

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

DISSERTATION

**Immunmodulation bei Multipler Sklerose durch
*Trichuris suis ova***

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Friderike Joëlle Benzel

aus Karlsruhe

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. L. Harms

2. Prof. Dr. med. A. Bitsch

3. Prof. Dr. med. J. P. Sieb

Datum der Promotion: 07.09.2012

Inhaltsverzeichnis

I.	Einführung.....	1
I.1.	Multiple Sklerose	1
I.2.	Die Hygienehypothese	6
I.3.	Das Th1-Th2-Modell.....	9
I.4.	Hygienehypothese und MS: Stand der Forschung	12
I.5.	Therapeutische Anwendung immunmodulatorisch wirksamer Parasiten beim Menschen.....	12
I.6.	Immunregulatorische Aktivität von Natürlichen Killer (NK) - Zellen	13
II.	Ziel der Arbeit und Fragestellung	16
III.	Material und Methoden.....	17
III.1.	Material.....	17
III.1.1.	Patienten	17
III.1.2.	Trichuris suis ova (TSO): Gewinnung, Verabreichungsform und Einnahme...	18
III.1.3.	Probengewinnung.....	18
III.1.4.	Geräte.....	20
III.1.5.	Verbrauchsmaterialien.....	21
III.1.6.	Chemikalien, Reagenzien und Fertiglösungen	21
III.1.7.	Puffer und Zellkulturmedien.....	23
III.1.8.	Software	23
III.2.	Methoden.....	24
III.2.1.	Bestimmung der Immunglobuline im Serum mittels ELISA.....	24
III.2.2.	Bestimmung zellulärer Blutbestandteile und funktioneller Parameter.....	24
III.2.3.	Durchflusszytometrie	24
III.2.4.	Analysesoftware für die Durchflusszytometrie	34
III.2.5.	Statistische Auswertung und graphische Darstellung.....	34
IV.	Ergebnisse	36
IV.1.	Funktionelle Analyse der CD4+ T-Lymphozyten unter TSO-Therapie	36
IV.1.1.	Analyse der Zytokinproduktion (IL2, IL4, IL10 und IFN γ) von CD4+ T- Lymphozyten nach Stimulation mit den Superantigenen SEA, SEB und TSST plus CD28 im Vollblut.....	36
IV.1.2.	Analyse MACS-selektierter kurzzeitkultivierter CD4+ T-Lymphozyten und ihrer Subpopulationen nach Stimulation mit PMA/Ionomycin	45
IV.2.	Immunglobulinkonzentrationen im Serum unter TSO-Therapie	53
IV.3.	Funktionelle Parameter: Leber und Nierenfunktion	55
IV.4.	Differentialblutbild.....	55
IV.5.	Lymphozyten: quantitative und qualitative Analyse unter TSO-Therapie	59
IV.5.1.	Lymphozyten im Differentialblutbild.....	60

IV.5.2.	Durchflusszytometrische qualitative und quantitative Analyse der Lymphozyten mittels Trucount.....	60
IV.6.	NK-Zellen	65
IV.6.1.	NK-Zellen: Einteilung in CD56dim (+) und CD56bright (++) NK-Zellen	65
IV.6.2.	CD56++ NK-Zellen	66
IV.7.	Klinische Veränderungen unter TSO-Therapie	68
V.	Diskussion	69
V.1.	Hintergrund der vorliegenden Arbeit und Stand der Wissenschaft.....	69
V.1.1.	TSO.....	69
V.1.2.	Hygienehypothese und Th1-Th2-Shift als Grundlage – eine zu starke Vereinfachung?	71
V.1.3.	Regulatorische T-Zellen als Immunmodulatoren.....	72
V.1.4.	Interleukin 10 – Sekretion durch verschiedene Zellpopulationen	73
V.1.5.	MS-Prävalenz und die Hygienehypothese	74
V.2.	Angewandte Methoden und Materialien	74
V.2.1.	Superantigene als Stimulantien und Einfluss auf die T-Zelldifferenzierung.....	74
V.2.2.	Kinetik der Stimulation mit Superantigenen bzw. PMA/Ionomycin	75
V.2.3.	Einfluss von TSO-Dosis und Intensität parasitärer Infektionen	76
V.2.4.	Zeitpunkte der TSO-Einnahme und Auswahl der Patienten	77
V.2.5.	Erreicht die Wirkung von TSO das ZNS?	78
V.3.	Ergebnisse: Abgleich mit aktuellen Daten	79
V.3.1.	Immunglobulinkonzentrationen im Serum	79
V.3.2.	Funktionelle Parameter und Differentialblutbild.....	79
V.3.3.	Trucount zur durchflusszytometrischen Bestimmung der absoluten Zellzahl ..	80
V.3.4.	Analyse der Zytokinproduktion von CD4+ T-Zellen unter TSO-Therapie	82
V.3.5.	Klinische Veränderungen unter TSO-Therapie und weitere Entwicklung.....	85
VI.	Zusammenfassung.....	86
VII.	Literaturverzeichnis	88
	Publikation.....	97
	Erklärung.....	98
	Danksagung.....	99

I. Einführung

I.1. Multiple Sklerose

Allgemeines und Epidemiologie

Autoimmunerkrankungen betreffen mindestens 5 bis 7 % der erwachsenen Bevölkerung in Europa und den USA mit steigender Tendenz. Im Hinblick auf das Zentrale Nervensystem (ZNS) ist die häufigste Autoimmunerkrankung die Multiple Sklerose (MS), auch Encephalomyelitis disseminata (ED) genannt, eine entzündliche demyelinisierende Erkrankung. Die Inzidenz variiert zwischen 60-200/100 000 in Gebieten hoher Prävalenz wie dem nördlichen Europa, den USA und Neuseeland, bzw. 6-20/100000 in Gebieten niedrigen Erkrankungsrisikos ¹. In Deutschland schätzt man die Gesamtzahl der MS-Patienten auf ungefähr 120.000, damit liegt die Prävalenzrate bei etwa 150 auf 100.000 Einwohner ². Gleichzeitig ist die MS auch die am häufigsten zu Invalidität führende Erkrankung junger Erwachsener. Der Krankheitsbeginn liegt meist zwischen dem 20. und 40. Lebensjahr, obwohl in Einzelfällen auch Menschen vor dem 20. (7%) oder nach dem 50. Lebensjahr (12%) erkranken ³. An der schubförmigen Verlaufsform erkranken Frauen etwa doppelt so häufig wie Männer, während das Verhältnis bei der primär chronisch-progredienten Verlaufsform in etwa gleich ist ⁴.

Histopathologie und Pathophysiologie

Die Bezeichnung ED leitet sich von den disseminiert gelegenen Entmarkungsherden, sogenannten Plaques, in Hirn und Rückenmark ab, die überwiegend perivenös in der weißen Substanz liegen. Sowohl pathohistologisch als auch radiologisch mittels Magnetresonanz (MRT) konnten jedoch in geringem Maße auch Läsionen in der grauen Substanz nachgewiesen werden, insbesondere im zerebralen Cortex ^{5, 6}. Zum zugrundeliegenden Pathomechanismus liegen verschiedene Erklärungsansätze vor, als gesichert gilt jedoch bisher lediglich die Endstrecke dieses Prozesses. Dabei induzieren "Cluster of differentiation 4 positive" (CD4+) T-Helfer-Zellen Typ 1 (Th1) durch Aktivierung von Mikrogliazellen über immunpathologische Mechanismen eine Zerstörung der von Oligodendrozyten gebildeten Myelinscheiden des ZNS. Dies führt zu einer herdförmigen Schädigung der Myelinscheiden und damit zu einer klinisch relevanten Schädigung der Axone. Man geht davon aus, dass T- und B-Zellen in der Peripherie durch ZNS-eigene Antigene ⁷ oder kreuzreaktive Fremdantigene, beispielsweise bei Virusinfektionen ^{8, 9} aktiviert werden und es im Anschluss zu klonaler Expansion mit Überwindung der Blut-Hirn-Schranke und Infiltration des ZNS kommt ¹⁰,

¹¹. Prädilektionsstellen sind der Nervus opticus, periventrikuläres Marklager, Hirnstamm, Cerebellum, Frontallappen sowie im Myelon die Hinterstränge, insbesondere im Zervikalmark. Kommt es zur Demyelinisierung, wird eine schnelle saltatorische Erregungsleitung verhindert und es resultiert eine langsame, kontinuierliche Erregungsausbreitung mit Auftreten von Verlustströmen. Unter zusätzlichem Einfluß eines entzündlichen Ödems treten temporäre Leitungsunterbrechungen auf, die sich bei axonaler Schädigung zu dauerhafter Leitungsunterbrechung entwickeln. Größere Herde führen auf diese Weise zu lokalisationsabhängigen Funktionsstörungen, während kleinere Herde klinisch symptomlos bleiben können und erst radiologisch oder in der Sektion zutage treten ¹². Hieraus leitet sich auch die Bezeichnung Multiple Sklerose ab, die neben dem Verteilungsmuster mit multilokulärem Befall auf die sklerotischen Narbenherde als den Endzustand der akuten Entzündung durch Bildung von Glianarben hinweist.

Lucchinetti et al. ^{13, 14} zeigen immunpathologische Heterogenität der MS-Läsionen bei verschiedenen Patienten. Möglicherweise handelt es sich bei der MS um mehrere Entitäten mit ähnlicher klinischer Manifestation bei unterschiedlicher Ätiologie. Unterstützt wird diese Theorie durch die Tatsache, dass die Läsionen zwischen verschiedenen Individuen wesentlich stärker als intraindividuell variieren ¹⁴.

Klinik

Entsprechend dem Befallsmuster im gesamten ZNS und dem unterschiedlichen Verlauf variieren die klinischen Symptome interindividuell stark. Typisch für die MS ist, dass nahezu alle zerebralen und spinalen Symptome als Ausdruck der Dissemination in Raum und Zeit unabhängig voneinander auftreten können. Häufigste Frühsymptome sind Sensibilitäts- oder motorische Störungen mit je 30-40%, gefolgt von Retrobulbärneuritis mit 20-30%, wobei eine partielle bis vollständige Rückbildung insbesondere zu Beginn möglich ist ¹⁵. Später kommen häufig zentrale Paresen mit spastischer Tonuserhöhung, Parästhesien, cerebelläre und okuläre Symptome und Blasenstörungen hinzu. Die Langzeitprognose reicht von leichter motorischer, sensibler oder kognitiver Beeinträchtigung bis hin zu schwerster Behinderung mit Tetraparese, Schluckstörungen und Pflegebedürftigkeit. Dabei weist ungefähr ein Drittel der Patienten über einen langen Zeitraum nach Diagnosestellung nahezu keine Behinderung auf, ein weiteres Drittel eine eher leichte Behinderung und ein etwas geringerer Anteil ist schwerst beeinträchtigt und besitzt, im Gegensatz zu den beiden

erstgenannten Gruppen, eine erniedrigte Lebenserwartung. Zur klinisch objektivierenden Graduierung des neurologischen Defizits wird derzeit am häufigsten die Kurtzke-Skala oder „Expanded Disability Status Scale“ (EDSS) angewendet. Acht neurologische funktionelle Systeme werden mit Punktwerten von 0 (entspricht normaler neurologischer Untersuchung) bis 10 (Tod durch MS) beurteilt. In der Auswertung fallen insbesondere motorische Funktionen ins Gewicht, vollständiger Verlust der Gehfähigkeit besteht beispielsweise ab Grad 8.

Als typisch, wenn auch nicht spezifisch gilt das Fatigue-Syndrom, bei dem die Patienten durch eingeschränkte Belastbarkeit und vorzeitige Ermüdbarkeit unter ausgeprägtem Erschöpfungsgefühl leiden, das nicht anders als durch die Krankheit selber erklärlich ist.
16, 17.

Verlaufsformen

Es gibt zwei Verlaufsformen mit diversen Unterformen: die erste ist die schubförmig remittierende (engl. Relapsing-remitting-, RR-) MS (85 – 90%) mit meist sekundär progredientem (engl. secondary progressive-, SP-MS) Verlauf. Nach 15-jähriger Krankheit gehen knapp 60% der RR-MS in eine sekundär progrediente Verlaufsform über, nach 25 Jahren fast 90%. Intermittierende Schübe sind auch bei dieser Form in seltenen Fällen möglich. Die zweite Form ist die primär progrediente (PP-MS) Form, die ca. 10 – 15% aller Pat. betrifft. Hier kommt es zu progredienter Verschlechterung des neurologischen Befundes, oft wird erst nach jahrelangem Bestehen die Diagnose MS gestellt. Bei dieser Form stehen motorische Defizite stärker im Vordergrund als bei der RR-MS oder SP-MS¹.

Ätiologie

Auch über 170 Jahre nach der Erstbeschreibung durch Carswell 1838 und trotz intensivster Forschungstätigkeit einschließlich mehrerer Tiermodelle wie beispielsweise der artifiziell induzierten Experimentellen Autoimmunenzephalitis (EAE) an Mäusen oder Ratten, konnten bis heute Ätiologie und zugrundeliegender Pathomechanismus nicht geklärt werden. Damit ist nach wie vor die kausale Prävention und Therapie unmöglich. Als mögliche Auslöser im Rahmen einer multifaktoriellen Genese werden sowohl genetische, hormonelle als auch infektiös-immunologische und Umweltfaktoren diskutiert¹.

Interne Faktoren

Der Einfluss genetischer Faktoren konnte epidemiologisch teilweise bestätigt werden: das Erkrankungsrisiko Verwandter ersten Grades von MS-Patienten ist um den Faktor 15–25 erhöht. Die höchste Erkrankungskorrelation besteht bei eineiigen Zwillingen mit circa 30%, gefolgt von 25% bei Geschwistern mit zwei betroffenen Elternteilen. Das Risiko adoptierter Kinder unterscheidet sich nicht von dem der Allgemeinbevölkerung.

Bestimmte ethnische Gruppen, insbesondere Kaukasier besitzen eine vergleichsweise erhöhte Erkrankungswahrscheinlichkeit. Auffällig ist die Korrelation zwischen Gebieten mit hoher MS-Prävalenz und hohem Bevölkerungsanteil an Menschen nordeuropäischer Abstammung^{18, 19}. Dennoch zeigen Migrationsstudien, dass die Prävalenz in Gebieten mit hohem Einwandereranteil an Nordeuropäern nur halb so hoch ist wie in Nordeuropa¹⁸⁻²⁰. Nahezu resistent gegenüber der MS scheinen hingegen beispielsweise die Aborigines in Australien oder die Maori in Neuseeland zu sein – obwohl im Gegensatz dazu in diesen Gebieten die MS bei der Bevölkerung mit kaukasischer Abstammung verhältnismäßig oft auftritt²¹⁻²³.

Bestimmte Human Leucocyte Antigen-(HLA-)Typen wie HLA-DR 15, -DR2, -DW2, -B7 und -A3 sind überproportional häufig unter MS-Patienten zu finden²⁴, insbesondere HLA-DR und -DQ scheinen mit einer vermuteten Beteiligung von 10–60% die stärksten genetischen Risikofaktoren der MS zu sein²⁵. Aber auch anderen genetische Faktoren wie Polymorphismen von T-Zell-Rezeptor Genen (TCR), Immunglobulinloci, CCR5 (CC-Motiv-Chemokin-Rezeptor) oder CD45, um nur einige Beispiele zu nennen, könnte eine Bedeutung zukommen. Für bestimmte Polymorphismen des CCR2 oder Interleukin 10 (IL10)-Rezeptor- α wird sogar ein protektiver Effekt vermutet, wohingegen andere Polymorphismen z. B. des CCR5, IL-10, IL-4-Rezeptors- β , IL2-Rezeptors- β sowie von Interferon γ (IFN γ)-, Vitamin D- oder Östrogenrezeptoren die Erkrankungswahrscheinlichkeit erhöhen könnten²⁶. Insgesamt weisen diese Kenntnisse auf die kausale Beteiligung der genetischen Faktoren hin.

Der deutlich höhere Frauenanteil unter den MS-Patienten scheint für den Einfluss hormoneller Faktoren zu sprechen, unterstützt wird diese Hypothese durch die verringerte Schubfrequenz während der Schwangerschaft und häufigere postpartale Schübe^{1, 27, 28}. Ob zyklusbedingte Hormonschwankungen eine Rolle spielen ist noch nicht geklärt. Manche Studien belegen diese These, beispielsweise durch prämenstruell

signifikant höhere Schubinzidenz ²⁹, während andere den Zusammenhang widerlegen ³⁰.

Externe Faktoren

Der drastische Prävalenzanstieg der MS innerhalb eines relativ kurzen Zeitraums, ungefähr der letzten 60 Jahre, schließt interne Faktoren als alleinige Ursache eines derartigen Wandels im Immunrepertoire praktisch aus. Ein Wandel im Genom käme erst nach wesentlich längeren Zeitspannen zum Tragen. Epidemiologische Daten zur MS demonstrieren in diesem Zusammenhang starke regionale Unterschiede: von der Häufigkeitszunahme sind praktisch nur die heutzutage industriell hochentwickelten Länder betroffen, was für Umweltfaktoren spricht.

Es liegt eine Vielzahl von Veröffentlichungen vor, die eine infektiöse, insbesondere virale Genese durch ubiquitäre Viren wie z. B. Epstein-Barr- (EBV) ³¹⁻³³, Varicella Zoster Virus (VZV) oder humanes Herpesvirus 6 ³⁴ nahelegen ³⁵. Unter MS-Patienten ist die Seroprävalenz für EBV erhöht, jedoch liegt diese in der Allgemeinbevölkerung ohnehin schon bei über 90% ³⁶. Eine andere Studie untersucht den möglichen Zusammenhang zwischen Infektionszeitpunkt mit EBV und MS-Prävalenz: in Gebieten hoher Prävalenz waren über ein Drittel der Untersuchten in der Pubertät noch seronegativ, während es in Gebieten niedriger Prävalenz praktisch ausnahmslos in früher Kindheit zur Serokonversion kommt. So könnte eine späte Infektion das MS-Risiko erhöhen. ^{33, 37}. In diesem Zusammenhang sind molekulares Mimikri (die Aktivierung autoreaktiver Zellen durch Kreuzreaktivität zwischen Auto- und Alloantigenen), „Bystander Activation“ (die Aktivierung autoreaktiver Zellen durch unspezifische inflammatorische Antworten) und virale Persistenz die meistuntersuchten Mechanismen ³⁸. Ein mögliches Autoantigen in der MS könnte Myelin Basis Protein (MBP) sein. Zwar finden sich MBP-spezifische T-Zellen bei allen Menschen, jedoch können diese bei MS-Patienten einen erhöhten Aktivierungszustand aufweisen ^{1, 39}. Auch besteht der bisher ungeklärte Verdacht, immunologischen Vorgängen nach Impfungen könnte pathogenetisch eine Rolle zukommen ⁴⁰.

Obwohl einige dieser infektiösen Mechanismen als gesicherte Faktoren für Autoimmunität gelten, konnte bislang für keinen von ihnen eine Schlüsselposition in der Pathogenese der MS nachgewiesen werden.

Eine wichtige Rolle spielt die geographische Breite: mit Ausnahme Japans, wo eine relativ niedrige Prävalenz besteht, steigt die Prävalenz proportional zum Abstand vom Äquator an. Womit lassen sich neben Zusammensetzung der Bevölkerung diese geographischen Verteilungsmuster korrelieren? Diskutiert werden der protektive Einfluss der UV-Strahlung durch ihre nachweislich immunsuppressive Wirkung – durch direkte Suppression von Immunzellen⁴¹ oder fördernden Einfluss auf immunregulatorische Zellen⁴¹, sowie in Zusammenhang mit der Biosynthese von Melatonin und Vitamin D. Epidemiologisch gewonnene Daten stützen die Rolle der Vitamin D-Unterversorgung. Eine exzessive Melatoninausschüttung bei mangelnder UV-Licht-Exposition könnte eine inflammatorische Th1-Antwort des Immunsystems fördern. Die Prävalenz variiert jedoch auch innerhalb ähnlicher geographischer Breiten regional. Beispiele hierfür sind Endemiegebiete, sogenannte *Foci* wie die Schweiz, Orkney- und Shetland-Inseln oder Sardinien mit relativ zur Umgebung betrachtet besonders hoher Prävalenz^{19, 42, 43}. Migrationsstudien zeigten, dass Einwanderer das MS-Risiko des Landes beibehalten, in dem sie bis zum 15.-16. Lebensjahr gelebt hatten, eine spätere Migration jedoch führt zu keiner Veränderung des Risikos^{44, 45}. Die geographische Lage spiegelt jedoch auch das sozioökonomische Niveau eines Landes wieder. Aus epidemiologischen Untersuchungen lässt sich die negative Korrelation zwischen der steigenden Prävalenz von Autoimmunerkrankungen und Allergien einerseits und der stark reduzierten Prävalenz von Infektionskrankheiten in den industriell hochentwickelten Ländern andererseits ableiten, insbesondere parasitäre Infektionen wurden hier in kürzester Zeit praktisch eliminiert. Als Beispiel kann in diesem Zusammenhang Japan als das aus ökonomischer Sicht am weitesten entwickelte Land Asiens herangezogen werden: obwohl die MS-Prävalenz im Vergleich zu Europa und den USA niedriger ist, übersteigt sie die sämtlicher anderer asiatischer Länder um ein vielfaches.

I.2. Die Hygienehypothese

Die epidemiologische Basis der Hygienehypothese

Innerhalb der letzten 60 Jahre ist in den modernen Industrieländern ein drastischer Zuwachs an Autoimmunerkrankungen und Allergien zu verzeichnen, die Tendenz ist weiterhin steigend⁴⁶⁻⁴⁸. Letztendlich ist nach wie vor unklar, welche kausalen Mechanismen diesen Störungen des Immunsystems zugrunde liegen. Aus epidemiologischer Sicht besteht eine auffällige reziproke Korrelation zwischen

Autoimmunerkrankungen bzw. Allergien einerseits und veränderten Lebensbedingungen und Gesundheitsrisiken andererseits ⁴⁹⁻⁵².

Die Begründung der Hygienehypothese

Die Beobachtung der Zusammenhänge zwischen steigender Allergieprävalenz und veränderten Lebensbedingungen führte 1989 zur erstmaligen Formulierung der Hygienehypothese durch Strachan ⁵³, kurz darauf wurde die Hypothese auch auf Autoimmunerkrankungen erweitert ^{49, 51, 52}.

Die Kernaussage der Hygienehypothese lautet folgendermaßen: während der gesamten Evolutionsgeschichte war der Mensch Infektionen durch diverse Mikroorganismen ausgesetzt, was zur Entwicklung spezieller Abwehrmechanismen des Immunsystems führte. Durch einen schnellen Wandel mit verbessertem Hygienestandard sowie Prävention und Therapie von Infektionskrankheiten seien diese evolutionsbiologisch entwickelten Abwehrmechanismen teils überflüssig geworden ^{54, 55}, die stark reduzierte Interaktion mit Pathogenen in der Kindheit führe zur Zunahme von Autoimmunerkrankungen und Allergien ⁵⁶.

Fraglich ist, ob tatsächlich evolutionsbiologisch eine gewisse Gewöhnung an bzw. Abhängigkeit von den immunregulierenden Einflüssen der Infektionserreger eingetreten ist, oder ob das "unterforderte" Immunsystem sich mangels externer Antigene gegen körpereigene bzw. nicht-pathogene Strukturen wendet.

Leibowitz et al. veröffentlichten schon 1966 ähnliche epidemiologische Daten bezüglich der MS ⁵⁷, in denen erstmals der Zusammenhang zwischen verbesserten Hygienebedingungen und zunehmender Prävalenz untersucht wurde.

Die Hygienehypothese und parasitäre Infektionen

Der radikalste Wandel betrifft sicherlich parasitäre Infektionen, die in unseren Breiten innerhalb kürzester Zeit fast eliminiert worden sind. Im Gegensatz dazu besteht in weniger entwickelten Ländern weiterhin eine sehr hohe Prävalenz, insbesondere im Kindesalter. Evolutionär existieren hochkomplexe Interaktionen zwischen Parasiten und ihren Wirten, die weit über die Interaktion mit anderen Infektionserregern hinausgehen. Parasiten sind darauf ausgelegt, langfristig von ihren Wirten zu profitieren und streben eine Koexistenz an. Daher modifizieren sie unter anderem deren Immunsystem, was evolutionsbiologisch zu einer Koevolution von Parasit und Wirt mit Veränderungen im Immunrepertoire des Wirtes führt und als "Extended Phenotype" bezeichnet wird ^{55, 56}.

Die Einflüsse parasitärer Infektionen auf das Immunsystem sind äußerst vielschichtig und noch nicht abschließend erforscht. Allgemeiner Konsens herrscht jedoch darüber, dass parasitäre Infektionen, zum Beispiel durch Helminthen oder Leishmanien, eine Polarisierung der Immunantwort in Richtung "antiinflammatorische" Th2-Antwort bewirken. Diese beinhaltet eine Steigerung der Produktion von IL4, IL5, IL10 und IL13 durch CD4+ T-Helferzellen und eine dadurch erhöhte Produktion von IgE und IgG4 durch B-Zellen sowie einen absoluten und relativen Anstieg der Eosinophilen Granulozytenzahlen⁵⁸.

Immunologische und epidemiologische Grundlagen der Hygienehypothese

Diverse Beobachtungen auf zellulärer Ebene stellen einen Zusammenhang zwischen der eher epidemiologisch basierten Hygienehypothese und dem Th1- Th2- Modell her^{59, 60}. Die "antiinflammatorische" Th2-Antwort unter parasitärer Infektion wirkt regulierend auf Th1 vermittelte Reaktionen – dies wäre eine plausible Erklärung dafür, dass Menschen während parasitärer Infektionen nur in Ausnahmefällen Autoimmunerkrankungen entwickeln bzw. die Krankheitsaktivität während der Infektion selten zunimmt.

IL10 wird von CD4+ Lymphozyten im Rahmen der Th2- Antwort und vor allem auch von regulatorischen CD4+CD25+ T-Lymphozyten (Treg) sezerniert, sowie in geringerem Ausmaß von anderen Zellpopulationen. Erhöhte IL10-Level, wie sie im Rahmen einer Th2-Antwort unter Parasiteninfektion vorkommen, wirken sowohl gegen Allergien als auch gegen Autoimmunerkrankungen protektiv⁶¹⁻⁶³.

Den ersten Beweis für die Beziehung zwischen Parasiten und Allergien konnten Lynch et al erbringen, indem sie 1993 an 375 venezuelanischen Kindern einen Anstieg in der Prävalenz von Allergien nach antiparasitärer Therapie aufzeigten⁶⁴. Als Pionier gilt Weinstock, der in den 1990er Jahren beobachtete, dass Parasiteninfektionen auch gegen chronisch entzündliche Darmerkrankungen (CED) schützen können⁵⁰ und nach dem Einsatz von *Schistosoma* im murinen Modell 2003⁶⁵ im Jahre 2005 erstmals erfolgreich den Einsatz von *Trichuris suis ova* (TSO) an Patienten mit CED demonstrieren konnte⁶⁶⁻⁶⁸. Weitere Veröffentlichungen in diesem Zusammenhang entstanden durch Yazdanbakhsh et al im Jahr 2000: Kinder im zentralafrikanischen Gabun, die mit dem intestinalen Helminthen *Schistosoma haematobium* infiziert waren, litten wesentlich seltener unter Hausstauballergie als die nicht infizierte Vergleichsgruppe⁶⁹. Dass die daraufhin durchgeführte Therapie mit Antihelminthika

zum Anstieg der Allergieprävalenz führte, spricht für einen direkten Zusammenhang zwischen Wurminfektion und Suppression der Hypersensitivität. Ähnliche Zusammenhänge konnten auch in einer kontrolliert randomisierten Studie an 317 Kindern in Gabun sowie in einer individuell randomisierten placebokontrollierten Studie mit Antihelminthika an 1566 Vietnamesischen Kindern gezeigt werden ^{70, 71}.

2003 zeigten Cooke et al. im murinen Modell, dass eine frühzeitige Infektion mit *Schistosoma mansoni* (*S. mansoni*) den Ausbruch von Diabetes mellitus Typ I (DM I) bei genetisch zu dieser Krankheit prädisponierten Mäusen verhindern konnte ⁷².

Inzwischen liegen eine Vielzahl von Veröffentlichungen vor, die die Hygienehypothese und den protektiven Einfluss von Parasiten untermauern – sowohl aus epidemiologischer Sicht ^{58, 73-75}, auf immunologischer Grundlagenforschung basierend ^{74, 76}, aus Studien mit Patienten ^{77, 78}, als auch aus tierexperimentellen Arbeiten ⁷⁴. Insbesondere auch zur EAE liegen solche Daten vor ⁷⁹⁻⁸³.

Der Begriff der Immunmodulation durch parasitäre Infektionen hat sich bereits in der Immunologie etabliert und zeigt vielversprechende Perspektiven auf. Für die Zukunft erhofft man sich, dass die Mechanismen, mit denen Parasiten das Immunsystem regulieren, entschlüsselt und therapeutisch genutzt werden können, ohne dass dabei tatsächlich eine parasitäre Infektion stattfinden muss. Diese Option verspricht eine sichere und nebenwirkungsärmere Therapie, befindet sich jedoch noch im experimentellen Stadium.

Es existiert eine Vielzahl an Erklärungsmodellen zur Hygienehypothese und deren hochkomplexen immunologischen Grundlagen.

1.3. Das Th1-Th2-Modell

Bereits 1986 entdeckten Mosmann et al. zwei unterschiedliche antigenspezifische T-Helferzelltypen im spezifischen Immunsystem der Maus, die sich anhand ihrer typischen Zytokinsekretion und dadurch in ihrer Aktivität unterscheiden, sich ansonsten aber in ihrer Ausstattung an Oberflächenmolekülen gleichen und sich aus den selben Zellvorläufern entwickeln, aus reifen, naiven CD3+CD4+CD8- T-Lymphozyten ⁸⁴. Beide Typen erkennen Antigene, die durch antigenpräsentierende Zellen (antigen presenting cells, APC) mit "Major Histocompatibility Complex" II (MHC II) präsentiert werden ⁸⁴. Das Modell wurde auch auf das menschliche Immunsystem übertragen ⁸⁵. Einem vereinfachten Schema nach gibt es zwei verschiedene T-Helferzelltypen, die die Immunantwort in verschiedene Richtungen beeinflussen: proinflammatorische Th1-

Zellen lenken diese in Richtung zellulärer Immunität und fördern die Produktion opsonierender Immunglobulin-G-Antikörper (IgG-Ak). Dadurch werden Viren, intrazelluläre Erreger und maligne oder allogene Zellen eliminiert sowie allergische bzw. Überempfindlichkeitsreaktionen ausgelöst.

Th2-Zellen stimulieren die humorale Immunantwort und Antikörperbildung durch B-Lymphozyten bzw. Plasmazellen (insbesondere IgM, IgA, IgE), um extrazelluläre Erreger wie beispielsweise mehrzellige Parasiten zu bekämpfen. Zudem ist Th2-Dominanz mit Immuntoleranz assoziiert. Jedoch besteht auch eine Assoziation mit der Neigung zu Allergien vom Soforttyp. Obwohl nicht restlos geklärt ist, welche Mechanismen im Einzelnen die Differenzierung naiver Th0-CD4-Zellen in Th1- und Th2-Zellen steuern, steht fest, dass der Erstkontakt mit einem Antigen entscheidend für die weitere klonale Expansion bzw. deren dominierende Richtung in Th1 oder Th2 ist^{86, 87}. Komplexe Interaktionen zwischen CD4+ und CD8+ T-Zellen, B-Zellen, APC und den jeweiligen sezernierten Zytokinen nehmen zudem wechselseitigen Einfluss auf die Differenzierung naiver CD4+ Zellen⁸⁸.

Die beiden Untergruppen lassen sich anhand ihrer Zytokinsekretion differenzieren: für Th1 typisch sind in erster Linie makrophagenaktivierende und leukozytenrekrutierende Effektormoleküle wie IFN γ sowie IL2 und Tumornekrosefaktor α (TNF α). IFN γ hat zwei wichtige Funktionen in der inflammatorischen Immunantwort: es aktiviert die Phagozytose und Produktion mikrobizider Enzyme durch Makrophagen, zudem stimuliert es die Produktion komplementbindender IgG-Antikörper durch Plasmazellen als wichtigste opsonierende Antikörper in der Phagozytose (beim Menschen IgG1 und IgG3). Auch die Differenzierung von CD8+ T-Zellen in aktivierte zytotoxische T-Zellen wird gefördert. Diese Reaktionen dienen der Eliminierung intrazellulärer Erreger, können aber bei Fehlregulation zu inflammatorischer Gewebsschädigung führen.

Ein Effekt der Th2-Zellen ist die Förderung der humoralen Immunität mittels B-Zell-aktivierender Moleküle wie IL4, IL5, IL13 sowie IL10 und Transforming growth factor Beta (TGF β). IL4 ist in erster Linie verantwortlich für den Isotypen-Switch von B-Zellen, der zu einer Änderung des produzierten Immunglobulintypes führt. Das Resultat ist eine Verschiebung hin zu mastzellaktivierendem IgE zur Bekämpfung extrazellulärer Parasiten. IL5 ist das wichtigste eosinophilenaktivierende Zytokin. IL10 reguliert Vermehrung und Differenzierung vieler Immunzellen, supprimiert die klassische Aktivierung und Aktivität von APC durch Inhibition der Zytokinproduktion von TNF u.a.

Außerdem führt IL10 zur verminderten Expression von MHCII, CD40 und kostimulatorischer Moleküle wie CD80 und CD86. Es kann auch die Funktion von CD8+ T-Effektorzellen negativ beeinflussen und bewirkt einen IL4/IL13-dominierten Th2-Aktivierungszustand ⁸⁹.

Beide Th-Untergruppen besitzen die Fähigkeit zur membrangebundenen Expression von CD40-Ligand (CD40-L oder CD154), einem Aktivierungsmarker aus der TNF-Familie mit diversen Funktionen. CD40-L wird als kostimulatorisches Molekül nach Aktivierung von Th-Zellen exprimiert und aktiviert seinerseits APC durch Bindung an deren Oberflächenmarker CD40. Neben einer Reihe anderer Effekte stimuliert CD40L auf Th2-Zellen über Bindung an CD40 auf B-Zellen deren Proliferation, Immunglobulinproduktion (vor allem IgM und nicht-komplementbindendes IgG4) und bewirkt eine Änderung des Isotyps (Isotypen-Switch).

Beide Zelltypen besitzen komplexe autokrine Effekte: durch Sekretion der jeweils typischen Zytokine wird über positive Rückkoppelung die weitere Differenzierung naiver Th-Zellen zum entsprechenden Zelltyp gefördert. So werden Th1-Lymphozyten, die mittels IFN γ Makrophagen aktivieren, umgekehrt auch von Makrophagen und anderen APC über IL12 zur Proliferation angeregt. Zudem bewirkt IFN γ über die verstärkte Expression von IL12-Rezeptoren auf der Zelloberfläche von Lymphozyten, einen positiven Selbstverstärkungseffekt ⁸⁵.

Äquivalent besteht zwischen Th1- und Th2-Antwort eine negative Rückkoppelung: Th2-typische Zytokine dämmen die Th1-Antwort ein und umgekehrt, was auch als "Down-regulation" bezeichnet wird ⁹⁰⁻⁹². Beispielsweise antagonisieren Th2-Zytokine wie IL4 und IL13 das makrophagenaktivierende IFN γ und besitzen dadurch antiinflammatorische Wirkung. IL10 und antiproliferatives TGF β supprimieren wie oben erwähnt unter anderem die Aktivierung von Makrophagen und Leukozyten, wodurch überschießende akute und gewebschädigende chronische Entzündungen eingedämmt werden. In Infektionen in-vivo spielen daher häufig sowohl Th1- als auch Th2-Zytokine in zeitlicher Abfolge eine Rolle. Oft setzt die Th2-Antwort später ein, um die zunächst gegen pathogene Organismen wirkungsvolle, aber für den Wirt längerfristig autoaggressive Th1-Antwort einzudämmen und potentielle Folgeschäden zu verhindern ⁹³.

Im Hinblick auf Autoimmunerkrankungen assoziiert man Th1-Dominanz u.a. mit Multipler Sklerose, Rheumatoider Arthritis (RA) und DM I. Chronisch entzündliche

Darmerkrankungen (CED) sind eher Th1-assoziiert wie Morbus Crohn, oder eher Th2-assoziiert wie Colitis Ulcerosa. Allergische oder atopische Diathese ist Th2-assoziiert.

I.4. Hygienehypothese und MS: Stand der Forschung

Dass Immunmodulation durch Parasiten auch für die MS ein vielversprechender therapeutischer Ansatz sein könnte, zeigen einige neuere Veröffentlichungen. Besondere Bedeutung kommt einer prospektive Kohortenstudie von Correale et al. aus Buenos Aires, Argentinien, zu, die 2007 erstmalig am Menschen die negative Assoziation zwischen natürlich erworbener mild verlaufender parasitärer Infektion und Krankheitsprogression der MS zeigte⁹⁴. Unter Verzicht auf antihelminthische Therapie resultierten eine signifikante Verringerung der Schubfrequenz, minimale Progression im EDSS und minimale Zunahme kontrastanreichernder Herde in der Magnetresonanztomographie (MRT), verglichen mit antihelminthisch behandelten Patienten. Zusätzlich zeigte sich eine entsprechende regulatorische antiinflammatorische Modifikation im Zytokinprofil.

Wegweisend waren vorangegangene tierexperimentelle Arbeiten zur EAE der Maus. Schon 2002 demonstrierten Fabry et al., dass die Schwere der EAE durch vorangehende Infektion mit *S. mansoni* verringert werden kann, was sowohl anhand klinischer Tests als auch neuropathologisch nachweisbar ist^{81, 95}. La Flamme et al. untermauerten diese Resultate 2003 mit ähnlichen Ergebnissen⁷⁹⁻⁸¹, ebenso wie neuere Untersuchungen^{82, 83}. Walsh et al. beispielsweise führen diesen Effekt auf TGF-beta vermittelte Th1/Th17-Suppression zurück⁸².

I.5. Therapeutische Anwendung immunmodulatorisch wirksamer Parasiten beim Menschen

Der immunmodulatorische Effekt parasitärer Infektionen kompensiert nicht die Tatsache, dass sie meist ernsthafte Bedrohungen für die Gesundheit darstellen und behandlungsbedürftig sind. Daher ist die iatrogene Infektion von Patienten mit humanpathogenen Parasiten selbstverständlich obsolet. Wie kann der positive Effekt dennoch therapeutisch genutzt werden?

Eine mögliche Idee ist der Einsatz isolierter Parasitenbestandteile. In Tiermodellen wurden schon mehrere Erfolg versprechende Stoffe eingesetzt, wie beispielsweise Cystatin aus *Onchocerca volvulus* oder *Acanthocheilonema viteae* bei Ovalbumin-induzierter Hypersensitivität der Luftwege oder artifiziell induzierter Colitis^{73, 96}. Bisher

liegt jedoch keiner der tierexperimentell wirksamen Parasitenbestandteile in einer therapeutisch beim Menschen einsetzbaren Verabreichungsform vor.

Eine Alternative stellt der Einsatz nicht humanpathogener Parasiten beim Menschen dar, beispielsweise des Schweinepeitschenwurmes *Trichuris suis*. Wie weiter oben in Kapitel I.1 bereits erwähnt, testeten Weinstock et al. 2003 den Helminthen zur Therapie von CED mit Erfolg, indem sie sieben CED-Patienten (vier mit M. Crohn, drei mit Colitis ulcerosa) über ein halbes Jahr in 14-tägigem Intervall eine Dosis von 2500 TSO per os verabreichten ⁶⁸. 2005 bestätigte die gleiche Gruppe die Effektivität bei CED durch eine randomisierte doppelblind placebokontrollierte Studie an 54 Colitis ulcerosa Patienten ⁶⁷. Ein großer Vorteil ist die recht unbedenkliche Anwendung von *T. suis*. Nach Einnahme von TSO entwickeln sich die Eier im Dünndarm des Menschen bis zum Larvenstadium und zeigen kurzzeitig ein teilinvasives Verhalten mit Invasion des Kopfteiles der Larven zur Nahrungsgewinnung in die Darmmukosa, sterben jedoch nach ca. 2 Wochen ab und werden ausgeschieden. So soll eine immunstimulierende Wirkung ohne unkontrollierbare Infektion oder Nebenwirkungen erreicht werden. Die bisher vorliegenden Veröffentlichungen zur Anwendung bei CED zeigen positive Ergebnisse: sowohl bei Colitis ulcerosa als auch bei Morbus Crohn konnte die Wirksamkeit anhand signifikanter klinischer und histopathologischer Verbesserungen aufgezeigt werden ^{66, 67, 97, 98}. Analog zu Fabrys Arbeiten zur Immunmodulation der EAE mit Schistosomen kündigten Fleming et al. 2004 den Einsatz von TSO bei einer Gruppe von 10- 20 MS-Patienten an. Erste Ergebnisse zeigten eine signifikante Reduktion gadoliniumanreichernder Herde im Kontrastmittel-MRT, ohne Indizien für schädigende Auswirkungen der Helminthen zu liefern ⁹⁹.

Eine 2010 veröffentlichte doppelblind placebokontrollierte Studie mit *T. suis* bei allergischer Rhinitis, zeigte signifikante Veränderungen an Laborparametern wie eosinophilen Granulozyten und den Immunglobulinen IgE, IgG4 und IgA. Dies weist auf eine systemische Interaktion mit dem Immunsystem hin. Aus klinischer Sicht konnte jedoch kein therapeutischer Nutzen belegt werden – ob dies an Verabreichungsform, Studiendesign oder tatsächlich mangelnder Wirkung der Helminthen auf Allergien liegt, muss durch weitere Studien untersucht werden ¹⁰⁰.

I.6. Immunregulatorische Aktivität von Natürlichen Killer (NK) - Zellen

Auch auf Seiten der angeborenen Immunität gibt es im Rahmen von Autoimmunerkrankungen regulatorische Aktivität. Einer Zellgruppe kam in den letzten

Jahren besonders im Hinblick auf die MS besondere Bedeutung zu: den regulatorischen NK-Zellen, definiert durch die Oberflächenmarker CD3-CD16-CD44+CD56++ (CD56"high" oder "bright"). Diese Subgruppe macht einen Anteil von maximal 10% der im Blut befindlichen peripheren NK-Zellen aus, wird aber im Gegensatz zu den restlichen 90% der NK-Zellen mit dem Profil CD3-CD16+CD56+ (CD56"dim") in sekundären Lymphorganen angereichert und erreicht dort einen Anteil von 75% der NK-Zellen.

NK-Zellen entstammen der lymphatischen Zellreihe. Als Vertreter der unspezifischen Immunabwehr dienen sie der Zerstörung viral infizierter Zellen und Tumorzellen: mit Hilfe spezieller Rezeptoren identifizieren NK-Zellen MHC-I-Moleküle, die sich obligat auf der Zelloberfläche aller gesunden körpereigenen Zellen befinden. Bei Fehlen der MHC-I-Moleküle induzieren sie die Apoptose der Zielzelle.

Zur Identifizierung von CD56++ NK-Zellen können die Marker CD44 und CD62L herangezogen werden, da sie diese wesentlich stärker exprimieren als CD56+Zellen^{101, 102}. CD44 spielt eine Rolle in der Aktivierung und Regulierung der IFN γ -Produktion von NK-Zellen und steigert deren Zytotoxizität¹⁰¹.

CD56++ NK-Zellen produzieren diverse Zytokine, unter anderem IFN γ , TNF und GM-CSF (engl. Granulocyte macrophage colony-stimulating factor). Zytotoxizität wird im Gegensatz zu CD56+ NK-Zellen erst nach verlängerter Aktivierung erworben. Auch in der Expression von Adhäsionsmolekülen und Chemokinrezeptoren für das sogenannte "Homing" gibt es Unterschiede zu CD56+ NK-Zellen. CD16 beispielsweise gilt als aktivierender Rezeptor, wohingegen CD94 (oder KIR, engl. killer immunoglobuline like receptors) inhibitorische Signale vermitteln und somit den Angriff auf die Zielzelle verhindern.

Von besonderem Interesse bezüglich immunregulatorischer Aktivität ist, dass CD56++ NK-Zellen CD16-negativ sind und in hohem Maße aktivierungshemmendes CD94 exprimieren.

Die meisten tierexperimentellen Arbeiten zu experimentell induzierten Autoimmunerkrankungen demonstrieren eine protektive Rolle der NK-Zellen mit Schutz vor Gewebeschäden. Antikörpervermittelte Depletion von NK-Zellen führte zur Exazerbation der EAE, während späterer Transfer in-vitro generierter NK-Zellen aus dem Knochenmark die Schwere der Erkrankung eindämmen konnte¹⁰³⁻¹⁰⁵. Zudem resultierte unter NK-Zell Depletion eine verstärkte Proliferation und IFN γ -Sekretion der

autoreaktiven T-Zellen, die für das zur Induktion der EAE verwendete Antigen spezifisch waren.

Weitere Hinweise auf die immunregulatorische Rolle von CD56⁺⁺ NK-Zellen erbrachten Phase II Studien mit MS-Patienten, denen der monoklonale humanisierte IL2-Rezeptor-Antikörper Daclizumab verabreicht wurde. Eine Suppression der Krankheitsaktivität konnte sowohl klinisch belegt als auch im MRT quantifiziert werden. Dieser Erfolg ging weniger mit der Reduktion der Zellzahl autoreaktiver CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen einher, als vielmehr mit einer Zunahme der regulatorischen CD56⁺⁺ NK-Zellen. Bemerkenswert war auch die Tatsache, dass unter, nicht jedoch vor Therapie isolierte NK-Zellen von Patienten autolog aktivierte T-Zellen zerstörten, ohne dass eine weitere Aktivierung der NK-Zellen in-vitro nötig gewesen wäre ¹⁰⁶. Eine Studie mit Einsatz eines äquivalenten Antikörpers bei autoimmuner Uveitis zeigte, dass CD56⁺⁺ NK-Zellen sich durch hohe IL10-Sekretion auszeichnen ¹⁰⁷. Bei MS-Patienten unter Therapie mit IFN β zeigte sich innerhalb von 3 Monaten ebenfalls eine Zunahme der Häufigkeit der regulatorischen NK-Zellen ¹⁰⁸.

Zusammengefasst lässt sich schlussfolgern, dass bestimmte NK-Zellen durch ihre wechselseitige Interaktion mit APC, T- und B-Zellen Potential zur Immunregulation sowohl der unspezifischen als auch der spezifischen Immunabwehr besitzen und bei Autoimmunkrankheiten eine Rolle spielen. Die zugrundeliegenden Mechanismen, Interaktionen und Subgruppen von NK-Zellen sind bisher wenig erforscht.

II. Ziel der Arbeit und Fragestellung

Nach aktuellem Stand der Wissenschaft gibt es viele Hinweise darauf, dass parasitäre Infektionen bei Autoimmunerkrankungen wie der Multiplen Sklerose durch immunregulatorische Mechanismen positive Effekte besitzen. Das Th1-Th2-Modell in Verbindung mit der Hygienehypothese liefert hierfür eine mögliche Erklärung.

Eier des nicht-humanpathogenen Parasiten *Trichuris suis* (TSO) wurden bereits erfolgreich und nebenwirkungsarm bei Chronisch Entzündlichen Darmerkrankungen eingesetzt. In der vorliegenden Arbeit soll erstmalig die Wirkung der Einnahme von TSO bei MS-Patienten untersucht werden. Da noch keine Kenntnisse über die genaue Wirkungsweise von TSO auf das menschliche Immunsystem vorliegen, soll hier mithilfe eines breit angelegten Screenings eine Verlaufsbeobachtung immunologischer Parameter unter Therapie erfolgen, um mögliche Einflüsse auf das Immunsystem zu detektieren. Anhand immunologischer, klinischer und neurologischer Parameter sollen insbesondere die folgenden Fragen beantwortet werden:

1. Beeinflusst die Behandlung mit *Trichuris suis* ova das Zytokinmuster von CD4+ T-Zellen im Sinne eines Th1-Th2-Shifts mit Suppression der proinflammatorischen Th1-Zellantwort?
Lassen sich unter in-vitro Stimulation von CD4+ Zellen im Vollblut mit Superantigenen sowie von isolierten kurzzeitkultivierten CD4+ Zellen mit PMA/Ionomycin diese Veränderungen im Aktivierungs- oder Zytokinmuster (IL2, IL4, IL10, IFN γ) nachweisen? Kommt es zu selektiven Reaktionen der Subgruppen (naive, Effektor- und Memory-CD4+ Zellen) im Therapieverlauf, verändert sich deren Zytokinsekretion spezifisch?
2. Ist eine systemische immunologische Antwort unter *T. suis* nachweisbar? Zeigen Immunzellen der angeborenen (Granulozyten, Monozyten, NK-Zellen) oder der adaptiven Abwehr (Lymphozyten) quantitative oder qualitative Veränderungen unter TSO-Therapie?
3. Lassen sich quantitativ erhöhte Frequenzen immunregulatorischer CD56++ NK-Zellen unter TSO-Therapie nachweisen?
4. Kommt es zu klinischen oder serologisch nachweisbaren Wirkungen und Nebenwirkungen?

III. Material und Methoden

III.1. Material und Patienten

III.1.1. Patienten

Mit Einverständnis der lokalen Ethikkommission wurden vier an sekundär chronisch progredienter MS (SP-MS) erkrankte Patienten im Rahmen eines individuellen Heilversuches mit *Trichuris suis* ova unter regelmäßiger klinischer sowie immunologischer Kontrolle behandelt. Die Krankheitskriterien nach McDonald, 2001 wurden erfüllt. Die Patienten standen während des gesamten Untersuchungszeitraumes unter Betreuung der Klinik für Neurologie der Charité–Universitätsmedizin Berlin, Campus Mitte.

	Patient 1	Patient 2	Patient 3	Patient 4
Geschlecht	m	w	m	m
Alter bei Untersuchungsbeginn	44	48	43	55
Jahre seit Erstdiagnose MS	4	3	13	14
Verlaufsform der MS	Sekundär progredient	Sekundär progredient	seit 7 Jahren sekundär chronisch-progredient	seit 6 Jahren sekundär chronisch-progredient
Erstdiagnose	2003	2004	1994	1993
MRT-Befund	2007: >20 Herde intracranial in Pedunculus cerebellaris bds., cervicalem Mark, supratentoriellem Marklager, Balken, Myelon Keine KM-speichernden Herde	2004: multiple intracraniale und spinale Herde	2006: > 40 supratentorielle Herde, mehrere infratentorielle Herde pontin/ Pedunculi cerebelli; V.a. Herde im Myelon; KM-Gabe verweigert	2003: multiple intracraniale und spinale Herde
Bisherige Therapie	5 Zyklen Mitoxantron-Stoßtherapie bis 12/2006; 02/2007 Triamcinolon intrathekal; Calcium-Antagonist	5 Zyklen Mitoxantron-Stoßtherapie bis 12/2006; Lioresal; 1x Triamcinolon intrathekal	1994: 5x1g Methylprednison i.v.; 2006: 5x1g Methylprednison i.v.	1993 - 2001 mehrfach hochdosierte Steroid-Stoßtherapie, seit 2001 als wirkungslos dokumentiert
EDSS Untersuchungsbeginn	6,0	4,0	5,0	8,0
EDSS Untersuchungsende	6,5	4,0	5,0	8,0
Gehstrecke Untersuchungsbeginn	10-100m (einseitige Gehhilfe), intermittierend weniger	100m	1-2km	max. 5m mit bds. Gehhilfe (intermittierend möglich)
Gehstrecke Untersuchungsende	10-100m (she. Beginn)	100m	2km	max. 5m (she. Beginn)

Tabelle (Tab.) 1: Im Rahmen des individuellen Heilversuches mit TSO behandelte MS-Patienten

III.1.2. *Trichuris suis ova* (TSO): Gewinnung, Verabreichungsform und Einnahme

TSO wurde von Parasite Technologies A/S, Copenhagen, Dänemark aus unter Laborbedingungen gezüchtet und mit *T. suis*-infizierten *Minipigs* (*Minipigs*) isoliert. Nach Reifung wurden die adulten Würmer in mehreren Schritten aus dem Schweinedarm selektiert, bis zur Eiablage in-vitro kultiviert und die Eier in einem speziellen Verfahren isoliert und für die Einnahme hygienisch aufbereitet. Die Prozessierung und Abfüllung in Ampullen erfolgte nach den Regeln der "Good manufacturing practice" ("GMP") für Phase II Studien (Ovamed GmbH, Barsbüttel, Deutschland).

TSO liegt gebrauchsfertig zur Einnahme als wässrige Suspension in einer 15 ml Verpackungseinheit vor, die jeweils 2500 entwicklungsfähige, aufgereinigte *Trichuris suis ova* im Embryonalstadium enthält, in 0,05-molarer (mol/L) Schwefelsäure (H₂SO₄, pH 1,0) konserviert. Diese wurden uns freundlicherweise von der Firma Ovamed, Barsbüttel, zur Verfügung gestellt. Die Lagerung der Ampullen erfolgte im Kühlschrank. Die Einnahme von TSO erfolgte bei Raumtemperatur über 12 Wochen in Abständen von jeweils 2 Wochen.

III.1.3. Probengewinnung

Die Proben wurden durch regelmäßige Blutentnahmen (jeweils morgens zwischen 6.00h – 9.00h) mittels Vacutainer-System gewonnen. Dabei wurden über einen Zeitraum von insgesamt 11 Monaten je Patient acht Blutentnahmen nach unten abgebildetem Schema (she. Abb. 1) durchgeführt. Die Blutentnahme- bzw. Messzeitpunkte wurden nach dem Kriterium festgelegt, bei möglichst geringer Patientenbelastung repräsentativ für immunologische Veränderungen zu sein.

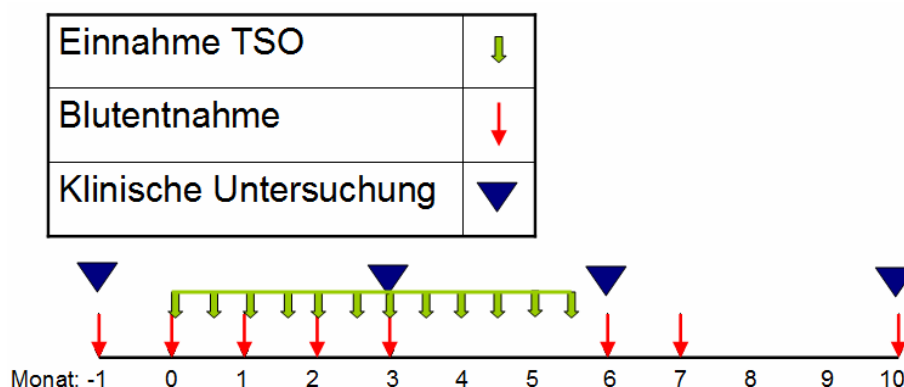


Abbildung (Abb.) 1: Zeitlicher Ablauf der TSO-Einnahme, Blutentnahmetermine und klinische Visiten

In Tabelle 2 wird die Nummerierung der Messzeitpunkte erläutert.

Vor TSO-Einnahme	Unter TSO-Einnahme	Nach TSO-Einnahme
Basiswert -1: ein Monat vor Beginn der TSO-Einnahme	Wert 1: ein Monat nach Beginn der TSO-Einnahme	Wert 7: sieben Monate nach Beginn der TSO-Einnahme; ein Monat nach Absetzen von TSO
Basiswert 0: direkt vor Beginn der TSO-Einnahme	Wert 2: zwei Monate nach Beginn der TSO-Einnahme	Wert 10: zehn Monate nach Beginn der TSO-Einnahme; zwei Monate nach Absetzen von TSO
	Wert 3: drei Monate nach Beginn der TSO-Einnahme	
	Wert 6: sechs Monate nach Beginn der TSO-Einnahme; Letzter Wert unter TSO-Therapie	

Tab. 2: Schema der Messzeitpunkte zur Blutentnahme

Es wurden jeweils die in Tab. 3 aufgeführten Parameter kontrolliert.

Kontrolle	Zeitpunkt (Monat)							
	-1	0	1	2	3	6	7	10
Auswahlkriterien	x							
Einverständniserklärung	x							
Ausführliche Anamnese	x							
Kurzanamnese	x	x	x	x	x	x	x	x
Medikamentenanamnese	x	x	x	x	x	x	x	x
Neurologische Untersuchung	x				x	x		x
Kontrolle Nebenwirkungen	x	x	x	x	x	x	x	x
Rotes Blutbild (Hb, Hkt, Erythrozytenzahl, MCH, MCHC, MCV, RDW)	x	x	x	x	x	x	x	x
Thrombozyten, MPV	x	x	x	x	x	x	x	x
Weißes Blutbild (Leukozytenzahl, Neutrophile/ Eosinophile/ Basophile Granulozyten, Monozyten, Lymphozyten)	x	x	x	x	x	x	x	x
Gesamt-IgE	x	x	x	x	x	x	x	x
IgG-Subgruppen (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4)	x	x	x	x	x	x	x	x
NK-Zellen (Zellzahl, Subgruppen)	x	x	x	x	x	x	x	x
B-Zellen (CD19+ Zellen) (Zellzahl, Subgruppen)	x	x	x	x	x	x	x	x
Monozyten/ Makrophagen (CD14+ Zellen)	x	x	x	x	x	x	x	x
CD4+ Zellen (Zellzahl, Subgruppen)	x	x	x	x	x	x	x	x
CD8+ Zellen (Zellzahl, Subgruppen)	x	x	x	x	x	x	x	x
Zytokinsekretion CD4+ Zellen (IL2, IL4, IL10, IFN γ) nach Stimulation im Vollblut	x	x	x	x	x	x	x	x
Zytokinsekretion (IL2, IL4, IL10, IFN γ) und Subgruppen (Effektor-, Memory-) CD4+ Zellen nach Stimulation in Kurzzeitzellkultur	x	x	x	x	x	x	x	x

Tab. 3: Durchgeführte Datenerhebungen, Untersuchungen und Zellanalysen

Zu jedem Messzeitpunkt erfolgte eine Blutentnahme mit Gewinnung folgender Proben:

1.) Proben für immunologische Messungen mittels FACS, zur IgE/IgG-Bestimmung beziehungsweise zur Konservierung bei -80°C

- 50 ml Vollblut in fünf heparinbeschichteten 10ml Vacutainern
- 10 ml Vollblut in einem Serum-Vacutainer

2.) Proben für hämatologische und chemische Analysen im Zentrallabor der Charité

- 5 ml Vollblut in heparinbeschichtetem Vacutainer
- 2 ml Vollblut in EDTA-beschichtetem Vacutainer

Vacutainer Systems Adapter	Vacutainer Systems BD, Plymouth, UK
Vacutainer Systems Butterfly Kanüle (21 G 0,5 x 19 mm)	Vacutainer Systems BD, Plymouth, UK
Serum Röhrchen 5 ml (SST II Advance)	Vacutainer Systems BD, Plymouth, UK
EDTA 2,0 ml Röhrchen mit 3,6 mg K2E	Vacutainer Systems BD, Plymouth, UK
Heparin 10ml Röhrchen mit LH PST II 3,0ml; LH 170 I.U.	Vacutainer Systems BD, Plymouth, UK
Vacutainer Sytems Blood Collection Set 0,8x19mmx178mm (LOT 06M19)	Vacutainer Systems BD, Plymouth, UK

Tab. 4: Zur Blutentnahme verwendete Materialien

III.1.4. Geräte

Brutschrank "Jouan IG 150" (ISO 9001)	Jouan GmbH, Unterhaching, Deutschland
Autoklav "Varioklav"	H+P Labortechnik
Eismaschine "Scotsman AF 10"	Scotsman, UK
FACS Calibur (Analysegerät)	BD, Heidelberg, Deutschland
Midi-MACS Magnet Separator	Miltenyi Biotech GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland
Multi-MACS Stand	Miltenyi Biotech GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland
Mikroskop DM IL	Leica, Wetzlar, Deutschland
Neubauer Zählkammer improved „bright line“	Schubert & Weiss, München, Deutschland
Lichtmikroskop	Carl Zeiss Jena, DDR
Vortex Genie 2	Scientific Industries
Zentrifuge Multifuge 1S-R Heraeus,	Thermo Electron Corporation, Langenselbold, Deutschland
Zentrifuge Force1618	Labnet, Deutschland
Zentrifuge Universal 30F,	Thermo Electron Corporation, Langenselbold, Deutschland
Vacunsafe comfort IBS	Integra Biosciences GmbH, Fernwald, Deutschland
-80er Hera Freeze,	Thermo Electron Corporation, Langenselbold, Deutschland
-80er Tiefkühltruhe	Heraeus, Kendro Laboratory Products
Laborkühlschrank (8°C)	Philipp Kirsch GmbH, Offenburg, Deutschland
Flow-bench Hera safe Kendro KS 12	Heraeus Langenselbold Deutschland
Pipetus Akku	Hirschmann Laborgeräte Eberstadt, Deutschland
Pipetten (100-1000 µl, 10-100µl, 0.5-10µl)	Eppendorf, Deutschland

Tab. 5: Eingesetzte Geräte

III.1.5. Verbrauchsmaterialien

1,5ml Eppendorf Gefäße	Eppendorf, Deutschland
1,5ml Eppendorfgefäße (Reagiergefäße)	Sarstedt AG&Co. Nümbrecht, Deutschland
5ml Rundboden-(FACS-)Röhrchen	BD, Heidelberg, Deutschland
10ml Rundboden Röhrchen, steril	Corning, Schiphol-Rijk, Niederlande
15ml Röhrchen Falcon-Tubes	BD, Heidelberg, Deutschland
15ml Zentrifugenröhrchen	Sarstedt AG&Co. Nümbrecht, Deutschland
20G Kanülen	BD Microlance, Fraga, Spanien
24well-Platten (flat bottom with lid)	Sarstedt AG&Co. Nümbrecht, Deutschland
50ml Zentrifugenröhrchen	Sarstedt AG&Co. Nümbrecht, Deutschland
IgE-Testkit für ELISA Sandwich-Assay	Euroimmun, Medizinische Labordiagnostika AG
LS Separation Columns	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland
mini FACS-Tubes	BD, Heidelberg, Deutschland
Pipettenspitzen Eppendorf	Eppendorf, Deutschland
serologische Pipetten 5ml/ 10ml Cosat Stripette	Corning New York, USA
Steriflip-Filtereinheit, 50ml	Millipore, Billerica, MA, USA
Steritop-Filtereinheit, 250ml	Millipore, Billerica, MA, USA
Trucount Tubes	BD Biosciences Becton, Dickinson and Company San Jose CA USA (LOT 74436; 48045 counts)
Zellkultureinsätze 0,4µm	BD Falcon, Heidelberg, Deutschland
Zellsiebe, 70µm	BD Falcon, Heidelberg, Deutschland

Tab. 6: Zur Zellpräparation verwendete Verbrauchsmaterialien

III.1.6. Chemikalien, Reagenzien und Fertiglösungen

Lösungen zur Zellpräparation und –aufbewahrung:

Aqua dest	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland
BD-Lyse	BD, Heidelberg, Deutschland
Biocoll Separation Solution: Isotonic solution, density 1,077 g/ml tested for endotoxin	Biochrom AG
Bovines Serumalbumin (BSA)	Biomol, Hamburg, Deutschland
Descosept, Spüh- und Wischdesinfektion	Dr. Schuhmacher GmbH, Melsungen
EDTA/PBS (20mM)	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Ethanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Fetales Kälberserum (FCS)	Biochrom, Berlin, Deutschland
Formaldehydlösung mindestens 37% stabilisiert mit ca. 10% Methanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Glutamin	Biochrom, Berlin, Deutschland
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Penicillin/Streptomycin	Gibco, Paisley, Großbritannien
Phosphate Buffered Saline (PBS), Dulbecco's PBS with Calcium and Magnesium	PAA Laboratorie GmbH Pasching, Österreich
Trypanblau 0,4% (prepared in 0,81% sodium chloride and 0,06% potassium phosphate, dibasic)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland

Tab. 7: Lösungen für Zellpräparation und Aufbewahrung

Lösungen zur Verwendung am Durchflusszytometer (FACS):

FACS- Perm (10fach gepufferte Permealizing Solution)	BD, Heidelberg, Deutschland
FACS Flow	BD, Heidelberg, Deutschland
FACS Clean	BD, Heidelberg, Deutschland
FACS Rinse	BD, Heidelberg, Deutschland

Tab. 8: Lösungen zur Verwendung am Durchflusszytometer (FACS)

Antikörper zur Durchflusszytometrie und magnetgekoppelten Zellsortierung:

Als Fluorochrome wurden Fluoresceinisothiocyanat (FITC, FL1), Phycoerythrin (PE, FL2), Perinidin-Chlorophyll-A-Protein (PerCP, FL3) und Allophycocyanin (APC, FL4) verwendet.

Antikörper	Hersteller
FITC anti-human CD3	BD (Beckton Dickinson) Biosciences Pharmingen, Heidelberg, Deutschland
FITC anti-human CD44	BD, Heidelberg, Deutschland
FITC anti-human CD62Ligand (CD62L)	BD, Heidelberg, Deutschland
FITC anti-human IL2	BD, Heidelberg, Deutschland
FITC anti-human IFN γ	BD, Heidelberg, Deutschland
PE anti-human CD4	BD, Heidelberg, Deutschland
PE anti-human CD23	BD, Heidelberg, Deutschland
PE anti-human CD27	BD, Heidelberg, Deutschland
PE anti-human CD56	BD, Heidelberg, Deutschland
PE anti-human CD154 (CD40Ligand)	BD, Heidelberg, Deutschland
PerCP –Cy 5,5 labeled anti-human CD14	BD, Heidelberg, Deutschland
PerCP (SK3) anti-human CD4 PerCP	BD, Heidelberg, Deutschland
Streptavidin(SA)-PerCP	BD, Heidelberg, Deutschland
APC anti-human CD3	BD, Heidelberg, Deutschland
APC anti-human CD4	BD, Heidelberg, Deutschland
APC anti-human CD8	BD, Heidelberg, Deutschland
APC anti-human CD14	BD, Heidelberg, Deutschland
APC anti-human CD19	Beckman Coulter Immunotech, Marseille Frankreich
APC- rat anti-human IL4	BD, Heidelberg, Deutschland
APC-rat anti-human IL10	BD, Heidelberg, Deutschland
Purified NA/LE anti-human CD28	BD, Heidelberg, Deutschland
Biotinylated anti-human CD45RA	BD, Heidelberg, Deutschland
Octagam® humanes Immunglobulin G (Subklassenverteilung wie im menschlichen Blutplasma)	OCTAPHARMA GmbH, Langenfeld, Deutschland
CD4 Micro Beads anti-human	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland

Tab. 9: Antikörper zur Färbung für Durchflusszytometrie und magnetgekoppelten Zellsortierung

Stimulatoren und Inhibitoren der Zytokinsekretion:

Ionomycin Kalziumsalz aus Streptomyces conglobatus, Puder, $\geq 98\%$ (HPLC)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
PMA (Phorbol 12-Myristat 13-Acetat $\geq 99\%$ (TLC) Puder)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
TSST (Toxic Shock Syndrome Toxin-1) 0,1mg \rightarrow 100ug + 200ug PBS, [1:2 in Ethanol (s.o.) verdünnt]	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
SEA (Staphylococcal Enterotoxin A) 0,1mg (1:1 in Ethanol verdünnt)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
SEB (Staphylococcal Enterotoxin B) 0,1mg (1:1 in Ethanol verdünnt)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Brefeldin A aus Penicillium brefeldianum (=Decumbrin, Ascotoxin, Cyanein, BFA) in Ethanol 5 mg/ml	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland

Tab. 10: Stimulatoren und Inhibitoren der Zytokinsekretion

III.1.7. Puffer und Zellkulturmedien

1. Waschpuffer: PBS mit 2 Volumen% FCS

2. MACS-Puffer: PBS, 0,005 Volumen% FCS, EDTA (2mM) (alle Biochrom, Berlin, Deutschland)

3. Zellkulturmedium (Komplettmedium): RPMI 1640 mit 5mg/l Phenolrot mit 25mM HEPES mit stabilem Glutamin, 10 Volumen% FCS, 1 Vol.% (50000 IU) Penicillin/Streptomycin (alle Biochrom, Berlin, Deutschland)

III.1.8. Software

Cell Quest, Version 3.1	BD, Heidelberg, Deutschland
GraphPadPrism Version 5.0	GraphPadSoftware, Inc.1994-2007 San Diego, CA, USA
Microsoft Excel Version 2003	Microsoft Corporation
Sigma 2001	SPSS Inc., Chicago, IL, USA

Tab. 11: Verwendete Software

III.2. Methoden

Steriltechnik

Zur Vermeidung von Kontamination wurden für alle Arbeiten mit Zellen nur sterile Kulturgefäße, Nährlösungen und Arbeitsgeräte verwendet. Zellisolutions- und Kultivierungsarbeiten wurden stets unter einer keimfreien Arbeitsbank mit laminarer Luftströmung (Flow-bench) durchgeführt.

III.2.1. Bestimmung der Immunglobuline im Serum mittels ELISA

Die Gewinnung von Serum zur Analyse der darin enthaltenen Immunglobuline und späteren Konservierung erfolgte durch Zentrifugieren eines 10 ml-Serum-Vacutainers bei 1000g über eine Dauer von 15 min. Der dabei entstehende Überstand wurde unter sterilen Bedingungen in jeweils drei sterile 1,5 ml Eppendorf-Gefäße überführt und unmittelbar schonend bei -80°C tiefgekühlt.

Die Durchführung des ELISA (Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay) erfolgte durch die Firma Euroimmun, Deutschland, nach standardisiertem Protokoll ¹⁰⁹.

III.2.2. Bestimmung zellulärer Blutbestandteile und funktioneller Parameter

Die Kontrolle der zellulären Blutbestandteile wie Erythrozytenparameter [Hämoglobin, Hämatokrit, Erythrozytenzahl, MCH (engl., mean corpuscular heamoglobin), MCHC (engl. mean corpuscular heamoglobin concentration) , MCV (engl. mean corpuscular volume), RDW (engl. red cell distribution width), Thrombozyten, MPV (durchschnittliches Thrombozytenvolumen, engl. "mean platelet volume"), Leukozyten und ihrer Subgruppen neutrophile, eosinophile und basophile Granulozyten, Lymphozyten und Monozyten sowie von Leber- [Gamma-Glutamyl-Transseferase (GGT), Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT), Glutamat-Pyruvat-Transaminase GGT) und Nierenparametern (Harnstoff, Kreatinin) erfolgte im Zentrallabor der Charité-Universitätsmedizin Berlin unter standardisierten Bedingungen.

III.2.3. Durchflusszytometrie

Grundprinzipien der Durchflusszytometrie

Durchflusszytometer sind lasergestützte optische Meßsysteme, die z.B. Zellen in Suspension analysieren. Dabei werden Eigenschaften wie Größe und Granularität der Zellen durch Lichtstreuung parallel zur Auftreffrichtung (forward scatter, FSC für Größe) und in 90°Richtung (side scatter, SSC für Granularität) bestimmt. Zudem können

mittels Bindung von fluoreszenzfarbstoffgekoppelten Antikörpern spezifische Zellstrukturen an Zelloberflächen oder im Zellinneren analysiert werden¹¹⁰.

Das FACS Calibur ermöglicht die synchrone Detektierung von vier verschiedenen Fluoreszenzen. FSC- und SSC- Signale werden mit linearer, die Fluoreszenzsignale in logarithmischer Verstärkung aufgenommen. Je nach Probe wurden die Daten von mindestens 50 000 bis hin zu 400 000 Zellen aufgenommen.

Zur Analyse wurde CellQuest Research Software (Becton-Dickinson, Heidelberg, Deutschland) verwendet. Die Daten wurden als zweidimensionale "Punkt-Bilder" (engl. Dot Plots) dargestellt.

Darstellung und Selektion von Zellpopulationen in der Durchflusszytometrie:

Nach Lyse der Erythrozyten erfolgt die Darstellung der weißen Blutzellen entsprechend ihrer Größe und Granularität zweidimensional im Koordinatensystem als Punktwolken in charakteristischer Anordnung. Auf diese Weise lassen sich Lymphozyten (incl. NK-Zellen), Granulozyten, Monozyten und Makrophagen optisch abgrenzen.

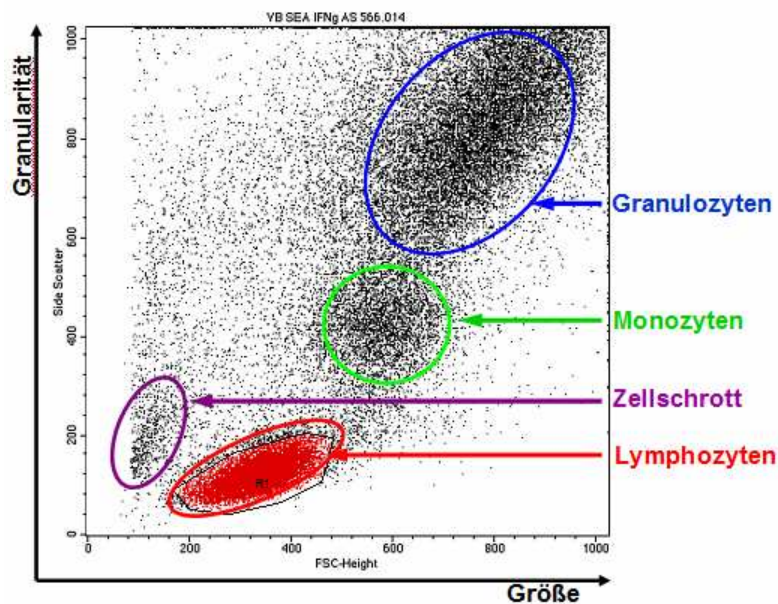


Abb. 2: Zellpopulationen im FSC/SSC

Soll eine der so abgegrenzten Zellpopulationen gesondert untersucht werden, grenzt man diese durch ein manuell zu setzendes Analysefenster, ein sogenanntes "Gate" von den restlichen Zellen ab, wodurch eine neue "Region" definiert wird und stellt diese Region in einem neuen Dot Plot dar. Die vorher mit fluoreszierenden Antikörpern markierten oder gefärbten Zellen bilden sich entsprechend der Intensität ihrer Fluoreszenz (die relativ zur Expression des jeweiligen Markers ist) in Gruppen an einer

logarithmisch skalierten Achse ab. Anhand dessen werden Zellen als positiv oder negativ für zwei bestimmten Marker (X-Achse und Y-Achse) definiert und wiederum durch entsprechende Gates abgegrenzt, z.B. kann der Dot Plot in 4 Quadranten unterteilt werden. Auf diese Weise werden die entsprechenden Zellzahlen der einzelnen Regions ermittelt. Die Analyse kann aber auch durch wiederholtes Gating selektierter Zellpopulationen spezifiziert werden, je nachdem mit wie vielen verschiedenen fluoreszierenden Antikörpern die Zelle vorher markiert wurde.

Präparation und Analyse der einzelnen Zellgruppen in der Durchflusszytometrie:

Insgesamt wurden 7 verschiedene Typen von Färbungen zur qualitativen und quantitativen Analyse der zellulären Subgruppen und deren Zytokinmuster durchgeführt. Grundsätzlich wurden bei allen beschriebenen Färbeschritten durch Konjugation von fluoreszierenden Antikörpern an Zellen zur Verhinderung unspezifischer Bindungen jeweils 2µl Octagam hinzugefügt.

Zelltyp	Verfahren	Färbung
NK-Zellen	Färbung im Vollblut	CD3-APC, CD44-FITC, CD56-PE
Zytotoxische T-Zellen (CD8 +)	Färbung im Vollblut Trucount	CD3- FITC, CD4- PE, CD8- APC, CD45RA-PerCP
Monozyten und Macrophagen (CD19+)	Färbung im Vollblut Trucount	CD14- PerCP, CD19- APC, CD23- PE, CD62L-FITC
NK-Zellen (CD16+)	Färbung im Vollblut Trucount	CD3- APC, CD 56- PE, CD62L- FITC
T-Helferzellen (CD4+)	Färbung im Vollblut Trucount	CD4- APC, CD 27- PE, CD 45RA- PerCP, CD62L- FITC
T-Helferzellen (CD4+)	Stimulation im Vollblut	CD4-PerCP, CD154 (CD40L)-PE IL2-FITC, IL4-APC, IL10-APC, IFN γ -FITC
T-Helferzellen (CD4+)	Stimulation in Kurzzeitzellkultur	CD27-PE, CD45RA-PerCP IL2-FITC, IL4-APC, IL10-APC, IFN γ -FITC

Tab. 12: Mittels FACS analysierte Zellen, deren Präparation und Oberflächenantigene

Bestimmung des Anteils CD56++ NK-Zellen

Nachdem 100µl Heparinblut in einem 1,5ml Eppendorf-Gefäß mit 100µl PBS gemischt, zentrifugiert (300G, 7min), der Überstand verworfen und unter Zugabe von 2µl Octagam resuspendiert wurde, erfolgt die Färbung mit Antikörpern: mit jeweils 5µl CD44-FITC, CD3-APC und CD56-PE inkubieren die Zellen 20min bei 8°C. Darauf folgt die Erythrozytenlyse und gleichzeitige Fixierung der weißen Blutzellen durch Zugabe von 1ml BD-Lyse und 10-minütiger Inkubation. Nach zwei Waschschrinen werden die Zellen in 100µl FACS-Flow aufgenommen und gefacst.

Nach Selektion der Lymphozyten im FSC/SSC Dot Plot wurden diese jeweils in einem mit CD3/CD56 und einem mit CD44/CD56 skalierten Dot Plot dargestellt. Die interessierende Zellpopulation war im ersten Fall CD3- und CD56++ (hoch positiv), im zweiten Fall CD44+ und CD56++. Durch diese doppelte Bestimmung der interessierenden Zellpopulation konnte eine höhere Genauigkeit und geringere Fehlerwahrscheinlichkeit durch kontrollierenden Abgleich erzielt werden.

Bestimmung der Absolutzellzahl ausgewählter Zellpopulationen mittels Truocount

1. Färbung der Zellen im Truocount-Tube

Die Verwendung von Truocount Röhrcchen in der Durchflusszytometrie ermöglicht die rechnerische Bestimmung der Absolutzellzahl von Zellpopulationen. Im Truocount Röhrcchen befindet sich eine bestimmte, vom Hersteller für die betreffende Charge angegebene Anzahl Microbeads mit definierten Eigenschaften, die genau wie Zellen den Durchflusszytometer passieren und im Punktdiagramm als abgegrenzte Gruppe erscheinen. Mittels folgender Formel kann bei der späteren Auswertung nun die Zellzahl definierter Zellpopulationen errechnet werden:

$\text{Zellzahl/ } \mu\text{l} = \frac{\text{Counts der zu untersuchenden Population} \times \text{Referenzzahl der Microbeads der Charge}}{\text{Counts der Microbeads} \times \text{Zellzahl/ } \mu\text{l Vollblut}}$
--

Zur Vorbereitung der Zellen wurde jeweils 50 µl Vollblut, 20 µl PBS, 2 µl Octagam und die jeweilige Antikörpermischung in 4 Truocount Röhrcchen pipettiert und für 15min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zusammensetzung der einzelnen Antikörpermischungen (jeweils 20µl) ist folgender Tabelle zu entnehmen.

Färbung	1.) CD4+ Lymphozyten	2.) CD8+ Lymphozyten	3.) B-Zellen; Monozyten, Makrophagen	4.) NK-Zellen
Antikörper	CD62L- FITC	CD3- FITC	CD62L- FITC	CD62L- FITC
Antikörper	CD 27- PE	CD4- PE	CD23- PE	CD 56- PE
Antikörper	CD 45RA- PerCP	CD45RA- PerCP	CD14- PerCP	CD3- APC
Antikörper	CD4- APC	CD8- APC	CD19- APC	

Tab. 13: Präparation von Antikörpern (jeweils 3-4 pro Mischung) zur weiteren durchflusszytometrischen Analyse verschiedener Lymphozyten mittels Truecount

Daraufhin wurden die Proben in 1,5 ml Eppendorf-Gefäße überführt. Während Färbung 3 und 4 jeweils direkt mit 450 µl FACS-Lyse für 10 min bei RT inkubiert und abschließend gewaschen wurden, erfolgte bei ersten beiden Färbungen nach

zweimaligem Waschen die Inkubation mit jeweils 5 µl SA-PerCP für 15min bei RT. Danach wurden auch diese analog zu Färbung 3 und 4 gewaschen, in FACS-Flow aufgenommen und gefacst.

2. Analyse der mittels Trucount erfassten Zellen

- CD4+ T-Lymphozyten:

Aus dem mit CD4/SSC skalierten Dot Plot wurde die Gruppe CD4 exprimierender Zellen der entsprechenden Granularität selektiert und mittels FSC/SSC Zellen abweichender Größe entfernt, zusätzlich wurden hier die Trucount-Beads erfasst. Die selektierten T-Helfer Zellen wurden nun anhand von CD45RA/CD62L und CD45RA/CD27 skalierten Dot Plots erfasst sowie die absolute Zellzahl errechnet.

CD45RA, eine Tyrosinphosphatase wird auf allen naiven Blutzellen exprimiert, während aktivierte Zellen grundsätzlich negativ für diesen Marker sind.

CD62L, sogenanntes L-Selektin, vermittelt das "Leukozytenhoming", den Ausstieg von Zellen aus der Blutbahn in Hochendothelvenolen peripherer Lymphorgane. Bei Aktivierung verlieren CD4 T-Zellen diesen Marker, der dann durch andere Selektine für die Migration durch nichtlymphatische Gefäße ersetzt wird. Somit werden CD62L-negative Zellen als aktivierte oder T-Effektorzellen definiert ⁸⁶.

CD27 wird konstitutionell von T-Zellen exprimiert. Zudem spielt es eine Rolle in der T-Zellentwicklung, da es nach Aktivierung über den Antigenrezeptor verstärkt exprimiert wird und kostimulatorische Signale übermittelt ¹¹¹. Bei weiterer Aktivierung und kommt es mit fortschreitender Zelldifferenzierung bei einem kleinen Teil der CD4+CD45RA- T-Zellen zum Verlust der CD27-Expression und Erlangen von Gedächtnisfunktion ^{112, 113}. Diese Zellen sezernieren bei Aktivierung verstärkt bestimmte Zytokine, z. B. IFN γ oder IL4. Sie werden daher als T-Gedächtnis-Zellen definiert.

- CD8+ T-Lymphozyten:

CD8+ Zellen wurden als zytotoxische T-Lymphozyten definiert. Im Analysefenster CD8/SSC wurde die Anzahl CD8+ Zellen und Microbeads bestimmt. CD8 positive Zellen wurden daraufhin im Dot Plot FSC/SSC dargestellt und nach Zellgröße positiv selektiert. Aus dem Lymphozytengate wurden die CD3+ Zellen selektiert, darauf folgend wurden die CD4+ Zellen aussortiert. Die verbleibenden CD8+CD4- Lymphozyten wurden im Dot Plot CD45RA/SSC dargestellt und in naive CD8+CD45RA+ und CD8+CD45RA- Gedächtnis- bzw. Effektorzellen unterteilt und analysiert ¹¹⁴.

Mittels in Absatz III.2.3. genannter Formel wurden die Absolutzahlen der Subgruppen errechnet.

- CD19+ B-Zellen und CD14+ Monozyten/ Macrophagen:

Monozyten und Macrophagen wurden als CD14+ Zellen definiert und folgendermaßen selektiert: Bestimmung der betreffenden Population in FSC/SSC, daraufhin Selektion mittels CD14/SSC nach CD14+ Zellen und Bestimmung der Anzahl der Microbeads im gleichen Dot Plot zur Errechnung der Absolutzellzahl.

B-Zellen wurden als CD19+ Zellen definiert und entsprechend nach folgendem Schema selektiert: Bestimmung der betreffenden Population in der Anzeige FSC/SSC, daraufhin Selektion mittels CD19/SSC nach CD19+ Zellen und Bestimmung der Anzahl der Microbeads im gleichen Dot Plot zur Errechnung der Absolutzellzahl. Die weitere Analyse von Subgruppen der B-Zellen erfolgte mittels CD62L. CD62L-negative B-Zellen wurden als aktivierte Zellen definiert.

- CD56+ NK-Zellen:

Die Selektion der CD56++ NK-Zellen als zu untersuchende Population erfolgte in dieser Reihenfolge: Selektion der Lymphozyten (R1), Selektion der CD3-negativen Zellen, Selektion der CD56+ Zellen und zuletzt Selektion und Zählung des Anteils der CD56++ Zellen als interessierende Population.

In einem weiteren Dot Plot wurden dieselben CD56+ Zellen hinsichtlich ihrer Expression von CD56 und CD44 dargestellt (R2). CD56++ Zellen sind stets CD44 positiv, während CD56+ Zellen teils CD44+, teils CD44- sind.

Durch diese doppelte Bestimmung der interessierenden Zellpopulation konnte eine höhere Genauigkeit und geringere Fehlerwahrscheinlichkeit durch Abgleich erzielt werden. Die Bestimmung der Absolutzellzahl der jeweiligen Zellpopulationen erfolgte nach weiter oben (Abschnitt III.2.3) genannter Formel.

Analyse von CD4+ Zellen nach Stimulation mit Superantigenen im Vollblut:

1. Stimulation der CD4+ Zellen mit Superantigenen im Vollblut

Zunächst wurde jeweils 1ml heparinisiertes Frischblut in sechzehn 10ml-Tubes verteilt. Daraufhin erfolgte die unspezifische Stimulierung der Lymphozyten, zunächst mit jeweils 1µl CD28-Antikörper zur Simulation der kostimulatorischen Aktivierung durch APC über den Rezeptor CD28. Dann wurden jeweils 4 Proben zur Aktivierung mit

Superantigenen versetzt: 1,5µl Staphylococcus-Enterotoxin A (SEA), 1,5µl Staphylococcus-Enterotoxin B (SEB) und dem ebenfalls von Staphylokokken gewonnenen 1,0µl Toxic-Shock-Syndrom-Toxin-1 (TSST-1). Bakterielle Superantigene bewirken über hochaffine zinkabhängige Bindung an die Vβ-Untereinheit (und in manchen Fällen auch niedrigaffine Bindung an die Vα-Untereinheit) des T-Zellrezeptors CD3 eine maximale Stimulation der Zytokinproduktion. Zum späteren Negativabgleich wurden 4 Proben lediglich mit CD28-AK belassen, der alleine keine Stimulation bewirkt. Nach zweistündiger Inkubationsdauer im Brutschrank erfolgte der Zusatz des Exkretionsinhibitors Brefeldin A (5µg/ml), welcher die Exkretion neu gebildeter Zytokine durch Dissoziation des Golgi-Apparates verhindert, nicht jedoch ihre Synthese und somit zu Akkumulation im Zellinneren führt ¹¹⁵. Nach sechsstündiger Gesamtinkubationsdauer erfolgten Fixierung und Färbung der Zellen.

2. Zellyse und -fixierung

Zunächst wurden die Zellen mit 20mM EDTA/PBS für 10min bei RT inkubiert. Nach Zugabe des Lysepuffers erfolgte ein weiterer Inkubationsschritt unter gleichen Bedingungen, der durch zentrifugieren (10min, 500G) beendet wurde. Zur Permeabilisierung der Zellmembran wurden die Zellen mit FACS-Perm inkubiert (10min bei RT) und daraufhin gewaschen. Danach wurden die Proben unter Zugabe von Octagam in 1,5ml-Gefäße überführt und mit antikörpergekoppelten Fluoreszenzfarbstoffen nach dem in Tabelle 14 dargestellten Schema (20min, 8°C, Lichtausschluss) inkubiert.

Fluoreszenzfarbstoffe	CD28-AK	CD28-AK + SEA (1,5µl)	CD28-AK + TSST (1,0 µl)	CD28-AK + SEB (1,5µl)
IL2, CD4, CD154	Probe 1	Probe 5	Probe 9	Probe 13
IL4, CD4, CD154	Probe 2	Probe 6	Probe 10	Probe 14
IL10, CD4, CD154	Probe 3	Probe 7	Probe 11	Probe 15
IFNγ, CD4, CD154	Probe 4	Probe 8	Probe 12	Probe 16

Tab. 14: Schema zur intra- und extrazellulären Färbung der CD4+ Lymphozyten

Abschliessend wurden die Zellen gewaschen und zu der direkt im Anschluss durchgeführten durchflusszytometrischen Analyse in FACS-Flow aufgenommen.

3. Analyse im FACS

Die Selektion erfolgte folgendermaßen: Selektion der Lymphozyten im FSC/SSC, Selektion der CD4+ Zellen, weitere Analyse in der Darstellung CD154/Zytokin (IL2, IL4, IL10 bzw. IFN γ).

CD154 (= CD40L bzw. CD40-Ligand) wird auf der Oberfläche von aktivierten, nicht aber von ruhenden T-Zellen exprimiert und dient somit als Differenzierungsmarker zwischen diesen beiden Populationen ⁸⁶. Seine Rolle besteht in der Regulierung der B-Zell-Funktion durch Bindung an CD40 auf der B-Zell-Oberfläche im Sinne eines Signals zum Immunglobulin-Klassenwechsel. Auf diese Weise konnten inaktive und aktivierte Zellen voneinander abgegrenzt und deren Zytokinproduktion basal sowie nach Stimulation beurteilt werden.

Auf diese Weise wurden die Anteile der Zellen bestimmt, die unter unspezifischer Stimulation IL2 bzw. IL4, IL10 oder IFN γ produzieren. Ausgewertet wurde der relative Anteil der CD4+ T-Zellen, die eines der Zytokine IL2, IL4, IL10 oder IFN γ produzieren. Zunächst erfolgte die getrennte Analyse dieser Anteile für jeden Patienten (Patient 1, 2, 3, 4), jedes Zytokin (IL2, IL4, IL10, IFN γ) und jedes der drei unspezifischen Stimulantien (SEA, SEB, TSST) getrennt. Danach wurden Mittelwerte und der Standardfehler (engl. standard error of mean, SEM) berechnet und die Ergebnisse tabellarisch und graphisch dargestellt.

Funktionelle Analyse CD4+-Zellen durch in-vitro Stimulation:

1. Gewinnung von CD4+-Zellen für Kurzzeit-Zellkultur

- Isolierung peripherer mononukleärer Zellen aus Vollblut durch Dichtegradientenzentrifugation:

Zunächst werden periphere mononukleärer Zellen (PBMC = T- und B-Lymphozyten, NK-Zellen, Monozyten und dendritische Zellen) aus dem Frischblut isoliert, was mittels isopyknischer Zellfraktionierung mithilfe von Biocoll-Trennlösung erfolgt. Näheres zur Methodik beinhaltet folgende Referenz ¹¹⁶. Die Schritte erfolgten wie unten beschrieben:

- mindestens 30ml venöses Heparinblut mit PBS auf 50ml Gesamtvolumen verdünnt
- Verteilung auf je 15ml Biocoll-Trennlösung in zwei 50ml-Tubes (zwei Phasen)
- 30min Zentrifugation (500G, 20°C, Bremse auf Stufe 9) zur Auftrennung der einzelnen Zellpopulationen ·
- Abpipettieren des Interphaseringes (enthält PBMC), Überführung in zwei sterilen 50ml-Röhrchen

- drei weitere Waschschritte mit jeweils 10ml PBS/FCS (300G, 20°C, 10min) zur Entfernung von Biocoll- und Thrombozytenresten
- Bestimmung der Zellzahl durch Entnahme eines Aliquot vor dem letzten Waschschritt
- Zellpellet nach Entfernung des Überstandes zur weiteren Separation der CD4+ Zellen und zur Konservierung von PBMC verwendet.

- Zellzählung:

Die Zellzählung erfolgte manuell mithilfe der Neubauer-Zählkammer, einer ca. 3x8cm durchmessenden Glasplatte mit 4 Großquadranten, die jeweils in 16 Kleinquadranten eingeteilt sind. Auszählen der einzelnen Quadranten und anschließendes Hochrechnen mit folgender Formel ergibt die durchschnittliche Zellzahl:

Zellzahl pro Großquadrant x Verdünnungsfaktor x Kammerfaktor 10^4 x Vol. der Ausgangslösung (ml)
--

Jeweils 2µl einer im Verhältnis 1:10 mit Tryptanblau 0,4% verdünnten Probe werden in die Neubauer-Zellkammer pipettiert und direkt im Anschluss unter dem Mikroskop gezählt. Die Färbung mit Tryptanblau ermöglicht die Differenzierung vitaler und toter Zellen, da sich lediglich tote Zellen anfärben und damit von der Zählung ausschließen lassen.

- Isolierung von CD4+ T-Zellen durch MACS:

Zur Isolierung der CD4+ T-Zellen wurde das magnetische Zelltrennungssystem Midi-MACS (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland) verwendet. Die Trennung von Zellfraktionen basiert auf der Anwendung superparamagnetischer, an monoklonale Antikörper konjugierter Mikropartikel (Microbeads), die spezifisch an das definierte Antigen auf der Zelloberfläche binden. Die magnetisch markierten Zellen können über eine an ein Magnetfeld gekoppelte Separationssäule in mehreren Schritten von den übrigen Zellpopulationen getrennt werden ¹¹⁷.

Die Separation der CD4+ Zellen erfolgt nach folgendem Schema: die mittels Dichtezentrifugation isolierten PBMC werden mit MACS-Puffer (8°C, 40 µl/10⁷ Zellen) und CD4 Microbeads (20 µl/10⁷ Zellen) resuspendiert und unter Zugabe von 10 µl Octagam (humanes IgG) für 15 Minuten im Kühlschrank inkubiert. Im Anschluss wird die Suspension mit 1ml entgastem MACS-Puffer gewaschen (300G, 10min, 4°C), die markierten PBMC in 500µl MACS-Puffer aufgenommen und auf der Separationssäule plaziert, welche vorher mit 3ml MACS-Puffer äquilibriert wurde. Nach dreimaligem Waschen mit jeweils 3ml Puffer und daraufhin erfolgtem Wechsel des Tubes entfernt

man die Säule aus dem Magnetfeld und eluiert mit 3ml MACS-Puffer. Die so gewonnene Suspensionslösung enthält CD4+ T-Lymphozyten, die im Anschluss gezählt und in Kompletmedium auf eine Zellzahl von 1×10^6 Zellen/ml eingestellt wird.

- Zellkultivierung der isolierten CD4+ Zellen:

Die unter standardisierten Bedingungen durchgeführte Zellkultivierung der isolierten CD4+ Zellen erfolgte mit einer Konzentration von 1×10^6 Zellen/ml in Kompletmedium im Brutschrank bei 37°C, 100% Luftfeuchtigkeit und 5,2 %igem CO₂-Gehalt. Als Kulturgefäße dienten 24-well Platten für Suspensionskulturen. Es wurden vier Proben mit jeweils 1×10^6 Zellen kultiviert.

- Polyklonale in vitro CD4+Th- Zell-Stimulation:

Nach einer Inkubationsdauer von 20h erfolgte die Stimulation der isolierten CD4+ Zellen mit Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA), 5ng/ml und Ionomycin, 1µg/ml über einen Zeitraum von 6h. PMA simuliert dabei durch eine Aktivierung der Proteinkinase C ein Triggern des T-Zell Rezeptors, während Ionomycin gleichzeitig für einen Calciumeinstrom in die T-Zelle sorgt. Dadurch wird eine maximale Aktivierung jeder T-Zelle bewirkt, es kommt zur Sekretion des zelleigenen typischen Zytokinpatterns¹¹⁸. Zwei Stunden nach Inkubationsbeginn wurden jeweils 2µl des Exkretionsinhibitors Brefeldin A (5µg/ml) hinzugefügt. Durch die Akkumulation der Zytokine im Golgi Vesikel ist bei entsprechender Präparierung der Zellen mit Perforin bzw. FACS-Perm die anschließende intrazelluläre Färbung mittels fluoreszierender Antikörper möglich.

- CD4+ Färbung und Fixierung der Zellen:

Bei den im Folgenden beschriebenen Schritten erfolgte das Waschen der Zellen jeweils mit 1ml Waschpuffer, die Zentrifugation über 7min bei 300G und RT. Das nach Abnehmen des Überstandes verbleibende Zellpellet wurde stets in 100µl resuspendiert, Inkubationsschritte zur Konjugation von Antikörpern an Zellen fanden allesamt bei einer Temperatur von 8°C unter Lichtausschluss statt, sofern nicht gesondert erwähnt.

Nach sechsständiger Inkubationsdauer erfolgte:

- Überführung in 1,5ml Röhrchen, Zentrifugierung zur Entfernung des Zellmediums
- Markierung der Zellen mit CD45RA-Antikörper (5µl), 20min Inkubation, Waschen
- Zugabe von jeweils 0,5µl SA-PerCP-Antikörper zur späteren Markierung der CD45RA-AK

- Fixierung der Zellen mit jeweils 800µl Waschpuffer und 100µl 20%iger PFA (Paraformaldehyd)-Lösung, 10min, Raumtemperatur, Lichtausschluss, anschliessend Zentrifugation
- Permeabilisierung der Zellmembran für die intrazelluläre Konjugation der fluoreszenzmarkierten Antikörper: Inkubation mit jeweils 1ml 0,5%iger Saponinlösung, über 10min, Raumtemperatur, danach zentrifugiert
- 20min Inkubation der Proben mit fluoreszierenden anti-Zytokinantikörpern aus vorher präparierten Kombinationslösungen (jeweils CD27 plus IFN γ und IL-4, bzw. IL2 und IL10)
- Waschen der Zellen, Aufnahme in FACS-Flow

- Einteilung der CD4+ Zell- Subpopulationen:

Nach erfolgter Selektion der CD4+ Lymphozyten wurden diese anhand von CD45RA und CD27 dargestellt. Dabei ergaben sich anhand der Expression der Oberflächenmoleküle CD27 und CD45RA die drei Untergruppen naive, Effektor- und Gedächtnis-T-Zellen nach in Tab. 15 dargestellter Einteilung:

Oberflächenmarker	Subgruppe der CD4+ T-Zellen
CD27+CD45RA-	T-Effektorzellen
CD27-CD45RA-	T-Gedächtniszellen/Memory-Zellen
CD27+CD45RA+	naive T-Zellen

Tab. 15: Subgruppen der CD4+ T-Zellen und ihre Oberflächenmarker

Daraufhin wurden die Zytokinproduktion der CD4+ Zellen insgesamt und nach Subpopulation aufgetrennt mit und ohne Stimulation analysiert. Erfasst wurde die intrazelluläre Expression von IL2, IL4, IL10 sowie IFN γ bzw. der Prozentsatz der für diese Interleukine positiven Zellen.

III.2.4. Analysesoftware für die Durchflusszytometrie

Alle FACS-Analysen wurden am Gerät Calibur durchgeführt, zur Etablierung und Kalibrierung der Experimente sowie der Darstellung der Messergebnisse wurde CellQuest Analysesoftware auf einem Macintosh Computer verwendet.

III.2.5. Statistische Auswertung und graphische Darstellung

Die Ermittlung der Rohdaten in der Durchflussanalyse erfolgte mittels CellQuest Software durch Darstellung in Dot Plots. Durch Setzen von Analysefenstern werden bei

diesem Programm die Absolutzahl der gemessenen Zellen und die jeweiligen entsprechenden prozentualen Anteile in Tabellenform präsentiert. Diese Daten wurden in das Programm Excel (Microsoft Office 2003) und Graph Pad Prism übertragen.

Die statistische Auswertung der Änderungen aller untersuchten Immunparameter im Verlauf erfolgte zunächst mittels gepaartem Student'schen T-Tests mit zweiseitiger Verteilung. Dabei wurden einerseits die vor Therapie ermittelten und als Basiswerte definierten Messergebnisse in Bezug zu den unter bzw. nach Therapie ermittelten Werten verglichen. Ein p-Wert $<0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen, als hochsignifikant wurden p-Werte $<0,01$ angesehen. Der T-Test wurde im Programm Microsoft Excel durchgeführt.

Zur Validierung der statistischen Ergebnisse erfolgte eine Messwiederholung mittels Varianzanalyse "one-way-ANOVA" (Analysis of Variance). Da durch die geringe Fallzahl bedingt für die vorliegenden Daten keine Gauss'sche Verteilung angenommen werden konnte, wurde die nonparametrische Varianzanalyse mittels Friedman-Test bei verbundenen Stichproben (Messdaten aller Patienten im Verlauf) zur Ermittlung signifikanter Änderungen unter Therapie durchgeführt. Als a-posteriori-Methode wurde Dunn's-Post-hoc-Analyse ("Dunn's multiple comparison test") angewendet, die eine detailliertere Analyse der Signifikanzen erlaubt. Für Friedman-Test und Dunn's Post-hoc-Analyse wurde das Programm GraphPadPrism verwendet.

Zur graphischen Darstellung der Messergebnisse wurde ebenfalls GraphPadPrism verwendet.

IV. Ergebnisse

IV.1. Funktionelle Analyse der CD4+ T-Lymphozyten unter TSO-Therapie

IV.1.1. Analyse der Zytokinproduktion (IL2, IL4, IL10 und IFN γ) von CD4+ T-Lymphozyten nach Stimulation mit den Superantigenen SEA, SEB und TSST plus CD28 im Vollblut

Zu jedem Messzeitpunkt erfolgte die Analyse der Zytokinsekretion von CD4+ T-Zellen nach in-vitro Stimulation mit anti-human-CD28-Antikörper (CD28-AK) sowie den Superantigenen SEA, SEB und TSST.

Abb. 3 (she. unten) stellt die in der FACS-Analyse abgebildeten Daten am Beispiel eines Patienten dar.

In der Analyse der zytokinproduzierenden CD4+ T-Zellen unter TSO-Therapie nach in-vitro Stimulation mit CD28-AK unter Zusatz von SEA, SEB bzw. TSST war ersichtlich, dass die alleinige Stimulation mit CD28-AK keine Stimulation der Zytokinproduktion bewirkt (she. Abb. 3.a). Die lediglich mit CD28-AK stimulierten Proben dienten somit als Negativkontrolle, um eine eventuell bestehende basale Zytokinproduktion ohne Einfluss der Stimulantien auszuschließen. Diese konnte in allen Messungen ausgeschlossen werden, daher werden nur die Ergebnisse der in-vitro Stimulation mit SEA, SEB und TSST (she. Abb. 3.b) – d) näher dargestellt.

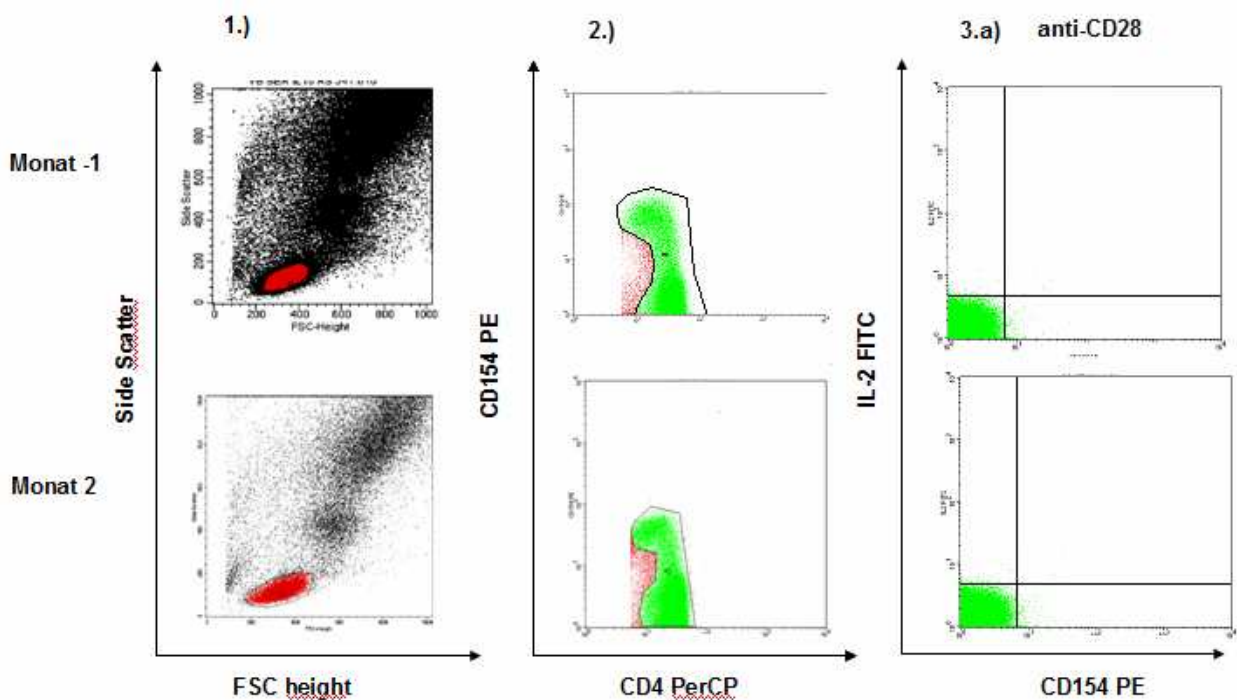


Abb. 3.A): durchflusszytometrische Analyse der Zytokinproduktion am Beispiel IL2-produzierender Zellen einen Monat vor (Monat -1) und zwei Monate nach Therapiebeginn (Monat 2): 1.) Selektion der Lymphozyten aus den Leukozyten 2.) Selektion der CD4+ CD154- und CD154+ Lymphozyten 3.) s.u.

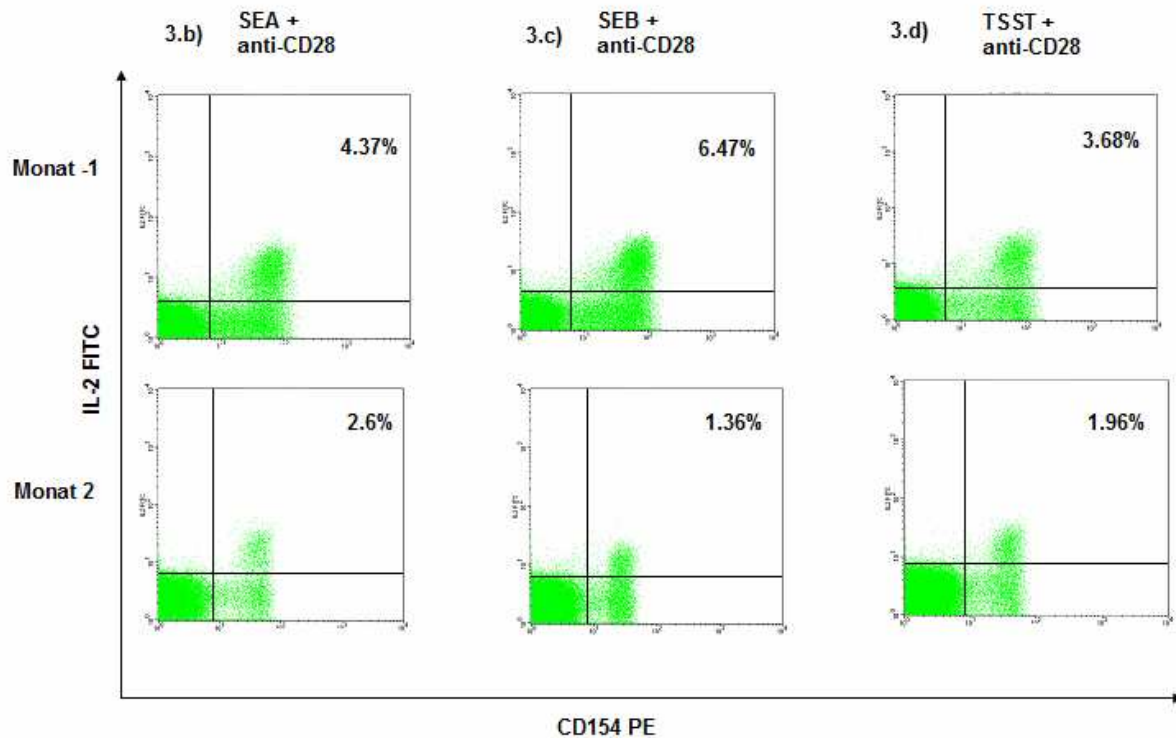


Abb. 3.B): 1.) und 2.) s.o.; 3.) Selektion der IL2-produzierenden Zellen nach Stimulation mit CD28-AK bzw. CD28-AK plus Superantigenen (von links nach rechts: 3.a) CD28-AK, 3.b) CD28-AK + SEA, 3.c) CD28-AK + SEB, 3.d) CD28-AK + TSST

IL2-Produktion nach Stimulation mit Superantigenen

Der Anteil IL2-produzierender CD4+ T-Zellen nach in-vitro Stimulation mit SEA, SEB und TSST lag für alle Patienten über den gesamten Zeitraum betrachtet nach SEA-Stimulation zwischen 0,13 – 15,8%, SEB zwischen 0,34 – 18,88% und TSST zwischen 0,5 – 11,84%. Durchschnittswerte der Anteile im Verlauf, geordnet nach Zustand vor, während und nach TSO-Therapie sind Tabelle 16 zu entnehmen:

Stimulans	IL2-prod. Zellen (%) vor TSO-Ther. (Monat -1; 0)	IL2-prod. Zellen (%) während TSO-Ther. (Monat 1; 2; 3; 6)	IL2-prod. Zellen (%) nach TSO-Ther. (Monat 7; 10)
SEA	4,09 (±0,37)	3,92 (±1,04)	5,98 (±1,33)
SEB	4,50 (±0,80)	5,33 (±1,37)	5,35 (±1,22)
TSST	2,16 (±0,47)	3,27 (±0,86)	3,88 (±1,50)
Durchschnitt (SEA, SEB und TSST)	3,58 (±0,38)	4,17 (±0,64)	5,07 (±0,74)

Tab. 16: Durchschnittlicher prozentualer Anteil IL2-produzierender CD4+ T-Zellen an allen CD4+ T-Zellen von 4 Patienten vor, unter und nach TSO-Therapie (mean/SEM)

Exemplarisch wird in Abbildung 4 an die Entwicklung des Anteils IL2-produzierender CD4+ T-Zellen bei einem Patienten aufgezeigt.

Anteil IL2-produzierender CD4+ T-Zellen bei Patient 3 nach in-vitro-Stimulation (in Prozent)

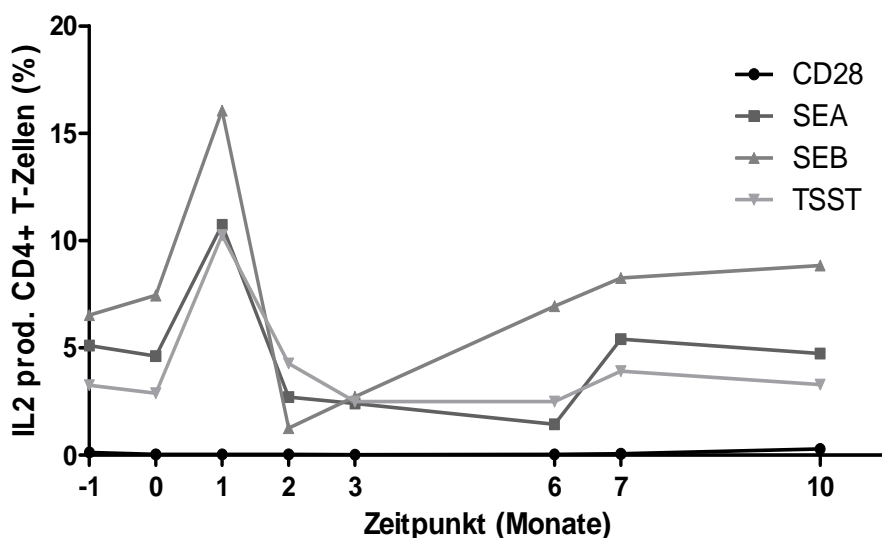


Abb. 4: Anteil IL2-produzierender CD4+ T-Zellen nach in-vitro-Stimulation mit CD28-AK alleine bzw. mit CD28-Ak plus Superantigen (SEA, SEB und TSST) bei Patient 3: Verlauf unter TSO-Einnahme

Die Messungen zeigen insbesondere bei diesem Patienten zeitlich mit der TSO-Einnahme korrelierende Veränderungen des Anteils IL2-produzierender CD4+Zellen: nach initialem Anstieg der IL2-Produktion einen Monat nach Therapiebeginn kommt es unter Therapie zu persistierend erniedrigten Werten und erneutem Anstieg nach Beendigung der Therapie.

Auffällig ist bei allen Patienten eine Senkung des Anteils IL2-produzierender Zellen unter das Ausgangsniveau nach zwei Monaten TSO-Einnahme. Abb. 5 zeigt die Entwicklung des Anteils IL2-produzierender CD4+ T-Zellen vor, unter und nach TSO-Therapie bei allen Patienten, getrennt nach der Wirkung der einzelnen Stimulantien SEA, SEB und TSST.

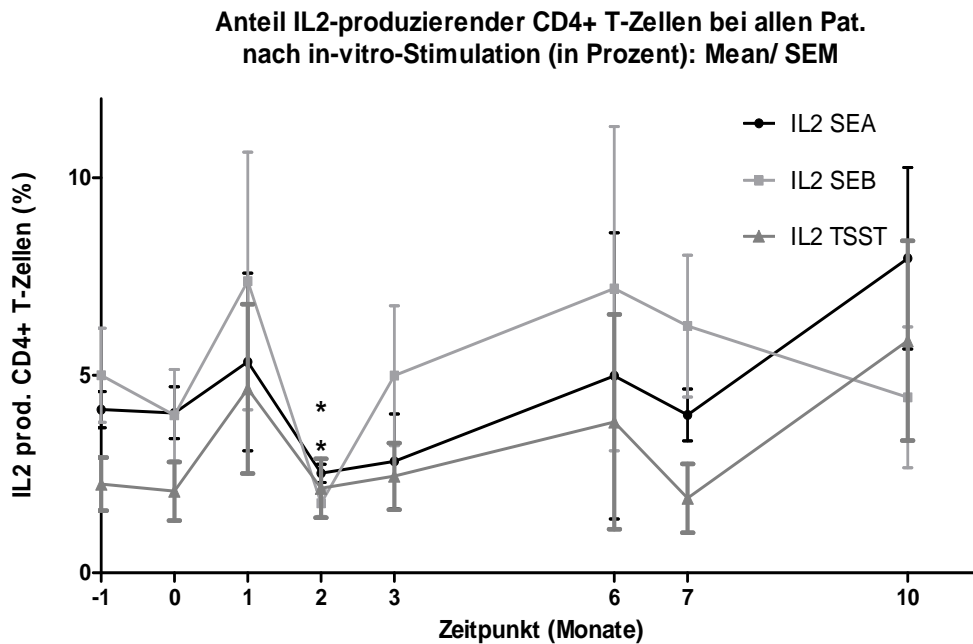


Abb. 5: Anteile IL2-produzierender CD4+ T-Zellen bei 4 Patienten vor, unter und nach TSO-Therapie nach in-vitro-Stimulation im Vollblut mit Superantigenen (SEA, SEB, TSST) (in Prozent aller CD4+ T-Zellen, mean/SEM). Signifikanz she. *

Die statistische Analyse mittels T-Test ergab im Fall der Stimulation mit SEA für den Anteil IL2-produzierender Zellen nach zwei Monaten TSO-Einnahme signifikant erniedrigte Anteile im Vergleich zu den beiden Basiswerten vor Therapie: $p = 0,01$ für Basiswert -1 verglichen mit Wert nach 2 Monaten Therapie; $p = 0,05$ für Basiswert 0 verglichen mit Wert nach 2 Monaten Therapie. Die Varianzanalyse nach Friedman mit Dunn´s Post-hoc-Test bestätigte dieses Ergebnis nicht (Daten nicht dargestellt).

IFN γ -Produktion nach Stimulation mit Superantigenen

Der Anteil IFN γ -produzierender Zellen unter TSO-Einnahme lag, für alle Patienten und Stimulantien über den gesamten Zeitraum betrachtet durchschnittlich zwischen 0,97% – 2,15%. Unter Therapie waren die durchschnittlichen Anteile IFN γ -produzierender Zellen im Vergleich zu den Ausgangswerten niedriger, wie aus Tabelle 17 hervorgeht.

Stimulans	IFN γ -prod. Zellen (%) vor TSO-Ther. (Monat -1; 0)	IFN γ -prod. Zellen (%) während TSO-Ther. (Monat 1; 2; 3; 6)	IFN γ -prod. Zellen (%) nach TSO-Ther. (Monat 7; 10)
SEA	1,79 (\pm 0,52)	1,01 (\pm 0,23)	1,40 (\pm 0,36)
SEB	2,93 (\pm 0,89)	1,19 (\pm 0,41)	1,70 (\pm 0,43)
TSST	1,73 (\pm 0,49)	0,72 (\pm 0,18)	1,16 (\pm 0,52)
Durchschnitt (SEA, SEB und TSST)	2,15 (\pm 0,38)	0,97 (\pm 0,17)	1,42 (\pm 0,24)

Tab.17: Durchschnittlicher prozentualer Anteil IFN γ -produzierender CD4+ T-Zellen an allen CD4+ T-Zellen von 4 Patienten vor, unter und nach TSO-Therapie (mean/SEM)

Die Originaldaten der einzelnen Patienten zeigten keine Signifikanzen bezüglich der erniedrigten Werte, weder im Student's T-Test noch in der Varianzanalyse (Daten nicht dargestellt).

In der graphischen Darstellung wird der unter TSO-Therapie reduzierte Anteil IFN γ -produzierender Zellen deutlich (siehe Abb. 6).

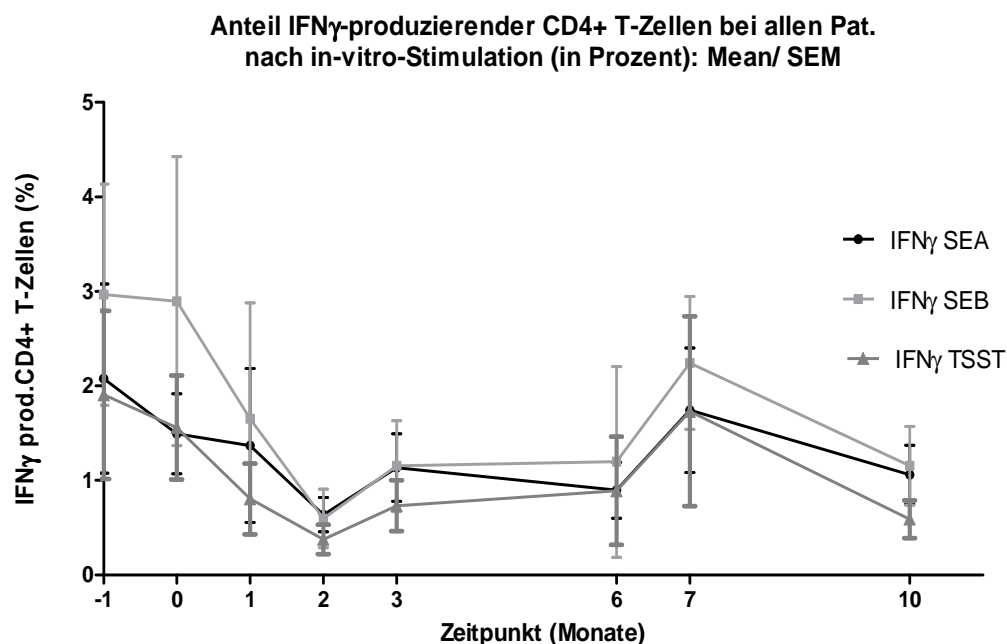


Abb. 6: Anteile IFN γ -produzierender CD4+ T-Zellen bei 4 Patienten vor, unter und nach TSO-Therapie nach in-vitro-Stimulation im Vollblut mit Superantigenen (SEA, SEB, TSST) (in Prozent aller CD4+ T-Zellen, mean/SEM)

Der unter TSO-Therapie erniedrigte Anteil IFN γ -produzierender Zellen steigt einen Monat nach Therapieende an, möglicherweise reflektorisch nach Wegfall der supprimierenden Wirkung von TSO bedingt. Abb. 7 zeigt den Verlauf exemplarisch bei einem Patienten.

**Anteil IFN γ -produzierender CD4+ T-Zellen bei Pat.1
nach in-vitro-Stimulation mit SEA, SEB, TSST und CD28-AK
(in Prozent)**

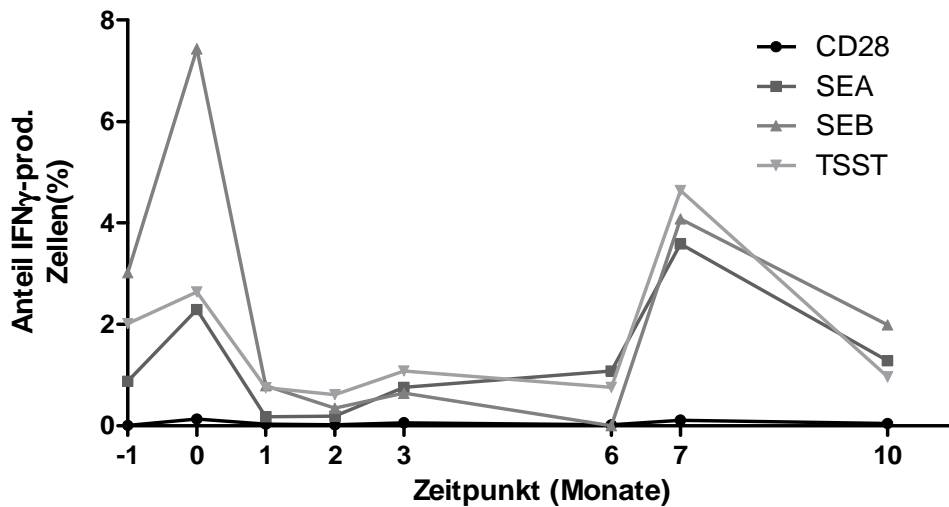


Abb. 7: Anteile IFN γ -produzierender CD4+ T-Zellen bei Patient 1 vor, unter und nach TSO-Therapie nach in-vitro-Stimulation im Vollblut mit Superantigenen (SEA, SEB, TSST) (in Prozent aller CD4+ T-Zellen)

IL4-Produktion nach Stimulation mit Superantigenen

Verglichen mit der Höhe des Anteils IL2- oder IFN γ -produzierender Zellen lag der Anteil IL4-produzierender Zellen um ein vielfaches niedriger bei durchschnittlich 0,3% (SEM \pm 0,06) vor, 0,47% (SEM \pm 0,06) während und 0,45% (SEM \pm 0,07) nach TSO-Therapie. Ein Anstieg der IL4-Produktion unter TSO-Therapie bis auf das Doppelte war zu verzeichnen, dieser hielt auch noch nach Beendigung derselben an. Zeitpunkt und Verlauf dieses Anstiegs variierten bei den einzelnen Patienten. Gemittelte Werte sind Tabelle 18 zu entnehmen.

Stimulans	IL4-prod. Zellen (%) vor TSO-Ther. (Monat -1; 0)	IL4-prod. Zellen (%) während TSO-Ther. (Monat 1; 2; 3; 6)	IL4-prod. Zellen (%) nach TSO-Ther. (Monat 7; 10)
SEA	0,24 (\pm 0,05)	0,50 (\pm 0,10)	0,54 (\pm 0,11)
SEB	0,47 (\pm 0,16)	0,58 (\pm 0,10)	0,58 (\pm 0,14)
TSST	0,20 (\pm 0,05)	0,34 (\pm 0,10)	0,23 (\pm 0,06)
Durchschnitt (SEA, SEB und TSST)	0,30 (\pm0,06)	0,47 (\pm0,06)	0,45 (\pm0,07)

Tab. 18: Durchschnittlicher prozentualer Anteil IL4-produzierender CD4+ T-Zellen an allen CD4+ T-Zellen von 4 Patienten vor, unter und nach TSO-Therapie (mean/SEM)

Abb. 8 zeigt die Entwicklung des Anteils IL4-produzierender CD4+ T-Zellen im Beobachtungszeitraum bei allen Patienten, getrennt nach der Wirkung der einzelnen Stimulantien SEA, SEB und TSST.

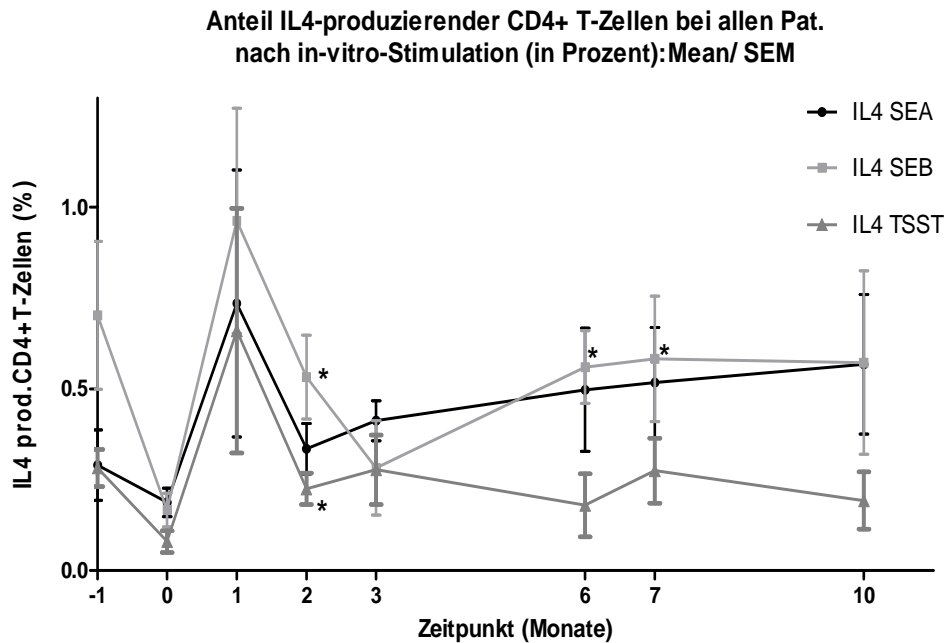


Abb. 8: Anteile IL4-produzierender CD4+ T-Zellen bei 4 Patienten vor, unter und nach TSO-Therapie nach in-vitro-Stimulation im Vollblut mit Superantigenen (SEA, SEB, TSST) (in Prozent aller CD4+ T-Zellen, mean/SEM). Signifikanz she. *.

Veränderungen unter Therapie waren im T-Test teils signifikant (she. Tab. 19), nicht jedoch in der Varianzanalyse mittels Friedman-Test und Dunn's Post-hoc-Analyse (Daten nicht dargestellt).

Basiswert 0 (direkt vor Therapiebeginn) verglichen mit:	SEA: P-Werte im T-Test	SEB: T-Test	TSST: T-Test
Wert 1	0,21	0,19	0,35
Wert 2	0,23	0,04	0,05
Wert 3	0,07	0,35	0,23
Wert 6	0,21	0,03	0,76
Wert 7	0,08	0,02	0,14
Wert 10	0,10	0,46	0,18

Tab. 19: Statistischer Vergleich der durchschnittlichen Anteile IL4-produzierender Zellen bei 4 Patienten mittels Student's T-Test (P-Werte). Verglichen werden jeweils die beiden Basiswerte vor Therapie (Monat -1 und 0) mit den Anteilen unter (Monat 1 – 6) bzw. nach Therapie (Monat 7 und 10), getrennt nach Stimulation mit den verschiedenen Superantigenen SEA, SEB und TSST

IL10-Produktion nach Stimulation mit Superantigenen

Der Anteil IL10-produzierender Zellen war mit durchschnittlich 0,45% (SEM \pm 0,08) vor Therapie, mit 0,30% (SEM \pm 0,04) während dieser und 0,24% (SEM \pm 0,04) nach Therapie noch niedriger als der Anteil der IL4-produzierenden Zellen (siehe Tabelle 20). Die Analyse der superantigenstimulierten Zellen ergab, dass sich die Anzahl IL10-produzierender CD4+ T-Zellen unter TSO-Therapie nicht konstant erhöht. Bei allen Patienten kam es jedoch zu unterschiedlichen Zeitpunkten zu erhöhten Anteilen dieser Zellpopulation oberhalb der Ausgangswerte. Diese Zeitpunkte lagen bei drei Patienten in der zweiten Hälfte des Therapiezeitraumes, bei einem ganz zu Beginn, also individuell zu unterschiedlichen Zeitpunkten im Verlauf (Daten nicht dargestellt).

Stimulans	IL10-prod. Zellen (%) vor TSO-Ther. (Monat -1; 0)	IL10-prod. Zellen (%) während TSO-Ther. (Monat 1; 2; 3; 6)	IL10-prod. Zellen (%) nach TSO-Ther. (Monat 7; 10)
SEA	0,39 (\pm 0,11)	0,33 (\pm 0,07)	0,27 (\pm 0,06)
SEB	0,65 (\pm 0,17)	0,42 (\pm 0,08)	0,28 (\pm 0,10)
TSST	0,31 (\pm 0,11)	0,16 (\pm 0,03)	0,17 (\pm 0,08)
Durchschnitt (SEA, SEB und TSST)	0,45 (\pm 0,08)	0,30 (\pm 0,04)	0,24 (\pm 0,04)

Tab. 20: Durchschnittlicher prozentualer Anteil IL10-produzierender CD4+ T-Zellen an allen CD4+ T-Zellen von 4 Patienten vor, unter und nach TSO-Therapie (mean/SEM)

Abb. 9 zeigt die Entwicklung des Anteils IL10-produzierender CD4+ T-Zellen vor, unter und nach TSO-Therapie bei allen Patienten, getrennt nach der Wirkung der einzelnen Stimulantien SEA, SEB und TSST auf.

Anteil IL10-produzierender CD4+ T-Zellen bei allen Pat. nach in-vitro-Stimulation (in Prozent): Mean/ SEM

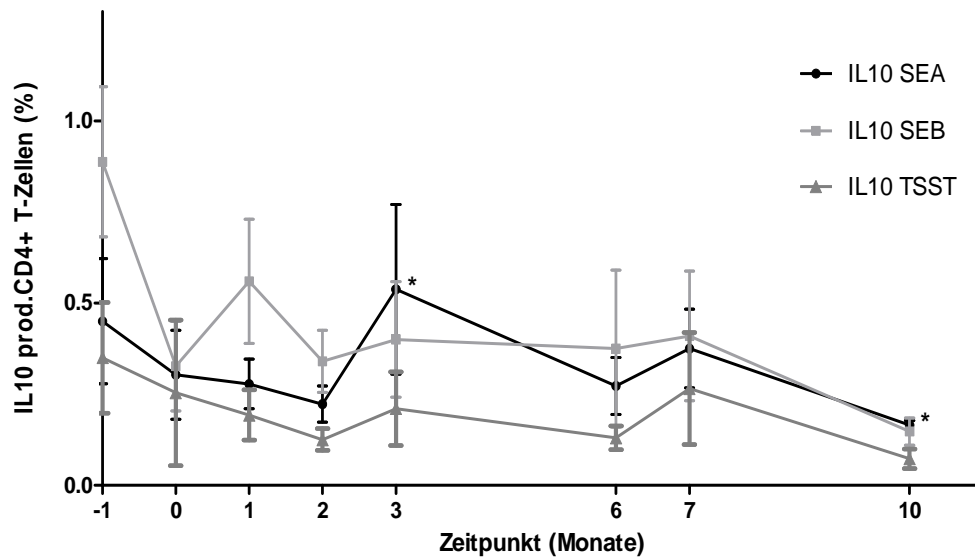


Abb. 9: Anteile IL10-produzierender CD4+ T-Zellen bei 4 Patienten vor, unter und nach TSO-Therapie nach in-vitro-Stimulation im Vollblut mit Superantigenen (SEA, SEB, TSST) (in Prozent aller CD4+ T-Zellen, mean/SEM). Signifikanz she. *.

Signifikante Veränderungen unter und nach Therapie bei SEB-Stimulation zeigten sich im T-Test: nach 3 Monaten Therapie signifikante Erhöhung ($p = 0,04$), 10 Monate nach Therapiebeginn signifikante Erniedrigung ($p = 0,05$) der Anteile IL10-produzierender T-Zellen nach SEA-Stimulation. Der Friedman-Test mit Dunn's Post-hoc-Analyse bestätigte dieses Ergebnis nicht (Daten nicht dargestellt).

Vergleich der Produktion von IL2, IL4, IL10 und IFN γ nach Stimulation mit Superantigenen

Nach Erfassung und Analyse der Anteile an CD4+Zellen, die IL2, IL4, IL10 oder IFN γ produzieren, wurde deren Mengenverhältnis zueinander analysiert. Am häufigsten waren IL2-produzierende Zellen, gefolgt von IFN γ , IL4, am seltensten IL10. Dieses Ergebnis ließ sich an Proben aller Patienten nach Anwendung der in-vitro Stimulantien SEA, SEB und TSST im Vollblut reproduzieren.

→ Häufigkeit der Zytokinproduktion: IL2 > IFN γ > IL4 > IL10

Tab. 21 veranschaulicht anhand von Durchschnittswerten die Anteile der Zellen, die ein bestimmtes Zytokin produzieren. Diese ergeben sich aus den Messergebnissen aller Patienten und Stimulantien über den gesamten Therapiezeitraum hinweg.

	IL2	IL4	IL10	IFN γ
mean/SEM	4,25 (\pm 0,38)	0,43 (\pm 0,04)	0,32 (\pm 0,03)	1,39 (\pm 0,15)

Tab. 21: Durchschnittswerte (mean/SEM) der prozentualen Anteile zytokinproduzierender Zellen von 4 Patienten nach Stimulation mit Superantigenen (Durchschnitt aus SEA, SEB, TSST) über den gesamten Beobachtungszeitraum

Abb. 10 zeigt auf, dass unter TSO-Therapie die Relation der Zytokinanteile zueinander stabil bleibt.

Vergleich der Anteile IL2, IL4, IL10 und IFN γ -produzierender Zellen (in Prozent)

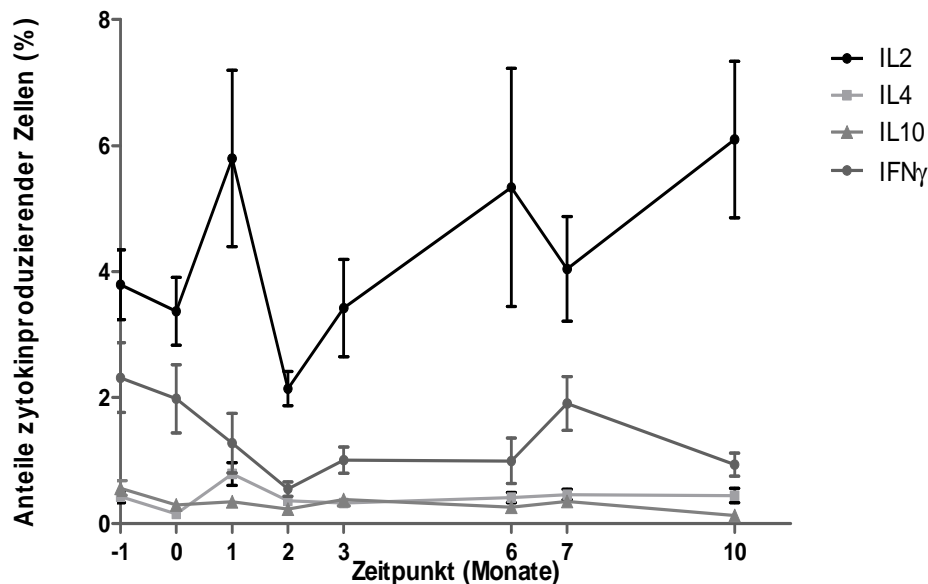


Abb. 10: Durchschnittswerte (mean/SEM) der prozentualen Anteile zytokinproduzierender Zellen nach Stimulation mit Superantigenen (Durchschnitt von SEA, SEB, TSST) über den gesamten Beobachtungszeitraum bei 4 Patienten

IV.1.2. Analyse MACS-selektierter kurzzeitkultivierter CD4+ T-Lymphozyten und ihrer Subpopulationen nach Stimulation mit PMA/Ionomycin

Zu jedem Messzeitpunkt erfolgte die Analyse von CD4+ T-Zellen nach deren Isolierung mittels MACS aus PBMCs. Äquivalent zu dem in IV.1.1. beschriebenen Ansatz wurden die Anteile der zytokinproduzierenden CD4+ T-Zellen untersucht. Zusätzlich wurden die vorher definierten Untergruppen Effektor-, Gedächtnis- und naive CD4+ T-Zellen im Verlauf analysiert.

Untenstehendes Schema zeigt die durchflusszytometrische Analyse und darauf folgende Selektion der Zellen am Beispiel der IL2- und/oder IL10-produzierenden Zellen eines Patienten (siehe Abb. 11). Zunächst wurden CD4+ T-Zellen als Gesamtheit, danach ihre Subpopulationen (siehe Tab. 15, S. 34) selektiert.

Im Vergleich zu den Ergebnissen der im Vollblut mittels Superantigenen stimulierten CD4+ Zellen ergab die Analyse weniger konstante Verläufe bei erhöhter individueller Schwankungsbreite.

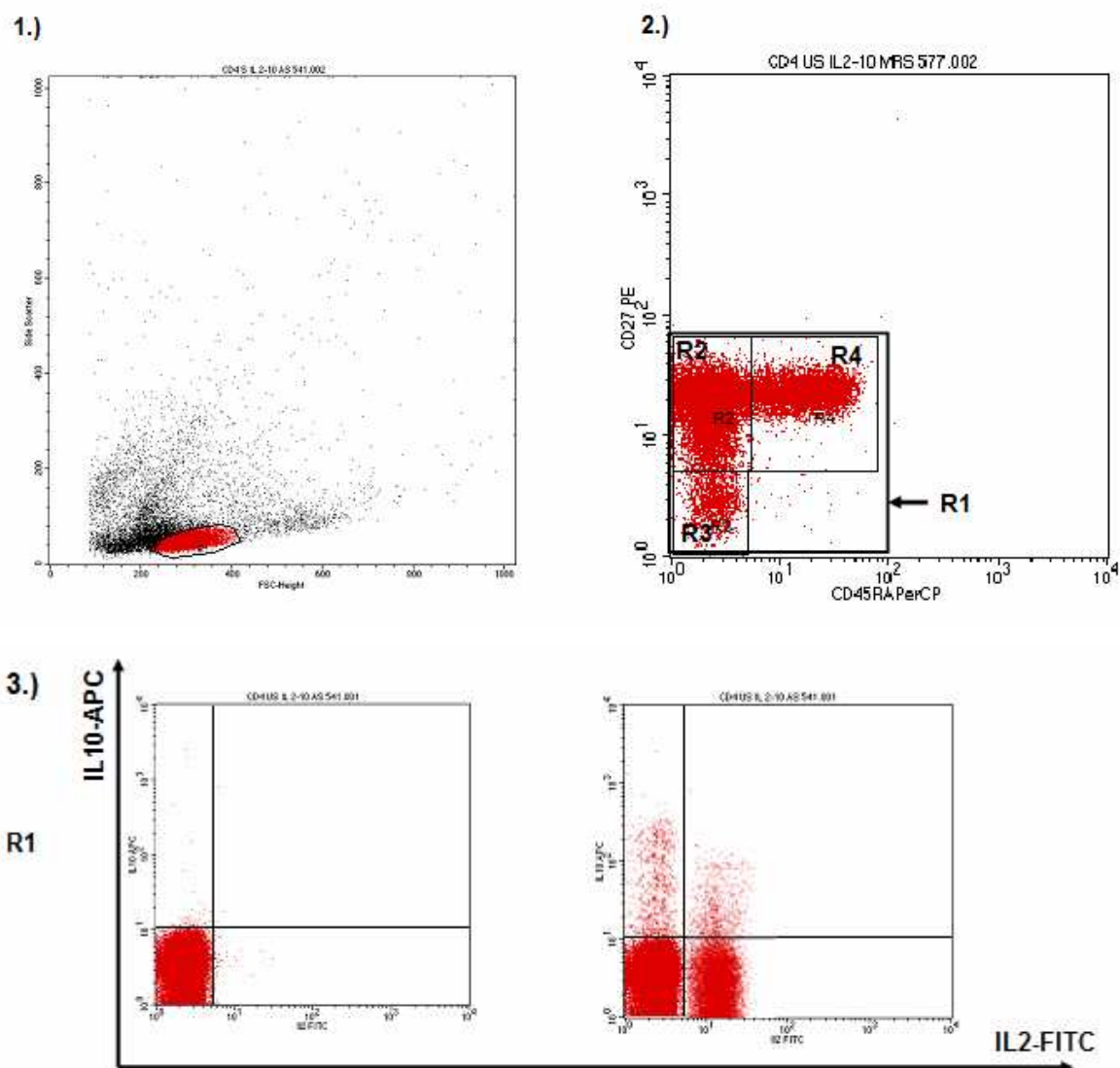


Abb. 11.A): Durchflusszytometrische Selektion von CD4+ T-Zellen und ihren Subgruppen nach in-vitro PMA/Ionomycin-Stimulation: 1.) Selektion der Lymphozyten in FSC/SSC, 2.) Selektion der Subgruppen (R1 = alle; R2 = Effektorzellen, R3 = Gedächtniszellen, R4 = naive Zellen), 3.) Darstellung der Zytokinsekretion der CD4+ T-Zellen gesamt, links = basal, rechts = PMA/Ionomycin-Stimulation 4.) s.u.

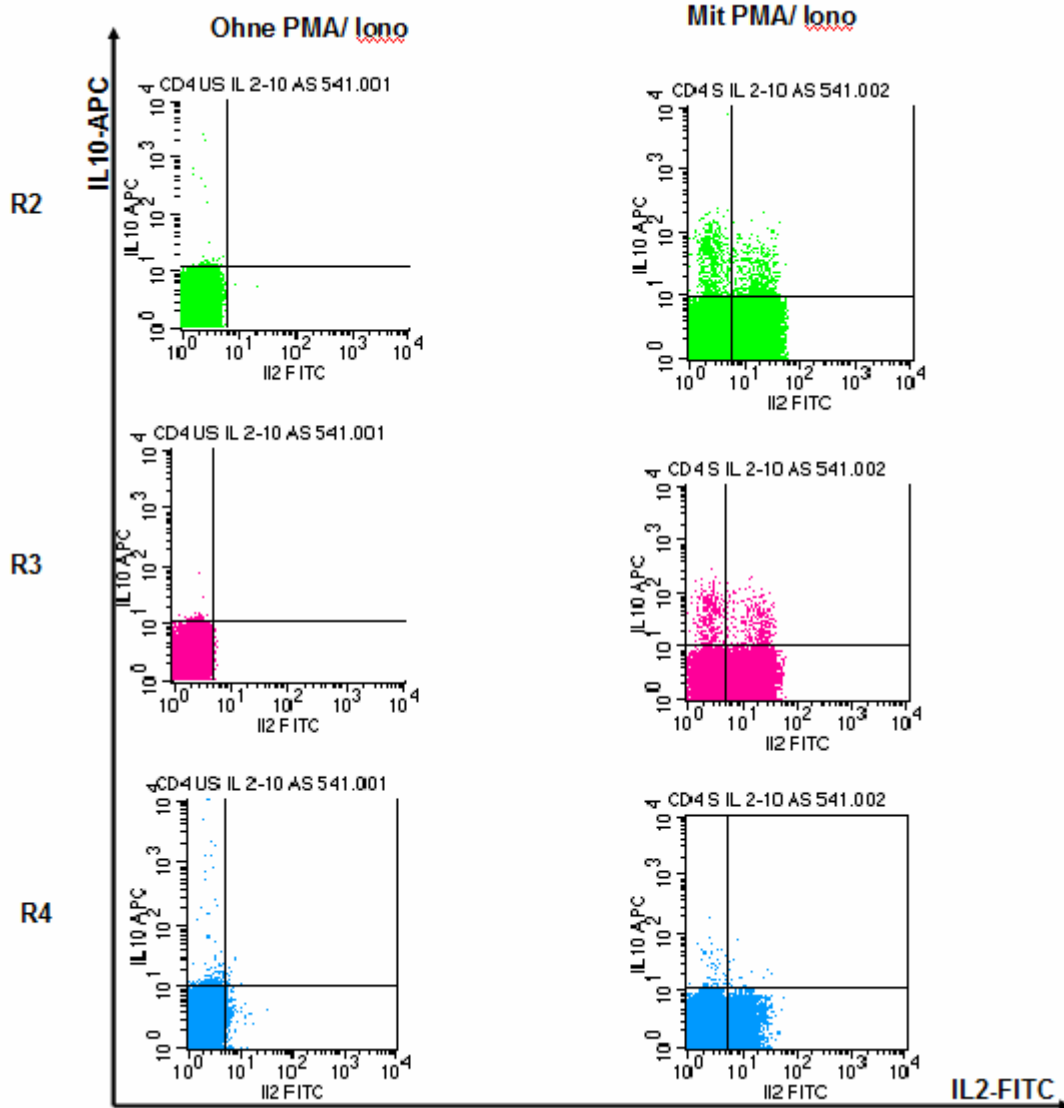


Abb. 11.B): 1.) – 3.) s.o.; 4.) Darstellung der Zytokinsekretion der Subgruppen (R2 = Effektorzellen, R3 = Gedächtniszellen, R4 = naive Zellen) , links = basal, rechts = PMA/Ionomycin-Stimulation

IL2-Produktion nach Stimulation mit PMA/Ionomycin

Der Anteil IL2-produzierender Zellen unter Stimulation mit PMA/Ionomycin schwankte im Durchschnitt zwischen ungefähr 30 – 60%.

Für alle Untergruppen und alle Patienten gemeinsam betrachtet lässt sich im Verlauf unter TSO-Therapie eine konstante leichte Abnahme der IL2-Produktion messen. Dieser Trend hält auch nach Beendigung der TSO-Therapie an. Bei den CD4+ Effektorzellen erfolgt eine kurzfristige Zunahme der IL2-Produktion nach zwei Monaten

TSO-Einnahme, gefolgt von einem leichten Abfall und Wiederanstieg auf Ausgangswerte nach Therapieende.

CD4+ T-Memoryzellen zeigen eine Abnahme von durchschnittlich 54,16% ($\pm 10,14$) vor Therapie auf 21,02% ($\pm 16,14$) nach drei Monaten Therapie, gefolgt von einem leichten Wiederanstieg nach Therapieende auf 28,82 ($\pm 6,48$). Bei naiven IL2-produzierenden CD4+ T-Zellen besteht bereits vor Therapie eine stärkere Schwankungsbreite. Bei initialem Abfall auf ca. 25% ist sonst kein klarer Trend ersichtlich (she. Abb. 12).

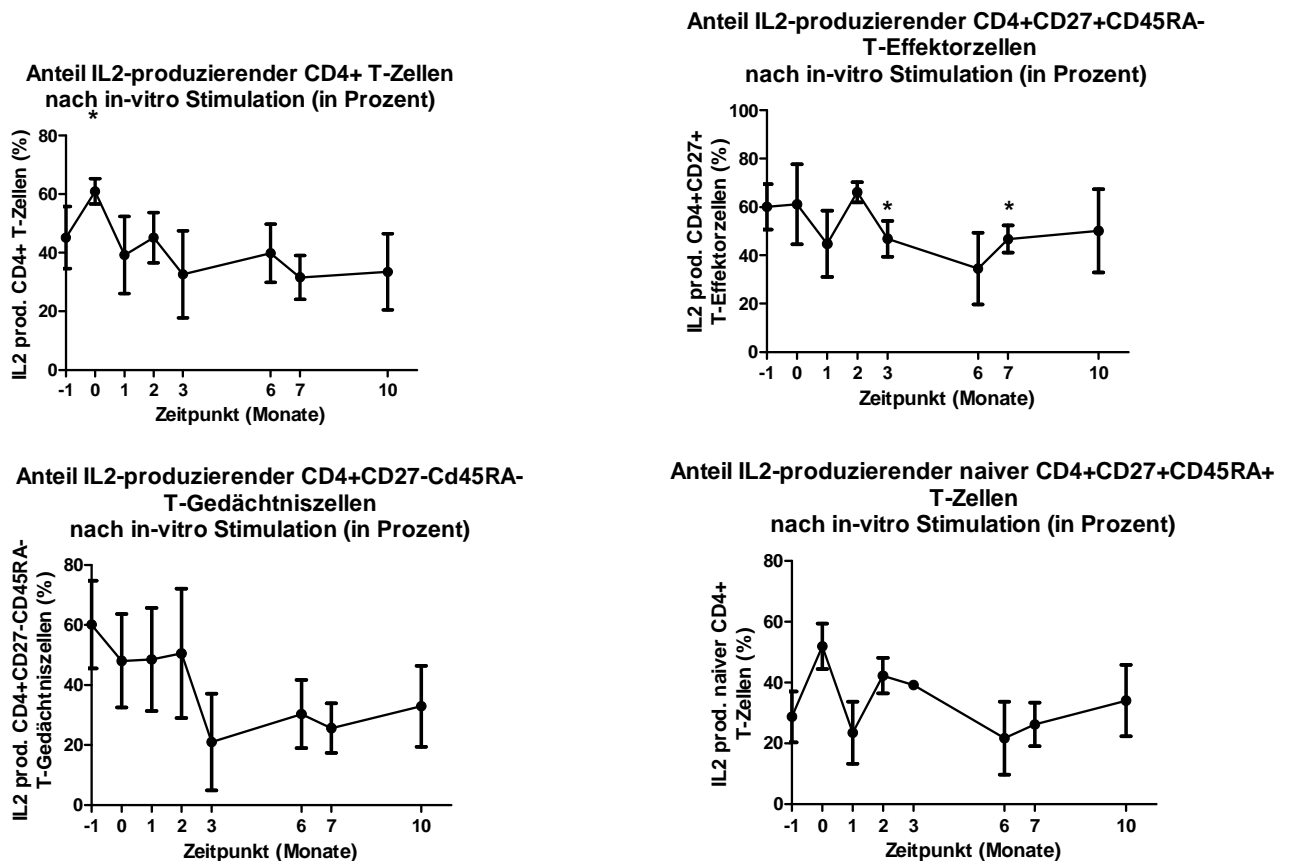


Abb. 12: Prozentuale Anteile IL2-produzierender CD4+ T-Zellen nach in-vitro Stimulation mit PMA/Ionomycin in Durchschnitt sowie in den Subpopulationen Effektor-, Gedächtnis- und naive Zellen (mean, SEM) bei 4 Patienten. Signifikanzen she. *.

Durchschnittswerte für die prozentualen Anteile der IL2-produzierenden Zellen allgemein und sortiert nach Untergruppen gibt Tabelle 22 an. Daraus geht hervor, dass CD4+ T-Effektorzellen den höchsten Anteil IL2-produzierender Zellen darstellen und naive CD4+ T-Zellen den geringsten.

Bei Memory- und naiven Zellen scheint die IL2-Produktion auch Therapieende supprimiert.

Untergruppe der CD4+ T-Zellen	IL2-prod. Zellen (%) vor TSO-Ther.	IL2-prod. Zellen (%) während TSO-Ther.	IL2-prod. Zellen (%) nach TSO-Ther.	IL2-prod. Zellen (%) über den gesamten Zeitraum
alle Zellen (R1)	53,07 (±6,07)	39,29 (±5,04)	32,55 (±6,90)	41,64 (±3,68)
Effektorzellen (R2)	60,64 (±8,84)	46,90 (±5,82)	48,45 (±8,41)	52,00 (±4,34)
Memory-Zellen(R3)	54,16 (±10,14)	37,88 (±7,42)	28,82 (±6,48)	40,28 (±5,09)
naive Zellen (R4)	40,35 (±6,80)	30,40 (±4,55)	30,17 (±6,54)	33,64 (±3,37)

Tab. 22: Durchschnittliche prozentuale Anteile IL2-produzierender CD4+ T-Zellen und ihrer Subgruppen nach PMA/Ionomycin-Stimulation von 4 Patienten vor, unter und nach TSO-Therapie sowie für den gesamten Beobachtungszeitraum

Signifikanzen ergaben sich im Student's T-Test für CD4+ Effektor-Zellen mit erniedrigter IL2-Produktion im 3. Therapiemonat verglichen mit Basiswert -1 ($p = 0,01$) sowie einen Monat nach Therapienende (Zeitpunkt 7 verglichen mit Basiswert 0, $p = 0,01$). Im Friedman Test mit Dunn's Post-hoc-Analyse fanden sich keine Signifikanzen (Daten nicht dargestellt).

IFN γ -Produktion nach Stimulation mit PMA/Ionomycin

IFN γ wurde von durchschnittlich 1,56 – 33,6% der CD4+ Zellen nach in-vitro Stimulation mit PMA/Ionomycin gebildet. Deutliche Unterschiede zeigen sich zwischen den Subgruppen: den höchsten Anteil IFN γ -produzierender Zellen stellen Memory-, den geringsten Anteil naive T-Zellen (she. Tab. 23).

Untergruppe der CD4+ T-Zellen	IFN γ -prod. Zellen (%) vor TSO-Ther.	IFN γ -prod. Zellen (%) während TSO-Ther.	IFN γ -prod. Zellen (%) nach TSO-Ther.	IFN γ -prod. Zellen (%) über den gesamten Zeitraum
alle Zellen (R1)	19,43 (±5,92)	16,75 (±4,30)	11,24 (±2,47)	15,81 (±2,70)
Effektorzellen (R2)	25,01 (±7,63)	14,29 (±2,09)	12,00 (±2,07)	17,10 (±2,48)
Memory-Zellen(R3)	33,60 (±10,44)	22,34 (±6,06)	20,10 (±8,75)	25,35 (±4,67)
naive Zellen (R4)	1,56 (±0,45)	8,17 (±6,34)	1,25 (±0,17)	3,66 (±3,10)

Tab. 23: Durchschnittliche prozentuale Anteile IFN γ -produzierender CD4+ T-Zellen und ihrer Subgruppen nach PMA/Ionomycin-Stimulation bei 4 Patienten vor, unter und nach TSO-Therapie sowie für den gesamten Beobachtungszeitraum

Für alle Subgruppen gemeinsam betrachtet (R1) lässt sich schwankungsbedingt kein klarer Trend des Anteils IFN γ -produzierender Zellen aufzeigen. Bei Memory- und Effektorzellen lässt sich eine geringe Abnahme unter TSO-Therapie erkennen, diese ist für Effektorzellen in Monat drei nach Therapiebeginn verglichen mit Basiswert 0 mit

einem P-Wert von 0,04 im Student's T-Test signifikant. Weitere Signifikanzen fanden sich nicht (Daten nicht dargestellt).

IL4-Produktion nach Stimulation mit PMA/Ionomycin

Der Anteil IL4-produzierender Zellen unter Stimulation mit PMA/Ionomycin schwankte im Durchschnitt zwischen ca. 0,27 – 4,83%. Für alle Untergruppen und alle Patienten gemeinsam betrachtet ergibt sich im Verlauf unter TSO-Therapie eine Zunahme der IL4-Produktion nach 3 Monaten TSO-Therapie, der ein Abfall auf die niedrigsten Werte des ganzen Beobachtungszeitraums nach 2 Monaten Therapie vorausgeht. CD4+ Effektorzellen und insbesondere naive Zellen zeigen die starke Zunahme des Anteils IL4-produzierender Zellen nach drei Monaten Therapie. Bei Memory-Zellen kommt es zum Abfall nach zwei Monaten, nicht jedoch zur Zunahme nach drei Monaten.

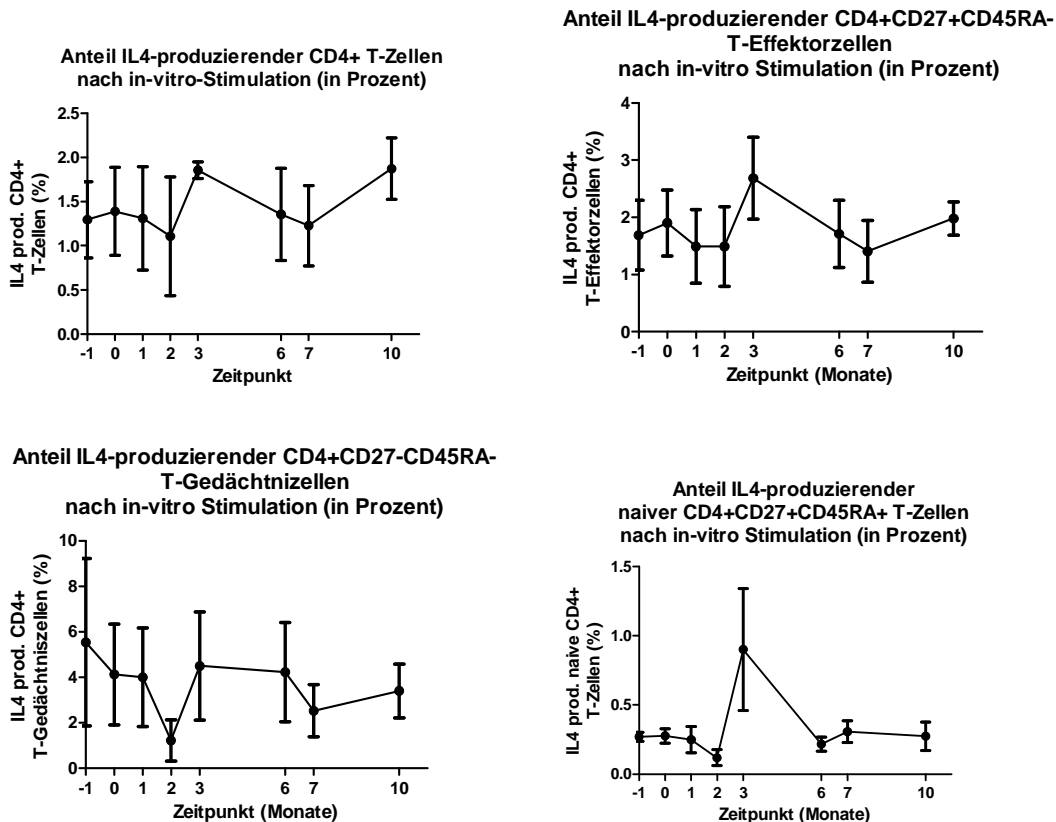


Abb. 13: Prozentuale Anteile IL4-produzierender CD4+ T-Zellen nach in-vitro Stimulation mit PMA/Ionomycin im Durchschnitt sowie in den Subpopulationen Effektor-, Gedächtnis- und naive Zellen (mean, SEM) bei 4 Patienten

Eine anhaltende Zunahme unter Therapie lässt sich nicht nachweisen.

Tabelle 24 demonstriert, dass Memory-CD4+ T-Zellen die stärksten IL4-Produzenten sind, obwohl dieser Anteil unter TSO absinkt, gefolgt von Effektorzellen. Naive Zellen produzieren kaum IL4.

Untergruppe der CD4+ T-Zellen	IL4-prod. Zellen (%) vor TSO-Ther.	IL4-prod. Zellen (%) während TSO-Ther.	IL4-prod. Zellen (%) nach TSO-Ther.	IL4-prod. Zellen (%) über den gesamten Zeitraum
alle Zellen (R1)	1,34 (±0,31)	1,36 (±0,24)	1,55 (±0,29)	1,42 (±0,16)
Effektorzellen (R2)	1,80 (±0,39)	1,74 (±0,28)	1,69 (±0,30)	1,74 (±0,19)
Memory-Zellen(R3)	4,83 (±2,01)	3,51 (±0,89)	2,97 (±0,78)	3,77 (±0,71)
naive Zellen (R4)	0,27 (±0,03)	0,31 (±0,09)	0,29 (±0,06)	0,29 (±0,04)

Tab. 24: Durchschnittliche prozentuale Anteile IL4-produzierender CD4+ T-Zellen und ihrer Subgruppen nach PMA/Ionomycin-Stimulation bei 4 Patienten vor, unter und nach TSO-Therapie sowie für den gesamten Beobachtungszeitraum

Die Veränderungen im Verlauf waren nicht signifikant (Daten nicht dargestellt).

IL10-Produktion nach Stimulation mit PMA/Ionomycin

Durchschnittlich 0,27 – 0,86% der CD4+ T-Zellen produzierten IL10. Die stärkste Produktion ging von CD4+ Effektorzellen aus (she. Tab. 25).

Untergruppe der CD4+ T-Zellen	IL10-prod. Zellen (%) vor TSO-Ther.	IL10-prod. Zellen (%) während TSO-Ther.	IL10-prod. Zellen (%) nach TSO-Ther.	IL10-prod. Zellen (%) über den gesamten Zeitraum
alle Zellen (R1)	0,53 (±0,09)	0,42 (±0,05)	0,61 (±0,16)	0,52 (±0,05)
Effektorzellen (R2)	0,86 (±0,24)	0,48 (±0,06)	0,58 (±0,15)	0,64 (±0,08)
Memory-Zellen(R3)	0,47 (±0,10)	0,40 (±0,08)	0,42 (±0,11)	0,43 (±0,05)
naive Zellen (R4)	0,27 (±0,06)	0,29 (±0,04)	0,55 (±0,22)	0,37 (±0,06)

Tab. 25: Durchschnittliche prozentuale Anteile IL10-produzierender CD4+ T-Zellen und ihrer Subgruppen nach PMA/Ionomycin-Stimulation bei 4 Patienten vor, unter und nach TSO-Therapie sowie für den gesamten Beobachtungszeitraum

Memory-Zellen zeigten nach einem Monat, naive nach drei Monaten einen erhöhten Anteil IL10-produzierender Zellen, im Falle der naiven Zellen war diese Erhöhung mit einem P-Wert von 0,05 im Student's T-Test signifikant. Bei T-Effektorzellen verringerte sich dieser Anteil im Verlauf leicht. Der niedrigste Anteil IL10-produzierender Zellen fand sich bei Memory- und Effektorzellen nach drei Monaten.

Diese Änderungen waren nicht signifikant (Daten nicht dargestellt).

Koexpression von Zytokinen: doppelt positive CD4+ T-Zellen

Ein geringer Anteil der CD4+ T-Lymphozyten ist bei Aktivierung zur simultanen Produktion verschiedener Zytokine fähig ("doppelt positive" Zellen). Auffällig ist, dass diese Zellen teils simultan Th1- und Th2-Zytokine produzieren.

Analysiert wurden hier die Anteile IL2- und IL10 koexprimierender sowie IL4- und IFN γ koexprimierender Zellen. Bei IL2-IL10-koproduzierenden Zellen sanken Effektor- und Memory-T-Zellen unter Therapie ungefähr auf die Hälfte ab. Bei naiven Zellen war der Anteil insgesamt geringer und fiel während der Therapie weiter ab, um danach auf höhere als die Ausgangswerte anzusteigen (she. Tabelle 26).

Untergruppe der CD4+ T-Zellen	IL2-/10-prod. Zellen (%) vor TSO-Ther.	IL2-/10-prod. Zellen (%) während TSO-Ther.	IL2-/10-prod. Zellen (%) nach TSO-Ther.	IL2-/10-prod. Zellen (%) über den gesamten Zeitraum
alle Zellen (R1)	0,52 (\pm 0,13)	0,45 (\pm 0,09)	0,34 (\pm 0,17)	0,44 (\pm 0,07)
Effektorzellen (R2)	0,84 (\pm 0,24)	0,43 (\pm 0,09)	0,49 (\pm 0,21)	0,59 (\pm 0,10)
Memory-Zellen(R3)	0,88 (\pm 0,26)	0,49 (\pm 0,13)	0,41 (\pm 0,14)	0,59 (\pm 0,11)
naive Zellen (R4)	0,27 (\pm 0,06)	0,21 (\pm 0,04)	0,37 (\pm 0,16)	0,28 (\pm 0,05)

Tab. 26: Durchschnittliche prozentuale Anteile IL2- und IL10-produzierender CD4+ T-Zellen und ihrer Subgruppen nach PMA/Ionomycin-Stimulation bei 4 Patienten vor, unter und nach TSO-Therapie sowie für den gesamten Beobachtungszeitraum

Der Anteil IL4-IFN γ -koproduzierender Zellen sank unter Therapie allgemein ab.

Memory-Zellen waren weitaus stärker vertreten als die anderen Gruppen, sanken aber unter und nach Therapie auch auf halbe Anteile ab. Naive Zellen bilden einen niedrigen Anteil von durchschnittlich 0,07% mit minimalem Anstieg unter Therapie (she. Tab. 27).

Untergruppe der CD4+ T-Zellen	IL4-/IFN γ -prod. Zellen (%) vor TSO-Ther.	IL4-/IFN γ -prod. Zellen (%) während TSO-Ther.	IL4-/IFN γ -prod. Zellen (%) nach TSO-Ther.	IL4-/IFN γ -prod. Zellen (%) über den gesamten Zeitraum
alle Zellen (R1)	0,55 (\pm 0,14)	0,40 (\pm 0,08)	0,33 (\pm 0,07)	0,42 (\pm 0,06)
Effektorzellen (R2)	0,68 (\pm 0,13)	0,37 (\pm 0,08)	0,34 (\pm 0,09)	0,46 (\pm 0,06)
Memory-Zellen(R3)	2,21 (\pm 0,73)	1,23 (\pm 0,37)	0,66 (\pm 0,21)	1,36 (\pm 0,29)
naive Zellen (R4)	0,07 (\pm 0,02)	0,10 (\pm 0,07)	0,04 (\pm 0,01)	0,07 (\pm 0,03)

Tab. 27: Durchschnittliche prozentuale Anteile IL4- und IFN γ -produzierender CD4+ T-Zellen und ihrer Subgruppen nach PMA/Ionomycin-Stimulation von 4 Patienten vor, unter und nach TSO-Therapie sowie für den gesamten Beobachtungszeitraum

Vergleich der Zytokinproduktion in den Subgruppen Effektor-, Memory- und naive CD4+ T-Lymphozyten

Der Vergleich der Anteile zytokinproduzierender Zellen in den einzelnen Subgruppen der MACS-selektierten CD4+ T-Zellen ergab, dass in allen Subgruppen IL2-produzierende Zellen am häufigsten sind, gefolgt von IFN γ , IL4 und zuletzt IL10.

An diesem Verhältnis ändert sich unter TSO-Therapie nichts, was die bereits in IV.1.1. beschriebenen Ergebnisse bestätigen.

Memory-T-Zellen stellen die CD4+ Subgruppe, die am stärksten IFN γ , IL4 und IL4/IFN γ kombiniert produziert.

Effektor-T-Zellen sind am häufigsten für die Produktion von IL2 und IL10 verantwortlich. IL2/IL10 koproduzierende Zellen finden sich unter Effektor- und Memoryzellen ungefähr gleich häufig (Daten nicht dargestellt).

IV.2. Immunglobulinkonzentrationen im Serum unter TSO-Therapie

Die Serumkonzentration von IgE unter TSO-Therapie

Die Analyse ergab, dass bei keinem der Patienten der Referenzbereich von 100 iU/ml (Internationale Einheiten, engl. "units" pro ml) überschritten wurde, die Werte lagen mit 2,2 iU/ml bis zu 29 iU/ml für alle Patienten betrachtet eher im unteren Referenzbereich. Eine starke serologische antiparasitäre Reaktion im Sinne eines Immunglobulin-Shift ist nicht zu beobachten.

Es zeigten sich interindividuelle Unterschiede: jeder der Patienten besaß ein relativ konstantes individuelles Niveau der IgE-Konzentration.

Bei den zwei Patienten mit niedrigster basaler Konzentration an IgE (Patient 2 mit Schwankungsbreite zwischen 4,2 und 7,6 iU/ml und Patient 3 zwischen 2,2 und 10 iU/ml) wurde unter Einnahme von TSO ein leichter Anstieg des IgE-Niveaus sowie ein Abfall auf Ausgangswerte nach Absetzen verzeichnet. In wesentlich stärkerer Ausprägung entspräche dies dem zu erwartenden Verlauf unter parasitärer Infektion (siehe Abbildung 14).

IgE-Level bei 4 Pat. vor, unter und nach TSO-Therapie (in iU/ml)

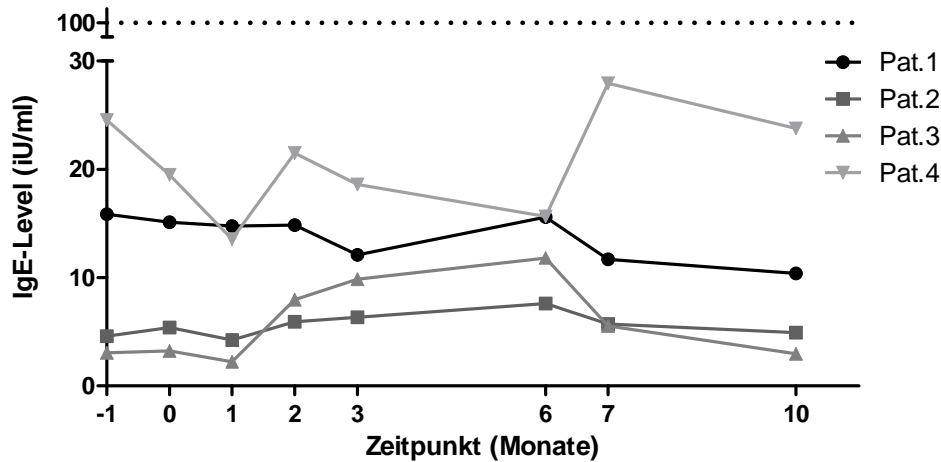


Abb. 14: IgE-Level bei 4 Patienten vor, unter und nach TSO-Therapie (iU/ml). Die punktierte Linie markiert den Referenzbereich

In statistischer Auswertung mittels Student's T-Test bzw. Friedman Test und Post-Hoc Analyse nach Dunn zeigten sich keine signifikanten Änderungen im zeitlichen Verlauf verglichen mit Ausgangswerten vor Therapie (Daten nicht dargestellt).

Die Serumkonzentration von IgG unter TSO-Therapie

Die Analyse der IgG-Subklassen 1 - 3 ergab individuell stabile Werte.

Unter TSO-Therapie stieg bei Patient 4 das IgG4-Level innerhalb des Referenzbereiches von 5,2 - 125 mg/dl auf maximal 61 mg/dl an. Bei Patient 1 und 2 lagen die Spiegel konstant im unteren Referenzbereich unterhalb von 20 mg/dl, bei Patient 3 wurde dieser unter Therapie mit einem Wert von minimal 4,6mg/dl leicht unterschritten (she. Abb. 15).

Bei keinem der Patienten lässt sich eine im zeitlichen Ablauf korrelierende Entwicklung der Immunglobuline IgG bzw. seiner Subklassen und IgE beobachten.

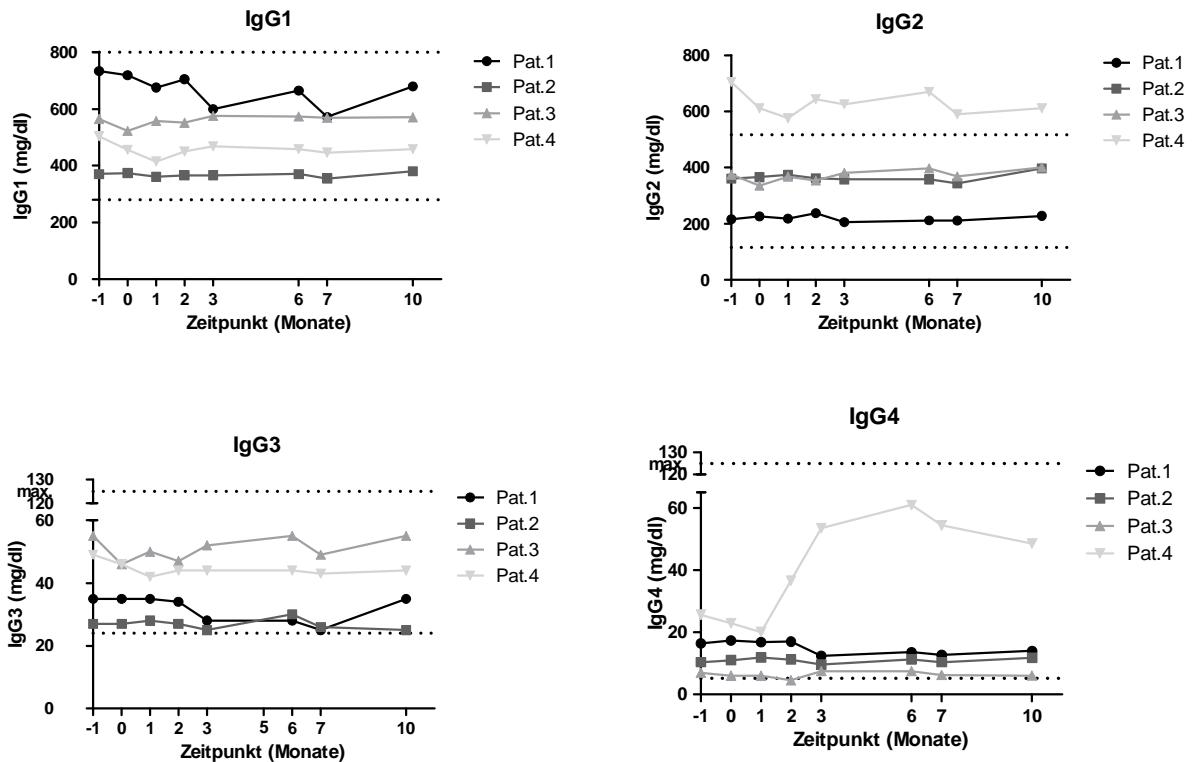


Abb. 15: Werte der einzelnen IgG-Subklassen in mg/dl jeweils bei 4 Patienten: Änderungen im Verlauf vor, unter und nach TSO-Einnahme. Punktierte Linien markieren den Referenzbereich.

IV.3. Funktionelle Parameter: Leber und Nierenfunktion

Während des gesamten Untersuchungszeitraumes wurden funktionelle Parameter der Leber- (GOT, GPT und GGT) und Nierenfunktion (Kreatinin und Harnstoff) überwacht. Hierbei zeigten sich keine Auffälligkeiten, die Werte blieben stabil im jeweiligen Ausgangsbereich der einzelnen Patienten (Daten nicht dargestellt).

IV.4. Differentialblutbild

Im Folgenden werden die hämatologischen Parameter dargestellt, die durch das Zentrallabor der Charité – Universitätsmedizin, Campus Mitte ermittelt wurden.

Erythrozyten

Innerhalb der erythrozytären Parameter (Hämoglobin, Hämatokrit, Erythrozytenzahl, MCH, MCHC, MCV, RDW) wurden keine mit der Einnahme von TSO korrelierenden Veränderungen festgestellt. Bei allen Patienten lagen sämtliche Parameter über den gesamten Messzeitraum in den Referenzbereichen des Labors (Daten nicht dargestellt).

Thrombozyten

Alle Kontrollen der Thrombozyten und ihres mittleren Volumens (MPV) ergaben im Referenzbereich (150-400 Thrombozyten/nl, MPV zwischen 7- 10 fl) liegende Werte ohne größere Schwankungen (Daten nicht dargestellt).

Leukozyten

Leukozyten als zelluläre Bestandteile des unspezifischen sowie spezifischen Immunsystems wurden als Gesamtheit untersucht sowie selektiert nach Subgruppen (neutrophile, eosinophile und basophile Granulozyten, NK-Zellen und Monozyten sowie Lymphozyten). Zudem wurden die Anteile der Subgruppen an der Gesamtpopulation der Leukozyten bestimmt (Daten nicht dargestellt).

Gesamtzahl der Leukozyten

Die Gesamtzahl der Leukozyten zeigte unter Therapie mit TSO keine größeren Veränderungen bei intraindividuell stabilen Werten. Im Verlauf trat keine statistisch signifikante Änderung ein (Daten nicht dargestellt).

Bei zwei der Patienten (Patient 2 und 3) kam es vorübergehend zu einem leichten Anstieg der Leukozytenzahl innerhalb des Referenzbereiches. Dieser korrelierte mit von den Patienten berichteten Symptomen eines banalen Infektes und klangen ohne Medikation rasch ab. Bei Patient 2 zeigten sich, abgesehen von oben erwähntem Anstieg, kontinuierlich leicht erniedrigte Leukozytenwerte ohne korrespondierende Klinik.

Neutrophile Granulozyten

Bei den neutrophilen Granulozyten ergab sich unter TSO-Einnahme keine signifikante Veränderung, die Werte lagen innerhalb des Referenzbereiches von 1,8-7,7/nl (Daten nicht dargestellt).

Eosinophile Granulozyten

Tabelle 28 gibt die laborspezifischen Referenzwerte für Eosinophile an.

Eosinophile: absolute Zellzahl/nl	< 0,70/nl (< 700/ μ l)
Eosinophile: Anteil an Granulozyten gesamt	1 - 4 %

Tab. 28: Referenzwerte für Eosinophile Granulozyten

Der prozentuale Anteil der Eosinophilen an den Granulozyten stieg bei Patient 3 unter Therapie auf das siebenfache des Referenzbereiches und lag maximal bei 28,4% nach 2 Monaten Therapie, 20% nach 3 Monaten und 14% nach 6 Monaten. Vier Monate nach Beendigung der Therapie war ein Abfall des Eosinophilenanteils auf 2,5% zu verzeichnen. Bei Patient 1 und 4 wurde der Referenzbereich unter und nach Therapie leicht überschritten (she. Abb. 16).

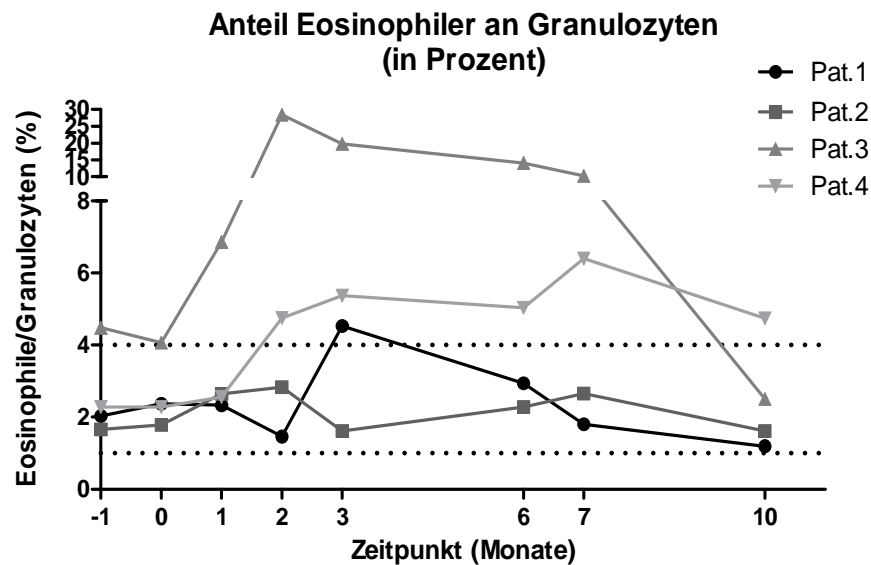


Abb. 16: Relativer Anteil der eosinophilen Granulozyten an der Gesamtzahl der Granulozyten bei 4 Patienten (in %) vor, unter und nach TSO-Einnahme. Punktierte Linien markieren den Referenzbereich

Für alle Patienten gemeinsam betrachtet war die Erhöhung des Eosinophilenanteils verglichen mit den Basiswerten vor Therapie nicht signifikant (Daten nicht dargestellt).

An der absoluten Zellzahl ließ sich der relativ erhöhte Anteil lediglich bei Patient 3 während zwei Messungen mit Überschreitung des Referenzbereiches ($<0,70/nl$) nachvollziehen. Hier zeigte sich unter TSO-Einnahme ein deutlicher Anstieg der Zellzahl mit konsekutivem Abfall auf basale Werte, korrelierend mit dem relativen Anteil Eosinophiler (she. Abb. 17)

Die Veränderung der Absolutzahl der Eosinophilen war für alle Patienten betrachtet statistisch nicht signifikant (Daten nicht dargestellt).

**Absolutzahl der Eosinophilen bei 4 Pat.
vor, unter und nach TSO-Therapie
(Zellzahl pro Nanoliter)**

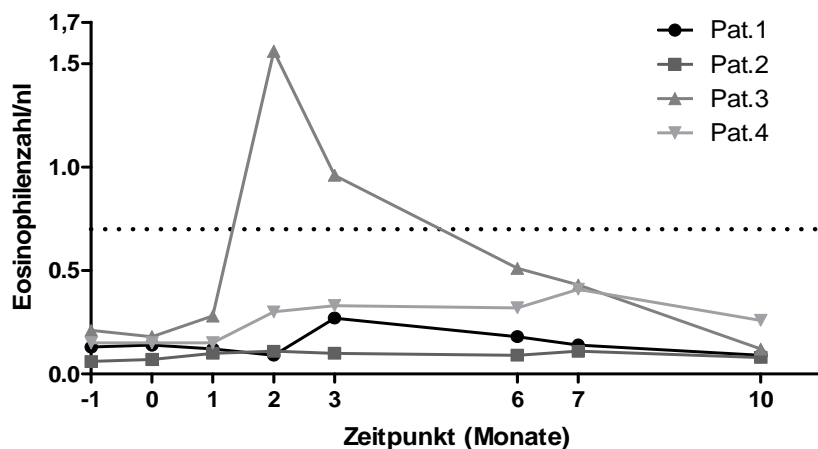


Abb. 17: Absolutzahl eosinophiler Granulozyten in n/nl bei 4 Patienten: Änderungen im Verlauf vor, unter und nach TSO-Einnahme. Der Referenzbereich liegt unter der punktierten Linie.

Basophile Granulozyten

Das Verhalten der Basophilen unter TSO-Einnahme war inkonstant, der Referenzbereich wurde bei keiner Messung überschritten. Auffällig ist lediglich, dass die Anteile Basophiler vor und nach Therapie ähnlich hoch sind, unter TSO-Einnahme aber variieren (Daten nicht dargestellt).

Statistisch signifikante Veränderungen konnten nicht nachgewiesen werden (Daten nicht dargestellt).

Monozyten

Monozyten: absolute Zellzahl/nl	0,2 - 1/nl (200 - 1000/ μ l)
Monozyten: Anteil an Leukozyten gesamt	2 - 12 %

Tab. 29: Laborspezifische Referenzwerte der Monozyten im peripheren Blut

In den durchgeführten Messungen zeigten die Monozyten unter Einnahme von TSO keine relevanten Veränderungen, der Referenzbereich der absoluten Zellzahl wurde mit durchschnittlich 401/ μ l bei keinem der Patienten unter- oder überschritten. Eine statistische Signifikanz ergab sich weder im Student's T-Test noch in der Varianzanalyse (Daten nicht dargestellt). Der relative Anteil der Monozyten an den Leukozyten lag bei drei Patienten konstant im Referenzbereich, lediglich bei Patient 1 zeigten sich unter TSO mit 20% etwas höhere Anteile der Monozyten, teils oberhalb des Referenzbereiches (she. Abb. 18).

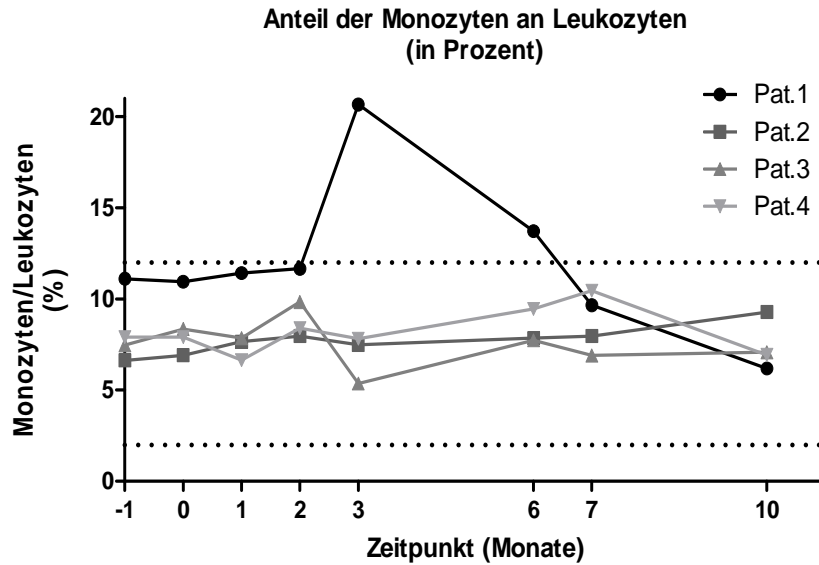


Abb. 18: Relativer Anteil der Monozyten an Leukozyten im peripheren Blut (%) bei 4 Patienten: Änderungen im Verlauf vor, unter und nach TSO-Einnahme. Punktierte Linien markieren den Referenzbereich

Die von uns durchgeführte Kontrolle dieser Zellgruppe mittels Truocount System ergab ähnliche Befunde. Dabei wurden Monozyten durch den Oberflächenmarker CD14 definiert und mittels oben genannter Formel die absolute Zellzahl/ μl errechnet. Diese lag durchschnittlich bei $561/\mu\text{l}$. Stärkere Veränderungen waren bei keinem der Patienten nachweisbar (Daten nicht dargestellt).

IV.5. Lymphozyten: quantitative und qualitative Analyse unter TSO-Therapie

Tab. 30 zeigt Referenzbereiche für Lymphozyten sowie ihre Subgruppen auf.

Lymphozyten und ihre Subgruppen		Oberflächenmarker
Lymphozyten gesamt und Anteil an Leukozyten gesamt	absolut	1,4 – 3,7/nl (1400 – 3700/ μl)
	relativ	20 – 45%
B-Zellen	absolut	70-830/ μl
	relativ	7-23%
T-Zellen	absolut	600-3100/ μl
	relativ	61- 85%
T-Helferzellen	absolut	300-2200/ μl
	relativ	30- 62%
Zytotoxische T-Zellen	absolut	200-1750/ μl
	relativ	21- 49 %
CD4/CD8 Ratio		0,85 – 4,43
NK-Zellen	absolut	50-1050/ μl
	relativ	5- 29%

Tab. 30: Referenzbereiche der Lymphozyten und ihrer Subgruppen im peripheren Blut sowie Oberflächenmarker

IV.5.1. Lymphozyten im Differentialblutbild

Die Analyse der Lymphozyten in ihrer Gesamtheit durch das Zentrallabor der Charité ergab weitgehend stabile Werte über den gesamten Zeitraum. Bei Patient 2 lagen diese permanent ohne große Schwankungen leicht unterhalb des Referenzbereiches des Labors, bei den anderen innerhalb dieses Bereiches. In statistischer Auswertung mittels T-Test bzw. Friedmann-Test und Dunn´s Post Test zeigten sich keine signifikanten Änderungen für das Verhalten unter Therapie.

IV.5.2. Durchflusszytometrische qualitative und quantitative Analyse der Lymphozyten mittels Trucount

Zusätzlich zu der unter IV.5.1. beschriebenen Analyse wurden von uns Lymphozyten nach zellulären Subgruppen sowie deren Absolutzellzahl und Anteile mittels Trucount System im FACS untersucht, um mögliche Veränderungen unter TSO detailliert zu erfassen.

CD4+ T-Lymphozyten:

Die Selektion der T-Helferzellen erfolgte wie in Kapitel III.2.3 beschrieben. Exemplarisch werden die Ergebnisse der FACS-Analyse bei einem Patienten in Abb. 19 dargestellt.

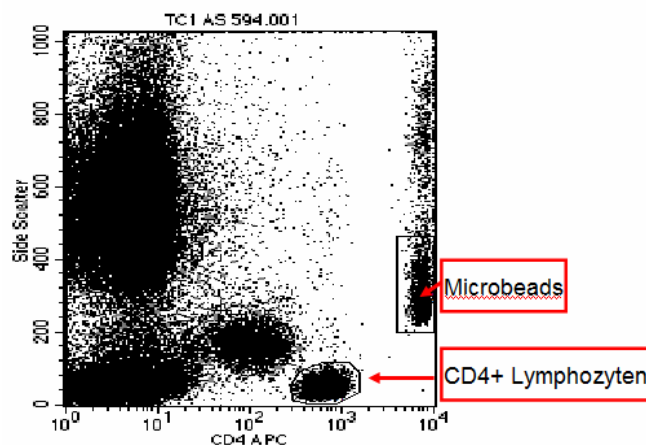


Abb. 19.A): Selektion der CD4+ T-Zellen und der Subpopulationen, 1.) Selektion CD4+ Lymphozyten und Microbeads (CD4/SSC), weiter she. unter 20.B)

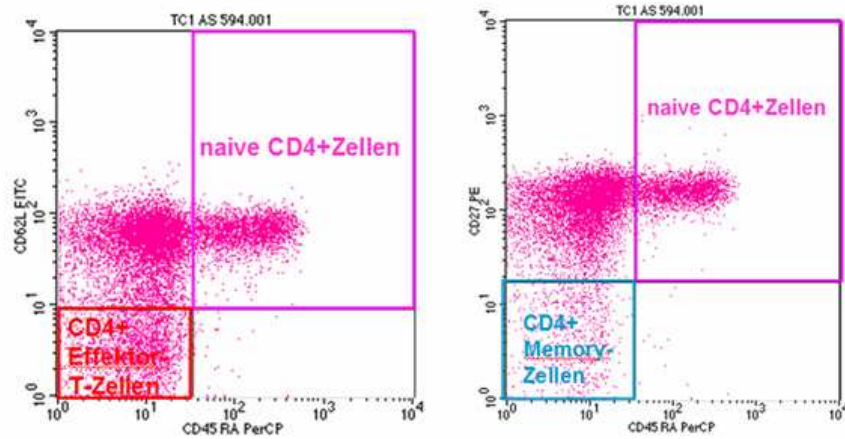


Abb. 19.B): Selektion der CD4+ T-Zellen und der Subpopulationen, 2.) Selektion CD45RA-CD62L-Effektorzellen sowie CD45RA+CD62L+ naiver Zellen (CD45RA/CD62L), 3.) Selektion CD45RA-CD27-Memory-Zellen sowie CD45RA+CD27+ naiver Zellen (CD45RA/CD27)

In der vorliegenden Arbeit fielen in der Zellzählung mittels Truocount die Zellzahlen mit Werten zwischen 490 – 4372/ μ l (Daten nicht dargestellt) etwas höher aus als in der Literatur angegeben (she. Tab. 30). Zwei Monate nach Therapiebeginn waren die Absolutzahlen der CD4+ T-Lymphozyten mit durchschnittlich 1434/ μ l am niedrigsten. Nach Beendigung der Therapie kam es zu einem kontinuierlichen Anstieg auf Werte von durchschnittlich 2662/ μ l (she. Abb. 20).

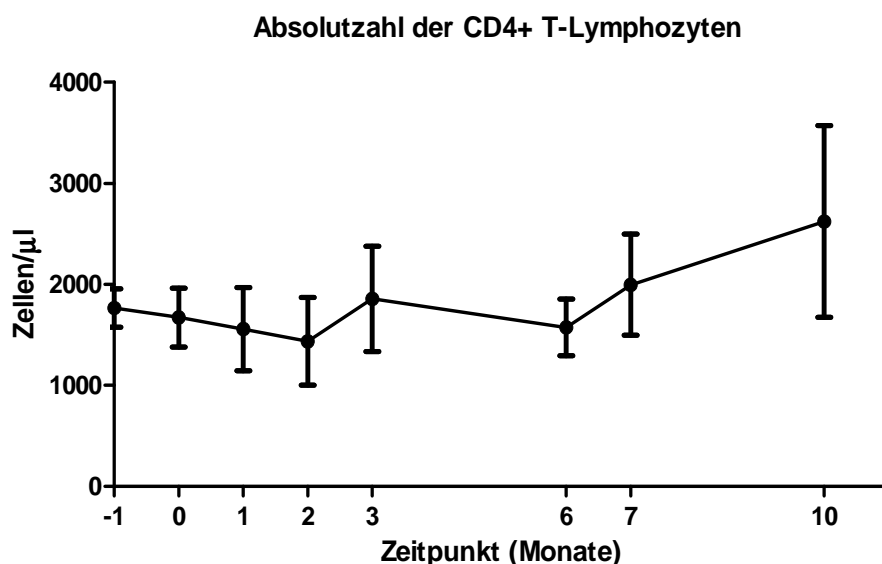


Abb. 20: Absolutzellzahl der CD4+ T-Zellen (Zellen/ μ l) vor, unter und nach TSO-Therapie (n = 4, mean/SEM)

Die Absolutzellzahl der CD4+CD27- Memory-T-Zellen zeigte im Verlauf keine mit der TSO-Einnahme korrelierenden Änderungen. Der relative Anteil dieser Subgruppe an

den CD4+ Zellen lag durchschnittlich bei 14,51% (SEM \pm 2,63, Daten nicht dargestellt). Bei Patient 1, 3 und 4 betrug dieser Anteil maximal 13,64% und schwankte bei Patient 2 im Verlauf zwischen 21,55% und 55,06% (she. Abb. 21).

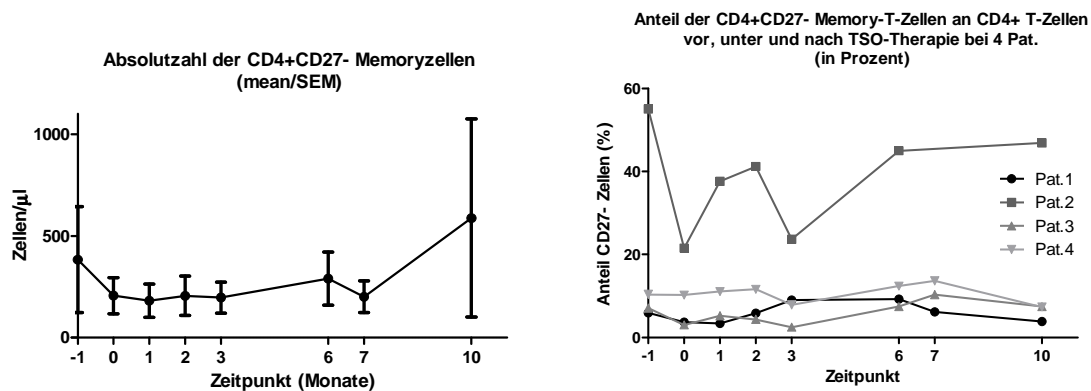


Abb. 21: 1.) Links: Absolutzellzahl (Zellen/ μ l, n=4, mean/SEM) der CD4+CD27- Memory-T-Zellen und 2.) rechts: deren prozentualer Anteil an CD4+ T-Zellen insgesamt (n=4) vor, unter und nach TSO-Therapie.

CD4+CD62L- T-Effektorzellen zeigten im Verlauf relativ stabile Absolutzellzahlen.

Der Anteil an den CD4+ T-Zellen lag bei durchschnittlich 22,28% (SEM \pm 2,00), blieb bei Patient 1, 3 und 4 stabil und änderte sich im Verlauf lediglich bei Patient 2. Auch hier übertreffen die Anteile von Patient 2 die der anderen Patienten. Analog zum Anteil der Memoryzellen ist kein Zusammenhang zur TSO-Einnahme erkennbar (Daten nicht dargestellt).

Die Absolutzahl naiver CD4+ T-Zellen sinkt unter TSO-Einnahme leicht ab, was sich an CD27+ und CD62+ Zellen in identischer Weise nachvollziehen lässt. Niedrigste Werte werden nach zwei Monaten erreicht. Der Anteil naiver CD4+CD27+ (26,25% \pm 2,31) bzw. in gleicher Weise CD4+CD62L+ T-Zellen verringert sich unter TSO Therapie geringfügig, im zweiten Monat ist dieser ebenfalls am niedrigsten. Zwischen den Ausgangswerten besteht eine größere Schwankungsbreite als im Therapieverlauf (Daten nicht dargestellt).

Von den untersuchten Subgruppen der CD4+ Zellen besitzen den durchschnittlich höchsten Anteil naive (CD45RA+CD27+ bzw. CD45RA+CD62L+) Zellen, gefolgt von CD45RA-CD62L- T-Effektorzellen. Am seltensten kommen CD27-CD45RA- T-Memoryzellen vor (Daten nicht dargestellt).

Die Veränderungen der Anteile und Absolutzellzahlen unter Therapie waren statistisch in T-Test und Varianzanalyse nicht signifikant.

CD8+ Lymphozyten:

Die Analyse der zytotoxischen T-Zellen erfolgte wie unter III.2.3. beschrieben.

Während des gesamten Untersuchungszeitraumes lagen die Absolutzellzahlen bei allen Patienten innerhalb des Referenzbereiches von 200 – 1000/ μ l. Auffällig war, dass 2 Monate nach Therapiebeginn die Zellzahl bei allen Patienten unterhalb von 454/ μ l lag (230 – 454/ μ l), was dem niedrigsten gemessenen Durchschnittswert entspricht (she. Abbildung 22).

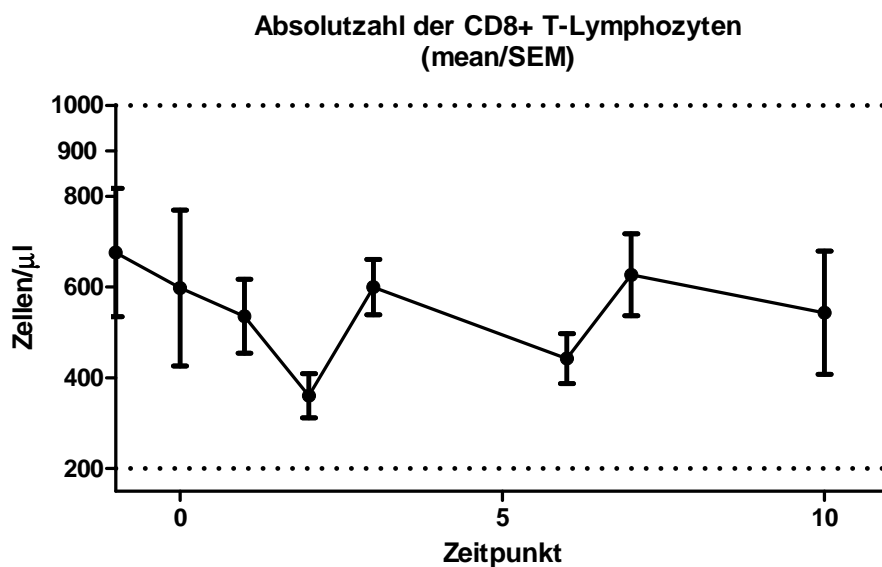


Abb. 22: Absolutzahl der CD8+ T-Lymphozyten im peripheren Blut, Zellzählung mittels Trucount (Zellen/ μ l, n=4, mean/SEM). Die punktierten Linien markieren den Referenzbereich

Die Unterschiede im Verlauf waren in Student's T-Test und Friedman-Test mit Dunn's Post-hoc-Test nicht signifikant.

Das Verhältnis naiver CD8+CD45RA+ zu aktivierten CD8+CD45RA- zytotoxischen Memory- bzw. Effektor-T-Zellen zeigte unter Therapie schwache Veränderungen. Besonders in Monat 2 war ein erniedrigter Anteil der aktivierten CD8+CD45RA- T-Zellen zu beobachten. Naive CD8+CD45RA+ T-Zellen hatten für alle Patienten betrachtet über den gesamten Beobachtungszeitraum mit durchschnittlich 54% (Range 41% - 71%) einen etwas höheren Anteil an den CD8+ T-Zellen als CD8+CD45RA- mit 46% (Range 29% - 61%, Daten nicht dargestellt).

CD4/CD8-Ratio

Die Untersuchung der CD4/CD8-Ratio ergab im Verlauf relativ stabile Werte zwischen 0,85 - 4,43 (Referenzbereich 0,8 - 4,0). Vor Therapie bestand eine höhere Schwankungsbreite, unter Therapie mit TSO stabilisierten sich die Werte bei allen Patienten im Bereich zwischen 1,46 und 3,54 (she. Abb. 23).

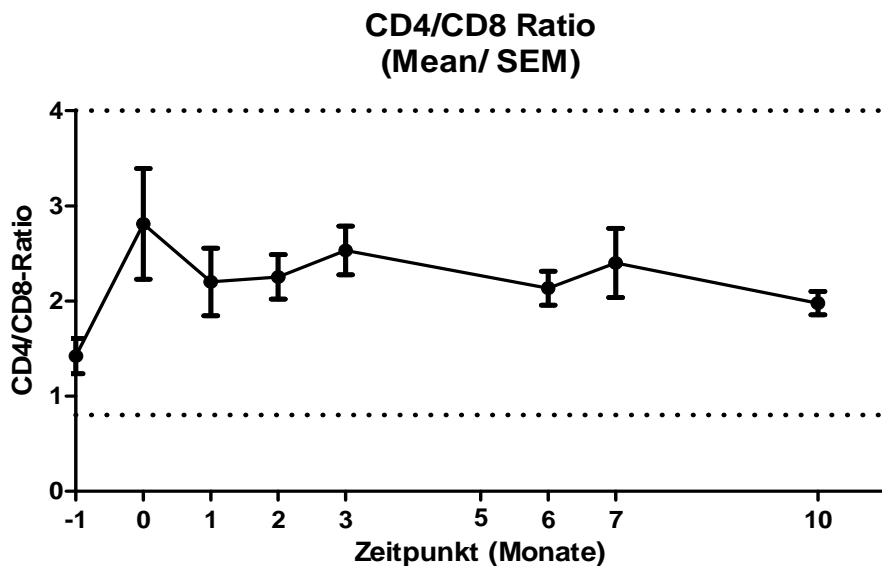


Abb. 23 : CD4/CD8-Ratio ($n = 4$, Mean/SEM) vor, unter und nach TSO-Ther. Die punktierten Linien markieren den Referenzbereich

B-Lymphozyten

Das Verhalten der B-Zellen unter TSO-Therapie variierte zwischen den einzelnen Patienten (she. Abb. 24). Bei Patient 1, 2 und 3 lagen die Zellzahlen während des gesamten Zeitraumes ungefähr im Referenzbereich (she. oben unter IV.5.). Patient 4 zeigte bei den Ausgangswerten vor Therapie bereits auf bis zu $1000/\mu\text{l}$ erhöhte Zellzahlen sowie stärkere Veränderungen unter TSO-Therapie.

Signifikante Änderungen unter TSO-Therapie wurden nicht nachgewiesen (Daten nicht dargestellt).

Die zusätzlich analysierten Marker CD62L und CD23 zeigten im zeitlichen Verlauf keine signifikanten Änderungen (Daten nicht dargestellt).

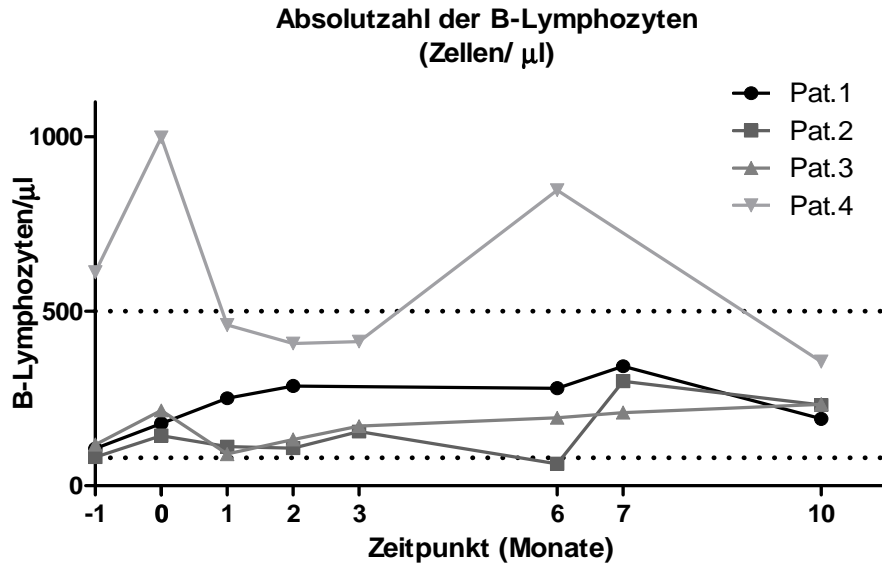


Abb. 24: Absolutzellzahl der CD19+ B-Lymphozyten (Zellen/ μ l, n = 4) vor, unter und nach TSO-Therapie. Die punktierten Linien markieren den Referenzbereich

IV.6. NK-Zellen

IV.6.1. NK-Zellen: Einteilung in CD56dim (+) und CD56bright (++) NK-Zellen

Die Selektion der NK-Zellen und ihrer Subgruppe CD56++ NK erfolgte wie in Kapitel III.2.3. beschrieben; Referenzwerte gibt Tab. 31 an.

NK-Zellen: absolute Zellzahl	50 – 1050/ μ l
NK-Zellen: relativer Anteil an Lymphozyten	5 – 29%

Tab. 31: Referenzwerte für NK-Zellen im peripheren Blut

Die mittels Truocount bestimmten Absolutzellzahlen der NK-Zellen lagen während des gesamten Messzeitraumes mit Werten zwischen 60 – 637/ μ l für alle Patienten betrachtet innerhalb des Referenzbereiches. Es fällt auf, dass vor TSO-Therapie eine größere intraindividuelle Schwankungsbreite (60 - 637/ μ l) besteht als unter TSO-Therapie, während derer die Zellzahlen im unteren bis mittleren Referenzbereich lagen (64 - 478/ μ l). Nach Beendigung der Therapie lagen die Zellzahlen mit 116 - 381/ μ l noch niedriger als vor und unter Therapie (she. Abb. 25).

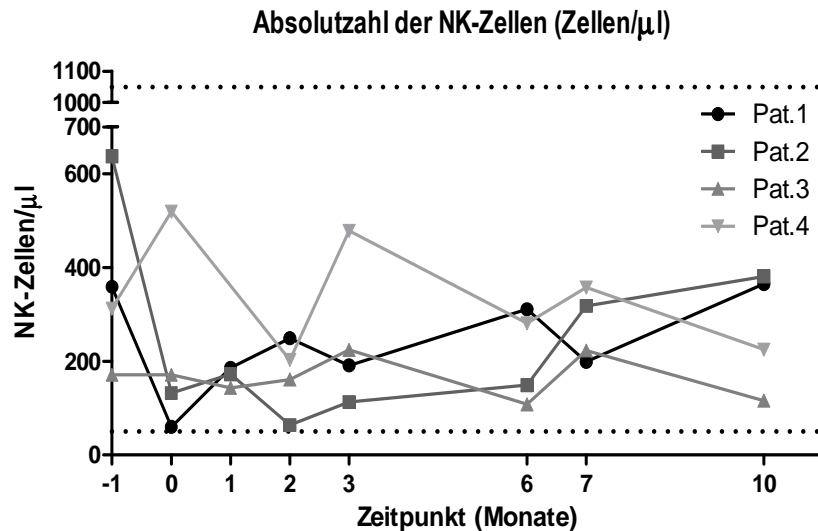


Abb. 25: Absolutzahlen der NK-Zellen im peripheren Blut (Zellen/ μ l) im Beobachtungszeitraum bei 4 Patienten. Die punktierten Linien markieren den Referenzbereich

Die Veränderungen im Verlauf unter Therapie waren statistisch nicht signifikant (Daten nicht dargestellt).

Der relative Anteil der NK-Zellen an der Lymphozytengesamtheit lag mit 5,51 - 13,39% ebenfalls im Referenzbereich (Daten nicht dargestellt).

IV.6.2. CD56++ NK-Zellen

Der Anteil der CD56++ NK-Zellen beträgt normalerweise bis zu 10% der gesamten NK-Zellen.

Die Selektion der CD56++ NK-Zellen erfolgte wie in Kapitel III.2.3. beschrieben und ist in Abb. 26 am Beispiel eines Patienten exemplarisch dargestellt.

Tab. 32 gibt Referenzwerte für CD56++ NK-Zellen an.

Relativer Anteil der CD56++ NK-Zellen an NK-Zellen gesamt	< 10%
Absolute Zellzahl CD56++ NK	< 5 - 105/ μ l
Relativer Anteil der CD56++ NK-Zellen an Lymphozyten	< 0,5- 2,9%

Tab. 32: Referenzwerte für NK++ Zellen im peripheren Blut

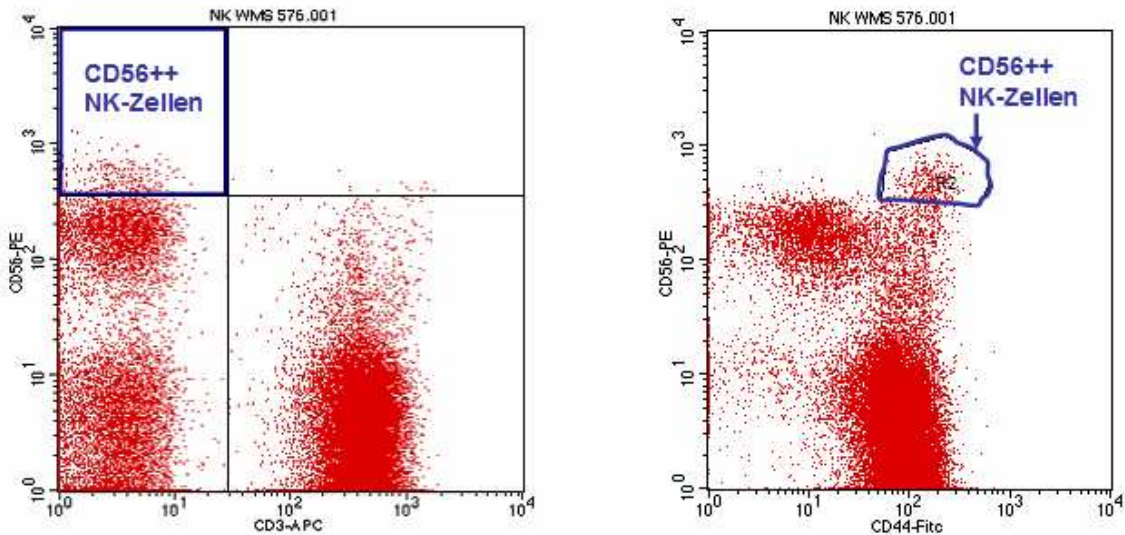


Abb. 28: Selektion der CD56++ NK-Zellen mittels verschiedener Oberflächenmarker: 1.) CD3- CD56++ , 2.) CD44+ CD56++

Die Zellzahlen der CD56++ NK-Zellen schwankten zwischen 3 – 37/ μ l während des gesamten Messzeitraumes für alle Patient betrachtet. Eine allgemeine Zu- oder Abnahme unter TSO-Therapie war nicht zu beobachten.

Jedoch erfolgte bei Patient 3 eine Zunahme der Absolutzellzahl sowie des Anteils der CD3-CD56++ NK-Zellen. Bei diesem Patienten kommt es zu einer Verdoppelung des Ausgangswertes von durchschnittlich 2,85% der CD3-CD56+ NK-Zellen vor Therapie auf 5,46% der NK-Zellen nach drei Monaten Therapie, also in direktem zeitlichen Zusammenhang. Bei den anderen drei Patienten war diese Entwicklung nicht nachzuvollziehen (she. Abb. 29, exemplarisch sind nur CD3+CD56++ NK-Zellen dargestellt).

Der Anteil der CD56++ NK-Zellen (als CD3-CD56++ bzw. CD44+CD56++ definiert) lag für CD3-CD56++ Zellen bei 0,67 - 5,46% der NK-Zellen (0,19 - 1,63% der Lymphozyten), ähnlich fiel der Anteil der CD44+CD56++ Zellen mit 0,49 - 5,14% der NK-Zellen (0,17 – 1,55% der Lymphozyten) aus.

Signifikante Veränderungen ergab keiner der beiden angewandten statistischen Tests (Daten nicht dargestellt).

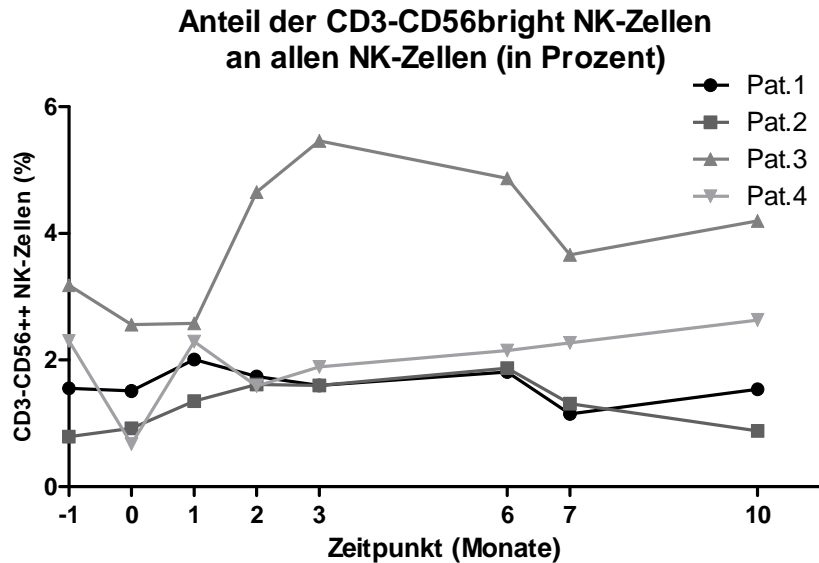


Abb. 29: Anteil der CD3-CD56++ NK-Zellen an allen NK-Zellen im peripheren Blut bei 4 Patienten im Beobachtungszeitraum

IV.7. Klinische Veränderungen unter TSO-Therapie

Die Patienten wurden im Verlauf regelmässig untersucht. Zu jedem Messzeitpunkt erfolgte eine Kurzanamnese mit Medikamentenanamnese sowie in Monat -1, 3, 6 und 10 eine umfassende klinisch-neurologische Untersuchung.

Die neurologische Untersuchung erbrachte im Verlauf bei drei Patienten (Patient 2, 3, 4) keine Progredienz der Klinik oder des EDSS. Während der Einnahme von TSO berichteten Patient 2, 3 und 4 über subjektiv erhöhtes Wohlbefinden im Vergleich zum Zeitraum vor Therapie, das auch noch vier Monate nach Therapie anhielt. Bei Patient 1 stellte sich nach ca. einem Monat TSO-Einnahme eine leichte Progredienz der Spastik mit partieller Reversibilität nach ca. 3 Monaten ein. Eine objektivierbare leichte Progredienz der MS zeigte sich an einem Anstieg des EDSS von 6,0 (Basiswert -1) auf 6,5 (Monate 6 und 10).

Die Patienten zeigten bis auf eine Ausnahme keine Nebenwirkungen unter TSO-Einnahme. Patient 4 litt im Verlauf einmalig unter Diarrhö, die in fraglichem Zusammenhang mit der Einnahme von TSO stand und ohne Medikation nach zwei Tagen persistierte. Eine erhöhte Anfälligkeit für Infekte wurde nicht beobachtet.

V. Diskussion

V.1. Hintergrund der vorliegenden Arbeit und Stand der Wissenschaft

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die immunologische Antwort von MS-Patienten unter TSO-Therapie in einem breit angelegten Screening aller peripheren Immunzellen zu untersuchen, um TSO auf das Vorhandensein immunmodulatorischer Eigenschaften zu überprüfen. Zahlreiche Veröffentlichungen beschreiben die Hygienehypothese im Zusammenhang mit Therapie und Prävention von Autoimmunerkrankungen und Allergien^{47, 59, 60}. Der nachweislich positive Einfluss natürlich erworbener parasitärer Infektionen auf den Verlauf von MS⁹⁴ und ihre experimentell nachgewiesene Effektivität bei EAE⁸⁰⁻⁸³ untermauern die Theorie, dass immunmodulatorische Eigenschaften von Parasiten im Rahmen von MS und anderen Autoimmunerkrankungen therapeutisch genutzt werden können.

V.1.1. TSO

Bisher liegt noch keine Veröffentlichung zur allgemeinen systemischen immunologischen Antwort auf TSO-Einnahme beim Menschen vor.

Eine placebokontrollierte Studie zur Wirkung von TSO auf Patienten mit allergischer Rhinitis überprüft allergierelevante Parameter wie Immunglobuline, Eosinophile und Allergiesymptome, wobei hier acht Gesamtdosen von jeweils 2500 *T. suis* ova in dreiwöchigen Abständen eingenommen wurden¹¹⁹. Dabei fanden sich nachweisbare immunologische Veränderungen, jedoch keine klinische Verbesserung der Allergiesymptome. Es existieren mehrere Studien zur TSO-Einnahme bei Chronisch Entzündlichen Darmerkrankungen (CED), d. h. M. Crohn und Colitis Ulcerosa. Dabei wurde die gleiche TSO-Dosierung wie in der vorliegenden Arbeit eingenommen, also zwölf mal 2500 TSO in zweiwöchigen Abständen^{66-68, 98}.

Von der Anwendung von TSO wird erwartet, dass der Wurm immunmodulatorische Effekte ausübt, ohne Neben- oder gar schädlichen Wirkungen zu besitzen. *Trichuris suis* ist ein enger Verwandter des humanpathogenen *Trichuris trichiuria*, mit dem mindestens 500 Millionen Menschen weltweit infiziert sind und der bei schwerem Befall gastrointestinale Symptome bis zu Hämorrhagien oder Ileus provoziert. *T. suis*, der Schweinepeitschenwurm ist jedoch wie alle Fadenwürmer streng wirtsspezifisch und daher nicht humanpathogen. Dieser Sachverhalt hat in der Therapie mit TSO positive und negative Seiten.

Positiv ist, dass starke Nebenwirkungen sehr unwahrscheinlich sind, obwohl entgegen der von Summers, Weinstock et al. postulierten Noninvasivität von *T. suis*⁶⁸ in der Therapie von CED mit TSO beim Menschen in einem Fall invasives Verhalten histopathologisch nachgewiesen wurde. Dabei wurden direkt unter entzündlich veränderter und verdünnter Ileozäkalschleimhaut mehrere Stadien der Helminthen gefunden. Klinische Symptome waren jedoch nicht assoziiert¹²⁰. Vom natürlichen Entwicklungszyklus von *T. suis* im Schwein ist bekannt, dass im Larvenstadium eine Invasion in die intestinale Mukosa erfolgt, die Larven danach ca. zwei Wochen dort verbleiben und bis an die Grenze der Muscularis mucosae wandern. Man geht davon aus, dass diese Gefahr bei intaktem menschlichem Darmepithel nicht besteht. In der vorliegenden Arbeit wurde eine solche Invasivität nicht untersucht. Die Entnahme von Darmbiopsien bei den von uns behandelten MS-Patienten unter TSO-Therapie wäre insbesondere bei fehlenden gastrointestinalen Nebenwirkungen nicht gerechtfertigt gewesen, und gehört außerdem nicht zur Fragestellung.

Die als Garant für sichere Anwendung angesehene mangelnde Invasivität könnte aber gleichzeitig die Anwendung von TSO zur systemischen Immunmodulation in Frage stellen, da die Interaktion von *T. suis* mit dem Immunsystem bzw. systemische Auswirkungen dadurch stark eingeschränkt werden. Ob der positive Effekt von TSO auf CED durch systemische oder lokale Effekte oder auch die Kombination beider Komponenten begründet ist, ist in der Literatur noch nicht beschrieben. Unsere Ergebnisse sprechen für einen mäßigen Einfluss auf das menschliche Immunsystem (s. u.). In diesem Sinne wäre die Anwendung von TSO als Kompromiss zu sehen: mäßige Wirkung bei praktisch fehlender Nebenwirkung. Die Wirkung kann möglicherweise durch höhere Dosierung oder häufigere Einnahme verstärkt werden, was in weiteren Studien getestet werden sollte.

Zahlreiche neuere Veröffentlichungen beweisen, dass einige immunmodulatorische Effekte von Parasiten nur durch einzelne Bestandteile wie bestimmte Proteine vermittelt werden können^{73, 121-124}. Möglicherweise ist es daher nicht nötig, zur Therapie ganze Wurmeier einzunehmen und den Therapieeffekt vom Entwicklungszyklus der Würmer im Darm abhängig zu machen. Davon abgesehen, dass nicht alle Patienten einer solchen Therapie mit lebenden Würmern gegenüber aufgeschlossen sind, ist auch die praktische Verfügbarkeit begrenzt. Die Gewinnung von TSO ist aufwendig, langwierig und steht nur einer begrenzten Patientenzahl zur Verfügung. Ein großer Fortschritt wäre

es, die für die Immunmodulation verantwortlichen Komponenten zu identifizieren und in Zukunft in isolierter Form anzuwenden.

V.1.2. Hygienehypothese und Th1-Th2-Shift als Grundlage – eine zu starke Vereinfachung?

Die Anwendung von TSO bei Autoimmunkrankheiten basiert auf der Hygienehypothese und der Annahme, dass ein Th1-Th2-Shift bei MS als Th1-vermittelter Autoimmunerkrankung antiinflammatorische und damit immunmodulatorische Effekte besitzt. Neuere Daten zeigen auf, dass das Th1-Th2-Modell die komplexen immunologischen Zusammenhänge zu stark vereinfacht, da unter anderem für Krankheitsgenese und -verlauf wichtige Zellpopulationen unberücksichtigt bleiben ¹²⁵. Naive CD4+ T-Zellen differenzieren sich nach neueren Erkenntnissen nicht in zwei, sondern in mindestens vier Untergruppen: Th1, Th2, Th17 und regulatorische T-Zellen (Treg) ¹²⁶. CD4+ Th1-Zellen sind nach diesem Modell in erster Linie für die Abwehr intrazellulärer Erreger verantwortlich und sezernieren vor allem IL2, IL3 und IFN γ . Th2-Zellen sind für die humorale Immunität zuständig, die sie mittels Sekretion von IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13 und IL-25 induzieren. Stark proinflammatorische Effekte werden hingegen Th17-Zellen zugeschrieben, die sich durch Sekretion von IL-17, IL-21, and IL-22 auszeichnen und deren Differenzierung physiologischerweise durch Infektion mit gramnegativen Bakterien, Pilzen und Protozoen induziert wird. Eine wichtige Rolle soll diese Zellpopulation aber auch bei der Vermittlung von Autoimmunkrankheiten wie MS und der Abstoßung von Transplantaten haben. Treg zeichnen sich durch die Expression von CD25 auf ihrer Oberfläche und den Transkriptionsfaktor FoxP3 aus und besitzen teils induzierbare immunregulatorische Eigenschaften, unter anderem durch Sekretion von IL10 ¹²⁷. Dabei geht man von einer von Situation und Differenzierungsstadium abhängigen Plastizität aus, im Rahmen von Transplantatabstoßung beispielsweise können sich vorher als Treg differenzierte CD4+ T-Zellen auch in Th17-Zellen transformieren, und somit die immunsuppressive Therapie gefährden ¹²⁸. Auch die Umwandlung von Th1- in Th2-Zellen wurde bereits beschrieben ⁹³.

In den letzten Jahren wurde sowohl für die Pathogenese der EAE ¹²⁹ als auch der MS ^{130, 131} die wichtige Rolle der Produktion von proinflammatorischem IL17 durch Th17-Zellen nachgewiesen. Insbesondere bei der Induktion und Förderung des inflammatorischen Geschehens könnte diese Zellgruppe eine wichtige Rolle spielen.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Sekretion des proinflammatorischen IL17 nicht untersucht und somit Th17 Zellen nicht berücksichtigt. Daher kann keine Aussage über einen möglicherweise existierenden Einfluss von TSO auf ihre Aktivität getroffen werden.

V.1.3. Regulatorische T-Zellen als wichtige Immunmodulatoren

In der vorliegenden Arbeit wurden Treg nicht als gesonderte Zellpopulation selektiert und untersucht, da dies ohne die Bestimmung der Oberflächenmarker CD25 und FoxP3 auf CD4+ T-Zellen nicht möglich ist. Eine Aussage darüber, ob es unter TSO zu einer gesteigerten Differenzierung naiver T-Zellen in Treg kommt konnte damit nicht erfolgen. Die zytokinsekretorische Aktivität dieser Zellpopulation wurde dennoch mittels Kontrolle der IL10-Sekretion durch CD4+ T-Zellen miterfasst. Ein klarer Einfluss von TSO auf die IL-10 Sekretion konnte nicht nachgewiesen werden, diese zeigte keine zum Einnahmezeitraum korrelierenden Veränderungen.

Mit den angewandten Methoden konnte daher auch nicht bestimmt werden, zu welchem Anteil Treg verantwortlich für die Sekretion von IL10 sind oder inwieweit andere CD4+ Populationen daran beteiligt sind. Beim Menschen sind neben Treg insbesondere Th2 Zellen zur IL10-Sekretion befähigt sind sowie in geringem Maße naive (Th0) und Th1 Zellen^{132, 133}. Manche Veröffentlichungen schreiben die unter parasitärer Infektion erhöhten IL10-Spiegel Treg zu^{134, 135}, andere Arbeiten gehen von einer zusätzlichen IL10-Produktion sowohl durch Effektor- als auch regulatorische T-Zellen aus⁸⁹. Dennoch wurde auch hier den Treg eine wesentlich höhere IL10-Produktion zugeschrieben als den Effektorzellen. Sogar Untersuchungen, die die IL10-Produktion von Immunzellen der angeborenen Abwehr berücksichtigen (s.u.) ergaben, dass die stärkste IL10-Produktion durch Treg erfolgt⁸⁹.

Es ist außerdem bekannt, dass Treg zum Beispiel im Rahmen von Schistosomeninfektion IL10-unabhängige immunmodulatorische Aktivität entwickeln können¹³⁶, die wir nicht untersuchten.

Wie bereits oben erwähnt, wurde als Hintergrund der vorliegenden Arbeit das klassische Th1-Th2-Modell herangezogen und die Zellen nach Zytokinproduktion in zwei Gruppen eingeteilt: IL2 und IFN γ für Th1, IL4 und IL10 für Th2. Treg wurden dabei nicht gesondert berücksichtigt. Für die Beurteilung des Effekts von TSO auf das Immunsystem spielt die theoretische Einteilung der CD4+ T-Zellen in Gruppen wie Th1, Th2 und Treg wahrscheinlich nur eine untergeordnete Rolle, wichtiger sind messbare

Veränderungen im Zytokinmuster. Dennoch sollte die Aktivität der verschiedenen Zellpopulationen im Rahmen von iatrogener TSO-Infektion beim Menschen zum besseren Verständnis der Hintergründe besser untersucht und definiert werden.

V.1.4. Interleukin 10 – Sekretion durch verschiedene Zellpopulationen

Als gesichert gilt die Rolle von IL10 als Zytokin mit antiinflammatorischer Wirkung unter anderem durch Suppression der Makrophagenaktivität, auch wenn seine immunregulatorische Funktion darüber weit hinausgeht. Ebenso kann vom regelhaften Auftreten erhöhter IL10-Spiegel im Rahmen von Parasiteninfektionen ausgegangen werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde lediglich die IL10-Produktion der CD4+ T-Zellen unter TSO-Einnahme untersucht. Die IL10-Produktion anderer Zelllinien wurde dabei nicht berücksichtigt, obwohl sie theoretisch als weiterer Faktor der immunmodulierenden Wirkung von Parasiten in Frage kommt.

Bei verschiedenen Parasiteninfektionen scheinen tatsächlich weitere Zellpopulationen zur Sekretion von IL-10 befähigt zu sein, z. B. CD8+ T-Zellen, B-Zellen und EBV-transformierte B-Zellen sowie Monozyten/Makrophagen und dendritische Zellen. CD8+ T-Zellen zeigten in Studien zur Zytokinsekretion bei EAE eine im Krankheitsverlauf eher späte regulatorische IL10-Sekretion ¹²⁹. Im Falle der Monozyten bzw. Makrophagen wirkt IL10 unter Parasiteninfektion wie auch unter Stimulation durch bakterielle Lipopolysaccharide immunregulatorisch als autoinhibitorischer Stimulus ^{61, 137}.

In einem Mausmodell mit IL10/RAG (regulation-of-activation-gene)-depletierten Mäusen unter Schistosomeninfektion wurde die IL10-Produktion von Zellen der adaptiven und der angeborenen Abwehr untersucht. Dabei stellte man fest, dass auch Zellen der angeborenen Abwehr wie beispielsweise Makrophagen unabhängig von T-Zellen IL10 produzieren können und somit synergistisch zum adaptiven Immunsystem die Th2-Antwort und Toleranz induzieren. Diese Autoregulation dient dazu, überschießende selbstschädigende Entzündungsreaktionen zu verhindern und somit die Überlebenswahrscheinlichkeit des Wirts zu erhöhen. Der größte Anteil des produzierten IL10 wurde aber auch hier CD4+CD25+ Treg zugeschrieben ⁸⁹.

V.1.5. MS-Prävalenz und die Hygienehypothese

Die Hygienehypothese dient in der Pathogenese der MS als ein mögliches Erklärungsmodell. Der epidemiologische Zusammenhang zwischen niedrigerer Pathogenexposition in der Kindheit und höherer Prävalenz von Autoimmunerkrankungen in den hochentwickelten Ländern verglichen mit Entwicklungsländern ist statistisch belegt⁴⁶⁻⁴⁸, die kausale Verknüpfung dieser beiden Tatsachen ist jedoch noch nicht abschließend geklärt. So berichtet eine epidemiologische Studie zur MS in Sardinien über eine signifikant höhere MS-Prävalenz in ländlichen als in städtischen Gebieten, obwohl die "autoimmun- und allergiepräventive" Pathogenexposition in der Kindheit in den ländlichen Gebieten höher ist. Dadurch wird zumindest in diesem Gebiet die Hygienehypothese in Frage gestellt. Erklärt wird die erhöhte Prävalenz durch Dominanz genetischer Risikofaktoren in Form von HLA-DR-Polymorphismen, die in Sardinien als Focus mit sehr hoher MS-Prävalenz eine Rolle spielen¹³⁸. Diese besondere epidemiologische Situation stellt sicherlich eine Ausnahme dar, ist aber ein Indiz für die multifaktorielle Genese der MS die damit verbundene Komplexität bezüglich Krankheitsverständnis und Therapie.

V.2. Angewandte Methoden und Materialien

V.2.1. Superantigene als Stimulantien und Einfluss auf die T-Zelldifferenzierung

Superantigene sind Stimulantien, die CD4+ T-Zellen über Interaktion mit dem V β -Anteil des T-Zellrezeptors CD3 zu maximaler Zytokinproduktion anregen. In der vorliegenden Arbeit wurden sie zur in-vitro Stimulation von CD4+ T-Zellen im Vollblut eingesetzt und dabei mit CD28-AK zur Vermittlung des kostimulatorischen Signals, welches normalerweise über APC vermittelt wird, kombiniert. Unter Verwendung von Superantigenen sollte die Zytokinproduktion der CD4+ T-Zellen optimalerweise maximal aktiviert werden, ohne Einflussnahme auf die Differenzierung in Richtung Th1 oder Th2, um das bereits bestehende vorherrschende Differenzierungsmuster analysieren zu können.

Theoretisch wäre unter parasitärer Infektion ein Anstieg der Th2-Antwort zu erwarten, der sich in erhöhter Sekretion der Zytokine IL4, IL5, IL10 und IL13 äußert. In der vorliegenden Arbeit konnte diese Verstärkung kaum nachgewiesen werden. Möglicherweise ist dies partiell durch Stimulations- und Messtechniken bedingt und nicht alleine durch einen mangelnden Effekt von TSO auf die systemische Immunität zu erklären.

Die von uns verwendeten Superantigene SEA, SEB und TSST sind starke Exotoxine bakteriellen Ursprungs und in vivo für teils lebensbedrohliche Krankheitsbilder von Lebensmittelvergiftung bis hin zu Toxic Shock Syndrome verantwortlich. Bei diesen Akutreaktionen kommt es in erster Linie zu einer maximalen Th1-Aktivierung, mit hochgradig inflammatorischer Wirkung und erst später im Verlauf zu einer ausgleichenden immunsupprimierenden Reaktion, die durch Th2 vermittelt wird ^{93, 139}. Mehrere Arbeiten ergaben in diesem Zusammenhang, dass durch Superantigene entsprechend auch in-vitro insbesondere die Th1-Antwort gefördert wird. Eine Arbeit zeigt nach SEB-Stimulation eine hohe Quote IL2- oder IFN γ -sezernierender CD4+ T-Zellen, während wenig IL10- und kaum IL4- und IL5-produzierende Zellen gefunden wurden ¹⁴⁰. Dies lässt sich auch in einem veränderten Assay reproduzieren, bei dem insbesondere die Funktion der verschiedenen APC bei der Präsentation des SEB untersucht wird ¹⁴¹. Eine andere Arbeit bestätigt diese Beobachtung, allerdings lässt sich hier experimentell durch Zugabe von IL4 bei SEB-Stimulation der Anteil IL4- und IL10-produzierender Zellen erhöhen und somit das Ergebnis von einer Th1-Antwort hin zur Th2-Antwort manipulieren ¹⁴². Da in der vorliegenden Arbeit die Stimulation mit Superantigenen direkt im Vollblut erfolgte, sind sicherlich an der Aktivierungsreaktion der CD4+ T-Zellen weitere Einflussfaktoren wie z. B. Anwesenheit von IL4 oder Zell-Zell-Interaktionen beteiligt.

V.2.2. Kinetik der Stimulation mit Superantigenen bzw. PMA/Ionomycin

Sucht man weiter nach Gründen für die unerwartet niedrige Th2-Aktivierung in der vorliegenden Untersuchung, sind auch die Kinetik der Zytokinsekretion nach in-vitro Stimulation und der Untersuchungszeitpunkt zu berücksichtigen. An MACS-isolierten und über längere Zeiträume mit TSST inkubierten CD4+ Lymphozyten wurde gezeigt, dass Th1-typische Zytokine wie IFN γ unter Zugabe von TSST schon nach 18h in erhöhtem Maße gebildet wurden, während Th2-typisches IL4 erst nach 72h erhöht nachweisbar war ¹⁴³. Eine andere Arbeit weist in-vitro nach, dass regulatorische T-Zellen nach Stimulation mit TSST ebenfalls erst später im Verlauf IL10 sezernieren, um das durch Th1-typische Zytokine geförderte inflammatorische Geschehen einzudämmen ¹³⁹. Eine Arbeit, die vorrangig die Koexpression (s. u.) von Th1- und Th2-typischen Zytokinen untersucht, postuliert eine schnelle Kinetik für IL2, eine intermediäre Kinetik für IFN γ und eine langsame Kinetik für IL10 ¹⁴⁴. So waren erhöhte Zahlen IL10-sezernierender Zellen grundsätzlich erst 24h später als IL2- bzw. IFN γ -

sezernierende Zellen nachweisbar. Dies bedeutet, dass es stark vom Zeitpunkt der Messungen abhängt, welche Zytokine von einer in-vitro stimulierten CD4⁺ T-Zelle sezerniert und damit nachgewiesen werden können. In der vorliegenden Arbeit erfolgten die Messungen stets einmalig 24h nach Einsetzen der Zellen in die Kurzzeitkultur, nach einer direkt vorangegangenen Stimulation mit PMA/Ionomycin über 6h, beginnend 18h nach Einsetzen in die Zellkultur.

Ebenfalls ist eine Abhängigkeit der Th2-Antwort von der eingesetzten Dosis der Superantigene möglich: in-vitro konnte gezeigt werden, dass die Th2-Differenzierung eher bei niedriger TSST-Konzentration stattfindet. Zudem waren Faktoren wie eine niedrigere Anzahl kokultivierter Monozyten und B-Zellen sowie das Vorhandensein von IL4 für eine Differenzierung in Th2 förderlich ¹⁴⁵. Die Anwesenheit von Monozyten in der Zellkultur kann, bedingt durch die Selektionsmethode mittels MACS auf CD4 und dessen Expression durch Monozyten kann in der vorliegenden Arbeit nicht ausgeschlossen werden.

V.2.3. Einfluss von TSO-Dosis und Intensität parasitärer Infektionen

Einige neuere Studien beleuchten den Zusammenhang zwischen Intensität bzw. Dauer von Wurminfektionen und ihrer Auswirkung auf das Immunsystem bezüglich Allergien und Immunsuppression: dabei wird gezeigt, dass schwere chronische Parasiteninfektionen mit hoher Parasitenlast Immunsuppression induzieren können, während milde akute Infektionen die Entwicklung von Allergien noch fördern können. Dies wurde zunächst an Mäusen ¹⁴⁶, später auch beim Menschen nachgewiesen ¹⁴⁷. Im Mausmodell wurde die Dauer einer Infektion mit *S. mansoni* in Relation gesetzt zur Schwere der Reaktion auf inhaliertes Ovalbumin, mit dem Sensibilisierung und Induktion einer asthmaähnlichen Erkrankung erfolgten. Dabei wurde eine Dauer von insgesamt 8 Wochen als akutes, 12 Wochen als intermediäres und 16 Wochen als chronisches Stadium der Infektion definiert. Nur in der chronischen Phase zeigte sich eine signifikante IL10-vermittelte Suppression der ovalbuminvermittelten Hyperreagibilität der Atemwege, vorher jedoch nicht. Diese Entdeckung relativiert das Postulat der Hygienehypothese, parasitäre Infektionen hätten im Allgemeinen protektiven Effekte bezüglich Allergien.

Da sich aus ethischen Gründen selbstverständlich die Induktion von Allergien am Menschen verbietet, kann nur untersucht werden, welche Auswirkungen eine antihelminthische Therapie bei natürlich erworbener Infektion hat: es zeigte sich

beispielsweise, dass ecuadorianische Schulkinder nach <12 Monaten antihelminthischer Therapie keinen Anstieg der Allergieprävalenz zeigten¹⁴⁸. Eine andere Arbeit untersucht Schulkinder in Gabun nach antihelminthischer Therapie von >22 Monaten Dauer. Diese führte zu einer im Prick-Test nachweisbar erhöhten Sensibilisierung gegen Hausstaubmilben⁷⁰ und einem Prävalenzanstieg allergischer Rhinitis. Inwieweit diese Erkenntnisse auf Autoimmunerkrankungen übertragbar sind, muss noch untersucht werden. Wäre die Schwere der Infektion auch bei Autoimmunerkrankungen für die therapeutische Wirkung ausschlaggebend, wäre von einer so milden Infektion wie TSO beim Menschen möglicherweise keine immunmodulierende Wirkung zu erwarten.

V.2.4. Zeitpunkte der TSO-Einnahme und Auswahl der Patienten

Die Messzeitpunkte in der vorliegenden Arbeit wurden nach dem Kriterium gewählt, möglichst repräsentativ für die Entwicklung des Immunsystems unter TSO-Einnahme zu sein und gleichzeitig die Belastung für die Patienten so gering wie möglich zu halten. Dabei gingen wir von einem mittel- bis längerfristigen immunmodulatorischen Effekt aus.

Bei o.g. Schema der Messzeitpunkte (siehe Kapitel III.1.3.) war eine genaue Untersuchung der Kinetik nicht möglich. Es ist jedoch denkbar, dass es innerhalb der ersten Tage nach TSO-Einnahme bzw. in den Intervallen zwischen den Messungen zu immunologischen Reaktionen kommt, die zwei Wochen nach Einnahme nicht mehr nachweisbar sind. Zur Klärung sollte eine Untersuchung der Kinetik von TSO mit kürzeren Abständen zwischen den Messungen erfolgen, z. B. täglich im ersten Einnahmezyklus.

Ein weiterer Punkt ist, dass die Untersuchung der immunologischen Parameter bisher nur an Patienten, nicht an gesunden Probanden erfolgte. Einerseits geht es langfristig genau darum, wie TSO sich auf das bereits veränderte Immunsystem von MS-Patienten auswirkt und ob unter diesen Bedingungen eine therapeutisch nutzbare systemische Immunmodulation erfolgt. Andererseits wäre zunächst auch eine Untersuchung der TSO-Wirkung beim Gesunden interessant. Dabei könnte die systemische Wirkung von TSO ohne weitere immunologische Besonderheiten überprüft werden. Zudem wurden nur Patienten mit sekundär progredienter MS eingeschlossen, jedoch wäre auch die Untersuchung anderer Verlaufsformen oder Krankheitsstadien wichtig. Wie bereits

erwähnt, war der Einschluss von Patienten, bei denen etablierte Therapieformen noch als wirksam betrachtet werden können, aus ethischen Gründen nicht möglich.

Da die Patienten sich während der Beobachtungszeit weiterhin in ihrem gewohnten Umfeld aufhielten, waren Umweltfaktoren wie beispielsweise Infekte nicht auszuschalten, obwohl diese theoretisch Einfluss auf das Immunsystem und damit die Wirkung von TSO haben könnten.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es erstens sinnvoll wäre, die Wirkung von TSO auf das menschliche Immunsystem engmaschig unter Studienbedingungen zu untersuchen. Zweitens sollte diese vergleichend an gesunden Probanden und MS-Patienten getestet werden. Aus diesen Gründen sollten für TSO kontrollierte Phase I- und II-Studien zu Kinetik und Wirkung nach standardisierten Prüfbedingungen erfolgen.

V.2.5. Erreicht die Wirkung von TSO das ZNS?

Die vorliegende Arbeit überprüft, ob TSO eine positive systemische Wirkung mit humoral nachzuweisendem Th1-Th2-Shift und antiinflammatorischer Komponente besitzt. Angenommen, dies ist der Fall, gibt es noch keine Garantie dafür, dass sich der immunmodulatorische Effekt auch auf die lokale inflammatorische Aktivität bzw. lokale Antikörper- und Zytokinproduktion im ZNS auswirkt, da dieses als immunprivilegiertes Organ nicht zwangsläufig direkt vom systemischen Immungeschehen beeinflusst wird. Tierexperimentelle Untersuchungen, z. B. an EAE-Mäusen unter Schistosomeninfektion beweisen klinisch und histopathologisch, dass antiinflammatorische systemische Effekte bei Parasiteninfektion auch auf die inflammatorische Aktivität im ZNS wirken⁷⁹⁻⁸¹. Für einen solchen positiven Effekt spricht auch die bereits erwähnte Studie von Correale und Farez aus Argentinien⁹⁴.

Um die Wirksamkeit objektiv und detailliert zu klären, wäre eine doppelblinde randomisierte Studie mit Analyse klinischer Daten, des Liquor cerebrospinalis und cMRT-Monitoring an einem gut definierten Kollektiv von MS-Patienten unter TSO-Einnahme wünschenswert.

V.3. Ergebnisse: Abgleich mit aktuellen Daten

V.3.1. Immunglobulinkonzentrationen im Serum

Unter parasitärer bzw. Wurminfektion findet normalerweise ein Konzentrationsanstieg des IgE und IgG4 auf Werte oberhalb des Referenzbereiches statt. Wie in Kapitel IV.2. dargestellt, fand ein Immunglobulinshift der B-Lymphozyten in Richtung antiparasitäre Antikörperbildung unter TSO nicht statt. Ein klarer Einfluss auf den humoralen Teil des Immunsystems wurde also wider Erwarten nicht nachgewiesen.

Im Gegensatz zu unseren Ergebnissen zeigten sich in der bereits erwähnten Studie zum Einfluss von TSO auf allergische Rhinitis signifikant erhöhte Spiegel des IgE-, IgG4 und TSO-spezifischen IgG. Dabei ist zu beachten, dass Patienten mit allergischer Rhinitis pathophysiologisch bedingt häufig erhöhte IgE-Spiegel aufweisen, für die erhöhten TSO-spezifischen IgG ist dies jedoch keine Erklärung. Zudem wird im Vergleich mit Placebo ein allein allergiebedingter Anstieg ausgeschlossen¹¹⁹. Wegen der diskrepanten Ergebnisse wären Untersuchungen an einer gesunden Studienpopulation interessant.

V.3.2. Funktionelle Parameter und Differentialblutbild

Funktionelle Parameter der Leber- und Nierenfunktion, rotes Differentialblutbild und Thrombozyten zeigten unter TSO-Therapie keine Veränderungen. Dies schliesst hämatologische, hepatische und renale Risiken weitgehend aus.

Eosinophile Granulozyten

Unter parasitärer Infektion kommt es pathophysiologisch bedingt zu einem Anstieg relativer und absoluter Eosinophilenwerte^{58, 86}. Bei drei der von uns untersuchten Patienten kam es unter TSO-Therapie mindestens kurzzeitig zu einem erhöhten relativen Eosinophilenanteil, jedoch nur bei einem der Patienten zu einem deutlichen Anstieg der absoluten Eosinophilenzahl. In der bereits erwähnten Rhinitisstudie mit TSO-Behandlung zeigte sich ein solcher Anstieg, obwohl die eingenommene TSO-Dosis niedriger als die von uns angewandte war. Patienten mit allergischer Rhinitis können pathophysiologisch bedingt erhöhte Eosinophilenwerte aufweisen¹¹⁹, diese wird durch das placebokontrollierte Studiendesign als alleiniger Faktor ausgeschlossen. Das geringe Ansteigen der Eosinophilen in der vorliegenden Arbeit ist ungeklärt, zum Vergleich sollte die Entwicklung bei gesunden Probanden analysiert werden.

V.3.3. Trucount zur durchflusszytometrischen Bestimmung der absoluten Zellzahl

Die Absolutzellzahlen im peripheren Blut wurden mittels Trucount-Tubes bestimmt. Dieses System gehört zu den sogenannten "single-platform"-Messmethoden zur Bestimmung der Absolutzellzahl. Dabei wird diese anhand von Messergebnissen aus einer einzigen Probe rechnerisch ermittelt, nämlich mittels der gemessenen Zahl der betreffenden Zellpopulation und der Zahl der Microbeads. Im Gegensatz dazu wird bei standardisierten "double-platform" Messungen der durchflusszytometrisch bestimmte Anteil einer Zellpopulation bestimmt und in Verhältnis zu einer mittels automatisierten Blutanalysegeräten ("automated hematology analyzers") ermittelten Absolutzellzahl berechnet. Single-platform Messmethoden zeichnen sich durch vergleichsweise weniger aufwendige instrumentelle Ausstattung und dadurch einfachere Handhabung aus, sind aber in modernen Labors weniger verbreitet. Dennoch wird die Methode in mehreren Vergleichsstudien als zuverlässig und valide beurteilt ¹⁴⁹⁻¹⁵¹.

Der direkte Vergleich der Methode Trucount mit der standardisierten Methode des Zentrallabors der Charité am Beispiel der Absolutzellzahl der Monozyten ergab ähnliche Werte, allerdings liegen die Absolutzellzahlen bei der Methode Trucount höher. Im Allgemeinen lagen die von uns mittels Trucount ermittelten Absolutzellzahlen von CD4+ und CD8+ T-Zellen, CD14+ Monozyten und Macrophagen sowie CD19+ B-Zellen innerhalb der Referenzbereiche, was Zuverlässigkeit und sachgerechte Ausführung der Methode bestätigt.

Aus verschiedenen Gründen kann es dennoch zu Abweichungen kommt, dieses sollen im Folgenden an einzelnen Zellpopulationen erläutert werden.

Ergebnisse der quantitativen und qualitativen Analyse der Lymphozyten mittels Trucount:

1. CD4+ T-Lymphozyten

Die von uns ermittelten Absolutzahlen der CD4+ T-Helferzellen liegen mit 490 – 4372/ μ l im Schnitt konstant höher als die angegebenen Referenzwerte von 450 – 2000/ μ l. Theoretisch könnte dies pathophysiologisch durch die MS oder technisch begründet sein, beispielsweise durch die Messmethode mittels Trucount oder durch Gatingstrategien. Starke mit der TSO-Therapie korrelierende Veränderungen sahen wir, abgesehen von leichter reversibler Zellzahlverminderung im 2. Monat, nicht.

Mehrere Studien vergleichen die Zellzahl der CD4+ T-Zellen von MS-Patienten mit der von gesunden Probanden. Eine italienische Studie ergibt insbesondere im Liquor, aber

auch im peripheren Blut von Patienten mit RR-MS erhöhte CD4+-Zellzahlen ¹⁵². Allerdings litten die von uns untersuchten Patienten unter SP-MS. Eine niederländische Studie ermittelt signifikant niedrigere CD4+ T-Zellzahlen im peripheren Blut von MS-Patienten verglichen mit gesunden Probanden, wohingegen die Zellzahlen im Liquor erhöht sein sollen ¹⁵³. Nach aktueller Literatur sind die erhöhten CD4+ Zellzahlen im peripheren Blut von MS-Patienten also nicht typisch.

Liegen diese Werte also doch an der Methode Truocount? Die Datenlage zur Bestimmung der absoluten Zellzahl von CD4+ Zellen mittels Truocount ergibt, dass die Verwendung dieses Systems im Allgemeinen etwas höhere CD4+ Zellzahlen ergibt als bei anderen Systemen üblich ¹⁵¹.

Eine Verunreinigung durch Monozyten oder Macrophagen kann ausgeschlossen werden. Da diese CD4+ Zellen wesentlich größer (FSC) und stärker granuliert (SSC) sind, werden sie durch Setzen von Gates im FACS sicher aussortiert.

Die qualitative Untersuchung der CD4+ T-Lymphozyten bezüglich der Anteile der Subpopulationen naive, Memory- und Effektorzellen ergab gut abgrenzbare Zellpopulationen, deren Verteilung ungefähr den in der Literatur angegebenen entspricht ^{113, 154}. Die eher geringen Veränderungen unter TSO scheinen also der realen Entwicklung zu entsprechen.

2. CD8+ Lymphozyten

Bei CD8+ zytotoxischen T-Zellen untersuchten wir die Absolutzahl sowie das Verhältnis naiver CD45RA+ zu aktivierten CD45RA(-) Zellen. Die quantitative Analyse der CD8+ Zellen ergab über den gesamten Messzeitraum im Referenzbereich liegende Zellzahlen. Die TSO-Therapie scheint keinen Einfluss auf die Absolutzellzahl der CD8+ Zellen zu besitzen. Wie auch die Anteile zytokinproduzierender CD4+ T-Zellen sind die Absolutzellzahlen der CD8+ T-Zellen nach zwei Therapiemonaten am niedrigsten. Um einen Zusammenhang zur Therapie zu klären, sind weitere Studien mit mehr Probanden nötig.

Die qualitative Analyse der Subpopulationen naiver und aktivierter CD8+ Zellen ergab ähnliche Anteile wie in der Literatur angegeben, allerdings liegen bisher nur Daten aus Blutproben gesunder Probanden vor ^{114, 155}.

V.3.4. Analyse der Zytokinproduktion von CD4+ T-Zellen unter TSO-Therapie

Um einen möglichen Th1-Th2-Shift unter TSO-Therapie zu überprüfen, erfolgte die Kontrolle der Zytokinproduktion von CD4+ T-Zellen nach in-vitro-Stimulation. Dazu wurden zwei verschiedene Methoden herangezogen (siehe III.2.3., IV.1.1. und IV.1.2.). Vergleichsliteratur zur T-Helferzellantwort unter TSO-Einnahme liegt noch nicht vor. Lediglich die bereits mehrfach erwähnte Allergiestudie untersucht auch systemische Auswirkungen, jedoch wird die T-Helferzellantwort hierbei nur indirekt durch das Profil der Immunglobuline berücksichtigt¹¹⁹. In der vorliegenden Arbeit wird also erstmals das Verhalten von T-Zellen unter TSO-Einnahme im Detail beobachtet.

Kommt es unter TSO-Einnahme zum erwarteten Th1-Th2-Shift?

Von Tiermodellen und Untersuchungen an Patienten unter parasitärer Infektion ist ein Th1-Th2-Shift mit typischer Änderung des Zytokinprofils bekannt⁵⁸. Dieser ließ sich bei den von uns untersuchten Patienten mit den angewandten Methoden nicht klar beweisen, es wurde aber eine partielle Suppression der Th1-Antwort mit erniedrigter IL2- und IFN γ -Produktion unter TSO-Einnahme gemessen.

Am deutlichsten nachzuvollziehen war dies am durchschnittlich verminderten Anteil IFN γ -produzierender CD4+ T-Zellen nach Superantigenstimulation im Vollblut. Diese Entwicklung lässt sich bei PMA/Ionomycin-Stimulation MACS-selektierter CD4+ T-Zellen weniger stark beobachten.

Die unter TSO supprimierte durchschnittliche IL2-Produktion ließ sich in der PMA/Ionomycin-Stimulation besser nachweisen als in der Superantigen-Stimulation. Die Produktion von IL4 und IL10 ist schwieriger zu untersuchen, da diese Zytokine von einem wesentlich geringeren Anteil CD4+ T-Zellen produziert werden und sich bereits geringe Schwankungen oder Messungenauigkeiten auswirken. Diese können durch Umwelteinflüsse in-vivo vor Probengewinnung, in-vitro oder durch technische Einflüsse bedingt sein und starken Einfluss auf das Messergebnis nehmen. Insbesondere die bereits vor Therapie inkonstanten Anteile des IL10 weisen auf die fehlende Zuverlässigkeit der Messungen bei derartig niedrigen Anteilen hin.

Eine Veröffentlichung zur Zytokinproduktion einzelner T-Zellen mittels der Detektion von Zytokin-mRNA nach in-vitro Stimulation ergab ähnliche Anteile der einzelnen Zytokine wie in der vorliegenden Arbeit: hierbei wurde IL2 am häufigsten produziert (14 – 36%),

gefolgt von IFN γ mit 2,8 – 5,5%. Für IL4 und IL10 ergaben sich niedrige Anteile unterhalb von 0,5% ¹⁵⁶.

Unsere Ergebnisse sprechen für einen partiell modulierenden Einfluss von TSO auf die spezifische Immunität.

Vergleich der Zytokin-Produktion der Subgruppen der CD4+ T-Zellen: Ergebnisse und Erwartungen

Der Vergleich der Zytokinproduktion von CD4+ T-Zellen in den einzelnen Subgruppen Effektor-, Memory und naive CD4+ T-Zellen nach Stimulation mit PMA/Ionomycin in Kurzzeitkultur ergab, dass diese unter den einzelnen Gruppen stark variiert.

Stärkste IL2-Produzenten waren CD4+CD27+CD45RA- Effektor-T-Zellen als die zweitgrößte Subgruppe (she.IV.5.2.), diese waren gleichzeitig stärkste IL10-Produzenten.

Die stärksten IL4-Produzenten waren CD27-CD45RA- Memory-T-Zellen. Diese Zellpopulation besitzt außerdem auch den größten Anteil IFN γ -produzierender Zellen und IL4-IFN γ doppelt positiver Zellen, obwohl sie quantitativ die kleinste Gruppe stellt.

In der Literatur sind ähnliche Anteile der Subpopulationen von CD4+ T-Zellen an der Zytokinproduktion beschrieben ¹⁵⁴.

Naive T-Zellen als die größte Subgruppe produzierten vor allem IL2. In der Literatur ist dieses Verhalten für naive CD4+ T-Zellen vor Aktivierung und Differenzierung beschrieben ⁸⁸.

Insgesamt betrachtet war in allen Subgruppen der Anteil IL2-produzierender CD4+ T-Zellen am höchsten, gefolgt von IFN γ , IL4 und IL10.

Diese Verteilung entspricht der in der Literatur angegebenen ¹⁵⁷, was eine korrekte Durchführung und Auswertung in der vorliegenden Arbeit nahelegt. Interne Kontrolle fand zudem durch doppelte Ansätze statt, wo dies möglich war (naive CD4+ Zellen). Daher lassen sich die Ergebnisse so interpretieren, dass die TSO-Therapie offensichtlich keinen Einfluss auf die Differenzierungsmuster der T-Zellen besitzt.

Dass es unter Stimulation selektierter CD4+ T-Zellen mit PMA/Ionomycin zu einem anderen Verhalten als unter Stimulation mit Superantigenen kommt, ist durch eine genauere Betrachtung der Methoden erklärbar und in der Literatur nachzulesen ^{139, 144, 145, 158}. Da eine genauere Diskussion den Umfang der vorliegenden Arbeit sprengen würde, wird auf eine genauere Diskussion an dieser Stelle verzichtet.

Koexpression von Th1-Th2-Zytokinen

Wie bereits erwähnt, differenzieren sich T-Helferzellen mindestens in die Typen Th1 und Th2. Wahrscheinlich dient dies dazu, die Immunantwort möglichst effizient zu gestalten. Allerdings konnte in mehreren Arbeiten gezeigt werden, dass auch hier das Th1-Th2-Modell nicht so absolut ist, wie früher angenommen wurde: T-Helferzellen sind in der Lage, Th1- und Th2-typische Zytokine synchron zu produzieren.

Wir untersuchten in der vorliegenden Arbeit die Koexpression von IL2 und IL10 sowie die Koexpression von IL4 und IFN γ durch CD4+ T-Zellen.

Die Expression von IL10, das nicht als rein Th2-typisches Zytokin betrachtet werden kann^{140, 159}, durch Th1- und Th2-Zellen, ist in-vitro unter anderem abhängig von der Stimulationsdauer: eine Arbeit an murinen T-Zellen ergab, dass bei Aktivierung der Zellen eine zeitabhängige Kinetik der Zytokinproduktion besteht und Th1-Th2 Zytokine nicht grundsätzlich von verschiedenen T-Helferzellen produziert werden, sondern sequentiell von den gleichen Zellen. Nach eintägiger in-vitro Stimulation mit SEB wurden IL2-produzierende Zellen isoliert und weitere 24h in gleicher Weise stimuliert. Daraufhin konnte auch bei diesen vermeintlichen Th1-Zellen IL10-Produktion nachgewiesen werden. Analog wurden nach zwei Tagen IFN γ -produzierende Zellen isoliert und weitere 24h stimuliert, was ebenfalls zu IL10-Produktion führte¹⁴⁴.

Während Arbeiten an murinen T-Zellen ergaben, dass sich die Produktion von IL4 und IFN γ gegenseitig ausschließt^{140, 158}, konnten wir bei unseren MS-Patienten eine solche Koexpression zeigen. Insbesondere CD4+ Gedächtniszellen waren für den Gesamtzeitraum betrachtet durchschnittlich zu 1,36% (SEM \pm 0,29) doppelt positiv, während dieser Anteil bei CD4+ Effektorzellen lediglich bei 0,46% (SEM \pm 0,06) und sogar nur 0,07% (SEM \pm 0,03) bei naiven CD4+ T-Zellen lag. Allerdings bewirkt TSO eine Abnahme der IL4/IFN γ doppeltpositiven Zellen. Dies könnte beispielsweise durch Induktion einer Differenzierung in Richtung Th1 oder Th2 durch TSO erklärt werden.

Im Gegensatz zu oben genannten Arbeiten liegen bereits Arbeiten vor, die diese Koproduktion unter speziellen definierten Bedingungen nachweisen¹⁶⁰. In einer Arbeit wird die Koexpression von IL4 und IFN γ bestätigt, aber gleichzeitig betont, dass diese unter den untersuchten koexprimierten Zytokinen am seltensten vorkommt¹⁵⁶.

Die Therapie mit TSO nahm keinen Einfluss auf die Häufigkeit einer solchen Koexpression.

V.3.5. Klinische Veränderungen unter TSO-Therapie und weitere Entwicklung

Die vier von uns mit TSO behandelten Patienten leiden unter sekundär progredienter MS. Diese Form der Erkrankung führt meist zu langsam kontinuierlicher Krankheitsprogression ohne einzelne abgrenzbare Schübe mit fast fehlender Reversibilität der neurologischen Defizite. Selten können sich aber auch zusätzlich einzelne Schübe einstellen. Die Behandlung ist in diesem Krankheitsstadium eher symptomatisch. Durch TSO-Therapie kann also in erster Linie eine Stabilisierung des neurologischen Befundes erwartet werden, auch bei positiver Wirkung ist nicht von größeren klinischen Verbesserungen auszugehen.

Wichtig wäre eine Untersuchung der Wirkung von TSO bei Patienten in früheren Krankheitsstadien. Aus ethischen Gründen ist dieses jedoch bislang nicht möglich, da die immunmodulatorische Wirksamkeit noch nicht als erwiesen angesehen werden kann und in früheren Krankheitsstadien schubprophylaktische bzw. immunsuppressive Therapien im Schub bei einem Teil der Patienten nachweislich effektiv und daher zu bevorzugen sind.

Die TSO-Therapie war bei drei von vier von uns untersuchten Patienten klinisch mit Stabilität und subjektivem Wohlbefinden verbunden. Die lediglich einmalig aufgetretenen Nebenwirkungen in Form von Diarrhö bei einem der Patienten, die in fraglichem Zusammenhang mit der TSO-Einnahme stehen, sprechen dafür, dass TSO nebenwirkungsarm und sicher in der Einnahme ist. Ergebnisse der bereits mehrfach erwähnten Allergiestudie ¹¹⁹, laut derer mindestens 83% der mit TSO behandelten Patienten unter gastrointestinalen Nebenwirkungen litten, lassen sich von uns nicht bestätigen. Ob dieser helminthische Parasit seinen Erwartungen an eine milde nebenwirkungsarme Immunmodulation gerecht wird, sollte in weiteren Untersuchungen mit höheren Teilnehmerzahlen getestet werden. Dabei wäre ein denkbares Studiendesign eine doppelblind placebokontrollierte Anwendung oder der Vergleich mit gesunden Probanden. Der Einsatz höherer Dosen an TSO und/oder häufigere Einnahmezeitpunkte wäre in diesem Rahmen von Interesse. Um den effektivsten Anwendungsmodus herauszufinden, sollte die Kinetik der TSO-Einnahme im Detail erforscht werden.

VI. Zusammenfassung

Autoimmunerkrankungen und Allergien zeigen in den vergangenen Jahrzehnten insbesondere in den hochentwickelten Ländern nördlicher Breitengrade eine unverhältnismäßige Prävalenzzunahme. Eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen liefert die Hygienehypothese. Dieser Theorie nach führt eine mangelnde Auseinandersetzung des Organismus mit pathogenen Keimen in Kindheit und Jugend zu einer Fehlregulierung des Immunsystems und Autoimmunität. Um die zugrundeliegenden Pathomechanismen zu erklären, wird unter anderem das Th1-Th2-Modell angeführt mit einer Dysbalance zwischen zwei reziprok regulierten Untergruppen von CD4+ T-Zellen: proinflammatorisch wirksame Th1-Lymphozyten (Produktion von IFN γ , IL2) und antiinflammatorisch wirksame Th2-Lymphozyten (IL4, IL10). Innerhalb der letzten Jahre wurden zahlreiche Daten gewonnen, die eine immunmodulierende Wirkung parasitärer Infektionen mit Th1-Th2-Shift bei Autoimmunerkrankungen beweisen, sowohl im Tierversuch als auch in der Anwendung am Menschen.

Eier des nicht humanpathogenen Helminthen *Trichuris suis* (*T. suis*) wurden beispielsweise bei Patienten, die unter chronisch entzündlichen Darmerkrankungen leiden, erfolgreich und nebenwirkungsarm eingesetzt. Mehrere Veröffentlichungen berichten über erfolgreichen Einsatz von Parasiten, z. B. *Schistosoma mansoni*, an Mäusen mit Experimenteller Autoimmun-Enzephalitis.

Von diesen vielversprechenden Daten ausgehend wurde in der vorliegenden Arbeit erstmalig die immunmodulatorische Wirkung von *T. suis* ova (TSO) bei Patienten mit Sekundär progressiver Multipler Sklerose analysiert. Vier Patienten nahmen im Rahmen eines individuellen Heilver Versuches über 6 Monate in 2-wöchentlichen Abständen 2500 TSO per os ein. Zu acht vorher definierten Zeitpunkten wurde die Entwicklung unter Therapie analysiert.

In einer breit angelegten Screening-Untersuchung wurden alle peripheren Immunzellen über den gesamten Therapieverlauf und darüber hinaus kontrolliert. Hierbei wurde insbesondere untersucht, ob es unter Einnahme von *T. suis* ova zu einem Th1-Th2-Shift von CD4+ T-Helferzellen kommt, ob sich die qualitative und quantitative Zusammensetzung der T-Zellen verändert und ob Zellen der spezifischen und unspezifischen Immunität sowie Serum-Immunglobuline Veränderungen zeigen. Parallel wurden CD56++ NK-Zellen untersucht, denen immunmodulatorische Eigenschaften zugeschrieben werden. Des Weiteren wurden allgemeine

hämatologische Parameter, Leber- und Nierenwerte sowie das Auftreten klinischer Wirkungen und Nebenwirkungen regelmäßig kontrolliert.

Zur Untersuchung des Zytokinprofils von CD4⁺ T-Zellen wurden zwei verschiedene Methoden der in-vitro Stimulation von CD4⁺ T-Zellen angewandt. Erstens wurden diese im Vollblut mittels Superantigenen (Staphylococcal Enterotoxin A und B, Toxic Shock Syndrome Toxoid) plus CD28-AK stimuliert, zweitens MACS-selektiert, kurzzeitkultiviert und mittels PMA/Ionomycin stimuliert. Durchflusszytometrisch wurden daraufhin die Zytokinproduktion der CD4⁺ T-Helferzellen allgemein sowie in ihren Subgruppen erfasst. Zudem wurden quantitative und qualitative Änderungen der CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten, B-Lymphozyten NK-Zellen und Monozyten durchflusszytometrisch analysiert. Mittels ELISA erfolgte die Quantifizierung der Serum-Immunglobuline IgG inklusive Untergruppen und IgE.

Durchflusszytometrisch zeigte sich unter TSO-Einnahme ein leicht supprimierter Anteil der IL2 und insbesondere IFN γ -produzierenden CD4⁺ T-Zellen, am niedrigsten nach zwei Monaten (in der Superantigen-Stimulation). Die Analyse der CD4⁺ T-Zell-Subgruppen konnte dieses Ergebnis nur teilweise reproduzieren. IL4-produzierende T-Zellen stiegen unter TSO leicht an, IL10-produzierende zeigten kaum Veränderungen. Ein ausgeprägter Th1-Th2-Shift konnte also nicht nachgewiesen werden. Das Verhältnis der jeweils produzierten Zytokine (am stärksten IL2, am geringsten IL10) blieb unter TSO-Therapie konstant. CD4⁺, insbesondere naive, und CD8⁺ T-Zellen erreichten nach 2 Monaten Therapie die niedrigsten Werte im gesamten Zeitraum. Eosinophile, IgE und IgG4 als parasitentypische Parameter zeigten ebenso wie der Anteil der CD56⁺⁺ NK-Zellen teilweise einen moderaten Anstieg. Andere immunologische Parameter, rotes Blutbild sowie Leber- und Nierenwerte blieben unverändert. Klinisch konnte bei drei von vier Patienten eine Stabilisierung ohne Krankheitsprogredienz, verbunden mit subjektiv erhöhtem Wohlbefinden bei fehlenden Nebenwirkungen beobachtet werden. Ein Patient zeigte im Untersuchungszeitraum eine leichte Progredienz der MS.

Die Ergebnisse sprechen für einen milden immunmodulatorischen Effekt von TSO mit einer partiellen Th1-Suppression bei nebenwirkungsarmer und sicherer Einnahme.

VII. Literaturverzeichnis

1. Sospedra M, Martin R. Immunology of multiple sclerosis. *Annu Rev Immunol* 2005;23:683-747.
2. Hein T, Hopfenmuller W. [Projection of the number of multiple sclerosis patients in Germany]. *Nervenarzt* 2000;71(4):288-94.
3. Hufschmidt A LC. *Neurologie compact*. Stuttgart; 2003.
4. Kremenutzky M, Cottrell D, Rice G, et al. The natural history of multiple sclerosis: a geographically based study. 7. Progressive-relapsing and relapsing-progressive multiple sclerosis: a re-evaluation. *Brain* 1999;122 (Pt 10):1941-50.
5. Inglese M, Ge Y, Filippi M, Falini A, Grossman RI, Gonen O. Indirect evidence for early widespread gray matter involvement in relapsing-remitting multiple sclerosis. *Neuroimage* 2004;21(4):1825-9.
6. Peterson JW, Bo L, Mork S, Chang A, Trapp BD. Transected neurites, apoptotic neurons, and reduced inflammation in cortical multiple sclerosis lesions. *Ann Neurol* 2001;50(3):389-400.
7. de Vos AF, van Meurs M, Brok HP, et al. Transfer of central nervous system autoantigens and presentation in secondary lymphoid organs. *J Immunol* 2002;169(10):5415-23.
8. Talbot PJ, Paquette JS, Ciurli C, Antel JP, Ouellet F. Myelin basic protein and human coronavirus 229E cross-reactive T cells in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 1996;39(2):233-40.
9. Wucherpfennig KW, Strominger JL. Molecular mimicry in T cell-mediated autoimmunity: viral peptides activate human T cell clones specific for myelin basic protein. *Cell* 1995;80(5):695-705.
10. Jacobsen M, Cepok S, Quak E, et al. Oligoclonal expansion of memory CD8+ T cells in cerebrospinal fluid from multiple sclerosis patients. *Brain* 2002;125(Pt 3):538-50.
11. Hickey WF. Migration of hematogenous cells through the blood-brain barrier and the initiation of CNS inflammation. *Brain Pathol* 1991;1(2):97-105.
12. Gilbert JJ, Sadler M. Unsuspected multiple sclerosis. *Arch Neurol* 1983;40(9):533-6.
13. Lucchinetti CF, Bruck W, Rodriguez M, Lassmann H. Distinct patterns of multiple sclerosis pathology indicates heterogeneity on pathogenesis. *Brain Pathol* 1996;6(3):259-74.
14. Lucchinetti C, Bruck W, Parisi J, Scheithauer B, Rodriguez M, Lassmann H. Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination. *Ann Neurol* 2000;47(6):707-17.
15. Steck A HH, Kieseier BC. *Demyelinisierende Erkrankungen*. Darmstadt: Steinkopf Verlag; 2003.
16. Giovannoni G. Multiple sclerosis related fatigue. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2006;77(1):2-3.
17. Barnett R. Fatigue. *Lancet* 2005;366(9479):21.
18. Dean G. Annual incidence, prevalence, and mortality of multiple sclerosis in white South-African-born and in white immigrants to South Africa. *Br Med J* 1967;2(5554):724-30.
19. Compston A. Risk factors for multiple sclerosis: race or place? *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1990;53(10):821-3.
20. Dean G. How many people in the world have multiple sclerosis? *Neuroepidemiology* 1994;13(1-2):1-7.

21. Ebers GC, Sadovnick AD. The geographic distribution of multiple sclerosis: a review. *Neuroepidemiology* 1993;12(1):1-5.
22. Hammond SR, English D, de Wyt C, et al. The clinical profile of MS in Australia: a comparison between medium- and high-frequency prevalence zones. *Neurology* 1988;38(6):980-6.
23. Skegg DC, Corwin PA, Craven RS, Malloch JA, Pollock M. Occurrence of multiple sclerosis in the north and south of New Zealand. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1987;50(2):134-9.
24. Haines JL, Bradford Y, Garcia ME, et al. Multiple susceptibility loci for multiple sclerosis. *Hum Mol Genet* 2002;11(19):2251-6.
25. Haines JL, Terwedow HA, Burgess K, et al. Linkage of the MHC to familial multiple sclerosis suggests genetic heterogeneity. The Multiple Sclerosis Genetics Group. *Hum Mol Genet* 1998;7(8):1229-34.
26. Dyment DA, Ebers GC, Sadovnick AD. Genetics of multiple sclerosis. *Lancet Neurol* 2004;3(2):104-10.
27. Moreau T, Brunot S, Couvreur G, Fromont A. [Pregnancy and multiple sclerosis]. *Presse Med* 2010;39(3):389-94.
28. Vukusic S, Hutchinson M, Hours M, et al. Pregnancy and multiple sclerosis (the PRIMS study): clinical predictors of post-partum relapse. *Brain* 2004;127(Pt 6):1353-60.
29. Zorgdrager A, De Keyser J. The premenstrual period and exacerbations in multiple sclerosis. *Eur Neurol* 2002;48(4):204-6.
30. Holmqvist P, Hammar M, Landtblom AM, Brynhildsen J. Symptoms of multiple sclerosis in women in relation to cyclical hormone changes. *Eur J Contracept Reprod Health Care* 2009;14(5):365-70.
31. Wandinger K, Jabs W, Siekhaus A, et al. Association between clinical disease activity and Epstein-Barr virus reactivation in MS. *Neurology* 2000;55(2):178-84.
32. Cepok S, Zhou D, Srivastava R, et al. Identification of Epstein-Barr virus proteins as putative targets of the immune response in multiple sclerosis. *J Clin Invest* 2005;115(5):1352-60.
33. Haahr S, Plesner AM, Vestergaard BF, Hollsborg P. A role of late Epstein-Barr virus infection in multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand* 2004;109(4):270-5.
34. Clark D. Human herpesvirus type 6 and multiple sclerosis. *Herpes* 2004;11 Suppl 2:112A-9A.
35. Soldan SS, Jacobson S. Role of viruses in etiology and pathogenesis of multiple sclerosis. *Adv Virus Res* 2001;56:517-55.
36. Pohl D. Epstein-Barr virus and multiple sclerosis. *J Neurol Sci* 2009;286(1-2):62-4.
37. Casetta I, Granieri E. Clinical infections and multiple sclerosis: contribution from analytical epidemiology. *J Neurovirol* 2000;6 Suppl 2:S147-51.
38. Olson JK, Croxford JL, Calenoff MA, Dal Canto MC, Miller SD. A virus-induced molecular mimicry model of multiple sclerosis. *J Clin Invest* 2001;108(2):311-8.
39. Martin R, Jaraquemada D, Flerlage M, et al. Fine specificity and HLA restriction of myelin basic protein-specific cytotoxic T cell lines from multiple sclerosis patients and healthy individuals. *J Immunol* 1990;145(2):540-8.
40. Orbach H, Agmon-Levin N, Zandman-Goddard G. Vaccines and autoimmune diseases of the adult. *Discov Med*;9(45):90-7.
41. Beretich BD, Beretich TM. Explaining multiple sclerosis prevalence by ultraviolet exposure: a geospatial analysis. *Mult Scler* 2009;15(8):891-8.

42. Beer S, Kesselring J. High prevalence of multiple sclerosis in Switzerland. *Neuroepidemiology* 1994;13(1-2):14-8.
43. Granieri E, Rosati G, Tola R, et al. The frequency of multiple sclerosis in Mediterranean Europe. An incidence and prevalence study in Barbagia, Sardinia, insular Italy. *Acta Neurol Scand* 1983;68(2):84-9.
44. Dean G, Kurtzke JF. On the risk of multiple sclerosis according to age at immigration to South Africa. *Br Med J* 1971;3(5777):725-9.
45. Hammond SR, English DR, McLeod JG. The age-range of risk of developing multiple sclerosis: evidence from a migrant population in Australia. *Brain* 2000;123 (Pt 5):968-74.
46. Pugliatti M, Sotgiu S, Rosati G. The worldwide prevalence of multiple sclerosis. *Clin Neurol Neurosurg* 2002;104(3):182-91.
47. Bach JF. The effect of infections on susceptibility to autoimmune and allergic diseases. *N Engl J Med* 2002;347(12):911-20.
48. Gale EA. The rise of childhood type 1 diabetes in the 20th century. *Diabetes* 2002;51(12):3353-61.
49. Kurtzke JF. Multiple sclerosis in time and space--geographic clues to cause. *J Neurovirol* 2000;6 Suppl 2:S134-40.
50. Elliott DE, Urban JJ, Argo CK, Weinstock JV. Does the failure to acquire helminthic parasites predispose to Crohn's disease? *Faseb J* 2000;14(12):1848-55.
51. Elliott DE, Summers RW, Weinstock JV. Helminths as governors of immune-mediated inflammation. *Int J Parasitol* 2007;37(5):457-64.
52. Zaccane P, Fehervari Z, Phillips JM, Dunne DW, Cooke A. Parasitic worms and inflammatory diseases. *Parasite Immunol* 2006;28(10):515-23.
53. Strachan DP. Hay fever, hygiene, and household size. *Bmj* 1989;299(6710):1259-60.
54. Rook GA. Review series on helminths, immune modulation and the hygiene hypothesis: the broader implications of the hygiene hypothesis. *Immunology* 2009;126(1):3-11.
55. Dunne DW, Cooke A. A worm's eye view of the immune system: consequences for evolution of human autoimmune disease. *Nat Rev Immunol* 2005;5(5):420-6.
56. Jackson JA, Friberg IM, Little S, Bradley JE. Review series on helminths, immune modulation and the hygiene hypothesis: immunity against helminths and immunological phenomena in modern human populations: coevolutionary legacies? *Immunology* 2009;126(1):18-27.
57. Leibowitz U, Antonovsky A, Medalie JM, Smith HA, Halpern L, Alter M. Epidemiological study of multiple sclerosis in Israel. II. Multiple sclerosis and level of sanitation. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1966;29(1):60-8.
58. Maizels RM, Balic A, Gomez-Escobar N, Nair M, Taylor MD, Allen JE. Helminth parasites--masters of regulation. *Immunol Rev* 2004;201:89-116.
59. Yazdanbakhsh M, Kremsner PG, van Ree R. Allergy, parasites, and the hygiene hypothesis. *Science* 2002;296(5567):490-4.
60. Weiss ST. Eat dirt--the hygiene hypothesis and allergic diseases. *N Engl J Med* 2002;347(12):930-1.
61. Schnoeller C, Rausch S, Pillai S, et al. A helminth immunomodulator reduces allergic and inflammatory responses by induction of IL-10-producing macrophages. *J Immunol* 2008;180(6):4265-72.
62. Ma A, Xiong Z, Hu Y, et al. Dysfunction of IL-10-producing type 1 regulatory T cells and CD4(+)CD25(+) regulatory T cells in a mimic model of human multiple sclerosis in Cynomolgus monkeys. *Int Immunopharmacol* 2009;9(5):599-608.

63. Yang Z, Chen M, Wu R, et al. Suppression of autoimmune diabetes by viral IL-10 gene transfer. *J Immunol* 2002;168(12):6479-85.
64. Lynch NR, Hagel I, Perez M, Di Prisco MC, Lopez R, Alvarez N. Effect of anthelmintic treatment on the allergic reactivity of children in a tropical slum. *J Allergy Clin Immunol* 1993;92(3):404-11.
65. Elliott DE, Li J, Blum A, et al. Exposure to schistosome eggs protects mice from TNBS-induced colitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003;284(3):G385-91.
66. Summers RW, Elliott DE, Urban JF, Jr., Thompson R, Weinstock JV. *Trichuris suis* therapy in Crohn's disease. *Gut* 2005;54(1):87-90.
67. Summers RW, Elliott DE, Urban JF, Jr., Thompson RA, Weinstock JV. *Trichuris suis* therapy for active ulcerative colitis: a randomized controlled trial. *Gastroenterology* 2005;128(4):825-32.
68. Summers RW, Elliott DE, Qadir K, Urban JF, Jr., Thompson R, Weinstock JV. *Trichuris suis* seems to be safe and possibly effective in the treatment of inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 2003;98(9):2034-41.
69. van den Biggelaar AH, van Ree R, Rodrigues LC, et al. Decreased atopy in children infected with *Schistosoma haematobium*: a role for parasite-induced interleukin-10. *Lancet* 2000;356(9243):1723-7.
70. van den Biggelaar AH, Rodrigues LC, van Ree R, et al. Long-term treatment of intestinal helminths increases mite skin-test reactivity in Gabonese schoolchildren. *J Infect Dis* 2004;189(5):892-900.
71. Flohr C, Tuyen LN, Lewis S, et al. Low efficacy of mebendazole against hookworm in Vietnam: two randomized controlled trials. *Am J Trop Med Hyg* 2007;76(4):732-6.
72. Zaccane P, Fehervari Z, Jones FM, et al. *Schistosoma mansoni* antigens modulate the activity of the innate immune response and prevent onset of type 1 diabetes. *Eur J Immunol* 2003;33(5):1439-49.
73. Harnett W. Parasite modulation of the immune response. *Parasite Immunol* 2005;27(10-11):357-9.
74. Fleming J, Fabry Z. The hygiene hypothesis and multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2007;61(2):85-9.
75. Fleming JO, Cook TD. Multiple sclerosis and the hygiene hypothesis. *Neurology* 2006;67(11):2085-6.
76. Harnett W, Harnett MM. Molecular basis of worm-induced immunomodulation. *Parasite Immunol* 2006;28(10):535-43.
77. Schubert C. The worm has turned. *Nat Med* 2004;10(12):1271-2.
78. Hunter MM, McKay DM. Review article: helminths as therapeutic agents for inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2004;19(2):167-77.
79. La Flamme AC, Canagasabay K, Harvie M, Backstrom BT. Schistosomiasis protects against multiple sclerosis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2004;99(5 Suppl 1):33-6.
80. La Flamme AC, Ruddenklau K, Backstrom BT. Schistosomiasis decreases central nervous system inflammation and alters the progression of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Infect Immun* 2003;71(9):4996-5004.
81. Sewell D, Qing Z, Reinke E, et al. Immunomodulation of experimental autoimmune encephalomyelitis by helminth ova immunization. *Int Immunol* 2003;15(1):59-69.
82. Walsh KP, Brady MT, Finlay CM, Boon L, Mills KH. Infection with a helminth parasite attenuates autoimmunity through TGF-beta-mediated suppression of Th17 and Th1 responses. *J Immunol* 2009;183(3):1577-86.

83. Zheng X, Hu X, Zhou G, et al. Soluble egg antigen from *Schistosoma japonicum* modulates the progression of chronic progressive experimental autoimmune encephalomyelitis via Th2-shift response. *J Neuroimmunol* 2008;194(1-2):107-14.
84. Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 1986;136(7):2348-57.
85. Abbas AK, Murphy KM, Sher A. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* 1996;383(6603):787-93.
86. Janeway C, Travers P, Walport M, Shlomchik M. *Immunobiology*. 6th ed. New York: Garland Science Publishing; 2005.
87. Kidd P. Th1/Th2 balance: the hypothesis, its limitations, and implications for health and disease. *Altern Med Rev* 2003;8(3):223-46.
88. Seder RA, Paul WE. Acquisition of lymphokine-producing phenotype by CD4+ T cells. *Annu Rev Immunol* 1994;12:635-73.
89. Hesse M, Piccirillo CA, Belkaid Y, et al. The pathogenesis of schistosomiasis is controlled by cooperating IL-10-producing innate effector and regulatory T cells. *J Immunol* 2004;172(5):3157-66.
90. Fiorentino DF, Zlotnik A, Vieira P, et al. IL-10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cells. *J Immunol* 1991;146(10):3444-51.
91. Gajewski TF, Fitch FW. Differential activation of murine TH1 and TH2 clones. *Res Immunol* 1991;142(1):19-23.
92. Gajewski TF, Fitch FW. Anti-proliferative effect of IFN-gamma in immune regulation. I. IFN-gamma inhibits the proliferation of Th2 but not Th1 murine helper T lymphocyte clones. *J Immunol* 1988;140(12):4245-52.
93. Infante-Duarte C, Kamradt T. Th1/Th2 balance in infection. *Springer Semin Immunopathol* 1999;21(3):317-38.
94. Correale J, Farez M. Association between parasite infection and immune responses in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2007;61(2):97-108.
95. Sewell DL, Reinke EK, Hogan LH, Sandor M, Fabry Z. Immunoregulation of CNS autoimmunity by helminth and mycobacterial infections. *Immunol Lett* 2002;82(1-2):101-10.
96. Schierack P, Lucius R, Sonnenburg B, Schilling K, Hartmann S. Parasite-specific immunomodulatory functions of filarial cystatin. *Infect Immun* 2003;71(5):2422-9.
97. Summers RW, Elliott DE, Weinstock JV. Why *Trichuris suis* should prove safe for use in inflammatory bowel diseases. *Inflamm Bowel Dis* 2005;11(8):783-4.
98. Summers RW, Elliott DE, Weinstock JV. Therapeutic colonization with *Trichuris suis*. *Arch Pathol Lab Med* 2006;130(12):1753; author reply -4.
99. Fleming. P 07.141. In: AAN 2009; 2009; Seattle, US; 2009.
100. Bager P, Arnved J, Ronborg S, et al. *Trichuris suis* ova therapy for allergic rhinitis: a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *J Allergy Clin Immunol*;125(1):123-30 e1-3.
101. Sague SL, Tato C, Pure E, Hunter CA. The regulation and activation of CD44 by natural killer (NK) cells and its role in the production of IFN-gamma. *J Interferon Cytokine Res* 2004;24(5):301-9.
102. Poli A, Michel T, Theresine M, Andres E, Hentges F, Zimmer J. CD56bright natural killer (NK) cells: an important NK cell subset. *Immunology* 2009;126(4):458-65.
103. Zhang B, Yamamura T, Kondo T, Fujiwara M, Tabira T. Regulation of experimental autoimmune encephalomyelitis by natural killer (NK) cells. *J Exp Med* 1997;186(10):1677-87.

104. Xu W, Fazekas G, Hara H, Tabira T. Mechanism of natural killer (NK) cell regulatory role in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* 2005;163(1-2):24-30.
105. Lunemann A, Lunemann JD, Munz C. Regulatory NK-cell functions in inflammation and autoimmunity. *Mol Med* 2009;15(9-10):352-8.
106. Bielekova B, Catalfamo M, Reichert-Scriver S, et al. Regulatory CD56(bright) natural killer cells mediate immunomodulatory effects of IL-2/alpha-targeted therapy (daclizumab) in multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103(15):5941-6.
107. Li Z, Lim WK, Mahesh SP, Liu B, Nussenblatt RB. Cutting edge: in vivo blockade of human IL-2 receptor induces expansion of CD56(bright) regulatory NK cells in patients with active uveitis. *J Immunol* 2005;174(9):5187-91.
108. Saraste M, Irljala H, Airas L. Expansion of CD56Bright natural killer cells in the peripheral blood of multiple sclerosis patients treated with interferon-beta. *Neurol Sci* 2007;28(3):121-6.
109. EUROIMMUN Medizinische Labordiagnostika AG, inventor Mikrotiter-ELISA Testsätze EV 3840-9601 E; EV 2841-9601 G; http://www.euroimmun.de/index.php?id=elisa_beschreibung&L=0; http://www.euroimmun.de/index.php?id=elisa_inkubation&L=0 2008.
110. BDBiosciences, inventor BD FACSCalibur flow cytometer; http://www.bdbiosciences.com/documents/facscalibur_brochure.pdf. 2009.
111. Loenen WA. CD27 and (TNFR) relatives in the immune system: their role in health and disease. *Semin Immunol* 1998;10(6):417-22.
112. Hintzen RQ, de Jong R, Lens SM, Brouwer M, Baars P, van Lier RA. Regulation of CD27 expression on subsets of mature T-lymphocytes. *J Immunol* 1993;151(5):2426-35.
113. Baars PA, Maurice MM, Rep M, Hooibrink B, van Lier RA. Heterogeneity of the circulating human CD4+ T cell population. Further evidence that the CD4+CD45RA-CD27- T cell subset contains specialized primed T cells. *J Immunol* 1995;154(1):17-25.
114. Hamann D, Baars PA, Rep MH, et al. Phenotypic and functional separation of memory and effector human CD8+ T cells. *J Exp Med* 1997;186(9):1407-18.
115. Misumi Y, Misumi Y, Miki K, Takatsuki A, Tamura G, Ikehara Y. Novel blockade by brefeldin A of intracellular transport of secretory proteins in cultured rat hepatocytes. *J Biol Chem* 1986;261(24):11398-403.
116. Biochrom AG, inventor Biocoll Separating solution, density 1.077 g/ml, isotone; http://search.cosmobio.co.jp/cosmo_search_p/search_gate2/docs/BCR_/L6155.20090401.pdf. 2008.
117. Miltenyi S, inventor Miltenyi Biotec CD 4 human, Order no. 130-045-101; http://www.miltenyibiotec.com/download/datasheets_en/20/MiltenyiBiotec_DataSheet_CD4-MicroBeads,-human_130-045-101.pdf. Germany. 1999 - 2011.
118. Chatila T, Silverman L, Miller R, Geha R. Mechanisms of T cell activation by the calcium ionophore ionomycin. *J Immunol* 1989;143(4):1283-9.
119. Bager P, Arnved J, Ronborg S, et al. Trichuris suis ova therapy for allergic rhinitis: a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *J Allergy Clin Immunol* 2010;125(1):123-30 e1-3.
120. Kradin RL, Badizadegan K, Auluck P, Korzenik J, Lauwers GY. Iatrogenic Trichuris suis infection in a patient with Crohn disease. *Arch Pathol Lab Med* 2006;130(5):718-20.
121. Hartmann S, Lucius R. Modulation of host immune responses by nematode cystatins. *Int J Parasitol* 2003;33(11):1291-302.
122. Schonemeyer A, Lucius R, Sonnenburg B, et al. Modulation of human T cell responses and macrophage functions by onchocystatin, a secreted protein of the filarial nematode *Onchocerca volvulus*. *J Immunol* 2001;167(6):3207-15.

123. Harnett W, Harnett MM. Helminth-derived immunomodulators: can understanding the worm produce the pill? *Nat Rev Immunol* 2010;10(4):278-84.
124. Hartmann S, Schonemeyer A, Sonnenburg B, Vray B, Lucius R. Cystatins of filarial nematodes up-regulate the nitric oxide production of interferon-gamma-activated murine macrophages. *Parasite Immunol* 2002;24(5):253-62.
125. Altmann DM. Review series on helminths, immune modulation and the hygiene hypothesis: nematode coevolution with adaptive immunity, regulatory networks and the growth of inflammatory diseases. *Immunology* 2009;126(1):1-2.
126. Afzali B, Lombardi G, Lechler RI, Lord GM. The role of T helper 17 (Th17) and regulatory T cells (Treg) in human organ transplantation and autoimmune disease. *Clin Exp Immunol* 2007;148(1):32-46.
127. Fietta P, Delsante G. The effector T helper cell triade. *Riv Biol* 2009;102(1):61-74.
128. Mitchell P, Afzali B, Lombardi G, Lechler RI. The T helper 17-regulatory T cell axis in transplant rejection and tolerance. *Curr Opin Organ Transplant* 2009;14(4):326-31.
129. Sonobe Y, Jin S, Wang J, et al. Chronological changes of CD4(+) and CD8(+) T cell subsets in the experimental autoimmune encephalomyelitis, a mouse model of multiple sclerosis. *Tohoku J Exp Med* 2007;213(4):329-39.
130. Racke MK. Immunopathogenesis of multiple sclerosis. *Ann Indian Acad Neurol* 2009;12(4):215-20.
131. Edwards LJ, Robins RA, Constantinescu CS. Th17/Th1 phenotype in demyelinating disease. *Cytokine* 2010;50(1):19-23.
132. Del Prete G, De Carli M, Almerigogna F, Giudizi MG, Biagiotti R, Romagnani S. Human IL-10 is produced by both type 1 helper (Th1) and type 2 helper (Th2) T cell clones and inhibits their antigen-specific proliferation and cytokine production. *J Immunol* 1993;150(2):353-60.
133. Zhu J, Paul WE. Heterogeneity and plasticity of T helper cells. *Cell Res* 2010;20(1):4-12.
134. Wilson MS, Taylor MD, Balic A, Finney CA, Lamb JR, Maizels RM. Suppression of allergic airway inflammation by helminth-induced regulatory T cells. *J Exp Med* 2005;202(9):1199-212.
135. McKee AS, Pearce EJ. CD25+CD4+ cells contribute to Th2 polarization during helminth infection by suppressing Th1 response development. *J Immunol* 2004;173(2):1224-31.
136. Baumgart M, Tompkins F, Leng J, Hesse M. Naturally occurring CD4+Foxp3+ regulatory T cells are an essential, IL-10-independent part of the immunoregulatory network in *Schistosoma mansoni* egg-induced inflammation. *J Immunol* 2006;176(9):5374-87.
137. Figueiredo AS, Hofer T, Klotz C, et al. Modelling and simulating interleukin-10 production and regulation by macrophages after stimulation with an immunomodulator of parasitic nematodes. *Febs J* 2009;276(13):3454-69.
138. Sotgiu S, Pugliatti M, Sotgiu A, Sanna A, Rosati G. Does the "hygiene hypothesis" provide an explanation for the high prevalence of multiple sclerosis in Sardinia? *Autoimmunity* 2003;36(5):257-60.
139. Cameron SB, Nawijn MC, Kum WW, Savelkoul HF, Chow AW. Regulation of helper T cell responses to staphylococcal superantigens. *Eur Cytokine Netw* 2001;12(2):210-22.
140. Assenmacher M, Schmitz J, Radbruch A. Flow cytometric determination of cytokines in activated murine T helper lymphocytes: expression of interleukin-10 in interferon-gamma and in interleukin-4-expressing cells. *Eur J Immunol* 1994;24(5):1097-101.
141. Schmitz J, Assenmacher M, Radbruch A. Regulation of T helper cell cytokine expression: functional dichotomy of antigen-presenting cells. *Eur J Immunol* 1993;23(1):191-9.

142. Cardell S, Hoiden I, Moller G. Manipulation of the superantigen-induced lymphokine response. Selective induction of interleukin-10 or interferon-gamma synthesis in small resting CD4+ T cells. *Eur J Immunol* 1993;23(2):523-9.
143. Gehring S, Schlaak M, van der Bosch J. A new in vitro model for studying human T cell differentiation: T(H1)/T(H2) induction following activation by superantigens. *J Immunol Methods* 1998;219(1-2):85-98.
144. Assenmacher M, Lohning M, Scheffold A, Manz RA, Schmitz J, Radbruch A. Sequential production of IL-2, IFN-gamma and IL-10 by individual staphylococcal enterotoxin B-activated T helper lymphocytes. *Eur J Immunol* 1998;28(5):1534-43.
145. Brandt K, van der Bosch J, Fliegert R, Gehring S. TSST-1 induces Th1 or Th2 differentiation in naive CD4+ T cells in a dose- and APC-dependent manner. *Scand J Immunol* 2002;56(6):572-9.
146. Smits HH, Hammad H, van Nimwegen M, et al. Protective effect of *Schistosoma mansoni* infection on allergic airway inflammation depends on the intensity and chronicity of infection. *J Allergy Clin Immunol* 2007;120(4):932-40.
147. Smits HH, Everts B, Hartgers FC, Yazdanbakhsh M. Chronic helminth infections protect against allergic diseases by active regulatory processes. *Curr Allergy Asthma Rep* 2010;10(1):3-12.
148. Cooper PJ, Chico ME, Vaca MG, et al. Effect of albendazole treatments on the prevalence of atopy in children living in communities endemic for geohelminth parasites: a cluster-randomised trial. *Lancet* 2006;367(9522):1598-603.
149. Brando B, Barnett D, Janossy G, et al. Cytofluorometric methods for assessing absolute numbers of cell subsets in blood. European Working Group on Clinical Cell Analysis. *Cytometry* 2000;42(6):327-46.
150. Higgins J, Hill V, Lau K, et al. Evaluation of a single-platform technology for lymphocyte immunophenotyping. *Clin Vaccine Immunol* 2007;14(10):1342-8.
151. Li X, Ymeti A, Lunter B, et al. CD4+ T lymphocytes enumeration by an easy-to-use single platform image cytometer for HIV monitoring in resource-constrained settings. *Cytometry B Clin Cytom* 2007;72(5):397-407.
152. Scolozzi R, Boccafogli A, Tola MR, et al. T-cell phenotypic profiles in the cerebrospinal fluid and peripheral blood of multiple sclerosis patients. *J Neurol Sci* 1992;108(1):93-8.
153. Frequin ST, Lamers KJ, Borm GF, Barkhof F, Jongen PJ, Hommes OR. T-cell subsets in the cerebrospinal fluid and peripheral blood of multiple sclerosis patients treated with high-dose intravenous methylprednisolone. *Acta Neurol Scand* 1993;88(2):80-6.
154. De Jong R, Brouwer M, Hooibrink B, Van der Pouw-Kraan T, Miedema F, Van Lier RA. The CD27- subset of peripheral blood memory CD4+ lymphocytes contains functionally differentiated T lymphocytes that develop by persistent antigenic stimulation in vivo. *Eur J Immunol* 1992;22(4):993-9.
155. Zippelius A, Bioley G, Le Gal FA, et al. Human thymus exports naive CD8 T cells that can home to nonlymphoid tissues. *J Immunol* 2004;172(5):2773-7.
156. Bucy RP, Karr L, Huang GQ, et al. Single cell analysis of cytokine gene coexpression during CD4+ T-cell phenotype development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92(16):7565-9.
157. Nguyen LT, Ramanathan M, Munschauer F, et al. Flow cytometric analysis of in vitro proinflammatory cytokine secretion in peripheral blood from multiple sclerosis patients. *J Clin Immunol* 1999;19(3):179-85.
158. Assenmacher M, Lohning M, Scheffold A, et al. Commitment of individual Th1-like lymphocytes to expression of IFN-gamma versus IL-4 and IL-10: selective induction of IL-10 by sequential stimulation of naive Th cells with IL-12 and IL-4. *J Immunol* 1998;161(6):2825-32.

159. Sornasse T, Larenas PV, Davis KA, de Vries JE, Yssel H. Differentiation and stability of T helper 1 and 2 cells derived from naive human neonatal CD4+ T cells, analyzed at the single-cell level. *J Exp Med* 1996;184(2):473-83.
160. Openshaw P, Murphy EE, Hosken NA, et al. Heterogeneity of intracellular cytokine synthesis at the single-cell level in polarized T helper 1 and T helper 2 populations. *J Exp Med* 1995;182(5):1357-67.

Publikation

1. Benzel F, Erdur H, Kohler S, Frentsch M, Thiel A, Harms L, Wandinger KP, Rosche B.

Immune monitoring of *Trichuris suis* egg therapy in multiple sclerosis patients.

J Helminthol. 2011 Aug 15:1-9. [Epub ahead of print]

Erklärung

„Ich, Friderike Joëlle Benzel, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: "Immunmodulation bei Multipler Sklerose durch *Trichuris suis ova*" selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum

Unterschrift

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. med. Lutz Harms für die Übernahme der Betreuung als Doktorvater und die kritische Begutachtung der Dissertationsschrift. Herrn Privatdozenten Dr. med. Klaus-Peter Wandinger danke ich für die initiale Betreuung und die durch ihn ermöglichte Unterstützung der Firma Euroimmun. Ein großes Dankeschön möchte ich meiner wissenschaftlichen Betreuerin Dr. med. Berit Rosche aussprechen für die Überlassung des Themas, die gute Betreuung und die kollegiale Zusammenarbeit. Meinem Arbeitsgruppenkollegen Hebung Erdur danke ich für die Hilfe bei den ersten Schritten im Labor.

Bei Dr. rer. nat. Sebastian Rausch möchte ich mich ganz besonders für die Beratung in parasitologischen Fragen sowie für die mir unersetzliche Unterstützung in allen Phasen der Arbeit bedanken. Dr. rer. medic. Anja Dahten danke ich ganz herzlich für die vielen Tipps zur praktischen Durchführung einer wissenschaftlichen Arbeit. Suzel Vuillaume gilt mein Dank für ihre Beratung in statistischen Fragen.

All meinen Freundinnen und Freunden, die hier namentlich unerwähnt bleiben, danke ich für ihre Unterstützung.

Nicht zuletzt und ohne große Worte gilt mein ganz besonderer Dank meinen Eltern.