

Aus der Klinik für Neurologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor Herr Univ.- Prof. Dr. H. P. Hartung

**Veränderungen des T-Zell-Rezeptor
Repertoires bei chronisch
inflammatorisch demyelinisierender
Polyradikuloneuropathie (CIDP) unter
der Therapie mit IVIg**

Dissertation

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Mareike Dorok
2018

Als Inauguraldissertation gedruckt mit der Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Prof. Dr. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. Bernd C. Kieseier

Zweitgutachter: PD Dr. Joerg Felsberg

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Mausberg, A.K., Dorok, M., Stettner, M., Müller, M., Hartung, H.P., Dehmel, T., Warnke, C., Meyer Zu Hörste, G., Kieseier, B.C., 2013. Recovery of the T-cell repertoire in CIDP by IV immunoglobulins. *Neurology* 80, 296–303.

Inhaltsverzeichnis

1. ZUSAMMENFASSUNG	1
1.1 Deutsche Version	1
1.2 Englische Version	2
2. EINLEITUNG	3
2.1 Das periphere Nervensystem	3
2.1.1 Myelinisierung der Nervenfasern	3
2.1.2 Blut-Nerven-Schranke	3
2.2 Inflammatorische Neuropathien	4
2.2.1 Guillain-Barré-Syndrom	5
2.2.2 Chronisch inflammatorisch demyelinisierende Polyneuropathie	5
2.2.3 Multifokale motorische Neuropathie	6
2.3 Therapiemöglichkeiten der CIDP	6
2.3.1 Wirkmechanismus von IVIg	7
2.3.2 Mögliche Wirkungen von IVIg auf T-Zellen	8
2.4 Prinzip der T-Zellaktivierung	9
2.4.1 Haupthistokompatibilitätskomplex	9
2.4.2 CD4 ⁺ - und CD8 ⁺ -Korezeptoren	10
2.4.3 T-Zell-Aktivierung und Differenzierung	10
2.4.4 Bedeutung von T-Zellen bei CIDP	11
2.5 Pathomechanismus der autoimmunen Neuropathie	12
2.5.1 Entstehung autoreaktiver T-Zellen	13
2.5.2 Immunreaktionen im peripheren Nerv	13
2.6 Entwicklung des T-Zell-Repertoires	14
2.6.1 Aufbau des T-Zell-Rezeptors	14
2.6.2 Somatische Rekombination	15
2.6.3 Differenzierungsstadien der T-Zellen im Thymus	16
2.6.4 Positive Selektion	18
2.6.5 Negative Selektion	19
2.6.6 Diversität des TCR-Repertoires	20
3. ZIELSETZUNG DER ARBEIT	22
4. METHODEN	23
4.1 Ethikvotum	23

4.2	Patientenkollektiv	23
4.3	Separierung von CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten	27
4.4	Gewinnung von RNA aus T-Lymphozyten.....	27
4.5	Photometrische Konzentrations- und Reinheitsbestimmung.....	28
4.6	Reverse Transkription	29
4.6.1	Amplifikation der CDR3-Region des TCR	29
4.7	Auswertungsstrategien	32
4.8	Analyse der Spectratyping Daten.....	34
4.9	Statistische Analyse	36
4.9.1	T-Test	36
5.	ERGEBNISSE	37
5.1	Spectratyping der Patientenkohorten	37
5.1.1	Spectratyping Profile der CD4 ⁺ Population	37
5.1.2	Spectratyping Profile der CD8 ⁺ Population	38
5.2	Statisische Analyse	40
5.2.1	CD4 ⁺ T-Zell-Population	40
5.2.2	CD8 ⁺ T-Zell-Population	41
5.3	Vergleich der einzelnen Vβ-Elemente	41
5.3.1	Spectratyping Profile der einzelnen V β -Elemente der CD4 ⁺ -Population	44
5.3.2	Spectratyping Profile der einzelnen V β -Elemente der CD8 ⁺ -Population	45
5.3.3	Vergleich der einzelnen V β -Elemente der CD4 ⁺ und CD8 ⁺ -Population	46
5.3.4	TCR Repertoire-Veränderungen ohne und unter IVIg-Therapie	47
5.3.5	Vergleich CD4 ⁺ mit CD8 ⁺ Repertoire einzelner CIDP-Patienten	48
5.3.6	TCR-Repertoire-Vergleich der einzelnen CIDP-Patienten mit der IVIg Gruppe	49
5.3.7	TCR-Repertoire-Vergleich der einzelnen CIDP-Patienten mit Kontroll- Probanden	50
5.4	Vergleich der TCR-Repertoire-Veränderungen in Bezug auf den klinischen Verlauf	50
5.4.1	Vergleich des CD4 ⁺ TCR-Repertoires von CIDP-Patienten in Bezug auf die Klinik	51
5.4.2	Vergleich des CD8 ⁺ TCR-Repertoires von CIDP-Patienten in Bezug auf die Klinik	52

5.4.3 Vergleich des CD4 ⁺ TCR-Repertoires unter IVIg Therapie im Bezug auf die Klinik	53
5.4.4 Vergleich des CD8 ⁺ TCR-Repertoires unter IVIg Therapie im Bezug auf die Klinik	53
5.4.5 Vergleich der CD4 ⁺ und CD8 ⁺ TCR-Repertoires bei klinischer Stabilität	54
5.5 Longitudinaler TCR-Repertoire-Vergleich zweier CIDP-Patienten ohne und unter IVIg	56
5.5.1 Patient 1	56
5.5.1.1 Vergleich CD4 ⁺ TCR-Repertoire mit und ohne IVIg-Gabe	57
5.5.1.1 Vergleich CD8 ⁺ TCR-Repertoire mit und ohne IVIg-Gabe	57
5.5.2 Patient 2	57
5.5.2.1 Vergleich CD4 ⁺ TCR-Repertoire mit und ohne IVIg-Gabe	58
5.5.2.1 Vergleich CD8 ⁺ TCR-Repertoire mit und ohne IVIg-Gabe	58
6. DISKUSSION	60
6.1 Kritische Bewertung des CDR3-Spectratypings	60
6.2 Bewertung der Ergebnisse	60
6.2.1 Einfluss von IVIg auf das TCR-Repertoire	60
6.2.2 Angleichung des TCR-Repertoires bei CIDP-Patienten an das von Kontroll- Probanden unter IVIg-Therapie	62
6.2.3 Vermehrte T-Zell-Expression bei CIDP-Patienten	64
6.2.4 CIDP und Virusinfektionen	65
7. SCHLUSSFOLGERUNG	67
8. LITERATURVERZEICHNIS	68
9. ANHANG	81
9.1 Materialien	81
9.1.1 Puffer	81
9.1.2 weitere Substanzen	81
9.1.3 Primer	82
9.1.4 Oligonukleotid-Sequenzen	82
9.1.5 Geräte	86
10. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	87
11. DANKSAGUNG	90

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Pathomechanismus autoimmuner Neuropathien	12
Abbildung 2: Somatische Rekombination des TCR	16
Abbildung 3: Entwicklungsstadien der T-Zellen im Thymus (DN-1 bis DN-4)	17
Abbildung 4: Genumlagerung des TCR im Thymus	18
Abbildung 5: Gen-Segment für die β -Kette des TCR	30
Abbildung 6: $V\beta 3$ (a) und $V\beta 8.2$ -Profil (b)	33
Abbildung 7: Spectratyping-Profile mit den Veränderungen von der Normalverteilung	35
Abbildung 8: Prozentuale $V\beta$ -Element-Verteilung der $CD4^+$ T-Zellen aller Probanden	37
Abbildung 9: Die prozentuale $V\beta$ -Element-Verteilung der $CD8^+$ T-Zellen aller Probanden	39
Abbildung 10: Prozentuale Verteilung von $V\beta 1$ bis $V\beta 24$ innerhalb der $CD4^+$ Population	42
Abbildung 11: Prozentuale Verteilung von $V\beta 1$ bis $V\beta 24$ innerhalb der $CD8^+$ Population	43
Abbildung 12: TCR-Repertoire-Verteilung der einzelnen Probanden	48
Abbildung 13: Patient 1	56
Abbildung 14: Patient 2	58

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: TCR-Vielfalt.....	21
Tabelle 2: CIDP Patienten	25
Tabelle 3: niPNP-Patienten	26
Tabelle 4: Kontroll-Probanden	26
Tabelle 5: T-Test-Analyse der $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zell-Population	40
Tabelle 6: Signifikanzprüfung der klinischen Korrelation	51
Tabelle 7: Signifikanzprüfung der klinischen Korrelation unter IVIg bei klinischer Stabilität.....	55

1. Zusammenfassung

1.1 Deutsche Version

Die chronisch inflammatorisch demyelinisierende Polyradikuloneuropathie (CIDP) ist eine Autoimmunerkrankung mit bisher nicht vollständig verstandenem Pathomechanismus. Sensible und motorische Störungen bis hin zu schweren Paresen resultieren aus einer Demyelinisierung der Axone im peripheren Nervensystem, die nach aktuellem Stand zellulär und humoral vermittelt ist. Ein Therapieansatz ist die Behandlung mit intravenösen Immunglobulinen (IVIg), wobei der Wirkmechanismus nicht vollständig aufgeklärt ist. In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, wie sich eine Therapie mit IVIg auf das T-Zell-Rezeptor (TCR) Repertoire peripher-venöser Lymphozyten betroffener Patienten auswirkt. Es sollte eine mögliche Korrelation zur klinischen Präsentation und mögliche prädominante T-Zellpopulationen identifiziert werden. Hierzu wurden CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen von CIDP-Patienten mit Hilfe des TCR Spectratypings untersucht und Veränderungen des TCR-Repertoires von CIDP-Patienten ohne mit CIDP-Patienten unter IVIg-Therapie, sowie mit Kontroll-Patienten verglichen. Die in dieser Arbeit gefundenen Veränderungen präsentierten sich sehr variabel und zeigten sowohl in der CD4⁺ als auch der CD8⁺ Population von der Normalverteilung des TCR-Repertoires verzerrte Abweichungen sowie oligoklonale T-Zell-Expansionen, die jedoch unabhängig vom klinischen Verlauf der Patienten waren. Dabei waren Abweichungen in der CD8⁺ Population deutlicher als in der CD4⁺ Population ausgeprägt. Unter IVIg-Therapie zeigten sich in beiden T-Zellpopulationen deutlich geringere Veränderungen im TCR-Repertoire und bei den Kontroll-Patienten insgesamt die geringsten Abweichungen. Der Einfluss von IVIg führte bei den CIDP-Patienten zu einer Angleichung an eine Gauß'sche Normalverteilung im TCR-Repertoire. Unsere Beobachtung einer TCR-Repertoire Veränderung in beiden T-Zell-Populationen betroffener Patienten unterstützt die Hypothese eines T-Zell vermittelten Pathomechanismus bei der Genese der CIDP, wobei die prädominante Verschiebung der CD8⁺ T-Zellen möglicherweise zusätzlich Hinweise auf virale Einflüsse bieten könnte. Die Veränderungen im TCR-Repertoire der einzelnen V β -Elemente präsentierten sich äußerst divers. Wir konnten kein einzelnes V β -Element identifizieren, das einen besonders hohen Anteil an Abweichungen aufwies. Der Befund unterstreicht die gegenwärtige Annahme einer polyklonalen T-Zell-Antwort als ursächlichen Mechanismus bei der Entstehung dieser behindernden Erkrankung.

1.2 Englische Version

Chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy (CIDP) is an acquired chronic autoimmune disorder of the peripheral nervous system. Current pathogenic concepts implicate both cellular and humoral immune responses to peripheral nerve antigens, although molecular targets remain elusive. Cellular infiltration, demyelination and to a varying degree axonal loss in the affected part of the nerve induce motor and sensory dysfunctions that may also result in ascending paralysis. One mainstay of treatment is intravenous immunoglobulins (IVIg), although the mechanism of action is not fully elucidated. The aim of this work was to investigate how IVIg therapy affects the T cell receptor (TCR) repertoire of peripheral venous lymphocytes of CIDP patients. We tried to identify a possible correlation between the clinical phenotype of patients affected by CIDP and potential predominant T cell populations in the peripheral venous blood. For this reason, TCR repertoires of CD4⁺ and CD8⁺ T cells from CIDP patients were analyzed by TCR spectratyping. We compared the changes of the TCR repertoire of CIDP patients without and under IVIg therapy and control patients. TCR repertoire of CIDP patients was distorted and oligoclonal T cell expansions were found both in the CD4⁺ and the CD8⁺ population. However, the degree of alterations did not correlate with the clinical presentation of the patients. Deviations in the CD8⁺ population were more pronounced than in the CD4⁺ population. Under IVIg therapy significantly fewer changes in the TCR repertoire were observed in both T cell populations. The TCR repertoire of IVIg treated patients was significantly normalized compared with non IVIg treated CIDP patients. Our observation of the profound oligoclonal response in T cell activation in both T cell populations supports the hypothesis that multiple peptides may induce and propagate this autoimmune-driven disease. The predominant shift of the CD8⁺ T cells indicates a potentially crucial role of CD8⁺ T cells in the immunopathogenesis of CIDP. The changes in the TCR repertoire of the individual V β elements were extremely diverse. A public expansion of a distinct TCR length in one V β element within a majority of affected patients was not detectable. These findings strengthen the hypothesis of a polyclonal T cell response as a causative mechanism in the development of this disabling disease.

2. Einleitung

2.1 Das periphere Nervensystem

Das humane Nervensystem besteht aus einem zentralen (ZNS) – Gehirn und Rückenmark - und einem peripheren (PNS) Nervensystem.

Zum PNS zählen alle Nerven und die dazu gehörenden Strukturen außerhalb des ZNS. Das PNS beginnt im Rückenmark bzw. im Gehirn mit Austritt der Spinal- bzw. der Hirnnerven. Durch Efferenzen werden Impulse aus dem ZNS in die Peripherie und durch Afferenzen von der Peripherie ins ZNS über die Neuronen geleitet (Bessou et al., 1981; Gandevia et al., 1982).

2.1.1 Myelinisierung der Nervenfasern

Eine physiologische Bewegung (Motorik) und ein physiologisches Empfinden (Sensorik) sind nur dann möglich, wenn eine zielgerichtete und reibungslose Reizweiterleitung zwischen Neuronen gewährleistet ist. Für eine besonders schnelle Reizweiterleitung müssen Nervenfasern, die als Axone bezeichnet werden, von Myelinscheiden umgeben und somit isoliert sein.

Im PNS können Axone der Neurone entweder stark oder schwach ummarkte Fortsätze haben oder auch marklos (unmyelinisiert) sein. Dabei korreliert die Dicke der Myelinschicht mit der Geschwindigkeit der Reizweiterleitung (Lorentendo and Honrubia, 1964). Diese Myelinisierung wird von Schwann-Zellen gebildet, die sich mehrmals um die Nervenfasern herumwinden und hintereinander liegen. Eine Myelinisierung ist dabei nicht komplett über die Länge des Axons ausgebildet, sondern sie bildet zur Weiterleitung der Aktionspotentiale Lücken, Ranvier'schen Schnürringe (Nodien) genannt, während sie in den Internodien - Bereich der Isolierung - übersprungen werden können. Diese Art der Reizweiterleitung wird saltatorische Erregungsleitung genannt und bringt einen großen Zeitgewinn mit sich, so dass Bewegungsabläufe und sensorische Empfindungen schnell und reibungslos umgesetzt werden können (De No und Honrubia, 1964; Lorentedeno und Honrubia, 1964; Lorente de Nó und Honrubia, 1966; Schwarz et al., 1995).

2.1.2 Blut-Nerven-Schranke

Einzelne Nervenfasern sind in Nervenfaszikeln organisiert, die durch das

Zusammenlagern mehrerer Nervenfasern zustande kommen. Die myelinisierten Nervenfasern haben als äußerste Schicht einen kernhaltigen Zytoplasmasaum der Schwannzelle, der unmittelbar einer aus retikulärem Bindegewebe umgebenden Basalmembran anliegt, was zusammen als Endoneurium bezeichnet wird (Gamble and Eames, 1964). Die eigentliche Blut-Nerven-Schranke (BNS) wird aus Endothelzellen der im Endoneurium gelegenen Kapillaren gebildet, so dass eine Barriere zwischen Schwannzellen und dem zirkulierenden Blut durch das Kapillarendothel des Endoneuriums aufgebaut wird. Dieses Kapillarendothel besteht aus sogenannten *tight junctions*, die eng mit einander verbunden sind und somit keine Fenestrierung zulassen, so dass nur bestimmte Zellen und Substanzen hindurch kommen (Abe et al., 2012; Poduslo et al., 1994; Weerasuriya and Mizisin, 2011).

Dieser Aufbau der BNS dient als Schutz von Nerven und erschwert ein Eindringen von pathogenen und entzündlichen Mediatoren des Immunsystems, wie beispielsweise T-Zellen oder Immunglobulinen (Ig) (Kanda, 2013). Jedoch ist die Barrierefunktion an den Spinalganglien und in der Nähe der Spinalwurzeln (J M Jacobs et al., 1976; Mizisin and Weerasuriya, 2011), sowie an den neuromuskulären Endplatten (W E Burkel, 1967) aufgehoben, so dass diese Bereiche als potentiell anfällig für Entzündungen und auch für Autoimmunerkrankungen angesehen werden (W F Brown and Snow, 1991; S Kuwabara et al., 2002).

2.2 Inflammatorische Neuropathien

Unter inflammatorischen Neuropathien versteht man entzündliche Erkrankungen des peripheren Nervensystems mit Zerstörung von Nervenfasern, Nervenwurzeln oder Myelinscheiden. Die Einteilung erfolgt zum einen nach dem Verlauf der Erkrankungen in monophasisch, schubförmig oder progressiv und zum anderen nach der Dauer in akut oder chronisch. Das Guillain-Barré Syndrom (GBS) ist eine akute Form mit heterogenem Verlauf, der bei einer möglichen aufsteigenden Parese bis hin zur Atemmuskulatur auch lebensbedrohlich sein kann (Jasti et al., 2016; Papathanasiou and Markakis, 2016). Zu den chronischen Formen zählen die CIDP und die multifokale motorische Neuropathie (MMN) (Torvik and Lundar, 1977; Whitesell, 2010; Yuki, 2012). Zudem kommt es zu unterschiedlichen Schädigungsmustern an den Nerven, zu denen die axonale Schädigung, die demyelinisierende Neuropathie und Mischformen zählen. Sowohl beim GBS, als auch bei der CIDP handelt es sich um

eine heterogene Erkrankung mit sehr variablen Symptomen.

2.2.1 Guillan-Barré-Syndrom

Das klassische GBS ist eine akute, inflammatorische, demyelinisierende Erkrankung der peripheren Nerven und Nervenwurzeln. Im Vordergrund steht der rasch progrediente Verlauf, der von einigen Tagen bis hin zu 8 Wochen dauern kann. Aufsteigende Paresen können bis hin zum Ausfall der Atemmuskulatur und somit zur Intubationspflichtigkeit führen. Die Symptome in Form von symmetrischen Paresen beginnen meist distal in den Extremitäten und steigen nach proximal auf. Beim GBS handelt es sich um eine Autoimmunerkrankung, bei der im Rahmen der axonalen Formen im Mausmodell Gangliosid-Antikörper eine Rolle zu spielen scheinen ohne, dass ein bestimmtes Zielantigen bestätigt worden ist (Cunningham et al., 2016). Häufig korreliert das GBS mit einer vorangegangenen bakteriellen Infektionen durch *Campylobacter jejuni* (Berciano et al., 2012; Franssen, 2012; Kuwabara and Misawa, 2012).

2.2.2 Chronisch inflammatorisch demyelinisierende Polyneuropathie

Die CIDP ist eine erworbene Autoimmunerkrankung des peripheren Nervensystems, bei der die Myelinscheiden, d. h. die Schwannzellen der peripheren Nerven und Nervenwurzeln in einem progressiven Krankheitsverlauf zerstört werden (Dalakas, 2011; Köller et al., 2005; Vallat et al., 2010). Die Symptome bestehen aus symmetrischen arm- und/oder beinbetonten sowohl motorischen, als auch sensorischen Ausfällen. Im Gegensatz zum GBS liegt eine CIDP dann vor, wenn die Symptome für mehr als zwei Monate fortschreiten. Seltener können auch Hirnnerven betroffen sein (Dalakas, 2012; Köller et al., 2005; R. S. Laughlin et al., 2009). Die Prävalenz liegt bei 8,9 / 100.000 Einwohner und die Inzidenz bei 1,6 / 100000 Einwohner (Hughes, 2010; R S Laughlin et al., 2009; Mahdi-Rogers and Hughes, 2014; Mathey et al., 2015). Das Durchschnittsalter liegt bei 58 Jahren, jedoch kann die CIDP in jedem Alter auftreten. Männer sind fast doppelt so häufig betroffen wie Frauen (Rotta et al., 2000).

Die Diagnose CIDP wird zunächst klinisch gestellt und richtet sich nach den Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Neurologie. In der Neurographie kann eine Reduktion der Nervenleitgeschwindigkeit, ein partieller Leitungsblock und distal verlängerte

Latenzen, sowie fehlende bzw. verlängerte F-Wellen-Latenzen festgestellt werden (Rajabally and Samarasekera, 2010; Bromberg, 2011; Guo et al., 2014). Im Liquor könnte eine normale Zellzahl und ein erhöhtes Liquorprotein zu sehen sein und Differenzialdiagnosen ausgeschlossen werden (Gorson et al., 2010; Larue et al., 2011; Van den Bergh et al., 2010). Als Differenzialdiagnosen wären beispielsweise HIV- und Lues-Infektionen zu nennen, die bei der Diagnostik einer CIDP berücksichtigt werden sollten (Said and Krarup, 2013; Vanasse et al., 2013; Tackenberg et al., 2007). Die Ätiologie der CIDP ist weitestgehend ungeklärt. Dennoch tritt diese Erkrankung gehäuft mit viralen Infektionen oder als Paraneoplasie auf (Köller et al., 2005; Lin and Hsu, 2011; J D Lünemann et al., 2010; San-Juan and Castro-Macías, 2008; Vallat et al., 2010b). Vor allem bei untherapierten CIDP-Patienten konnte eine erhöhte Rate an EBV-Infektionen festgestellt werden (Kasamon et al., 2002; J D Lünemann et al., 2010; Nociti et al., 2010), wobei eine hohe Durchseuchungsrate von EBV bedacht werden sollte.

2.2.3 Multifokale motorische Neuropathie

Zur Abgrenzung der CIDP ist die MMN eine erworbene, progrediente (chronische), multifokale Neuropathie mit langsamem Verlauf, die asymmetrisch ist und eher in den Armen beginnt. Sie ist ebenfalls eine Autoimmunerkrankung bei der in ca. 80% der Fälle GM-1-Antikörper nachgewiesen werden können (Baig et al., 2012; Muley and Parry, 2012; Vlam et al., 2012).

2.3 Therapiemöglichkeiten der CIDP

Aufgrund der aktuellen Studienlage sind zur Therapie von CIDP Patienten derzeit die Gabe von Kortikosteroiden, IVIg und der Plasmaaustausch (Gaebel et al., 2010) zugelassen. Für die langfristige Therapie ist die Wirkung von IVIg und Kortikosteroiden belegt (Kleyman and Brannagan, 2015; Kuitwaard et al., 2015; Lehmann et al., 2013, Mahdi-Rogers et al., 2010).

Die kortikosteroidsensitive CIDP wurde erstmals 1958 beschrieben (Austin, 1958). Kortison wird nach wie vor zur erfolgreichen Therapie der CIDP eingesetzt. Allerdings nimmt bei anhaltender Kortisontherapie die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten von Nebenwirkungen, wie z. B. dem Cushing-Syndrom zu.

Der Plasmaaustausch ermöglicht das kurzfristige Auswaschen potentieller

Autoantikörper und inflammatorischer Zytokine. Aufgrund eines deutlichen Nebenwirkungsprofils und einer teilweise nur kurzfristigen Symptomverbesserung mit anschließender Progredienz ist der Plasmaaustausch nicht zur Langzeittherapie geeignet (Dyck et al., 1986; Gajdos et al., 1997; Hahn et al., 1996; Mahdi-Rogers and Rajabally, 2010; Mehndiratta and Hughes, 2012).

Die therapeutische Wirksamkeit von IVIg ist sowohl kurzfristig als auch langfristig mit einem besseren Nebenwirkungsprofil als die Kortison- oder Plasmaaustausch-Therapie beschrieben (Dalakas, 2011; Hughes et al., 2008; Kieseier et al., 2008; Mahdi-Rogers und Rajabally, 2010). Die Effektivität von IVIg als Langzeittherapie wurde mittels der Vigorimeter-Griffstärke in der sog. ICE-Studie (Vanhoutte et al., 2012) bei CIDP-Patienten bestätigt. In der ICE-Studie wurde anhand der INCAT-Kriterien (Inflammatory Neuropathy Cause and Treatment) (Merkies and Schmitz, 2006) die Extremitäten-Beweglichkeit der CIDP-Patienten vor und nach der Therapie mit IVIg bewertet. Dabei stellte sich eine signifikante klinische Verbesserung heraus.

2.3.1 Wirkmechanismus von IVIg

Bei IVIg handelt es sich um Immunglobuline (Antikörper), die ursprünglich zur intravenösen Substitution bei Antikörper-Mangel-Erkrankungen eingesetzt worden sind. Die Immunglobuline für IVIg stammen aus einem Plasmapool mit normalen, polyklonalen und polyspezifischen Immunglobulinen von 3000-10000 gesunden Spendern. Für IVIg werden hauptsächlich Monomere (~ 60%) und Dimere (~ 40%) IgGs verwendet (Dalakas, 1997; A Durandy et al., 2009; Durandy et al., 2005; Seite et al., 2008). Derzeit wird IVIg zur Therapie von Autoimmunerkrankungen und chronisch entzündlichen Erkrankungen eingesetzt, bei denen Autoantikörper oder T-Zellen im Vordergrund des Pathomechanismus stehen (Gürcan and Ahmed, 2007). Zugelassen ist eine Therapie mit IVIg bei den Autoimmunerkrankungen CIDP, GBS, Kawasaki-Syndrom und idiopathisch, thrombozytopenischen Purpura (Nimmerjahn and Ravetch, 2008).

Die Wirkung von IVIg ist nicht vollständig bekannt und beruht wahrscheinlich auf komplexen Veränderungen verschiedenster Immunmechanismen. Es gibt Hinweise, dass niedrig dosiertes IVIg proinflammatorisch wirkt. Dies könnte z. B. durch Erhöhung des Kalziumspiegels, über eine Komplementaktivierung oder eine Bindung an das Fc-Fragment von IgG-spezifischen Rezeptoren (FcγR) auf angeborenen Immun-Effektorzellen bedingt sein. Hochdosiertes IVIg kann dagegen durch noch nicht

vollständig geklärte Mechanismen antiinflammatorisch wirken. Gerade dieser antiinflammatorische Effekt scheint für den Therapieerfolg mit IVIg bei der CIDP von Bedeutung zu sein (A Durandy et al., 2009). IVIg hat ein breites Wirkspektrum, was sowohl das adaptive, als auch das angeborene Immunsystem betreffen könnte (A Durandy et al., 2009; Nimmerjahn and Ravetch, 2008).

Bei der Wirkung auf das angeborene Immunsystem wird diskutiert, ob IVIg die Fc γ -Rezeptoren der neutrophilen Granulozyten mit Hilfe der IgG-Monomeren blockiert und die Leukozyten-Einwanderung und deren Endothel-Adhäsion hemmt (A Durandy et al., 2009; Bernd C Kieseier et al., 2008). Zugleich fördert IVIg die Granulozyten-Apoptose (A Durandy et al., 2009), hemmt die Makrophagen-Aktivität (A Durandy et al., 2009; Imbach, 2012; M D Kazatchkine and Kaveri, 2001; Nimmerjahn and Ravetch, 2008a), induziert Veränderungen bei den NK-Zellen beim Austausch zwischen Blut und Gewebe, die NK-Zell-Aktivierung, deren Zytokin-Produktion und Degranulation, sowie deren Anti-Tumor-Aktivität (A Durandy et al., 2009) und inaktiviert durch Komplement-Bindung die Komplementkaskade und neutralisiert das Komplement (A Durandy et al., 2009; Imbach, 2012; M D Kazatchkine and Kaveri, 2001; Bernd C Kieseier et al., 2008; Nimmerjahn and Ravetch, 2008).

Beim adaptiven Immunsystem hat IVIg einen hemmenden Einfluss auf T- und B-Zellen und fördert die Neutralisation von Auto-Immunglobulinen (A Durandy et al., 2009; Imbach, 2012; M D Kazatchkine and Kaveri, 2001; Bernd C Kieseier et al., 2008; Nimmerjahn and Ravetch, 2008). Außerdem hat IVIg eine hemmende Wirkung auf die durch dendritische Zellen vermittelte T-Zell-Aktivierung, Endozytose, Produktion proinflammatorischer Zytokine, die Differenzierung dendritischer Zellen, die Expression von Hauphistokompatibilitätskomplex (MHC) Klasse II und zugehöriger kostimmulierender Moleküle, sowie auf Fc γ -Rezeptoren (A Durandy et al., 2009).

2.3.2 Mögliche Wirkungen von IVIg auf T-Zellen

IVIg hat einen hemmenden Einfluss auf die Aktivierung, Proliferation und Differenzierung von T-Zellen (A Durandy et al., 2009; Imbach, 2012a; M D Kazatchkine and Kaveri, 2001; Bernd C Kieseier et al., 2008), die Interleukin 2 (IL2) Produktion (A Durandy et al., 2009) und auf die Differenzierung, Amplifikation sowie Funktion von T-Helfer (T_H) 17-Zellen (Mohan S Maddur et al., 2011). IVIg fördert die T-Zell-Apoptose durch Antikörper gegen CD95/Fas-Rezeptor (A Durandy et al., 2009; Bernd C Kieseier et al., 2008), die Hochregulation regulatorischer T-Zellen (T_{reg}) und deren Supressor-

Funktion (A Durandy et al., 2009; Kessel et al., 2007; Bernd C Kieseier et al., 2008) sowie die Produktion von Antikörpern gegen MHCs (Kaveri et al., 1996) und gegen TCR (Bernd C Kieseier et al., 2008).

2.4 Prinzip der T-Zellaktivierung

2.4.1 Haupthistokompatibilitätskomplex

Der MHC dient dazu, dass unser Immunsystem Antigene erkennen kann.

Der MHC Klasse I wird auf Oberflächen nahezu aller kernhaltigen Körperzellen exprimiert. Er hat die Aufgabe, Zellen, die durch Viren (Hewitt, 2003), maligne Entartung (Hage et al., 2013) oder durch intrazelluläre Bakterien (Neefjes and Sadaka, 2012) verändert sind, für das Immunsystem erkenntlich zu machen. Dies geschieht, indem der MHC Klasse I die entsprechenden Antigenpeptide auf der Zelloberfläche präsentiert. Dadurch können CD8⁺ T-Zellen antigenspezifisch aktiviert werden (Germain and Margulies, 1993; Hewitt, 2003; Joyce et al., 1994).

Die MHC Klasse I Kette lagert sich im Lumen des endoplasmatischen Retikulums (ER) mit einem β 2-Microglobulin zusammen, wodurch der peptidbindende Spalt des MHC Klasse I bereit zur Peptidbeladung ist. Leere Komplexe werden so lange im ER zurückgehalten bis ein Peptid gebunden wird (Bouvier, 2003). Intrazelluläre Proteine werden in den im Zytosol befindlichen Proteasomen in Peptide prozessiert, so dass diese nur noch aus 8-10 Aminosäuren bestehen und an MHC Klasse I binden können (Joyce et al., 1994). Ist ein MHC Klasse I beladen, wird es durch komplexe Wechselwirkungen über den Golgi-Apparat an die Zelloberfläche transportiert und kann dort das Peptid präsentieren (Germain and Margulies, 1993; Spiliotis et al., 2000). MHC Klasse II werden nur auf Antigen-präsentierenden Zellen (APC) exprimiert. Bei den klassischen APCs handelt es sich um Makrophagen und vor allem um dendritische Zellen, die bereits außerhalb des lymphatischen Gewebes mit dem Pathogen in Kontakt kommen und dieses als Peptid auf ihrer Oberfläche in lymphatischen Organen präsentieren. APCs können aber unter bestimmten Bedingungen auch Schwannzellen (Meyer zu Hörste et al., 2008), Endothelzellen, oder aktivierte T-Zellen sein (Cusick et al., 2012). Hier werden die antigenen Peptide von CD4⁺ T-Zellen erkannt.

Eine von zahlreichen möglichen Aufgaben der APCs ist das Prozessieren extrazellulärer Proteine via Phagozytose (Ciechanover, 2005; Munz, 2010), die dann innerhalb der entstandenen Vesikeln an die MHC Klasse II gebunden werden. Hierbei

müssen Peptide zur Stabilität des MHC Klasse II eine Mindestlänge von 13-17 Aminosäuren haben (Rudensky AYu et al., 1991).

2.4.2 CD4⁺- und CD8⁺-Korezeptoren

T-Zellen, die zur CD4⁺ Population gehören, exprimieren auf ihrer Oberfläche den Korezeptor CD4, und gehören damit zu T_H-Zellen. Der CD4-Korezeptor besteht aus vier Immunglobulinähnlichen Untereinheiten (D1-D4). Dabei treten die D1 und D2-Untereinheiten mit den β1- und β2-Ketten des MHC Klasse II in Kontakt. D3 befindet sich dazwischen gelagert und D4 ist in die T_H-Zellmembran verankert. CD4⁺ T-Zellen erkennen lösliche Antigene, die auf MHC Klasse II präsentiert werden. Es werden hauptsächlich zwei Subtypen – T_{H1} und T_{H2} Zellen – unterschieden.

T_{H1} Zellen führen zu einer zellvermittelten Immunität. Sie produzieren Zytokine wie z. B. IFN_γ (IL2, TNFβ) (Paul and Seder, 1994) und aktivieren eine zelluläre Immunantwort zu denen Makrophagen gehören.

T_{H2} Zellen führen über eine Aktivierung von B-Lymphozyten zur Produktion von Immunglobulinen und produzieren hauptsächlich IL4 (Paul and Seder, 1994), hierbei hemmt IL10 die T_{H1}-Entwicklung (Hsieh et al., 1992; Mosmann and Coffman, 1989; Petrovsky and Harrison, 1997).

T-Zellen mit dem CD8⁺ Rezeptor auf der Oberfläche werden als zytotoxische T-Zellen bezeichnet. Sie exprimieren den Korezeptor CD8, dessen langgestreckte Polypeptidsegmente in die Membran eingebaut sind und dessen Immunglobulinähnliche Domäne, die aus einer via Disulfidbrücken verbundenen α- und β-Kette besteht, an MHC Klasse I bindet (Emmrich et al., 1986). Diese CD8⁺ T-Zellen erkennen intrazelluläre Antigene, die auf MHC Klasse I präsentiert werden.

2.4.3 T-Zell-Aktivierung und Differenzierung

Für die Aktivierung naiver T-Zellen sind insgesamt drei Signale notwendig (DeFord-Watts et al., 2011; Lichtenfels et al., 2012):

Das erste Signal ist die Erkennung des spezifischen Antigens durch den TCR. Hierzu muss das Antigen entweder auf der Oberfläche einer APC mittels MHC Klasse II (bei CD4⁺ T-Zellen) oder mittels MHC Klasse I (bei CD8⁺ T-Zellen) auf einer Zelle präsentiert werden. Essentiell für diesen Schritt ist, dass dieses Antigen spezifisch zur hypervariablen CDR3-Region des TCR nach dem Schlüssel-Schloss-Prinzip passen

muss, damit die T-Zelle aktiviert werden kann (Abbildung 1 A).

Das zweite Signal wird durch Bindung von kostimulatorischen Molekülen vermittelt. Die häufigsten kostimulatorischen Moleküle sind CD80 (B7.1) und CD86 (B7.2) und werden auf APCs exprimiert. Diese binden an CD28 auf der Oberfläche naiver T-Zellen (Ford and Larsen, 2009; Lichtenfels et al., 2012). Ein weiteres korrespondierendes, kostimulatorisches Molekül ist der CD40-Ligand, der sich an APC-Oberflächen befindet und an CD40-Rezeptoren von T-Zellen binden kann. Diese Moleküle werden jedoch nur im Rahmen einer Immunantwort mit Peptidbeladung der APCs exprimiert, um eine Präsentation von Autoantigenen zu vermeiden.

Das dritte Signal wird durch Zytokine definiert, die eine Effektordifferenzierung von T-Zellen (u. a. auch eine T_H1 und T_H2 Antwort) determinieren. $CD8^+$ T-Zellen werden im Rahmen einer Immunantwort abhängig von der Art einer Virusinfektion durch die Zytokine IL 12, sowie Typ I IFN unterschiedlich stark beeinflusst und entsprechend exprimiert (Keppler et al., 2012).

Diese drei Aktivierungssignale induzieren eine mehrere Tage andauernde Proliferation und damit eine klonale Expansion, wobei viele T-Effektorzellen eines Klons entstehen, die durch den gleichen TCR somit auch durch die gleiche Antigenpezifität charakterisiert sind (Patel et al., 2012; Viganò et al., 2012).

2.4.4 Bedeutung von T-Zellen bei CIDP

Im Pathomechanismus der CIDP werden T-Zellen eine große Bedeutung zugesprochen. Mögliche Hinweise auf einen T-Zell vermittelten Pathomechanismus der CIDP könnten erhöhte Konzentrationen von $TNF\alpha$ (Misawa et al., 2001) und von löslichen IL2-Rezeptoren (Hartung et al., 1991, 1990) im Serum von CIDP Patienten bieten, die zum Teil mit dem klinischen Schweregrad und elektrophysiologischen Leitungsveränderungen im Sinne einer Demyelinisierung korrelieren.

Darüber hinaus zeigen T-Zellen während der CIDP, insbesondere $CD8^+$ T-Zellen ein verändertes TCR-Repertoire in Form von starken mono- und oligoklonalen Abweichungen von einer ansonsten normalen Gauß'schen Verteilung des TCR-Repertoires und dies sowohl im peripheren Blut, als auch in den betroffenen peripheren Nerven während der CIDP (T Schneider-Hohendorf et al., 2012).

Interessanterweise entwickeln B7.2 (CD86) transgene Mäuse, die für $CD4^+$ T-Zellen defizient sind, spontan eine Art autoimmune periphere Neuropathie, bei der insbesondere $CD8^+$ T-Zellen die wichtigsten Akteure zu sein scheinen (Salomon et al.,

2001; Yang et al., 2015, 2014). In Nervenbiopsien von CIDP Patienten konnten sowohl endo- als auch epidurale T-Zell-Infiltrationen entdeckt werden (Schmidt et al., 1996), wobei auch hier die CD8⁺ Population prädominant zu sein scheint (K Matsumuro et al., 1994).

Zusammenfassend tragen T-Zellen einen entscheidenden Beitrag zum Pathomechanismus der CIDP bei, wobei es einige Hinweise für eine Prädominanz der CD8⁺ Population gibt.

2.5 Pathomechanismus der autoimmunen Neuropathie

Dieses Kapitel beschäftigt sich mit dem Pathomechanismus autoimmuner Neuropathien. Zur Veranschaulichung eines Großteils der gegenwärtigen Erkenntnisse wählten wir ein breit akzeptiertes Modell für das GBS basierend auf dem Tiermodell der experimentellen autoimmunen Neuritis (EAN) (Meyer zu Hörste et al., 2007) in Abbildung 1. Bei diesem Modell konnte durch Immunisierung mit verschiedenen peripheren Myelinkomponenten eine Immunantwort gegen unbekannte Antigene der peripheren Nerven induziert werden, die zum Bild eines GBS führte (Kieseier et al., 2004). Im Vordergrund stand eine T-Zell vermittelte Immunabwehr (Gold et al., 1999; Kiefer et al., 2001; Köller et al., 2005), wobei auch humorale Komponenten beschrieben wurden.

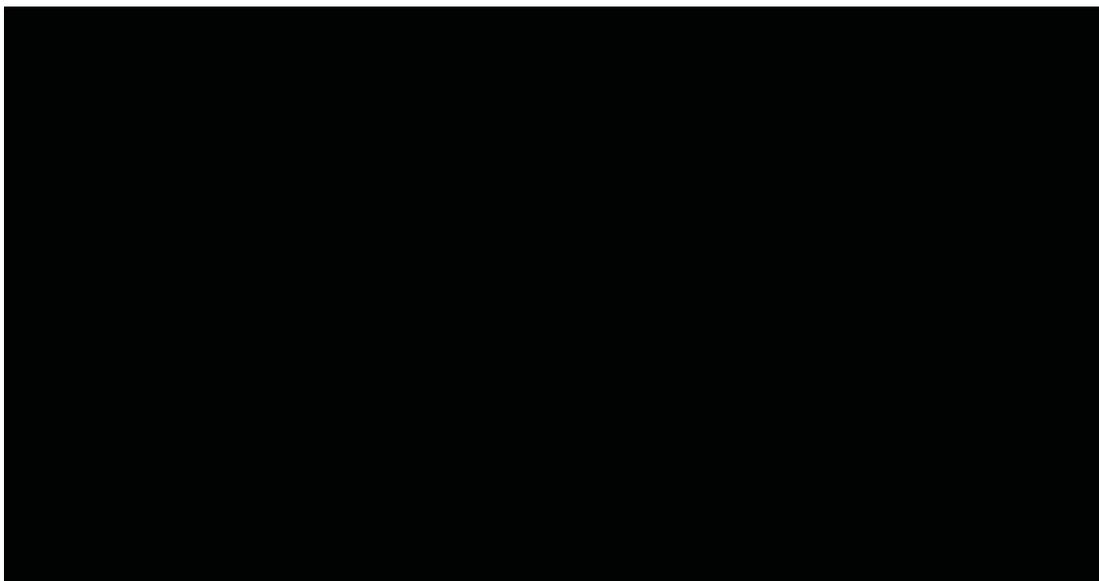


Abbildung 1: Pathomechanismus autoimmuner Neuropathien

Die Abbildung stellt ein schematisches Modell zum möglichen Pathomechanismus des GBS und der CIDP dar (modifiziert nach Meyer zu Hörste et al., 2007, Copyright © 2018 mit

Genehmigung von Springer Nature, hier: wegen Copyrights © unkenntlich gemacht).

APC – Antigen präsentierende Zelle, B – B-Zelle, BNS – Blutnervenschranke, LOS - Lipooligosaccharid, PNS – peripheres Nervensystem, T – T-Zelle, T_H1/T_H2 – T-Helfer1/2-Zelle

2.5.1 Entstehung autoreaktiver T-Zellen

Hauptakteure im Pathomechanismus autoimmuner Neuropathien scheinen bei einer T-Zell vermittelten Immunantwort autoreaktive T-Zellen zu sein, deren Entstehung im Organismus durch mehrere tolerogene Mechanismen reguliert wird. Ein möglicher Mechanismus könnte das molekulare Mimikry darstellen, das eine Präsentation körpereigener Oberflächenstrukturen im inflammatorischen Kontext aufgrund einer Ähnlichkeit zu bestimmten Epitopen auf der Oberfläche von Pathogenen beschreibt. Durch diese Präsentation können T-Zellen aktiviert werden und diese körpereigenen Strukturen autoreaktiv zerstören (Berciano et al., 2012; Franssen, 2012; Kuwabara and Misawa, 2012). Beim GBS könnte ein putatives Epitop in Form eines Lipooligosaccharides (LOS) durch einen unbekanntem Trigger wie beispielsweise eine Infektion mit *Campylobacter jejuni* molekulares Mimikry auslösen (Abbildung 1 A). Auch im Rahmen der CIDP sind beim Menschen autoreaktive T-Zellen gegen bestimmte Myelinproteine oder –peptide beschrieben worden (Csurhes et al., 2005; Klehmet et al., 2014; Sanvito et al., 2009).

2.5.2 Immunreaktionen im peripheren Nerv

Wurde eine Aktivierung von Immunzellen im systemischen Immunkompartiment initiiert, so muss die BNS als Barriere überwunden werden, um eine Inflammation innerhalb eines peripheren Nervens zu induzieren. Dazu ist eine Vielzahl von Reaktionen des Immunsystems möglich.

Vor der BNS können durch APC aktivierte T-Zellen weitere T-Zellen aktivieren (Abbildung 1 A). Diese aktivierten T-Zellen können über das sog. Rolling mit Hilfe von Zytokinen, Interleukinen, sowie weiteren immunologischen Mediatoren wie beispielsweise Adhäsionsmolekülen und Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) (Lawrence and Springer, 1991) (Abbildung 1 C links), die BNS passieren (D), das als Migration bezeichnet wird. Auch bei der CIDP wurden Hinweise einer erhöhten Expression von MMPs gefunden (Leppert et al., 1999). Mittels Chemokine können weitere immunkompetente Zellen angelockt werden (Ubogu, 2011). Dieses Zusammenspiel von Migration aktivierter T-Zellen, Anlockung weiterer Immunzellen

und Wirkung der Zytokine bewirkt eine lokale Entzündungsreaktion im Nerven und fördert eine vermehrte Permeabilität der BNS, so dass weitere T-Zellen in das Endoneurium einwandern können (Abbildung 1 C und D).

Außerdem können durch aktivierte T-Zellen auch B-Zellen aktiviert werden, die sich zu Plasmazellen differenzieren und Autoantikörper (Abbildung 1 B) sezernieren können, die ebenfalls die geschädigte BNS durchqueren können. Autoantikörper können bei GBS-Patienten zum Teil im Blut nachgewiesen werden (Klehmert et al., 2015, 2014). Jedoch sind spezifische Antigene nur bei extrem wenigen GBS-Subtypen etabliert, wie z. B. das Myelin-Protein oder die Schwann-Zell-Ganglioside (Meyer zu Hörste et al., 2007).

Am Axon eines peripheren Nervs können Makrophagen, die in diesem immunologischen Zusammenhang auch als professionelle APCs dienen, durch von T_H1 Zellen sezerniertes $IFN\gamma$ und TNF aktiviert werden (Abbildung 1 C rechts). Sie können zum einen direkt Schwannzellen und Axone durch Phagozytose angreifen oder Metabolite wie NO, TNF und Matrixmetalloproteinasen (MMPs) sezernieren (Abbildung 1 E), die ebenfalls das Gewebe und Axone schädigen können (Abbildung 1 F).

Aktivierte T_H2 Zellen können nach ihrer Migration im Nerv durch antiinflammatorische Interleukine wie IL4, IL10 und $TGF\beta$ aktivierte T_H1 Zellen in deren Aktivität hemmen, so dass eine überschießende Immunreaktion reduziert werden könnte.

Zur Terminierung einer Inflammation sind Makrophagen mittels Sezernierung antiinflammatorischer Zytokine (z. B. $TGF\beta$), sowie T_H2 Zellen durch Hemmung von T_H1 Zellen und Förderung einer T-Zell-Apoptose beteiligt (Abbildung 1 G) (Gold et al., 1997).

Je nach Grad einer axonalen Schädigung (Abbildung 1 F) können Symptome von z. B. motorischen Ausfällen und Sensibilitätsstörungen auftreten, die von leichten Kraftverlusten bis hin zu schweren Paresen reichen können (Köller et al., 2005; Pereira et al., 2012). Der Grad einer axonalen Schädigung ist eine wichtige Determinante der klinischen Krankheitsschwere bei CIDP-Patienten (Meyer zu Hörste et al., 2007).

2.6 Entwicklung des T-Zell-Repertoires

2.6.1 Aufbau des T-Zell-Rezeptors

Der TCR besteht aus zwei verschiedenen Polypeptidketten, einer TCR- α - und einer

TCR- β -Kette. Er ist membranständig und in verschiedene Domänen gefaltet. Diese Ketten haben jeweils eine variable (V) und eine konstante (C) Region. Im Bereich der V-Region befindet sich durch eine spezifische Faltung die Antigenbindungsstelle (Fernandes et al., 2012; Yin et al., 2012).

Mit dem Hintergrund eines dreidimensionalen Aufbaus ist es leichter zu verstehen, dass sich die Antigenbindungsregion, aus drei bindungsentscheidenden Bereichen zusammensetzt, die auch als CDR (complementarity determining regions) bezeichnet werden. CDR 1 und 2 binden bevorzugt an MHC Klasse I und II, wohingegen CDR 3 an das Antigen bindet. Daher ist es zu erklären, dass in dieser CDR3 der α - und β -Kette die größte Vielfalt besteht (Fernandes et al., 2012; Yin et al., 2012). Durch diese enorme Vielfalt des TCR-Repertoires ist es möglich, dass zahlreiche fremde Antigene von z. B. Erregern, die im menschlichen Körper eindringen, erkannt werden können. Gleichzeitig besteht die Gefahr, dass körpereigene Antigene als körperfremd erkannt werden und Autoimmunerkrankungen entstehen können (Mahajan et al., 2005). Zur Meidung T-Zell vermittelter, autoimmuner Reaktionen bestehen verschiedene Mechanismen während der T-Zell-Differenzierung auf die im Folgenden näher eingegangen wird.

2.6.2 Somatische Rekombination

Bei der Generierung des TCRs werden durch somatische Rekombination auf DNA-Ebene zufällig vier verschiedene Gen-Elemente, von denen unterschiedliche Kopien vorhanden sind, produktiv miteinander verknüpft. Jeder TCR trägt je eins der vier Gen-Elemente: V- (variable, variabel), J- (joining, Verknüpfung), D- (diversity, vielfältig) und C- (constant, konstant) Gen-Element. Durch die Verknüpfung der J-, V-, und D-Segmente, die rein zufällig abläuft, entsteht bereits zu diesem Entwicklungszeitpunkt eine sehr große Vielfalt für den TCR (Davis and Bjorkman, 1988; Gauss and Lieber, 1992; Pannetier et al., 1993) (Vgl. Abbildung 2). Zusätzliche Variabilität entsteht durch die vielfältigen kombinatorischen Möglichkeiten der α -Kette und β -Kette (Vgl. Abbildung 2).

Für die β -Kette ist die variable Region in drei Gensegmente, V_{β} , D_{β} und J_{β} codiert. Hier entsteht durch die Gen-Umlagerung ein funktionelles VDJ_{β} -Exon, das mit der C_{β} -Region verbunden und in die β -Kette des TCRs translatiert wird.

Für die α -Kette wird zunächst ein V_{α} -Gen-Segment mit einem J_{α} -Gen-Segment

gepaart, so dass ein funktionelles VJ_{α} -Exon für die variable Region entsteht. Dieses VJ_{α} -Exon wird mit der C_{α} -Region verbunden und in die α -Kette des TCRs translatiert. Abbildung 2 veranschaulicht die komplexe Gen-Segment-Verknüpfung während der somatischen Rekombination.

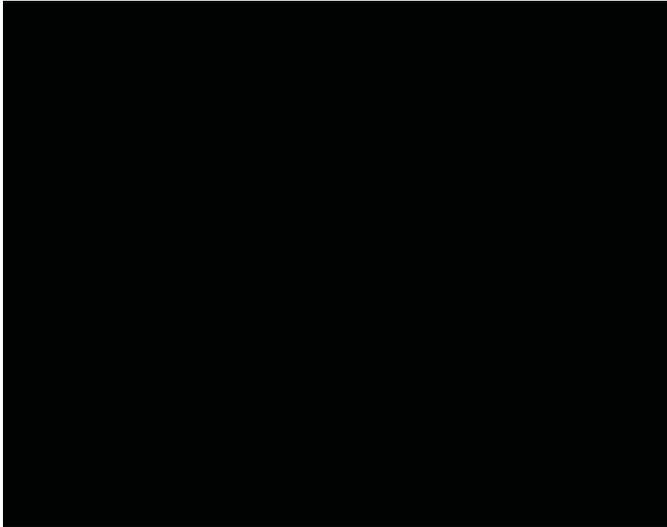


Abbildung 2: Somatische Rekombination des TCR

Die Abbildung zeigt ein Schema der komplexen Gen-Segment-Verknüpfung während der somatischen Rekombination. In der Mitte ist der fertige TCR nach Gen-Segment-Verknüpfung der α -Kette (oben) und der β -Kette (unten) dargestellt. Im Unterschied zur α -Kette (oben) weist die β -Kette (unten) zusätzlich zum V-, J- und C-Gen-Segment noch ein D-Segment für die Diversität auf (modifiziert nach Murphy K. et al. 2009, Copyright © 2008 durch Garland-Wissenschaft, Taylor and Francis Group, LLC, verwendet mit Genehmigung von W.W. Norton & Company, Inc., hier: wegen Copyrights © unkenntlich gemacht).

2.6.3 Differenzierungsstadien der T-Zellen im Thymus

T-Zellen entstehen im Knochenmark aus einer gemeinsamen Vorläuferzelle. Wobei die weitere Differenzierung im Thymus stattfindet.

Der T-Zell-Vorläufer gelangt vom Knochenmark aus über die Blutbahn in den Thymus. Im Folgenden entstehen im Thymus aus dem T-Zell-Vorläufer durch Genumlagerung mit wahrscheinlich verschiedenen Genlokalisationen zwei T-Zell-Populationen, eine größere Population an $\alpha:\beta$ -T-Zellen und eine kleinere an $\gamma:\delta$ -T-Zellen (Zheng et al., 2012). Die beiden Zelllinien unterscheiden sich in ihrer Spezifität, im Expressionsmuster von $CD4^{+}$ und $CD8^{+}$, in ihrer Verteilung in der Peripherie und funktionell, wobei über $\gamma:\delta$ -T-Zellen wenig bekannt ist (Janeway, 1992; Kang et al., 1998; Kang and Raulet, 1997).

Die $\alpha\beta$ -T-Zellen werden in einem langen Prozess der Differenzierung und Proliferation von doppeltnegativen (DN-1 bis DN-4) zu reifen, einfachpositiven $CD4^+$ oder $CD8^+$ T-Zellen. Bei der Differenzierung der DN-1- zur DN-4-Zelle spielen eine Reihe von Oberflächenmolekülen eine Rolle, auf die hier nicht eingegangen wird (Godfrey et al., 2012; Petrie et al., 1995; Robey and Fowlkes, 1994; Warmflash and Dinner, 2006), (Vgl. Abbildung 3).

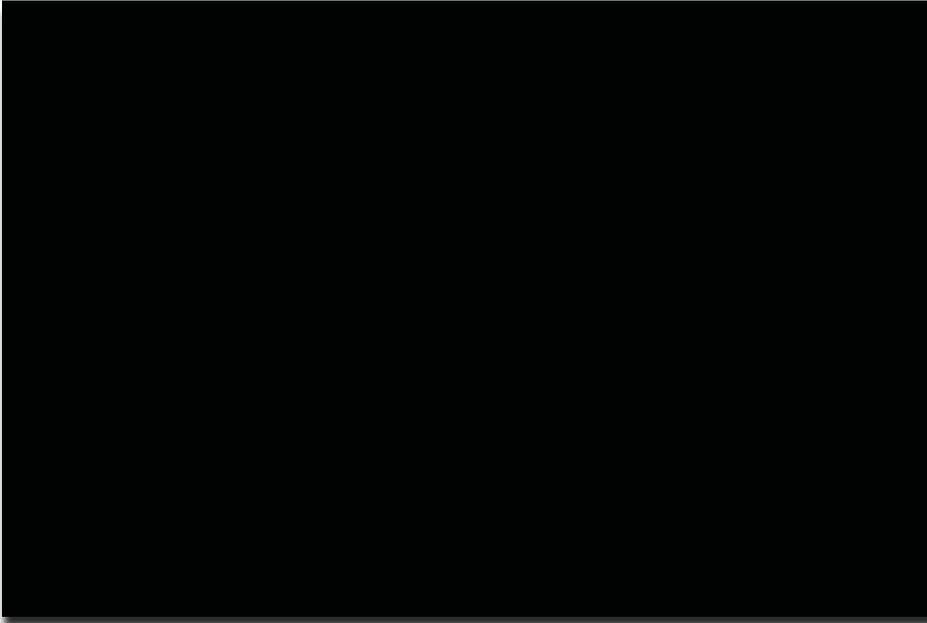


Abbildung 3: Entwicklungsstadien der T-Zellen im Thymus (DN-1 bis DN-4)

Zu Beginn gelangen erste doppeltnegative T-Zell-Vorläufer bzw. Thymozytenvorläufer (DN-1) via Venolen aus dem Blut ins Thymusmark (Medulla). Von hier aus durchlaufen sie in der Thymusrinde (Cortex) weitere Entwicklungsstadien (DN-2 bis DN-4) bis sie zurück im Thymusmark zu reifen, einfachpositiven $CD4^+$ oder $CD8^+$ T-Zellen werden und wieder ins Blutsystem wandern (modifiziert nach Murphy K. et al. 2009, Copyright © 2008 durch Garland-Wissenschaft, Taylor and Francis Group, LLC, verwendet mit Genehmigung von W.W. Norton & Company, Inc., hier: wegen Copyrights © unkenntlich gemacht).

Der T-Zell-Vorläufer beginnt bereits vor der $CD4$ - und $CD8$ -Expression im DN-2-Zellstadium mit der Genumlagerung der β -Kette des TCRs durch einige D_{β} - J_{β} -Umlagerungen. Dies fördert die Entwicklung zum DN-3-Stadium, in der die restlichen V_{β} -, D_{β} -, J_{β} -Gene der β -Kette produktiv umgelagert werden. Wenn dieser Schritt nicht erfolgreich war, gehen die T-Zell-Vorläufer zu Grunde. Dieses TCR- β -Rearrangement ist äußerst wichtig für die weitere T-Zell-Entwicklung und bietet die Basis der TCR-Diversität. Der Entwicklungsschritt zum DN4-Stadium erfolgt dadurch, dass diese

produktiv umgelagerte, also die funktionelle β -Kette mit einer Ersatz- α -Kette paart und mit dem CD3-Komplex, der der TCR-Signalgebung dient, auf der T-Zell-Vorläufer-Oberfläche exprimiert wird, so dass ein CD3:Prä-T-Zell-Rezeptor-Komplex entsteht. Dadurch erhält die Zelle das Signal, die Gene der α -Kette umzulagern, die nur aus V_α , C_α und J_α -Segmenten bestehen und mehrfach umgeordnet werden können, so dass kleine Mengen an $\alpha:\beta$ -T-Zell-Rezeptoren ausgebildet werden (Godfrey et al., 2012; C Pannetier et al., 1995).

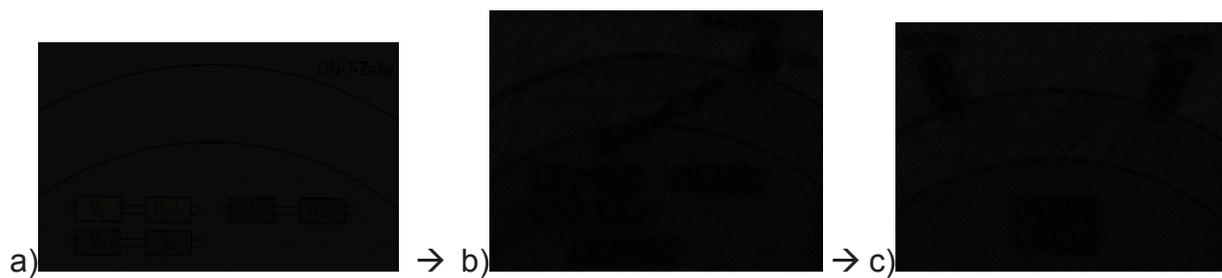


Abbildung 4: Genumlagerung des TCR im Thymus

- a) Zu Beginn lagern doppelnegative T-Zellen (DN) beider T-Zelllinien ($\alpha:\beta$ - und $\gamma:\delta$ -T-Zellen) ihre TCR-Gene gemeinsam um.
- b) Die funktionelle, umgelagerte β -Kette wird mit einer Ersatz- α -Kette (pT α) gepaart und die $\gamma:\delta$ -Gene werden abgeschaltet.
- c) Nach Umlagerung der α -Kette entsteht der reife $\alpha:\beta$ -TCR.

(modifiziert nach Murphy K. et al. 2009, Copyright © 2008 durch Garland-Wissenschaft, Taylor and Francis Group, LLC, verwendet mit Genehmigung von W.W. Norton & Company, Inc., hier: wegen Copyrights © unkenntlich gemacht)

2.6.4 Positive Selektion

Bei der positiven Selektion wird überprüft, ob der entstandene TCR körpereigene MHC erkennen kann. Dazu wird die Umlagerung der α -Ketten-Gene solange fortgeführt, bis die α - und β -Kette an die Selbst-MHC binden (Germain, 2002; Owen and Jenkinson, 1992). Bei der positiven Selektion, die vor allem im Kortex des Thymus stattfindet, werden die meisten T-Zellen – ca. 95% - aussortiert (Scollay et al., 1980).

Bei erfolgreicher positiver Selektion werden die doppelt positiven T-Zellen durch weitere Differenzierung einfach positiv, d. h. dass sie nur noch CD4⁺ oder CD8⁺ auf ihrer Oberfläche exprimieren (Hogquist et al., 1997; Huesmann et al., 1991; Stefanski et al., 2001).

2.6.5 Negative Selektion

Nachdem T-Zellen durch das Erkennen und Binden von MHC ein Überlebenssignal erhalten und somit positiv selektiert worden sind, muss überprüft werden, ob sie fälschlicherweise körpereigene Proteine (Auto-Antigene) erkennen. Die überlebenden T-Zellen gehen bei der Bindung der MHCs, die mit körpereigenen Autoantigenen beladen sind, in die Apoptose und werden somit negativ selektiert (Germain, 2002; Owen and Jenkinson, 1992).

Diese beiden Selektionen bewirken, dass nur ca. 3% der T-Zellen überleben und sich zu reifen T-Zellen mit folgenden Eigenschaften entwickeln können: MHC-Moleküle erkennen und binden zu können (positive Selektion), aber gleichzeitig nicht durch körpereigene Antigene aktiviert und autoreaktiv zu werden (negative Selektion) (Shortman et al., 1990; Surh and Sprent, 1994).

Die durch die negative Selektion erworbene Toleranz der noch unreifen T-Zellen (Thymozyten) innerhalb der zentralen lymphatischen Gewebe gegenüber Selbst-Peptiden wird als zentrale Toleranz bezeichnet. Sie besteht lebenslanglich und soll Autoimmunität verhindern. Dies gelingt nicht bei allen T-Zellen. Einige T-Zellen durchlaufen keine negative Selektion und können sich zu autoreaktiven T-Zellen entwickeln. Durch medulläre Thymusepithelzellen können auch außerhalb des Thymus in den zentralen lymphatischen Geweben gewebespezifische Antigene (tissue specific antigen) präsentiert werden, so dass eine ausreichende Präsentation körpereigener Proteine gewährleistet ist. Möglicherweise können z. B durch eine unvollständige Präsentation körpereigener Proteine durch APCs in den zentralen lymphatischen Geweben autoreaktive T-Zellen entstehen (Gascoigne and Palmer, 2011; Griesemer et al., 2010; Stoeckle et al., 2012).

Damit diese autoreaktiven T-Zellen ebenfalls keine Autoimmunität herbeiführen können, gibt es zusätzliche Mechanismen der peripheren Toleranz.

Diese entsteht zum einen dadurch, dass reife T-Zellen ihr Antigen erkennen, aber im nichtinflammatorischen Kontext. Die präsentierende Zelle weist dabei keine kostimulatorischen Moleküle auf, so dass die T Zelle nicht aktiviert werden und anschließend keine Differenzierung und Proliferation mehr durchführen (Anergie) kann. Zum anderen unterdrücken regulatorische T Zellen (T_{reg}) aktiv autoreaktive T-Zellen (Alpdogan and van den Brink, 2012).

Nach der negativen Selektion in der Medulla/Mark des Thymus, wandern reife T-Zellen in den peripheren Blutkreislauf und die sekundären lymphatischen Organe.

Die Neubildung von T-Zellen im Thymus hat seinen Höhepunkt bis zur Pubertät, so dass der Thymus sich von da an zurückbildet und im Erwachsenenalter kaum noch nachweisbar ist (Thymusinvolution), wobei die Thymusinvolution abhängig von der Genetik, von Umwelteinflüssen und vom Geschlecht variiert (Gui et al., 2012).

2.6.6 Diversität des TCR-Repertoires

Die notwendige Diversität des TCRs entsteht mit Hilfe der somatischen Rekombination, sowie der positiven und negativen Selektion. Diese Diversität führt dazu, dass jede T-Zelle ihren ganz spezifischen TCR mit einem α - β -Heterodimer ausgebildet hat, mit dem sie auch ihr passendes Antigen erkennen kann (Davis and Bjorkman, 1988; Gauss and Lieber, 1992). Bei der somatischen Rekombination werden auf DNA-Ebene zufällig verschiedene V-, J-, D-Gen-Segmente produktiv miteinander verknüpft. Eine Erhöhung der Diversität (junktionale Diversität) gelingt während der Rekombination zum einen durch den zufälligen Einbau von N-Nukleotiden (nicht kodierende Nukleotide) am 3'-Ende eines jeden kodierenden Genabschnittes mit Hilfe der terminalen Desoxynukleotidyltransferase und zum anderen durch den zufälligen Einbau von P-Nukleotiden (palindromische Sequenzen), die durch die Enden der rekombinierenden Gensegmente kodiert werden. P- und N-Nukleotide befinden sich zwischen den Gensegmenten V, J und D des umgelagerten TCR β -Gens. Durch dieses zufällige Einfügen eines Vielfachen von jeweils drei N-Nukleotiden kann die V β -CDR3-Region in ihrer Basenlänge stark variieren (Bonati et al., 1992; Cabaniols et al., 2001; Gilfillan et al., 1995).

Bei gesunden Menschen besteht somit ein Spektrum an T-Zellen, die aufgrund der oben beschriebenen Diversität TCRs mit unterschiedlichen Basenlängen exprimieren, damit im Falle einer notwendigen T-Zell-Immunreaktion auf ein bestimmtes Antigen auch ein entsprechend passende TCR zur Verfügung steht. Dieses Spektrum an verschiedenen TCRs, also das T-Zell-Rezeptor-Repertoire folgt durch seinen Längenpolymorphismus der CDR3-Region einer Gauß'schen Normalverteilung (C Pannetier et al., 1995), die mit Hilfe des CDR3 Spectratyping darstellbar ist. Bei der klonalen Expansion proliferieren die T-Zellen, mit einem TCR einer bestimmten Basenlänge, so dass hierbei Abweichungen von der Gauß'schen Normalverteilung entstehen (J Even et al., 1995). Mit Hilfe dieser Diversität entstehen ca. 10^{18} verschiedene individuelle TCR (Vgl. Tabelle 1).

Tabelle 1: TCR-Vielfalt

Die Tabelle zeigt die Anzahl der TCR-Gen-Segmente und Ursachen der TCR-Vielfalt (modifiziert nach Murphy K. et al. 2009, Copyright © 2008 durch Garland-Wissenschaft, Taylor and Francis Group, LLC, verwendet mit Genehmigung von W.W. Norton & Company, Inc., hier: wegen Copyrights © unkenntlich gemacht).

█	█	
	█	█
█	█	█
█	█	█
█	█	█
█	█	█
█	█	█
█	█	█
█	█	█

3. Zielsetzung der Arbeit

Ziel der Arbeit war, den Effekt von IVIg auf das TCR-Repertoire mittels CDR3-Spectratyping bei CIDP-Patienten zu untersuchen, dabei mögliche klinische Responder und Non-Responder zu identifizieren und somit das TCR-Repertoire als Surrogatmarker zur Therapieentscheidung und zum Therapiemonitoring zu nutzen.

4. Methoden

4.1 Ethikvotum

Die Ethikkommission der medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf genehmigte alle für diese Arbeit durchgeführten, klinischen Untersuchungen und Datenauswertungen nach der Erklärung von Helsinki (Studiennummer des Ethikvotums: 3315). Alle Patienten gaben zur wissenschaftlichen Nutzung ihrer Daten und Blutproben ihre schriftliche Einwilligung.

4.2 Patientenkollektiv

Alle in dieser Arbeit untersuchten Patienten wurden zwischen September 2009 und Oktober 2010 in der neurologischen Klinik der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf behandelt. Die Blutentnahmen erfolgten aus peripheren Venen in EDTA-Blutröhrchen (Ethyldiamintetraessigsäure) zur Vermeidung einer vorzeitigen Gerinnung. Es wurde das TCR-Repertoire von CIDP-Patienten ohne und mit IVIg-Therapie (Gamunex, Grifols, Barcelona, Spanien) miteinander, sowie mit Kontroll-Probanden verglichen. Dabei wurde keine Randomisierung nach Geschlecht oder Alter durchgeführt.

Insgesamt handelte es sich um 23 CIDP-Patienten zwischen 34 und 78 Jahren (mittleres Alter: 55 Jahre) mit 7 weiblichen und 16 männlichen Patienten. Von diesen 23 CIDP-Patienten erhielten 14 (Vgl. Tabelle 2 ohne Hervorhebung) vor der Blutprobenentnahme keine IVIg-Therapie, sondern nur Methylprednisolon oder Plasmaaustausch und wurden mindestens 4 Wochen vor der Probenentnahme weder immunmodulatorisch, noch immunsuppressiv therapiert. 11 der 23 CIDP-Patienten (Vgl. Tabelle 2 hellgraue Hervorhebung) erhielten eine Therapie mit IVIg für eine mittlere Dauer von 16 Monaten (Bereich 2-29 Monate).

Als Kontrollen untersuchten wir 14 Patienten mit nicht-inflammatorischer Polyneuropathie (niPNP) im Alter von 27 bis 78 (mittleres Alter: 61 Jahre) mit 5 weiblichen und 9 männlichen Patienten (Vgl. Tabelle 3), sowie 11 Kontroll-Probanden ohne Polyneuropathie bzw. ohne weitere bekannte Erkrankungen (KP) im Alter von 27 bis 74 Jahren (mittleres Alter: 53 Jahre) mit 6 weiblichen und 5 männlichen Probanden (Vgl. Tabelle 4).

2 Patienten (C4/Ct6 und C8/Ct8) der 11 mit IVIg therapierten Patienten untersuchten wir im Verlauf nach 2 und 7 Monaten, um die Wirkung von IVIg besser verfolgen zu können (Vgl. Tabelle 2, dunkelgraue Hervorhebung).

Die Diagnose der CIDP erfolgte entsprechend der Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Neurologie. Mit Hilfe der INCAT (Behinderungs-) Skala konnte bereits im Vorfeld der Grad der körperlichen Behinderung eingeschätzt werden, um eine Verbesserung nach der Gabe von IVIg evaluieren zu können (Hughes et al., 2001; Merkies and Schmitz, 2006; Richard A C Hughes et al., 2008). Hierzu wurden die klinischen Symptome in Form von INCAT-Punkten über einen Zeitpunkt 0, nach 6 Monaten und am Ende der Therapie, die eine mittlere Dauer von 16 Monaten betrug (Bereich 2-29 Monate), festgehalten. Dazu sind in Tabelle 2 die einzelnen CIDP-Patienten und die CIDP-Patienten, die mit IVIg behandelt worden sind, mit Alter, Geschlecht, Diagnose, Therapie und Verlauf der PNP aufgelistet.

Tabelle 2: CIDP Patienten

Patient	Geschlecht	Alter [Jahre]	Diagnose	Präsentation	Therapie vor Probenentnahme	alle Therapien	Verlauf	Tag der Diagnose	Dauer IVIg-TH [Monat]	INCAT-Punkte, Zeitpunkt 0	INCAT-Punkte nach 6 Monaten	Veränderung der INCAT-Punkte	INCAT-Punkte am Ende der TH
C1	f	45	CIDP MGUS	mot-sens	MP	MP, IVIg, PE, Cyclo	verschlechternd	09.2009	-	1	4	7	8
C2	m	77	MADSAM	mot-sens		IVIg, Cyclo	verschlechternd	NV	-	1	1	1	2
C3	m	53	CIDP / MADSAM	mot	MP	MP, Aza, IVIg	sich bessernd	04.2009	-	2	1	-1	1
C4	m	66	CIDP sens	sens	MP	MP, Aza, IVIg	stabil	Herbst 2007	-	0	0	0	0
C5	m	50	CIDP	NV	NV	NV	nicht verfügbar	NV	NV	NV	NV	NV	NV
C6	f	33	CIDP, axonal	mot-sens		IVIg	stabil	NV	-	2	2	0	2
C7	m	57	CIDP	sens	MP	MP, Aza, IVIg	sich bessernd	2003	-	6	5	-1	5
C8	f	71	CIDP	mot-sens	MP	MP, Aza, PE, IVIg, Cyclo, Ritux	sich bessernd	Mitte 2006	-	7	3	-3	4
C9	m	60	CIDP / DM II PNP	mot-sens		IVIg, PE, Cyclo	stabil	Frühjahr 2008	-	4	4	0	4
C10	f	74	CIDP	mot-sens		IVIg	stabil	12.2009	-	1	1	0	1
C11	m	56	CIDP	NV	NV	NV	nicht verfügbar	NV	NV	NV	NV	NV	NV
C12	m	46	CIDP axonale Variante	mot-sens		IVIg, MP, Aza	stabil	NV	-	1	1	0	1
C13	m	40	CIDP	mot-sens	MP	MP, Aza	sich bessernd	NV	NV	1	0	-1	0
C14	m	56	MMN MGUS	mot-sens		IVIg	stabil	NV	NV	2	2	0	2
Ct1	m	56	CIDP	mot-sens	IVIg, MP, PE	IVIg, MP, PE, IVIg, 1x Cyclo	verschlechternd	02.2008	25	4	6	4	8
Ct2	f	71	CIDP	mot-sens	MP, IVIg	MP, IVIg, Aza, MMF	stabil	06.2007	29	2	2	0	2
Ct3	m	43	CIDP / LSS	mot-sens	MP, IVIg	MP, IVIg	stabil	2002	5	1	1	0	1
Ct4	m	58	ax-demy PNP / CIDP	mot-sens	MP, IVIg	MP, Aza, IVIg	stabil	05.2006	15	2	2	0	2
Ct5	f	58	CIDP MGUS	mot-sens	MP, IVIg	MP, Aza, IVIg, Ritux, PE, Cyclo, IVIg	stabil	NV	7	1	2	0	1
Ct6	m	67	CIDP sens	sens	MP, IVIg	MP, Aza, IVIg	stabil	NV	2	0	0	0	0
Ct7	f	71	CIDP	mot-sens	MP, PE, IVIg	MP, Aza, PE, IVIg, Cyclo, Ritux	sich bessernd	NV	19	7	3	-3	4
Ct8	f	68	axonale PNP / CIDP	mot-sens	IVIg	IVIg	stabil	2003	17	1	1	0	1
Ct9	m	75	MMN	mot	IVIg	IVIg	stabil	2003	29	4	4	0	4
Ct10	m	68	MMN	mot-sens	IVIg	IVIg	verschlechternd	12.2008	12	5	4	2	7
Ct11	m	86	PNP MGUS	mot-sens	NV	NV	nicht verfügbar	NV	NV	1	NV	NV	NV

Tabelle 3: niPNP-Patienten

Patientenschlüssel	Geschlecht	Alter in Jahren	Diagnose
N1	m	77	Axonal-demyelinisierende PNP, nicht näher charakterisiert
N2	f	57	V.a. CMT1a, noch nicht humangenetisch gesichert
N3	f	45	CMT1a (genetisch gesichert)
N4	f	27	Axonal-demyelinisierende, sensomotorische PNP, DD CMT1a
N5	f	70	Axonal-sensomotorische PNP, Z. n. MTX bei RA
N6	m	74	Axonale sensomotorische PNP, Z. n. Alkohol-Abusus
N7	m	75	Axonal-sensomotorische PNP, Morbus Parkinson
N8	f	50	Axonal-sensomotorische PNP, Z. n. Alkohol-Abusus
N9	m	73	Degenerative sensible PNP
N10	m	78	PNP bei Diabetes mellitus Typ 2
N11	m	72	PNP a. e. chemotoxisch bei Chronisch myelonischer Leukämie
N12	m	67	Sensomotorisch axonal-demyelinisierende PNP, Immunhistochemisch keine Neuritis-Sicherung
N13	m	57	Sensomotorisch axonal- demyelinisierende PNP, Polymyalgia rheumatica DD RA
N14	m	78	Sensomotorische axonal-demyelinisierende PNP, Diabetes mellitus Typ 2, Morbus Alzheimer

Tabelle 4: Kontroll-Probanden

Patientenschlüssel	Geschlecht	Alter in Jahren
K1	f	30
K 2	f	31
K 3	m	59
K 4	f	54
K 5	f	28
K 6	f	26
K 7	f	67
K 8	m	35
K 9	m	68
K 10	m	30
K 11	m	24

Abkürzungen: Ax – axonal, Aza – Azathioprin, CMT1a - Hereditäre motorisch-sensorische Neuropathie Typ 1 / HMSN1 / Morbus Charcot-Marie-Tooth, Cyclo – Cyclophosphamid, demy – demyelinisierend, f – female / weiblich, m – masculin / männlich, MP - Methylprednisolon, MADSAM - multifocal acquired demyelinating sensory and motor neuropathy / Multifokale erworbene demyelinisierende sensorische und motorische Neuropathie / LSS - Lewis-Sumner-Syndrom, MGUS – monoklonale Gammopathie unklarer Signifikanz, MMF – Mycophenolat Mofetil, mot – motorisch, NV - nicht verfügbare Daten, PE – plasma exchange / Plasmaaustausch, RA – rheumatoide Arthritis, Ritux – Rituximab, sens – sensorisch, TH – Therapie

4.3 Separierung von CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten

Die Aufreinigung von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen aus dem peripheren Blut erfolgte durch immunologische negative Selektion mit Hilfe eines humanen CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellisierungskits nach dem Protokoll des Herstellers (RosetteSep, STEMCELL Technologies, Frankreich), (Beeton and Chandy, 2007). Zur Markierung unerwünschter Zellen mit Antikörperkomplexen und magnetischen Partikeln wurden 50µl des humanen CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellisierungskits pro ml Blut vermischt. Für CD4⁺ T-Zellen wurden 3ml und für CD8⁺ T-Zellen 6ml des frischen Blutes verwendet. Nach 20 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur im Dunkeln wurde das T-Zell-Gemisch mit gleichem Volumen 2%FCS/PBS (Lonza, Verviers, Belgien) aufgefüllt und auf einen Ficoll-Gradienten (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Schweden) geschichtet, wobei 4ml Ficoll für CD4⁺ und 15ml Ficoll für CD8⁺ T-Zellen vorlegt wurden.

Nach Zentrifugation (20 min, 2100 rpm, ohne Bremse, bei Raumtemperatur) wurde die entstandene Interphase mit einer Plastikpipette abgenommen und mit 2%FCS/PBS gewaschen.

Nach erneuter Zentrifugation (10min, 1400 rpm, 4°C) wurde die Flüssigkeit oberhalb der Zellpellets abgesaugt und mit reinem PBS (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) gewaschen (10min, 1400 rpm, 4°C).

Nachdem die Flüssigkeit über dem Zellpellet abgesaugt worden war, wurde das Zellpellet zur RNA Präparation mit 700µl Trizol (Invitrogen, Mannheim, Deutschland) resuspendiert, gut gemischt und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die T-Lymphozyten RNA bei -20°C eingefroren.

4.4 Gewinnung von RNA aus T-Lymphozyten

Beim Arbeiten mit RNA musste darauf geachtet werden, eine Degradierung der RNA durch exogene RNasen (Ribonukleasen) zu verhindern. Da RNasen nicht wie DNasen durch Autoklavieren inaktiviert werden können, wurden alle mit RNA verwendeten Lösungen zur Eliminierung der RNasen mit 0,1% Diethylpyrocarbonat (DEPC, PanReac AppliChem, Darmstadt, Deutschland) behandelt. Anschließend wurden die Lösungen autoklaviert, da so DEPC zersetzt wurde. Hitzeinstabile Lösungen wurden mit DEPC-behandeltem Aqua dest. angesetzt. Es wurden nur sterile, für die Arbeit mit RNA ausgezeichnete Plastikgefäße und sterile Plastikpipetten sowie gestopfte

Pipettenspitzen verwendet. Es wurde, ebenso wie beim Umgang mit DNA, nur mit Handschuhen gearbeitet.

Die Gesamt-RNA wurde unter Verwendung eines Trizol-Reagenz gemäß den Anweisungen des Herstellers gewonnen und quantifiziert (Nanodrop 2000, Thermo Scientific, NanoDrop products, Wilmington, USA).

Im Detail wurde für die RNA-Gewinnung die in Trizol gemischten T-Zellen mit 180µl Chloroform 50mal invertiert, 10 Minuten lang bei Raumtemperatur inkubiert und 15 Minuten bei 6°C und 12000rpm zentrifugiert. Anschließend wurde die obere Phase abgenommen und mit 1µl Glycogen, als Trägersubstanz für die RNA, vermischt. Als nächstes wurden 500µl Isopropanol zum Fällen der RNA hinzugegeben. Nach sorgfältigem Mixen und 20 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur, wurde 10 Minuten lang bei 4°C und 12000rpm zentrifugiert. Nach Abkippen der oberen Flüssigkeit wurde 1ml 70%iges in DEPC-H₂O verdünntes Ethanol zum Reinigen der RNA dazugegeben. Nach 15-minütiger Zentrifugation bei 4°C und 12000rpm wurde die Restflüssigkeit abgenommen, so dass ein RNA-Pellet zurückblieb. Dieses RNA-Pellet wurde in 10µl DEPC-Wasser gelöst, für 10 Minuten zum Lösen der RNA auf 56°C erwärmt und dann bei -20°C eingefroren. Der RNA-Gehalt dieser Probe wurde über optische Dichtebestimmung im NanoDrop (Thermo Scientific, Wilmington, USA) gemessen.

4.5 Photometrische Konzentrations- und Reinheitsbestimmung

Die Kalibrierung erfolgte gegen DEPC-Wasser. Zur Berechnung der Konzentration wurde, unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors, folgende Beziehung verwendet:

$$1,0 A_{260} \cong 37 \mu\text{g ssNS/ml}$$

Zur Überprüfung der Reinheit von RNA-Lösungen wurde das Verhältnis der Absorptionswerte bei 260 und 280 nm bestimmt. Reine Präparationen sollten A_{260}/A_{280} Werten zwischen 1,7 und 2,1 besitzen. Kontaminationen mit Proteinen führen zu deutlich geringeren Werten. Diese photometrische Konzentrations- und Reinheitsbestimmung wurde im NanoDrop durchgeführt.

4.6 Reverse Transkription

Die Synthese der cDNA erfolgte unter Verwendung von 1µg Gesamt-RNA mit einer M-MLV reversen Transkriptase und einem Oligo-dT-Primer (beides Invitrogen) gemäß dem Herstellerprotokoll.

Nach der RNA-Messung durch den NanoDrop wurde der Gesamt-RNA-Gehalt ermittelt. Dieser sollte zwischen 0,2-1µg (bestenfalls zwischen 0,8-1µg) liegen. Die RNA wurde mit DEPC-Wasser zur RNasen-Inaktivierung zu einem Gesamtvolumen von 10,5µl aufgefüllt. Zu diesem Gemisch wurde 1µl Oligo(dT)₁₂₋₁₈ Primer (0,5µg/µl) beigemischt und 10 Minuten auf 70°C erwärmt, so dass der Primer sich hier an die RNA anlagern konnte, d. h. dieser Primer am 5' Ende phosphoryliert. Zum Abkühlen wurde das Gemisch sofort auf Eis gestellt.

Im Anschluss wurde ein Mastermix (8,5 µl) aus:

- 0,2µM/µl DTT (Dithiothreitol)
- 5x Puffer [250mM Tris-HCl (pH 8.3 bei Raumtemperatur), 375mM KCl, 15mM MgCl₂] nach den Herstellerangaben von Invitrogen
- 0,01µMol/µl dNTP Mix
- 40Einheiten/µl RNaseOUT™ rekombinanter Ribonuklease Hemmer
- 200Einheiten/µl M-MLV (Moloney Murine Leukemia Virus) reverse Transkriptase

zu einem Gesamtvolumen von 20µl hinzugefügt (siehe die Herstellerangaben von Invitrogen für den Oligo(dT)₁₂₋₁₈ Primer).

Dieses 20µl „RNA-Oligo-dT-Primer-Mastermix-Gemisch“ wurde nun 1 Stunde bei 37°C, 5 Minuten bei 95°C inkubiert und anschließend auf 4°C abgekühlt, so dass die RNA in diesem Prozess mit Hilfe der MMLV reversen Transkriptase in eine cDNA umgeschrieben werden konnte.

Das jetzt entstandene cDNA-Gemisch wurde mit 80µl DEPC-Wasser zu 100µl Gesamtvolumen aufgefüllt.

4.6.1 Amplifikation der CDR3-Region des TCR

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) dient der Vervielfältigung bestimmter Gen-Abschnitte. An diese Gen-Abschnitte lagern sich nach Auftrennung beider DNA-Stränge durch Denaturierung (Erhitzung auf über 90°C) Primer an (Annealing

genannt). Als Elongation wird eine Verlängerung der DNA von den Primern ausgehend durch die DNA-Polymerase durch Einbau der komplementären N-Nucleotide genannt. Zur Vervielfachung der spezifischen CDR3-Region des TCRs wurde folgender Mastermix (25µl) nach Herstellerangaben (Taq DNA Polymerase, dNTPack von Roche Diagnostics Deutschland GmbH Roche Applied Science, Mannheim) angefertigt, wobei insgesamt jeweils für CD4⁺ und CD8⁺ TCR 26 Vβ-Primer à 2,5µl (Vβ1 bis Vβ26) (Invitrogen) hinzugefügt wurden:

- 16,75µl DEPC-H₂O
- 10x Puffer mit MgCl₂ konzentriert
- 0,5µMol/µl dNTP`s
- 1,25µl Cβ-Primer
- 2,5µl Vβ-Primer
- 0,25µl Taq-DNA-Polymerase (5 Einheiten/µl)
- 2,5µl cDNA

Bei dieser PCR wurde die cDNA zunächst 5 Minuten lang auf 94°C erhitzt, damit sich beide DNA-Einzelstränge an den Wasserstoffbrückenbindungen trennen konnten, d. h. denaturierten. Danach wurden 40mal folgende drei Schritte durchlaufen:

1 Minute bei 94°C Denaturierung (Trennung der beiden DNA-Stränge)

1 Minute bei 60°C Annealing (Anlagerung der spezifischen Primer an den spezifischen, zu verlängernden DNA-Abschnitt)

4 Minuten bei 72°C Elongation (Verlängerung und Amplifikation des entsprechenden DNA-Abschnitts durch Einfügen von dNTPs vom 5`- zum 3`-Ende mit Hilfe der DNA-Polymerase, wodurch ein neuer Einzelstrang gebildet wurde.)

Am Ende wurde noch einmal für 10 Minuten bei 72°C elongiert und anschließend auf 4°C abgekühlt.



Abbildung 5: Gen-Segment für die β-Kette des TCR

In dieser Abbildung ist das Gen-Segment für die β-Kette des TCR mit den jeweiligen Vβ-, Jβ- und Cβ-Gen-Segmenten und der CDR3-Region, die während der PCR amplifiziert werden soll, dargestellt (modifiziert nach C Pannetier et al., 1995, Copyright © 2018 mit Genehmigung von Elsevier, hier: wegen Copyrights © unkenntlich gemacht).

4.6.2 CDR3-Spectratyping

Das CDR3 Spectratyping ist eine Methode zur Charakterisierung der TCR-Variabilität. Zur Darstellung der CDR3-Region der TCR β -Ketten wird diese amplifiziert und die auftretenden Längen der Vervielfältigungen analysiert. Hierzu bedarf es spezieller, spezifischer Primer. Es gibt 24 V β -Genabschnitte beim Menschen, wobei mittlerweile unterschiedliche Versionen bekannt sind, so dass zur Amplifikation dieses Genabschnittes 26 spezifische Vorwärts-Primer verwendet wurden, wodurch das gesamte Repertoire an TCR betrachtet werden konnte (C Pannetier et al., 1995b; Schwab et al., 2009). Daraus ergibt sich, dass für die Genabschnitte V β 5 und V β 13 jeweils 2 Primer (V β 5,1, V β 5,2 und V β 13,1, V β 13,2) verwendet wurden, da es sich hierbei um unterschiedliche Varianten mit unterschiedlichen Genabschnitten handelt. Als Rückwärts-Primer wurde nur ein C β -Primer, dessen Sequenz in der C β -Region liegt, eingesetzt. Dieser C β -Primer (Invitrogen) wurde am 5'-Ende mit Cyanin 5 fluoreszenzmarkiert, um die PCR-Produkte zu detektieren.

Für diese Methode wurde 1 μ l des PCR-Produktes in einen Mastermix aus 18 μ l Formamid (Hi-Di™ Formamide, Thermo Fisher Scientific Inc., USA) und 0,25 μ l 400HD-ROX (Applied Biosystems, USA) Größenstandart pipettiert. Der 400HD ROX ist ein ROXTM-Fluorophor-markierter Standard für eine reproduzierbare Fragmentanalyse. Der Standard enthält 21 ROXTM-farbstoffmarkierte DNA-Fragmente für die Größenbestimmung von DNA-Fragmenten im Bereich von 50-400 Nukleotiden und liefert 21 markierte Fragmente, woraus eine Größenkurve resultiert (Thermofisher, Deutschland). Im weiteren Schritt wurden die DNA-Stränge 5 Minuten durch Erhitzung auf 96°C denaturiert und im automatischen Sequenziergerät über eine POP4 Matrix gelelektrophoretisch mit einer Elektrophoresespannung von 100V bis 15kV der Größe nach im ABI310 (Automatisches Sequenziergerät, „ABI PRISM® 310 Genetic“, Applied Biosystem) in 10 bis max. ca. 1.000 Basenpaaren aufgetrennt. Die Detektion erfolgte über Cyanin 5, der Größenstandard ist ROX markiert. Die kontinuierliche Detektion der Fluoreszenzfarbstoff-markierten Fragmente erfolgte durch Anregung der Farbstoffe über einen fokussierten Argon Laser und die Auswertung der Emission nach spektraler Aufspaltung an einem Beugungsgitter im Emissionsbereich von 520 bis 700nm über eine hochauflösende CCD-Kamera (Advanced Biolab Service, München).

4.7 Auswertungsstrategien

Die Auswertung erfolgte mit Hilfe des Programms Peak Scanner von Applied Biosystems. Mit diesem Programm ist es möglich, die unterschiedlichen Basen-Längen der 26 verschiedenen PCR-Produkte aller 24 V β -Elemente auf der Abszisse graphisch darzustellen. Die Ordinate gibt die Leuchtintensität, die durch die CCD-Kamera aufgenommen wurde, wieder, was somit ein Korrelat zur PCR-Produkt-Menge ist.

Bei gesunden Menschen ohne bekannte Infektionen bzw. Erkrankungen oder beispielsweise gesunden Neugeborenen, Säuglingen und Kindern folgt diese Variabilität an V β -CDR3-Längen auf der Abszisse im Zusammenhang mit der PCR-Produkt-Menge bzw. der gemessenen Basen-/TCR-Menge auf der Ordinate einer Gauß'schen Normalverteilung, d. h. hier gibt es keine Verschiebungen in den Basenlängen (Bonarius et al., 2006; Kou et al., 2000; Monteiro et al., 1996). Durch den zufälligen Einbau von jeweils drei N-Nukleoiden zwischen den Gensegmenten V, J und D des umgelagerten TCR β -Gens kann die V β -CDR3-Region in ihrer Basenlänge stark variieren (Bonati et al., 1992; Cabaniols et al., 2001; Gilfillan et al., 1995), so dass es zur Generierung verschieden langer TCRs kommt, die zu dieser Gauß'schen Normalverteilung führen. Diese Normalverteilung spiegelt daher die Vielfalt an verschiedenen T-Zellen mit ihren individuellen T-Zell-Rezeptorlängen ohne bekannte aktive T-Zell-Immunabwehr (C Pannetier et al., 1995) dar. Im Rahmen einer T-Zell-Immunabwehr kommt es durch bestimmte Antigene zur T-Zell-Aktivierung und zur klonalen TCR-Expansion, bei der nur eine bestimmte TCR-Länge passend zu dem entsprechenden Antigen exprimiert wird, so dass Abweichungen von der Normalverteilung im TCR-Repertoire entstehen. Diese Abweichungen können zum einen durch eine extreme PCR-Produktmengen Zunahme, d.h. durch einen sehr hohen Peak auf der Ordinate und zum anderen durch eine veränderte Basenlänge auf der Abszisse zu erkennen sein (Abbildung 6).

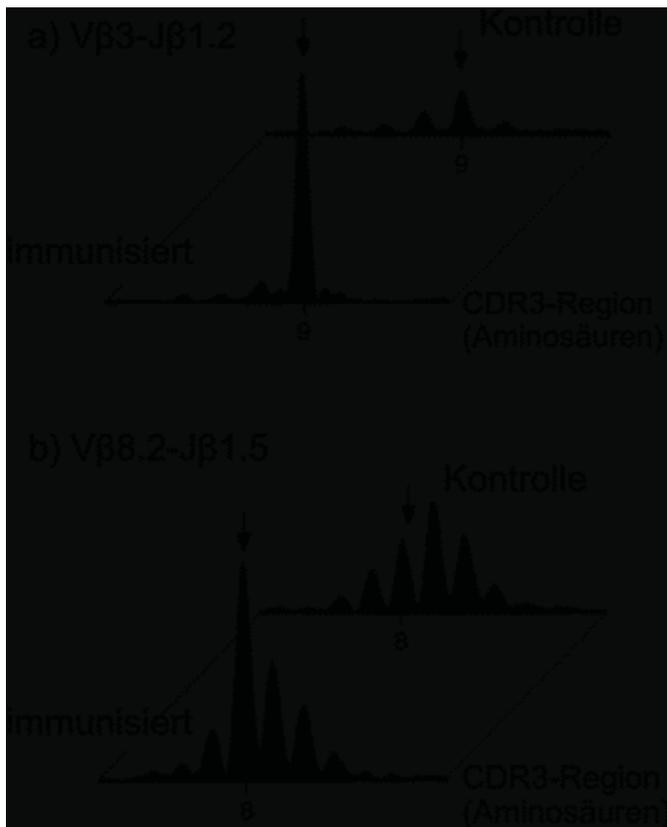


Abbildung 6: Vβ3 (a) und Vβ8.2-Profil (b)

In beiden Abbildungen folgt das Vβ3 (a) und das Vβ8.2-Profil (b) der Kontrolle einer Gauß'sche Normalverteilung, so dass anhand dieser das Profil nach der Immunisierung verglichen werden kann (modifiziert nach C. Pannetier et al., 1995, Copyright © 2018 mit Genehmigung von Elsevier, hier: wegen Copyrights © unkenntlich gemacht).

a Das Vβ3-Profil hat sich an Position 9 auf der Abszisse auf der die Länge der CDR3-Region in Aminosäuren angegeben ist, nach der Immunisierung verändert. Auf der Ordinate sind im Vergleich zur Kontrolle eine deutliche Größenzunahme dieses Peaks und eine gleichzeitige Abnahme der benachbarten Peaks zu erkennen. Das bedeutet, dass mehr PCR-Produkt im Bereich dieser CDR3-Länge und weniger PCR-Produkt in den benachbarten CDR3-Basenlängen entstanden ist. Daraus ist zu schließen, dass eine klonale T-Zell-Expansion stattgefunden hat, bei der durch eine T-Zell-Aktivierung mit Hilfe eines Antigens – hier durch die Immunisierung - eine bestimmte T-Zell-Effektorzelle, die den passenden TCR für dieses Antigen hat, schnell und in großer Anzahl vermehrt worden ist. Diese Graphik wird daher als monoklonale TCR-Expansion eingestuft, da fast ausschließlich dieser eine Peak detektierbar ist und keine Normalverteilung mehr besteht.

b Das $V\beta 8.2$ -Profil hat sich an Position 8 auf der Abszisse nach der Immunisierung verändert. Auf der Ordinate ist im Vergleich zur Kontrolle eine deutliche Größenzunahme dieses einen Peaks ohne Veränderung der benachbarten Peaks zu erkennen. Das bedeutet, dass auch hier mehr PCR-Produkt entstanden ist, hier jedoch bei gleichbleibender PCR-Produkt-Menge der TCRs mit anderen Basenlängen (benachbarte Peaks). Die Schlussfolgerung ist, dass hier nur eine leichte klonale T-Zell-Expansion stattgefunden hat. Diese Graphik wird als verschoben eingestuft und weicht nur leicht von der Normalverteilung ab.

4.8 Analyse der Spectratyping Daten

Das hier vorgestellte Bewertungssystem sollte den relativ komplexen Datensatz, der beim CDR3-Spectratyping entstand, klassifizieren und damit Normalverteilungen (C Pannetier et al., 1995) von leichten und großen Abweichungen differenzieren helfen. Es wird im Folgenden erklärt und in Abbildung 7 durch repräsentative Spectratyping-Profile veranschaulicht. Nimmt eine T-Zelle mit einer bestimmten TCR Länge durch klonale Expansion nach Antigenerkennung zu, resultiert das in einem höheren Anteil dieser TCR-Länge innerhalb eines bestimmten $V\beta$ -Elements. Die dadurch resultierende Zunahme des PCR-Produkts des TCR dieser Länge bedingt eine Zunahme der Fluoreszenz bei PCR-Produkten dieser Länge und damit eine Abweichung von der zu erwartenden Normalverteilung. Die Längenverteilung der einzelnen $V\beta$ -Elemente des TCR-Repertoires in der CDR3-Region wurden in vier Verteilungs-Varianten graphisch dargestellt: 1. normal (n); 2. verschoben (s); 3. verzerrt (w) und 4. monoklonal (m) oder biklonal (b).

Als normal wurde eine Verteilung einzelner $V\beta$ -Elemente im TCR-Repertoire bewertet, wenn sie einer Gauß'schen Normalverteilung folgte. Die Normalverteilung ist hauptsächlich bei gesunden Individuen zu erwarten (J Even et al., 1995; C Pannetier et al., 1995; Puisieux et al., 1994). Eine Verteilung der TCR-Längen, bei der alle CDR3-Basenlängen detektierbar waren, einzelne aber geringfügig von der Normalverteilung abwichen, wurde als verschoben bewertet. Eine TCR-Längenverteilung wurde als verzerrt bewertet, wenn durch die deutliche Zunahme anderer TCR-Längen des gleichen $V\beta$ -Elementes manche Längen nicht mehr detektierbar waren. Eine extreme Verzerrung der Normalverteilung, bei der nur eine (monoklonal) oder zwei (biklonal) Längen detektierbar waren, wurde als oligoklonal eingestuft.

Zur besseren Veranschaulichung haben wir die vom Peak Scanner Programm erstellten Graphiken (Peaks) in einem Power Point Programm zusammengestellt.

Danach erfolgte die Einstufung in normale, verschobene, verzerrte oder klonale Verteilungen. Diese Daten führten wir in Exceltabellen auf und zählten die Anzahl der jeweiligen Verteilungen zum einen pro Proband und zum anderen pro V β -Element. Diese Daten rechneten wir prozentual um und stellten sie graphisch mittels dem Statistikprogramm GraphPad Prism 5 dar. Wie oben bereits beschrieben worden ist, haben wir die Probanden bis auf zwei Patienten (C4/Ct6 und C8/Ct8) nicht im Verlauf beobachtet, so dass wir direkte Vergleiche nur zwischen dem CD4⁺ und CD8⁺ TCR-Repertoire der jeweiligen Probanden bzw. V β -Elementen durchführen konnten. Die jeweiligen Kohorten (CIDP, CIDP IVIg, niPNP und KP) haben wir rein deskriptiv verglichen.

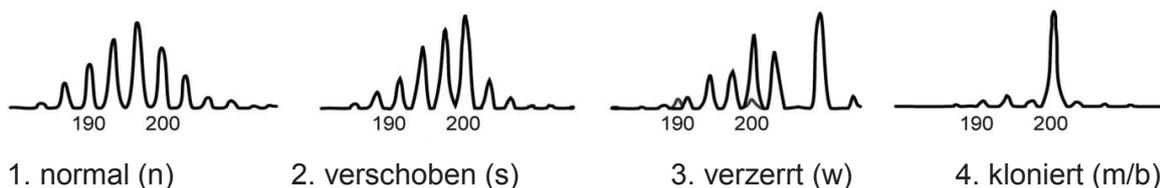


Abbildung 7: Spectratyping-Profile mit den Veränderungen von der Normalverteilung (modifiziert nach Mausberg et al., 2013, Copyright © 2018 mit Genehmigung vom Wolters Kluwer Permissions Team)

1. Dieses Profil stellt die Gauß'sche Normalverteilung (normal, n) des TCR-Repertoires anhand der Variabilität an V β -CDR3-Basen-Längen dar. Der höchste Peak befindet sich in der Mitte. Jeweils links und rechts dieses Peaks befinden sich drei weitere deutlich detektierbare Peaks, die parallel zueinander in ihrer Höhe abnehmen. Insgesamt handelt es sich um 7 deutlich detektierbare Peaks, die zusammen eine „glockenförmige“ Gauß'sche Normalverteilung darstellen, anhand der die Abweichungen 2. bis 4. verglichen und eingestuft wurden.
2. In diesem Profil sind alle 7 Peaks detektierbar. Allerdings weichen einzelne Peaks v. a. in ihrer Höhe, d.h. in ihrer PCR-Produkt-Menge, von der Normalverteilung (1.) ab, so dass diese TCR-Repertoire-Verteilung nicht normal, sondern verschoben (s) ist.
3. In diesem Profil sind nicht alle 7 Peaks deutlich zu detektierenden. Da einzelne Peaks fehlen, besteht eine starke Abweichung zur Normalverteilung. Die TCR-Repertoire-Verteilung ist verzerrt (w). Hier ist nicht nur das PCR-Produkt einzelner CDR3-Basenlängen verändert, sondern es treten sogar neue PCR-Produkte mit anderen CDR3-Längen auf.
4. In diesem Profil ist die Zunahme des PCR Produktes einer Länge so deutlich, dass die anderen Peaks unter die Nachweisgrenze fallen und nur noch ein (wie hier abgebildet, monoklonal, m) oder 2 Peaks (biklonal, b) detektierbar sind.

4.9 Statistische Analyse

4.9.1 T-Test

Der T-Test dient als parametrisches, statistisches Verfahren der Signifikanzprüfung von Mittelwertunterschieden bei Normalverteilungen. Ein signifikanter Mittelwertsunterschied liegt dann vor, wenn der p-Wert als Wahrscheinlichkeitswert $p \leq 0,05$ ist, ein hoch signifikanter Mittelwertsunterschied ist ab $p \leq 0,01$ und ein höchst signifikanter Unterschied beginnt bei $p \leq 0,001$. Getestet wurde hier im Konfidenzintervall (KI) von 95% (Ebner, C., 1985), d. h. dass der wahre Wert in mindestens 95% der berechneten Konfidenzintervalle auf der Grundlage aller gemessenen Daten liegt (Dorey, 2010).

In dieser Arbeit wurde der T-Test für zwei unabhängige Stichproben mittels GraphPad Prism 5.0 (GraphPad, La Jolla, CA, USA) angewandt. Es wurde der Mittelwertunterschied zwischen den CIDP-Patienten als erste Stichprobe und den mit IVIg therapierten CIDP-Patienten, sowie den beiden Kontrollen (niPNP, KP) als jeweils zweite Stichprobe zum einen ermittelt. Zum anderen wurde der Mittelwertunterschied zwischen den mit IVIg therapierten CIDP-Patienten und den Kontrollen (Kontroll-Probanden und niPNP) errechnet, um den Einfluss von IVIg auf das TCR-Repertoire untersuchen zu können (Vgl. Tabelle 5, Ergebnisse).

5. Ergebnisse

5.1 Spectratyping der Patientenkohorten

Wir verglichen die T-Zellpopulationen aus dem Blut unbehandelter Patienten mit CIDP (CIDP, C1-C14), IVIg behandelter Patienten mit CIDP (CIDP IVIg, Ct1-Ct11) und als Kontrollen Patienten mit nicht-inflammatorischer Polyneuropathie (niPNP, N1-N14) sowie Kontroll-Probanden (KP, K1-K11) (Vgl. Tabelle 2, sowie Abbildung 8 und 9).

5.1.1 Spectratyping Profile der CD4⁺ Population

In der CD4⁺-Population war die Mehrzahl der V β -Elemente in allen vier Kohorten normal verteilt. Oligoklonale Expansionen waren fast nicht nachweisbar. Verzerrte V β -Elemente waren in der CIDP-Gruppe und bei den mit IVIg behandelten Patienten mit CIDP nachweisbar, aber nicht bei den Kontroll-Gruppen (niPNP, KP). Verschobene Repertoires kamen häufiger bei Patienten mit CIDP als bei den IVIg-behandelten CIDP-Patienten vor.

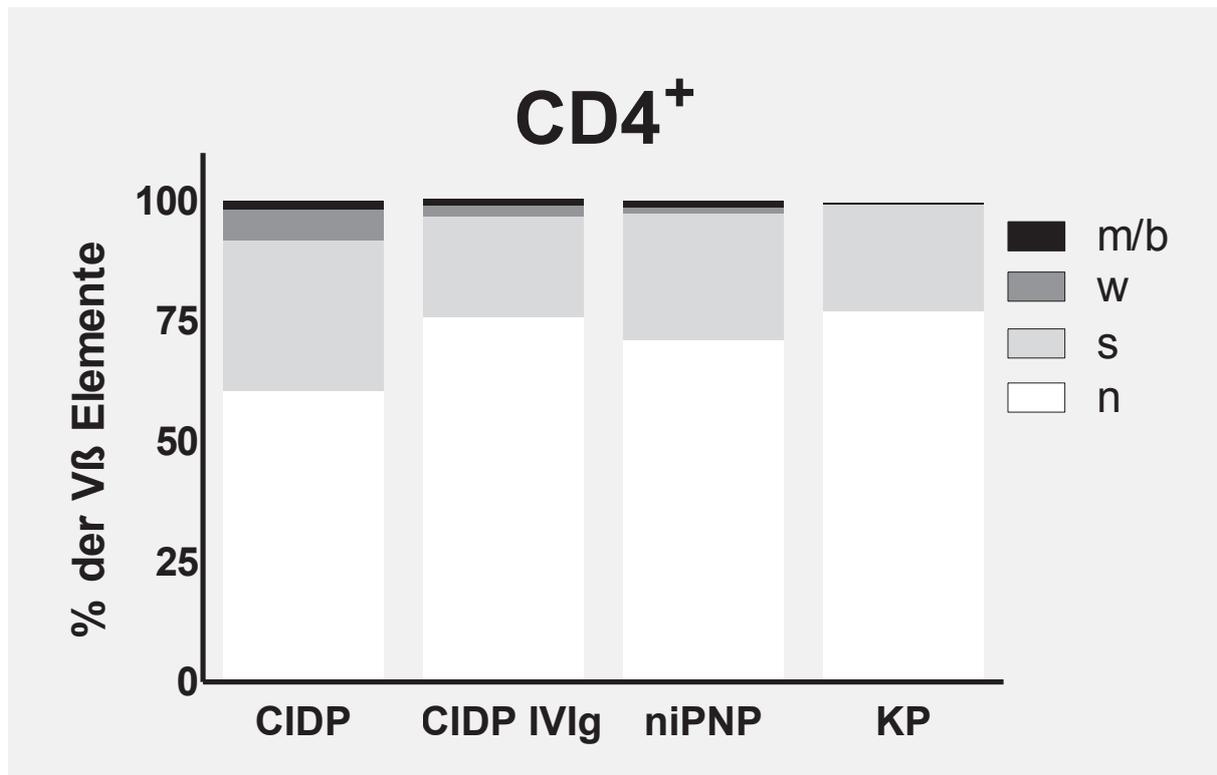


Abbildung 8: Prozentuale V β -Element-Verteilung der CD4⁺ T-Zellen aller Probanden

Basierend auf dem in Abbildung 7 eingeführten Bewertungssystem wurde die klonale Expansion in der CD4⁺-Population von Patienten mit chronisch-entzündlicher, demyelinisierender Polyneuropathie (CIDP), mit intravenösem Immunglobulin behandelte

CIDP-Patienten (CIDP IVIg), Patienten mit nicht-inflammatorischer Polyneuropathie (niPNP) und Kontroll-Probanden (KP) untersucht. Es wurden pro Proband 24 V β -Elemente analysiert, der Grad der Abweichungen bestimmt und der Mittelwert für jede Kohorte berechnet. oligoklonal: schwarz (m/b), verzerrt: dunkelgrau (w); verschoben: grau (s); normal: weiß (n)

Bei den Kontroll-Probanden war der Anteil der V β -Elemente, die normal verteilt waren, zwar am größten, jedoch waren auch hier verschobene Elemente zu detektieren (KP: normal 77 ± 6 ; verschoben 22 ± 3 [%]).

Im Vergleich dazu war bei den Patienten, die an einer nicht-inflammatorischen Polyneuropathie erkrankt waren, eine geringfügig stärkere Abweichung von der Normalverteilung zu detektieren (niPNP: normal 72 ± 1 ; verschoben 26 ± 1 ; verzerrt 1 ± 1 ; oligoklonal 1 ± 1 [%]). Die größten Abweichungen traten bei den CIDP Patienten ohne IVIg-Therapie im Vergleich zu den restlichen Probanden auf, so dass das CD4⁺ TCR-Repertoire hier wesentlich häufiger verschoben, verzerrt und kloniert und somit stark abgewichen war (CIDP: normal 61 ± 11 ; verschoben 31 ± 6 ; verzerrt 6 ± 4 ; oligoklonal 2 ± 1 [%]). Bemerkenswert war in diesem Zusammenhang, dass das CD4⁺ TCR-Repertoire der mit IVIg therapierten CIDP-Patienten bis auf einige verzerrte und oligoklonale Abweichungen dem Spectratyping-Profil der Kontroll-Probanden sehr ähnlich war (CIDP IVIg: normal 75 ± 4 ; verschoben 21 ± 4 ; verzerrt 2 ± 0 ; oligoklonal 1 ± 0 [%]).

Die jeweiligen prozentualen Verteilungen der V β -Elemente (n, s, w, m/b) wiesen bei allen vier Kohorten die gleiche Rangfolge in ihrer Häufigkeit auf (Gesamt CD4⁺: normal 71 ± 6 ; verschoben 25 ± 4 ; verzerrt 2 ± 2 ; oligoklonal 1 ± 1 [%]).

5.1.2 Spectratyping Profile der CD8⁺ Population

In der CD8⁺-Population war die Mehrzahl der V β -Elemente in allen vier untersuchten Kohorten verschoben. Verzerrte und oligoklonale Expansionen waren in allen vier Kohorten nachweisbar, jedoch am stärksten bei den CIDP-Patienten. Verschobene und normal verteilte Repertoires kamen häufiger bei den Kontrollen vor.

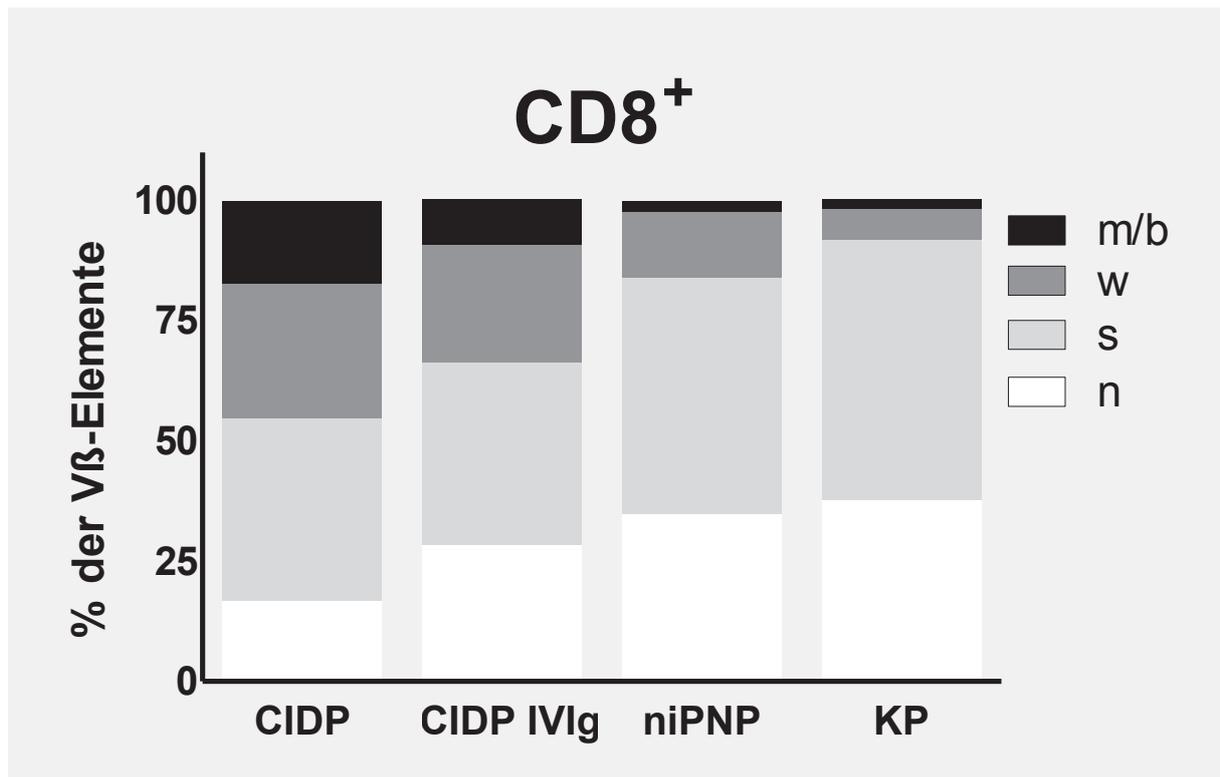


Abbildung 9: Die prozentuale Vβ-Element-Verteilung der CD8⁺ T-Zellen aller Probanden
 Basierend auf dem in Abbildung 5 eingeführten Bewertungssystem wurde die klonale Expansion in der CD8⁺-Population von Patienten mit chronisch inflammatorisch demyelinisierender Polyneuropathie (CIDP), mit intravenösem Immunglobulin behandelte CIDP-Patienten (CIDP IVIg), Patienten mit nicht-inflammatorischer Polyneuropathie (niPNP) und Kontroll-Probanden (KP) untersucht. Es wurden pro Proband 24 Vβ-Elemente analysiert, der Grad der Abweichungen bestimmt und der Mittelwert für jede Kohorte berechnet.
 oligoklonal: schwarz (m/b), verzerrt: dunkelgrau (w); verschoben: grau (s); normale: weiß (n)

Oligoklonale, verzerrte und verschobene Repertoires waren häufiger bei Patienten mit CIDP (CIDP: normal 18 ± 13 ; verschoben 39 ± 5 ; verzerrt 28 ± 10 ; oligoklonal 15 ± 8 [%]) als in den Kontrollen.

Mit IVIg behandelte CIDP-Patienten zeigten niedrige Frequenzen oligoklonaler und verzerrter Vβ-Elemente, jedoch mit einer entsprechend erhöhten Häufigkeit an normal und verschoben verteilten Vβ-Elementen (CIDP IVIg: normal 28 ± 3 ; verschoben 39 ± 5 ; verzerrt 24 ± 6 ; oligoklonal 9 ± 2 [%]).

Im Vergleich zu den CD4⁺ T-Zellen konnten bei den CD8⁺ T-Zellen am häufigsten verschobene, statt normale Verteilungen detektiert werden, so dass eine eindeutige absteigende Rangfolge der prozentualen Verteilungen der Vβ-Elemente, hier bei den CD8⁺ T-Zellen nicht vorlag. Verzerrte und klonierte Verteilungen, die bei den CD4⁺ T-

Zellen nur selten vorkamen, traten bei den CD8⁺ T-Zellen deutlich häufiger auf (Gesamt CD8⁺: normal 31 ± 9; verschoben 44 ± 5; verzerrt 18 ± 8; oligoklonal 7 ± 6 [%]).

Interessanterweise war die Verteilung des CD8⁺ TCR-Repertoires bei den Patienten, die an einer nicht-inflammatorischen Polyneuropathie erkrankt waren (niPNP: normal 38 ± 6; verschoben 47 ± 3; verzerrt 14 ± 4; oligoklonal 2 ± 5 [%]) und den Kontroll-Probanden (KP: normal 41 ± 10; verschoben 50 ± 6; verzerrt 7 ± 11; oligoklonal 2 ± 5 [%]), sehr ähnlich verteilt. Bei den Kontroll-Probanden traten eindeutig am wenigsten Abweichungen auf.

5.2 Statische Analyse

Im Folgenden wurden die Mittelwertunterschiede zwischen den CIDP-Patienten und den mit IVIg therapierten CIDP-Patienten, sowie den beiden Kontrollen (niPNP, KP) mittels T-Test errechnet und in einer Tabelle dargestellt, wobei signifikante Unterschiede grau hervorgehoben wurden (Tabelle 5).

Tabelle 5: T-Test-Analyse der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zell-Population

T-Test - CD4 ⁺					T-Test - CD8 ⁺				
CIDP vs CIDP IVIg	normal	verschoben	verzerrt	mono-/biklonal	normal	verschoben	verzerrt	mono-/biklonal	
p-Wert	0,008	0,0248	0,0712	0,7974	0,0744	0,9891	0,6109	0,2322	
CIDP vs niPNP									
p-Wert	0,0981	0,3017	0,0119	0,6864	0,0168	0,0745	0,0245	0,0135	
CIDP vs KP									
p-Wert	0,0015	0,0217	0,0043	0,2554	0,0316	0,0516	0,0015	0,0308	
CIDP IVIg vs niPNP									
p-Wert	0,4819	0,3265	0,4455	0,9022	0,3875	0,069	0,1174	0,0221	
CIDP IVIg vs KP									
p-Wert	0,813	0,7737	0,0594	0,3405	0,3453	0,0569	0,0123	0,0455	

5.2.1 CD4⁺ T-Zell-Population

Bei den Normal- und verschobenen Verteilungen der CD4⁺ T-Zell-Population konnten zwischen den CIDP-Patienten und den mit IVIg therapierten CIDP-Patienten, sowie den Kontroll-Probanden signifikante Unterschiede der Mittelwerte errechnet werden. So war der Unterschied bei den Normalverteilungen zwischen den CIDP und CIDP mit IVIg Patienten mit p=0,0080 und zwischen den CIDP und Kontroll-Probanden mit p=0,0015 signifikant ($p \leq 0,05$) (Tabelle 5, graue Hervorhebung links). Bei den verschobenen Verteilungen waren die Mittelwertunterschiede zwischen den CIDP und CIDP mit IVIg Patienten mit p=0,0248 und zwischen den CIDP und Kontroll-Probanden mit p=0,0217 ebenfalls signifikant ($p \leq 0,05$) (Tabelle 5, graue Hervorhebung links).

Bei den verzerrten Verteilungen der CD4⁺ T-Zell-Population konnten zwischen den CIDP-Patienten und den niPNP-Patienten $p=0,0119$, sowie den Kontroll-Probanden $p=0,0043$ auch signifikante Mittelwertunterschiede ermittelt werden ($p \leq 0,05$) (Tabelle 5, graue Hervorhebung links).

Keine signifikanten Unterschiede zwischen den CIDP-Patienten und den Vergleichsgruppen (CIDP IVIg, niPNP, KP) gab es zwischen den klonalen Verteilungen im CD4⁺ TCR-Repertoire. Außerdem gab es im gesamten CD4⁺ TCR-Repertoire keine signifikanten Unterschiede zwischen den mit IVIg therapierten CIDP-Patienten und den niPNP und Kontroll-Probanden (Tabelle 5 ohne Hervorhebung links).

5.2.2 CD8⁺ T-Zell-Population

Bei den Normalverteilungen im CD8⁺ TCR-Repertoire konnten zwischen den CIDP-Patienten und den niPNP-Patienten $p=0,0168$, sowie den Kontroll-Probanden $p=0,0316$ signifikante ($p \leq 0,05$) Mittelwertunterschiede ermittelt werden (Tabelle 5, graue Hervorhebung rechts).

Bei den verzerrten und klonierten Verteilungen waren die Mittelwertunterschiede zwischen den CIDP und den niPNP-Patienten mit $p=0,0245$ (verzerrt) und $p=0,0135$ (oligoklonal), sowie den Kontroll-Probanden mit $p=0,0015$ (verzerrt) und $p=0,0308$ (oligoklonal) ebenfalls signifikant ($p \leq 0,05$) (Tabelle 5, graue Hervorhebung).

Signifikant ($p \leq 0,05$) waren auch die Unterschiede zwischen den mit IVIg therapierten CIDP-Patienten und den niPNP bei den verzerrten Verteilungen $p=0,0221$, sowie den Kontroll-Patienten bei den verzerrten $p=0,0123$ und den oligoklonalen $p=0,0455$ Verteilungen (Tabelle 5, graue Hervorhebung).

Keine signifikanten Unterschiede zwischen den CIDP-Patienten und den Vergleichsgruppen (CIDP IVIg, niPNP, KP) gab es bei den verschobenen Verteilungen im CD8⁺ TCR-Repertoire (Tabelle 5, ohne Hervorhebung).

5.3 Vergleich der einzelnen V β -Elemente

Zur Darstellung der Abweichungen im TCR-Repertoire im Detail wurden die Spectratyping Profile jedes einzelnen V β -Elementes aller vier Kohorten erstellt (Abbildung 10 und 11). Durch diese Abbildungen gelang ein Vergleich zwischen den

Verteilungen jedes einzelnen V β -Elementes. Dabei fiel auf, dass diese Verteilungen für jedes V β -Element individuell unterschiedlich waren.

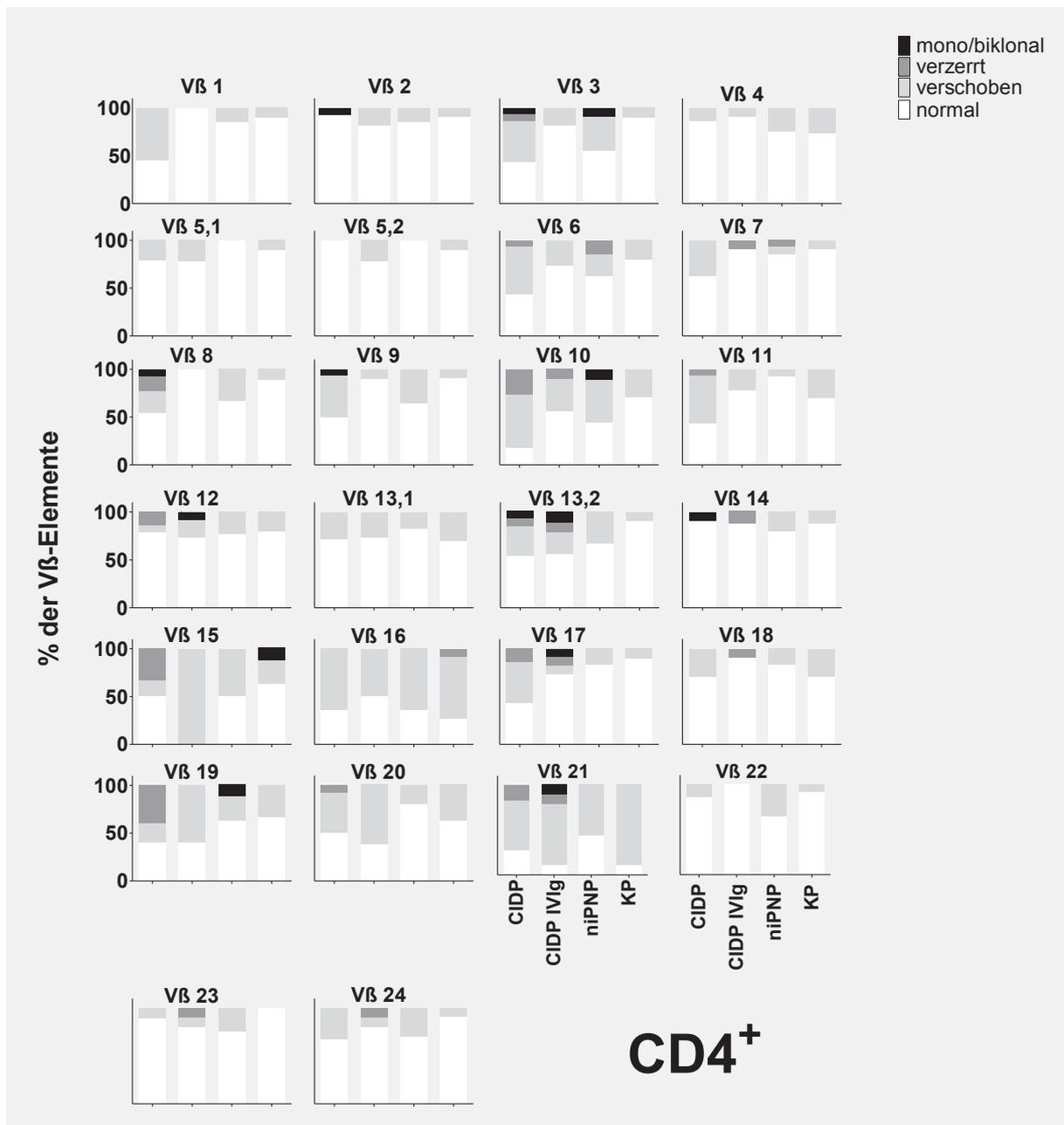


Abbildung 10: Prozentuale Verteilung von V β 1 bis V β 24 innerhalb der CD4⁺ Population
 Die unterschiedlichen Verschiebungen wurden in den 4 Kohorten in den einzelnen V β -Elementen analysiert. Angegeben sind die prozentualen Anteile innerhalb der 4 Kohorten (CIDP, CIDP IVIg, niPNP, KP).

oligoklonal: schwarz (m/b), verzerrt: dunkelgrau (w); verschoben: grau (s); normal: weiß (n)

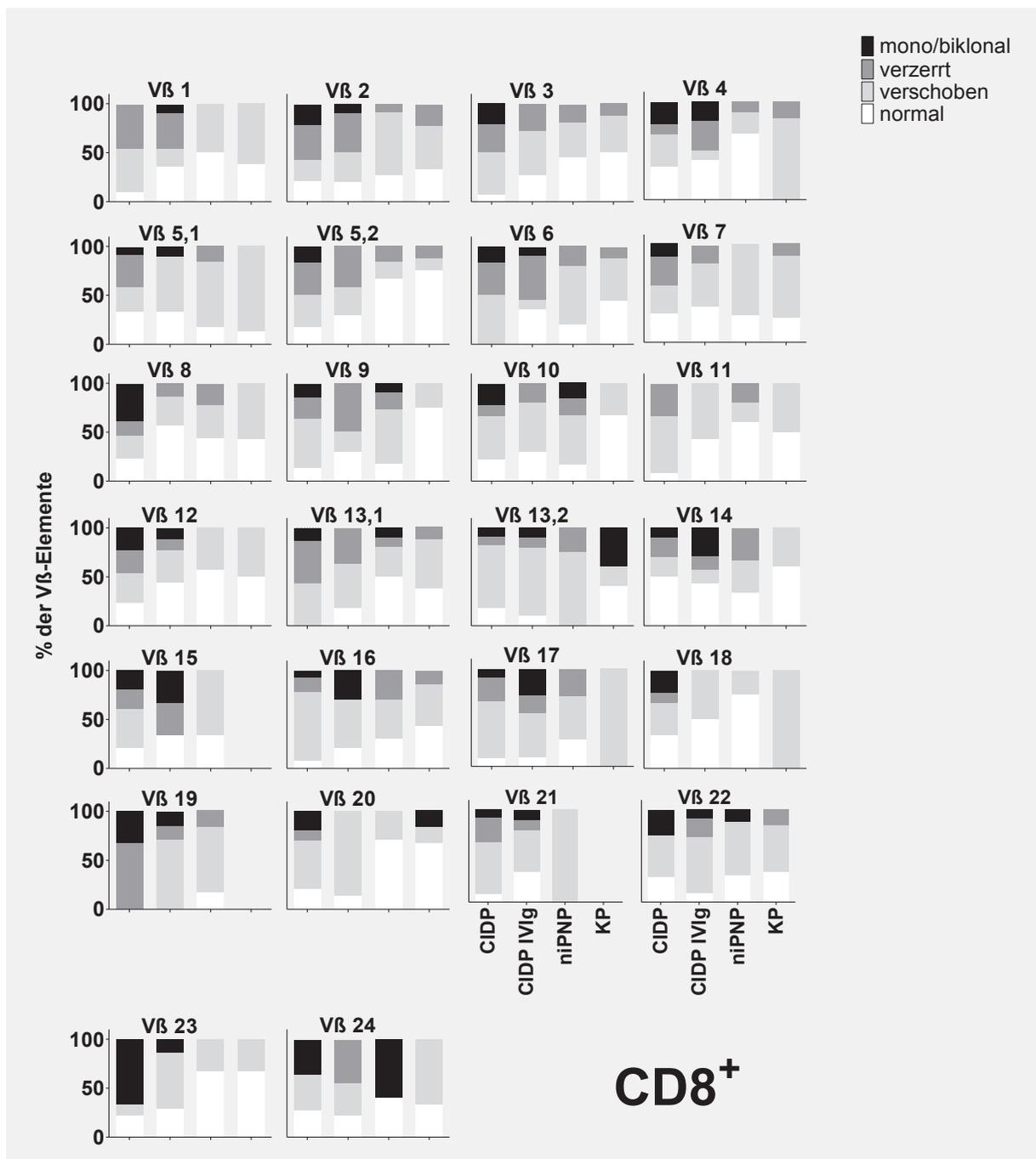


Abbildung 11: Prozentuale Verteilung von Vβ1 bis Vβ24 innerhalb der CD8⁺ Population
 Die unterschiedlichen Verschiebungen wurden in den 4 Kohorten in den einzelnen Vβ-Elementen analysiert. Angegeben sind die prozentualen Anteile innerhalb der 4 Kohorten (CIDP, CIDP IVIg, niPNP, KP).

oligoklonal: schwarz (m/b), verzerrt: dunkelgrau (w); verschoben: grau (s); normal: weiß (n)

5.3.1 Spectratyping Profile der einzelnen V β -Elemente der CD4⁺-Population

Im Folgenden wurde untersucht, ob es möglicherweise nur ein bestimmtes V β -Element oder mehrere V β -Elemente gibt, die besonders häufig starke Abweichungen im CD4⁺ TCR-Repertoire aufweisen könnten. In der CDR3-Region des TCRs binden Antigene spezifisch im Bereich eines V β -Elementes. Würden im Bereich eines V β -Elementes starke Abweichungen im Repertoire auftreten, könnten Erkenntnisse über Antigene gewonnen werden, die spezifisch in dieser Region binden (Abbildung 10).

In unseren Untersuchungen fand sich kein einzelnes V β -Element, das durch besonders häufige und deutliche Abweichungen hervorzuheben war. Vielmehr zeigte sich eine Reihe von V β -Elementen, die häufiger starke Abweichungen aufwiesen.

Es konnten sechs V β -Elemente detektiert werden, die nur geringfügige Abweichungen zeigten, dies waren: V β 1, V β 4, V β 5,1, V β 5,2, V β 13,1 und V β 22. Unter diesen V β -Elementen ist V β 5,2 hervorzuheben, da es hier fast ausschließlich normale und nur sehr wenige verschobene Verteilungen gab.

Auffällig war, dass besonders in der CIDP-Gruppe sehr starke Abweichungen von der Normalverteilung detektiert wurden, nämlich bei 6 von 26 V β -Elementen oligoklonale (V β 2, V β 3, V β 8, V β 9, V β 13,2 und V β 14) und bei 12 von 26 V β -Elementen verzerrte (V β 3, V β 6, V β 8, V β 10, V β 11, V β 12, V β 13,2, V β 15, V β 17, V β 19, V β 20 und V β 21) Abweichungen im TCR-Repertoire.

Dahingegen konnten deutlich weniger Abweichungen im TCR-Repertoire der CIDP-Patienten, die mit IVIg behandelt worden waren, erfasst werden. Es kamen bei 4 von 26 V β -Elementen oligoklonale (V β 12, V β 13,2, V β 17 und V β 21) und in 9 von 26 V β -Elementen verzerrte (V β 7, V β 10, V β 13,2, V β 14, V β 17, V β 18, V β 21, V β 23 und V β 24) Verteilungen vor.

Die Gesamtanzahl der V β -Elemente mit starken Abweichungen während einer IVIg-Therapie war um 5 V β -Elemente geringer als bei den CIDP-Patienten.

Hervorzuheben ist, dass das CD4⁺ TCR-Repertoire von 3 V β -Elementen (V β 1, V β 8 und V β 22) bei den CIDP-Patienten mit IVIg-Therapie im Gegensatz zu den CIDP-Patienten ohne IVIg sich normal verteilt zeigte. Bei 4 V β -Elementen (V β 2, V β 3, V β 9 und V β 14) konnten während einer IVIg-Therapie keine oligoklonalen und in 5 V β -Elementen keine verzerrten (V β 6, V β 11, V β 15, V β 19 und V β 20) Abweichungen

detektiert werden, die innerhalb dieser V β -Elemente bei den CIDP-Patienten jedoch bestanden.

Beim Vergleich derjenigen V β -Elemente, bei denen es sowohl bei den ohne als auch gleichzeitig bei den mit IVIg therapierten CIDP-Patienten zu starken Abweichungen kam, handelte es sich nicht um die gleichen V β -Elemente. Stattdessen traten oligoklonale nur bei V β 13,2 und verzerrte nur in 4 V β -Elementen (V β 10, V β 13,2, V β 17 und V β 21) gleichzeitig bei beiden Patienten-Gruppen auf.

Bei den Kontroll-Probanden traten als Kontrollgruppe in allen V β -Elementen, bis auf eine Ausnahme in V β 15, bei dem auch verzerrte und oligoklonale Verteilungen vorkamen, nur normale und verschobene Verteilungen auf. Interessanterweise kamen diese oligoklonalen Abweichungen bei diesem V β 15 Element nicht bei den drei weiteren Kohorten vor. Lediglich bei den CIDP-Patienten zeigten sich in diesem V β -Element verzerrte Verteilungen.

Dies spiegelte sich auch bei den niPNP-Patienten wider. In dieser Gruppe kamen verzerrte Verteilungen nur in V β 6 und V β 7 und oligoklonale Verteilungen in V β 3, V β 10 und V β 19 vor, wobei gleichzeitig bei den CIDP-Patienten oligoklonale Verteilungen nur in V β 3 auftraten.

5.3.2 Spectratyping Profile der einzelnen V β -Elemente der CD8⁺-Population

Auch bei den CD8⁺ T-Zellen konnte kein einzelnes V β -Element mit besonders starken Abweichungen hervorgehoben werden (Abbildung 11). Jedoch gab es hier im Unterschied zu den CD4⁺ T-Zellen wesentlich häufigere und auch stärkere Abweichungen. Außerdem gab es kein V β -Element, das nur normale und verschobene Verteilungen aufwies. V β 11 zeigte als alleiniges V β -Element keine klonierten Verteilungen. So präsentierten 23 der 26 V β -Elemente klonierte Verteilungen, bei den CD4⁺ T-Zellen betraf dies nur 18 V β -Elemente.

Besonders bei den CIDP-Patienten konnten in allen V β -Elementen starke Abweichungen von der Normalverteilung detektiert werden. Bis auf 2 V β -Elemente (V β 1 und V β 11) ohne oligoklonale Abweichungen kamen in allen weiteren V β -Elementen (in 24 von 26 V β -Elementen) sowohl verzerrte, als auch oligoklonale Verteilungen und damit eine deutliche Abweichung von der Normalverteilung vor.

Vergleicht man die CIDP mit den IVIg therapierten Patienten so ist auffällig, dass hier bei CD8⁺ T-Zellen unter IVIg-Therapie deutlich weniger Abweichungen im TCR-Repertoire (in 18 von 26 Vβ-Elementen) zu beobachten waren. Die Anzahl der Vβ-Elemente mit starken Abweichungen war in der IVIg Gruppe um 8 Vβ-Elemente (in 15 von 26 Vβ-Elementen) weniger im Vergleich zur CIDP Kohorte.

Interessanterweise zeigte das CD8⁺ TCR-Repertoire von CIDP-Patienten unter IVIg-Therapie in 9 Vβ-Elementen (Vβ3, Vβ5,2, Vβ7, Vβ8, Vβ9, Vβ10, Vβ13,1, Vβ18 und Vβ20) keine oligoklonalen Verteilungen im Gegensatz zum TCR-Repertoire der CIDP-Patienten ohne IVIg-Therapie, wo sich lediglich 2 Vβ-Elemente (Vβ1 und Vβ11) ohne oligoklonale Abweichungen fanden. Bei Vβ11 konnten verzerrte Verteilungen, die bei den CIDP-Patienten auftraten, während einer IVIg-Therapie nicht detektiert werden und in 8 Vβ-Elementen (Vβ2, Vβ4, Vβ6, Vβ12, Vβ19, Vβ21, Vβ23 und Vβ24) traten entweder weniger starke Abweichungen oder vermehrt Normalverteilungen unter IVIg-Therapie als bei den CIDP-Patienten auf.

Im Gegensatz zu der allgemeinen Tendenz der Normalverteilung gab es aber auch Vβ-Elemente, bei denen in der IVIg Gruppe mehr Abweichungen auftraten als bei den CIDP-Patienten ohne IVIg-Therapie. Beispiele dafür sind Vβ1, bei dem der Gesamtanteil an starken Abweichungen (verzerrt und oligoklonal) während einer IVIg Therapie im Vergleich zu CIDP-Patienten ohne IVIg-Therapie geringer war, jedoch oligoklonale Veränderungen hinzukamen, die bei den CIDP-Patienten nicht auftraten, jedoch war der Gesamtanteil an Normalverteilungen größer.

Weitere Beispiele waren, erstens, dass in Vβ4 und Vβ6 der IVIg Gruppe der Gesamtanteil an starken Veränderungen größer war, wobei der oligoklonale Anteil weniger häufig detektierbar war und zweitens, dass der Gesamtanteil der Abweichungen in Vβ5,1, Vβ21 und Vβ23 bei der IVIg Gruppe geringer, der oligoklonale Anteil jedoch höher ausfiel.

5.3.3 Vergleich der einzelnen Vβ-Elemente der CD4⁺ und CD8⁺-Population

Um zu klären, ob es Gemeinsamkeiten zwischen den CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen in Bezug auf die Vβ-Elemente gab, wurden die sechs Vβ-Elemente der CD4⁺ T-Zellen, die nur normale und verschobene Verteilungen aufwiesen mit denen der CD8⁺ T-Zellen verglichen. Jedoch zeigten diese sechs Vβ-Elemente (Vβ1, Vβ4, Vβ5,1, Vβ5,2,

V β 13,1 und V β 22) bei den CD8⁺ T-Zellen starke Abweichungen und beinhalteten alle vier Verteilungsvarianten, so dass hier keine Ähnlichkeiten zu den Verteilungen der CD4⁺ T-Zellen zu beobachten waren. Wie bereits erwähnt, zeigte nur V β 11 keine klonierten Verteilungen, was in beiden T-Zellpopulationen der Fall war. Dieses V β 11-Element war jedoch nicht in den o. g. sechs V β -Elementen der CD4⁺ T-Zellen enthalten.

Mit Hilfe dieser Ergebnisse konnte verdeutlicht werden, dass es zwischen den Verteilungen in Bezug auf die einzelnen V β -Elemente keine Gemeinsamkeiten zwischen den CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen gab. Beim Vergleich der Verteilungen des CD4⁺ mit dem CD8⁺ TCR-Repertoires fiel auf, dass das CD4⁺ TCR-Repertoire überwiegend (61%) und das der CD8⁺ T-Zellen eher selten (17%) normal verteilt war. Das CD8⁺ TCR-Repertoire war häufiger verschoben (38%) und deutlich öfter verzerrt (28%), als dies bei den CD4⁺ T-Zellen der Fall war (31% und 6%). Hervorzuheben war auch, dass ein beachtlicher Anteil oligoklonale Verteilungen (17%) beim CD8⁺ TCR-Repertoire im Vergleich zu den CD4⁺ T-Zellen (6%) waren. Interessanterweise entsprach der Anteil der oligoklonalen Verteilungen bei den CD8⁺ T-Zellen, dem der Normalverteilungen.

Insgesamt standen somit die Abweichungen von der Normalverteilung bei den CD8⁺ T-Zellen (83%) im Vergleich zu den CD4⁺ T-Zellen (39%) im Vordergrund.

5.3.4 TCR Repertoire-Veränderungen ohne und unter IVIg-Therapie

Im Folgenden wurden die prozentualen Verteilungen aller 24 V β -Elemente pro Proband einer Kohorte (CIDP, CIDP mit IVIg, niPNP und KP) graphisch dargestellt, um personenbezogene Unterschiede zwischen dem CD4⁺ und CD8⁺ TCR-Repertoire aufdecken und erneut einen Vergleich zwischen den Kohorten durchführen zu können.

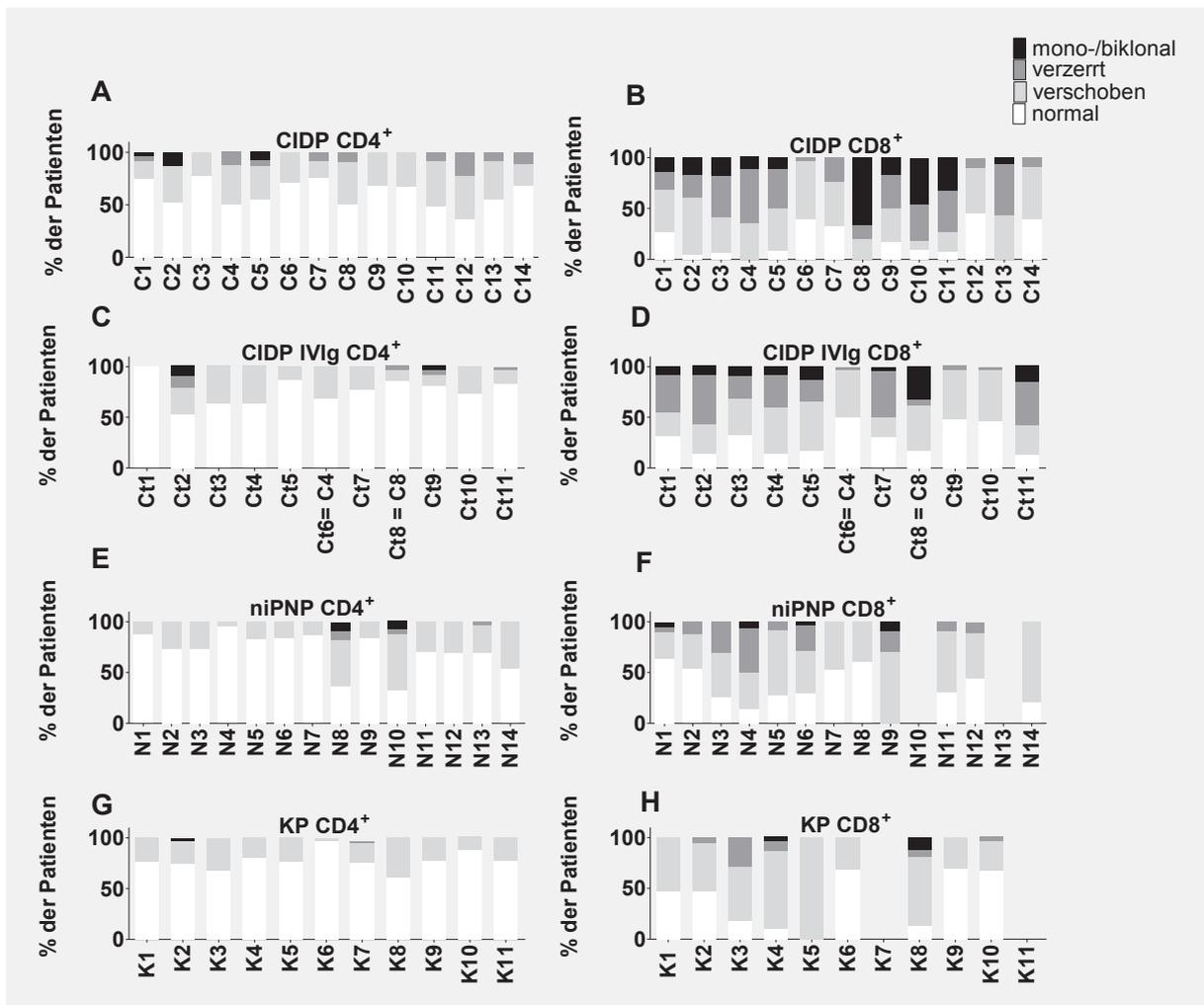


Abbildung 12: TCR-Repertoire-Verteilung der einzelnen Probanden

A und B Die Verteilung des TCR-Repertoires der CD4⁺ (A) und CD8⁺ (B) T-Zellen der einzelnen Probanden aller 14 CIDP-Patienten (C1 bis C14)

C und D Die Verteilung des TCR-Repertoires der CD4⁺ (C) und CD8⁺ (D) T-Zellen der einzelnen Probanden aller 11 mit IVIg therapierten CIDP-Patienten (Ct1 bis Ct11)

E und F Die Verteilung des TCR-Repertoires der CD4⁺ (E) und CD8⁺ (F) T-Zellen der einzelnen Probanden aller 14 niPNP-Patienten (N1 bis N14)

G und H Die Verteilung des TCR-Repertoires der CD4⁺ (G) und CD8⁺ (H) T-Zellen der einzelnen Probanden aller 11 Kontroll-Probanden (K1 bis K14)

5.3.5 Vergleich CD4⁺ mit CD8⁺ Repertoire einzelner CIDP-Patienten

In der Kohorte der CIDP Patienten, die vor der Blutentnahme nicht mit IVIg behandelt wurden, wies das TCR-Repertoire der CD4⁺ Population bei vier Probanden (C3, C6, C9 und C10, Abbildung 12 A) keine stärkeren Abweichungen (verzerrt oder oligoklonal) auf. Bei 3 dieser 4 Probanden (C3, C9 und C10, Abbildung 12 B) zeigten

sich im CD8⁺ TCR-Repertoire sowohl besonders starke, als auch besonders häufige oligoklonale und verzerrte Verteilungen.

Seltener war zu beobachten, dass starke Abweichungen im CD8⁺ seltener detektiert wurden als im CD4⁺ TCR-Repertoire (Vgl. Patient C12). Manche Probanden (C1, C2 und C5) zeigten zwar starke Abweichungen im CD4⁺ TCR-Repertoire, diese waren jedoch bei den CD8⁺ T-Zellen noch häufiger und stärker ausgeprägt. Die Tendenz innerhalb der Gruppe ließ sich nicht zwangsläufig auf alle Patienten in der Gruppe anwenden.

5.3.6 TCR-Repertoire-Vergleich der einzelnen CIDP-Patienten mit der IVIg Gruppe

Beim Vergleich des CD4⁺ TCR-Repertoires der beiden CIDP Kohorten gab es unter IVIg-Therapie folgende Veränderungen des TCR-Repertoires (Abbildung 12 A mit C): Bei den mit IVIg therapierten CIDP-Patienten kamen im Vergleich zu den CIDP Patienten Normalverteilungen deutlich häufiger (CIDP: 61%; CIDP IVIg: 75%), verschobene seltener (CIDP: 31%; CIDP IVIg: 21%), verzerrte kaum (CIDP: 6%; CIDP IVIg: 2%) und oligoklonierte Verteilungen (CIDP: 2%; CIDP IVIg: 1%) fast gar nicht vor. Außerdem war der Gesamtanteil an abweichenden Verteilungen (verschoben, verzerrt und oligoklonal) bei der IVIg Gruppe (24%) deutlich geringer als bei den CIDP-Patienten (39%).

Im CD8⁺ TCR-Repertoire kamen Normalverteilungen bei beiden CIDP-Gruppen im Vergleich zu den CD4⁺ T-Zellen eher selten vor (Abbildung 12 B mit D). Wobei sie bei der IVIg Gruppe deutlich häufiger vorkamen (28%), als bei den CIDP-Patienten (17%). Verschobene Verteilungen traten bei beiden Gruppen gleich häufig auf (38%).

Besonders starke Abweichungen, wie verzerrte und oligoklonale Verteilungen kamen bei der IVIg Gruppe viel seltener vor (CIDP IVIg: 24% und 9%), als bei den CIDP-Patienten (CIDP: 28% und 15%).

Der Gesamtanteil an abweichenden Verteilungen war bei beiden Gruppen im CD8⁺ TCR-Repertoire sehr hoch, dennoch war er bei der IVIg Gruppe deutlich geringer (72%) als bei den CIDP-Patienten (83%).

Somit traten sowohl bei den CD4⁺, als auch bei den CD8⁺ T-Zellen unter IVIg-Therapie insgesamt seltener Abweichungen von der Normalverteilung des TCR-Repertoires auf und starke Abweichungen waren unter IVIg-Therapie deutlich geringer.

5.3.7 TCR-Repertoire-Vergleich der einzelnen CIDP-Patienten mit Kontroll-Probanden

Normale und verschobene Verteilungen des CD4⁺ TCR-Repertoires gab es bei beiden Gruppen bei jedem Probanden.

Die Normalverteilungen waren bei den Kontroll-Probanden sehr viel häufiger (77%), sowie verschobene Verteilungen deutlich seltener (22%) vertreten, als bei den CIDP-Patienten (61% und 31%) (Abbildung 12 A mit G).

Verzerrte und klonierte Verteilungen waren bei den CD4⁺ T-Zellen der Kontroll-Probanden kaum zu beobachten. Es traten nur bei einem einzigen Kontroll-Probanden verzerrte (K7: 1%, Abbildung 12 G) und bei einem Proband oligoklonale Verteilungen (K2: 4%, Abbildung 12 G) auf. Dagegen gab es in der CIDP-Gruppe bei 9 Probanden (C1, C4, C5, C7, C8, C11, C12, C13 und C14 Abbildung 12 A) verzerrte und drei Probanden (C1, C2 und C5, Abbildung 12 A) oligoklonale Verteilungen.

Im CD8⁺ TCR-Repertoires gab es bei den Kontroll-Probanden bei 8 Probanden (K1-4, K6 und K8-10, Abbildung 12 H) und bei der CIDP-Gruppe bei 11 Probanden (C1-3, C5-7, C9-12 und C14, Abbildung 12 B) Normalverteilungen. Jedoch konnte bei zwei niPNP-Patienten (N10 und N13, Abbildung 12 F) und bei zwei Kontroll-Probanden (K7 und K11, Abbildung 12 H) kein PCR-Produkt detektiert werden und somit das CD8⁺ TCR-Repertoires dieser Probanden nicht ermittelt werden.

Verschobene TCR-Repertoires kamen bei allen Probanden vor, jedoch bei den gesunden häufiger (44%), als bei den CIDP-Probanden (38%), außer der o. g. Probanden deren TCR-Repertoire nicht ermittelt werden konnte (N10, N13, K7, K11). Bei 5 Kontroll-Probanden (K2, K3, K4, K8 und K10, Abbildung 12 H) traten verzerrte und bei zweien (K4 und K8, Abbildung 12 H) oligoklonale Verteilungen auf, was im Vergleich zu den CIDP-Patienten, die alle verzerrte Abweichungen und bei 10 Patienten oligoklonale Verteilungen beinhalteten (Abbildung 12 B) deutlich weniger war.

5.4 Vergleich der TCR-Repertoire-Veränderungen in Bezug auf den klinischen Verlauf

Im Folgenden wurden die TCR-Repertoires, der einzelnen Probanden der beiden CIDP-Kohorten (CIDP, CIDP IVIg), die in Abbildung 12 A bis C aufgeführt sind, in

Bezug auf den jeweils einzelnen klinischen Verlauf untereinander verglichen. Hier stellte sich die Frage nach einer möglichen Korrelation zwischen einer klinischen Verbesserung und gleichzeitigen Tendenz zur Normalisierung des TCR-Repertoires unter der Therapie mit IVIg und ob es möglicherweise Unterschiede zwischen dem CD4⁺ und CD8⁺ TCR-Repertoire gab (Vgl. Tabelle 2).

Tabelle 6: Signifikanzprüfung der klinischen Korrelation

Ergebnis der T-Test-Analyse der Mittelwertunterschiede zwischen Patienten mit einer klinischen Verbesserung (C3, C7, C8, C13) und Patienten mit einer klinischen Verschlechterung (C1, C2).

T-Test - CD4⁺				
C3, C7, C8, C13 vs C1, C2	normal	verschoben	verzerrt	mono-/biklonal
p-Wert	0,9408	0,7976	0,2622	nicht auswertbar
T-Test - CD8⁺				
C3, C7, C8, C13 vs C1, C2	normal	verschoben	verzerrt	mono-/biklonal
p-Wert	0,6784	0,2345	0,3926	0,7578

5.4.1 Vergleich des CD4⁺ TCR-Repertoires von CIDP-Patienten in Bezug auf die Klinik

Bei vier CIDP-Probanden (C3, C7, C8 und C13) waren die klinischen Symptome, die mit Hilfe der INCAT-Punkte gewichtet worden sind, über den gesamten Beobachtungszeitraum von 6 Monaten nach der Blutprobenentnahme rückläufig (Abbildung 12 A und Tabelle 2), wobei sie bei zwei CIDP-Probanden (C1 und C2) progredient waren. Diese Patienten wurden vor der Blutentnahme nicht mit IVIg therapiert, jedoch wurden alle Patienten bis auf C13 im Verlauf unter anderem mit IVIg behandelt.

Im Folgenden sollte verglichen werden, ob der klinische Verlauf der CIDP mit dem Maß der Abweichungen des TCR-Repertoires korreliert.

Das CD4⁺ TCR-Repertoire war bei beiden Vergleichsgruppen annähernd identisch normal verteilt. Bei der Gruppe mit der klinischen Verbesserung war die Normaverteilung prozentual geringfügig mehr detektiert worden (64,5%), als bei der Gruppe mit klinischer Verschlechterung (63,5%). Vershobenen und verzerrte Verteilungen konnten prozentual im CD4⁺ TCR-Repertoire bei der Gruppe mit der klinischen Verbesserung um 2,75 und 7 Prozentpunkte mehr erfasst werden (28,75%

und 9%), als bei der Gruppe mit der klinischen Verschlechterung (26% und 2%). Jedoch konnten im CD4⁺ TCR-Repertoire nur in der Gruppe mit der klinischen Verschlechterung oligoklonale Verteilungen (8,5%) registriert werden.

In diesem Vergleich gab es in Bezug auf die Verteilungen im CD4⁺ TCR-Repertoire prozentuale Unterschiede, der Mittelwertunterschied war jedoch nicht signifikant (normal: $p=0,9408$, verschoben: $p=0,7976$, verzerrt: $p=0,2622$, Tabelle 6). Dadurch, dass im CD4⁺ TCR-Repertoire der Patienten mit klinischer Verbesserung keine oligoklonalen Verteilungen verzeichnet werden konnten, konnte der T-Test hier nicht angewandt werden.

Zusammenfassend konnten in Bezug auf die Verteilungsmuster eine prozentuale Tendenz zur Normalisierung im CD4⁺ TCR-Repertoire beobachtet werden jedoch ohne Signifikanz, d. h. insgesamt ohne signifikanter Korrelation zum klinischen Verlauf von CIDP-Patienten.

5.4.2 Vergleich des CD8⁺ TCR-Repertoires von CIDP-Patienten in Bezug auf die Klinik

Im CD8⁺ TCR-Repertoire kamen Normalverteilungen bei den Patienten mit der klinischen Verschlechterung deutlich häufiger vor (15,5%), als bei den Patienten, die sich klinisch verbessert hatten (9,5%) (Abbildung 12 B und Tabelle 2).

Anders war es bei den verschobenen Verteilungen, die bei den klinisch verbesserten Patienten deutlich seltener vorkamen (35,5%), als bei beiden Patienten mit klinischer Verschlechterung (49%).

Verzerrte und oligoklonale Verteilungen traten bei den verbesserten Patienten häufiger auf (32% und 23%), als bei der Vergleichsgruppe (20% und 15,5%).

Insgesamt auffällig war, dass das CD8⁺ TCR-Repertoire bei Patienten mit einer klinischen Verschlechterung einen deutlich höheren Anteil an Normalverteilungen und einen deutlich geringen Anteil an Abweichungen im Vergleich zu Patienten mit einer klinischen Verbesserung aufwies.

Zusammenfassend konnten in Bezug auf die Verteilungsmuster im CD8⁺ TCR-Repertoire prozentuale Abweichungen beobachtet werden, die bei CIDP-Patienten mit klinischer Verbesserung ausgeprägter als bei CIDP-Patienten mit klinischer Verschlechterung waren. Beim Mittelwertvergleich mittels T-Test lag kein signifikanter Zusammenhang mit der Klinik von CIDP-Patienten vor.

5.4.3 Vergleich des CD4⁺ TCR-Repertoires unter IVIg Therapie im Bezug auf die Klinik

Bei Ct2 und Ct11 verschlechterte sich der klinische Verlauf trotz IVIg Therapie (Abbildung 12 C und Tabelle 2). Im Vergleich dazu war bei Ct8 unter IVIg eine deutliche Verbesserung zu beobachten. Im Folgenden sollte geprüft werden, ob der Erfolg der IVIg Therapie mit dem Grad der Abweichung im TCR Repertoire zusammenhing.

Es zeigte sich, dass das CD4⁺ TCR-Repertoire bei beiden Probanden mit der klinischen Verschlechterung (53% und 83%) weniger normale Verteilungen als bei dem Patienten mit klinischer Verbesserung (86%) beinhaltete, sowie mehr Abweichungen in Form von verschobenen Verteilungen (26% und 13%), als bei Ct8 (10%). Verzerrte Abweichungen traten nur bei Ct2 (11%) vermehrt im Vergleich zu Ct8 (5%) auf, wobei Ct11 geringfügig weniger (4%) aufwies. Bemerkenswert war, dass oligoklonale Verteilungen nur bei Ct2 (11%) auftraten.

Zusammenfassend wies das CD4⁺ TCR-Repertoire vom CIDP-Patienten Ct8, der sich unter IVIg Therapie klinisch verbesserte, im Vergleich zu den beiden CIDP-Patienten, die unter IVIg Therapie eine klinische Verschlechterung präsentierten, einen hohen Anteil an normalen und verschobenen Verteilungen, einen geringen Anteil an verschobenen und verzerrten Verteilungen und keine oligoklonalen Verteilungen. Einen T-Test konnten wir sowohl im CD4⁺ als auch im CD8⁺ TCR Repertoire bei diesem Vergleich nicht anwenden, weil uns nur ein Wert bei Ct8 vorlag und mindestens zwei oder mehr Werte erforderlich sind.

5.4.4 Vergleich des CD8⁺ TCR-Repertoires unter IVIg Therapie im Bezug auf die Klinik

Der Anteil an Normalverteilungen war im CD8⁺ TCR-Repertoire bei Ct2 (14%) und Ct11 (13%), die unter IVIg Therapie eine klinische Verschlechterung zeigten, im Vergleich zum Patient Ct8 (17%), der sich unter IVIg Therapie klinisch verbesserte, geringer (Abbildung 12 D und Tabelle 2).

Verschobene Verteilungen wurden bei Ct2 (29%) und Ct11 (29%) weniger als bei Ct8 (44%) und verzerrte Verteilungen häufiger (Ct2:48% und Ct11:42%), als bei Ct8 (6%) detektiert. Oligoklonale Verteilungen konnten bei Ct2 (10%) und C11 (17%) seltener als bei Ct8 (33%) erfasst werden.

Zusammenfassend wies das CD8⁺ TCR-Repertoire von Ct8 im Vergleich zu Ct2 und Ct11 häufiger normale und verschobene, sowie weniger verzerrte Verteilungen auf. Jedoch traten trotz klinischer Verbesserung mehr oligoklonale Verteilungen auf als bei Ct2 und Ct11 bei klinischer Verschlechterung.

5.4.5 Vergleich der CD4⁺ und CD8⁺ TCR-Repertoires bei klinischer Stabilität

Der größte Anteil beider Gruppen wies klinisch keine Veränderungen auf. Somit blieben bei den CIDP-Patienten ohne IVIg Therapie 6 und bei den mit IVIg therapierten CIDP-Patienten 7 Patienten klinisch stabil (Abbildung 12 A bis D und Tabelle 2 und 7). Interessanterweise war das CD8⁺ TCR-Repertoire bei 4 von 6 der CIDP-Patienten (C4, C6, C9 und C10) deutlich abweichender, als das CD4⁺ TCR-Repertoire dieser Patienten. Nur bei C12 und C14 wies das CD8⁺ TCR-Repertoire weniger Veränderungen als das CD4⁺ TCR-Repertoire der gleichen Patienten auf (Abbildung 12 A und B).

Diese Tendenz zeigte sich noch ausgeprägter bei den mit IVIg therapierten CIDP-Patienten, wo 6 der 7 Patienten im CD8⁺ TCR-Repertoire wesentlich stärkere und häufigere Abweichungen präsentierten, als im CD4⁺ TCR-Repertoire. Eine Ausnahme bot Patient Ct9, dessen Repertoire zwar insgesamt häufiger Veränderungen (verschoben und verzerrt) im CD8⁺ TCR-Repertoire darstellte, jedoch im Gegensatz zum CD4⁺ TCR-Repertoire keine oligoklonalen Abweichungen zeigte (Abbildung 12, C und D).

Vergleicht man das CD4⁺ TCR-Repertoire der Patienten mit klinischer Stabilität ohne und mit IVIg-Therapie (Abbildung 12 A und C, Tabelle 2), so fiel auf, dass Abweichungen bei CIDP-Patienten unter IVIg weniger detektiert werden konnten. Normalverteilungen konnten bei Patienten unter IVIg Therapie häufiger erfasst werden (CIDP: 60%; CIDP IVIg 73%) und verschobene (CIDP: 32%; CIDP IVIg 26%), sowie verzerrte (CIDP: 8%; CIDP IVIg 1%) Verteilungen wiesen bei CIDP-Patienten unter IVIg Therapie einen geringeren Anteil auf. Eine Ausnahme bildeten die oligoklonalen Verteilungen, die bei den CIDP-Patienten unter IVIg Therapie geringfügig häufiger registriert werden konnten (CIDP: 0%; CIDP IVIg 1%).

Statistisch war dies jedoch nicht signifikant (normal: $p=0,0661$, verschoben: $p=0,24900$, verzerrt: $p=0,0767$, Tabelle 7), wobei der T-Test bei den oligoklonalen

Verteilungen aufgrund der nicht vorhandenen Abweichungen bei den CIDP-Patienten nicht anwendbar war.

Ein ähnliches Ergebnis kennzeichnete der Vergleich des CD8⁺ TCR-Repertoires der Patienten mit klinischer Stabilität ohne und mit IVIg-Therapie (Abbildung 12, B und D). Hier konnten normale (CIDP: 25%; CIDP IVIg 34%) und verschobene (CIDP: 39%; CIDP IVIg 42%) Verteilungen bei CIDP-Patienten unter IVIg Therapie häufiger als bei Patienten ohne IVIg Therapie erfasst werden. Wohingegen verzerrte (CIDP: 24%; CIDP IVIg 19%), sowie oligoklonale (CIDP: 12%; CIDP IVIg 5%) Verteilungen deutlich weniger auftraten.

Statistisch war dies auch nicht signifikant (normal: $p=0,3503$, verschoben: $p=0,6751$, verzerrt: $p=0,6320$, oligoklonal: $p=0,3230$, Tabelle 7).

Auch hier wurde deutlich, dass trotz klinischer Stabilität, Abweichungen von der Normalverteilung im CD8⁺ TCR-Repertoire im Vergleich zum CD4⁺ TCR-Repertoire wesentlich häufiger auftraten und dass Veränderung sowohl im CD4⁺ als auch etwas mehr im CD8⁺ TCR-Repertoire beim Vergleich von CIDP-Patienten, die eine klinische Stabilität präsentierten, unter Therapie mit IVIg seltener registriert wurden, als bei CIDP-Patienten ohne IVIg Therapie. Wobei es sich nicht um die gleichen CIDP-Patienten gehandelt hat.

Ein statistisch signifikanter Mittelwertunterschied zwischen den CIDP und mit IVIg therapierten CIDP Patienten konnte bei klinischer Stabilität nicht nachgewiesen werden (Tabelle 7).

Tabelle 7: Signifikanzprüfung der klinischen Korrelation unter IVIg bei klinischer Stabilität

T-Test-Analyse der Mittelwertunterschiede zwischen den CIDP-Patienten (C stabil: C4, C6, C9, C10, C12 und C14) und den CIDP-Patienten mit IVIg-Therapie (Ct stabil: Ct3, Ct4, Ct5, Ct6, Ct7, Ct9 und Ct10) mit einer klinischen Stabilität.

T-Test - CD4 ⁺					
C vs Ct		normal	verschoben	verzerrt	mono-/biklonal
	p-Wert	0,0661	0,249	0,0767	nicht auswertbar
T-Test - CD8 ⁺					
C vs Ct		normal	verschoben	verzerrt	mono-/biklonal
	p-Wert	0,3503	0,6751	0,632	0,323
C stabil: C4, C6, C9, C10, C12 und C14					
Ct stabil: Ct3, Ct4, Ct5, Ct6, Ct7, Ct9 und Ct10					

5.5 Longitudinaler TCR-Repertoire-Vergleich zweier CIDP-Patienten ohne und unter IVIg

Bisher wurde die Verteilung des TCR-Repertoires rein deskriptiv verglichen. Hier wurden zwei Patienten im Verlauf untersucht. Zum einen ohne die Gabe von IVIg (C4 und C8) und zum anderen mit der Gabe von IVIg (Ct4 und Ct8), um die Veränderungen des TCR-Repertoires im Verlauf beurteilen zu können.

5.5.1 Patient 1

Bei Patient 1 handelte es sich um einen 66-jährigen Mann mit sensorischer CIDP. Dem Patienten wurde 2 Monate vor (C4 Abbildung 13, 1. und 3. Balken) und nach (Ct6 Abbildung 13, 2. und 4. Balken) IVIg-Gabe Blut entnommen und das TCR-Repertoire mittels CDR3-Spectratyping analysiert.

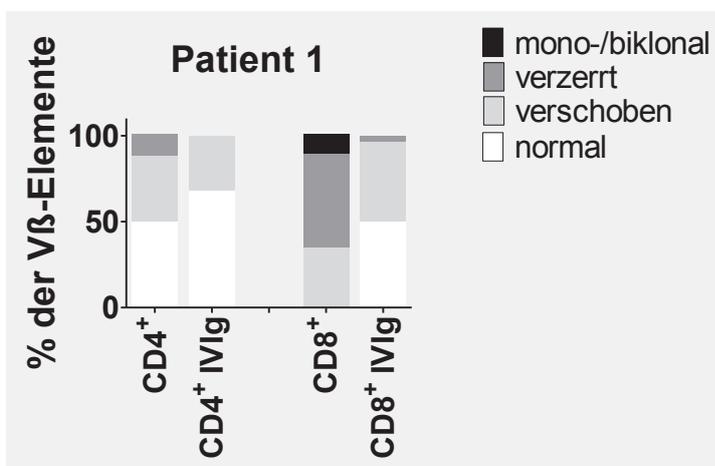


Abbildung 13: Patient 1

1. **Balken:** *prozentuale Verteilung des TCR-Repertoires aller V β -Elemente der CD4⁺ T-Zellen von einem CIDP-Patienten (C4) ohne IVIg-Therapie*
2. **Balken:** *prozentuale Verteilung des TCR-Repertoires aller V β -Elemente der CD4⁺ T-Zellen von einem CIDP-Patienten (Ct6) zwei Monate unter IVIg-Therapie*
3. **Balken:** *prozentuale Verteilung des TCR-Repertoires aller V β -Elemente der CD8⁺ T-Zellen von einem CIDP-Patienten (C4) ohne IVIg-Therapie*
4. **Balken:** *prozentuale Verteilung des TCR-Repertoires aller V β -Elemente der CD8⁺ T-Zellen von einem CIDP-Patienten (Ct6) zwei Monate unter IVIg-Therapie*

5.5.1.1 Vergleich CD4⁺ TCR-Repertoire mit und ohne IVIg-Gabe

Das TCR-Repertoire der CD4⁺ T-Zellen von Patient 1 war mit IVIg häufiger normal (mit IVIg Ct6: 68% und ohne IVIg C4: 50%), etwas weniger verschoben (mit IVIg Ct6: 32% und ohne IVIg C4: 38%) und im Gegenteil zum Repertoire ohne IVIg-Gabe nicht verzerrt (mit IVIg Ct6: 0% und ohne IVIg C4: 13%). Sowohl mit, als auch ohne IVIg-Therapie traten im CD4⁺ TCR-Repertoire keine oligoklonalen Abweichungen auf (Vgl. Abbildung 13 A, 1. und 2. Balken).

5.5.1.1 Vergleich CD8⁺ TCR-Repertoire mit und ohne IVIg-Gabe

Das CD8⁺ TCR-Repertoire war mit IVIg-Therapie zur Hälfte und ohne IVIg-Gabe gar nicht normal verteilt (mit IVIg Ct6: 0% und ohne IVIg C4: 50%). Verschobene Verteilungen konnten mit IVIg-Therapie häufiger, als ohne detektiert werden (mit IVIg Ct6: 46% und ohne IVIg C4: 35%). Starke Abweichungen konnten mit IVIg-Gabe deutlich seltener beobachtet werden, so dass verzerrte (mit IVIg Ct6: 4% und ohne IVIg C4: 54%) deutlich weniger und oligoklonale Verteilungen (mit IVIg Ct6: 0% und ohne IVIg C4: 12%) mit IVIg-Therapie nicht auftraten (Vgl. Abbildung 13 A, 3. und 4. Balken).

5.5.2 Patient 2

Bei Patient 2 handelte es sich um eine 71-jährige Frau mit motorisch-sensorischer CIDP. Die erste Blutentnahme zur Untersuchung des TCR-Repertoires erfolgte nach einer 6-monatigen IVIg-Therapie (Ct8, Abbildung 14, 2. und 4. Balken). Die zweite Blutentnahme wurde vier Monate nach absetzen von IVIg durchgeführt (C8, Abbildung 14, 1. und 3. Balken).

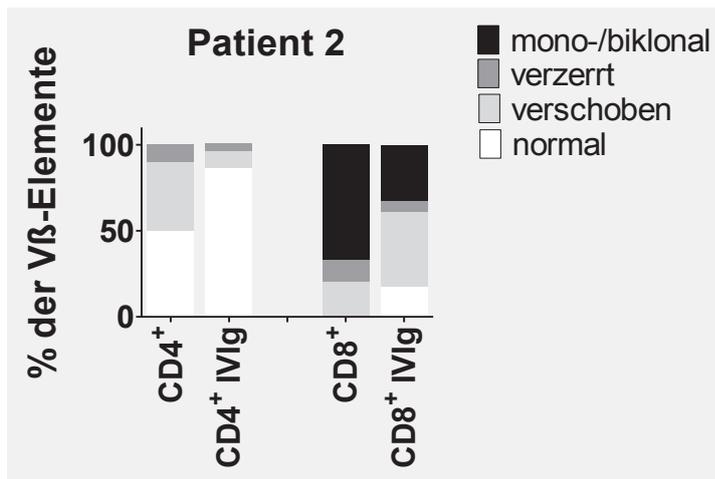


Abbildung 14: Patient 2

1. **Balken:** prozentuale Verteilung des TCR-Repertoires aller Vβ-Elemente der CD4⁺ T-Zellen von einem CIDP-Patienten (C8) ohne IVIg-Therapie
2. **Balken:** prozentuale Verteilung des TCR-Repertoires aller Vβ-Elemente der CD4⁺ T-Zellen von einem CIDP-Patienten (Ct8) unter IVIg-Therapie
3. **Balken:** prozentuale Verteilung des TCR-Repertoires aller Vβ-Elemente der CD8⁺ T-Zellen von einem CIDP-Patienten (C8) ohne IVIg-Therapie
4. **Balken:** prozentuale Verteilung des TCR-Repertoires aller Vβ-Elemente der CD8⁺ T-Zellen von einem CIDP-Patienten (Ct8) unter IVIg-Therapie

5.5.2.1 Vergleich CD4⁺ TCR-Repertoire mit und ohne IVIg-Gabe

Das CD4⁺ TCR-Repertoire von Patient 2 war mit IVIg-Therapie fast komplett und ohne nur zur Hälfte normal verteilt (mit IVIg Ct8: 86%, ohne IVIg C8: 50%). Mit IVIg traten kaum, ohne deutlich mehr verschobene Verteilungen auf (mit IVIg Ct8: 10%, ohne IVIg C8: 40%). Verzerrte Verteilungen konnten mit IVIg-Gabe seltener, als ohne beobachtet werden (mit IVIg Ct8: 5%, ohne IVIg C8: 10%). Oligoklonale Abweichungen traten im CD4⁺ TCR-Repertoire mit und ohne IVIg-Therapie nicht auf (Abbildung 14, 1. und 2. Balken).

5.5.2.1 Vergleich CD8⁺ TCR-Repertoire mit und ohne IVIg-Gabe

Im CD8⁺ TCR-Repertoire von Patient 2 konnten mit IVIg-Therapie im Gegenteil zum Repertoire ohne IVIg-Gabe Normalverteilungen erfasst werden (mit IVIg Ct8: 17%, ohne IVIg C8: 0%). Verschobene Verteilungen kamen mit IVIg-Gabe häufiger vor als ohne (mit IVIg Ct8: 44%, ohne IVIg C8: 20%) Die starken Abweichungen waren mit IVIg-Therapie geringer, so dass verzerrte kaum (mit IVIg Ct8: 6%, ohne IVIg C8: 13%)

und oligoklonale sehr viel weniger beobachtet werden konnten (mit IVIg Ct8: 33%, ohne IVIg C8: 67%), (Abbildung 14, 3. und 4. Balken).

6. Diskussion

6.1 Kritische Bewertung des CDR3-Spectratypings

Es existieren verschiedene Ansätze zur Analyse großer Datenmengen, die durch das CDR3-Spectratyping erstellt worden sind (Long et al., 2006; Rempala et al., 2011; Venturi et al., 2007).

Das in dieser Arbeit eingeführte Bewertungssystem wurde zur Analyse der Basenlängenverteilung des TCRs von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen verwendet, um den Einfluss von IVIg auf das TCR-Repertoire zu untersuchen. Mit dieser Methode konnte gezeigt werden, dass Veränderungen im TCR-Repertoire von CIDP-Patienten unter IVIg Therapie denen von Kontroll-Probanden glichen und annähernd normal verteilt waren. Das Bewertungssystem ist rein deskriptiv und veranschaulicht die prozentualen Unterschiede in der Verteilung der V β -Elemente im CD4⁺ und CD8⁺ TCR Repertoire. Es konnten mit der Methode des CDR3-Spectratypings ausgeprägte Abweichungen im TCR-Repertoire der CIDP-Patienten demonstriert werden, die in der CD8⁺ Population am deutlichsten auftraten. Diese Ergebnisse bestätigen frühere Arbeiten von Schneider-Hohendorf (T Schneider-Hohendorf et al., 2012) bei Verwendung der gleichen Methode und von Klehmet (Klehmet et al., 2015, 2014).

6.2 Bewertung der Ergebnisse

6.2.1 Einfluss von IVIg auf das TCR-Repertoire

Mit dieser Arbeit konnten wir zeigen, dass das TCR-Repertoire der mit IVIg behandelten CIDP-Patienten weniger Abweichungen aufwies als in der unbehandelten CIDP-Kohorte und annähernd dem TCR-Repertoire beider Kontroll-Gruppen glich (Vgl. Abbildung 8 und 9 im Ergebnisteil). Dies konnten wir überwiegend statistisch signifikant mittels T-Test belegen. Signifikante Mittelwertunterschiede erfassten wir zwischen der CIDP-Kohorte ohne IVIG Therapie und den mit IVIg therapierten CIDP Patienten bei den normalen und verschobenen Verteilungen im CD4⁺ TCR-Repertoire, jedoch nicht im CD8⁺ TCR-Repertoire. Hier sei zu diskutieren, ob IVIg mehr Einfluss auf CD4⁺ T-Zellen haben könnte. Eine mögliche Wirkung von IVIg ist eine Hemmung von B-Zellen und Neutralisation von Auto-Immunglobulinen, sowie eine hemmende Wirkung auf die durch dendritische Zellen vermittelte T-Zell-Aktivierung (A. Durandy et al., 2009; Imbach, 2012; M. D. Kazatchkine and Kaveri, 2001; Bernd C. Kieseier et al.,

2008; Nimmerjahn and Ravetch, 2008), so dass CD4⁺ T-Zellen hemmend beeinflusst werden könnten. Außerdem konnten Antikörper gegen CD4⁺ (Hurez et al., 1994) in IVIg-Präparaten nachgewiesen werden. Zu Bedenken ist jedoch, dass gerade im CD4⁺ TCR-Repertoire insgesamt weniger Abweichungen auftraten, so dass möglicherweise aufgrund der geringeren Fallzahl an verzerrten und oligoklonalen Verteilungen keine signifikanten Unterschiede erfasst worden sein könnten. Keine signifikanten Mittelwertunterschiede bzw. somit eine Ähnlichkeit im TCR-Repertoire konnten wir beim Vergleich von CIDP-Patienten unter IVIg Therapie und KP im gesamten CD4⁺ TCR-Repertoire und im CD8⁺ TCR-Repertoire bei allen außer den oligoklonalen Verteilungen entdecken. Dies könnte den Schluss zu lassen, dass eine IVIg Therapie eine Normalisierung im TCR-Repertoire hervorrufen könnte. Dieses Ergebnis bietet eine Bestätigung für den Einfluss von IVIg zur Normalisierung des TCR-Repertoires (J. Even et al., 1995; C. Pannetier et al., 1995). Interessant dabei ist, dass oligoklonale Verteilungen besonders im CD8⁺ TCR-Repertoire weniger durch IVIg beeinflussbar zu sein scheinen. Ob hier bestimmte CD8⁺ T-Zell-Klone durch IVIg nicht eliminierbar sein oder ob IVIg mehr Antikörperreaktionen beeinflussen könnte, bleibt Gegenstand weiterer Forschungsarbeiten.

Des Weiteren fanden wir bei Untersuchungen der einzelnen V β -Elemente heraus, dass nicht nur die Gesamtanzahl an starken Abweichungen während einer IVIg-Therapie geringer waren, sondern auch, dass das CD4⁺ TCR-Repertoire eines einzelnen V β -Elementes unter IVIg-Therapie teilweise oder sogar komplett normalisiert werden konnte. Ferner beschränkten sich starke Abweichungen von der Normalverteilung nicht auf ein einzelnes V β -Element, sondern waren individuell von Proband zu Proband unterschiedlich.

Eine Korrelation zwischen Normalisierung im TCR-Repertoire unter Therapie mit IVIg und einer klinischen Verbesserung konnten wir nicht zeigen. Jedoch muss berücksichtigt werden, dass die Ergebnisse überwiegend auf Basis einer Beobachtung der CIDP-Patienten mit einer relativ geringen Patientenanzahl beruhten. Für eine Verlaufsbeobachtung stand nur eine begrenzte Anzahl von 2 Patienten zur Verfügung, die eine Unterstützung der Ergebnisse bieten. Hierbei präsentierte Patient 1 unter IVIg Therapie eine Normalisierung des TCR-Repertoires, wobei Patient 2 nach Absetzen von IVIg unter Therapie mit MP eine Zunahme an stärkeren Abweichungen sowohl im CD4⁺, als auch im CD8⁺ TCR-Repertoire bot. Hier sei diskutabel, ob die Zunahme an Veränderungen durch MP auftrat oder Folge einer wegfallenden Wirkung von IVIg war.

6.2.2 Angleichung des TCR-Repertoires bei CIDP-Patienten an das von Kontroll-Probanden unter IVIg-Therapie

Bisher wurde die Therapie mit IVIg nur im Hinblick auf Veränderung des TCR-Repertoires bei SLE untersucht (Costa et al., 2013). Bei dieser Studie wurde das TCR-Repertoire bei Patienten mit einer SLE-Erkrankung im zeitlichen Verlauf einer IVIg-Therapie im Hinblick auf die Wiederherstellung einer Gauß'schen Normalverteilung analysiert. Im Ergebnis korrelierte eine Erholung des TCR-Repertoires von $V\beta 1$, $V\beta 2$, $V\beta 11$ und $V\beta 14$ unter der IVIg-Therapie mit einer klinischen Verbesserung (Costa et al., 2013).

Eine direkte Korrelation zur klinischen Verbesserung konnte in dieser Arbeit nicht beobachtet werden. Hier wurden das TCR-Repertoire der $CD4^+$ und auch der $CD8^+$ T-Zellen bei Patienten mit CIDP untersucht und es konnten bei CIDP-Patienten mit IVIg Therapie weniger starke Abweichungen bzw. weniger hoch aktivierte $V\beta$ -Elemente im Vergleich zu CIDP-Patienten ohne IVIg Therapie, sowie ein ähnliches TCR-Repertoire wie bei Kontroll-Probanden beobachtet werden. Wobei sich keine Hinweise auf bestimmte $V\beta$ -Elemente boten. Die Abweichungen waren zufällig auf die einzelnen $V\beta$ -Elemente verteilt und von Proband zu Proband unterschiedlich ohne Hinweise auf bestimmte $V\beta$ -Elemente.

Diese Feststellung beruht überwiegend auf einer Querschnittsanalyse von CIDP-Patienten, die mit IVIg behandelt wurden. Für eine Langzeitanalyse standen nur zwei Patienten zur Verfügung, die jedoch die bisherigen Erkenntnisse in dieser Arbeit unterstützten. Möglicherweise könnte eine größere Patientenzahl innerhalb der longitudinalen Analyse die bisherigen Beobachtungen ergänzen.

Die Therapie von CIDP-Patienten mit IVIg ist wirksam (Richard A. C. Hughes et al., 2008) und wurde schon 1988 erfolgreich erprobt (Panicker et al., 1988), jedoch ist der Wirkmechanismus noch nicht vollständig verstanden. T-Zellen bilden ein mögliches Ziel einer IVIg-Behandlung (Anthony et al., 2011; Jacob and Rajabally, 2009; Mohan S. Maddur et al., 2011).

In den hiesigen vorliegenden Untersuchungen konnten wir eine Angleichung des TCR-Repertoires von CIDP-Patienten, die mit IVIg behandelt worden sind, an das TCR-Repertoire von Kontroll-Probanden zeigen. Wir konnten jedoch nur im $CD4^+$ TCR-Repertoire keine signifikanten Mittelwertunterschiede bzw. eine Angleichung für alle Verteilungen beobachten. Im $CD8^+$ TCR-Repertoire konnten wir dagegen signifikant

mehr verzerrte und oligoklonale Verteilungen bei CIDP-Patienten mit IVIg Therapie als bei Kontroll-Probanden nachweisen, wobei sich verschobene und normale Verteilungen genau wie im CD4⁺ TCR-Repertoire nicht signifikant unterschieden bzw. sich angleichen. Dieses Ergebnis zeigt lediglich einen verbleibenden Anteil an verzerrten und oligoklonalen Verteilungen im CD8⁺ TCR-Repertoire von CIDP-Patienten mit IVIg-Therapie im Vergleich zu Kontroll-Probanden. Ob es sich hierbei um aktivierte CD8⁺ T-Zell-Klone handeln, was für den erhöhten Anteil an oligoklonalen Verteilungen spricht, oder ob autoreaktive T-Zellen zu einem höheren Anteil an stark veränderten Verteilungen geführt haben könnten, bleibt ungeklärt. Die Wahrscheinlichkeit für das Vorhandensein von autoreaktiven T-Zellen könnte bei einem reduzierten Aktivitätszustand innerhalb des TCR-Repertoires zwar geringer sein, jedoch ist das Vorhandensein nicht auszuschließen. Fraglich bleibt auch, ob dieses Ergebnis auf eine Quantität an CD8⁺ T-Zellen mit verzerrten und oligoklonalen TCR-Repertoire oder auf einen geringeren Einfluss von IVIg oder auch beidem zu beziehen sein könnte. Zu erwähnen ist auch, dass das CD8⁺ TCR-Repertoire von CIDP-Patienten mit IVIg-Therapie im Vergleich zu CIDP-Patienten ohne IVIg-Therapie signifikant mehr normale, sowie signifikant weniger verzerrte Verteilungen aufwies, denn im T-Test konnten signifikante Mittelwertunterschiede zwischen CIDP-Patienten und niPNP bei diesen Verteilungen errechnet werden, jedoch nicht zwischen CIDP-Patienten mit IVIg-Therapie und niPNP-Probanden. Interessant ist auch, dass dies nicht für die verzerrten Verteilungen beim Vergleich mit den Kontroll-Probanden zutrifft. Zu diskutieren wäre, ob dieses Ergebnis zufällig auftrat oder ob IVIg prinzipiell mehr Einfluss auf den Anteil an verzerrten Verteilungen im CD8⁺ TCR-Repertoire von niPNP-Patienten haben bzw. diese veränderten T-Zellen besser bekämpfen könnte. Hierzu bedarf es weitere Forschungsarbeit mit ggf. höheren Fallzahlen und einer möglichen Differenzierung von CD8⁺ T-Zellen in autoreaktiv und klonal aktiv. Interessant war die Feststellung, dass eine Angleichung des TCR-Repertoires von CIDP-Patienten mit IVIg-Therapie an das von Kontroll-Probanden nicht mit dem klinischen Verlauf der CIDP-Erkrankung korrelierte.

Wir konnten bei unseren Untersuchungen keine eindeutige klinische Korrelation zur Angleichung des TCR-Repertoires beobachten. Wir konnten zwar eine Angleichung anhand prozentualer Unterschiede bei allen CIDP-Patienten vor allem im CD4⁺ TCR-Repertoire beobachten, diese waren jedoch nicht signifikant. Im CD8⁺ TCR-Repertoire

könnten wir keine eindeutige Tendenz zur prozentualen Angleichung an eine Normalverteilung bei CIDP-Patienten mit klinischer Verbesserung beobachten.

6.2.3 Vermehrte T-Zell-Expression bei CIDP-Patienten

In den hiesigen Ergebnissen konnte ein signifikanter Unterschied im TCR-Repertoire bei allen Verteilungen, bis auf die oligoklonalen in der CD4⁺ Population und bei den verschobenen in der CD8⁺ Population zwischen CIDP-Patienten und Kontroll-Probanden ausgemacht werden. Somit bestehen vermehrte Abweichungen im TCR-Repertoire der CIDP-Patienten, was Hinweise auf eine T-Zell-vermittelte Immunabwehr im Pathomechanismus der CIDP wahrscheinlicher machen lassen.

Die relative Häufigkeit von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen in den betroffenen Nerven von Patienten mit entzündlichen Neuropathie wurde nur sehr selten erforscht (Khalili-Shirazi et al., 1997; K. Matsumuro et al., 1994; Meyer Zu Hörste et al., 2009; T. Schneider-Hohendorf et al., 2012). Jedoch wurde schon 1986 entdeckt, dass MHC Klasse II, die Antigene für CD4⁺ T-Zellen präsentieren, nur auf einigen Makrophagen und Schwannzellen exprimiert worden sind (Pollard et al., 1986), womit CD4⁺ T-Zellen eher nicht die Hauptrolle im Nerven der CIDP-Patienten zu spielen scheinen. Des Weiteren wurde publiziert, dass eine Infiltration von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen im Endoneurium von biopsierten Nerven der CIDP-Patienten vorherrschte (Khalili-Shirazi et al., 1997), dass das Vorhandensein von T-Zellen im Endoneurium mit der Aktivität der Demyelinisierung korrelieren könnte und dass die Anzahl der CD8⁺ T-Zellen gegenüber der CD4⁺ T-Zellen überwog (K. Matsumuro et al., 1994).

Eine weitere Studie machte die zerstörerischen Fähigkeiten von T-Zellen, die sich in peripheren Nerven ansammelten, durch eine erhöhte BNS-Durchlässigkeit, sowie Demyelinisierung deutlich (Harvey et al., 1995). Interessant ist auch, dass gerade die Anzahl der T-Zellen im N. suralis der CIDP-Patienten als diagnostisches Kriterium betrachtet werden kann und damit die T-Zellen im Pathomechanismus der CIDP von Belang zu sein scheinen (Bosboom et al., 1999), wobei hier nicht zwischen CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen unterschieden wurde.

Immunphänotypische Untersuchungen des Blutes von CIDP-Patienten ergaben weitere Hinweise auf eine erhöhte Beteiligung CD8⁺ T-Zellen im Krankheitsgeschehen der CIDP (Van den Berg et al., 1995).

Übereinstimmend mit den bereits aufgeführten und den hiesigen Forschungsergebnissen wurde in einer weiteren Studie über das Überwiegen der

starken Abweichungen im CD8⁺ TCR-Repertoire bei CIDP-Patienten berichtet. Darin wurde eindeutig gezeigt, dass die oligoklonalen Verteilungen im TCR-Repertoire der CD8⁺ T-Zellen, die aus dem peripheren Blut der CIDP-Patienten gewonnen wurden, in Form einer klonalen CD8⁺ T-Zell-Expansion auch in einer Biopsie der betroffenen Nerven dieser Patienten gefunden wurden. Das heißt, dass die Abweichungen im CD8⁺ TCR-Repertoire sowohl durch Nervenbiopsien, als auch durch die Gewinnung von peripherem Blut mit Hilfe des CDR3-Spectratypings belegt wurden (T. Schneider-Hohendorf et al., 2012). Dadurch, dass sich CD8⁺ T-Zellen nicht nur am Ort der Entzündung, nämlich im entzündeten Nerv durch Nervenbiopsie, sondern auch systemisch im peripheren Blut von CIDP-Patienten nachweisen ließ (Hohlfeld and Dornmair, 2012), liegt eine systemische Ausbreitung über die Blutbahn in sekundäre Lymphorgane nahe (T. Schneider-Hohendorf et al., 2012). Mittels möglicher, daraus resultierender (Auto-)Antigen-Präsentation in den sekundären Lymphorganen, könnten weitere Nerven attackiert werden. In dieser Arbeit konnte durch die Untersuchung des peripheren Blutes am ehesten eine systemische Antigen-Präsentation bestätigt werden, wobei zusätzlich zu körpereigenen (Auto-)Antigenen auch Virusinfektionen die CIDP triggern könnten. Beide Triggermöglichkeiten unterstützen eine vermehrte Anzahl an CD8⁺ T-Zellen bei CIDP-Patienten. Auch neueste Studien zeigen eine Prädominanz autoreaktiver T-Zellen im Pathomechanismus der CIDP (Klehm et al., 2015, 2014), so dass gemeinsam mit den hier gefundenen Ergebnissen eine T-Zell-vermittelte Immunreaktion im Rahmen der CIDP am ehesten im Vordergrund stehen könnte.

6.2.4 CIDP und Virusinfektionen

Zur Diskussion steht, ob das Auftreten oligoklonaler Verteilungen mit einer chronischen T-Zell-Antwort auf Infektionen einhergeht (D N Posnett et al., 1994; R Schwab et al., 1997).

Zytotoxische CD8⁺ T-Zellen sind hauptsächlich für die Immunabwehr von Virusinfektionen verantwortlich (R. M. Buller et al., 1987).

Schon sehr früh gab es Hinweise auf mögliche Zusammenhänge von Virusinfektionen und chronischen Autoimmunerkrankungen (M. B. Oldstone, 1989), wie z. B. die rheumatoide Arthritis, der systemische Lupus Erythematodes (SLE) oder die Multiple Sklerose (Münz et al., 2009) und möglicherweise auch die CIDP. Besonders die Tendenz zur oligoklonalen Expansion von CD8⁺ T-Zellen, wie sie in dieser Arbeit auch

bei der CIDP nachweisbar war, wird im Rahmen einer chronischen T-Zell-Reaktion im Zusammenhang mit Virusinfektionen diskutiert (D. N. Posnett et al., 1994; R. Schwab et al., 1997). Interessanterweise konnten bei untherapierten CIDP-Patienten eine höhere Epstein-Barr-Virus (EBV) Kopienzahl, sowie mäßig erhöhte EBV-spezifischen IgG festgestellt werden, was mögliche Hinweise auf einen Virus-getriggerten Pathomechanismus bei CIDP-Patienten bieten könnte (J. D. Lünemann et al., 2010). In dieser Arbeit konnte eine vermehrte Expression von T-Zellen, insbesondere der CD8⁺ T-Zellen mit verändertem TCR-Repertoire beobachtet werden. Die vermehrte CD8⁺ T-Zell-Expression könnte möglicherweise auch im Rahmen einer Virusinfektion entstanden sein. Ob tatsächlich Viren existieren und ob diese mit verantwortlich für die vermehrte CD8⁺ T-Zell-Expression während der CIDP sein könnten, bleibt weiterhin ungeklärt und kann eine mögliche Basis für weitere Forschungen bieten.

7. Schlussfolgerung

Mit Hilfe unserer Untersuchungen konnten wir zeigen, dass eine IVIg-Therapie das TCR-Repertoire von CIDP-Patienten beeinflussen kann. Unsere Beobachtungen ergaben eine signifikante Angleichung des TCR-Repertoires an eine Gauß'sche Normalverteilung (J. Even et al., 1995; C. Pannetier et al., 1995) von Kontrollprobanden, wobei der Effekt bei CD4⁺ T-Zellen bei allen Verteilungen signifikant, jedoch bei CD8⁺ T-Zellen nur bei normalen und verschobenen Verteilungen signifikant ausfiel. IVIg könnte somit einen antiinflammatorischen Effekt z. B. vorzugsweise durch Antigen-Antikörper-Reaktion wegen des deutlicheren Einflusses von CD4⁺ T-Zellen im Rahmen der CIDP haben. Dadurch, dass wir lediglich das TCR-Repertoire mit seinen unterschiedlichen Basenlängen untersucht haben, können wir keine Aussage über Wechselwirkungen von MHC-I- oder MHC-II- Molekülen oder Einflüsse von Zytokinen, Chemokinen oder anderen Immunmodulatoren machen.

Wir konnten zeigen, dass es eine zufällige Verteilung von Abweichungen des TCR-Repertoires von der Normalverteilung von Kontrollprobanden auf die jeweiligen V β -Elemente war. Dies könnte den Schluss zulassen, dass es sich um sehr unterschiedliche bzw. zahlreiche („Auto“) -Antigene im Pathomechanismus der CIDP handeln müsste.

Eine Korrelation zur Klinik konnten wir nicht beobachten, so dass das TCR-Repertoire nach diesen Untersuchungen nicht als klinischer Marker dienen könnte. Jedoch haben wir lediglich einen Vergleich von verschiedenen Patienten-Kohorten durchgeführt und konnten den Einfluss von IVIg an 2 Patienten im Verlauf beobachten, so dass hier weitere Untersuchungen durchgeführt werden sollten.

8. Literaturverzeichnis

- Abe, M., Sano, Y., Maeda, T., Shimizu, F., Kashiwamura, Y., Haruki, H., Saito, K., Tasaki, A., Kawai, M., Terasaki, T., Kanda, T., 2012. Establishment and Characterization of Human Peripheral Nerve Microvascular Endothelial Cell Lines: A New *in vitro* Blood-Nerve Barrier (BNB) Model. *Cell Struct. Funct.* 37, 89–100.
- Alpdogan, O., van den Brink, M.R.M., 2012. Immune tolerance and transplantation. *Semin. Oncol.* 39, 629–642. <https://doi.org/10.1053/j.seminoncol.2012.10.001>
- Anthony, R.M., Kobayashi, T., Wermeling, F., Ravetch, J.V., 2011. Intravenous gammaglobulin suppresses inflammation through a novel T(H)2 pathway. *Nature* 475, 110–113. <https://doi.org/10.1038/nature10134>
- Austin, J.H., 1958. Recurrent polyneuropathies and their corticosteroid treatment; with five-year observations of a placebo-controlled case treated with corticotrophin, cortisone, and prednisone. *Brain J. Neurol.* 81, 157–192.
- Baig, F., Knopp, M., Rajabally, Y.A., 2012. Diagnosis, epidemiology and treatment of inflammatory neuropathies. *Br. J. Hosp. Med. Lond. Engl.* 2005 73, 380–385.
- Beeton, C., Chandy, K.G., 2007. Enrichment of NK cells from human blood with the RosetteSep kit from StemCell technologies. *J. Vis. Exp. JoVE* 326. <https://doi.org/10.3791/326>
- Berciano, J., García, A., Berciano, M.T., Lafarga, M., 2012. Criteria for Guillain-Barré syndrome: Additional insights from clinico-pathological studies. *Clin. Neurophysiol. Off. J. Int. Fed. Clin. Neurophysiol.* <https://doi.org/10.1016/j.clinph.2012.06.022>
- Bessou, P., Joffroy, M., Pagès, B., 1981. Efferents and afferents in an intact muscle nerve: background activity and effects of sural nerve stimulation in the cat. *J. Physiol.* 320, 81–102.
- Bonarius, H.P.J., Baas, F., Remmerswaal, E.B.M., van Lier, R.A.W., Berge, I.J.M. ten, Tak, P.P., de Vries, N., 2006. Monitoring the T-Cell Receptor Repertoire at Single-Clone Resolution. *PLoS ONE* 1. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000055>
- Bonati, A., Zanelli, P., Ferrari, S., Plebani, A., Starcich, B., Savi, M., Neri, T.M., 1992. T-cell receptor beta-chain gene rearrangement and expression during human thymic ontogenesis. *Blood* 79, 1472–1483.
- Bosboom, W.M., Van den Berg, L.H., De Boer, L., Van Son, M.J., Veldman, H., Franssen, H., Logtenberg, T., Wokke, J.H., 1999. The diagnostic value of sural nerve T cells in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *Neurology* 53, 837–845.
- Bouvier, M., 2003. Accessory proteins and the assembly of human class I MHC molecules: a molecular and structural perspective. *Mol. Immunol.* 39, 697–706.
- Bromberg, M.B., 2011. Review of the evolution of electrodiagnostic criteria for chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy. *Muscle Nerve* 43, 780–794. <https://doi.org/10.1002/mus.22038>
- Brown, W.F., Snow, R., 1991. Patterns and severity of conduction abnormalities in Guillain-Barré syndrome. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 54, 768–774.
- Buller, R.M., Holmes, K.L., Hügin, A., Frederickson, T.N., Morse, H.C., 1987. Induction of cytotoxic T-cell responses *in vivo* in the absence of CD4 helper cells. *Nature* 328, 77–79. <https://doi.org/10.1038/328077a0>

- Burkel, W.E., 1967. The histological fine structure of perineurium. *Anat. Rec.* 158, 177–189. <https://doi.org/10.1002/ar.1091580207>
- Cabaniols, J.P., Fazilleau, N., Casrouge, A., Kourilsky, P., Kanellopoulos, J.M., 2001. Most alpha/beta T cell receptor diversity is due to terminal deoxynucleotidyl transferase. *J. Exp. Med.* 194, 1385–1390.
- Ciechanover, A., 2005. Intracellular protein degradation: from a vague idea thru the lysosome and the ubiquitin-proteasome system and onto human diseases and drug targeting. *Cell Death Differ.* 12, 1178–1190. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401692>
- Costa, N., Pires, A.E., Gabriel, A.M., Goulart, L.F., Pereira, C., Leal, B., Queiros, A.C., Chaara, W., Moraes-Fontes, M.F., Vasconcelos, C., Ferreira, C., Martins, J., Bastos, M., Santos, M.J., Pereira, M.A., Martins, B., Lima, M., João, C., Six, A., Demengeot, J., Fesel, C., 2013. Broadened T-cell repertoire diversity in ivlg-treated SLE patients is also related to the individual status of regulatory T-cells. *J. Clin. Immunol.* 33, 349–360. <https://doi.org/10.1007/s10875-012-9816-7>
- Csurhes, P., Sullivan, A., Green, K., Pender, M., McCombe, P., 2005. T cell reactivity to P0, P2, PMP-22, and myelin basic protein in patients with Guillain-Barré syndrome and chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 76, 1431–1439. <https://doi.org/10.1136/jnnp.2004.052282>
- Cunningham, M.E., McGonigal, R., Meehan, G.R., Barrie, J.A., Yao, D., Halstead, S.K., Willison, H.J., 2016. Anti-ganglioside antibodies are removed from circulation in mice by neuronal endocytosis. *Brain J. Neurol.* 139, 1657–1665. <https://doi.org/10.1093/brain/aww056>
- Cusick, M.F., Libbey, J.E., Fujinami, R.S., 2012. Molecular mimicry as a mechanism of autoimmune disease. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* 42, 102–111. <https://doi.org/10.1007/s12016-011-8294-7>
- Dalakas, M.C., 2012. Clinical trials in CIDP and chronic autoimmune demyelinating polyneuropathies. *J. Peripher. Nerv. Syst. JPNS* 17 Suppl 2, 34–39. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8027.2012.00393.x>
- Dalakas, M.C., 2011. Advances in the diagnosis, pathogenesis and treatment of CIDP. *Nat. Rev. Neurol.* 7, 507–517. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2011.121>
- Dalakas, M.C., 1997. Intravenous immune globulin therapy for neurologic diseases. *Ann. Intern. Med.* 126, 721–730.
- Davis, M.M., Bjorkman, P.J., 1988. T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition. *Nature* 334, 395–402. <https://doi.org/10.1038/334395a0>
- De No, R.L., Honrubia, V., 1964. Continuous conduction of action potentials by single myelinated fibers of desheathed nerv: types of normal nerv fibers*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 52, 1318–1325.
- DeFord-Watts, L.M., Dougall, D.S., Belkaya, S., Johnson, B.A., Eitson, J.L., Roybal, K.T., Barylko, B., Albanesi, J.P., Wülfing, C., van Oers, N.S.C., 2011. The CD3 zeta subunit contains a phosphoinositide-binding motif that is required for the stable accumulation of TCR-CD3 complex at the immunological synapse. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 186, 6839–6847. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1002721>
- Dorey, F.J., 2010. In Brief: Statistics in Brief: Confidence Intervals: What is the Real Result in the Target Population? *Clin. Orthop.* 468, 3137–3138. <https://doi.org/10.1007/s11999-010-1407-4>

- Durandy, A., Kaveri, S.V., Kuijpers, T.W., Basta, M., Miescher, S., Ravetch, J.V., Rieben, R., 2009. Intravenous immunoglobulins--understanding properties and mechanisms. *Clin. Exp. Immunol.* 158 Suppl 1, 2–13. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2009.04022.x>
- Durandy, A., Wahn, V., Petteway, S., Gelfand, E.W., 2005. Immunoglobulin replacement therapy in primary antibody deficiency diseases--maximizing success. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 136, 217–229. <https://doi.org/10.1159/000083948>
- Dyck, P.J., Daube, J., O'Brien, P., Pineda, A., Low, P.A., Windebank, A.J., Swanson, C., 1986. Plasma exchange in chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy. *N. Engl. J. Med.* 314, 461–465. <https://doi.org/10.1056/NEJM198602203140801>
- Emmrich, F., Strittmatter, U., Eichmann, K., 1986. Synergism in the activation of human CD8 T cells by cross-linking the T-cell receptor complex with the CD8 differentiation antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 83, 8298–8302.
- Even, J., Lim, A., Puisieux, I., Ferradini, L., Dietrich, P.Y., Toubert, A., Hercend, T., Triebel, F., Pannetier, C., Kourilsky, P., 1995. T-cell repertoires in healthy and diseased human tissues analysed by T-cell receptor beta-chain CDR3 size determination: evidence for oligoclonal expansions in tumours and inflammatory diseases. *Res. Immunol.* 146, 65–80.
- Fernandes, R.A., Shore, D.A., Vuong, M.T., Yu, C., Zhu, X., Pereira-Lopes, S., Brouwer, H., Fennelly, J.A., Jessup, C.M., Evans, E.J., Wilson, I.A., Davis, S.J., 2012. T cell receptors are structures capable of initiating signaling in the absence of large conformational rearrangements. *J. Biol. Chem.* 287, 13324–13335. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.332783>
- Ford, M.L., Larsen, C.P., 2009. Translating costimulation blockade to the clinic: lessons learned from three pathways. *Immunol. Rev.* 229, 294–306. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2009.00776.x>
- Franssen, H., 2012. Our continuing discussion on Guillain-Barré syndrome criteria. *Clin. Neurophysiol. Off. J. Int. Fed. Clin. Neurophysiol.* <https://doi.org/10.1016/j.clinph.2012.08.009>
- Gaebel, K., Blackhouse, G., Campbell, K., Robertson, D., Xie, F., Assasi, N., Chalk, C., Levine, M., Goeree, R., 2010. Intravenous immunoglobulin for the treatment of chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy: a systematic review and meta-analysis. *Open Med.* 4, e154–e166.
- Gajdos, P., Chevret, S., Clair, B., Tranchant, C., Chastang, C., 1997. Clinical trial of plasma exchange and high-dose intravenous immunoglobulin in myasthenia gravis. Myasthenia Gravis Clinical Study Group. *Ann. Neurol.* 41, 789–796. <https://doi.org/10.1002/ana.410410615>
- Gamble, H.J., Eames, R.A., 1964. An electron microscope study of the connective tissue of human peripheral nerve. *J. Anat.* 98, 655–663.
- Gandevia, S., Burke, D., McKeon, B., 1982. The relationship between the size of a muscle afferent volley and the cerebral potential it produces. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 45, 705–710.
- Gascoigne, N.R.J., Palmer, E., 2011. Signaling in thymic selection. *Curr. Opin. Immunol.* 23, 207–212. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2010.12.017>
- Gauss, G.H., Lieber, M.R., 1992. The basis for the mechanistic bias for deletional over inversional V(D)J recombination. *Genes Dev.* 6, 1553–1561.
- Germain, R.N., 2002. T-cell development and the CD4-CD8 lineage decision. *Nat. Rev. Immunol.* 2, 309–322. <https://doi.org/10.1038/nri798>

- Germain, R.N., Margulies, D.H., 1993. The biochemistry and cell biology of antigen processing and presentation. *Annu. Rev. Immunol.* 11, 403–450.
<https://doi.org/10.1146/annurev.iy.11.040193.002155>
- Gilfillan, S., Bachmann, M., Trembleau, S., Adorini, L., Kalinke, U., Zinkernagel, R., Benoist, C., Mathis, D., 1995. Efficient immune responses in mice lacking N-region diversity. *Eur. J. Immunol.* 25, 3115–3122.
<https://doi.org/10.1002/eji.1830251119>
- Godfrey, D.I., Kennedy, J., Suda, T., Zlotnik, A., 2012. Pillars article: a developmental pathway involving four phenotypically and functionally distinct subsets of CD3-CD4-CD8- triple-negative adult mouse thymocytes defined by CD44 and CD25 expression. *J. Immunol.* 193, 4244–4252. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 189, 4203–4211.
- Gold, R., Archelos, J.J., Hartung, H.P., 1999. Mechanisms of immune regulation in the peripheral nervous system. *Brain Pathol. Zurich Switz.* 9, 343–360.
- Gold, R., Hartung, H.P., Lassmann, H., 1997. T-cell apoptosis in autoimmune diseases: termination of inflammation in the nervous system and other sites with specialized immune-defense mechanisms. *Trends Neurosci.* 20, 399–404.
- Gorson, K.C., van Schaik, I.N., Merkies, I.S.J., Lewis, R.A., Barohn, R.J., Koski, C.L., Cornblath, D.R., Hughes, R.A.C., Hahn, A.F., Baumgarten, M., Goldstein, J., Katz, J., Graves, M., Parry, G., van Doorn, P.A., 2010. Chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy disease activity status: recommendations for clinical research standards and use in clinical practice. *J. Peripher. Nerv. Syst. JPNS* 15, 326–333. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8027.2010.00284.x>
- Griesemer, A.D., Sorenson, E.C., Hardy, M.A., 2010. The role of the thymus in tolerance. *Transplantation* 90, 465–474.
<https://doi.org/10.1097/TP.0b013e3181e7e54f>
- Gui, J., Mustachio, L.M., Su, D.-M., Craig, R.W., 2012. Thymus Size and Age-related Thymic Involution: Early Programming, Sexual Dimorphism, Progenitors and Stroma. *Aging Dis.* 3, 280–290.
- Guo, X., Qin, X., Zhang, Y., Huang, C., Yu, G., 2014. Electrophysiological features of POEMS syndrome and chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *J. Clin. Neurosci. Off. J. Neurosurg. Soc. Australas.* 21, 587–590.
<https://doi.org/10.1016/j.jocn.2013.05.023>
- Gürçan, H.M., Ahmed, A.R., 2007. Efficacy of various intravenous immunoglobulin therapy protocols in autoimmune and chronic inflammatory disorders. *Ann. Pharmacother.* 41, 812–823. <https://doi.org/10.1345/aph.1K037>
- Hage, F.E., Durgeau, A., Mami-Chouaib, F., 2013. TAP expression level in tumor cells defines the nature and processing of MHC class I peptides for recognition by tumor-specific cytotoxic T lymphocytes. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1283, 75–80.
<https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2012.06777.x>
- Hahn, A.F., Bolton, C.F., Pillay, N., Chalk, C., Benstead, T., Bril, V., Shumak, K., Vandervoort, M.K., Feasby, T.E., 1996. Plasma-exchange therapy in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. A double-blind, sham-controlled, cross-over study. *Brain J. Neurol.* 119 (Pt 4), 1055–1066.
- Hartung, H.P., Hughes, R.A., Taylor, W.A., Heinger, K., Reiners, K., Toyka, K.V., 1990. T cell activation in Guillain-Barré syndrome and in MS: elevated serum levels of soluble IL-2 receptors. *Neurology* 40, 215–218.
- Hartung, H.P., Reiners, K., Schmidt, B., Stoll, G., Toyka, K.V., 1991. Serum interleukin-2 concentrations in Guillain-Barré syndrome and chronic idiopathic

- demyelinating polyradiculoneuropathy: comparison with other neurological diseases of presumed immunopathogenesis. *Ann. Neurol.* 30, 48–53. <https://doi.org/10.1002/ana.410300110>
- Harvey, G.K., Gold, R., Hartung, H.P., Toyka, K.V., 1995. Non-neural-specific T lymphocytes can orchestrate inflammatory peripheral neuropathy. *Brain J. Neurol.* 118 (Pt 5), 1263–1272.
- Hewitt, E.W., 2003. The MHC class I antigen presentation pathway: strategies for viral immune evasion. *Immunology* 110, 163–169. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2567.2003.01738.x>
- Hogquist, K.A., Tomlinson, A.J., Kieper, W.C., McGargill, M.A., Hart, M.C., Naylor, S., Jameson, S.C., 1997. Identification of a naturally occurring ligand for thymic positive selection. *Immunity* 6, 389–399.
- Hohlfeld, R., Dornmair, K., 2012. What T-cell receptors can tell us about neurologic disease. *Neurology* 78, 376–377. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e318245d2f5>
- Hsieh, C.S., Heimberger, A.B., Gold, J.S., O'Garra, A., Murphy, K.M., 1992. Differential regulation of T helper phenotype development by interleukins 4 and 10 in an alpha beta T-cell-receptor transgenic system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89, 6065–6069.
- Huesmann, M., Scott, B., Kisielow, P., von Boehmer, H., 1991. Kinetics and efficacy of positive selection in the thymus of normal and T cell receptor transgenic mice. *Cell* 66, 533–540.
- Hughes, R., 2010. Chronic Inflammatory Demyelinating Polyradiculoneuropathy. *J. Clin. Immunol.* <https://doi.org/10.1007/s10875-010-9399-0>
- Hughes, R., Bensa, S., Willison, H., Van den Bergh, P., Comi, G., Illa, I., Nobile-Orazio, E., van Doorn, P., Dalakas, M., Bojar, M., Swan, A., 2001. Randomized controlled trial of intravenous immunoglobulin versus oral prednisolone in chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy. *Ann. Neurol.* 50, 195–201.
- Hughes, R.A.C., Donofrio, P., Bril, V., Dalakas, M.C., Deng, C., Hanna, K., Hartung, H.-P., Latov, N., Merkies, I.S.J., van Doorn, P.A., 2008. Intravenous immune globulin (10% caprylate-chromatography purified) for the treatment of chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy (ICE study): a randomised placebo-controlled trial. *Lancet Neurol.* 7, 136–144. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(07\)70329-0](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(07)70329-0)
- Hurez, V., Kaveri, S.V., Mouhoub, A., Dietrich, G., Mani, J.C., Klatzmann, D., Kazatchkine, M.D., 1994. Anti-CD4 activity of normal human immunoglobulin G for therapeutic use. (Intravenous immunoglobulin, IVIg). *Ther. Immunol.* 1, 269–277.
- Imbach, P., 2012. 30 years of immunomodulation by intravenous immunoglobulin. *Immunotherapy* 4, 651–654. <https://doi.org/10.2217/imt.12.60>
- Jacob, S., Rajabally, Y.A., 2009. Current proposed mechanisms of action of intravenous immunoglobulins in inflammatory neuropathies. *Curr. Neuropharmacol.* 7, 337–342. <https://doi.org/10.2174/157015909790031166>
- Jacobs, J.M., Macfarlane, R.M., Cavanagh, J.B., 1976. Vascular leakage in the dorsal root ganglia of the rat, studied with horseradish peroxidase. *J. Neurol. Sci.* 29, 95–107.
- Janeway, C.A., 1992. The T cell receptor as a multicomponent signalling machine: CD4/CD8 coreceptors and CD45 in T cell activation. *Annu. Rev. Immunol.* 10, 645–674. <https://doi.org/10.1146/annurev.iy.10.040192.003241>

- Jasti, A.K., Selmi, C., Sarmiento-Monroy, J.C., Vega, D.A., Anaya, J.-M., Gershwin, M.E., 2016. Guillain-Barré syndrome: causes, immunopathogenic mechanisms and treatment. *Expert Rev. Clin. Immunol.* 12, 1175–1189. <https://doi.org/10.1080/1744666X.2016.1193006>
- Joyce, S., Kuzushima, K., Kepecs, G., Angeletti, R.H., Nathenson, S.G., 1994. Characterization of an incompletely assembled major histocompatibility class I molecule (H-2Kb) associated with unusually long peptides: implications for antigen processing and presentation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 4145–4149.
- Kanda, T., 2013. Biology of the blood-nerve barrier and its alteration in immune mediated neuropathies. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 84, 208–212. <https://doi.org/10.1136/jnnp-2012-302312>
- Kang, J., Coles, M., Cado, D., Raulet, D.H., 1998. The developmental fate of T cells is critically influenced by TCRgammadelta expression. *Immunity* 8, 427–438.
- Kang, J., Raulet, D.H., 1997. Events that regulate differentiation of alpha beta TCR+ and gamma delta TCR+ T cells from a common precursor. *Semin. Immunol.* 9, 171–179. <https://doi.org/10.1006/smim.1997.0069>
- Kasamon, Y.L., Nguyen, T.N., Chan, J.A., Nascimento, A.F., 2002. EBV-associated lymphoma and chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy in an adult without overt immunodeficiency. *Am. J. Hematol.* 69, 289–293.
- Kaveri, S., Vassilev, T., Hurez, V., Lengagne, R., Lefranc, C., Cot, S., Pouletty, P., Glotz, D., Kazatchkine, M.D., 1996. Antibodies to a conserved region of HLA class I molecules, capable of modulating CD8 T cell-mediated function, are present in pooled normal immunoglobulin for therapeutic use. *J. Clin. Invest.* 97, 865–869. <https://doi.org/10.1172/JCI118488>
- Kazatchkine, M.D., Kaveri, S.V., 2001. Immunomodulation of autoimmune and inflammatory diseases with intravenous immune globulin. *N. Engl. J. Med.* 345, 747–755. <https://doi.org/10.1056/NEJMr993360>
- Keppler, S.J., Rosenits, K., Koegl, T., Vucikujja, S., Aichele, P., 2012. Signal 3 cytokines as modulators of primary immune responses during infections: the interplay of type I IFN and IL-12 in CD8 T cell responses. *PloS One* 7, e40865. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040865>
- Kessel, A., Ammuri, H., Peri, R., Pavlotzky, E.R., Blank, M., Shoenfeld, Y., Toubi, E., 2007. Intravenous immunoglobulin therapy affects T regulatory cells by increasing their suppressive function. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 179, 5571–5575.
- Khalili-Shirazi, A., Gregson, N.A., Hall, M.A., Hughes, R.A., Lanchbury, J.S., 1997. T cell receptor V beta gene usage in Guillain-Barré syndrome. *J. Neurol. Sci.* 145, 169–176.
- Kiefer, R., Kieseier, B.C., Stoll, G., Hartung, H.P., 2001. The role of macrophages in immune-mediated damage to the peripheral nervous system. *Prog. Neurobiol.* 64, 109–127.
- Kieseier, B.C., Kiefer, R., Gold, R., Hemmer, B., Willison, H.J., Hartung, H.-P., 2004. Advances in understanding and treatment of immune-mediated disorders of the peripheral nervous system. *Muscle Nerve* 30, 131–156. <https://doi.org/10.1002/mus.20076>
- Kieseier, B.C., Meyer Zu Hörste, G., Lehmann, H.C., Gold, R., Hartung, H.-P., 2008. Intravenous immunoglobulins in the treatment of immune neuropathies. *Curr. Opin. Neurol.* 21, 555–562. <https://doi.org/10.1097/WCO.0b013e32830efc03>

- Klehmet, J., Goehler, J., Ulm, L., Kohler, S., Meisel, C., Meisel, A., Harms, H., 2015a. Effective treatment with intravenous immunoglobulins reduces autoreactive T-cell response in patients with CIDP. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 86, 686–691. <https://doi.org/10.1136/jnnp-2014-307708>
- Klehmet, J., Meisel, C., Meisel, A., 2014. Efficiency of long-term treatment with intravenous immunoglobulins correlates with reduced autoreactive T cell responses in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy patients. *Clin. Exp. Immunol.* 178 Suppl 1, 149–150. <https://doi.org/10.1111/cei.12549>
- Köller, H., Kieseier, B.C., Jander, S., Hartung, H.-P., 2005. Chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *N. Engl. J. Med.* 352, 1343–1356. <https://doi.org/10.1056/NEJMra041347>
- Kou, Z.C., Puhr, J.S., Rojas, M., McCormack, W.T., Goodenow, M.M., Sleasman, J.W., 2000. T-Cell receptor Vbeta repertoire CDR3 length diversity differs within CD45RA and CD45RO T-cell subsets in healthy and human immunodeficiency virus-infected children. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 7, 953–959.
- Kuwabara, S., Misawa, S., 2012. Immune-mediated neuropathies induced by immunosuppressive treatment. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 83, 672. <https://doi.org/10.1136/jnnp-2012-302876>
- Kuwabara, S., Ogawara, K., Misawa, S., Mori, M., Hattori, T., 2002. Distribution patterns of demyelination correlate with clinical profiles in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 72, 37–42.
- Larue, S., Bombelli, F., Viala, K., Neil, J., Maisonobe, T., Bouche, P., Musset, L., Fournier, E., Léger, J.M., 2011. Non-anti-MAG DADS neuropathy as a variant of CIDP: clinical, electrophysiological, laboratory features and response to treatment in 10 cases. *Eur. J. Neurol.* 18, 899–905. <https://doi.org/10.1111/j.1468-1331.2010.03312.x>
- Laughlin, R.S., Dyck, P.J., Melton, L.J. 3rd, Leibson, C., Ransom, J., Dyck, P.J.B., 2009. Incidence and prevalence of CIDP and the association of diabetes mellitus. *Neurology* 73, 39–45. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e3181aaea47>
- Lawrence, M.B., Springer, T.A., 1991. Leukocytes roll on a selectin at physiologic flow rates: distinction from and prerequisite for adhesion through integrins. *Cell* 65, 859–873.
- Leppert, D., Hughes, P., Huber, S., Erne, B., Grygar, C., Said, G., Miller, K.M., Steck, A.J., Probst, A., Fuhr, P., 1999. Matrix metalloproteinase upregulation in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy and nonsystemic vasculitic neuropathy. *Neurology* 53, 62–70.
- Lichtenfels, R., Rapp, G., Hombach, A.A., Recktenwald, C.V., Dressler, S.P., Abken, H., Seliger, B., 2012. A proteomic view at T cell costimulation. *PloS One* 7, e32994. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0032994>
- Lin, W.-S., Hsu, Y.-D., 2011. Sjögren's syndrome with chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *Neurol. India* 59, 476–478. <https://doi.org/10.4103/0028-3886.82754>
- Long, S.A., Khalili, J., Ashe, J., Berenson, R., Ferrand, C., Bonyhadi, M., 2006. Standardized analysis for the quantification of Vbeta CDR3 T-cell receptor diversity. *J. Immunol. Methods* 317, 100–113. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2006.09.015>

- Lorente de Nó, R., Honrubia, V., 1966. Theory of the flow of action currents in isolated myelinated nerve fibers. *X. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 55, 321–328.
- Lorentendo, R., Honrubia, V., 1964a. Continuous conduction of action potentials by peripheral myelinated fibers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 52, 305–312.
- Lorentendo, R., Honrubia, V., 1964b. Electrical stimulation of the internodes of single fibers of nerves with intact sheath. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 52, 783–790.
- Lünemann, J.D., Tackenberg, B., Stein, A., Wandinger, K.P., Oertel, W.H., Wagner, H.J., Münz, C., Meisel, H., Sommer, N., Zipp, F., 2010. Dysregulated Epstein-Barr virus infection in patients with CIDP. *J. Neuroimmunol.* 218, 107–111. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2009.11.003>
- Maddur, M.S., Vani, J., Hegde, P., Lacroix-Desmazes, S., Kaveri, S.V., Bayry, J., 2011. Inhibition of differentiation, amplification, and function of human TH17 cells by intravenous immunoglobulin. *J. Allergy Clin. Immunol.* 127, 823–830–7. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2010.12.1102>
- Mahajan, V.S., Leskov, I.B., Chen, J.Z., 2005. Homeostasis of T cell diversity. *Cell. Mol. Immunol.* 2, 1–10.
- Mahdi-Rogers, M., Hughes, R. a. C., 2014. Epidemiology of chronic inflammatory neuropathies in southeast England. *Eur. J. Neurol.* 21, 28–33. <https://doi.org/10.1111/ene.12190>
- Mahdi-Rogers, M., Rajabally, Y.A., 2010. Overview of the pathogenesis and treatment of chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy with intravenous immunoglobulins. *Biol. Targets Ther.* 4, 45–49.
- Mathey, E.K., Park, S.B., Hughes, R.A.C., Pollard, J.D., Armati, P.J., Barnett, M.H., Taylor, B.V., Dyck, P.J.B., Kiernan, M.C., Lin, C.S.-Y., 2015. Chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy: from pathology to phenotype. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 86, 973–985. <https://doi.org/10.1136/jnnp-2014-309697>
- Matsumuro, K., Izumo, S., Umehara, F., Osame, M., 1994. Chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy: histological and immunopathological studies on biopsied sural nerves. *J. Neurol. Sci.* 127, 170–178.
- Mausberg, A.K., Dorok, M., Stettner, M., Müller, M., Hartung, H.P., Dehmel, T., Warnke, C., Meyer Zu Hörste, G., Kieseier, B.C., 2013. Recovery of the T-cell repertoire in CIDP by IV immunoglobulins. *Neurology* 80, 296–303. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e31827debad>, (Abbildung 1 A, Seite 298, Copyright © 2018 mit Genehmigung vom Wolters Kluwer Permissions Team)
- Mehndiratta, M.M., Hughes, R.A.C., 2012. Plasma exchange for chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy. *Cochrane Database Syst. Rev. Online* 9, CD003906. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD003906.pub3>
- Merkies, I.S.J., Schmitz, P.I.M., 2006. Getting closer to patients: the INCAT Overall Disability Sum Score relates better to patients' own clinical judgement in immune-mediated polyneuropathies. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 77, 970–972. <https://doi.org/10.1136/jnnp.2005.076174>
- Meyer zu Hörste, G., Hartung, H.-P., Kieseier, B.C., 2007. From bench to bedside--experimental rationale for immune-specific therapies in the inflamed peripheral nerve. *Nat. Clin. Pract. Neurol.* 3, 198–211. <https://doi.org/10.1038/ncpneuro0452>, (Abbildung 1, Seite 202, Copyright © 2018 mit Genehmigung von Springer Nature über Copyright Clearance Center)

- Meyer zu Hörste, G., Hu, W., Hartung, H.-P., Lehmann, H.C., Kieseier, B.C., 2008. The immunocompetence of Schwann cells. *Muscle Nerve* 37, 3–13. <https://doi.org/10.1002/mus.20893>
- Meyer Zu Hörste, G., Reiners, J., Lehmann, H.C., Airas, L., Kieseier, B.C., 2009. CD73 is expressed on invading T lymphocytes in the inflamed peripheral nerve. *Muscle Nerve* 40, 287–289. <https://doi.org/10.1002/mus.21325>
- Misawa, S., Kuwabara, S., Mori, M., Kawaguchi, N., Yoshiyama, Y., Hattori, T., 2001. Serum levels of tumor necrosis factor-alpha in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *Neurology* 56, 666–669.
- Mizisin, A.P., Weerasuriya, A., 2011. Homeostatic regulation of the endoneurial microenvironment during development, aging and in response to trauma, disease and toxic insult. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 121, 291–312. <https://doi.org/10.1007/s00401-010-0783-x>
- Monteiro, J., Hingorani, R., Peroglizzi, R., Apatoff, B., Gregersen, P.K., 1996. Oligoclonality of CD8 + T cells in Multiple Sclerosis. *ResearchGate* 23, 127–38. <https://doi.org/10.3109/08916939608995336>
- Mosmann, T.R., Coffman, R.L., 1989. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu. Rev. Immunol.* 7, 145–173. <https://doi.org/10.1146/annurev.iy.07.040189.001045>
- Motulsky, H.J., Brown, R.E., 2006. Detecting outliers when fitting data with nonlinear regression – a new method based on robust nonlinear regression and the false discovery rate. *BMC Bioinformatics* 7, 123. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-7-123>
- Muley, S.A., Parry, G.J., 2012. Multifocal motor neuropathy. *J. Clin. Neurosci. Off. J. Neurosurg. Soc. Australas.* 19, 1201–1209. <https://doi.org/10.1016/j.jocn.2012.02.011>
- Munz, C., 2010. Antigen processing via autophagy - not only for MHC class II presentation anymore? *Curr. Opin. Immunol.* 22, 89–93. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2010.01.016>
- Münz, C., Lünemann, J.D., Getts, M.T., Miller, S.D., 2009. Antiviral immune responses: triggers of or triggered by autoimmunity? *Nat. Rev. Immunol.* 9, 246–258. <https://doi.org/10.1038/nri2527>
- Murphy Kenneth, Travers Paul, Walport Mark (2009), *Janeways Immunologie*. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag, 7. Auflage 2009, Seite 199, Abbildung 4.10, Seite 354, Abbildung 7.21, Seite 356, Abbildung 7.22, Seite 200, Abb. 4.12, Copyright © 2008 durch Garland-Wissenschaft, Taylor and Francis Goup, LLC, verwendet mit Genehmigung von W.W. Norton & Company, Inc.
- Neefjes, J., Sadaka, C., 2012. Into the intracellular logistics of cross-presentation. *Front. Immunol.* 3, 31. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00031>
- Nimmerjahn, F., Ravetch, J.V., 2008a. Anti-inflammatory actions of intravenous immunoglobulin. *Annu. Rev. Immunol.* 26, 513–533. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.26.021607.090232>
- Nociti, V., Frisullo, G., Marti, A., Luigetti, M., Iorio, R., Patanella, A.K., Bianco, A., Tonali, P.A., Grillo, R.L., Sabatelli, M., Batocchi, A.P., 2010. Epstein-Barr virus antibodies in serum and cerebrospinal fluid from multiple sclerosis, chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy and amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neuroimmunol.* 225, 149–152. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2010.04.007>

- Oldstone, M.B., 1989. Overview: infectious agents as etiologic triggers of autoimmune disease. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 145, 1–3.
- Owen, J.J., Jenkinson, E.J., 1992. Apoptosis and T-cell repertoire selection in the thymus. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 663, 305–310.
- Panicker, R., Bloom, A.L., Compston, D.A., 1988. Inflammatory demyelinating polyneuropathy in a haemophiliac associated with human immunodeficiency virus infection, responding to high dose intravenous immunoglobulin. *Postgrad. Med. J.* 64, 699–700.
- Pannetier, C., Cochet, M., Darche, S., Casrouge, A., Zöller, M., Kourilsky, P., 1993. The sizes of the CDR3 hypervariable regions of the murine T-cell receptor beta chains vary as a function of the recombined germ-line segments. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90, 4319–4323.
- Pannetier, C., Even, J., Kourilsky, P., 1995. T-cell repertoire diversity and clonal expansions in normal and clinical samples. *Immunol. Today* 16, 176–181, (Abbildung 1 (a), Seite 177 und Abbildung 2 (a) und (b), Seite 178, Copyright © 2018 mit Genehmigung von Elsevier über Copyright Clearance Center)
- Papathanasiou, A., Markakis, I., 2016. Clinical Heterogeneity of Guillain-Barré Syndrome in the Emergency Department: Impact on Clinical Outcome. *Case Rep. Emerg. Med.* 2016, 4981274. <https://doi.org/10.1155/2016/4981274>
- Patel, E.S., Okada, S., Hachey, K., Yang, L.-J., Durum, S.K., Moreb, J.S., Chang, L.-J., 2012. Regulation of in vitro human T cell development through interleukin-7 deprivation and anti-CD3 stimulation. *BMC Immunol.* 13, 46. <https://doi.org/10.1186/1471-2172-13-46>
- Paul, W.E., Seder, R.A., 1994. Lymphocyte responses and cytokines. *Cell* 76, 241–251.
- Pereira, J.A., Lebrun-Julien, F., Suter, U., 2012. Molecular mechanisms regulating myelination in the peripheral nervous system. *Trends Neurosci.* 35, 123–134. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2011.11.006>
- Petrie, H.T., Livak, F., Burtrum, D., Mazel, S., 1995. T cell receptor gene recombination patterns and mechanisms: cell death, rescue, and T cell production. *J. Exp. Med.* 182, 121–127.
- Petrovsky, N., Harrison, L.C., 1997. Diurnal rhythmicity of human cytokine production: a dynamic disequilibrium in T helper cell type 1/T helper cell type 2 balance? *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 158, 5163–5168.
- Poduslo, J.F., Curran, G.L., Berg, C.T., 1994. Macromolecular permeability across the blood-nerve and blood-brain barriers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 5705–5709.
- Pollard, J.D., McCombe, P.A., Baverstock, J., Gatenby, P.A., McLeod, J.G., 1986. Class II antigen expression and T lymphocyte subsets in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *J. Neuroimmunol.* 13, 123–134.
- Posnett, D.N., Sinha, R., Kabak, S., Russo, C., 1994. Clonal populations of T cells in normal elderly humans: the T cell equivalent to “benign monoclonal gammopathy.” *J. Exp. Med.* 179, 609–618.
- Puisieux, I., Even, J., Pannetier, C., Jotereau, F., Favrot, M., Kourilsky, P., 1994. Oligoclonality of tumor-infiltrating lymphocytes from human melanomas. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 153, 2807–2818.
- Rajabally, Y.A., Samarasekera, S., 2010. Electrophysiological sensory demyelination in typical chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *Eur. J. Neurol.* 17, 939–944. <https://doi.org/10.1111/j.1468-1331.2010.02953.x>

- Rempala, G.A., Seweryn, M., Ignatowicz, L., 2011. Model for comparative analysis of antigen receptor repertoires. *J. Theor. Biol.* 269, 1–15.
<https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2010.10.001>
- Robey, E., Fowlkes, B.J., 1994. Selective events in T cell development. *Annu. Rev. Immunol.* 12, 675–705. <https://doi.org/10.1146/annurev.iy.12.040194.003331>
- Rotta, F.T., Sussman, A.T., Bradley, W.G., Ram Ayyar, D., Sharma, K.R., Shebert, R.T., 2000. The spectrum of chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *J. Neurol. Sci.* 173, 129–139.
- Rudensky AYu, Preston-Hurlburt, P., Hong, S.C., Barlow, A., Janeway, C.A.J., 1991. Sequence analysis of peptides bound to MHC class II molecules. *Nature* 353, 622–627. <https://doi.org/10.1038/353622a0>
- Said, G., Krarup, C., 2013. Chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *Handb. Clin. Neurol.* 115, 403–413. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-52902-2.00022-9>
- Salomon, B., Rhee, L., Bour-Jordan, H., Hsin, H., Montag, A., Soliven, B., Arcella, J., Girvin, A.M., Padilla, J., Miller, S.D., Bluestone, J.A., 2001. Development of spontaneous autoimmune peripheral polyneuropathy in B7-2-deficient NOD mice. *J. Exp. Med.* 194, 677–684.
- San-Juan, O.D., Castro-Macías, J.I., 2008. [Chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy. 10 years' experience in a Mexican centre]. *Rev. Neurol.* 46, 656–659.
- Sanvito, L., Makowska, A., Gregson, N., Nemni, R., Hughes, R.A.C., 2009. Circulating subsets and CD4(+)CD25(+) regulatory T cell function in chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy. *Autoimmunity* 42, 667–677. <https://doi.org/10.3109/08916930903140907>
- Schmidt, B., Toyka, K.V., Kiefer, R., Full, J., Hartung, H.P., Pollard, J., 1996. Inflammatory infiltrates in sural nerve biopsies in Guillain-Barre syndrome and chronic inflammatory demyelinating neuropathy. *Muscle Nerve* 19, 474–487. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4598\(199604\)19:4<AID-MUS8>3.0.CO;2-9](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4598(199604)19:4<AID-MUS8>3.0.CO;2-9)
- Schneider-Hohendorf, T., Schwab, N., Uçeyler, N., Göbel, K., Sommer, C., Wiendl, H., 2012. CD8+ T-cell immunity in chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy. *Neurology* 78, 402–408. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e318245d250>
- Schwab, N., Bien, C.G., Waschbisch, A., Becker, A., Vince, G.H., Dornmair, K., Wiendl, H., 2009. CD8+ T-cell clones dominate brain infiltrates in Rasmussen encephalitis and persist in the periphery. *Brain* 132, 1236–1246. <https://doi.org/10.1093/brain/awp003>
- Schwab, R., Szabo, P., Manavalan, J.S., Weksler, M.E., Posnett, D.N., Pannetier, C., Kourilsky, P., Even, J., 1997. Expanded CD4+ and CD8+ T cell clones in elderly humans. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 158, 4493–4499.
- Schwarz, J.R., Reid, G., Bostock, H., 1995. Action potentials and membrane currents in the human node of Ranvier. *Pflüg. Arch. Eur. J. Physiol.* 430, 283–292.
- Scollay, R.G., Butcher, E.C., Weissman, I.L., 1980. Thymus cell migration. Quantitative aspects of cellular traffic from the thymus to the periphery in mice. *Eur. J. Immunol.* 10, 210–218. <https://doi.org/10.1002/eji.1830100310>
- Seite, J.-F., Shoenfeld, Y., Youinou, P., Hillion, S., 2008. What is the contents of the magic draft IVIg? *Autoimmun. Rev.* 7, 435–439. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2008.04.012>

- Shortman, K., Egerton, M., Spangrude, G.J., Scollay, R., 1990. The generation and fate of thymocytes. *Semin. Immunol.* 2, 3–12.
- Spiliotis, E.T., Manley, H., Osorio, M., Zúñiga, M.C., Edidin, M., 2000. Selective export of MHC class I molecules from the ER after their dissociation from TAP. *Immunity* 13, 841–851.
- Stefanski, H.E., Mayerova, D., Jameson, S.C., Hogquist, K.A., 2001. A low affinity TCR ligand restores positive selection of CD8+ T cells in vivo. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 166, 6602–6607.
- Stoeckle, C., Quecke, P., Rückrich, T., Burster, T., Reich, M., Weber, E., Kalbacher, H., Driessen, C., Melms, A., Tolosa, E., 2012. Cathepsin S dominates autoantigen processing in human thymic dendritic cells. *J. Autoimmun.* 38, 332–343. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2012.02.003>
- Surh, C.D., Sprent, J., 1994. T-cell apoptosis detected in situ during positive and negative selection in the thymus. *Nature* 372, 100–103. <https://doi.org/10.1038/372100a0>
- Tackenberg, B., Lünemann, J.D., Steinbrecher, A., Rothenfusser-Korber, E., Sailer, M., Brück, W., Schock, S., Zschenderlein, R., Zipp, F., Sommer, N., 2007. Classifications and treatment responses in chronic immune-mediated demyelinating polyneuropathy. *Neurology* 68, 1622–1629. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000260972.07422.ea>
- Torvik, A., Lundar, T., 1977. A case of chronic demyelinating polyneuropathy resembling the Guillain-Barré syndrome. *J. Neurol. Sci.* 32, 45–52.
- Ubogu, E.E., 2011. Chemokine receptors as specific anti-inflammatory targets in peripheral nerves. *Endocr. Metab. Immune Disord. Drug Targets* 11, 141–153.
- Vallat, J.-M., Sommer, C., Magy, L., 2010a. Chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy: diagnostic and therapeutic challenges for a treatable condition. *Lancet Neurol.* 9, 402–412. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(10\)70041-7](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(10)70041-7)
- Van den Berg, L.H., Mollee, I., Wokke, J.H., Logtenberg, T., 1995. Increased frequencies of HPRT mutant T lymphocytes in patients with Guillain-Barré syndrome and chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy: further evidence for a role of T cells in the etiopathogenesis of peripheral demyelinating diseases. *J. Neuroimmunol.* 58, 37–42.
- Van den Bergh, P.Y.K., Hadden, R.D.M., Bouche, P., Cornblath, D.R., Hahn, A., Illa, I., Koski, C.L., Léger, J.-M., Nobile-Orazio, E., Pollard, J., Sommer, C., van Doorn, P.A., van Schaik, I.N., 2010. European Federation of Neurological Societies/Peripheral Nerve Society guideline on management of chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy: report of a joint task force of the European Federation of Neurological Societies and the Peripheral Nerve Society - first revision. *Eur. J. Neurol. Off. J. Eur. Fed. Neurol. Soc.* 17, 356–363. <https://doi.org/10.1111/j.1468-1331.2009.02930.x>
- Vanasse, M., Rossignol, E., Hadad, E., 2013. Chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *Handb. Clin. Neurol.* 112, 1163–1169. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-52910-7.00037-4>
- Vanhoutte, E.K., Latov, N., Deng, C., Hanna, K., Hughes, R.A.C., Bril, V., Dalakas, M.C., Donofrio, P., van Doorn, P.A., Hartung, H.-P., Merkies, I.S.J., 2012. Vigorimeter grip strength in CIDP: a responsive tool that rapidly measures the effect of IVIG - the ICE study. *Eur. J. Neurol. Off. J. Eur. Fed. Neurol. Soc.* <https://doi.org/10.1111/j.1468-1331.2012.03851.x>

- Venturi, V., Kedzierska, K., Turner, S.J., Doherty, P.C., Davenport, M.P., 2007. Methods for comparing the diversity of samples of the T cell receptor repertoire. *J. Immunol. Methods* 321, 182–195. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2007.01.019>
- Viganò, S., Perreau, M., Pantaleo, G., Harari, A., 2012. Positive and negative regulation of cellular immune responses in physiologic conditions and diseases. *Clin. Dev. Immunol.* 2012, 485781. <https://doi.org/10.1155/2012/485781>
- Vlam, L., van den Berg, L.H., Cats, E.A., Piepers, S., van der Pol, W.-L., 2012. Immune Pathogenesis and Treatment of Multifocal Motor Neuropathy. *J. Clin. Immunol.* <https://doi.org/10.1007/s10875-012-9779-8>
- Warmflash, A., Dinner, A.R., 2006. A model for TCR gene segment use. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 177, 3857–3864.
- Weerasuriya, A., Mizisin, A.P., 2011. The blood-nerve barrier: structure and functional significance. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 686, 149–173. https://doi.org/10.1007/978-1-60761-938-3_6
- Whitesell, J., 2010. Inflammatory neuropathies. *Semin. Neurol.* 30, 356–364. <https://doi.org/10.1055/s-0030-1267279>
- Yang, M., Peyret, C., Shi, X.Q., Siron, N., Jang, J.H., Wu, S., Fournier, S., Zhang, J., 2015. Evidence from Human and Animal Studies: Pathological Roles of CD8(+) T Cells in Autoimmune Peripheral Neuropathies. *Front. Immunol.* 6, 532. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00532>
- Yang, M., Rainone, A., Shi, X.Q., Fournier, S., Zhang, J., 2014. A new animal model of spontaneous autoimmune peripheral polyneuropathy: implications for Guillain-Barré syndrome. *Acta Neuropathol. Commun.* 2, 5. <https://doi.org/10.1186/2051-5960-2-5>
- Yin, Y., Wang, X.X., Mariuzza, R.A., 2012. Crystal structure of a complete ternary complex of T-cell receptor, peptide-MHC, and CD4. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 5405–5410. <https://doi.org/10.1073/pnas.1118801109>
- Yuki, N., 2012. Guillain-Barré syndrome and anti-ganglioside antibodies: a clinician-scientist's journey. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B Phys. Biol. Sci.* 88, 299–326.
- Zheng, J., Liu, Y., Lau, Y.-L., Tu, W., 2012. $\gamma\delta$ -T cells: an unpolished sword in human anti-infection immunity. *Cell. Mol. Immunol.* <https://doi.org/10.1038/cmi.2012.43>

9. Anhang

9.1 Materialien

9.1.1 Puffer

PBS	Wasch-Puffer, Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
2% FCS/PBS	Wasch-Puffer, 2% (v/v) FCS („fetal calf serum“), Lonza (Verviers, Belgien) in PBS
5xPuffer	cDNA Puffer, [250mM Tris-HCl (pH 8.3 bei Raumtemperatur), 375mM KCl, 15mM MgCl ₂], Invitrogen
10xPuffer	PCR Puffer, [200mM Tris-HCl (pH 8.4), 500mM KCl], Roche Diagnostics Deutschland GmbH (Mannheim, Deutschland)

9.1.2 weitere Substanzen

RosetteSep	Antikörpercocktail zur Separierung von CD4 ⁺ und CD8 ⁺ T-Zellen STEMCELL Technologies SARL, Grenoble, Frankreich
Ficoll-Paque [™] Plus	endotoxin tested GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Schweden
TRizol [®] Reagenz	Invitrogen, Mannheim, Deutschland
DEPC	PanReac AppliChem, Darmstadt, Deutschland

Chloroform	Carl Roth und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Isopropanol (Isopropyl-Alkohol)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
DTT (0,1M)	Dithiothreitol, Invitrogen
Glycogen	Invitrogen
HiDi	Applied Biosystems Deutschland GmbH, Darmstadt, Deutschland
400HD ROX (Größenstandart)	Applied Biosystems
Taq DNA Polymerase	Roche Diagnostics
PCR Grade Nucleotide Mix	Roche Diagnostics
MMLV reverse Transkriptase	Invitrogen
RNase Inhibitor	Invitrogen

9.1.3 Primer

Oligo dT Primer	Invitrogen
C β -Primer (FAM-markiert)	Invitrogen
V β -Primer	Invitrogen

9.1.4 Oligonukleotid-Sequenzen

Primer	Sequenz vom 5' - zum 3'-Ende	Position (Kodon)	Reaktions-Set
--------	---------------------------------	---------------------	---------------

Vβ1 human	CAA CAG TTC CCT GAC TTG CAC	84	A
Vβ2 human	TCA ACC ATG CAA GCC TGA CCT	86	B
Vβ3 human	TCT AGA GAG AAG AAG GAG CGC	86	C
Vβ4 human	CAT ATG AGA GTG GAT TTG TCA TT	122	B
Vβ5.1 human	TTC AGT GAG ACA CAG AGA AAC	135	D
Vβ5.2 human	CCT AAC TAT AGC TCT GAG CTG	75	D
Vβ6 human	AGG CCT GAG GGA TCC GTC TC	81	E
Vβ7 human	CTG AAT GCC CCA ACA GCT CTC	86	F
Vβ8 human	TAC TTT AAC AAC AAC GTT CCG	144	B
Vβ9 human	AAA TCT CCA GAC AAA GCT CAC	84	G
Vβ10 human	CAA AAA CTC ATC CTG TAC CTT	76	L

Vβ11 human	ACA GTC TCC AGA ATA AGG ACG	90	H
Vβ12 human	GAC AAA GGA GAA GTC TCA GAT	117	H
Vβ13.1 human	GAC CAA GGA GAA GTC CCC AAT	117	C
Vβ13.2 human	GTT GGT GAG GGT ACA ACT GCC	135	I
Vβ14 human	TCT CGA AAA GAG AAG AGG AAT	84	J
Vβ15 human	GTC TCT CGA CAG GCA CAG GCT	87	I
Vβ16 human	GAG TCT AAA CAG GAT GAG TCC	132	G
Vβ17 human	CAC AGA TAG TAA ATG ACT TTC AG	137	J
Vβ18 human	GAG TCA GGA ATG CCA AAG GAA	117	A
Vβ19 human	CCC CAA GAA CGC ACC CTG C	79	K
Vβ20 human	TCT GAG GTG CCC CAG AAT CTC	111	E

Vβ21 human	GAT ATG AGA ATGAGG AAG CAG	143	L
Vβ22 human	CAG AGA AGT CTG AAA TAT TCG A	122	F
Vβ23 human	TCA TTT CGT TTT ATG AAA AGA TGC	146	A
Vβ24 human	AAA GAT TTT AAC AAT GAA GCA GAC	129	K
Cβ human	X ^a - CTT CTG ATG GCT CAA ACA C		
	^a X bedeutet fluoreszenz-markiert.		

Die Primer wurden in Primersets (A bis L) so gemischt, dass bis zu drei Primer abhängig von der Produktgröße in einem Gemisch kombiniert werden konnten. Die Oligonukleotid-Sequenzen wurden modifiziert nach (Monteiro et al., 1996; Schwab et al., 2009).

Name	Primer	Produktgröße in bp
A	1 18 23	84 117 146
B	2 4 8	86 122 144
C	3 13,1	86 117
D	5,2 5,1	75 135
E	6 20	81 111
F	7 22	86 122
G	9 16	84 132
H	11 12	90 117
I	15 13,2	87 135

J	14	17	84	137
K	19	24	79	129
L	10	21	76	143

9.1.5 Geräte

Zentrifuge für Falcon-Tubes	Multifuge 3 S-R Heraeus, Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland
Zentrifuge für Eppendorf-Tubes	Thermo Scientific Heraeus Fresco 17 Centrifuge, Thermo Electron, LED GmbH, Osterode, Deutschland
Vortex	Labinco L46, Breda, Niederlande
Mini-Eppendorf-Zentrifuge	Mini spin plus, von der Firma Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
PCR-Maschine	PCR System 9700, GeneAmp, Applied Biosystems (Kalifornien, USA)
Thermocycler / PCR-Block	Biometra TRIOThermoblock, Göttingen, Deutschland
Automatisches Sequenziergerät	ABI Prism 310 Genetic Analyzer, Applied Biosystems Deutschland GmbH, Darmstadt, Deutschland
Nanodrop 2000	NanoDrop products, Thermo Scientific, Wilmington, USA

10. Abkürzungsverzeichnis

AIDP	Akut inflammatorisch demyelinisierende Polyneuropathie
APC	Antigen-präsentierende Zelle
Apoptose	Zelltod
AK	Antikörper
Aza	Azathioprin
Ax	Axonal
B	B-Zelle
BNS	Blut-Nerven-Schranke
C	Konstantes Gen-Segment
CCD	englisch: charge-coupled device, ladungsgekoppeltes Bauteil
CCR/CXR	Englische Abkürzung für Chemokin-Rezeptor
CD	Unterscheidungsgruppen
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CDR3	3. hypervariable Region des TCR
CIDP	Chronisch inflammatorisch demyelinisierende Polyradikuloneuropathie
CMT1a	Hereditäre motorisch-sensorische Neuropathie Typ 1 / HMSN1 / Morbus Charcot-Marie-Tooth
Cyclo	Cyclophosphamid
D	Diversity / vielfätiges Gen-Segment
Demy	Demyelinisierend
DM	Diabetes mellitus
DEPC	Diethyldicarbonat, Diethylpyrocarbonat
DN	Doppelnegativ
DTT	Dithiothreitol
EAN	Experimentelle autoimmune Neuritis
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EFNS	Europäische Vereinigung für Neurologie
ER	Endoplasmatisches Retikulum
f	Weiblich
FCS/PBS	Fetales Kälberserum in phosphatgepufferter Kochsalzlösung

GBS	Guillan-Barré-Syndrom
GM-1-AK	Monosialogangliosid 1 Antikörper
H ₂ O	Wasser
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HLA	Humanes Leukozyten Antigen
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IVIg	Intravenöses Immunglobulin
J	Verknüpfendes Gen-Segment
KI	Konfidenzintervall
KP	Kontroll-Patienten
LOS	Lipooligosaccharid
LSS	Lewis-Sumner-Syndrom
m	Masculin / männlich
MADSAM	Multifokale erworbene demyelinisierende sensorische und motorische Neuropathie / Lewis-Sumner-Syndrom
MgCl ₂	Magnesium-Chlorid
MGUS	Monoklonale Gammopathie unklarer Signifikanz
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
MMF	Mycophenolat Mofetil
M-MLV	Moloney Murine Leukämie reverse Virus Transkriptase
MMN	Multifokale motorische Neuropathie
MMP	Matrix-Metalloproteasen
MO	Makrophagen
Mot	Motorisch
MP	Methylprednisolon
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
MRT	Magnetresonanztomographie
MS	Multiple Sklerose
niPNP	Nichtinflammatorische Polyneuropathie
N-	Bindung am Zucker (N-Glykosid)-Rest
NO	Stickstoffmonoxid

NOD-	Non-Obese Diabetic
NS	Nicht signifikant
NV	Nicht verfügbare Daten
PCR	Polymerasekettenreaktion
PE	Plasma exchange / Plasmaaustausch
PNS	Peripheres Nervensystem
P-	Bindung am Phosphorsäurerest
RA	Rheumatoide Arthritis
RNA	Ribonukleinsäure
Ritux	Rituximab
Rpm	Umdrehungen pro Minute
tRNA	Transfer-Ribonukleinsäure
TCR	T-Zell-Rezeptor
T	T-Zelle
T _H	T-Helfer-Zelle
TNF	Tumornekrosefaktor
TGF	Transforming Growth Factor / transformierender Wachstumsfaktor
SD	Standartabweichung
SENS	Sensibel
SLE	Systemischer Lupus erythematodes
V	Variable / variables Gen-Segment
ZNS	Zentrales Nervensystem
*	signifikant

11. Danksagung

In erster Linie möchte ich mich bei Professor Dr. med. Kieseier bedanken, dass diese Arbeit überhaupt erst möglich war.

Ein ganz besonders großer Dank gilt meiner Betreuerin Dr. Anne-Kathrin Mausberg, die mir mit sehr viel Geduld, fachlicher Kompetenz und Herzlichkeit immer bei Seite stand.

Im Rahmen der gesamten Arbeit möchte ich auch Dr. med. Gerd Meyer zu Hörste, Dr. med. Mark Stettner, Dr. med. Clemens Warnke, Christian Wolf, Thomas Dehmel, Kathleen Wolfram, Tatjana Males, Zippora Kohne und all denen danken, die mir auch während der Zeit im Labor eine sehr große Hilfe waren und mich sehr unterstützt haben.

Selbstverständlich möchte ich mich von ganzem Herzen bei meiner Familie und meinen Freunden für die große Geduld, die Hilfestellung und die riesen Unterstützung bedanken.