrem von den anderen abwich. Um die Daten besser darstellen zu können, rechneten wir alle Ergebnisse (inklusive Positiv- und Negativ-Kontrollen) von unseren 4x10⁵ eingesetzten PBMC auf 10⁶ hoch. Als nächsten Schritt subtrahierten wir die aus der Negativ-Kontrolle erhaltenen SFU der spontanen IFN-γ Produktion von dem Mittelwert der Triplikate. Der erhaltene Wert wurde zum Vergleich und zur Erstellung von Graphen in GraphPad Prism 6 übertragen.

3.8 Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS)

Da eine *in vivo* Analyse der Immunantwort in peripherem Nervengewebe nicht möglich ist, wird auf die Bestimmung zirkulierender Immunzell-Subpopulationen zurückgegriffen, welche einen immunzytologisch gut erfassbaren Parameter für die Immunreaktionen im Krankheitsverlauf der CIDP darstellen. Für die Bestimmung der Frequenzen der T-Lymphozytensubpopulationen wurde das Labor Berlin beauftragt. Es erfolgte eine Differenzierung in Monozyten, B-Lymphozyten, CD4+, CD8+ und regulatorische T-Lymphozyten. CD4+ sowie CD8+ T-Lymphozyten wurden zusätzlich in ihre Subgruppen eingeteilt: naive T-Lymphozyten (CD4/8+ CD45RA+ CCR7+), TEMRA (CD4/8+ CD45RA+ CCR7-), TEM (CD4/8+ CD45RA- CCR7-), TCM (CD4/8+ CD45RA- CCR7+).

3.9 Statistik und graphische Darstellung

Die Statistik und die Graphen wurden mit Hilfe der *Software* GraphPad Prism 6 erstellt. Signifikanzniveaus von schwach signifikant (*, Irrtumswahrscheinlichkeit von $p \leq 0,05$) über signifikant (**, Irrtumswahrscheinlichkeit von $p \leq 0,01$) bis stark signifikant (***, Irrtumswahrscheinlichkeit von $p \leq 0,001$) wurden gekennzeichnet. Die Werte wurden bei einer standardverteilten Wertemenge (Gaußschen Verteilung) zuerst mittels eines *ANOVA Tests* (mit *Holm-Sidak's Test* zum Vergleich multipler Werte) statistisch ausgewertet. Alternativ wurde unter Annahme einer nicht-Gaußschen Verteilung der *Kruskal-Wallis Test* (mit *Dunn's Test* zum Vergleich multipler Werte) angewendet. Bei Anhalt für eine Tendenz ($p < 0,1$) im *Kruskal-Wallis*- oder *ANOVA Test* nutzten wir nachfolgend im Fall von zwei Werten einer Gaußschen Wertemenge den *Student's T-Test* oder alternativ bei zwei Werten einer nicht-Gaußschen Wertemenge den *Mann-Whitney-U-Test* zur statistischen Auswertung. In den Graphen wurden die Werte entweder als *Scatter Plot* einzeln mit arithmetischem Mittel (Mittelwert) und positiver sowie negativer Standardabweichung oder als *Box Plot and Whiskers* mit Median, 25. und 75. Perzentile sowie Darstellung des niedrigsten (Minimum) und höchsten Wertes (Maximum) angegeben. Dieses Vorgehen der statistischen Auswertung wurde mit Fr. Dr. phil. Ulrike Grittner aus dem Institut für Biometrie und Klinische Epidemiologie der Charité-Universitätsmedizin Berlin abgesprochen und von ihr bestätigt.

Da dies eine prospektive Beobachtungsstudie mit einer bzgl. des Krankheitsverlaufs, der Krankheitsdauer und der Therapiestrategie sehr heterogenen Patientenkohorte darstellt, erfolgt die Auswertung in Subgruppen, um die Ergebnisse besser interpretieren zu können.

3.10 *Material*

3.10.1 *Geräte*

Tabelle 3.10.1: Geräte

Gerät	Hersteller
Sterilbank und Abzug Holten LaminAir	Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA
Brutschrank/Inkubator HERA cell	Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA
Elektronische Semi-Mikrowaage	Sartorius Research, Göttingen, Deutschland
ELISPOT Reader Immunospot	CTL Analyzers, Ohio, USA
Gefrierschrank -80°C UF755G	Dometic Medical Systems, Hosingen, Luxemburg
Gefrierschrank -20°C Economic Froster	Bosch Thermotechnik, Wetzlar, Deutschland
Kühl-, Gefrierschrank-Kombination KGK2833	Liebherr, Bulle, Schweiz
Stickstofftank Bio-Safe Controlß	Cryotherm, Kirchen/Sieg, Deutschland
Mikropipetten (0,5-10,10-100, 20-200, 100-1000µl)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Mikroskop Primo Vert	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Multipipette (0,5-300µl)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Nalgene Freezing Container	Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA
Vortexer Genie-2	Scientific Industries, New York, USA
Wasserbad	GFL, Burgwedel, Deutschland

Gerät	Hersteller
Zellzählkammer Neubauer (0,1mm/0,0025mm ²)	Laboroptik, Lancing, United Kingdom
Zentrifuge 5810	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge 5810R (-9 bis 40°C)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zellzähl-Nummeriergerät ENM	Rexel, Westlands, United Kingdom
Combipipette Multistep	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
ELISPOT Reader AID classic	AID, Strassberg, Deutschland

3.10.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 3.10.2: Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
96-Well Platte für ELISPOT MultiScreen Filter Plates	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
EDTA-Röhrchen Vacutainer 4,0ml	BD Biosciences, New Jersey, USA
Kryotubes (1,6ml)	Sarstedt, Nürnbrecht, Deutschland
Pipettenspitzen (10, 100, 1000µl)	Sarstedt, Nürnbrecht, Deutschland
Reagiergefäße (0,5ml, 1,5ml)	Sarstedt, Nürnbrecht, Deutschland
Transferpipette (3,5ml)	Sarstedt, Nürnbrecht, Deutschland
Zentrifugenröhrchen Falcon (15, 50ml)	BD Biosciences, New Jersey, USA
CPT-Röhrchen Vacutainer (8ml)	BD Biosciences, New Jersey, USA
Eco-Lab-Filtrationsvorsätze, steril 25mm, 0,2µm	Neo-Lab, Heidelberg, Deutschland
Combitips Advanced Biopur 2,5ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Rundbodenplatte 96-Well	Sarstedt, Nürnbrecht, Deutschland
Vakuum-Filter System, Bottle-Top 150ml, 0,2µm	Corning, New York, USA

3.10.3 ELISPOT-Antigene

Tabelle 3.10.3: ELISPOT-Antigene

Stock	Aminosäuresequenz	Verdünnung	Konzentration im Well (µg/ml)
PMP-22 32–51	NGHATDLWQNCSTSSSGNVH	1:125	40
PMP-22 51–64	HHCFS SSPNEWLQS	1:125	40
PMP-22 120–133	RHPEWHLNSDYSYG	1:125	40
P2 14–25	ENFDDYMKALGV	1:125	40
P2 61–70	EISFKLGQEF	1:125	40
P0 180-199	ASKRGRQTPVLYAMLDHSRS	1:25	20
MBP 82-100	DENPVVHFFKNIIVTPRTPP	1:25	20
CFT	Peptidpool	1:55	9
CEF	Peptidpool	1:55	9
SEB	Staphylococcal Enterotoxin B	1:2000	0,25

Wie in Tab. 3.7.1 erkenntlich, lagen die Stocks der PMP-22- und P2-Peptide mit einer Konzentration von 10mg/ml und die Stocks der Peptide P0 180-199 und MBP 82-100 mit 1mg/ml vor. CFT-, CEF- und SEB-Stocks lagen ebenfalls mit 1mg/ml vor. Die Antigene wurden durch die AG Dr. rer. nat. Rudolf Volkmer am Campus Charité Mitte zur Verfügung gestellt. SEB wurde von der Firma Sigma-Aldrich (Schnelldorf, Deutschland) gekauft.

3.10.4 ELISPOT-Antikörper und -Reporterenzyme

Tabelle 3.10.4: ELISPOT-Antikörper und -Reporterenzyme

Antikörper, Reporterenzym	Hersteller
Antikörper Anti-hu IFN-γ Biotin	eBioscience, San Diego, USA
Antikörper Anti-hu CD28 Purified Grade	eBioscience, San Diego, USA
Anti-hu IFN-γ Purified Grade	eBioscience, San Diego, USA
Streptavidin-HRP	Biolegend, California, USA

3.10.5 Puffer und Medien

Tabelle 3.10.5: Puffer und Medien

Puffer, Medium	Zusammensetzung
Kryomedium	80% FCS, 20% DMSO
Einfriermedium (Lösung 1)	60% FCS, 40% RPMI
Zellmedium	RPMI, 10% FCS, 1% P/S, 1% Glutamin
Peptidmedium	RPMI, 10% FCS, 1% P/S, 1% Glutamin, anti-CD 28-Antikörper (4µg/ml)
Waschpuffer, PBS-Tween	500ml PBS, 500µl Tween20
Antikörperpuffer, PBS-Tween-BSA	500ml PBS, 500µl Tween20, 5g BSA fraction V
0,1M Acetat-Puffer (pH 5,0)	Destilliertes Wasser, 0,17% Essigsäure (100%), 35,2% Natriumacetat (0,2M)
AEC-Lösung	300mg AEC, 30ml Dimethylformamid
Zellzählmedium	45ml PBS, 5ml Trypanblau
AEC-Puffer	0,1M Acetatpuffer, 3,3% AEC-Lösung, 0,05% H ₂ O ₂ (30%)

3.10.6 Software

Tabelle 3.10.6: Software

Software	Hersteller
EndNote Web basic	Thomson Reuters, New York, USA
EndNote X5	Thomson Reuters, New York, USA
GraphPad Prism Version 6	GraphPad Software, California, USA
ImmunoCapture 6.4.81	CTL Analyzers, Ohio, USA
Immunospot 5.1 Professional	CTL Analyzers, Ohio, USA
Microsoft Excel 2013	Microsoft Corporation, Washington, USA
Microsoft Word 2013	Microsoft Corporation, Washington, USA

Software	Hersteller
Microsoft Power Point 2013	Microsoft Corporation, Washington, USA
SAP ERP 6.0	SAP, Walldorf, Deutschland
AID ELISPOT 7.0 iSpot	AID, Strassberg, Deutschland
CTL Switchboard 2.5.5	CTL Analyzers, Ohio, USA

3.10.7 Reagenzien und Chemikalien

Tabelle 3.10.7: Reagenzien und Chemikalien

Reagenzien, Chemikalien	Hersteller
3-Amino-9-Ethylcarbazol (Tabletten)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Deutschland
Ampuwa Wasser für Injektionszwecke	Fresenius, Bad Homburg, Deutschland
Dimethylsulfoxid (100%)	Calbiochem, Bad Soden, Deutschland
Dulbecco's PBS (1x) GIBCO	Life Technologies, California, USA
FCS (Fetales Kälberserum, Hitze inaktiviert)	PAA, New Jersey, USA
L-Glutamin	Biochrom, Berlin, Deutschland
Penicillin / Streptomycin (P/S)	PAA, New Jersey, USA
RPMI 1640 Medium	PAA, New Jersey, USA
Trypanblau	Merck, Darmstadt, Deutschland
Tween 20 Detergent	Calbiochem, California, USA
BSA (bovine serum albumine)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Deutschland
Eisessig, Essigsäure C ₂ H ₄ O ₂	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumacetat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Dimethylformamid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Penicillin/Streptomycin	Biochrom, Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
L-Alanyl-L-Glutamin	Biochrom, Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland

4 ERGEBNISSE

4.1 Charakterisierung der Kohorte und Subgruppenbildung

Bei unserer Patientenkohorte handelt es sich um eine sehr heterogene Gruppe, die sich nicht nur in der CIDP-Variante sondern auch in Parametern wie Krankheitsschwere und –verlauf sowie Therapieform, –dauer und –ansprechen unterscheidet. Aus diesem Grund ist für die Auswertung unserer Ergebnisse die Bildung von Subgruppen interessant. Als Kriterien für die Unterteilung wählten wir die Krankheitsgravität, die Zeit seit Diagnosestellung bei Einschluss in die Studie, die CIDP-Variante sowie die bereits erhaltene Therapie.

Das mittlere Alter der Patienten lag bei Einschluss in die Studie bei 59 Jahren (Spannweite 32-78, Median 61). Das Verhältnis Männer:Frauen war 19:9. Dabei befanden sich 22 von 28 Patienten (78,6%) in einem klinisch-instabilen Krankheitsstadium, 5 (17,6%) in einem Stadium der Remission und 1 (3,6%) in einer klinisch-stabilen Phase der Erkrankung. Anhand der klinischen Datenbank der Neurologischen Ambulanz der Charité war die Bildung von Subgruppen nach INCAT-Score (>2 versus (vs.) ≤ 2), nach Zeit seit Diagnosestellung (>2 vs. ≤ 2 Jahre), nach CIDP-Variante (typisch vs. atypisch), nach bereits erhaltener Therapie (therapienaiv vs. anbehandelt), und nach Therapieansprechen (*responder* vs. *non-responder*) möglich. In unserer Kohorte lag der mittlere INCAT-Score an V1 bei 2,7 (Spannweite 1-5). Insgesamt wiesen 15 von 28 Patienten (53,6%) einen INCAT-Score >2 und 13 (46,4%) einen INCAT-Score ≤ 2 auf. 12 (43%) Patienten wurden in den ersten 2 Jahren nach Diagnosezeitpunkt in die Studie aufgenommen, 4 von diesen sogar im ersten Jahr. Bei den verbleibenden 16 (57%) Patienten wurde die Diagnose durchschnittlich 5,75 Jahre vor Einschluss in die Studie gestellt. In unserer Kohorte stellte sich bei 2 Patienten im Verlauf eine von den Diagnoserichtlinien der CIDP abweichende Pathogenese der Polyneuropathie heraus. Ihre Daten wurden nicht in die Analyse aufgenommen. 10 der verbleibenden 26 Patienten (38,5%) hatten eine typische CIDP, 4 Patienten (15,4%) eine sensible CIDP, 3 Patienten (11,5%) eine MADSAM, 2 Patienten (7,7%) eine DADS, 1 Patient (3,8%) eine Monoklonale Gammopathie Unklarer Signifikanz (MGUS), 1 Patient (3,8%) eine Multifokale Motorische Neuropathie (MMN) und 1 Patient (3,8%) zeigte einen sensiblen-ataktischen Befall. 4 Patienten (15,4%) zeigten einen davon andersartigen Verlauf, der sich nicht eindeutig einer CIDP-Variante zuordnen ließ. 13 von 28 (46,4%) Patienten wurden komplett

4 Ergebnisse

therapienaiv in unsere Studie eingeschlossen, 11 (39,3%) hatten zuvor bereits IVIG und 4 (14,3%) zuvor schon Kortikosteroide erhalten. Insgesamt 15 von 28 Patienten (53,6%) wurden daher als „anbehandelt“ klassifiziert. Anhand klinischer Daten wie MRC *Sum Score* und den Veränderungen der Gehstrecke konnten wir das Therapieansprechen der Patienten beurteilen. Insgesamt klassifizierten wir 19 (73,1%) von 26 Patienten (2 Patienten erhielten während unserer Studie keine Therapie) als *responder* und 8 (26,9%) Patienten als *non-responder*. Diese Verteilung entspricht den Angaben in der aktuellen Literatur [23]. Zur genaueren Charakterisierung der Kohorte siehe Tabelle 4.1.1.

Als Kontrollpopulation standen uns für die ELISPOT-Analyse 15 gesunde Kontrollen ähnlicher Altersverteilung zur Verfügung. Das mittlere Alter lag hier bei 70 Jahren (Spannweite 53-83, Median 71). Das Geschlechterverhältnis Männer:Frauen lag bei 7:8. Für die FACS-Analyse standen 28 gesunde Kontrollen ähnlicher Altersverteilung zur Verfügung, deren mittleres Alter bei 61 Jahren lag (Spannweite 42-83, Median 61), mit einem Verhältnis von Männer:Frauen von 10:18. Alle Kontrollen befanden sich zum Zeitpunkt der Blutentnahme in einem altersentsprechenden Gesundheitszustand.

4 Ergebnisse

Tabelle 4.1.1: *Klinische Informationen der CIDP-Kohorte (N=28; M, männlich; W, weiblich; T, typisch; A, atypisch; AB, anbehandelt; TN, therapienaiv; R, responder; N, non-responder; GS, Glukokortikosteroid)*

Geschlecht	Alter	CIDP-Variante	INCAT	Zeit seit Diagnosestellung (Jahre)	Therapie	Therapieansprechen
M	73	T	2	1	AB (IVIG)	R
W	49	T	2	1	AB (GS)	R
M	44	T	1	2	TN	R
W	32	T	2	4	AB (GS)	R
W	54	T	5	<1	AB (IVIG)	R
M	61	T	3	2	TN	R
W	70	T	4	8	AB (IVIG)	R
W	72	T	5	8	TN	R
W	78	T	4	5	AB (IVIG)	R
M	77	T	4	7	TN	R
W	33	A-sensibel	2	<1	AB (IVIG)	R
M	50	A-sensibel	2	1	TN	R
M	45	A-sensibel	1	2	AB (IVIG)	N
M	73	A-sensibel	3	6	AB (IVIG)	R
M	65	A-MADSAM	4	<1	AB (IVIG)	R
M	64	A-MADSAM	3	2	AB (IVIG)	R
W	63	A-MADSAM	2	3	AB (GS)	R
M	57	A-DADS	3	6	TN	R
M	74	A-DADS	1	5	TN	R
W	71	A-MGUS	3	5	AB (IVIG)	N
M	52	A-MMN	3	7	TN	R
M	61	A-sensibel-ataktisch	2	1	TN	N
M	70	A	3	5	TN	N
M	59	A	2	7	TN	N
M	65	A	3	3	AB (IVIG)	N
M	52	A	2	7	TN	nie GS/IVIG
M	36	Keine CIDP (PNP bei Spondylitis ankylosans)	1	<1	TN	nie GS/IVIG
M	47	Keine CIDP (Hepatitis C-assozierte PNP)	3	3	AB (GS)	N

4.2 *Auswertung der T-Lymphozyten-Immunreaktionen auf periphere Myelinantigene*

4.2.1 *CIDP-Patienten haben signifikant erhöhte Antigen-spezifische T-Lymphozyten-Antworten*

In jeder ELISPOT-Analyse wurden alle 7 peripheren Myelinantigene (PMP-22 32-51, PMP-22 51-64, PMP-22 120-133, P2 14-25, P2 61-70, P0 180-199, MBP 82-100) gemeinsam mit 3 Positiv-Kontrollen (CFT, CEF, SEB) und einer Negativ-Kontrolle (Medium) als Stimulanzen zu den PBMC der Patienten bzw. Kontrollprobanden hinzugefügt.

4 Ergebnisse

Wie in Abb. 4.2.1 erkennbar, ergeben sich in der CIDP-Kohorte für alle peripheren Myelinantigene an V1 (*Baseline*) signifikant erhöhte Werte im Vergleich zur Negativ-Kontrolle ($p < 0,05$), unter Ausnahme von P2 14-25 ($p = 0,0621$). P0 180-199 ($M \pm SD = 30,77 \pm 41,80$) und MBP 82-100 ($M \pm SD = 39,35 \pm 53,56$) zeigen in der ELISPOT-Analyse drei- bis vierfach höhere Antworten als die anderen verwendeten Antigene: PMP-22 32-51 ($M \pm SD = 7,75 \pm 11,29$), PMP-22 51-64 ($M \pm SD = 9,00 \pm 9,50$), PMP-22 120-133 ($M \pm SD = 9,10 \pm 11,20$), P2 14-25 ($M \pm SD = 9,14 \pm 10,28$) und P2 61-70 ($M \pm SD = 9,21 \pm 13,51$).

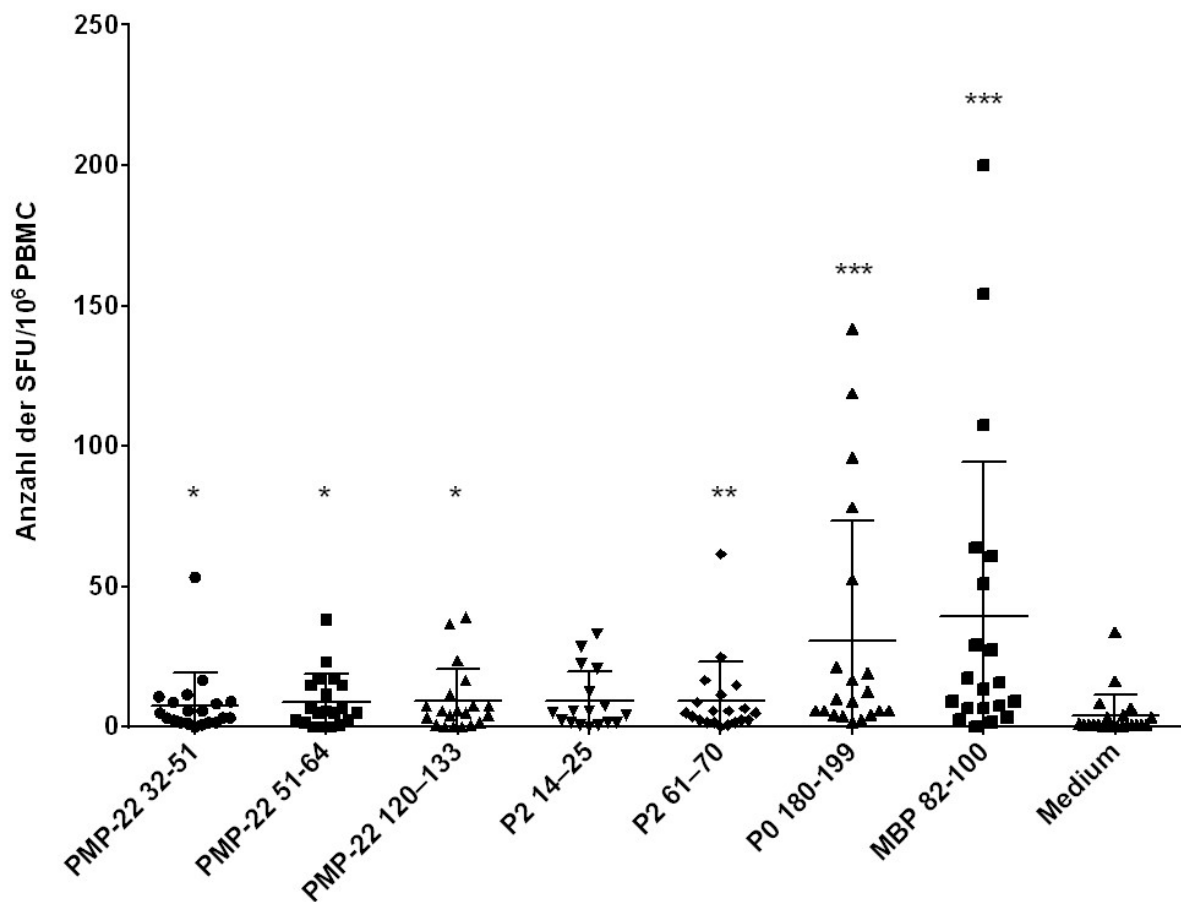


Abbildung 4.2.1: Myelinantigen-spezifische $IFN-\gamma$ -Antworten der CIDP-Patienten ($N=20$) im T-Zell-ELISPOT an Visite (V) 1 im Vergleich zur Negativ-Kontrolle (Medium). Signifikant höhere SFU bei PMP-22 32-51, PMP-22 51-64, PMP-22 120-133; P2 61-70, P0 180-199 und MBP 82-100. Dargestellt als Scatter Plot mit Mittelwert sowie positiver und negativer Standardabweichung. (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$)

4 Ergebnisse

Wie in Abb. 4.2.2 erkennbar, ergeben sich in der CIDP-Kohorte für alle drei Positiv-Kontrollen an V1 (*Baseline*) signifikant erhöhte Werte im Vergleich zur Negativ-Kontrolle ($p_{\text{CFT}} < 0,01$, $p_{\text{CEF}} < 0,001$, $p_{\text{SEB}} < 0,001$).

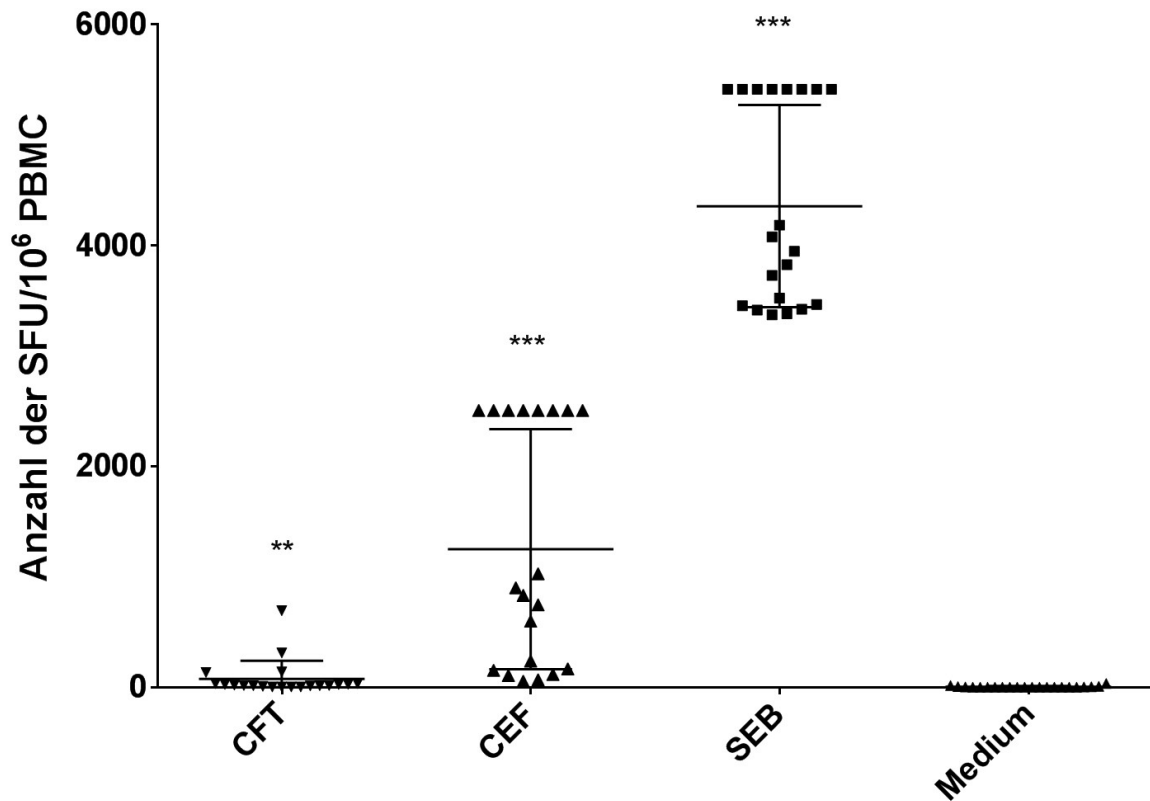


Abbildung 4.2.2: *IFN- γ -Antworten der CIDP-Patienten (N=20) auf Positiv-Kontrollen im T-Zell-ELISPOT an Visite (V) 1 im Vergleich zur Negativ-Kontrolle (Medium). Die dargestellten Werte der Negativ-Kontrolle entsprechen denen in Abb. 4.2.1. Methodisch bedingte Maximalwerte der SFU von CEF (2500) und für SEB (5400). Signifikant höhere SFU bei CFT, CEF und SEB. Dargestellt als Scatter Plot mit Mittelwert sowie positiver und negativer Standardabweichung. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$)*

4.2.2 CIDP-Patienten zeigen signifikant erhöhte Myelinantigen-spezifische T-Lymphozyten-Antworten gegenüber gesunden Kontrollen ohne signifikante Veränderungen im Krankheitsverlauf

Über insgesamt 12 Monate wurden von den 28 CIDP-Patienten zu 5 Untersuchungszeitpunkten im peripheren Blut Myelinantigen-spezifische T-Lymphozyten-Antworten in der ELISPOT-Analyse gemessen. Zuerst werden alle Ergebnisse im Verlauf eines Jahres (V1-V5) dargestellt, bevor im Folgenden Subgruppen der Kohorte im Vergleich zu den gesunden Kontrollen (C) an V1 (*Baseline*) gezeigt werden.

4 Ergebnisse

In Abb. 4.2.3 zeigen sich für PMP-22 32-51 an V1 und V2 gegenüber C signifikant ($p < 0,05$) erhöhte SFU. Beim Vergleich von V1 und V5 lässt sich kein Trend zur Reduktion der SFU erkennen ($p = 0,3542$). Für PMP-22 51-64 zeigen sich an V1 und V3 ($p < 0,01$) sowie für V2, V4 und V5 ($p < 0,05$) signifikant erhöhte SFU gegenüber C. Im Verlauf von V1 auf V5 konnten wir keinen Trend zur Reduktion der SFU darstellen ($p = 0,3709$). Für PMP-22 120-133 konnten wir gegenüber C an V1, V2, V3 und V4 ($p < 0,01$) signifikant erhöhte SFU messen. Hier konnten wir beim Vergleich V1 mit V5 einen Trend zur Reduktion der SFU zeigen ($p = 0,1991$). Für P2 14-25 ließen sich an V1, V2, V3 ($p < 0,01$) sowie V4 ($p < 0,001$) und V5 ($p < 0,05$) signifikant erhöhte SFU gegenüber C erheben, es lässt sich kein Trend zur Reduktion der SFU von V1 auf V5 nachweisen ($p = 0,3639$). Für P2 61-70 zeigen sich an V1 und V3 ($p < 0,05$) signifikant erhöhte SFU gegenüber C. Für P2 61-70 lässt sich ein Trend zur Reduktion der SFU von V1 auf V5 ($p = 0,0924$) und außerdem eine signifikante Reduktion der SFU von V3 auf V5 ($p < 0,05$) erkennen.

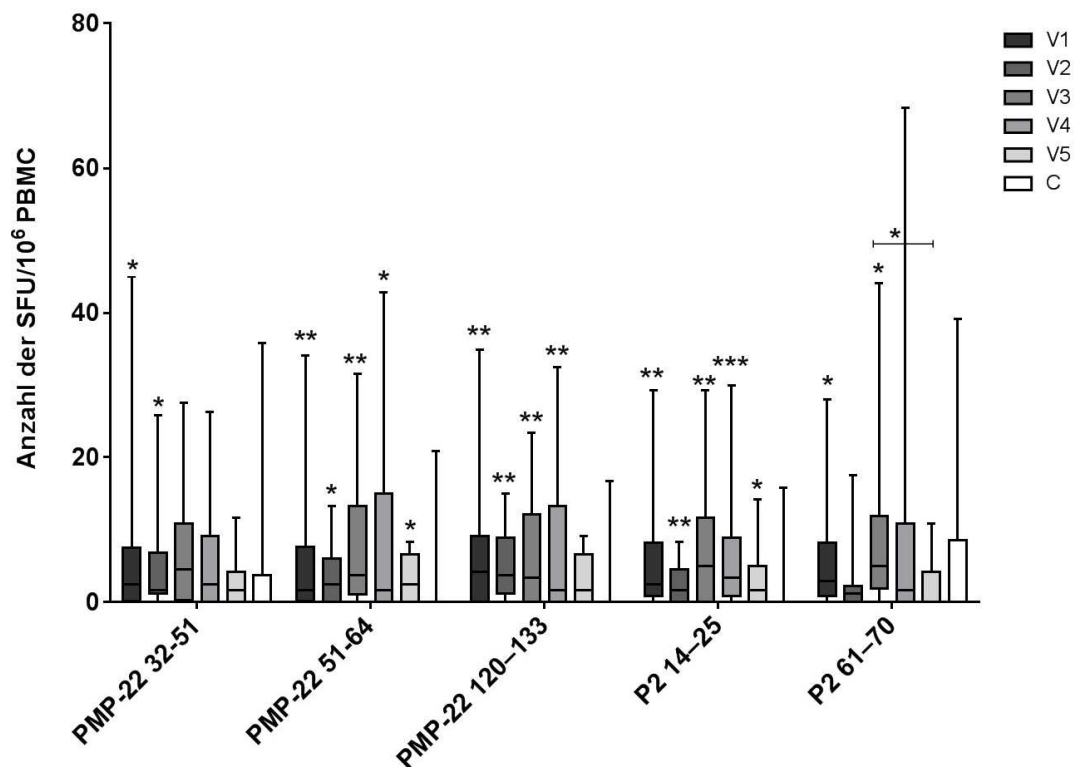


Abbildung 4.2.3: Myelinantigen-spezifische $IFN-\gamma$ -Antworten der CIDP-Patienten im T-Zell-ELISPOT im Verlauf Visite (V)1-5 ($N_{V1}=20$, $N_{V2}=7$, $N_{V3}=13$, $N_{V4}=11$, $N_{V5}=8$). Im Vergleich zu gesunden Kontrollen (C, $N_C=14$) signifikant erhöhte SFU bei PMP-22 32-51 (V1-2), PMP-22 51-64 (V1-5), PMP-22 120-133 (V1-4), P2 14-25 (V1-5), P2 61-70 (V1, V3). Signifikante Reduktion der SFU bei P2 61-70 von V3 auf V5. Dargestellt als Box Plot and Whiskers mit Median, 25. und 75. Perzentile sowie Minimum und Maximum. (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$)

4 Ergebnisse

In Abb. 4.2.4. zeigen sich für P0 180-199 an V1, V3, V4 und V5 gegenüber C signifikant erhöhte SFU ($p < 0,05$). Beim Vergleich der SFU an V1 und V5 lässt sich kein Trend zur Reduktion erkennen ($p = 0,4087$). Für MBP 82-100 konnten wir zu allen Untersuchungszeitpunkten signifikant erhöhte SFU gegenüber C nachweisen (V1 $p < 0,001$, V2 und V5 $p < 0,05$, V3 und V4 $p < 0,01$). Ein Trend zur Reduktion der SFU von V1 auf V5 zeigt sich nicht ($p = 0,2851$).

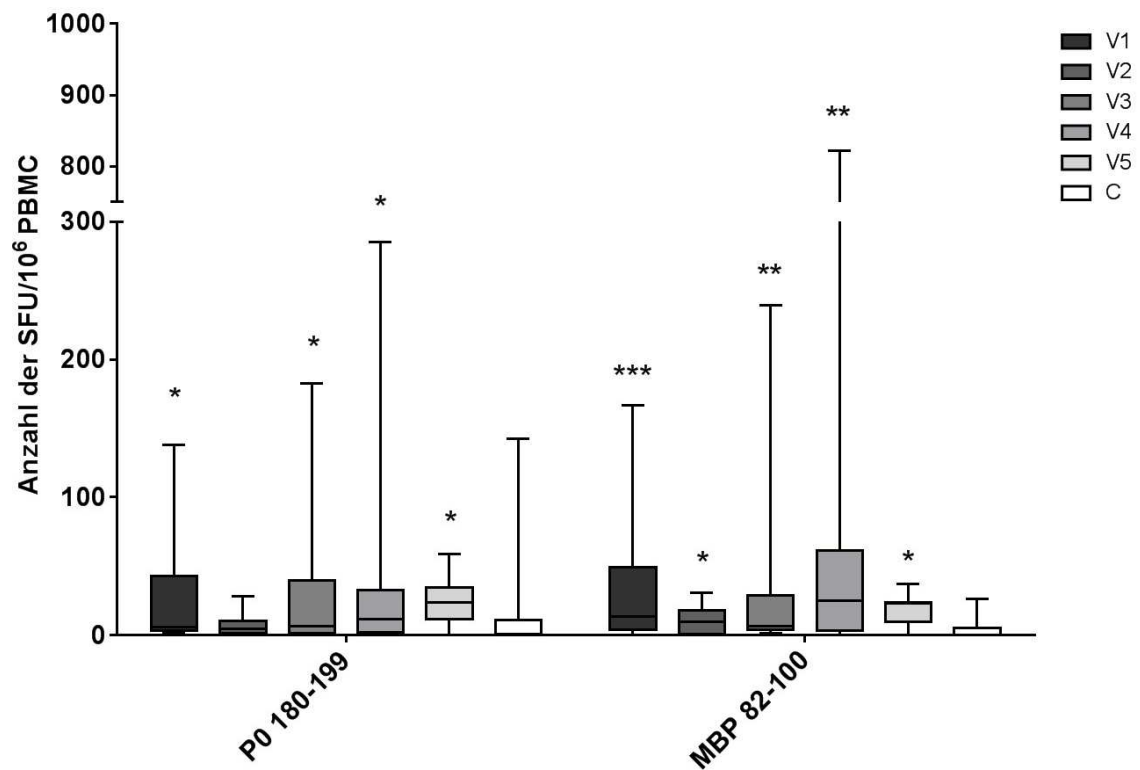


Abbildung 4.2.4: Myelinantigen-spezifische IFN- γ -Antworten auf P0 180-199 und MBP 82-100 der CIDP-Patienten im T-Zell-ELISPOT im Verlauf Visite (V)1-5 ($N_{V1}=20$, $N_{V2}=7$, $N_{V3}=13$, $N_{V4}=11$, $N_{V5}=8$). Im Vergleich zu gesunden Kontrollen (C, $N_C=14$) signifikant erhöhte SFU bei P0 180-199 (V1, V3-5) und MBP 82-100 (V1-5). Dargestellt als Box Plot and Whiskers mit Median, 25. und 75. Perzentile sowie Minimum und Maximum. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$)

4 Ergebnisse

Wie in Abb. 4.2.5 erkennbar, gibt es für die CIDP-Patienten keine signifikant unterschiedlichen CFT- und CEF-spezifischen SFU gegenüber C. Es lassen sich keine Tendenzen zur Reduktion der SFU im Verlauf von V1 auf V5 nachweisen.

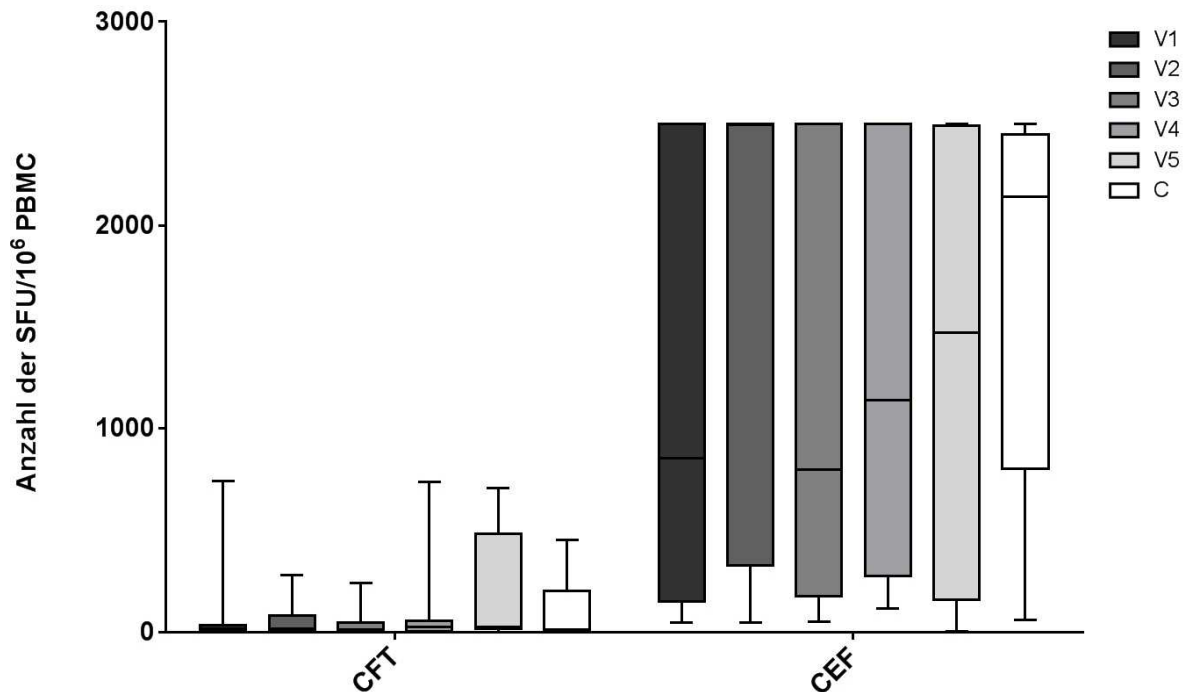


Abbildung 4.2.5: CFT- und CEF-spezifische IFN- γ -Antworten der CIDP-Patienten im T-Zell-ELISPOT im Verlauf Visite (V) 1-5 vs. gesunde Kontrollen (C). Methodisch bedingte Maximalwerte der SFU von CEF (2500). ($N_{V1}=20$, $N_{V2}=7$, $N_{V3}=13$, $N_{V4}=11$, $N_{V5}=8$, $N_C=14$). Dargestellt als Box Plot and Whiskers mit Median, 25. und 75. Perzentile sowie Minimum und Maximum.

4 Ergebnisse

In Abb. 4.2.6 ist ein direkter Vergleich der SFU von V1 und V5 dargestellt. Für jedes periphere Myelinantigen zeigen sich an V5 in der Tendenz niedrigere SFU als an V1. Dieser Trend zur Reduktion der SFU ist für PMP-22 120-133 ($p=0,28$), P2 61-70 ($p=0,09$) und MBP 82-100 ($p=0,29$) am deutlichsten.

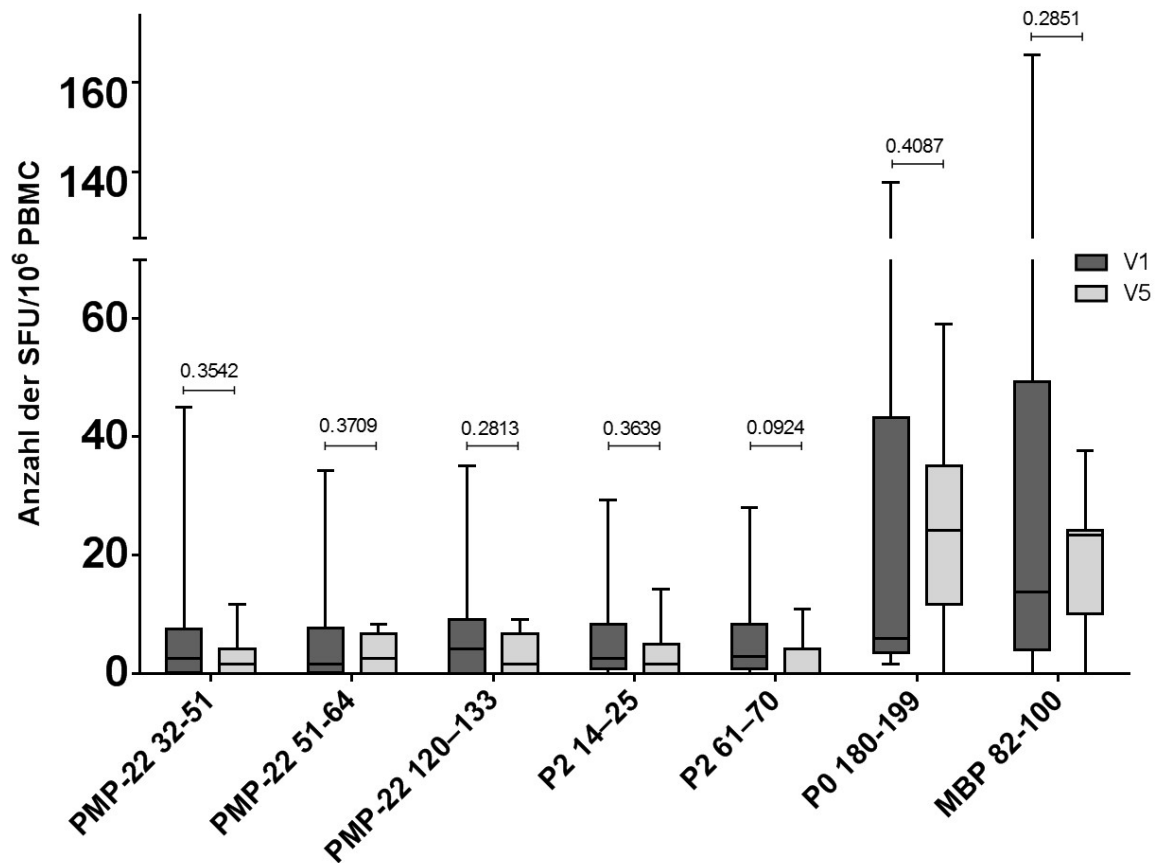


Abbildung 4.2.6: Myelinantigen-spezifische IFN- γ -Antworten der CIDP-Patienten im T-Zell-ELISPOT im Vergleich Visite (V) 1 mit V5 ($N_{V1}=20$, $N_{V5}=8$). Diese Daten sind bereits in Abb. 4.2.3 und 4.2.4 dargestellt, werden hier aber zur Übersicht erneut gezeigt. Dargestellt als Box Plot and Whiskers mit Median, 25. und 75. Perzentile sowie Minimum und Maximum.

4.2.3 Geringere Krankheitsgravität (INCAT \leq 2) geht mit höheren Myelinantigen-spezifischen T-Lymphozyten-Antworten einher

In Abb. 4.2.7 fällt beim Vergleich der Subgruppe „INCAT $>$ 2“ und „INCAT \leq 2“ zum Zeitpunkt V1 auf, dass die Gruppe der Patienten mit einer geringeren Krankheitsgravität (INCAT \leq 2) tendenziell höhere T-Lymphozyten-Antworten in der ELISPOT-Analyse aufweist, PMP-22 120-133 ($p=0,44$), P2 14-25 ($p=0,45$), P2 61-70 ($p=0,35$), P0 180-199 ($p=0,57$) und MBP 82-100 ($p=0,45$). Wie bei der gesamten Kohorte (siehe Abb. 4.2.3 und 4.2.4) sind die Antworten auf jedes Antigen auch in diesen Subgruppen gegenüber C erhöht. Für die Antigene PMP-22 51-64 ($p_{\text{INCAT}>2}$ und $p_{\text{INCAT}\leq 2}<0,05$), PMP-22 120-133 ($p_{\text{INCAT}>2}<0,05$, $p_{\text{INCAT}\leq 2}<0,01$), P2 14-25 ($p_{\text{INCAT}>2}<0,01$, $p_{\text{INCAT}\leq 2}<0,05$), P0 180-199 ($p_{\text{INCAT}>2}<0,05$) und MBP 82-100 ($p_{\text{INCAT}>2}<0,05$, $p_{\text{INCAT}\leq 2}<0,01$) sind diese Unterschiede statistisch signifikant.

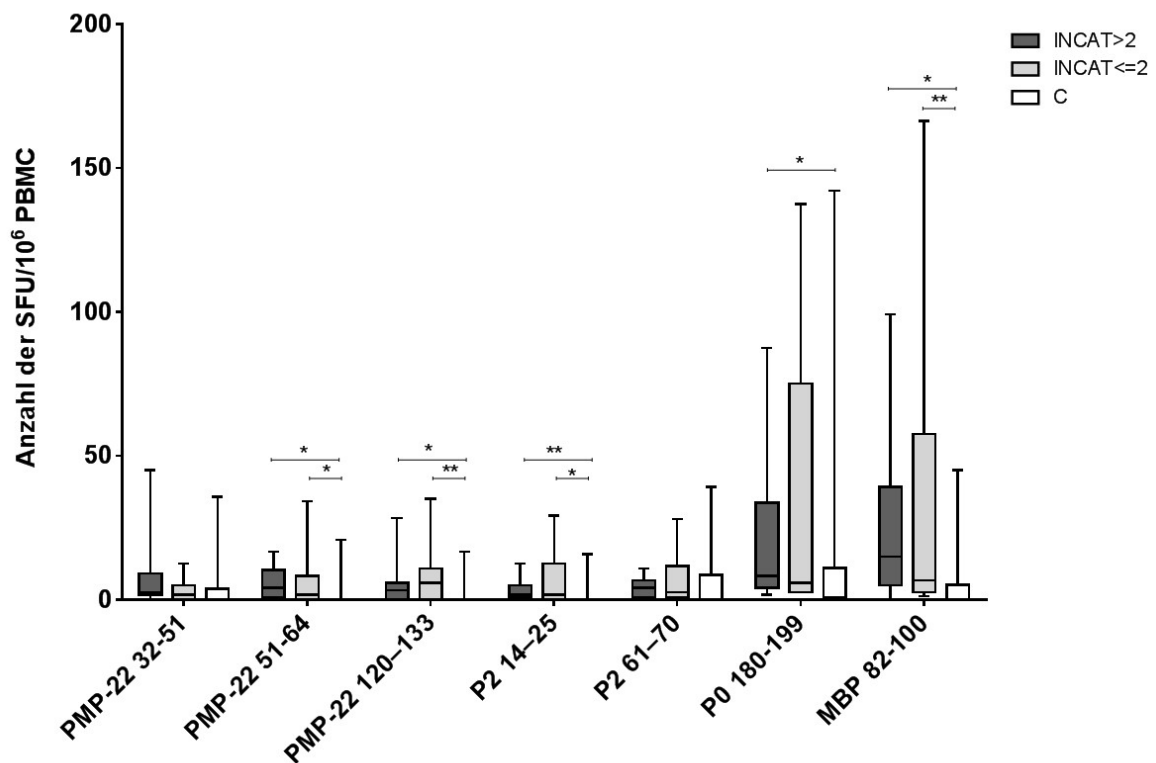


Abbildung 4.2.7: Subgruppenvergleich „INCAT $>$ 2“ (N=9) vs. „INCAT \leq 2“ (N=11) der Myelinantigen-spezifischen IFN- γ -Antworten der CIDP-Patienten im T-Zell-ELISPOT an Visite (V) 1. Im Vergleich zu gesunden Kontrollen (C, $N_C=14$) signifikant erhöhte SFU bei PMP-22 51-64, PMP-22 120-133, P2 14-25, P0 180-199 und MBP 82-100. Dargestellt als Box Plot and Whiskers mit Median, 25. und 75. Perzentile sowie Minimum und Maximum. (* $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$)

4.2.4 Höhere Myelinantigen-spezifische T-Lymphozyten-Antworten im Frühstadium der CIDP

Beim Vergleich der Patienten mit einer „Zeit seit Diagnosestellung >2 Jahren“ zu denen mit einer „Zeit seit Diagnosestellung ≤2 Jahren“ zeigen die Patienten mit einer kürzer zurückliegenden Diagnose (≤2 Jahren), die Tendenz zu höheren Antworten in der ELISPOT-Analyse. Diese Tendenz ist für die Antigene PMP-22 120-133 ($p=0,50$), P2 14-25 ($p=0,78$), P2 61-70 ($p=0,48$) und MBP 82-100 ($p=0,68$) am deutlichsten. Wie bei der gesamten Kohorte (siehe Abb. 4.2.3 und 4.2.4) sind die Antworten auf jedes Antigen auch in diesen beiden Subgruppen gegenüber C erhöht. Für die Antigene PMP-22 51-64 ($p_{>2\text{ Jahre}} < 0,05$, $p_{\leq 2\text{ Jahre}} < 0,01$), PMP-22 120-133 ($p_{>2\text{ Jahre und } \leq 2\text{ Jahre}} < 0,05$), P0 180-199 ($p_{>2\text{ Jahre und } \leq 2\text{ Jahre}} < 0,05$) und MBP 82-100 ($p_{>2\text{ Jahre und } \leq 2\text{ Jahre}} < 0,01$) sind diese Unterschiede statistisch signifikant.

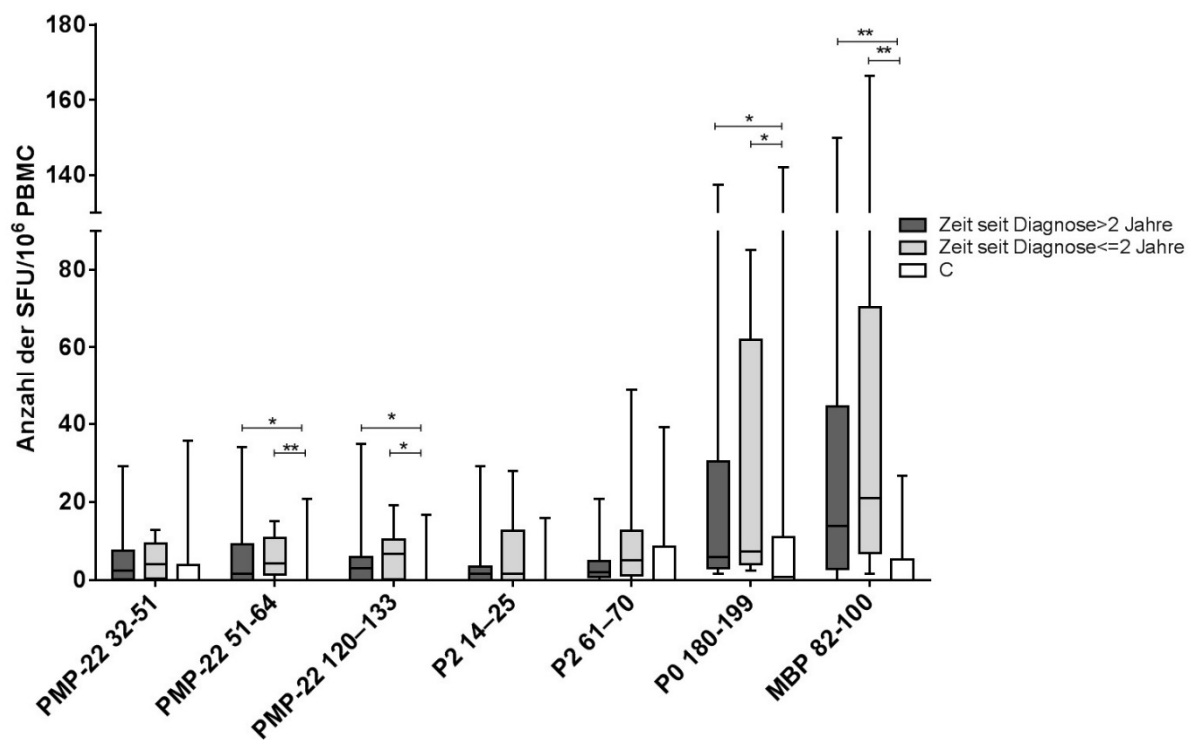


Abbildung 4.2.8: Subgruppenvergleich „Zeit seit Diagnosestellung >2 Jahre“ (N=12) vs. „Zeit seit Diagnosestellung ≤2 Jahre“ (N=8) der Myelinantigen-spezifischen IFN- γ -Antworten der CIDP-Patienten im T-Zell-ELISPOT an Visite (V) 1. Im Vergleich zu gesunden Kontrollen (C, $N_C=14$) signifikant erhöhte SFU bei PMP-22 51-64, PMP-22 120-133, P0 180-199 und MBP 82-100. Dargestellt als Box Plot and Whiskers mit Median, 25. und 75. Perzentile sowie Minimum und Maximum. (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$)

4.2.5 Patienten mit atypischen CIDP-Varianten haben höhere Myelinantigen-spezifische T-Lymphozyten-Antworten

Die Patienten wurden abhängig von der klinischen Manifestation nach den derzeit geltenden Richtlinien (EFNS 2010) einer typischen bzw. atypischen CIDP zugeordnet. Wie in Abb. 4.2.9 zu erkennen, zeigen die Patienten mit einer atypischen CIDP tendenziell höhere Antworten auf die Antigenstimulation. Dieser Unterschied ist für folgende periphere Myelinantigene deutlich (typisch vs. atypisch): PMP-22 32-51 ($p=0,0621$), PMP-22 51-64 ($p=0,1050$), PMP-22 120-133 ($p=0,1451$), P0 180-199 ($p=0,1894$) und MBP 82-100 ($p=0,1841$). Wie bei der gesamten Kohorte (siehe Abb. 4.2.3 und 4.2.4) sind die Antworten auf jedes Antigen auch in diesen Subgruppen gegenüber C erhöht. Die Unterschiede sind für PMP-22 32-51 ($p_{\text{atypisch}} < 0,05$), PMP-22 51-64 ($p_{\text{atypisch}} < 0,01$), PMP-22 120-133 ($p_{\text{typisch}} < 0,05$, $p_{\text{atypisch}} < 0,01$), P2 14-25 ($p_{\text{typisch}} < 0,05$, $p_{\text{atypisch}} < 0,01$), P0 180-199 ($p_{\text{atypisch}} < 0,05$) und MBP 82-100 ($p_{\text{atypisch}} < 0,001$) statistisch signifikant.

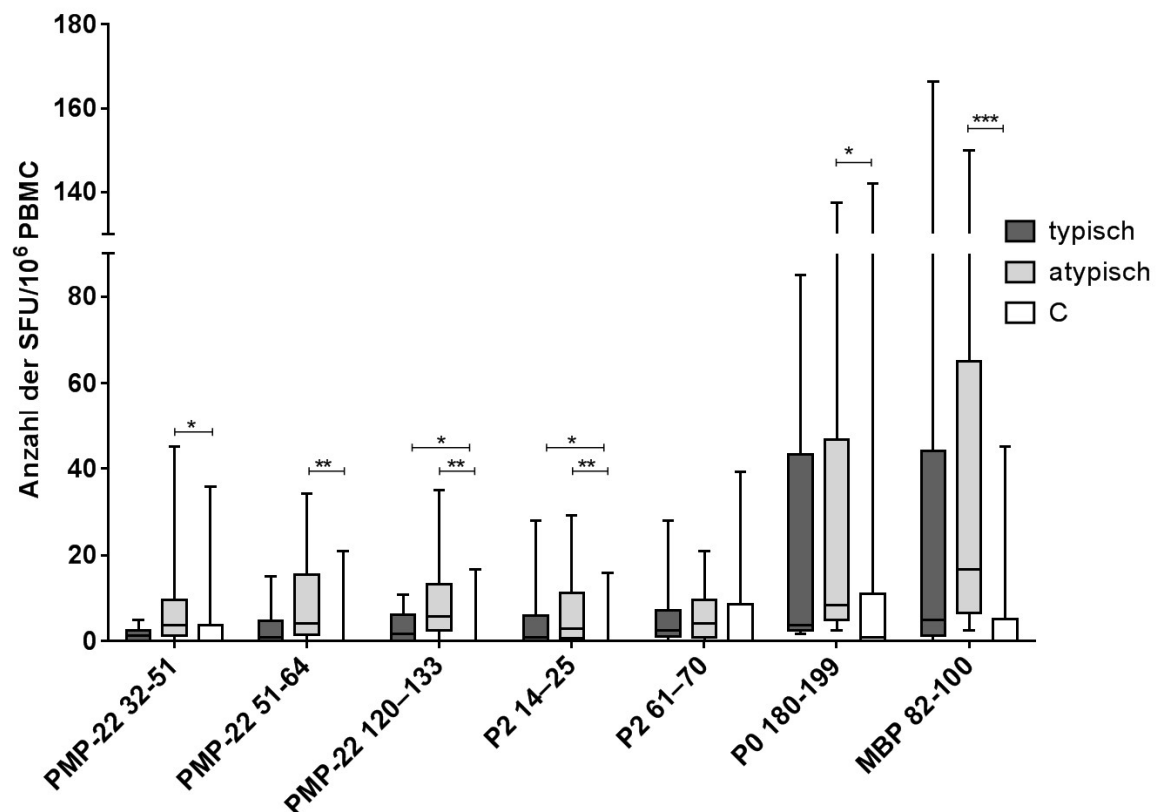


Abbildung 4.2.9: Subgruppenvergleich „typisch“ (N=8) vs. „atypisch“ (N=12) der Myelinantigen-spezifischen IFN- γ -Antworten der CIDP-Patienten im T-Zell-ELISPOT an Visite (V) 1. Im Vergleich zu gesunden Kontrollen (C, N_C=14) signifikant erhöhte SFU bei PMP-22 32-51, PMP-22 51-64, PMP-22 120-133, P2 14-25, P0 180-199 und MBP 82-100. Dargestellt als Box Plot and Whiskers mit Median, 25. und 75. Perzentile sowie Minimum und Maximum. (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$)

4.2.6 Vergleich „therapienaiv“ vs. „anbehandelt“ zeigt keine Unterschiede der Myelinantigen-spezifischen T-Lymphozyten-Antworten

Als „therapienaiv“ klassifizierten wir Patienten, die zuvor keine immunmodulatorischen oder –suppressiven Therapien erhalten hatten. Die Gruppe „anbehandelt“ enthält diejenigen Patienten, die bereits vor Einschluss in die Studie IVIG-Transfusionen oder Glukokortikoide zur Behandlung der CIDP bekommen haben.

4 Ergebnisse

In Abb. 4.2.10 stellen wir die Frequenzen Myelinantigen-spezifischer T-Lymphozyten-Antworten der therapienaiven und der anbehandelten Patienten dar. Für einige periphere Myelinantigene sind in der Gruppe der anbehandelten Patienten erhöhte Myelinantigen-spezifische IFN- γ -Antworten im peripheren Blut nachweisbar. Dieser Trend zeigt sich für folgende Antigene: PMP-22 120-133 ($p=0,5684$), P2 14-25 ($p=0,2940$), P2 61-70 ($p=0,5212$), P0 180-199 ($p=0,1618$), MBP 82-100 ($p=0,3069$). Wie bei der gesamten Kohorte (siehe Abb. 4.2.3 und 4.2.4) sind die Antworten auf jedes Antigen, hier mit Ausnahme der SFU der Therapienaiven bei P2 61-70 und P0 180-199, auch in diesen beiden Subgruppen gegenüber C erhöht. Für die Antigene PMP-22 32-51 ($p_{\text{therapienaiv}} < 0,05$), PMP-22 51-64 ($p_{\text{therapienaiv und anbehandelt}} < 0,05$), PMP-22 120-133 ($p_{\text{anbehandelt}} < 0,01$), P2 14-25 ($p_{\text{therapienaiv}} < 0,05$), P0 180-199 ($p_{\text{anbehandelt}} < 0,05$) und MBP 82-100 ($p_{\text{therapienaiv}} < 0,05$, $p_{\text{anbehandelt}} < 0,01$) sind diese Unterschiede statistisch signifikant.

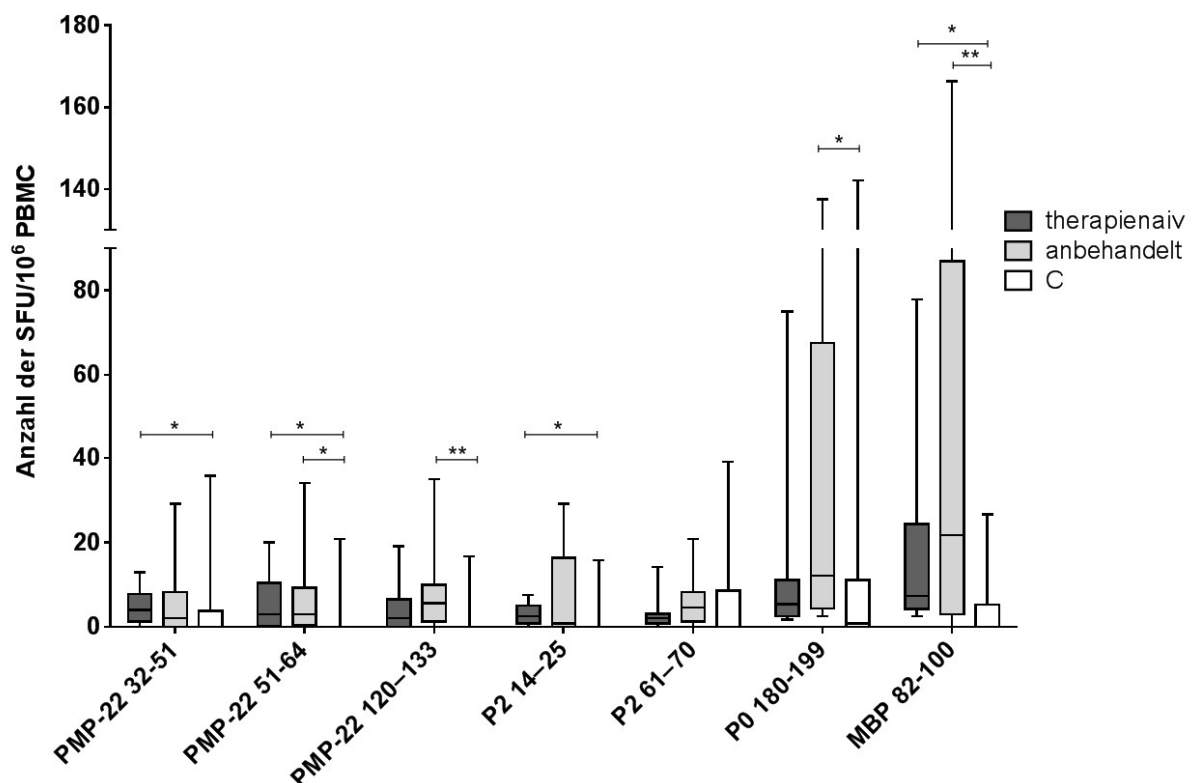


Abbildung 4.2.10: Subgruppenvergleich „therapienaiv“ (N=9) vs. „anbehandelt“ (N=11) der Myelinantigen-spezifischen IFN- γ -Antworten der CIDP-Patienten im T-Zell-ELISPOT an Visite (V) 1. Im Vergleich zu gesunden Kontrollen (C, $N_C=14$) signifikant erhöhte SFU bei PMP-22 32-51, PMP-22 51-64, PMP-22 120-133, P2 14-25, P0 180-199 und MBP 82-100. Dargestellt als Box Plot and Whiskers mit Median, 25. und 75. Perzentile sowie Minimum und Maximum. (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$)

4.3 Quantitative Analyse der Lymphozytenpopulationen im peripheren Blut

4.3.1 Unterschiede in den Frequenzen der Lymphozytenpopulationen bei CIDP-Patienten im Verlauf von 12 Monaten

Wie im Kapitel 3.2 „Patienten und gesunde Kontrollprobanden“ beschrieben, wurden über 12 Monate von 28 CIDP-Patienten und 28 gesunden Kontrollen gleicher Altersverteilung die Frequenzen der PBMC und T-Lymphozytensubpopulationen mittels FACS bestimmt. Die meisten Patienten (22/28, 78,6%) befanden sich bei Einschluss in die Studie in einem klinisch-instabilen Krankheitsstadium.

Zuerst erfolgt eine Analyse im Verlauf (V1 vs. V5 vs. C):

4 Ergebnisse

In Abb. 4.3.1 zeigen sich für die T-Lymphozyten und für die CD4+ T-Lymphozyten an V1 signifikant ($p < 0,05$) gegenüber C erhöhte Frequenzen. Die Frequenzen der T-Lymphozyten ($p = 0,0984$) und CD4+ T-Lymphozyten ($p = 0,0832$) sind tendenziell auch an V5 gegenüber C erhöht. Weitere signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) liegen beim Vergleich der gegenüber C erniedrigten Frequenzen der NK-Zellen der Kohorte an V1 und V5 vor. Im Verlauf V1 bis V5 lassen sich Trends zur Reduktion der Frequenzen für die B-Lymphozyten ($p = 0,0889$) und Lymphozyten ($p = 0,2042$) erkennen.

Eine deskriptive, statistische Beschreibung der Abb. 4.3.1 ist Tab. 4.3.1 zu entnehmen.

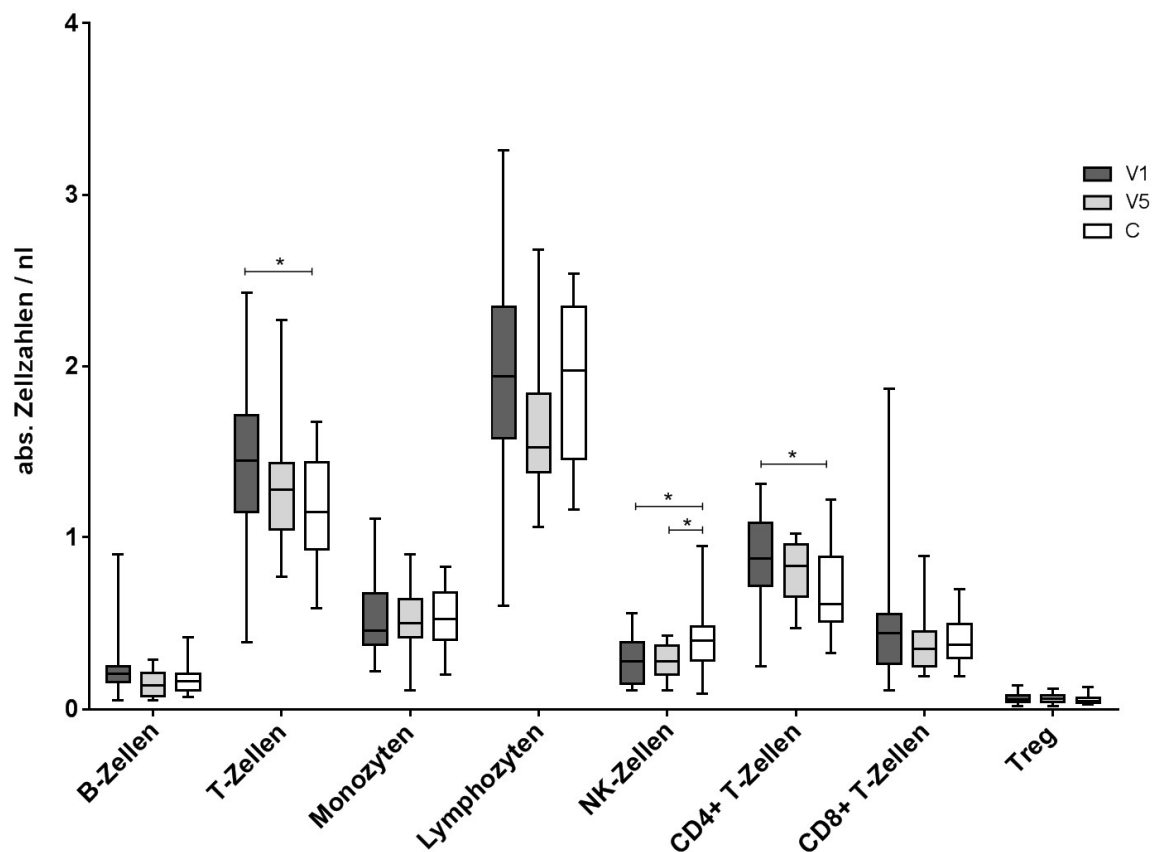


Abbildung 4.3.1: Quantitative Analyse der Lymphozytenpopulationen der CIDP-Kohorte mittels FACS an Visite (V) 1 und V5 vs. gesunde Kontrollen (C) ($N_{V1}=26$, $N_{V5}=15$, $N_C=28$). Im Vergleich zu C signifikant erhöhte Frequenzen der T-Lymphozyten an V1, CD4+ T-Lymphozyten an V1 sowie signifikant erniedrigte Frequenzen der NK-Zellen an V1 und V5. Dargestellt als Box Plot and Whiskers mit Median, 25. und 75. Perzentile sowie Minimum und Maximum. (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$)

4 Ergebnisse

Tabelle 4.3.1: Signifikanzwerte für die quantitative Analyse der Lymphozytenpopulationen an Visite (V) 1, V5 vs. gesunde Kontrollen (C). ($N_{V1}=26$, $N_{V5}=15$, $N_C=28$)

	B-Zellen	T-Zellen	Monozyten	Lymphozyten	NK-Zellen	CD4+ T-Zellen	CD8+ T-Zellen	Treg
p-Wert V1 vs. V5	0,0889	0,6062	0,9277	0,2042	0,7570	0,4817	0,5422	0,8143
p-Wert V1 vs. C	0,2181	0,0238	0,8485	0,8929	0,0136	0,0183	0,3637	0,2885
p-Wert V5 vs. C	0,4878	0,0984	0,7801	0,2356	0,0162	0,0832	0,7672	0,3523

4 Ergebnisse

In Abb. 4.3.2 sind für die CD4+ TEM an V1 ($p < 0,01$) sowie V5 ($p < 0,001$) gegenüber C erhöhte Frequenzen zu erkennen. Ebenso sind die Frequenzen der CD4+ TCM an V1 signifikant ($p < 0,01$) und an V5 tendenziell ($p = 0,0913$) gegenüber C erhöht. Für die CD4+ TEMRA lässt sich ein Trend zu gegenüber C niedrigeren Frequenzen sowohl an V1 ($p = 0,0775$) als auch an V5 ($p = 0,2251$) erkennen. Im Verlauf V1-5 zeigt sich ein Trend zur Reduktion der Frequenzen der CD4+ naiven T-Lymphozyten ($p = 0,1484$).

Eine deskriptive, statistische Beschreibung der Abb. 4.3.2 ist Tab. 4.3.2 zu entnehmen.

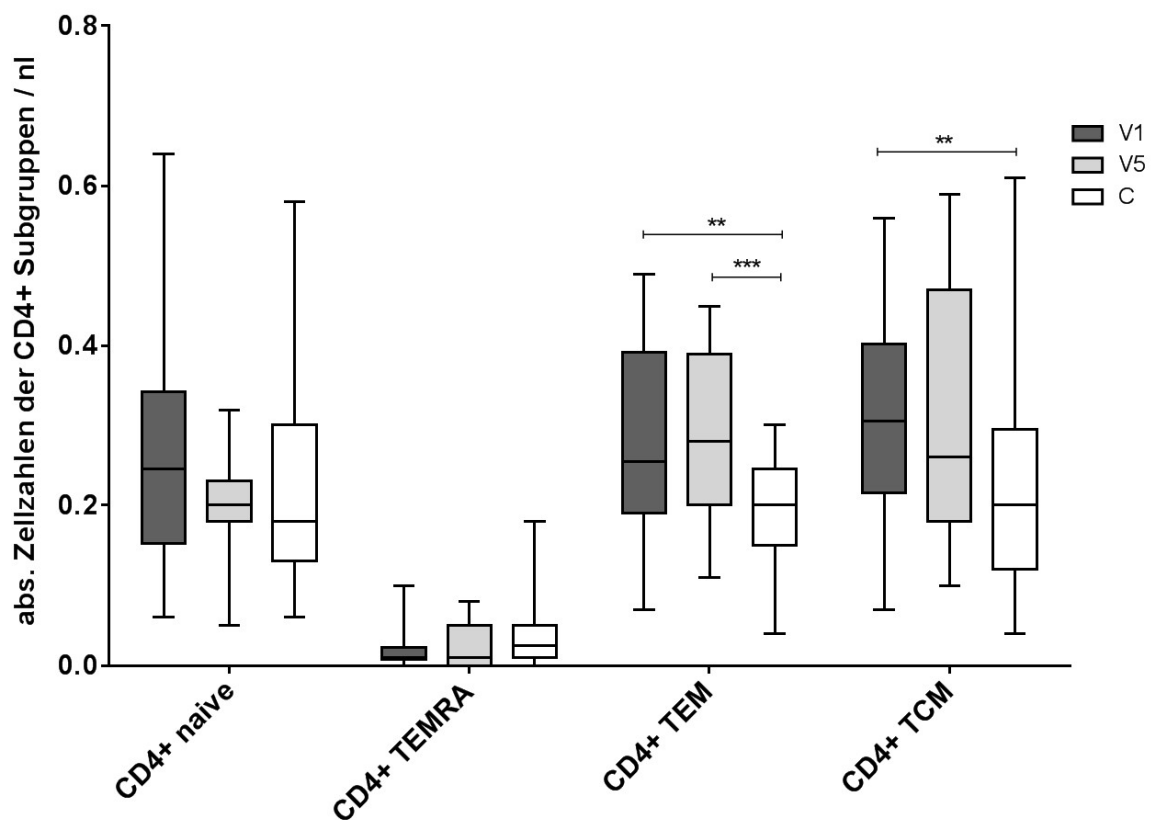


Abbildung 4.3.2: Quantitative Analyse der CD4+ Subpopulationen der CIDP-Kohorte mittels FACS an Visite (V) 1 und V5 vs. gesunde Kontrollen (C) ($N_{V1}=26$, $N_{V5}=15$, $N_C=28$). Im Vergleich zu C signifikant erhöhte Frequenzen der CD4+ TEM zu V1 und V5, CD4+ TCM zu V1. Dargestellt als Box Plot and Whiskers mit Median, 25. und 75. Perzentile sowie Minimum und Maximum. (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$)

4 Ergebnisse

In Abb. 4.3.3 zeigen sich Tendenzen zu höheren Frequenzen der Kohorte für die naiven CD8+ T-Lymphozyten an V1 ($p=0,1491$) sowie für die CD8+ TCM an V1 ($p=0,0612$) und V5 ($p=0,0718$).

Eine deskriptive, statistische Beschreibung der Abb. 4.3.3 ist Tab. 4.3.2 zu entnehmen.

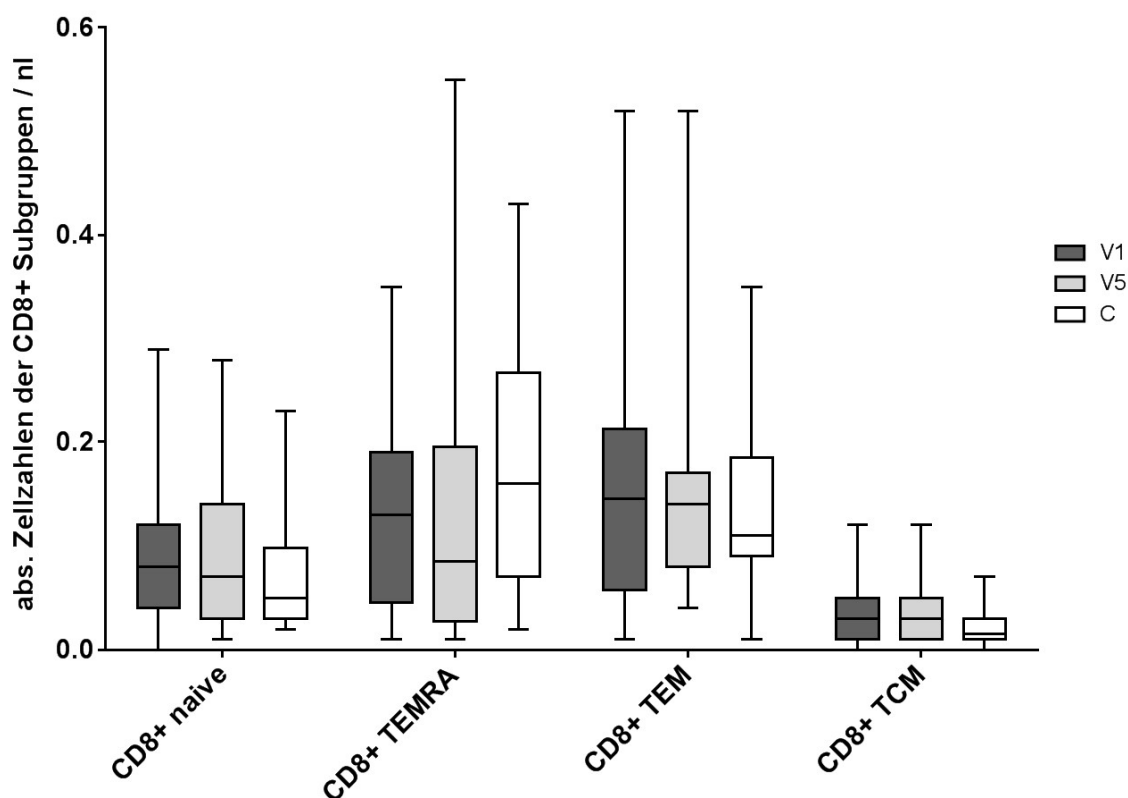


Abbildung 4.3.3: Quantitative Analyse der CD8+ Subpopulationen der CIDP-Kohorte mittels FACS an Visite (V) 1 und V5 vs. gesunde Kontrollen (C) ($N_{V1}=26$, $N_{V5}=15$, $N_C=28$). Dargestellt als Box Plot and Whiskers mit Median, 25. und 75. Perzentile sowie Minimum und Maximum.

Tabelle 4.3.2: Signifikanzwerte für die quantitative Analyse der CD4+ und CD8+ Subpopulationen an Visite (V) 1, V5 vs. gesunde Kontrollen (C). ($N_{V1}=26$, $N_{V5}=15$, $N_C=28$)

	CD4+ naive	CD4+ TEMRA	CD4+ TEM	CD4+ TCM	C8+ naive	CD8+ TEMRA	CD8+ TEM	CD8+ TCM
p-Wert V1 vs. V5	0,1484	>0,9999	0,5428	0,6930	0,6241	0,7226	0,9413	0,8865
p-Wert V1 vs. C	0,3369	0,0775	0,0049	0,0085	0,1491	0,3456	0,7341	0,0612
p-Wert V5 vs. C	0,9548	0,2251	0,0004	0,0913	0,5386	0,3933	0,6448	0,0718

4.3.2 Patienten mit geringerer Krankheitsgravidität haben signifikant erhöhte Frequenzen der naiven CD4+ T-Lymphozyten

Wie in den Abb. 4.3.4 bis 4.3.6 zu erkennen, weisen die Patienten der Subgruppe „INCAT \leq 2“ für einige Lymphozytenpopulationen höhere Frequenzen auf als die stärker betroffenen Patienten („INCAT $>$ 2“). Dieser Unterschied liegt bei den B-Lymphozyten ($p=0,3349$) als Trend vor, wohingegen die Patienten der Gruppe „INCAT $>$ 2“ tendenziell höhere Monozyten-Frequenzen aufweisen ($p=0,2638$). Im Vergleich zu C konnten wir signifikant ($p<0,05$) erhöhte Frequenzen der B-Lymphozyten und CD4+ T-Lymphozyten in der Subgruppe „INCAT \leq 2“ zeigen. In der Subgruppe „INCAT $>$ 2“ waren die Frequenzen der Monozyten gegenüber C signifikant ($p<0,05$) erhöht.

Eine deskriptive, statistische Beschreibung der Abb. 4.3.4 ist Tab. 4.3.3 zu entnehmen.

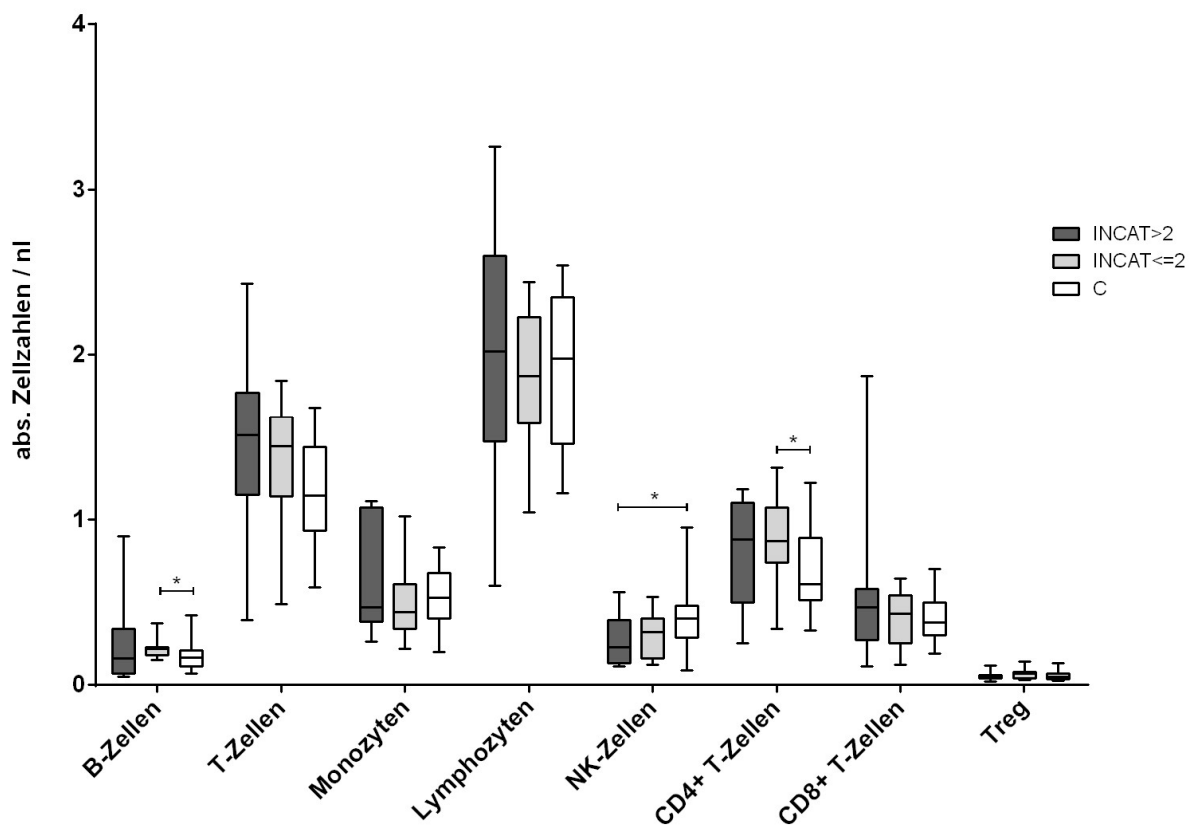


Abbildung 4.3.4: Quantitative Analyse der Lymphozytenpopulationen der Subgruppe „INCAT $>$ 2/ \leq 2“ vs. gesunde Kontrollen (C) an Visite (V) 1 mittels FACS ($N_{INCAT>2}=13$, $N_{INCAT\leq 2}=13$, $N_C=28$). Im Vergleich zu C signifikant erhöhte Frequenzen bei „INCAT $>$ 2“ für die NK-Zellen sowie signifikant erhöhte Frequenzen bei „INCAT \leq 2“ für die B-Lymphozyten, CD4+ T-Lymphozyten. Dargestellt als Box Plot and Whiskers mit Median, 25. und 75. Perzentile sowie Minimum und Maximum. (* $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$)

4 Ergebnisse

Tabelle 4.3.3: Signifikanzwerte für die quantitative Analyse der Lymphozytenpopulationen aus dem Subgruppenvergleich „INCAT>2/≤2“ vs. gesunde Kontrollen (C) an Visite (V) 1. ($N_{INCAT>2}=13$, $N_{INCAT≤2}=13$, $N_C=28$)

	B-Zellen	T-Zellen	Monozyten	Lymphozyten	NK-Zellen	CD4+ T-Zellen	CD8+ T-Zellen	Treg
p-Wert INCAT>2 vs. INCAT≤2	0,3349	0,6880	0,2638	0,7008	0,5544	0,4499	0,5830	0,4346
p-Wert INCAT>2 vs. C	0,2333	0,0875	0,3022	0,7101	0,0328	0,2003	0,1506	0,7431
p-Wert INCAT≤2 vs. C	0,0372	0,0561	0,3228	0,8685	0,0621	0,0110	0,8354	0,1846

4 Ergebnisse

In Abb. 4.3.5 zeigen sich für die Subgruppe „INCAT \leq 2“ gegenüber „INCAT $>$ 2“ signifikant ($p < 0,05$) erhöhte Frequenzen der CD4+ naiven T-Lymphozyten, wohingegen in der Subgruppe „INCAT $>$ 2“ die Frequenzen der CD4+ TEMRA tendenziell ($p = 0,3163$) erhöht sind. Auch im Vergleich zu C zeigt die Subgruppe „INCAT \leq 2“ eine Tendenz zu niedrigeren CD4+ TEMRA Frequenzen ($p = 0,0595$). Gegenüber C sind die Frequenzen der CD4+ TEM in beiden Subgruppen ($p < 0,05$) sowie die Frequenzen der CD4+ TCM bei der Subgruppe „INCAT \leq 2“ ($p < 0,01$) signifikant erhöht.

Eine deskriptive, statistische Beschreibung der Abb. 4.3.5 ist Tab. 4.3.4 zu entnehmen.

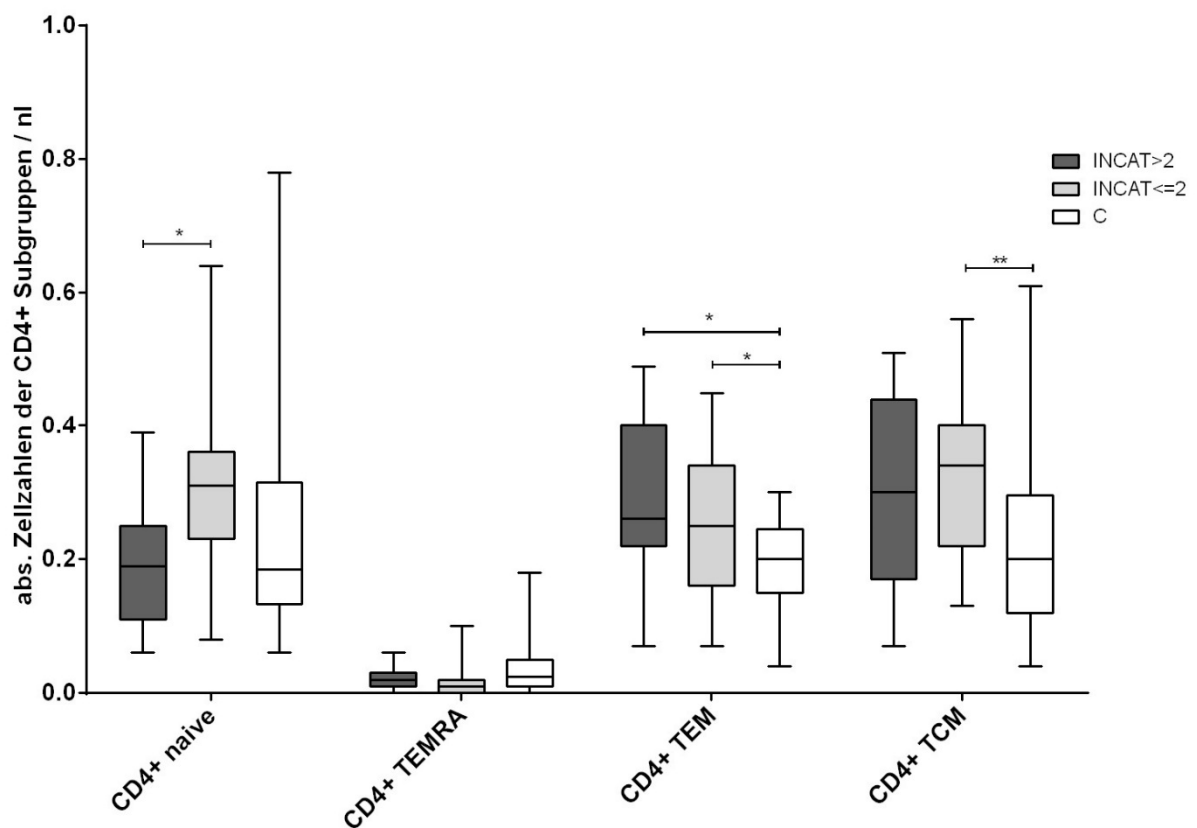


Abbildung 4.3.5: Quantitative Analyse der CD4+ Subpopulationen der Subgruppe „INCAT $>$ 2/ \leq 2“ vs. gesunde Kontrollen (C) an Visite (V) 1 mittels FACS ($N_{\text{INCAT}>2}=13$, $N_{\text{INCAT}\leq 2}=13$, $N_C=28$). Im Vergleich zu C signifikant erhöhte Frequenzen bei „INCAT $>$ 2“ für CD4+ TEM sowie signifikant erhöhte Frequenzen bei „INCAT \leq 2“ für CD4+ TEM und CD4+ TCM. Signifikant erhöhte Frequenzen der CD4+ naiven T-Lymphozyten bei „INCAT \leq 2“ im Vergleich zu „INCAT $>$ 2“. Dargestellt als Box Plot and Whiskers mit Median, 25. und 75. Perzentile sowie Minimum und Maximum. (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$)

4 Ergebnisse

Wie in Abb. 4.3.6 erkenntlich, zeigen sich für die Subgruppe „INCAT \leq 2“ gegenüber „INCAT $>$ 2“ signifikant ($p < 0,05$) erhöhte Frequenzen der CD8+ naiven T-Lymphozyten. Die Patienten der Subgruppe „INCAT $>$ 2“ zeigen Tendenzen zu gegenüber der Gruppe „INCAT \leq 2“ erhöhten CD8+ TEMRA Frequenzen ($p = 0,0624$). Im Vergleich zu C zeigt die Subgruppe „INCAT \leq 2“ signifikant erhöhte Frequenzen der CD8+ naiven T-Lymphozyten ($p < 0,01$) und CD8+ TCM ($p < 0,05$), wohingegen C deutlich höhere Frequenzen der CD8+ TEMRA gegenüber der Subgruppe „INCAT \leq 2“ aufweisen ($p = 0,0528$).

Eine deskriptive, statistische Beschreibung der Abb. 4.3.6 ist Tab. 4.3.4 zu entnehmen.

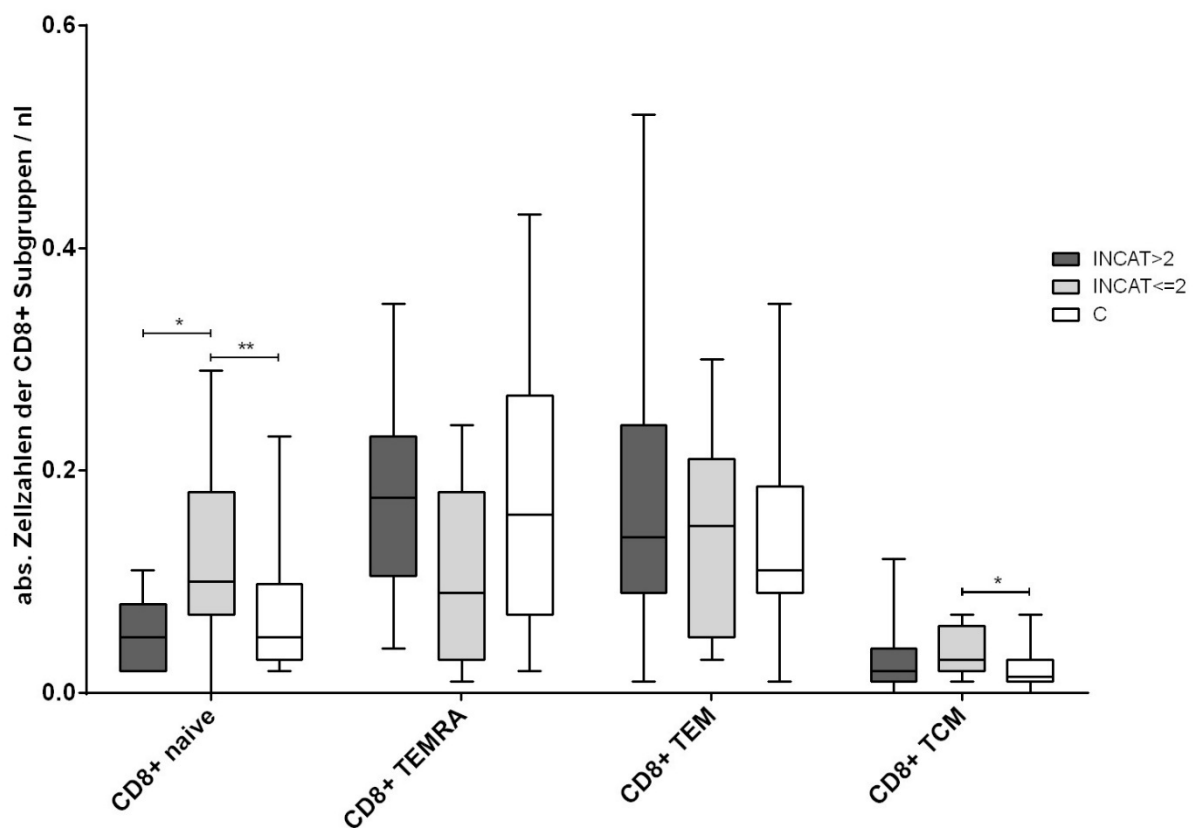


Abbildung 4.3.6: Quantitative Analyse der CD8+ Subpopulationen der Subgruppe „INCAT $>$ 2/ \leq 2“ vs. gesunde Kontrollen (C) an Visite (V) 1 mittels FACS ($N_{\text{INCAT}>2}=13$, $N_{\text{INCAT}\leq 2}=13$, $N_C=28$). Im Vergleich zu C signifikant erhöhte Frequenzen bei „INCAT \leq 2“ für CD8+ naive T-Lymphozyten und CD8+ TCM. Signifikant erhöhte Frequenzen der CD8+ naiven T-Lymphozyten bei „INCAT \leq 2“ im Vergleich zu „INCAT $>$ 2“. Dargestellt als Box Plot and Whiskers mit Median, 25. und 75. Perzentile sowie Minimum und Maximum. (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$)

4 Ergebnisse

Tabelle 4.3.4: Signifikanzwerte für die quantitative Analyse der CD4+ und CD8+ Subpopulationen aus dem Subgruppenvergleich „INCAT>2/≤2“ vs. gesunde Kontrollen (C) an Visite (V) 1. (N_{INCAT>2}=13, N_{INCAT≤2}=13, N_C=28)

	CD4+ naive	CD4+ TEMRA	CD4+ TEM	CD4+ TCM	C8+ naive	CD8+ TEMRA	CD8+ TEM	CD8+ TCM
p-Wert INCAT>2 vs. INCAT≤2	0,0472	0,3163	0,4076	0,6519	0,0156	0,0624	0,3939	0,3436
p-Wert INCAT>2 vs. C	0,4260	0,2571	0,0223	0,1252	0,4232	0,1504	0,3293	0,3142
p-Wert INCAT≤2 vs. C	0,0841	0,0595	0,0289	0,0090	0,0089	0,0528	0,9565	0,0341

4.3.3 Erhöhte Frequenzen der CD4+ und CD8+ Memory T-Lymphozyten im Frühstadium der Erkrankung

Wie in den Abb. 4.3.7 bis 4.3.9 zu erkennen, weisen die Patienten der Subgruppe „Zeit seit Diagnosestellung ≤2 Jahre“ gegenüber der Vergleichsgruppe mit einer längeren Krankheitsdauer (>2 Jahre) für einige Zelllinien tendenziell erhöhte Frequenzen auf. In Abb. 4.3.7 zeigt die Gruppe mit einer kürzer zurückliegenden Diagnose (≤2 Jahre) im Vergleich zu der Gruppe „Zeit seit Diagnosestellung >2 Jahre“ für B-Lymphozyten (p=0,1445), Lymphozyten (p=0,2796), CD4+ (p=0,2633) und CD8+ T-Lymphozyten (p=0,2051) tendenziell erhöhte Frequenzen. Die Patienten aus der Subgruppe „Zeit seit Diagnosestellung >2 Jahre“ zeigen gegenüber denen mit einer kürzeren Krankheitsdauer (≤2 Jahre) für Monozyten signifikant (p<0,05) erhöhte Werte. Im Vergleich zu C können wir in der Subgruppe „Zeit seit Diagnosestellung >2 Jahre“ für die NK-Zellen signifikant (p<0,05) erniedrigte und für die T-Lymphozyten (p=0,2182) sowie CD4+ T-Lymphozyten (p=0,1512) tendenziell erhöhte Frequenzen messen. In der Gruppe „Zeit seit Diagnosestellung ≤2 Jahre“ liegen gegenüber C signifikant erhöhte Frequenzen der B-Lymphozyten (p<0,05), T-Lymphozyten (p<0,05) und CD4+ T-Lymphozyten (p<0,01) sowie tendenziell erhöhte Werte für die CD8+ T-Lymphozyten (p=0,1031) vor. Tendenzen zu niedrigeren Frequenzen gegenüber C können wir für diese Subgruppe bei den Monozyten (p=0,0541) und NK-Zellen (p=0,0683) zeigen.

Eine deskriptive, statistische Beschreibung der Abb. 4.3.7 ist Tab. 4.3.5 zu entnehmen.

4 Ergebnisse

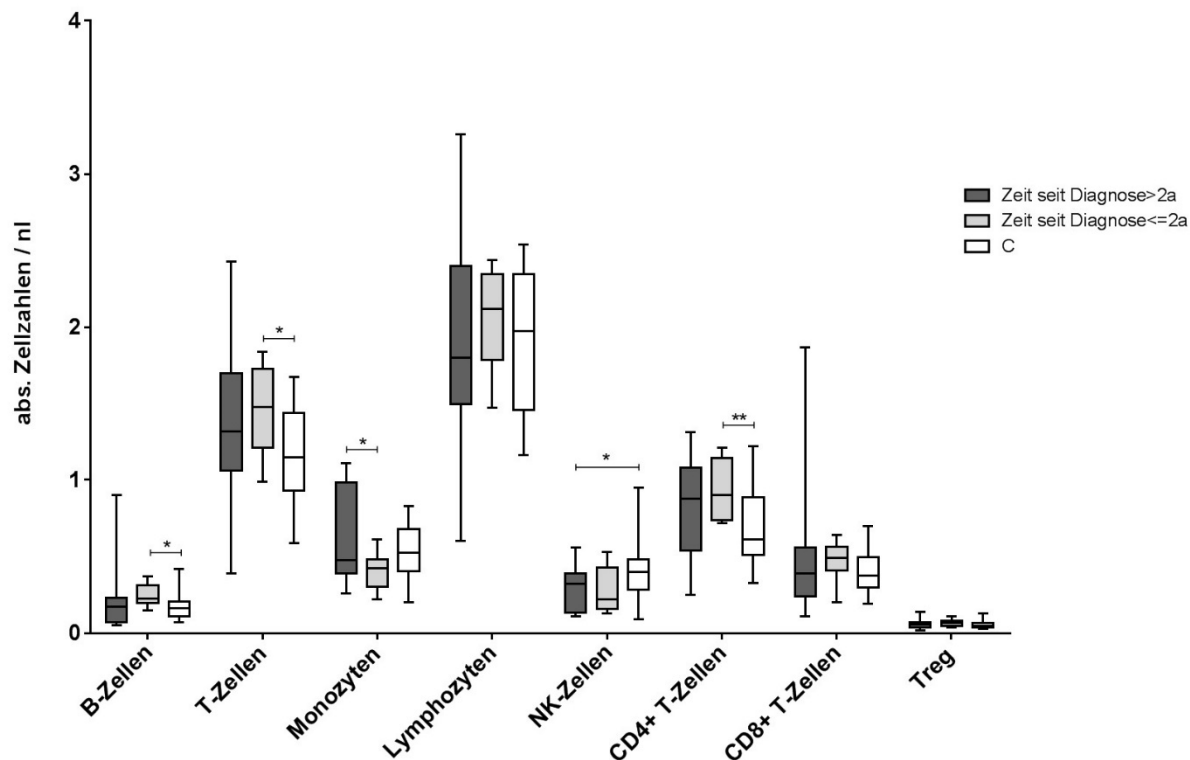


Abbildung 4.3.7: Quantitative Analyse der Lymphozytenpopulationen der Subgruppe „Zeit seit Diagnosestellung>2 Jahre/≤2 Jahre“ vs. gesunde Kontrollen (C) an Visite (V) 1 mittels FACS. ($N_{>2 \text{ Jahre}}=16$, $N_{\leq 2 \text{ Jahre}}=10$, $N_C=28$). Im Subgruppenvergleich signifikant erhöhte Frequenzen der Monozyten in der Gruppe „Zeit seit Diagnosestellung>2 Jahre“. Im Vergleich zu C signifikant erniedrigte Frequenzen bei „Zeit seit Diagnosestellung>2 Jahre“ für NK-Zellen. Bei „Zeit seit Diagnosestellung≤2 Jahre“ signifikant erhöhte Werte für B-Lymphozyten, T-Lymphozyten und CD4+ T-Lymphozyten. Dargestellt als Box Plot and Whiskers mit Median, 25. und 75. Perzentile sowie Minimum und Maximum. (* $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$)

Tabelle 4.3.5: Signifikanzwerte für die quantitative Analyse der Lymphozytenpopulationen aus dem Subgruppenvergleich „Zeit seit Diagnosestellung>2/≤2 Jahre“ vs. gesunde Kontrollen (C) an Visite (V) 1. ($N_{>2 \text{ Jahre}}=16$, $N_{\leq 2 \text{ Jahre}}=10$, $N_C=28$)

	B-Zellen	T-Zellen	Monozyten	Lymphozyten	NK-Zellen	CD4+ T-Zellen	CD8+ T-Zellen	Treg
p-Wert >2 Jahre vs. ≤2 Jahre	0,1445	0,4241	0,0345	0,2796	0,8476	0,2633	0,2051	0,4432
p-Wert >2 Jahre vs C	0,3069	0,2182	0,2533	0,7034	0,0455	0,1512	0,5298	0,5739
p-Wert ≤2 Jahre vs. C	0,0189	0,0116	0,0541	0,4196	0,0683	0,0060	0,1031	0,1531

4 Ergebnisse

Wie in Abb. 4.3.8 zu erkennen, sind die Frequenzen im Subgruppenvergleich für die Patienten mit einer „Zeit seit Diagnosestellung ≤ 2 Jahre“ für die CD4+ naiven T-Lymphozyten signifikant ($p < 0,05$) erhöht. Im Vergleich zu C sind die Frequenzen in der Subgruppe „Zeit seit Diagnosestellung > 2 Jahre“ bei den CD4+ TEM und CD4+ TCM signifikant ($p < 0,05$) erhöht. In der Subgruppe „Zeit seit Diagnosestellung ≤ 2 Jahre“ sind die Frequenzen der CD4+ naiven T-Lymphozyten ($p < 0,05$), CD4+ TEM ($p < 0,001$) und CD4+ TCM ($p < 0,05$) signifikant gegenüber C erhöht.

Eine deskriptive, statistische Beschreibung der Abb. 4.3.8 ist Tab. 4.3.6 zu entnehmen.

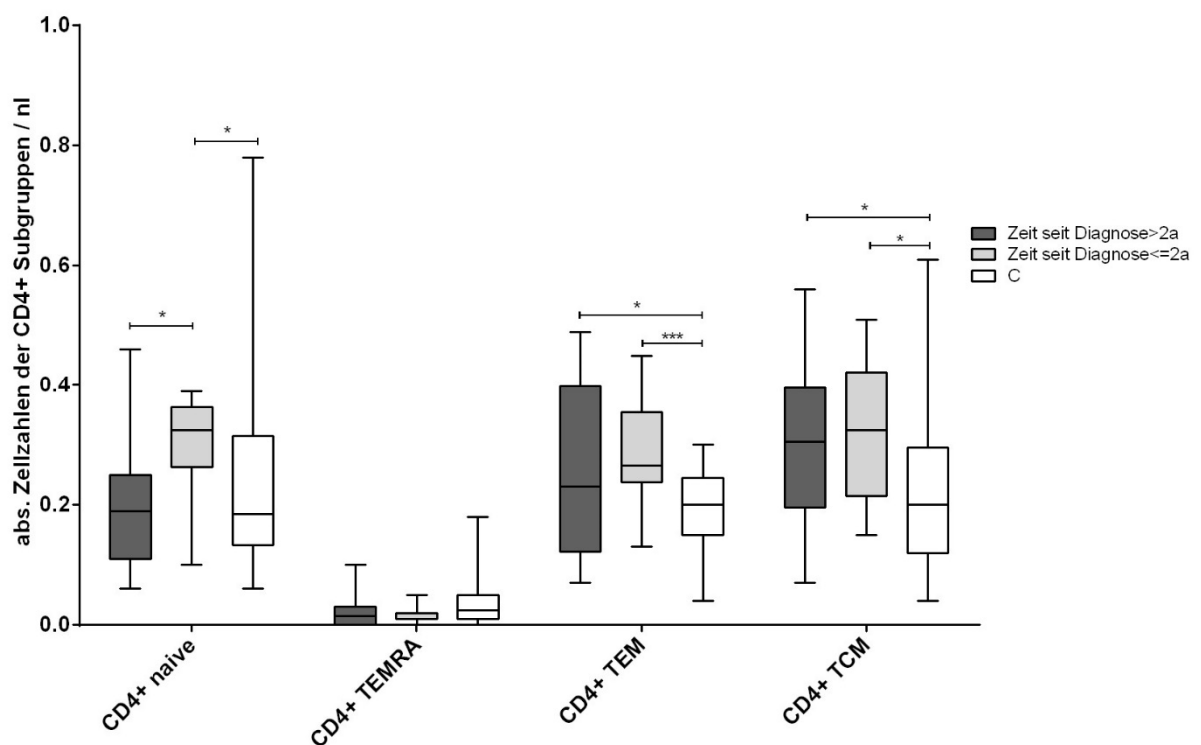


Abbildung 4.3.8: Quantitative Analyse der CD4+ Subpopulationen der Subgruppe „Zeit seit Diagnosestellung > 2 Jahre/ ≤ 2 Jahre“ vs. gesunde Kontrollen (C) an Visite (V) 1 mittels FACS. ($N_{>2 \text{ Jahre}}=16$, $N_{\leq 2 \text{ Jahre}}=10$, $N_C=28$). Im Subgruppenvergleich signifikant erhöhte Frequenzen der CD4+ naiven T-Lymphozyten in der Gruppe „Zeit seit Diagnosestellung ≤ 2 Jahre“. Im Vergleich zu C für die Patienten mit einer „Zeit seit Diagnosestellung > 2 Jahre“ signifikant erhöhte Werte für CD4+ TEM und CD4+ TCM. Für die Gruppe „Zeit seit Diagnosestellung ≤ 2 Jahre“ gegenüber C signifikant erhöhte Frequenzen der CD4+ naiven T-Lymphozyten, CD4+ TEM und CD4+ TCM. Dargestellt als Box Plot and Whiskers mit Median, 25. und 75. Perzentile sowie Minimum und Maximum. (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$)

4 Ergebnisse

In Abb. 4.3.9 zeigt die Gruppe mit einer kürzer zurückliegenden Diagnose (≤ 2 Jahre) im Subgruppenvergleich für die CD8+ naiven T-Lymphozyten ($p < 0,01$) und CD8+ TCM ($p < 0,05$) signifikant erhöhte Frequenzen. Im Vergleich zu C liegen in der Gruppe „Zeit seit Diagnosestellung ≤ 2 Jahre“ für die CD8+ naiven T-Lymphozyten ($p < 0,01$) und CD8+ TCM ($p < 0,05$) signifikant erhöhte Werte vor.

Eine deskriptive, statistische Beschreibung der Abb. 4.3.9 ist Tab. 4.3.6 zu entnehmen.

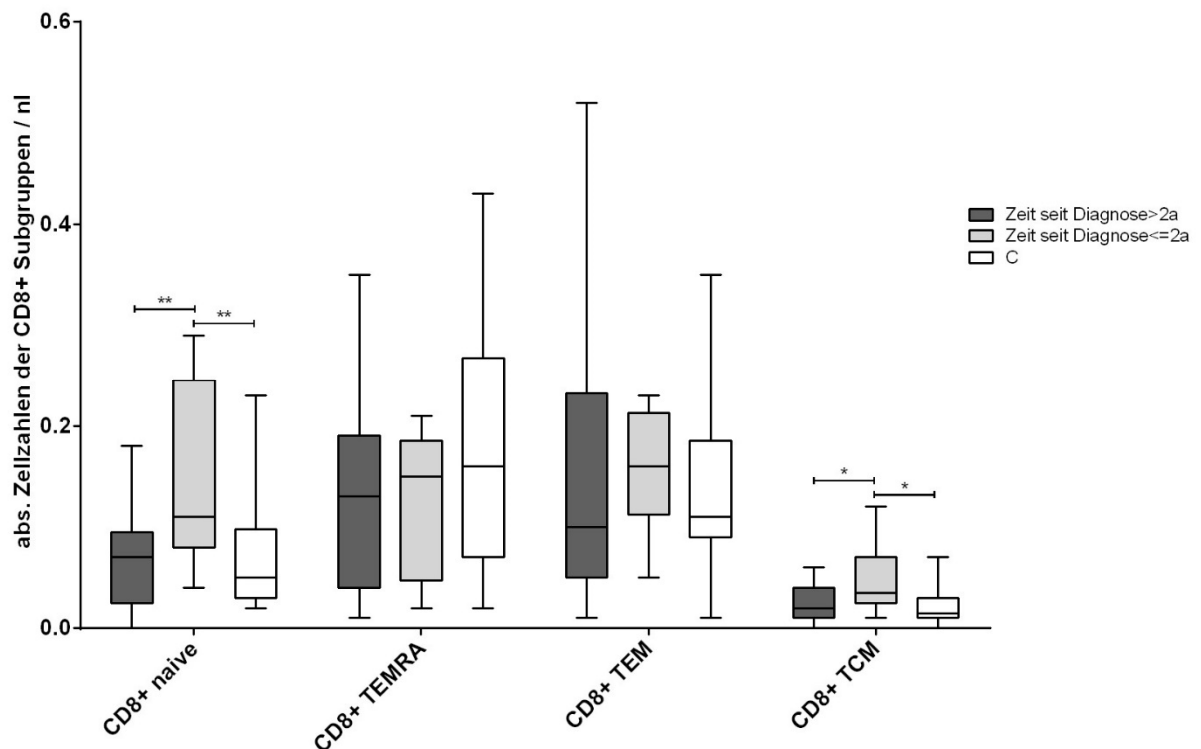


Abbildung 4.3.9: Quantitative Analyse der CD8+ Subpopulationen der Subgruppe „Zeit seit Diagnosestellung > 2 Jahre/ ≤ 2 Jahre“ vs. gesunde Kontrollen (C) an Visite (V) 1 mittels FACS. ($N_{> 2 \text{ Jahre}}=16$, $N_{\leq 2 \text{ Jahre}}=10$, $N_C=28$). Im Subgruppenvergleich signifikant erhöhte Frequenzen der CD8+ naiven T-Lymphozyten und CD8+ TCM in der Gruppe „Zeit seit Diagnosestellung ≤ 2 Jahre“. Im Vergleich zu C für die Patienten mit einer „Zeit seit Diagnosestellung ≤ 2 Jahre“ signifikant erhöhte Werte für CD8+ naive T-Lymphozyten und CD8+ TCM. Dargestellt als Box Plot and Whiskers mit Median, 25. und 75. Perzentile sowie Minimum und Maximum. (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$)

4 Ergebnisse

Tabelle 4.3.6: Signifikanzwerte für die quantitative Analyse der CD4+ und CD8+ Subpopulationen aus dem Subgruppenvergleich „Zeit seit Diagnosestellung >2/≤2 Jahre“ vs. gesunde Kontrollen (C) an Visite (V) 1. (N_{>2 Jahre}=16, N_{≤2 Jahre}=10, N_C=28)

	CD4+ naive	CD4+ TEMRA	CD4+ TEM	CD4+ TCM	C8+ naive	CD8+ TEMRA	CD8+ TEM	CD8+ TCM
p-Wert >2 Jahre vs. ≤2 Jahre	0,0162	0,4149	0,4127	0,7001	0,0064	0,3862	0,3286	0,0490
p-Wert >2 Jahre vs C	0,7696	0,1819	0,0347	0,0451	0,8254	0,5184	0,6944	0,3426
p-Wert ≤2 Jahre vs. C	0,0314	0,1234	0,0009	0,0218	0,0038	0,2348	0,2328	0,0207

4.3.4 **Atypische CIDP-Varianten weisen signifikant höhere Frequenzen der CD4+ T-Lymphozyten auf, vor allem Memory T-Lymphozyten**

In den Abb. 4.3.10 bis 4.3.12 zeigen die Patienten mit einer atypischen CIDP gegenüber den Patienten mit einer typischen CIDP für einige Lymphozytenpopulationen erhöhte Frequenzen. So ist in Abb. 4.3.10 zu erkennen, dass die Subgruppe „atypische CIDP“ für T-Lymphozyten ($p < 0,01$), Monozyten ($p < 0,05$), Lymphozyten ($p < 0,05$), CD4+ T-Lymphozyten ($p < 0,001$) und TREG ($p < 0,01$) signifikant erhöhte Frequenzen gegenüber den Patienten mit einer typischen CIDP aufweist. Dieser Trend besteht auch bei den B-Lymphozyten ($p = 0,2102$). Im Vergleich zu C können wir in der Gruppe „atypische CIDP“ signifikant erhöhte Frequenzen der T-Lymphozyten, CD4+ T-Lymphozyten ($p < 0,001$) und der TREG ($p > 0,05$) sowie tendenziell erhöhte Frequenzen für die B-Lymphozyten ($p = 0,0917$), CD8+ T-Lymphozyten ($p = 0,1816$) und Lymphozyten ($p = 0,2247$) erheben. Im Gegensatz dazu sind die Frequenzen der NK-Zellen in der Gruppe „atypische CIDP“ gegenüber C tendenziell erniedrigt ($p = 0,0597$). Ebenso sind die Frequenzen der NK-Zellen in der Gruppe der Patienten mit einer typischen CIDP signifikant ($p < 0,05$) gegenüber C erniedrigt. Tendenzen zu niedrigeren Frequenzen gegenüber C können wir in der Gruppe „typische CIDP“ für die Lymphozyten ($p = 0,1319$) und TREG ($p = 0,2337$) zeigen.

Eine deskriptive, statistische Beschreibung der Abb. 4.3.10 ist Tab. 4.3.7 zu entnehmen.

4 Ergebnisse

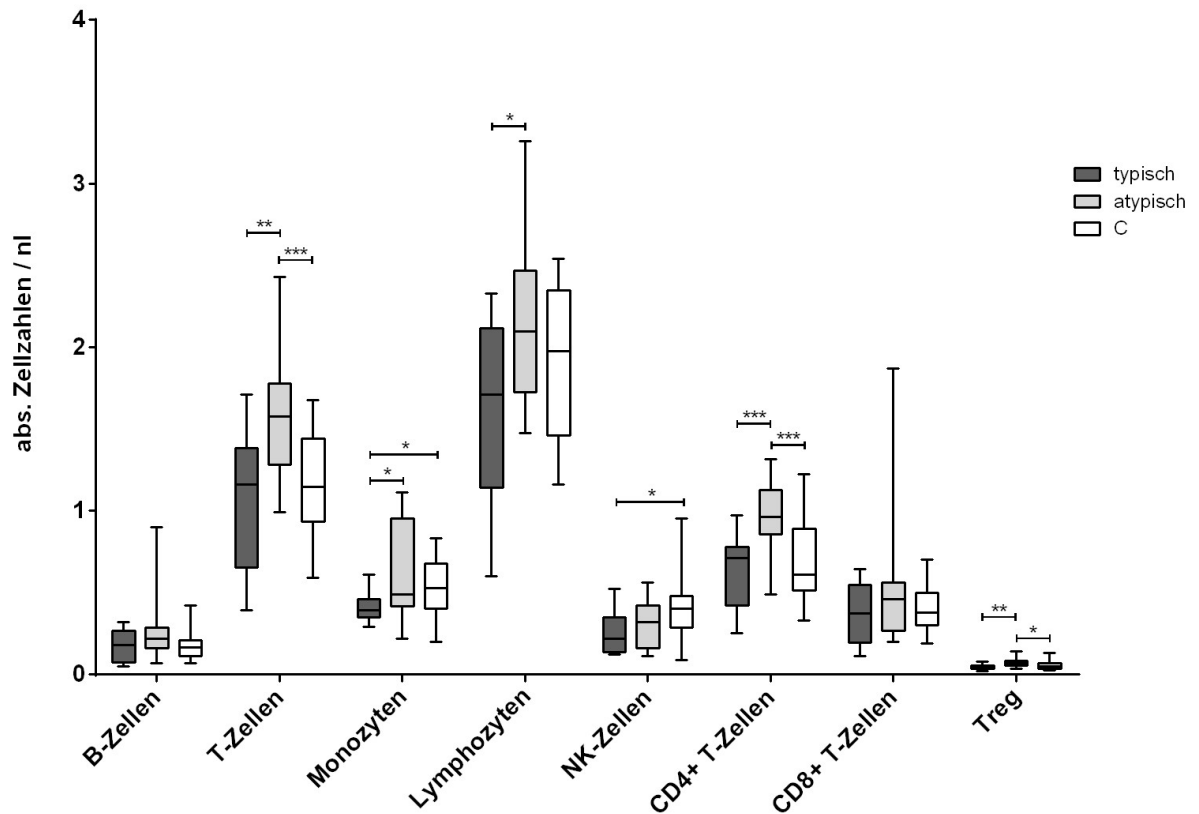


Abbildung 4.3.10: Quantitative Analyse der Lymphozytenpopulationen der Subgruppe „typisch/atypisch“ vs. gesunde Kontrollen (C) an Visite (V) 1 mittels FACS. ($N_{\text{typisch}}=9$, $N_{\text{atypisch}}=17$, $N_{\text{C}}=28$). Im Subgruppenvergleich signifikant erhöhte Frequenzen in der Gruppe „atypische CIDP“ für T-Lymphozyten, Monozyten, Lymphozyten, CD4+ T Lymphozyten und TREG. Im Vergleich zu C signifikant erhöhte Frequenzen für T-Lymphozyten, CD4+ T-Lymphozyten und TREG bei „atypisch“. Signifikant erniedrigte Frequenzen gegenüber C bei der Subgruppe „typische CIDP“ für Monozyten und NK-Zellen. Dargestellt als Box Plot and Whiskers mit Median, 25. und 75. Perzentile sowie Minimum und Maximum. (* $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$)

Tabelle 4.3.7: Signifikanzwerte für die quantitative Analyse der Lymphozytenpopulationen aus dem Subgruppenvergleich „typisch/atypisch“ vs. gesunde Kontrollen (C) an Visite (V) 1. ($N_{\text{typisch}}=9$, $N_{\text{atypisch}}=17$, $N_{\text{C}}=28$)

	B-Zellen	T-Zellen	Monozyten	Lymphozyten	NK-Zellen	CD4+ T-Zellen	CD8+ T-Zellen	Treg
p-Wert typisch vs. atypisch	0,2102	0,0062	0,0493	0,0226	0,3880	0,0007	0,3504	0,0054
p-Wert typisch vs. C	0,9467	0,4270	0,0328	0,1319	0,0393	0,5480	0,6929	0,2337
p-Wert atypisch vs. C	0,0917	0,0006	0,3220	0,2247	0,0597	0,0002	0,1816	0,0234

4 Ergebnisse

Wie in Abb. 4.3.11 zu erkennen, zeigt die Subgruppe „atypische CIDP“ im Vergleich zu „typische CIDP“ auch für die CD4+ T-Lymphozytensubpopulationen teilweise erhöhte Frequenzen. So sind die Frequenzen der CD4+ TEM ($p < 0,05$) und CD4+ TCM ($p < 0,01$) signifikant erhöht. Im Vergleich zu C können wir für die Gruppe „atypische CIDP“ signifikant erhöhte Frequenzen der CD4+ TEM und CD4+ TCM ($p < 0,001$) sowie tendenziell erhöhte Frequenzen der naiven CD4+ T-Lymphozyten ($p = 0,1816$) nachweisen. Die Frequenzen der CD4+ TEMRA in dieser Gruppe im Vergleich zu C sind tendenziell erniedrigt ($p = 0,0862$).

Eine deskriptive, statistische Beschreibung der Abb. 4.3.11 ist Tab. 4.3.8 zu entnehmen.

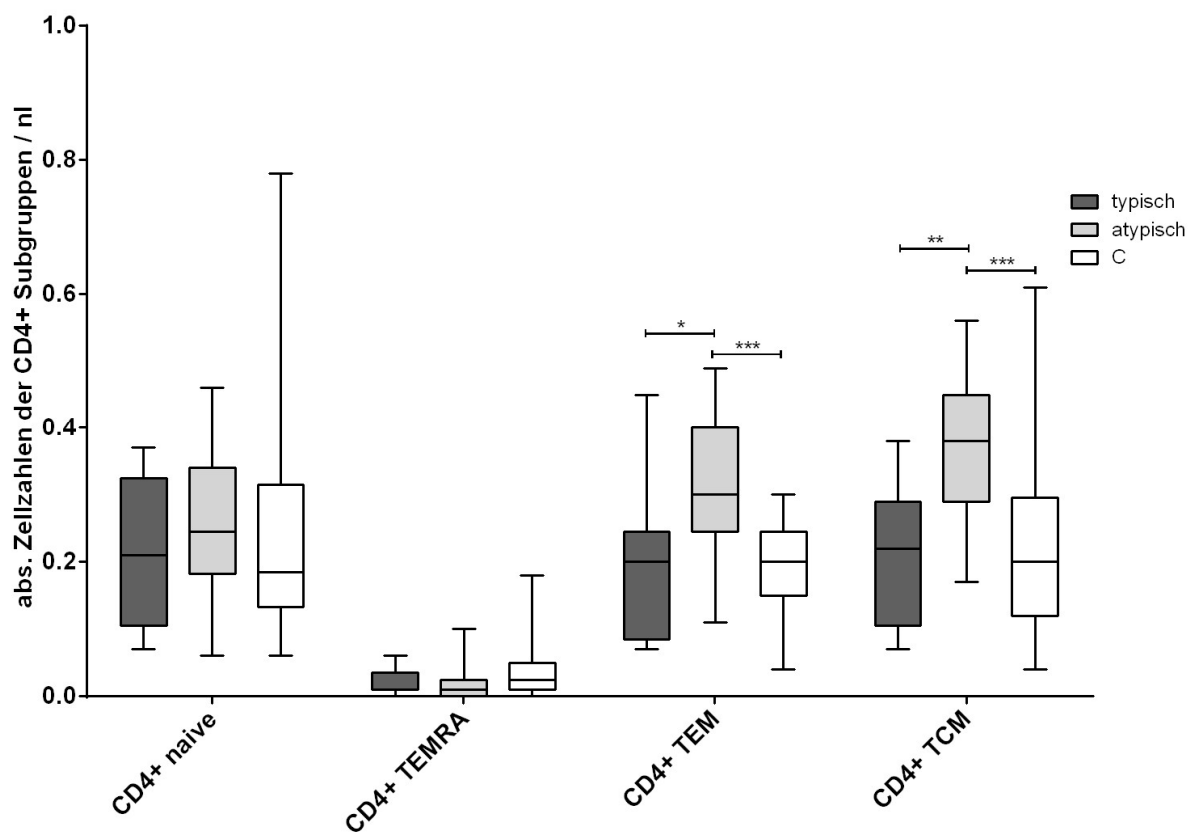


Abbildung 4.3.11: Quantitative Analyse der CD4+ Subpopulationen der Subgruppe „typisch/atypisch“ vs. gesunde Kontrollen (C) an Visite (V) 1 mittels FACS. ($N_{\text{typisch}}=9$, $N_{\text{atypisch}}=17$, $N_{\text{C}}=28$). Im Subgruppenvergleich signifikant erhöhte Frequenzen in der Gruppe „atypisch“ für die CD4+ TEM und CD4+ TCM. Im Vergleich zu C in der Gruppe „atypisch“ signifikant erhöhte Werte für CD4+ TEM und CD4+ TCM. Dargestellt als Box Plot and Whiskers mit Median, 25. und 75. Perzentile sowie Minimum und Maximum. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$)

4 Ergebnisse

In Abb. 4.3.12 zeigen die Patienten mit einer atypischen CIDP im Subgruppenvergleich die Tendenz zu erhöhten Frequenzen für CD8+ TEM ($p=0,1745$) und CD8+ TCM ($p=0,1475$). Im Vergleich zu C können wir für die Gruppe „atypische CIDP“ signifikant erhöhte Frequenzen der CD8+ TCM ($p<0,05$) sowie tendenziell erhöhte Werte der CD8+ naive-T-Lymphozyten ($p=0,1117$) und CD8+ TEM ($p=0,2516$) messen. Dahingegen sind die Frequenzen der CD8+ TEMRA dieser Gruppe gegenüber C tendenziell erniedrigt ($p=0,2764$).

Eine deskriptive, statistische Beschreibung der Abb. 4.3.12 ist Tab. 4.3.8 zu entnehmen.

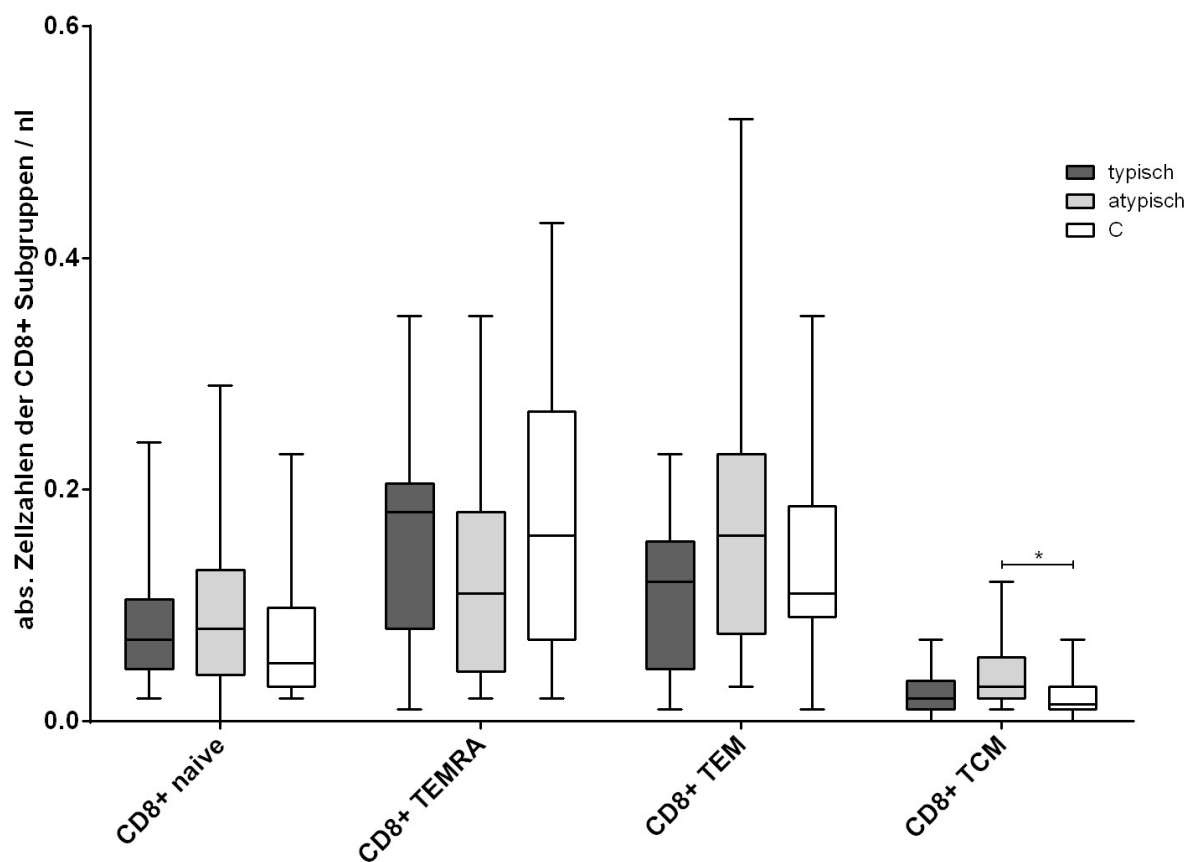


Abbildung 4.3.12: Quantitative Analyse der CD8+ Subpopulationen der Subgruppe „typisch/atypisch“ vs. gesunde Kontrollen (C) an Visite (V) 1 mittels FACS. ($N_{\text{typisch}}=9$, $N_{\text{atypisch}}=17$, $N_{\text{C}}=28$). Im Vergleich zu C signifikant erhöhte Frequenzen der CD8+ TCM in der Gruppe „atypisch“. Dargestellt als Box Plot and Whiskers mit Median, 25. und 75. Perzentile sowie Minimum und Maximum. (* $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$)

4 Ergebnisse

Tabelle 4.3.8: Signifikanzwerte für die quantitative Analyse der CD4+ und CD8+ Subpopulationen aus dem Subgruppenvergleich „typisch/atypisch“ vs. gesunde Kontrollen (C) an Visite (V) 1. ($N_{\text{typisch}}=9$, $N_{\text{atypisch}}=17$, $N_{\text{C}}=28$)

	CD4+ naive	CD4+ TEMRA	CD4+ TEM	CD4+ TCM	C8+ naive	CD8+ TEMRA	CD8+ TEM	CD8+ TCM
p-Wert typisch vs. atypisch	0,3226	0,6895	0,0160	0,0014	0,6422	0,5159	0,1745	0,1475
p-Wert typisch vs. C	0,7550	0,2857	0,6566	0,7359	0,3662	0,7404	0,4145	0,7747
p-Wert atypisch vs. C	0,1816	0,0862	0,0002	0,0001	0,1117	0,2764	0,2516	0,0184

4.3.5 Anbehandelte Patienten zeigen erniedrigte Frequenzen der NK-Zellen

In Abb. 4.3.13 stellen wir die Frequenzen der Lymphozytenpopulationen der therapienaiven und der anbehandelten Patienten dar. Als „therapienaiv“ klassifizierten wir Patienten, die zuvor keine immunmodulatorischen oder – suppressiven Therapien erhalten hatten. Die Gruppe „anbehandelt“ enthält diejenigen Patienten, die bereits vor Einschluss in die Studie IVIG-Transfusionen oder Glukokortikoide zur Behandlung der CIDP bekommen haben. Es lassen sich für die Frequenzen der Lymphozytenpopulationen der therapienaiven und der anbehandelten Patienten keine signifikanten Unterschiede darstellen. In der Tendenz ($p=0,0999$) waren die Frequenzen der NK-Zellen in der Gruppe der Anbehandelten gegenüber der Gruppe der Therapienaiven erniedrigt. Im Vergleich zu C können wir für die Therapienaiven tendenziell erhöhte Frequenzen der B-Lymphozyten ($p=0,1241$), T-Lymphozyten ($p=0,0655$), CD4+ T-Lymphozyten ($p=0,0954$) sowie erniedrigte Zahlen der NK-Zellen ($p=0,2542$) nachweisen. Für die Gruppe der Anbehandelten im Vergleich zu C können wir signifikant erniedrigte Frequenzen der NK-Zellen ($p>0,05$) und signifikant erhöhte Frequenzen der CD4+ T-Lymphozyten ($p<0,05$) sowie tendenziell erhöhte Zahlen der T-Lymphozyten ($p=0,0641$) zeigen.

Eine deskriptive, statistische Beschreibung der Abb. 4.3.13 ist Tab. 4.3.9 zu entnehmen.

4 Ergebnisse

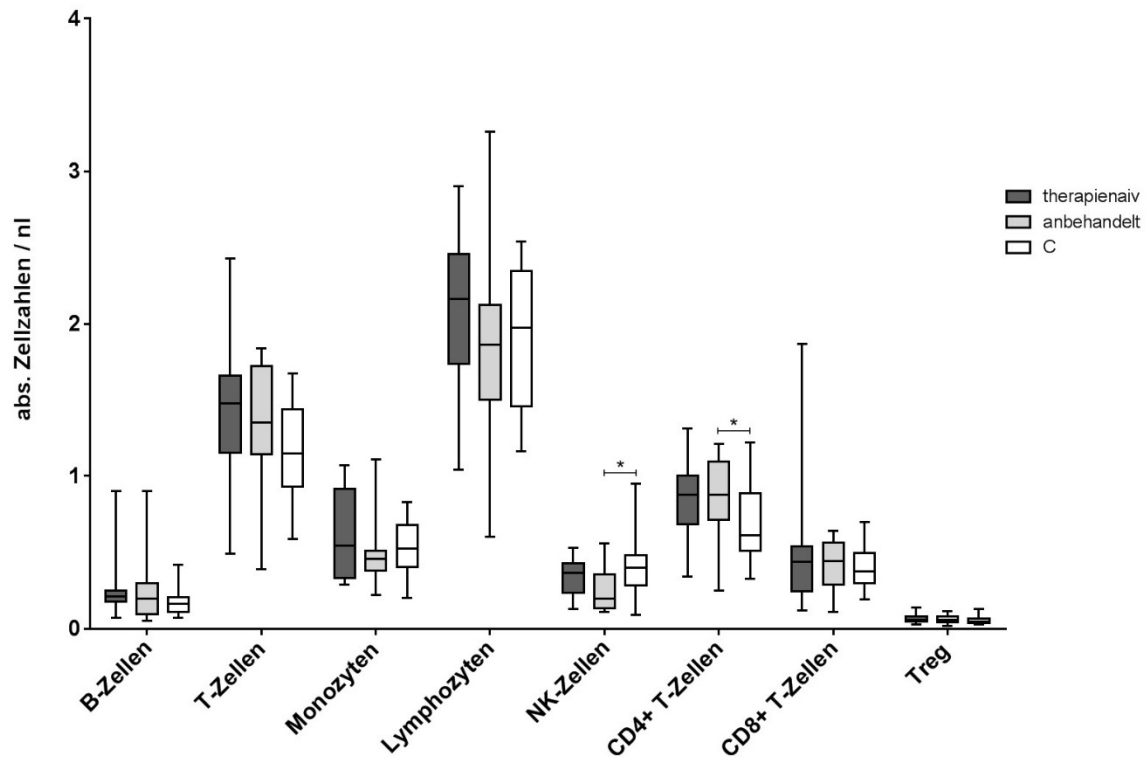


Abbildung 4.3.13: Quantitative Analyse der Lymphozytenpopulationen der Subgruppe „therapienaiv/anbehandelt“ vs. gesunde Kontrollen (C) an Visite (V) 1 mittels FACS. ($N_{\text{therapienaiv}}=11$, $N_{\text{anbehandelt}}=15$, $N_{\text{C}}=28$). Bei der Gruppe „anbehandelt“ im Vergleich zu C signifikant erhöhte Frequenzen der CD4+ T-Lymphozyten und signifikant erniedrigte Frequenzen der NK-Zellen. Dargestellt als Box Plot and Whiskers mit Median, 25. und 75. Perzentile sowie Minimum und Maximum. (* $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$)

Tabelle 4.3.9: Signifikanzwerte für die quantitative Analyse der Lymphozytenpopulationen aus dem Subgruppenvergleich „therapienaiv/anbehandelt“ vs. gesunde Kontrollen (C) an Visite (V) 1. ($N_{\text{therapienaiv}}=11$, $N_{\text{anbehandelt}}=15$, $N_{\text{C}}=28$)

	B-Zellen	T-Zellen	Monozyten	Lymphozyten	NK-Zellen	CD4+ T-Zellen	CD8+ T-Zellen	Treg
p-Wert therapienaiv vs. anbehandelt	0,5942	0,6587	0,3188	0,3425	0,0999	0,8764	0,4375	0,5634
p-Wert therapienaiv vs. C	0,1241	0,0655	0,3782	0,4588	0,2542	0,0954	0,8513	0,2792
p-Wert anbehandelt vs. C	0,3205	0,0641	0,3269	0,6890	0,0113	0,0332	0,5258	0,4504

4 Ergebnisse

In Abb. 4.3.14 können wir für die Gruppe „therapienaiv“ im Vergleich zu C signifikant erhöhte Frequenzen der CD4+ TCM ($p < 0,05$), tendenziell erhöhte Zahlen der CD4+ TEM ($p = 0,0799$) sowie tendenziell erniedrigte CD4+ TEMRA Frequenzen ($p = 0,1540$) zeigen. Für die Anbehandelten lassen sich im Vergleich zu C signifikant ($p < 0,01$) erhöhte Werte der CD4+ TEM, tendenziell erhöhte Frequenzen der CD4+ TCM ($p = 0,0507$) sowie tendenziell erniedrigte CD4+ TEMRA-Frequenzen ($p = 0,1081$) erheben.

Eine deskriptive, statistische Beschreibung der Abb. 4.3.14 ist Tab. 4.3.10 zu entnehmen.

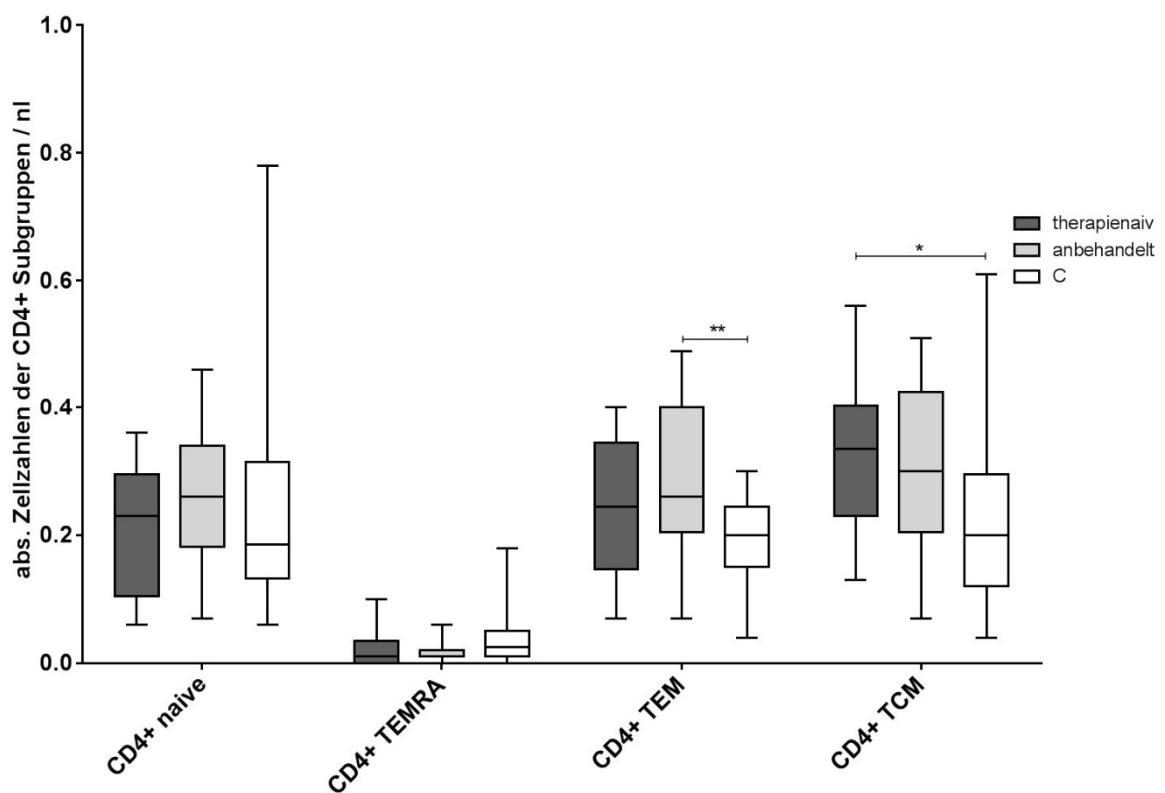


Abbildung 4.3.14: Quantitative Analyse der CD4+ Subpopulationen der Subgruppe „therapienaiv/anbehandelt“ vs. gesunde Kontrollen (C) an Visite (V) 1 mittels FACS. ($N_{\text{therapienaiv}}=11$, $N_{\text{anbehandelt}}=15$, $N_{\text{C}}=28$). Im Vergleich zu C bei der Gruppe „therapienaiv“ signifikant erhöhte Frequenzen der CD4+ TCM und bei der Gruppe „anbehandelt“ im Vergleich zu C signifikant erhöhte Werte der CD4+ TEM. Dargestellt als Box Plot and Whiskers mit Median, 25. und 75. Perzentile sowie Minimum und Maximum. (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$)

4 Ergebnisse

In Abb. 4.3.15 zeigen sich keine signifikanten Unterschiede im Subgruppenvergleich oder im Vergleich der Gruppen zu C für die Frequenzen der CD8+ Subpopulationen. Tendenziell sind die CD8+ TEMRA Frequenzen der Therapienaiven gegenüber C erniedrigt ($p=0,1616$) sowie die Frequenzen der CD8+ TCM gegenüber C erhöht ($p=0,0572$). Bei der Gruppe der Anbehandelten konnten wir gegenüber C tendenziell erhöhte Werte der CD8+ naive T-Lymphozyten ($p=0,0616$) sowie CD8+ TCM ($p=0,2112$) messen.

Eine deskriptive, statistische Beschreibung der Abb. 4.3.15 ist Tab. 4.3.10 zu entnehmen.

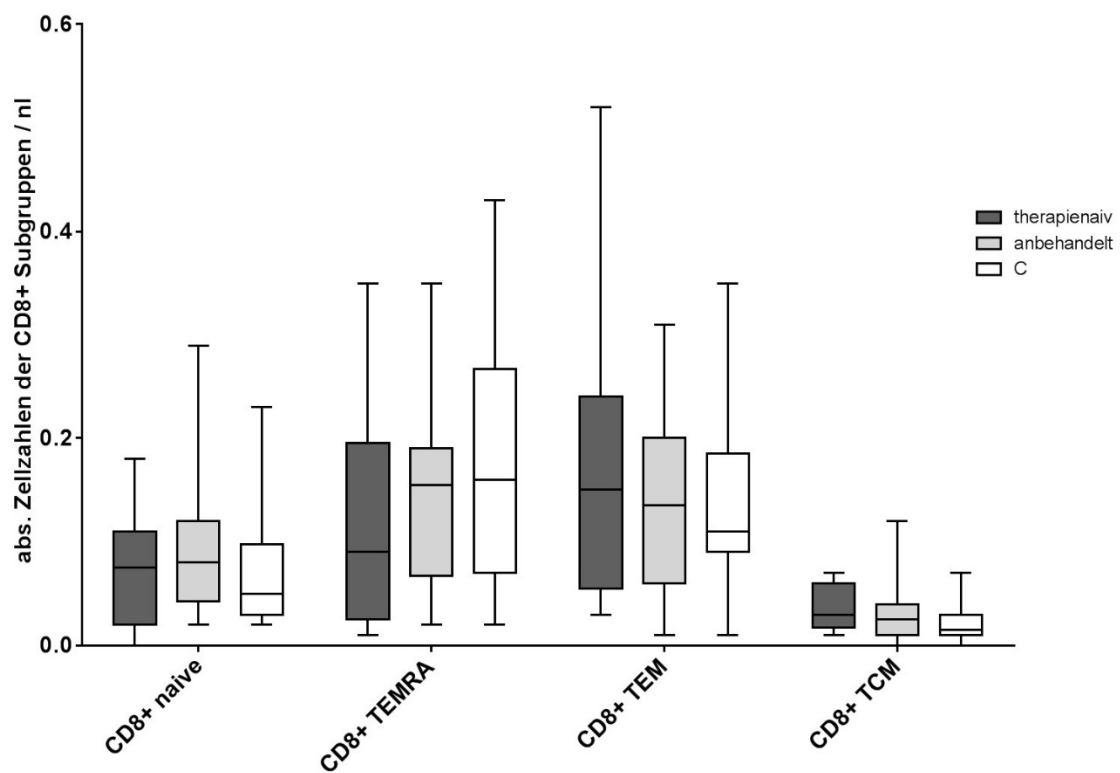


Abbildung 4.3.15: Quantitative Analyse der CD8+ Subpopulationen der Subgruppe „therapienaiv/anbehandelt“ vs. gesunde Kontrollen (C) an Visite (V) 1 mittels FACS. ($N_{\text{therapienaiv}}=11$, $N_{\text{anbehandelt}}=15$, $N_{\text{C}}=28$). Dargestellt als Box Plot and Whiskers mit Median, 25. und 75. Perzentile sowie Minimum und Maximum.

4 Ergebnisse

Tabelle 4.3.10: Signifikanzwerte für die quantitative Analyse der CD4+ und CD8+ Subpopulationen aus dem Subgruppenvergleich „therapienaiv/anbehandelt“ vs. gesunde Kontrollen (C) an Visite (V) 1. ($N_{\text{therapienaiv}}=11$, $N_{\text{anbehandelt}}=15$, $N_{\text{C}}=28$)

	CD4+ naive	CD4+ TEMRA	CD4+ TEM	CD4+ TCM	C8+ naive	CD8+ TEMRA	CD8+ TEM	CD8+ TCM
p-Wert therapienaiv vs. anbehandelt	0,5953	0,5495	0,3968	0,6504	0,3069	0,3821	0,3820	0,4215
p-Wert therapienaiv vs. C	0,7877	0,1540	0,0799	0,0180	0,7002	0,1616	0,6768	0,0572
p-Wert anbehandelt vs. C	0,2516	0,1081	0,0025	0,0507	0,0616	0,4245	0,8704	0,2112

5 DISKUSSION

Bei der vorliegenden Studie handelt es sich um eine explorative Arbeit, in der wir verschiedene klinische, immunchemische (ELISPOT) und immunzytologische (FACS) Parameter untersuchten, deren gemeinsames Ziel die Identifizierung von verlässlichen Immunmarkern bei CIDP-Patienten war. Durch diese Immunmarker wollten wir prädiktive Aussagen über den individuellen Krankheitsverlauf erlangen und einschätzen können, welche Patienten wann einer frühzeitigen immunmodulatorischen oder –suppressiven Therapie zugeführt werden sollten. Gleichmaßen wollten wir unsere drei in Kapitel 2.5 formulierten Hypothesen in ihrer Gültigkeit überprüfen. Zu diesem Zweck erhoben wir über einen Verlauf von 12 Monaten bei 28 CIDP-Patienten, von denen sich 22 (78,6%) in einem klinisch instabilen Krankheitsstadium befanden, Werte und unterteilten unsere Kohorte in Subgruppen: „INCAT Score>2“ vs. „≤2“, „Zeit seit Diagnosestellung>2 Jahre“ vs. „≤2 Jahre“, „typische“ vs. „atypische“ CIDP und „therapienaiv“ vs. „anbehandelt“. Unsere Ergebnisse verglichen wir mit 28 gesunden Kontrollprobanden gleicher Altersverteilung.

Dabei konnten wir bei den CIDP-Patienten sowohl signifikant erhöhte Myelinantigen-spezifische T-Lymphozyten-Antworten (auf PMP-22, P2 sowie erstmals P0 und MBP) als auch signifikant höhere Frequenzen der Lymphozytenpopulationen (vor allem CD4+ *Memory* T-Lymphozyten) zeigen. Damit gelang es uns, die erste Hypothese zu bestätigen. Durch die deutlich höheren T-Lymphozyten-Antworten auf P0 180-199 und MBP 82-100 sind diese peripheren Myelinantigene die für uns aussichtsreichsten zukünftigen Immunmarker bei der CIDP.

Zusätzlich gelang es uns, über eine Aufteilung in Subgruppen die verschiedenen Krankheitsverläufe der CIDP sowohl klinisch als auch immunologisch genau zu charakterisieren. Wir konnten somit auch unsere zweite Hypothese verifizieren, da die Patienten im Frühstadium der Erkrankung („Zeit seit Diagnosestellung≤2 Jahre“) und damit einhergehend auch die milder betroffenen („INCAT≤2“) ein stärker aktiviertes inflammatorisches Milieu aufwiesen. Im Gegensatz zu unserer Hypothese konnten wir jedoch keine Reduktion dieser Werte im Verlauf der 12 Monate Beobachtungszeit darstellen.

Die dritte Hypothese konnten wir bestätigen, da wir deutlich erhöhte Laborwerte (in ELISPOT- und FACS-Analyse) bei Patienten mit atypischen CIDP-Varianten

gegenüber Patienten mit einer typischen CIDP festgestellt haben. Beispielhaft definieren wir in Kapitel 5.4.3 *post-hoc* labormedizinische Grenzwerte zur Differenzierung dieser CIDP-Verläufe („typisch“ vs. „atypisch“). Dabei stellen sich die neuen peripheren Myelinantigene P0 180-199 und MBP 82-100 in Kombination mit CD4+ *Memory* T-Lymphozyten (TEM, TCM) als am aussagekräftigsten heraus. Diese Erkenntnisse könnten nach Bestätigung durch nachfolgende Studien zukünftig zur besseren Diagnosestellung bei atypischen Krankheitsverläufen herangezogen werden.

5.1 Methodische Aspekte der Arbeit

5.1.1 ELISPOT zur Messung von T-Lymphozyten-Immunreaktionen auf periphere Myelinantigene

Für die ELISPOT-Analyse wählten wir 7 verschiedene periphere Myelinantigene, die wie in 2.4.4 erläutert ausgewählt wurden. Bei der Betrachtung der Ergebnisse wurde deutlich, dass die Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen für alle getesteten Antigene signifikant höhere T-Lymphozyten-Antworten zeigten. Allerdings wurden in aktuellen Publikationen die Hinweise dichter, dass wahrscheinlich auch Strukturproteine aus der Region der Ranvier-Schnürringe in der Immunpathogenese der CIDP als Autoantigene in Frage kommen. Hierfür spricht vor allem, dass die klinische Verbesserung nach IVIG-Transfusionen häufig innerhalb von 1-2 Tagen auftritt. Dies lässt sich eher durch eine Aufhebung der Blockade der saltatorischen Erregungsleitung erklären, als durch Remyelinisierungsprozesse, die zeitlich wesentlich langwieriger wären (Wochen bis Monate) [57]. Das gleiche Prinzip könnte für die rapide, teils sprunghafte klinische Verschlechterung der Patienten am Ende eines IVIG-Therapieintervalls gelten. Wie durch Dalakas et al. beschrieben, werden deshalb vor allem Proteine der nodalen, paranodalen und juxtapanodalen Region für am wahrscheinlichsten autoantigen in der CIDP gehalten [57]. Hierzu zählen Neurofascin 155 und 186, Gliomedin, Ankyrin G und weitere [57]. Eine Folgestudie zur Untersuchung der immunpathogenetischen Relevanz von Neurofascin 155 und 186 wurde durch unsere Arbeitsgruppe bereits im August 2013 begonnen und wird aktuell vervollständigt.

Eine mögliche Fehlerquelle der Methode war die Aufbereitung der peripheren Myelinantigene. So lagen uns die Antigene PMP-22 32-51, PMP-22 51-64, PMP-22

120-133, P2 14-25 und P2 61-70 zu 10mg/ml in DMSO gelöst vor, wohingegen P0 180-199 und MBP 82-100 zu 1mg/ml in Ampuwa-Wasser gelöst waren. Grund hierfür waren die unterschiedlichen Lösungseigenschaften basierend auf Hydro- bzw. Lipophilie der Aminosäuresequenzen. Um dennoch jegliche Beeinflussung der ELISPOT-Analyse durch das zytotoxische DMSO ausschließen zu können, verdünnten wir es vor Einsetzen in den Ansatz. Pro *well* befand sich somit jeweils nur eine Menge von maximal 1,82µl DMSO auf 200µl Volumen. Von einer solch geringen Konzentration geht laut aktuellem Wissensstand [65] keine zellschädigende Wirkung aus. Die unterschiedlichen Konzentrationen, in denen die Antigene in der ELISPOT-Analyse verwendet wurden, ergaben sich aus vorher durchgeführten Verdünnungsreihen mit Bestimmung der optimalen Konzentrationen.

Für die Durchführung der ELISPOT-Analyse verwendeten wir aus peripher venösem Blut extrahierte PBMC. Diese wurden in flüssigem Stickstoff gelagert, bevor die T-Lymphozyten-Autoreaktivität auf periphere Myelinantigene gemessen wurde. Es ergaben sich fünf wesentliche Fehlerquellen bei der Durchführung der ELISPOT-Analyse:

Erstens bemühten wir uns, von den Patienten möglichst in einer instabilen Phase ihrer Erkrankung Blut zu entnehmen. Dabei galt es, einen größtmöglichen Abstand zu vorangegangenen IVIG-Transfusionen einzuhalten, um in der Blutzirkulation verbliebene IVIG-Bestandteile, die die ELISPOT-Messung beeinflussen könnten, zu vermeiden. Dies konnte allerdings nicht bei sämtlichen Blutentnahmen sichergestellt werden, da die Patienten bei plötzlicher Symptomverschlechterung oder individuellen Terminänderungen teilweise unplanmäßig mit IVIG-Transfusionen behandelt wurden. Somit ließen sich nicht in allen Fällen feste Visitenabstände einhalten.

Zweitens bestanden bei einigen Patienten aufgrund von Begleiterkrankungen verschiedenartige Medikationen mit unterschiedlichen Einflüssen auf das Verhalten der T-Lymphozyten in der ELISPOT-Analyse. Bei Anzeichen auf eine bestehende medikamentöse oder andersartige, bspw. paraneoplastische, Immunsuppression der Patienten führten wir keine Blutentnahmen durch.

Drittens verlangte unser Protokoll das Einfrieren und Auftauen der PBMC. Dieses erfolgte standardisiert gemäß publizierter ELISPOT-Protokolle [5, 66]. Dennoch

mussten Daten in Einzelfällen aufgrund eines hohen Anteils (>20%) toter Zellen nach dem Auftauen verworfen werden.

Viertens ist der ELISPOT ein Experiment, welches mit einer sehr hohen interindividuellen, patientenspezifischen Variabilität der Ergebnisse aufwartet. Da die T-Lymphozyten-Immunreaktionen jedes Patienten von multiplen Einflussfaktoren (Begleiterkrankungen, Medikation, Phase der Erkrankung, virale Infekte etc.) abhängen, legten wir besonderen Wert auf standardisierte Laborabläufe und Auswertemethoden. Hier orientierten wir uns an veröffentlichten ELISPOT-Protokollen und den Erfahrungen unserer eigenen Arbeitsgruppe [5, 35, 64]. Außerdem können diese Einflussfaktoren auf die T-Lymphozyten-Immunktivierung ebenfalls intraindividuell im Verlauf von 12 Monaten deutlich variieren, sodass auch hier Normierungsschritte notwendig wurden. Die entsprechende mathematische Normierung der Daten ist in 3.6.4 beschrieben. Trotz des standardisierten Vorgehens und der Normierungsschritte ergaben sich vereinzelt nicht-auswertbare Datensätze durch unspezifische Immunsystemaktivierung oder –suppression, die nicht in die Auswertung mit einbezogen werden konnten.

Fünftens ist anzumerken, dass die getesteten peripheren Myelinantigene als wahrscheinliche Autoantigene der CIDP im Vergleich zu viralen oder bakteriellen Antigenen nur deutlich schwächere T-Lymphozyten-Immunreaktionen auslösen [64]. So beobachteten wir 100- bis 1000-fach höhere SFU bei der Stimulation durch die Positiv-Kontrollen (CFT, CEF und SEB), siehe hierzu die Ergebnisse aus 4.2. In der *Software*-gestützten Zählung der SFU fielen daher unspezifische Farbveränderungen der Filtermembranen bei peripheren Myelinantigenen deutlicher ins Gewicht als bei Positiv-Kontrollen und konnten zu veränderten Werten führen.

Dennoch ist es wichtig hervorzuheben, dass durch die Standardisierung der Laborabläufe und die mathematische Normierung der Daten eine gleichbleibend hohe Qualität und verlässliche Ergebnisse gewährleistet werden konnten. Im Gegensatz zu dem in der Literatur häufig angewendeten T-Zell-*Proliferation Assay* [35, 40, 54, 55] ermöglicht die Methode des ELISPOT eine genauere und spezifischere Aussage auch über niedrig-ausgeprägte antigenspezifische T-Lymphozyten-Antworten [63].

5.1.2 FACS zur Messung von Lymphozytenpopulationen

Für die Bestimmung der Frequenzen der Lymphozytenpopulationen und T-Lymphozytensubpopulationen der CIDP-Patienten entnahmen wir zu jeder Visite 8ml peripher venöses Blut in ein EDTA-Vakuumbloodentnahmeröhrchen und sandten es per Charité-internem Boten an das Labor Berlin zur immunzytologischen Analyse (FACS). Von diesem erhielten wir Datensätze, die wir nach entsprechender Formatierung in GraphPad Prism 6 zur Erstellung von vergleichbaren Graphen übernahmen.

Ähnlich der ELISPOT-Analyse ist auch hier der Zeitpunkt der Blutentnahme von entscheidender Bedeutung. So können der Abstand zur letzten IVIG-Transfusion, Begleiterkrankungen, Medikamente, virale Infekte, Ernährung und weitere Faktoren eine Auswirkung auf die Frequenzen von PBMC- und T-Lymphozytensubpopulationen haben.

Anders als bei der ELISPOT-Analyse wurde hier die Abholung und Aufbereitung des Blutes durch Boten und das Labor Berlin vorgenommen. Zum einen ergaben sich dadurch für uns unbeeinflussbar unterschiedlich lange Latenzzeiten bis zur FACS-Analyse. In Einzelfällen wurden die Blutproben erst am Morgen des Folgetages ausgewertet. Zum anderen können wir aber von einer standardisierten und qualitativ hochwertigen Bearbeitung der Blutproben ausgehen, da das Labor Berlin sämtliche Anfragen der Charité-Universitätsmedizin Berlin bearbeitet und sich selbst regelmäßigen Qualitätssicherungsmaßnahmen unterzieht.

5.2 Myelinantigen-spezifische T-Lymphozyten-Antworten in der CIDP

Bei der Betrachtung unserer Resultate wird deutlich, dass die Patienten für sämtliche getesteten peripheren Myelinantigene zu allen Visiten signifikant höhere Antworten zeigten als die gesunden Kontrollen. Für die verwendeten PMP-22- und P2-Antigene ist dies in Übereinstimmung mit der Literatur. Denn sowohl im CIDP-verwandten EAN-Mausmodell konnten P2-spezifische [51] als auch bei 4 von 7 CIDP-Patienten PMP-22 51-64-spezifische T-Lymphozyten-Reaktionen [35] gezeigt werden. In unserer eigenen Arbeitsgruppe konnten wir bislang PMP-22 32-51-, PMP-22 120-133- und P2 14-25-, P2 61-70-spezifische T-Lymphozyten-Antworten messen [5]. Vor dieser Studie konnten jedoch weder für P0 180-199 noch

für MBP 82-100 spezifische, signifikante T-Lymphozyten-Immunreaktionen bei CIDP-Patienten gezeigt werden.

Bislang konnten für P0 in verschiedenen Tiermodellen Hinweise für ein autoantigenes Potential in der Pathogenese der CIDP gefunden werden. So konnten im CIDP-verwandten EAN-Mausmodell bereits T-Zell-spezifische Reaktionen auf *whole* P0 beschrieben werden [50]. Im Tiermodell der SAP, welches neben der EAN als CIDP-ähnliches Mausmodell genutzt wird, konnten spezifische TH1-Lymphozyten-Antworten nur gegen P0 180-199 aber gegen keine weiteren P0 Proteine gefunden werden. Zusätzlich war es in dieser Studie möglich, durch die Injektion von P0 180-199 reaktiven TH1-Lymphozyten eine autoimmune Neuropathie im Tiermodell auszulösen [58]. In weiteren Studien konnte die Immunisierung mit P0 180-199 sowohl in Wildtyp-Mäusen wie auch in IFN- γ *knockout* Mäusen und TNF- α *knockout* Mäusen eine EAN auslösen [67-69].

Für MBP konnten in der Literatur bislang nur vereinzelt Hinweise auf ein autoantigenes Potential in Bezug auf Neuroinflammation gefunden werden. So wurde sowohl für *whole* MBP als auch für MBP 82-100 nach spezifischen T-Lymphozyten-Immunreaktionen bei CIDP-Patienten gesucht. Hier ließen sich jedoch keine signifikanten T-Lymphozyten-Antworten von CIDP-Patienten gegen MBP 82-100 oder *whole* MBP im Vergleich zu den gesunden Kontrollen nachweisen [35]. Die von uns dargestellten signifikant erhöhten T-Lymphozyten-Reaktionen bei CIDP-Patienten auf MBP 82-100 könnten durch die sehr gut differenzierte Auswahl der Patienten für unsere Kohorte zu erklären sein. Einerseits schlossen wir den größten Teil der Patienten in einem klinisch-instabilen Stadium der Erkrankung ein und andererseits konnten wir durch die Anwendung neuester diagnostischer Richtlinien einen Teil der Kohorte schon sehr früh nach Krankheitsbeginn rekrutieren. Aus diesen beiden Gründen scheint das inflammatorische Milieu unserer Kohorte stärker ausgeprägt zu sein als in anderen Studien und damit eine definiertere Suche nach Autoantigenen zu ermöglichen.

Im Gegensatz zur CIDP konnte bereits früh die maßgebliche Rolle von MBP mit dem immundominanten Anteil 82-100 in der Pathogenese der MS gezeigt werden. Da die MS ebenfalls eine autoimmune demyelinisierende Erkrankung ist, stehen sich die Pathogenesen der MS und der CIDP möglicherweise nahe. Es ist seit Langem bekannt, dass MBP 82-100 nach intradermaler Injektion in *Lewis*-Ratten oder Mäusen zusammen mit einem Adjuvans (*CFA-Complete Freund Adjuvance*)

und Pertussis-Toxin das MS-ähnliche Mausmodell der Experimentellen Autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE) auslösen kann [70]. Jedoch konnte die entsprechende Induktion einer EAN (CIDP-ähnliches Mausmodell) durch MBP-Injektion bisher nicht beobachtet werden. Die Induktion der EAN ist allerdings durch Immunisierung mit anderen peripheren Myelinantigenen, wie PMP-22, P2 und P0, bereits beschrieben worden [12, 42, 52]. Einschränkend anzumerken ist, dass die EAN eher als das Mausmodell des GBS gerechnet wird, da der monophasische, hochakute Krankheitsverlauf dem GBS ähnelt [71]. Brun et al. gelang es kürzlich (2015), durch die Injektion von S-palm P0 180-199 in Mäusen eine chronische oder chronisch-remittierende Neuroinflammation auszulösen, die dem Krankheitsverlauf der CIDP deutlich näher steht [71].

Es konnte gezeigt werden, dass das in Studien zur Induktion einer EAE eingesetzte Pertussis-Toxin eine Reduktion des transendothelialen Widerstandes der Blut-Hirn-Schranke und damit sowohl eine erhöhte Permeabilität für Proteine als auch eine erhöhte Transmigration von Zellen (Monozyten) induziert [72]. Dies könnte eine Erklärung liefern, weshalb die Injektion von MBP eine zentrale (EAE), aber keine periphere (EAN) Neuroinflammation auslösen kann. Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass Glatirameracetat als Antagonist des MBP 82-100-spezifischen T-Zell-Rezeptors eingesetzt werden kann und zu einer klinischen Besserung des Krankheitsbildes MS führt [73, 74]. Interessanterweise konnte kürzlich (2014) von Zhang et al. auch ein therapeutischer Effekt von Glatirameracetat im EAN-Modell bei *Lewis*-Ratten nachgewiesen werden. Die Injektion von Glatirameracetat führte sowohl vor als auch 10 Tage nach Induktion der EAN zu klinisch, elektrophysiologisch und histologisch nachweisbaren Symptomverbesserungen (Linderung der neurologischen Defizite, Reduktion der Demyelinisierung und der axonalen Degeneration) [75]. Diese Ergebnisse bedürfen zwar weitergehender Validierung in tierexperimentellen Studien, lassen aber auf ein neues therapeutisches Konzept in der CIDP hoffen. Denn auch in der MS war Glatirameracetat eines der ersten Medikamente, das es durch immunmodulatorische Mechanismen im Tiermodell in die klinische Anwendung (seit 1996 zugelassen) geschafft hat [73].

Im Rahmen unserer Studie bestätigten wir einerseits signifikant erhöhte PMP-22- und P2-spezifische T-Lymphozyten-Antworten von CIDP-Patienten. Darüber hinaus gelang es uns, für die Immunpathogenese der CIDP erstmalig zwei neue

Antigene zu identifizieren. Wir zeigten signifikant erhöhte Antworten auf P0 180-199 sowie MBP 82-100 bei CIDP-Patienten. Dabei konnten wir für P0 180-199 und MBP 82-100 drei- bis vierfach höhere Antworten in der ELISPOT-Analyse zeigen als für die anderen getesteten peripheren Myelinantigene. Dieser Größenunterschied könnte auf ein höheres autoimmunes Potential dieser Antigene in der Pathogenese der CIDP hindeuten.

Die prospektive Analyse unserer Kohorte über 12 Monate ermöglichte uns zudem Aussagen über den Verlauf der Myelinantigen-spezifischen T-Lymphozyten-Antworten. Wie durch unsere Arbeitsgruppe bereits in der Literatur beschrieben, können IVIG-Transfusionen bei Patienten, die auf diese Therapieform ansprechen (*responder*), zu einer tendenziellen Verminderung der inflammatorischen Aktivität von T-Lymphozyten in der ELISPOT-Messung führen. Dabei konnte unsere Arbeitsgruppe bei Therapie-*respondern* eine signifikante Reduktion der PMP-22 32-51-, PMP-22 120-133- sowie P2 61-70-spezifischen T-Lymphozyten-Antworten nachweisen [5].

Wir konnten in dieser Studie die Trends zur Reduktion der durch die ELISPOT-Analyse gemessenen T-Lymphozyten-Antworten auf periphere Myelinantigene nur ansatzweise reproduzieren. Diese Reduktionen waren hier in Übereinstimmung mit unseren Vordaten für die peripheren Myelinantigene PMP-22 120-133 und P2 61-70 sowie erstmals für MBP 82-100 deutlich. Im Vergleich zu der Vorstudie unserer Arbeitsgruppe [5] befanden sich in der vorliegenden Studie vermehrt „anbehandelte“ Patienten (53,6%) in der Kohorte und wir führten die *Follow-up*-Untersuchung nach 12 Monaten gegenüber 24 Monaten in der Vorstudie durch. Die andere Beschaffenheit der Kohorte dieser Studie könnte als Erklärung für die ausbleibende Reduktion der Myelinantigen-spezifischen T-Lymphozyten-Antworten unter IVIG-Therapie gedeutet werden [5].

5.3 Unterschiede in den Frequenzen der Lymphozytenpopulationen bei CIDP-Patienten

In der immunzytologischen Analyse der Lymphozytenpopulationen unserer Kohorte konnten wir bei den CIDP-Patienten in der *Baseline*-Untersuchung gegenüber den gesunden Kontrollen signifikant erhöhte Frequenzen der T-Lymphozyten sowie der CD4+ T-Lymphozyten nachweisen.

Dies ist in Übereinstimmung mit der Literatur, in der gezeigt werden konnte, dass CIDP-Patienten eine erhöhte Anzahl von CD4+ T-Lymphozyten im Blut aufweisen

können [12, 41-43]. Allerdings bleibt die Datenlage widersprüchlich, da Sanvito et al. [40] gleiche Frequenzen der CD4+ T-Lymphozyten bei CIDP-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen beobachten konnten. Darauf, dass eine T-Lymphozyten-getragene Aktivierung des Immunsystems bei GBS, CIDP und MS eine wesentliche Rolle spielt, konnte schon 1991 durch systemisch erhöhte IL-2-Konzentrationen hingedeutet werden [33]. Später konnten erhöhte Frequenzen von aktivierten CD4+ T-Lymphozyten gezeigt und ihre wichtige Rolle in der Pathogenese der autoimmunen Neuroinflammation bei der MS bewiesen werden [76, 77]. Auch für die Autoimmunerkrankung Diabetes mellitus Typ 1 konnten erhöhte Frequenzen der aktivierten CD4+ T-Lymphozyten gezeigt werden [78].

Weiterhin gibt es Studien, die erhöhte Frequenzen und eine maßgeblich Rolle der CD8+ T-Lymphozyten in der Pathogenese der CIDP beschreiben [44]. Unsere Arbeitsgruppe und eine weitere Studie konnten allerdings unveränderte Frequenzen der CD8+ T-Lymphozyten bei unbehandelten CIDP-Patienten zeigen [5, 40]. In der vorliegenden Arbeit konnten unveränderte Frequenzen der CD8+ T-Lymphozyten bei CIDP-Patienten erneut dargestellt werden. Sowohl bei den Werten der T-Lymphozyten als auch der CD4+ und CD8+ T-Lymphozyten zeigten sich im Verlauf von 12 Monaten keine Veränderungen.

Bezüglich der jeweiligen CD4+ und CD8+ Subpopulationen ließen sich ebenfalls, insbesondere für CD4+, interessante Ergebnisse finden: So konnten wir gegenüber gesunden Kontrollen signifikant erhöhte Frequenzen der CD4+ TEM und CD4+ TCM nachweisen. Dies ist in Übereinstimmung mit unserer Vorstudie, in der wir bereits erhöhte Werte der CD4+ TEM und CD4+ TCM, CD8+ TEM sowie gleichzeitig erhöhte Myelinantigen-spezifische T-Lymphozyten-Antworten bei Therapie-*respondern* gegenüber Langzeit-IVIG-Patienten und gesunden Kontrollen finden konnten. Dies legt bei diesen Patienten eine hauptsächlich Autoantigen-getriebene chronische Entzündungsreaktion nahe, die für die klinische Besserung durch IVIG-Transfusionen eine wissenschaftliche Erklärung liefern könnte [5]. Auch konnten wir in unserer Arbeitsgruppe bereits erhöhte Frequenzen von CD8+ TEM bei Therapie-*respondern* gegenüber *non-respondern* zeigen [5]. Zuvor konnten schon erhöhte Frequenzen von CD4+ sowie CD8+ TEM und TCM im Liquor von CIDP-Patienten gefunden werden [49]. Im Widerspruch dazu stehen Daten, in denen gleiche Frequenzen von *Memory* T-Lymphozyten im Blut von CIDP-Patienten und gesunden Kontrollen gezeigt werden [40]. Die pathogenetische

Relevanz der *Memory* T-Lymphozyten bei der CIDP-verwandten Immunpathogenese der MS konnte durch erhöhte Frequenzen von CD4+ sowie CD8+ TEM belegt werden [46, 79]. CD4+ TEM scheinen eine wichtige Rolle in der Ausbildung einer autoimmunen Neuroinflammation [48] und generell einer autoimmunen Pathogenese [80] zu spielen. Ebenfalls für die Autoimmunerkrankung Diabetes mellitus Typ 1 konnten erhöhte Frequenzen für CD4+ sowie CD8+ TEM gezeigt werden [78]. Auch für andere chronische Autoimmunerkrankungen, wie granulomatöse Polyangiitis und Systemischer Lupus Erythematoses, konnten bereits erhöhte Aktivitäten oder Frequenzen von CD4+ TEM nachgewiesen werden [45, 47]. Dementgegen sollte gestellt werden, dass ältere Patienten generell zu höheren TEM-Frequenzen [81] und gleichzeitig auch verstärkt zur Ausbildung von Autoimmunerkrankungen [82] zu neigen scheinen. In den Vordaten unserer Arbeitsgruppe gibt es bisher für diesen Einfluss des Alters allerdings keinen Anhalt. Denn wir konnten in den Vordaten zu der relativ jüngeren Gruppe der *Therapie-responder* im Vergleich zu *non-respondern*, Langzeit-IVIG-Patienten und gesunden Kontrollen die Tendenz zu höheren Frequenzen der CD4+ TEM und CD4+ TCM sowie CD8+ TEM nachweisen [5]. Um diese Hypothese jedoch zufriedenstellend zu belegen, wären Folgestudien mit anderer Subgruppenbildung (bspw. „Alter >70“ vs. „≤70 Jahre“) notwendig.

In der vorliegenden Studie konnten wir sowohl für CD4+ als auch für CD8+ TEM und TCM gleichbleibende Frequenzen im Verlauf von 12 Monaten zeigen. Dies steht scheinbar im Gegensatz zu Vordaten unserer Arbeitsgruppe, in denen eine signifikante Reduktion der Frequenzen der CD8+ TEM unter IVIG-Therapie bei *CIDP-respondern* nachgewiesen werden konnte [5], und zu einer weiteren Studie, die einen deutlichen reduktiven Effekt von IVIG auf die Aktivität von CD4+ und CD8+ T-Lymphozytensubpopulationen belegen konnte [44]. Da wir in der vorliegenden Studie aber weder eine Subgruppenanalyse der *responder* und *non-responder* vorgenommen haben, noch alle Patienten unserer Kohorte kontinuierlich mit IVIG-Transfusionen therapiert worden sind, bedeuten die bei uns gleichbleibenden Frequenzen der CD4+ sowie CD8+ TEM und TCM über 12 Monate keinen Widerspruch zur aktuellen Literatur. Die bei uns gemessenen über 12 Monate gleichbleibenden Frequenzen dieser *Memory* Lymphozytenpopulationen könnten vielmehr dadurch begründet sein, dass nur 13 von 28 Patienten (46,4%)

komplett therapienaiv in unsere Kohorte eingeschlossen wurden und die anderen zuvor bereits immunsuppressiv oder –modulatorisch behandelt worden waren.

Für die Frequenzen der CD4+ und CD8+ naiven T-Lymphozyten konnten wir in der vorliegenden Studie an V1 keine signifikanten Unterschiede zwischen CIDP-Patienten und gesunden Kontrollen feststellen. Dies stimmt mit von uns und anderen bereits veröffentlichten Daten von CIDP-Patienten überein [5, 40, 43]. Allerdings sahen wir einen Trend zur Reduktion der Frequenzen der CD4+ naiven T-Lymphozyten im Verlauf von 12 Monaten. Bereits zuvor konnten wir in unserer Arbeitsgruppe bei CIDP-Patienten eine signifikante Reduktion der Frequenzen der CD4+ naiven T-Lymphozyten durch immunsuppressive Therapien beschreiben [43] und dadurch die Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen bestätigen, die eine Reduktion der CD4+ naiven T-Lymphozyten-Frequenzen durch Glukokortikoide nachweisen konnten [83, 84]. In der verwandten Pathogenese der MS wurden bereits verminderte Frequenzen von CD4+ naiven T-Lymphozyten [79] und für Diabetes mellitus Typ 1 verminderte Frequenzen von sowohl CD4+ als auch CD8+ naiven T-Lymphozyten gefunden [78].

Für die CD4+ und CD8+ TEMRA-Frequenzen konnten wir in dieser Studie keine Unterschiede zu den gesunden Kontrollen und gleichbleibende Frequenzen im Verlauf von 12 Monaten zeigen. Dies entspricht der aktuellen Literatur und den Vordaten unserer Arbeitsgruppe [5].

Für die TREG-Frequenzen konnten wir in dieser Studie keine Unterschiede im Vergleich zu den gesunden Kontrollen und gleichbleibende Werte im Verlauf von 12 Monaten zeigen. Dies entspricht der aktuellen Literatur, in der unveränderte Frequenzen bei CIDP-Patienten von unserer und anderen Arbeitsgruppen beschrieben wurden [40, 43]. Es konnten allerdings bereits Hinweise gefunden werden, dass TREG trotz gleichbleibender Frequenz ein gemindert immunosupprimierendes Potential aufweisen können [40] und dies auch in der CIDP für die Immunpathogenese maßgebend sein könnte [12].

Für die Frequenzen der Lymphozyten konnten wir in dieser Studie keine signifikanten Unterschiede zu den gesunden Kontrollen, aber eine deutliche Reduktion von V1 auf V5 zeigen. Da sich unter den Werten der Lymphozyten verschiedene Zellpopulationen subsummieren, ist die Betrachtung der jeweiligen Frequenzen von B-, T-Lymphozyten und NK-Zellen aufschlussreicher.

Für die Frequenzen der B-Lymphozyten konnten wir in dieser Studie keine Unterschiede im Vergleich zu den gesunden Kontrollen zeigen, jedoch war im Verlauf von V1 bis V5 ein deutlicher Trend zur Reduktion erkennbar. Auch in der Literatur konnten bei CIDP-Patienten bis jetzt keine signifikant veränderten Frequenzen von B-Lymphozyten gezeigt werden [40]. In den Vordaten unserer eigenen Arbeitsgruppe konnten wir bei der Gruppe der CIDP-Patienten, die zuvor mit Glukokortikoiden behandelt worden war, reduzierte B-Lymphozyten-Frequenzen gegenüber therapienaiven CIDP-Patienten nachweisen [43]. Bei Betrachtung der Daten zu den „Anbehandelten“ (15/28, 53,6%) dieser Studie, die zum Teil mit Glukokortikoiden (4/15, 26,7%) vorbehandelt waren, konnten wir keine Unterschiede der Frequenzen der B-Lymphozyten zwischen „Therapienaiven“ (13/28, 46,4%) und „Glukokortikoid-Behandelten“ feststellen. Die niedrigen Fallzahlen lassen hier keine weitergehenden Schlussfolgerungen zu. Die von uns im Verlauf von 12 Monaten gemessene Reduktion der B-Lymphozyten-Frequenzen in der Kohorte, könnte durch einen reduktiven Effekt der IVIG-Transfusionen auf diese Zellpopulation begründet sein. So konnten kürzlich Hinweise für die Bedeutung des *B-Cell Activating Factor* (BAFF) in der Pathogenese der CIDP gefunden werden [85]. Da IVIG-Transfusionen bewiesenermaßen zu einer Reduktion des BAFF führen können, ist bei den IVIG-respondern unserer Kohorte eine vermehrte Apoptose mit daraus resultierenden niedrigeren Frequenz der B-Lymphozyten denkbar [86]. In der aktuellen Literatur sind die Hinweise auf die Rolle der B-Lymphozyten in der Immunpathogenese der CIDP widersprüchlich. Einerseits konnten schon 1980 erstmals IgM- und IgG-Ablagerungen entlang der peripheren neuroinflammatorischen Läsionen bei CIDP-Patienten gefunden werden, die eine B-Lymphozyten-vermittelte humorale Pathogenese nahe legten [27]. Andererseits konnten später (1993) bei der gezielten Suche nach Autoantikörpern gegen das periphere Myelinprotein P0 nur bei 15,6% der CIDP-Patienten bzw. 18,5% der GBS-Patienten IgM-Antikörper und sogar bei keinem CIDP-Patienten bzw. 7,9% der GBS-Patienten IgG-Antikörper gefunden werden [53]. Dementgegen stehen Daten aus derselben Arbeitsgruppe, in denen bei 6 von 13 (46,2%) CIDP- und 12 von 19 (63,2%) GBS-Patienten P0- und P2-spezifische T-Lymphozyten-proliferative Antworten gemessen werden konnten [54]. 8 Jahre später (2001) wurden erneut P0-spezifische IgG-Autoantikörper im Blut von CIDP-Patienten gesucht und bei 6 von 21 (28,6%) Patienten gefunden [50]. Die Zusammenschau dieser Daten liefert

verstärkt Hinweise auf eine T-Lymphozyten-getragene Immunpathogenese der CIDP, in der B-Lymphozyten eine untergeordnete Rolle spielen. Die aktuelle Literatur weist allerdings darauf hin, dass eine niedrigere Expression des immunsuppressiven Oberflächenrezeptors Fc- γ IIB auch bei gleichbleibenden Frequenzen der B-Lymphozyten für eine ungehemmte Aktivierung mit konsekutiver Antikörperproduktion verantwortlich sein könnte [87]. Weiterhin konnten Hinweise gefunden werden, dass IVIG-Transfusionen über eine Hochregulierung dieses immunsuppressiven B-Lymphozyten-Rezeptors Fc- γ IIB zum Therapieerfolg bei der CIDP beitragen könnten [88, 89].

Bei den Frequenzen der Monozyten konnten wir in dieser Studie keine Unterschiede im Vergleich zu gesunden Kontrollen und gleichbleibende Werte im Verlauf von 12 Monaten zeigen. Damit konnten wir die vorherigen Ergebnisse unserer eigenen Arbeitsgruppe und aus weiteren Studien nicht reproduzieren, in denen erhöhte Frequenzen der Monozyten bei CIDP-Patienten gezeigt werden konnten [40, 43]. Gründe könnten in der unterschiedlichen Zusammensetzung der Kohorte liegen, da die von uns gemessenen gleichbleibenden Frequenzen der Monozyten durch den Anteil an Patienten bedingt sein könnte, der bereits zuvor einer immunsuppressiven oder –modulatorischen Therapie unterzogen worden war (15/28, 53,6%). Monozyten sind die im Blut zirkulierenden Vorläufer der gewebeständigen Makrophagen. Bei GBS- sowie CIDP-Patienten wurde gezeigt, dass Makrophagen an den Orten der neuroinflammatorischen Läsionen maßgeblich zu der Zerstörung des neuronalen Gewebes beitragen, indem sie als APZ den T-Lymphozyten Antigene präsentieren und über B7-Moleküle kostimulatorische Signale für die T-Lymphozyten-Aktivierung zur Verfügung stellen [28].

Eine besondere Rolle in unserer Analyse nahmen die NK-Zellen ein, da sie als einzige Lymphozytenpopulation in ihren Frequenzen konstant zu jedem der 5 Messzeitpunkte (12 Monate) statistisch signifikant unter den Werten der gesunden Kontrollen lagen. Dies entspricht der aktuellen Literatur, in der bereits erniedrigte NK-Zell-Frequenzen bei therapienaiven CIDP-Patienten nachgewiesen werden konnten [40]. Welche zentrale Funktion NK-Zellen in der Induktion und Unterhaltung einer autoimmunen Entzündung unterschiedlicher Erkrankungen, wie rheumatoider Arthritis, Systemischer Lupus Erythematodes, Diabetes mellitus Typ 1 und MS, spielen, konnte belegt werden [90, 91]. Erklärungsansätze über diese zentrale Rolle bei der Aktivierung des zellulären Immunsystems liefert die Erkenntnis, dass NK-

Zellen über die Ausschüttung von IFN- γ eine Verschiebung der Immunantwort in Richtung Th1-Lymphozyten mit subsequenter Monozytenmigration und –aktivierung bewirken können [92]. Dies zeigt sich auch in der Anwendung immunsuppressiver und –modulatorischer Therapien bei Autoimmunerkrankungen. Denn dass sowohl immunsuppressive Therapien mit Glukokortikoiden [43] als auch immunmodulierende Therapien mit IVIG-Transfusionen [93] bei CIDP-Patienten zu niedrigeren Frequenzen und verminderter zytotoxischer Aktivität der NK-Zellen führen können, wurde nachgewiesen. Dies könnte zum klinischen Erfolg dieser Therapien bei CIDP-Patienten beitragen. In der vorliegenden Studie war es uns nun möglich, für diese These bestätigende Hinweise zu finden, da wir in der Subgruppe der anbehandelten gegenüber den therapienaiven Patienten eine deutliche Tendenz zu niedrigeren NK-Zell-Frequenzen beobachten konnten. Da NK-Zellen wahrscheinlich auch immunsuppressive Funktionen in vivo übernehmen können, könnten die erniedrigten Frequenzen in unserer Kohorte ebenfalls zu einer verstärkten Ausprägung des autoimmun-reaktiven Milieus beigetragen haben [94].

5.4 *Klinische und immunologische Charakterisierung der CIDP-Subgruppen*

Es ist als Stärke dieser Studie anzusehen, dass wir eine Subgruppeneinteilung mit besserer Vergleichbarkeit der Ergebnisse und Beobachtungen in verschiedenen Krankheitsstadien vornehmen konnten. In der aktuellen Literatur wurden bisher, außerhalb unserer eigenen Arbeitsgruppe [5, 43], keine immunchemischen oder immunzytologischen Subgruppenanalysen bei der CIDP durchgeführt. Bislang veröffentlichte Studien beschränken sich auf den Vergleich zwischen CIDP und gesunden Kontrollen [40, 50, 56] oder verglichen CIDP- mit GBS-Patienten und gesunden Kontrollen [33, 35, 41, 53, 55]. Hier verhalf uns die detaillierte CIDP-Datenbank der Hochschulambulanz zu einer differenzierten Subgruppeneinteilung. Die Größe und Reichweite unserer Ambulanz gemeinsam mit der Anwendung neuester diagnostischer Richtlinien ermöglichten uns die Rekrutierung von vorrangig klinisch-instabilen Patienten, die sich zum großen Teil in einem therapienaiven Anfangsstadium befanden. In dieser Krankheitsphase sind tendenziell die deutlichsten Immunantworten und größten Veränderungen im Laufe einer Therapie zu erwarten. Durch die Analyse der Subgruppen, in die wir die CIDP-Kohorte einteilten, konnten wir neue Erkenntnisse gewinnen, die im Folgenden diskutiert werden.

5.4.1 Anbehandelte CIDP-Patienten haben erniedrigte NK-Zell-Frequenzen

Wir teilten die Patienten in „therapienaiv“ und „anbehandelt“ ein. In der Analyse der Myelinantigen-spezifischen T-Lymphozyten-Antworten konnten wir zwischen diesen beiden Subgruppen keinen wesentlichen Unterschied feststellen. Die Auswertung der immunzytologischen Daten zeigte wie bei der Gesamtkohorte im Vergleich zu den gesunden Kontrollen eine Erhöhung der Frequenzen der CD4+ TEM und CD4+ TCM sowie die Tendenz zu erniedrigten CD4+ TEMRA-Frequenzen sowohl bei therapienaiven als auch bei anbehandelten Patienten. Im direkten Vergleich der beiden Gruppen lieferte unsere Auswertung darüber hinaus allerdings keinen neuen Anhalt für wesentliche Unterschiede, unter Ausnahme der NK-Zellen. Wir konnten für die Gruppe der anbehandelten gegenüber den therapienaiven Patienten eine deutliche Tendenz zu niedrigeren Frequenzen der NK-Zellen zeigen. Ebenso zeigten die „Anbehandelten“ gegenüber den gesunden Kontrollen signifikant erniedrigte NK-Zell-Frequenzen. Da, wie oben beschrieben (Seite 81), Glukokortikoid-[43] und IVIG-Therapien [93] reduzierend auf die NK-Zell-Frequenzen bei CIDP-Patienten wirken können, sind diese Therapien wahrscheinlich ursächlich für die von uns dargestellten erniedrigten Frequenzen. Dass wir für die gesamte Kohorte insgesamt auch erniedrigte NK-Zell-Frequenzen gegenüber den gesunden Kontrollen gemessen haben, könnte an dem hohen Anteil an „Anbehandelten“ liegen. Sie stellten mit 15 von 28 Patienten (53,6%) die Mehrheit und beeinflussten durch die stark erniedrigten NK-Zell-Frequenzen die Gesamtkohorte maßgeblich. Nach ausführlicher statistischer Beratung unterließen wir eine entsprechende Korrelationsanalyse wegen zu niedriger Fallzahlen. In nachfolgenden Studien wäre es aussichtsreich, ausschließlich therapienaive Patienten einzuschließen, um immunmodulatorische oder –suppressive Therapieeffekte auf die immunologischen Messwerte ausschließen zu können.

5.4.2 Aktiviertes Immunsystem im Frühstadium der Erkrankung

In einer weiteren Subgruppe („INCAT-Score>2“ vs. „≤2“) konnten wir erstmals für klinisch milder betroffene CIDP-Patienten (INCAT-Score≤2) die Tendenz zu erhöhten peripheren Myelinantigen-spezifischen T-Lymphozyten-Antworten, insbesondere auf PMP-22 120-133, P2 14-25, P2 61-70, P0 180-199 und MBP 82-100, nachweisen. In der immunzytologischen Analyse dieser Subgruppe konnten wir gegenüber der Gruppe der gravierender betroffenen Patienten (INCAT-

Score >2) signifikant erhöhte Frequenzen der CD4 $+$ und CD8 $+$ naiven T-Lymphozyten zeigen. In der Literatur konnte bereits belegt werden, dass die CIDP-ähnliche Pathogenese der MS ebenfalls durch MBP-spezifische T-Lymphozyten-Reaktionen ausgelöst werden kann und diese hauptsächlich von naiven T-Lymphozyten ausgehen [95]. Die Vordaten unserer Arbeitsgruppe zeigen, dass eine länger anhaltende klinische Remission der CIDP durch Glukokortikoide vs. IVIG-Therapie vor allem durch die Reduktion der Frequenzen der naiven T-Lymphozyten getragen wird [43]. Insofern scheinen die naiven T-Lymphozyten in der Immunpathogenese der CIDP eine maßgebliche Rolle zu spielen.

Der typische chronisch-progrediente Verlauf der CIDP und die klinische Erfahrung belegen, dass die körperliche Beeinträchtigung durch die CIDP im Lauf der Zeit immer gravierender wird. Somit weisen Patienten mit einer kürzer zurückliegenden Diagnosestellung tendenziell eine geringere Krankheitschwere (einen niedrigeren INCAT-Score) auf als andere. Je höher der Grad der Erkrankung desto größer ist auch das Ausmaß der axonalen Degeneration [12]. Unsere Daten zeigen hier die Tendenz zur Inaktivierung des Immunsystems bei höherem Krankheitsgrad. Dies könnte durch die längere, eventuell zum Teil subklinische Krankheitsphase mit folgender Abschwächung der Immunreaktion bedingt sein.

Wie oben beschrieben, lassen sich unsere Daten der Subgruppenanalyse „INCAT-Score >2 “ vs. „ ≤ 2 “ gut mit der Analyse der Subgruppe „Zeit seit Diagnosestellung >2 “ vs. „ ≤ 2 Jahre“ zusammenführen. Für diese Annahme sprechen auch unsere ELISPOT- sowie immunzytologischen Ergebnisse, die sowohl in der Gruppe „INCAT-Score ≤ 2 “ als auch in der Gruppe „Zeit seit Diagnosestellung ≤ 2 Jahre“ höhere T-Lymphozyten-Antworten bzw. Frequenzen der Lymphozytenpopulationen zeigen als in der jeweiligen Vergleichsgruppe.

In der Subgruppenanalyse „Zeit seit Diagnosestellung >2 “ vs. „ ≤ 2 Jahre“ konnten wir für die Patienten mit einer ≤ 2 Jahre zurückliegenden Diagnose eine Tendenz zu höheren Myelinantigen-spezifischen T-Lymphozyten-Antworten auf PMP-22 120-133, P2 14-25, P2 61-70 und MBP 82-100 beobachten. Gleichmaßen waren bei diesen Patienten die Frequenzen der B- und T-Lymphozyten tendenziell und die Frequenzen der CD4 $+$ und CD8 $+$ naiven T-Lymphozyten signifikant erhöht. Erhöhte Frequenzen der CD4 $+$ TEM oder CD4 $+$ TCM konnten wir nicht erneut nachweisen. Allerdings könnten die erhöhten CD4 $+$ und CD8 $+$ naiven T-Lymphozyten für eine wesentliche Rolle dieser T-Lymphozytenpopulationen in der frühen Phase der CIDP

bzw. allgemein bei autoimmunen Inflammationen sprechen. Einen ersten Hinweis auf die maßgebliche Funktion der naiven T-Lymphozyten für die demyelinisierende Neuroinflammation der CIDP konnten Vordaten unserer Arbeitsgruppe durch Glukokortikoid-induzierte klinische Remissionen bei gleichzeitig erniedrigten Frequenzen der naiven T-Lymphozyten liefern [43].

Im Vergleich zur Subgruppe „Zeit seit Diagnosestellung >2 Jahre“ deuten unsere Daten daher darauf hin, dass Patienten mit einem kurzen Krankheitsverlauf (≤ 2 Jahre) ein stärker aktiviertes inflammatorisches Milieu aufweisen und Immuntherapien in dieser Phase voraussichtlich am besten ansprechen.

5.4.3 Hohes inflammatorisches Milieu bei atypischen CIDP-Verläufen ermöglicht die Definition diagnostischer Schwellenwerte

Erfahrungen aus der klinischen Praxis und die aktuelle Literatur zeigen, dass Patienten mit einer atypischen Variante der CIDP, insbesondere einer DADS, oftmals schlechter auf Immuntherapien ansprechen als Patienten mit einer typischen CIDP [19-21]. In dieser Studie zeigten 10 von 10 Patienten mit einer typischen CIDP eine gutes Therapieansprechen (*responder*, definiert in Kapitel 2.3), wohingegen wir nur 9 von 16 (56,3%) Patienten mit atypischen CIDP-Verläufen als *responder* klassifizieren konnten. Wir konnten hier erstmals für Patienten mit einer atypischen CIDP die deutliche Tendenz zu erhöhten Antworten der T-Lymphozyten auf die peripheren Myelinantigene PMP-22, P0 180-199 und MBP 82-100 nachweisen. Eine Bestätigung dieser Ergebnisse deutet sich in unserer Analyse der Lymphozytenpopulationen an, in der für die Subgruppe „atypische CIDP“ gegenüber den Patienten mit einer typischen CIDP besonders die Frequenzen der CD4+ T-Lymphozyten sowie die CD4+ TEM und CD4+ TCM signifikant erhöht waren. Für die CIDP konnten bereits CD4+ sowie CD8+ TEM und TCM in erhöhter Frequenz im CSF nachgewiesen werden [49]. Da die maßgebliche entzündungsfördernde Rolle der CD4+ TEM schon in der CIDP-ähnlichen Immunpathogenese der MS [79] belegt werden konnte und allgemein für die Entstehung von Autoimmunerkrankungen verantwortlich gemacht wird [48], sind die CD4+ TEM und CD4+ TCM vermutlich in erster Linie für die von uns gemessenen hohen T-Lymphozyten-Antworten in der ELISPOT-Analyse verantwortlich. Die auch im Verlauf erhöhten Myelinantigen-spezifischen T-Lymphozyten-Antworten und gleichzeitig hohen Frequenzen der CD4+TEM sowie CD4+ TCM bei den Patienten mit atypischen CIDP-Verläufen könnten sich dadurch erklären lassen, dass es sich

bei den CIDP-Varianten ggf. um andere Krankheitsentitäten handelt und deshalb das Therapieansprechen unterschiedlich ausfallen bis vollständig ausbleiben kann. Das in unseren Analysen dargestellte stärker aktivierte inflammatorische Milieu der Patienten mit „atypischer CIDP“ könnte zu dem in der Literatur beschriebenen und von uns in dieser Studie beobachteten schlechteren Ansprechen auf in der CIDP etablierte immunmodulierende Therapien führen [19, 20, 61]. In diesem Zusammenhang könnten klinisch längere Therapiezeiträume oder eine Umstellung der Medikation erwogen werden. In der Literatur gibt es allerdings auch Hinweise darauf, dass sich CIDP-Varianten gleichermaßen gut mit IVIG-Transfusionen oder Glukokortikoiden therapieren lassen [10, 57]. Ebenfalls ist denkbar, dass die Patienten mit einer atypischen Variante der Erkrankung später diagnostiziert werden und somit länger ohne indizierte Immuntherapien bleiben. Diese Latenz der Therapie könnte zu einer frühzeitigeren axonalen Degeneration führen, die eine spätere klinische Symptomlinderung durch IVIG-Transfusionen oder Glukokortikoide schwieriger macht. Eine genauere Charakterisierung der atypischen Varianten, MADSAM, DADS etc., war uns nicht möglich, da die geringen Fallzahlen keine differenzierteren Aussagen zuließen. Interessanterweise konnten wir in dieser Studie für unsere beiden neu etablierten peripheren Myelinantigene, P0 180-199 und MBP 82-100, in der Gruppe der Patienten mit „atypischer CIDP“ erhöhte IFN- γ -Antworten messen. Zukünftig könnten diese beiden Antigene als Marker zur immunchemischen Differenzierung von typischen und atypischen Verläufen wegweisend sein:

Zur Bestätigung dieser Hypothese analysierten wir unsere Daten *post-hoc* nach der höchsten Trennschärfe. Wir legten den Grenzwert für MBP 82-100 auf 10 SFU/10⁶ PBMC im T-Lymphozyten-ELISPOT (siehe Kapitel 3.7). Dadurch konnten wir 75,0% (9/12, Sensitivität) der atypischen Verläufe mit einer Spezifität von 62,5% (5/8) korrekt zuordnen, positiv prädiktiver Wert (PPW) von 75,0% (9/12), negativ prädiktiver Wert (NPW) von 62,5% (5/8). Durch die gleiche Vorgehensweise definierten wir einen Grenzwert von 5 SFU/10⁶ PBMC für P0 180-199. Da 91,7% (11/12, Sensitivität) der atypischen Verläufe mit einer Spezifität von 62,5% (5/8) durch diesen Laborparameter zutreffend bestimmt werden konnten (PPW=78,6% (11/14), NPW=83,3% (5/6)), scheint die Aussagekraft dieses Tests höher zu sein.

Um zukünftig eine noch bessere Vorhersage der CIDP-Verläufe treffen zu können, sollten auch immunzytologische Daten in Betracht gezogen werden. Da in unseren Analysen die Unterschiede der Frequenzen bei CD4+ *Memory* Subpopulationen besonders deutlich waren, konzentrierten wir uns auf die Definition von Grenzwerten für CD4+ TEM und CD4+ TCM: Mit einem diagnostischen Schwellenwert von 0,240 CD4+ TEM/nl wäre es möglich gewesen, 82% (14/17, Sensitivität) der atypischen CIDP-Verläufe mit einer Spezifität von 78,0% (7/9) präzise zu diagnostizieren (PPW=88,0% (14/16), NPW=70,0% (7/10)). Bei den CD4+ TCM ergab sich bei 0,275/nl die höchste Trennschärfe und es hätte die zutreffende Diagnose bei 76,0% (13/17) der atypischen Verläufe mit einer Spezifität von 78,0% (7/9) gestellt werden können (PPW=87,0% (13/15), NPW=64,0% (7/11)). Um bestmögliche prädiktive Aussagen über den individuelle CIDP-Verlauf zu erlangen, empfehlen wir in der klinischen Diagnostik sowohl immunchemische (P0 180-199-, MBP 82-100-spezifische T-Lymphozyten-Reaktionen) als auch immunzytologische (CD4+ TEM-, CD4+ TCM-Frequenzen) Parameter zu analysieren und in Bezug zur Klinik zu setzen. Wir glauben, dass diese Parameter zukünftig wichtige Grenzwerte zur Diagnose einer atypischen CIDP markieren, die uns auch individuellere Aussagen über Therapieansprechen und Prognose ermöglichen könnten.

Da dies eine *post-hoc*-Analyse darstellt, bedarf es einer Bestätigung unserer Ergebnisse durch nachfolgende Studien. Prospektive multizentrische Kohortenstudien, die aktuelle diagnostische Richtlinien und Bewertungsskalen einsetzen, könnten hier eine feinere Beschreibung dieser atypischen CIDP-Varianten liefern und unsere Ergebnisse zu den CIDP-Subgruppen bestätigen. Für weitere Analysen wären einerseits klinische und elektrophysiologische Parameter aber andererseits auch immunzytologische und immunchemische Methoden nützlich, um Krankheitsverlauf und Therapieansprechen in Korrelation zu Laborveränderungen setzen zu können.

5.5 Limitationen der Arbeit

Im Rahmen dieser Kohortenstudie wurden 28 CIDP-Patienten prospektiv über einen Verlauf von 12 Monaten untersucht. Die Patienten befanden sich zum Zeitpunkt des Einschlusses in die Studie fast ausschließlich in einem klinisch-instabilen, aktiven Stadium der Erkrankung. Zu jeder Visite fanden eine definierte

klinische Evaluation des Krankheitsbildes sowie Blutentnahmen zur Analyse der T-Lymphozyten-Antworten auf periphere Myelinantigene und der Frequenzen der Lymphozytenpopulationen statt. Hierzu verwendeten wir die Methoden ELISPOT und FACS.

Besondere Schwierigkeiten, denen wir im Verlauf dieser Studie begegnet sind, waren vor allem der Seltenheit der Erkrankung geschuldet. So war es schwierig, eine ausreichend große Anzahl an Patienten zu rekrutieren. Einerseits war es unser Anliegen, Patienten mit chronisch-stabilen sowie inaktiven Verläufen auszuschließen, da von diesen sowohl klinisch als auch immunchemisch keine Therapieantwort zu erwarten war. Andererseits war die Rekrutierung einer ausreichend großen Anzahl therapienaiver CIDP-Patienten in der Frühphase der Erkrankung mühsam, da viele Patienten bereits bei Verdacht immunsuppressiv behandelt werden. Somit waren große Zeiträume mit unterschiedlichen Therapieversuchen vor endgültiger Diagnosestellung und Überweisung an unsere Hochschulambulanz möglich. Während dieser ambulanten Betreuung konnten wir nicht für einheitliche Therapien oder Bewertungsskalen garantieren und die Befunde deshalb nicht für unsere Studie nutzen. Trotz der Größe und Reichweite unserer Neurologischen Hochschulambulanz konnten wir zur *Baseline*-Untersuchung so lediglich eine Kohorte von 28 Patienten rekrutieren. Die geringe Größe der Stichprobe limitierte zum einen die Untersuchung weiterer Subgruppen und erschwerte zusätzlich die Ermittlung statistisch signifikanter Werte. Weiterhin ist zu bemerken, dass Logistik und Organisation der Studie durch die wegen der Seltenheit der Erkrankung langen Anreisewege der Patienten sowie durch das hohe Alter und damit einhergehenden Begleiterkrankungen behindert wurden. Zusätzlich führte der lange Studienverlauf von 12 Monaten dazu, dass Begleiterkrankungen, Umzüge von Wohnsitzen und weitere patientenspezifische Veränderungen vorkamen, die zum Ausschluss aus der Studie führten. Aus diesen Gründen wurde die Anzahl an Messwerten reduziert. Bei den Versuchen die Vergleichbarkeit unserer Ergebnisse durch Subgruppenanalysen zu verbessern, ergaben sich daher vereinzelt sehr geringe Fallzahlen. Eine statistische Auswertung dieser Analysen war stark limitiert und teilweise nur deskriptiv möglich.

Weiterhin versuchten wir, spezifische Merkmale der jeweiligen Subgruppen mit unseren ELISPOT- und FACS-Ergebnissen zu korrelieren. Allerdings entschieden

wir uns im Verlauf gegen eine entsprechende Korrelationsanalyse, da die Anzahl an Patienten hierfür zu gering war.

Als explorative Pilotstudie können nachfolgende Studien auf unseren Daten aufbauen. Die von uns gewählten Kriterien zur Subgruppeneinteilung erwiesen sich als nützlich und könnten in Zukunft weiter präzisiert werden. Dabei deuten die Befunde unserer terminlich eng gesetzten Visiten darauf hin, dass eine Unterteilung in größere klinische Abstände sinnvoll wäre. So liegt der von uns gewählte Grenzwert von 2 Jahren in einem sehr frühen Stadium dieser über lange Jahre chronisch-progredient verlaufenden Erkrankung. Deshalb wäre eine Unterteilung bspw. in „Zeit seit Diagnosestellung < 1 Jahr“ und „> 10 Jahre“ anzuraten. Ebenfalls ließe sich der Schweregrad der Erkrankung deutlicher unterteilen (bspw. in „INCAT-Score ≤ 2 “ vs. „> 5“). Bei einer solchen Einteilung wären die Unterschiede in den Laboranalysen voraussichtlich deutlicher. Uns standen für derartige Differenzierungen aufgrund der Seltenheit der Erkrankung und trotz Größe unserer Hochschulambulanz zu wenig CIDP-Patienten zur Verfügung.

Insgesamt gelang es uns dennoch, eine genaue klinische Einteilung unserer Kohorte in verschiedene Subgruppen vorzunehmen. Dies ist in der Literatur bislang einmalig und ermöglichte es uns, immunchemische und immunzytologische Charakterisierungen dieser Subgruppen vorzunehmen. Dass wir dabei auf eine Kohorte zurückgreifen konnten, die sich laut aktuellen Richtlinien zu 78,6% (22/28) in einem klinisch-instabilen Krankheitsstadium befand, steigert die Aussagekraft unserer Studie weiter. Dennoch wäre für nachfolgende Studien zu beherzigen, dass einerseits sowohl eine größere Kohorte mit der Erhebung weiterer klinischer Daten (wie bspw. Schmerzen, Fatigue oder Tremor) und andererseits ein längerer Studienverlauf nötig sind, um die Frage nach individuellen Krankheitsverläufen sowie der immunmodulierenden Wirkung der IVIG in der CIDP hinreichend klären zu können.

5.6 Schlussfolgerung und Ausblick

Im Rahmen dieser Studie untersuchten wir eine Kohorte von 28 CIDP-Patienten in einem klinisch-instabilen Krankheitsstadium über einen Zeitraum von 12 Monaten. Zu 5 Untersuchungszeitpunkten erhoben wir klinisch den Krankheitsverlauf und das Therapieansprechen, immunzytologisch die Lymphozytenpopulationen sowie immunchemisch die T-Lymphozyten-Antworten auf periphere Myelinantigene. Die Zusammenarbeit mit der Neurologischen Hochschulambulanz der Charité Universitätsmedizin Berlin und Einsicht in die dort geführte CIDP-Datenbank ermöglichten uns die Subgruppeneinteilung unserer Kohorte mit detaillierterer Einsicht in die Immunpathogenese der CIDP.

Ziel der Studie war es, Immunmarker zu identifizieren, die als unterstützende Diagnoseparameter der CIDP herangezogen werden können. Welche große klinische Relevanz diese Suche hat, zeigt die Fehldiagnosequote von 47% bei Patienten der *Northwestern University* (Chicago, USA) [3]. In der vorliegenden Studie konnten wir nun die von uns formulierten Hypothesen präzisieren und drei wesentliche, neue Erkenntnisse liefern:

Erstens gelang es uns, erstmalig signifikant erhöhte T-Lymphozyten-Antworten bei CIDP-Patienten auf die peripheren Myelinantigene P0 180-199 und MBP 82-100 darzustellen, was für deren immunpathogenetische Relevanz sprechen könnte. Obwohl wir bisher keine Schwellenwerte für die Diagnose der CIDP festlegen konnten, bleiben periphere Myelinantigene, wie PMP-22, P2 und jetzt auch P0 180-199 und MBP 82-100, die vielversprechendsten Immunmarker.

Zweitens ließ sich bei Patienten mit einer atypischen Variante der CIDP anhand von höheren Myelinantigen-spezifischen T-Lymphozyten-Antworten und erhöhten Frequenzen der Lymphozytenpopulationen ein stärker aktiviertes inflammatorisches Milieu beschreiben. Um diese immunologischen Erkenntnisse zukünftig klinisch nutzen zu können, definierten wir *post-hoc* Schwellenwerte für die T-Lymphozyten-Reaktionen auf P0 180-199 und MBP 82-100 sowie für die Frequenzen der CD4+ *Memory* T-Lymphozyten (TEM, TCM). Diese Ergebnisse könnten nach einer Bestätigung durch nachfolgende Studien zu einer sichereren Differenzierung der Krankheitsverläufe der CIDP und damit zu individuelleren Aussagen über die Prognose führen.

Drittens konnten wir nachweisen, dass sich sowohl bei Patienten in der Frühphase der CIDP als auch bei Patienten mit einem noch mildereren Schweregrad

der Erkrankung höhere Myelinantigen-spezifische T-Lymphozyten-Antworten und erhöhte Frequenzen der Lymphozytenpopulationen messen lassen. Zusammenfassend sind dies wichtige Erkenntnisse, da sie für die Empfehlung einer frühzeitigen immunmodulierenden oder –suppressiven Therapie wissenschaftliche Grundlagen liefern. Ein frühzeitiger Therapiebeginn kann bewiesenermaßen einer irreversiblen axonalen Degeneration entgegenwirken [16]. Demnach könnte das Therapieprinzip „*Hit hard and early*“ angesichts des von uns dargestellten hohen inflammatorischen Milieus zu Beginn der Erkrankung sowie bei klinisch milder betroffenen Patienten zukünftig auch in der Therapie der CIDP zur Maxime werden und die heutigen Richtlinien ergänzen. Denn aktuell sehen diese erst ab Einschränkungen des täglichen Lebens oder bei Progression der Symptome immunsuppressive oder –modulierende Therapien vor [17, 96, 97]. Zur Klärung dieser Hypothese werden wir in weiteren Studien die Therapieverläufe unserer CIDP-Patienten in Bezug zu den erhobenen Laborwerten setzen.

Um das für unsere Arbeitsgruppe längerfristige Ziel der Identifizierung von Immunmarkern, die prädiktiv individuelle Aussagen über Krankheitsverlauf und Therapieansprechen erlauben, erreichen zu können, bedarf es größer konzipierter und auf längere Zeit angelegter prospektiver multizentrischer Kohortenstudien. Unsere Studie stellt eine explorative Pilotstudie dar. Nachfolgenden Studien empfehlen wir, einerseits klinische Parameter aber auch immunzytologische sowie immunchemische Methoden zu verwenden. Dabei wäre es angezeigt, Krankheitsverlauf und Therapieansprechen in Korrelation zu den im Labor ermittelten Schwellenwerten für T-Lymphozyten-Antworten auf periphere Myelinantigene (PMP-22, P2, P0 180-199, MBP 82-100) und Frequenzen der Lymphozytenpopulationen (CD4+ *Memory* T-Lymphozyten) zu setzen. Da die differentialdiagnostische Abgrenzung der CIDP zu anderen chronischen Polyneuropathien das vorrangige Problem im klinischen Alltag darstellt, wäre eine Kontrollgruppe aus Patienten mit Polyneuropathien nicht-autoimmuner Genese besser geeignet.

6 SCHRIFTENVERZEICHNIS

1. Lunn, M.P., H. Manji, P.P. Choudhary, R.A. Hughes and P.K. Thomas, *Chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy: a prevalence study in south east England*. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 1999. **66**(5): p. 677-80.
2. Mahdi-Rogers, M. and R.A. Hughes, *Epidemiology of chronic inflammatory neuropathies in southeast England*. Eur J Neurol, 2014. **21**(1): p. 28-33.
3. Allen, J.A. and R.A. Lewis, *CIDP diagnostic pitfalls and perception of treatment benefit*. Neurology, 2015. **85**(6): p. 498-504.
4. Vallat, J.M., C. Sommer and L. Magy, *Chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy: diagnostic and therapeutic challenges for a treatable condition*. Lancet Neurol, 2010. **9**(4): p. 402-12.
5. Klehmet, J., J. Goehler, L. Ulm, S. Kohler, C. Meisel, A. Meisel and H. Harms, *Effective treatment with intravenous immunoglobulins reduces autoreactive T-cell response in patients with CIDP*. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 2015. **86**(6): p. 686-91.
6. Dalakas, M.C., *Clinical trials in CIDP and chronic autoimmune demyelinating polyneuropathies*. J Peripher Nerv Syst, 2012. **17 Suppl 2**: p. 34-9.
7. Koller, H., B.C. Kieseier, S. Jander and H.P. Hartung, *Chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy*. N Engl J Med, 2005. **352**(13): p. 1343-56.
8. Said, G., *Chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy*. Neuromuscul Disord, 2006. **16**(5): p. 293-303.
9. Latov, N., *Diagnosis and treatment of chronic acquired demyelinating polyneuropathies*. Nat Rev Neurol, 2014. **10**(8): p. 435-46.
10. Eftimov, F. and I. van Schaik, *Chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy: update on clinical features, phenotypes and treatment options*. Curr Opin Neurol, 2013. **26**(5): p. 496-502.
11. Van den Bergh, P.Y., R.D. Hadden, P. Bouche, D.R. Cornblath, A. Hahn, I. Illa, C.L. Koski, J.M. Leger, E. Nobile-Orazio, J. Pollard, C. Sommer, P.A. van Doorn, I.N. van Schaik, S. European Federation of Neurological and S. Peripheral Nerve, *European Federation of Neurological Societies/Peripheral Nerve Society guideline on management of chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy: report of a joint task force of the European Federation of Neurological Societies and the Peripheral Nerve Society - first revision*. Eur J Neurol, 2010. **17**(3): p. 356-63.
12. Hughes, R.A., D. Allen, A. Makowska and N.A. Gregson, *Pathogenesis of chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy*. J Peripher Nerv Syst, 2006. **11**(1): p. 30-46.
13. Austin, J.H., *Recurrent polyneuropathies and their corticosteroid treatment; with five-year observations of a placebo-controlled case treated with corticotrophin, cortisone, and prednisone*. Brain, 1958. **81**(2): p. 157-92.
14. Czaplinski, A. and A.J. Steck, *Immune mediated neuropathies--an update on therapeutic strategies*. J Neurol, 2004. **251**(2): p. 127-37.
15. Cocito, D., I. Paolasso, G. Antonini, L. Benedetti, C. Briani, C. Comi, R. Fazio, S. Jann, S. Mata, A. Mazzeo, M. Sabatelli, E. Nobile-Orazio and C.R. Italian Network for, *A nationwide retrospective analysis on the effect of immune therapies in patients with chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy*. Eur J Neurol, 2010. **17**(2): p. 289-94.
16. Dalakas, M.C. and Medscape, *Advances in the diagnosis, pathogenesis and treatment of CIDP*. Nat Rev Neurol, 2011. **7**(9): p. 507-17.
17. Lauria, G., S.T. Hsieh, O. Johansson, W.R. Kennedy, J.M. Leger, S.I. Mellgren, M. Nolano, I.S. Merkies, M. Polydefkis, A.G. Smith, C. Sommer, J. Valls-Sole, S. European Federation of Neurological and S. Peripheral Nerve, *European Federation of Neurological Societies/Peripheral Nerve Society Guideline on the use of skin biopsy in the diagnosis of small fiber neuropathy. Report of a joint task force of the European Federation of Neurological Societies and the Peripheral Nerve Society*. Eur J Neurol, 2010. **17**(7): p. 903-12, e44-9.

18. Bright, R.J., J. Wilkinson and B.J. Coventry, *Therapeutic options for chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy: a systematic review*. BMC Neurol, 2014. **14**: p. 26.
19. Katz, J.S., D.S. Saperstein, G. Gronseth, A.A. Amato and R.J. Barohn, *Distal acquired demyelinating symmetric neuropathy*. Neurology, 2000. **54**(3): p. 615-20.
20. Larue, S., F. Bombelli, K. Viala, J. Neil, T. Maisonobe, P. Bouche, L. Musset, E. Fournier and J.M. Leger, *Non-anti-MAG DADS neuropathy as a variant of CIDP: clinical, electrophysiological, laboratory features and response to treatment in 10 cases*. Eur J Neurol, 2011. **18**(6): p. 899-905.
21. Nobile-Orazio, E., *Chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy and variants: where we are and where we should go*. J Peripher Nerv Syst, 2014. **19**(1): p. 2-13.
22. Cats, E.A., W.L. van der Pol, S. Piepers, H. Franssen, B.C. Jacobs, R.M. van den Berg-Vos, J.B. Kuks, P.A. van Doorn, B.G. van Engelen, J.J. Verschuuren, J.H. Wokke, J.H. Veldink and L.H. van den Berg, *Correlates of outcome and response to IVIg in 88 patients with multifocal motor neuropathy*. Neurology, 2010. **75**(9): p. 818-25.
23. Hughes, R.A., P. Donofrio, V. Bril, M.C. Dalakas, C. Deng, K. Hanna, H.P. Hartung, N. Latov, I.S. Merkies, P.A. van Doorn and I.C.E.S. Group, *Intravenous immune globulin (10% caprylate-chromatography purified) for the treatment of chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy (ICE study): a randomised placebo-controlled trial*. Lancet Neurol, 2008. **7**(2): p. 136-44.
24. Breiner, A., C. Barnett and V. Bril, *INCAT disability score: a critical analysis of its measurement properties*. Muscle Nerve, 2014. **50**(2): p. 164-9.
25. Vanhoutte, E.K., C.G. Faber, S.I. van Nes, B.C. Jacobs, P.A. van Doorn, R. van Koningsveld, D.R. Cornblath, A.J. van der Kooi, E.A. Cats, L.H. van den Berg, N.C. Notermans, W.L. van der Pol, M.C. Hermans, N.A. van der Beek, K.C. Gorson, M. Eurlings, J. Engelsman, H. Boot, R.J. Meijer, G. Lauria, A. Tennant and I.S. Merkies, *Modifying the Medical Research Council grading system through Rasch analyses*. Brain, 2012. **135**(Pt 5): p. 1639-49.
26. Vanhoutte, E.K., N. Latov, C. Deng, K. Hanna, R.A. Hughes, V. Bril, M.C. Dalakas, P. Donofrio, P.A. van Doorn, H.P. Hartung and I.S. Merkies, *Vigormeter grip strength in CIDP: a responsive tool that rapidly measures the effect of IVIG--the ICE study*. Eur J Neurol, 2013. **20**(5): p. 748-55.
27. Dalakas, M.C. and W.K. Engel, *Immunoglobulin and complement deposits in nerves of patients with chronic relapsing polyneuropathy*. Arch Neurol, 1980. **37**(10): p. 637-40.
28. Kiefer, R., B.C. Kieseier, G. Stoll and H.P. Hartung, *The role of macrophages in immune-mediated damage to the peripheral nervous system*. Prog Neurobiol, 2001. **64**(2): p. 109-27.
29. Kieseier, B.C., R. Kiefer, R. Gold, B. Hemmer, H.J. Willison and H.P. Hartung, *Advances in understanding and treatment of immune-mediated disorders of the peripheral nervous system*. Muscle Nerve, 2004. **30**(2): p. 131-56.
30. Janeway, C.A., Jr., *How the immune system protects the host from infection*. Microbes Infect, 2001. **3**(13): p. 1167-71.
31. Bertram, S., *Einfluss humoraler Faktoren auf die neuromuskuläre Transmission bei der chronischen inflammatorischen demyelinisierenden Polyneuropathie (CIDP)*. 2010, Ludwig-Maximilians-Universität München: Munich. p. 96.
32. Mathey, E.K., J.D. Pollard and P.J. Armati, *TNF alpha, IFN gamma and IL-2 mRNA expression in CIDP sural nerve biopsies*. J Neurol Sci, 1999. **163**(1): p. 47-52.
33. Hartung, H.P., K. Reiners, B. Schmidt, G. Stoll and K.V. Toyka, *Serum interleukin-2 concentrations in Guillain-Barre syndrome and chronic idiopathic demyelinating polyradiculoneuropathy: comparison with other neurological diseases of presumed immunopathogenesis*. Ann Neurol, 1991. **30**(1): p. 48-53.

34. Misawa, S., S. Kuwabara, M. Mori, N. Kawaguchi, Y. Yoshiyama and T. Hattori, *Serum levels of tumor necrosis factor-alpha in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy*. *Neurology*, 2001. **56**(5): p. 666-9.
35. Csurhes, P.A., A.A. Sullivan, K. Green, M.P. Pender and P.A. McCombe, *T cell reactivity to P0, P2, PMP-22, and myelin basic protein in patients with Guillain-Barre syndrome and chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy*. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 2005. **76**(10): p. 1431-9.
36. Andreasen, S.O., J.E. Christensen, O. Marker and A.R. Thomsen, *Role of CD40 ligand and CD28 in induction and maintenance of antiviral CD8+ effector T cell responses*. *J Immunol*, 2000. **164**(7): p. 3689-97.
37. Steinke, J.W. and M.G. Lawrence, *T-cell biology in immunotherapy*. *Ann Allergy Asthma Immunol*, 2014. **112**(3): p. 195-9.
38. Lanzavecchia, A. and F. Sallusto, *Dynamics of T lymphocyte responses: intermediates, effectors, and memory cells*. *Science*, 2000. **290**(5489): p. 92-7.
39. D'Asaro, M., F. Dieli, N. Caccamo, M. Musso, F. Porretto and A. Salerno, *Increase of CCR7- CD45RA+ CD8 T cells (T(EMRA)) in chronic graft-versus-host disease*. *Leukemia*, 2006. **20**(3): p. 545-7.
40. Sanvito, L., A. Makowska, N. Gregson, R. Nemni and R.A. Hughes, *Circulating subsets and CD4(+)CD25(+) regulatory T cell function in chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy*. *Autoimmunity*, 2009. **42**(8): p. 667-77.
41. Van den Berg, L.H., I. Mollee, J.H. Wokke and T. Logtenberg, *Increased frequencies of HPRT mutant T lymphocytes in patients with Guillain-Barre syndrome and chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy: further evidence for a role of T cells in the etiopathogenesis of peripheral demyelinating diseases*. *J Neuroimmunol*, 1995. **58**(1): p. 37-42.
42. Adam, A.M., P.F. Atkinson, S.M. Hall, R.A. Hughes and W.A. Taylor, *Chronic experimental allergic neuritis in Lewis rats*. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 1989. **15**(3): p. 249-64.
43. Klehmet, J., M. Staudt, L. Ulm, N. Unterwalder, A. Meisel and C. Meisel, *Circulating lymphocyte and T memory subsets in glucocorticosteroid versus IVIG treated patients with CIDP*. *J Neuroimmunol*, 2015. **283**: p. 17-22.
44. Mausberg, A.K., M. Dorok, M. Stettner, M. Muller, H.P. Hartung, T. Dehmel, C. Warnke, G. Meyer Zu Horste and B.C. Kieseier, *Recovery of the T-cell repertoire in CIDP by IV immunoglobulins*. *Neurology*, 2013. **80**(3): p. 296-303.
45. Sen, Y., H. Chunsong, H. Baojun, Z. Linjie, L. Qun, J. San, Z. Qiuping, L. Junyan, X. Zhang and T. Jinqun, *Aberration of CCR7 CD8 memory T cells from patients with systemic lupus erythematosus: an inducer of T helper type 2 bias of CD4 T cells*. *Immunology*, 2004. **112**(2): p. 274-89.
46. Haegele, K.F., C.A. Stueckle, J.P. Malin and E. Sindern, *Increase of CD8+ T-effector memory cells in peripheral blood of patients with relapsing-remitting multiple sclerosis compared to healthy controls*. *J Neuroimmunol*, 2007. **183**(1-2): p. 168-74.
47. Abdulahad, W.H., Y.M. van der Geld, C.A. Stegeman and C.G. Kallenberg, *Persistent expansion of CD4+ effector memory T cells in Wegener's granulomatosis*. *Kidney Int*, 2006. **70**(5): p. 938-47.
48. Kleinewietfeld, M. and D.A. Hafler, *Regulatory T cells in autoimmune neuroinflammation*. *Immunol Rev*, 2014. **259**(1): p. 231-44.
49. Giunti, D., G. Borsellino, R. Benelli, M. Marchese, E. Capello, M.T. Valle, E. Pedemonte, D. Noonan, A. Albin, G. Bernardi, G.L. Mancardi, L. Battistini and A. Uccelli, *Phenotypic and functional analysis of T cells homing into the CSF of subjects with inflammatory diseases of the CNS*. *J Leukoc Biol*, 2003. **73**(5): p. 584-90.
50. Yan, W.X., J.J. Archelos, H.P. Hartung and J.D. Pollard, *P0 protein is a target antigen in chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy*. *Ann Neurol*, 2001. **50**(3): p. 286-92.

51. Zhu, J., H. Link, E. Mix, T. Olsson and W.X. Huang, *Th1-like cell responses to peripheral nerve myelin components over the course of experimental allergic neuritis in Lewis rats*. Acta Neurol Scand, 1994. **90**(1): p. 19-25.
52. Maurer, M., K.V. Toyka and R. Gold, *Immune mechanisms in acquired demyelinating neuropathies: lessons from animal models*. Neuromuscul Disord, 2002. **12**(4): p. 405-14.
53. Khalili-Shirazi, A., P. Atkinson, N. Gregson and R.A. Hughes, *Antibody responses to P0 and P2 myelin proteins in Guillain-Barre syndrome and chronic idiopathic demyelinating polyradiculoneuropathy*. J Neuroimmunol, 1993. **46**(1-2): p. 245-51.
54. Khalili-Shirazi, A., R.A. Hughes, S.W. Brostoff, C. Linington and N. Gregson, *T cell responses to myelin proteins in Guillain-Barre syndrome*. J Neurol Sci, 1992. **111**(2): p. 200-3.
55. Taylor, W.A., S.W. Brostoff and R.A. Hughes, *P2 specific lymphocyte transformation in Guillain-Barre syndrome and chronic idiopathic demyelinating polyradiculoneuropathy*. J Neurol Sci, 1991. **104**(1): p. 52-5.
56. Lin, J.T., V. Rowe, S.W. Brostoff and N.I. Abdou, *Lymphocyte studies in a patient with chronic polyradiculoneuropathy*. Neurology, 1982. **32**(10): p. 1127-32.
57. Dalakas, M.C., *Pathogenesis of immune-mediated neuropathies*. Biochim Biophys Acta, 2015. **1852**(4): p. 658-666.
58. Kim, H.J., C.G. Jung, M.A. Jensen, D. Dukala and B. Soliven, *Targeting of myelin protein zero in a spontaneous autoimmune polyneuropathy*. J Immunol, 2008. **181**(12): p. 8753-60.
59. Pette, M., K. Fujita, D. Wilkinson, D.M. Altmann, J. Trowsdale, G. Giegerich, A. Hinkkanen, J.T. Epplen, L. Kappos and H. Wekerle, *Myelin autoreactivity in multiple sclerosis: recognition of myelin basic protein in the context of HLA-DR2 products by T lymphocytes of multiple-sclerosis patients and healthy donors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(20): p. 7968-72.
60. Wucherpfennig, K.W., I. Catz, S. Hausmann, J.L. Strominger, L. Steinman and K.G. Warren, *Recognition of the immunodominant myelin basic protein peptide by autoantibodies and HLA-DR2-restricted T cell clones from multiple sclerosis patients. Identity of key contact residues in the B-cell and T-cell epitopes*. J Clin Invest, 1997. **100**(5): p. 1114-22.
61. Gorson, K.C., I.N. van Schaik, I.S. Merkies, R.A. Lewis, R.J. Barohn, C.L. Koski, D.R. Cornblath, R.A. Hughes, A.F. Hahn, M. Baumgarten, J. Goldstein, J. Katz, M. Graves, G. Parry and P.A. van Doorn, *Chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy disease activity status: recommendations for clinical research standards and use in clinical practice*. J Peripher Nerv Syst, 2010. **15**(4): p. 326-33.
62. Anthony, D.D. and P.V. Lehmann, *T-cell epitope mapping using the ELISPOT approach*. Methods, 2003. **29**(3): p. 260-9.
63. Lehmann, P.V. and W. Zhang, *Unique strengths of ELISPOT for T cell diagnostics*. Methods Mol Biol, 2012. **792**: p. 3-23.
64. Ott, P.A., B.R. Berner, B.A. Herzog, R. Guerkov, N.L. Yonkers, I. Durinovic-Bello, M. Tary-Lehmann, P.V. Lehmann and D.D. Anthony, *CD28 costimulation enhances the sensitivity of the ELISPOT assay for detection of antigen-specific memory effector CD4 and CD8 cell populations in human diseases*. J Immunol Methods, 2004. **285**(2): p. 223-35.
65. Germann, A., J.C. Schulz, B. Kemp-Kamke, H. Zimmermann and H. von Briesen, *Standardized Serum-Free Cryomedia Maintain Peripheral Blood Mononuclear Cell Viability, Recovery, and Antigen-Specific T-Cell Response Compared to Fetal Calf Serum-Based Medium*. Biopreserv Biobank, 2011. **9**(3): p. 229-236.
66. Kreher, C.R., M.T. Dittrich, R. Guerkov, B.O. Boehm and M. Tary-Lehmann, *CD4+ and CD8+ cells in cryopreserved human PBMC maintain full functionality in cytokine ELISPOT assays*. J Immunol Methods, 2003. **278**(1-2): p. 79-93.
67. Zhang, H.L., S. Azimullah, X.Y. Zheng, X.K. Wang, N. Amir, E.P. Mensah-Brown, M. Al Shamsi, A. Shahin, R. Press, J. Zhu and A. Adem, *IFN-gamma deficiency*

- exacerbates experimental autoimmune neuritis in mice despite a mitigated systemic Th1 immune response.* J Neuroimmunol, 2012. **246**(1-2): p. 18-26.
68. Zhang, H.L., M.Y. Hassan, X.Y. Zheng, S. Azimullah, H.C. Quezada, N. Amir, M. Elwasila, E. Mix, A. Adem and J. Zhu, *Attenuated EAN in TNF-alpha deficient mice is associated with an altered balance of M1/M2 macrophages.* PLoS One, 2012. **7**(5): p. e38157.
69. Zhu, Y., H. Ljunggren, E. Mix, H.L. Li, P. van der Meide, A.M. Elhassan, B. Winblad and J. Zhu, *CD28-B7 costimulation: a critical role for initiation and development of experimental autoimmune neuritis in C57BL/6 mice.* J Neuroimmunol, 2001. **114**(1-2): p. 114-21.
70. Mannie, M.D., P.Y. Paterson, D.C. U'Prichard and G. Flouret, *Induction of experimental allergic encephalomyelitis in Lewis rats with purified synthetic peptides: delineation of antigenic determinants for encephalitogenicity, in vitro activation of cellular transfer, and proliferation of lymphocytes.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1985. **82**(16): p. 5515-9.
71. Brun, S., W. Beaino, L. Kremer, O. Taleb, A.G. Mensah-Nyagan, C.D. Lam, J.M. Greer, J. de Seze and E. Trifilieff, *Characterization of a new rat model for chronic inflammatory demyelinating polyneuropathies.* J Neuroimmunol, 2015. **278**: p. 1-10.
72. Kugler, S., K. Bocker, G. Heusipp, L. Greune, K.S. Kim and M.A. Schmidt, *Pertussis toxin transiently affects barrier integrity, organelle organization and transmigration of monocytes in a human brain microvascular endothelial cell barrier model.* Cell Microbiol, 2007. **9**(3): p. 619-32.
73. Schrempf, W. and T. Ziemssen, *Glatiramer acetate: mechanisms of action in multiple sclerosis.* Autoimmun Rev, 2007. **6**(7): p. 469-75.
74. Ziemssen, T., J. Hoffman, R. Apfel and S. Kern, *Effects of glatiramer acetate on fatigue and days of absence from work in first-time treated relapsing-remitting multiple sclerosis.* Health Qual Life Outcomes, 2008. **6**: p. 67.
75. Zhang, C.J., H. Zhai, Y. Yan, J. Hao, M.S. Li, W.N. Jin, N. Su, T.L. Vollmer and F.D. Shi, *Glatiramer acetate ameliorates experimental autoimmune neuritis.* Immunol Cell Biol, 2014. **92**(2): p. 164-9.
76. Mikulkova, Z., P. Praksova, P. Stourac, J. Bednarik, L. Strajtova, R. Pacasova, J. Belobradkova, P. Dite and J. Michalek, *Numerical defects in CD8+CD28- T-suppressor lymphocyte population in patients with type 1 diabetes mellitus and multiple sclerosis.* Cell Immunol, 2010. **262**(2): p. 75-9.
77. Segal, B.M., *Stage-specific immune dysregulation in multiple sclerosis.* J Interferon Cytokine Res, 2014. **34**(8): p. 633-40.
78. Matteucci, E., M. Ghimenti, S. Di Beo and O. Giampietro, *Altered proportions of naive, central memory and terminally differentiated central memory subsets among CD4+ and CD8+ T cells expressing CD26 in patients with type 1 diabetes.* J Clin Immunol, 2011. **31**(6): p. 977-84.
79. Mikulkova, Z., P. Praksova, P. Stourac, J. Bednarik and J. Michalek, *Imbalance in T-cell and cytokine profiles in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis.* J Neurol Sci, 2011. **300**(1-2): p. 135-41.
80. Devarajan, P. and Z. Chen, *Autoimmune effector memory T cells: the bad and the good.* Immunol Res, 2013. **57**(1-3): p. 12-22.
81. Grubeck-Loebenstien, B., S. Della Bella, A.M. Iorio, J.P. Michel, G. Pawelec and R. Solana, *Immunosenescence and vaccine failure in the elderly.* Aging Clin Exp Res, 2009. **21**(3): p. 201-9.
82. Goronzy, J.J. and C.M. Weyand, *Immune aging and autoimmunity.* Cell Mol Life Sci, 2012. **69**(10): p. 1615-23.
83. Migita, K., K. Eguchi, Y. Kawabe, T. Nakamura, S. Shirabe, T. Tsukada, Y. Ichinose, H. Nakamura and S. Nagataki, *Apoptosis induction in human peripheral blood T lymphocytes by high-dose steroid therapy.* Transplantation, 1997. **63**(4): p. 583-7.
84. Leussink, V.I., S. Jung, U. Merschorf, K.V. Toyka and R. Gold, *High-dose methylprednisolone therapy in multiple sclerosis induces apoptosis in peripheral blood leukocytes.* Arch Neurol, 2001. **58**(1): p. 91-7.

85. Ritter, C., D. Forster, P. Albrecht, H.P. Hartung, B.C. Kieseier and H.C. Lehmann, *IVIg regulates BAFF expression in patients with chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy (CIDP)*. J Neuroimmunol, 2014. **274**(1-2): p. 225-9.
86. Mitrevski, M., R. Marrapodi, A. Camponeschi, C. Lazzeri, L. Todi, I. Quinti, M. Fiorilli and M. Visentini, *Intravenous immunoglobulin replacement therapy in common variable immunodeficiency induces B cell depletion through differentiation into apoptosis-prone CD21(low) B cells*. Immunol Res, 2014. **60**(2-3): p. 330-8.
87. Tackenberg, B., I. Jelcic, A. Baerenwaldt, W.H. Oertel, N. Sommer, F. Nimmerjahn and J.D. Lunemann, *Impaired inhibitory Fcγ receptor IIB expression on B cells in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(12): p. 4788-92.
88. Nimmerjahn, F. and J.D. Lunemann, *Expression and function of the inhibitory Fcγ receptor in CIDP*. J Peripher Nerv Syst, 2011. **16 Suppl 1**: p. 41-4.
89. Tackenberg, B., F. Nimmerjahn and J.D. Lunemann, *Mechanisms of IVIG efficacy in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy*. J Clin Immunol, 2010. **30 Suppl 1**: p. S65-9.
90. Schleinitz, N., F. Vely, J.R. Harle and E. Vivier, *Natural killer cells in human autoimmune diseases*. Immunology, 2010. **131**(4): p. 451-8.
91. Fogel, L.A., W.M. Yokoyama and A.R. French, *Natural killer cells in human autoimmune disorders*. Arthritis Res Ther, 2013. **15**(4): p. 216.
92. Martin-Fontecha, A., L.L. Thomsen, S. Brett, C. Gerard, M. Lipp, A. Lanzavecchia and F. Sallusto, *Induced recruitment of NK cells to lymph nodes provides IFN-γ for T(H)1 priming*. Nat Immunol, 2004. **5**(12): p. 1260-5.
93. Bohn, A.B., L. Norderby, T. Harbo, A. Skovbo, T. Vorup-Jensen, J. Krog, J. Jakobsen and M.E. Hokland, *The effect of IgG levels on the number of natural killer cells and their Fc receptors in chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy*. Eur J Neurol, 2011. **18**(6): p. 919-24.
94. Lunemann, A., J.D. Lunemann and C. Munz, *Regulatory NK-cell functions in inflammation and autoimmunity*. Mol Med, 2009. **15**(9-10): p. 352-8.
95. Muraro, P.A., M. Pette, B. Bielekova, H.F. McFarland and R. Martin, *Human autoreactive CD4+ T cells from naive CD45RA+ and memory CD45RO+ subsets differ with respect to epitope specificity and functional antigen avidity*. J Immunol, 2000. **164**(10): p. 5474-81.
96. Van den Bergh, P.Y. and Y.A. Rajabally, *Chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy*. Presse Med, 2013. **42**(6 Pt 2): p. e203-15.
97. Eftimov, F. and I.N. van Schaik, *Immunotherapy of chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy*. Expert Opin Biol Ther, 2008. **8**(5): p. 643-55.

7 EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

„Ich, Maximilian Staudt, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema „Chronisch Inflammatorische Demyelinisierende Polyneuropathie - Immunmarker für Diagnose, Therapiestrategien und Prognose“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe. Der Hauptanteil meiner Arbeit bestand in der Durchführung der immunchemischen Analyse (ELISPOT) der Myelinantigen-spezifischen T-Lymphozyten-Reaktionen bei CIDP-Patienten über 12 Monate. Ebenfalls analysierte ich die immunzytologischen Daten (FACS) der Kohorte und wertete sie gemeinsam mit den Ergebnissen der T-Lymphozyten-Immunreaktionen im Vergleich zwischen CIDP-Subgruppen und gesunden Kontrollen aus.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „*Uniform Requirements for Manuscripts (URM)*“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

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

Datum

Unterschrift

Anteilserklärung an etwaigen erfolgten Publikationen

Maximilian Staudt hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1:

Klehmet J, Staudt M, Unterwalder N, Meisel A, Meisel C. Circulating lymphocyte and T memory subsets in glucocorticosteroid versus IVIG treated patients with CIDP. Journal of Neuroimmunology, 2015

Beitrag im Einzelnen:

- Auswahl möglicher Patienten, Akquirierung von Blut und fachgerechtes Versenden an das Labor Berlin, Auswertung und Analyse der immunzytologischen Daten sowie der klinischen Daten von Patienten und Kontrollen (Blutentnahme, Analyse der immunzytologischen Ergebnisse, Subgruppenbildung)
- Kritische Durchsicht und Korrektur des Manuskriptes

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers

Unterschrift des Doktoranden

8 *LEBENS LAUF*

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

9 DANKSAGUNG

Ich möchte in erster Linie meiner Betreuerin, Frau Dr. Juliane Klehmet, für die wirklich hervorragende Betreuung meiner Arbeit danken. Ihre sehr freundliche und gleichzeitig anspruchsvolle Art war ausschlaggebend für meine Motivation, diese Dissertation zu schreiben. Sowohl in fachlichen wie auch in praktischen Fragen fühlte ich mich stets bestens unterstützt. Die Vermittlung der zu untersuchenden Patienten über die von ihr geleitete CIDP-Ambulanz und die klinische Einschätzung der Krankheitsverläufe waren essentiell für meine Arbeit. Dabei weiß ich die zeitlich und persönlich enge Betreuung sehr zu schätzen.

Besonders herzlicher Dank gilt meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Andreas Meisel, der es mir ermöglichte, diese Doktorarbeit in seiner Arbeitsgruppe *Clinical Neuroscience* anzufertigen. Sein kompetenter Rat in fachlichen Fragen und seine in humorvoller Art vorgetragenen Richtungsweisungen waren sehr motivierend und wertvoll für die Planung und Durchführung meiner Dissertation.

Weiterhin möchte ich Herrn Dr. Christian Meisel meinen außerordentlichen Dank aussprechen, in dessen Arbeitsgruppe und mit Hilfe der Unterstützung seiner Mitarbeiter ich mich von Beginn an im Laboralltag sehr gut begleitet und aufgehoben gefühlt habe.

Ebenso möchte ich auch den weiteren Mitarbeitern der AG Meisel und der AG Scheibenbogen sehr herzlich für ihre permanente Hilfsbereitschaft in praktischen Fragen, für das stets freundschaftliche Arbeitsklima und insbesondere für ihre unerschöpfliche Geduld bei meinen Fehlern danken.

Allen beteiligten Patienten und Kontrollprobanden möchte ich für die Teilnahme an unserer Studie danken. Damit legten sie den Grundstein zum Gelingen dieser Forschungsarbeit.

Vor allem geht mein Dank aber an meine Freundin Sanna und meinen Sohn Aaron. Sie haben mir gemeinsam mit meinen Eltern, meinen Brüdern und meinen engen Freunden immer wieder neue Freude am Arbeiten und Leben vermittelt. Durch das Aushalten meiner unbeständigen Launen und durch ihre stets unglaubliche Unterstützung haben sie dies alles überhaupt erst möglich gemacht.

Ich danke euch von ganzem Herzen!