Natürliche-Killerzellen in der IVIg-Behandlung von Patienten mit CIDP

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

> vorgelegt von Maximilian Kurt Heininger aus Düsseldorf

Düsseldorf, März 2019

aus der Klinik für Neurologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Berichterstatter:

- 1. Univ.-Prof. Dr. Bernd C. Kieseier
- 2. Univ.-Prof. i. R. Dr. Joachim Ernst

Tag der mündlichen Prüfung: 08. März 2019

Inhaltsverzeichnis

	Abbildungsverzeichnis	V
	Tabellenverzeichnis	VI
I	Einleitung	1
	1 Immunbiologische Grundlagen	1
	1.1 Das angeborene Immunsystem	1
	1.2 Das adaptive Immunsystem	3
	1.2.1 Selbsttoleranz des adaptiven Immunsystems	7
	2 Natürliche-Killerzellen	9
	2.1 Rezeptoren	9
	2.2 Effektor-Funktionen	11
	2.3 Subpopulationen und Entwicklung	13
	2.4 NK-Zellen in Autoimmunerkrankungen	14
	3 Chronisch inflammatorische demyelinisierende Polyneuropathie	- 16
	3.1 Immunpathogenese	17
	3.2 Phänotypische Varianten	20
	3.3 Diagnosekriterien	21
	3.4 Therapie	22
	4 Intravenöse Immunglobuline	- 23
	4.1 Wirkmechanismen	24
	4.2 IVIg-Behandlung von Patienten mit CIDP	27
	5 ICAM-1 defiziente NOD Mäuse als Tiermodell der CIDP	- 28
	6 Zielsetzung und Fragestellung	- 30
II	Ergebnisse	- 32
	1 Zusammenhang zwischen der Therapieeffizienz einer IVIg-Behandlung und der	
	NK-Zell Population im ICAM-1 ^{-/-} NOD Mausmodell der CIDP	- 32
	1.1 In ICAM-1 ^{-/-} NOD Mäusen korreliert die Expression von NK-Zell Genen vor Initijerung	-
	einer IVIg-Behandlung mit der Therapieeffizienz	32
	2 Einfluss von Immunglobulinen auf murine und humane NK-Zellen <i>in vitro</i>	- 34
	2.1 Eine <i>in vitro</i> Inkubation mit Immunglobulinen hat vergleichbare Effekte auf die	
	Rezeptorexpression humaner und muriner NK-Zellen	34

2.2	Immunglobuline senken das zytotoxische und regulatorische Potential humaner und	
	muriner NK-Zellen <i>in vitro</i>	- 36
3 E	Effekte einer IVIg-Behandlung auf die NK-Zellen von Patienten mit CIDP	38
3.1	IVIg reduziert den Anteil typischer NK-Zell Transkripte im peripheren Blut	- 39
3.2	IVIg führt zu einer Reduktion der CD56 ^{dim} NK-Zell Subpopulation in den PBMC von	
	Patienten mit CIDP	- 40
3.3	Eine IVIg-Behandlung hat nur geringen Einfluss auf die ex vivo NK-Zell Aktivität	- 43
3.4	Zum Ende eines Behandlungsintervalls steigt die mRNA Expression der NK-Zell	
	Transkripte wieder auf ihr Ausgangsniveau an	- 44
3.5	Reduktion und Wiederanstieg der mRNA Level von NK-Zell Transkripten wiederholt sich	
	in jedem Behandlungsintervall	- 45
4 2	Zusammenhang zwischen dem NK-Zell Status vor Behandlungsbeginn und der	
E	Effizienz einer IVIg-Therapie in Patienten mit CIDP	46
4.1	Therapierefraktäre und -respondierende Patienten mit CIDP zeigen vor Beginn der IVIg-	
	Behandlung keine Unterschiede in der mRNA Expression von NK-Zell Markern	- 47
4.2	Responder und Non-Responder zeigen vor der ersten IVIg-Gabe keine Unterschiede in	
	der Größe und Expression der NK-Zell Population	- 48
4.3	Responder und Non-Responder zeigen vor Beginn der IVIg-Therapie nur tendenzielle	
	Unterschiede in der NK-Zell Aktivität	- 49
4.4	NK-Zellen von Respondern und Non-Respondern zeigen keine Unterschiede im	
	Ansprechen auf eine <i>in vitro</i> Inkubation mit Immunglobulinen	- 50
5 [Die IVIg-induzierten Änderungen der NK-Zell Population 24 h nach	
E	Behandlungsbeginn in Relation zur Therapieeffizienz in Patienten mit CIDP	52
5.1	Non-Responder zeigen nach einer IVIg-Gabe keine Reduktion typischer NK-Zell	
	Transkripte im peripheren Blut	- 52
5.2	Responder zeigen nach einer IVIg-Gabe eine verstärkte Reduktion der CD56 ^{dim} NK-Zell	
	Subpopulation im peripheren Blut	- 53
5.3	Non-Responder zeigen eine tendenziell reduzierte NK-Zell Aktivität nach einer IVIg-Gabe	- 55
5.4	Mögliche Nutzung des IVIg-Effekts auf NK-Zellen zur Früherkennung der	
	Therapieeffizienz in Patienten mit CIDP	- 57
6 2	Zusammenhang zwischen der Therapieeffizienz einer IVIg-Behandlung und den	
r	regulatorischen T-Zellen in Patienten mit CIDP	59
6.1	Therapieresponder zeigen bereits vor Behandlungsinitiierung eine erhöhte FOXP3-	
	Expression im peripheren Blut	- 59
6.2	IVIg führt in Therapierespondern zu einer Expansion regulatorischer T-Zellen	- 60

	7 Einfluss der NK-Zell Population auf den Schweregrad der motori	schen
	Beeinträchtigung in Patienten mit CIDP	61
	7.1 Die Expression typischer NK-Zell Transkripte korreliert mit dem Schweregra	d der
	Erkrankung in Patienten mit CIDP	61
	III Diskussion	63
	1 Die Rolle von NK-Zellen in der Therapieeffizienz einer IVIg-Behandlun	g des
	ICAM-1 ^{-/-} NOD Mausstamms	63
	2 Einfluss von IVIg auf murine und humane NK-Zellen in vitro	64
	3 Die Rolle von NK-Zellen in der IVIg-Behandlung von Patienten mit CIDP	66
	3.1 Einfluss von IVIg auf die NK-Zellen von Patienten mit CIDP in vivo	66
	3.1.1 Einfluss von IVIg auf die NK-Zell Aktivität behandelter Patienten	71
	3.2 Zusammenhang zwischen der NK-Zell Population und der Therapieeffizienz eine	r IVlg-
	Behandlung	72
	3.3 Mögliche Rolle von Tregs in der IVIg-induzierten Änderung der NK-Zellen ur	d der
	Therapieeffizienz einer IVIg-Behandlung von Patienten mit CIDP	75
	4 NK-Zellen als Biomarker zur Identifizierung therapierefraktärer Patienten	77
	5 NK-Zellen in der Pathophysiologie der CIDP und des ICAM-1 ^{-/-} NOD Tiermod	ells 80
	6 Fazit und Ausblick	84
IV		
	IV Zusammentassung	86
	Summary	86 88
V	IV Zusammentassung Summary Summary V Material und Methoden	86 88 90
v	IV Zusammentassung Summary	86 88 90
V	IV Zusammentassung Summary	86 88 90 90
V	IV Zusammentassung Summary	86 88 90 90 90
V	IV Zusammentassung Summary	86 88 90 90 90 90
V	IV Zusammentassung Summary	86 88 90 90 90 90 90
V	IV Zusammentassung Summary	86 88 90 90 90 90 90 92
v	IV Zusammentassung Summary	86 88 90 90 90 90 90 92 93 94
V	Summenrassung Summary V Material und Methoden 1 Materialien 1.1 Materialien 1.1 Bezugsquellennachweis 1.1.1 Chemikalien 1.1.2 Geräte und Materialien 1.2 Medien und Puffer 1.3 FACS Antikörper 1.4 Primer 1.5 Kits	86 88 90 90 90 90 90 91 92 93 94 96
v	V Zusammenrassung Summary	86 88 90
V	V Zusammenrassung Summary	86 80 90 90 90 90 90 90 90 90 90 90 90 90 90 90 90 90 90 90 91 92 93 96 96 96 96
v	V Material und Methoden 1 Materialien 1.1 Bezugsquellennachweis 1.1.1 Chemikalien 1.1.2 Geräte und Materialien 1.2 Medien und Puffer 1.3 FACS Antikörper 1.4 Primer 1.5 Kits 1.6 Zelllinien 1.7 Software 2 Methoden	86 90 90 90 90 90 90 90 90 90 90 90 90 90 90 90 90 90 90 90 91 92 93 96 96 96 96 96 96

2.2 Entnahme humaner Blutproben	97
2.3 Zellbiologische Methoden	97
2.3.1 Isolierung mononukleärer Zellen des peripheren Blutes (PBMC)	97
2.3.2 Auszählung vitaler Zellen	98
2.3.3 Einfrieren von Zellen	98
2.3.4 Auftauen von Zellen	98
2.3.5 Zellkultur	99
2.4 Tierversuche	99
2.4.1 Mäuse	99
2.4.2 ICAM-1 ^{-/-} NOD Neuropathie versuchsspezifischer Scoresheet	99
2.4.3 Blutentnahme bei Mäusen	99
2.4.4 Isolierung von PBMC	100
2.5 Immunbiologische Methoden	100
2.5.1 Durchflusszytometrie	100
2.5.1.1 Färbung membranständiger Oberflächenproteine	100
2.5.1.2 Färbung intrazellulärer Zytokine	101
2.5.1.3 Intranukleäre FOXP3 Färbung	101
2.5.2 <i>in vitro</i> Inkubation mit Immunglobulinen	101
2.5.3 in vitro Test der zytotoxischen und regulatorischen NK-Zell Aktivität	102
2.5.4 Auswertung Durchflusszytometrie	103
2.6 Molekularbiologische Methoden	103
2.6.1 RNA Expressionsanalyse in humanem und murinem Vollblut	103
2.6.1.1 RNA-Isolation aus Vollblut	104
2.6.1.2 Photometrische Konzentrations- und Reinheitsbestimmung	105
2.6.1.3 Synthese der cDNA/Reverse Transkription	106
2.6.1.4 Quantitative Echtzeit Polymerasekettenreaktion (qPCR)	107
2.7 Statistik	108
VI Referenzen	109
VII Anhang	117
1 Abkürzungsverzeichnis	117
2 Danksagung	119
3 Eidesstattliche Erklärung	120

Abbildungsverzeichnis

Abbildung I-1: Schematische Darstellung B-Zell Rezeptor und Immunglobulin
Abbildung I-2: Modell zur Immunpathogenese der CIDP
Abbildung II-1: Korrelation zwischen der Therapieeffizienz einer IVIg-Behandlung und
der Expression von NK-Zell Rezeptoren vor Beginn der Therapie in ICAM-1 ^{-/-} NOD
Mäusen
Abbildung II-2: Einfluss einer in vitro Inkubation mit Immunglobulinen auf die Expression
membranständiger NK-Zell Rezeptoren in murinen und humanen PBMC
Abbildung II-3: Einfluss einer in vitro Inkubation mit Immunglobulinen auf die
Zytokinproduktion und zytotoxische NK-Zell Aktivität in murinen und humanen
PBMC
Abbildung II-4: Änderung der relativen mRNA Expression von NK-Zell Genen im
peripheren Blut von Patienten mit CIDP, 24 h nach der ersten IVIg-Gabe
Abbildung II-5: Änderungen der Lymphozytenpopulation in PBMC von Patienten mit
CIDP, 24 h nach der ersten IVIg-Gabe41
Abbildung II-6: Änderungen der NK-Zell Population in PBMC von Patienten mit CIDP, 24
h nach der ersten IVIg-Gabe42
Abbildung II-7: Auswirkungen einer IVIg-Gabe auf die NK-Zell Aktivität in PBMC von
Patienten mit CIDP43
Abbildung II-8: Änderung der relativen mRNA Expression von NK-Zell Genen am Ende
eines IVIg-Behandlungsintervalls in PBMC von Patienten mit CIDP44
Abbildung II-9: Änderung der relativen mRNA Expression von NK-Zell Genen in PBMC
eines Patienten mit CIDP über vier IVIg-Behandlungsintervalle
Abbildung II-10: Vergleich der relativen mRNA Expression von NK-Zell Genen zwischen
respondierenden und therapierefraktären Patienten mit CIDP vor Beginn einer IVIg-
Behandlung47
Abbildung II-11: Vergleich der Expression und Größe der NK-Zell Population zwischen
respondierenden und therapierefraktären Patienten mit CIDP vor Beginn einer IVIg-
Behandlung
Abbildung II-12: Vergleich der NK-Zell Aktivität zwischen respondierenden und
therapierefraktären Patienten mit CIDP vor Beginn einer IVIg-Behandlung
Abbildung II-13: Vergleich des in vitro IVIg-Effekts auf die NK-Zell Expression zwischen
respondierenden und therapierefraktären Patienten mit CIDP vor Beginn einer IVIg-
Behandlung

Abbildung II-14: Vergleich des in vitro IVIg-Effekts auf die NK-Zell Aktivität zwischen	
respondierenden und therapierefraktären Patienten mit CIDP vor Beginn einer IVIg-	
Behandlung	51
Abbildung II-15: Änderung der relativen mRNA Expression typischer NK-Zell Gene in	
Blutproben von respondierenden und therapierefraktären Patienten mit CIDP 24 h	
nach der ersten IVIg-Gabe	53
Abbildung II-16: Unterschiede in den Auswirkungen einer IVIg-Gabe auf die NK-Zell	
Population in PBMC zwischen respondierenden und therapierefraktären Patienten	
mit CIDP	54
Abbildung II-17: Auswirkungen einer IVIg-Gabe auf die NK-Zell Aktivität in PBMC von	
respondierenden und therapierefraktären Patienten mit CIDP	56
Abbildung II-18: Individuelle Änderung der NK-Zell Population 24 h nach der ersten IVIg-	
Gabe in Abhängigkeit des Therapieerfolgs von Patienten mit CIDP	58
Abbildung II-19: Vergleich der relativen FOXP3 mRNA Expression zwischen	
respondierenden und therapierefraktären Patienten mit CIDP vor Beginn einer IVIg-	
Behandlung	60
Abbildung II-20: Einfluss von IVIg auf die Größe der Treg Population in PBMC von	
respondierenden und therapierefraktären Patienten mit CIDP	61
Abbildung II-21: Korrelation des INCAT-Scores und der NK-Zell Population in	
behandlungsnaïven Patienten mit CIDP	62
Abbildung III-1: Verknüpfung IVIg-induzierter NK-Zell Änderung zur Früherkennung des	
Therapieerfolgs von Patienten mit CIDP	78

Tabellenverzeichnis

Tabelle II-1: IVIg-induzierte Änderung der relativen mRNA Expression typischer NK-Zell	
Gene	.45
Tabelle II-2: Vergleich der IVIg-induzierten Änderungen der NK-Zell Population zwischen	
Respondern und Non-Respondern	.55
Tabelle II-3: IVIg-induzierte Änderung der NK-Zellen als Merkmal zur Identifizierung von	
Non-Respondern	.59

I Einleitung

1 Immunbiologische Grundlagen

Das Immunsystem der Vertebraten verfügt über verschiedene Strategien, das Eindringen und die Vermehrung infektiöser Organismen zu verhindern. Pathogene, welche die schützende Barriere der Oberflächenepithelien überwinden, und ins Innere des Körpers gelangen, werden dort von der humoralen und zellulären Immunantwort bekämpft. Die an der Abwehr beteiligten Zellen des Immunsystems lassen sich anhand der Rezeptoren - mit welchen sie vermeintliche Erreger oder infizierte und entartete Zellen erkennen - in zwei Gruppen unterteilen: Die Zellen des sogenannten "angeborenen" Immunsystems exprimieren eine limitierte Anzahl vererbbarer, Keimbahn-kodierter Rezeptoren über welche sie z.B. Erreger erkennen, oder körpereigene gesunde von infizierten Zellen unterscheiden können. Dadurch sind sie in der Lage, potentielle Gefahren ohne vorherige Sensibilisierung zu identifizieren und rasch zu bekämpfen, indem sie z.B. Pathogene phagozytieren oder infizierte Zellen zur Apoptose führen. Im Gegensatz dazu exprimieren die Zellen des "erworbenen" adaptiven Immunsystems Rezeptoren mit hochvariablen Erkennungsregionen auf ihrer Oberfläche, welche während der Reifung der Zellen durch zufällige Kombination bestimmter Gensegmente gebildet werden. Durch den Prozess der somatischen Rekombination entstehen dabei Immunzellen, von denen jede eine individuelle Isoform ihres Rezeptors exprimiert und somit jeweils ein spezifisches Antigen erkennt. Trifft die Zelle im Kontext einer Infektion auf ihr Antigen, führt dies zur Aktivierung und weiter zur klonalen Expansion, wodurch eine Vielzahl von Zellen gleicher Spezifität gebildet wird. Diese sind nun in der Lage, sehr gezielt die Antigen-exprimierenden Pathogene zu bekämpfen. Nach erfolgreicher Beseitigung der Erreger bleiben langlebige Antigen-spezifische Gedächtniszellen erhalten, welche bei einer erneuten Infektion des gleichen Erregers eine schnelle Aktivierung des adaptiven Immunsystems gewährleisten.

1.1 Das angeborene Immunsystem

Zu den Zellen des angeborenen Immunsystems gehören z.B. neutrophile Granulozyten, Monozyten, Makrophagen, Dendritische Zellen (DC) und Natürliche-Killerzellen (NK-Zellen). Ihre Stärke besteht darin, Pathogene unmittelbar nach dem Eindringen in den Körper bekämpfen zu können, da sie sich innerhalb weniger Minuten nach dem Initialkontakt aktivieren lassen. Mikroorganismen welche das Oberflächenepithel überwunden haben und in das Gewebe eingedrungen sind, werden dort meist von geweberesidenten Makrophagen erkannt und phagozytiert. Makrophagen reifen aus zirkulierenden Monozyten und exprimieren sogenannte "Mustererkennungsrezeptoren" (PRRs von engl. "Pattern Recognition Receptors") über welche sie Pathogene anhand charakteristischer Pathogenassoziierter molekularer Muster (PAMPs von engl. "Pathogen-Associated Molecular Patterns") erkennen. Hat eine Makrophage ein Pathogen durch Phagozytose aufgenommen, fusioniert das dabei gebildete Phagosom im Inneren der Zelle mit Lysosomen wodurch der

assoziierter molekularer Muster (PAMPs von engl. "Pathogen-Associated Molecular Patterns") erkennen. Hat eine Makrophage ein Pathogen durch Phagozytose aufgenommen, fusioniert das dabei gebildete Phagosom im Inneren der Zelle mit Lysosomen wodurch der Erreger abgetötet und zerstört wird. Zusätzlich sind Makrophagen in der Lage durch die Produktion und Freisetzung chemischer Botenstoffe, den sogenannten Zytokinen, eine lokale Entzündungsreaktion (Inflammation) auszulösen. Dabei weiten sich lokale Blutgefäße, erhöhen ihre Durchlässigkeit und steigern die Expression von Adhäsionsmolekülen, wodurch weitere Immunzellen sowie Serumproteine das infizierte Gewebe infiltrieren. Die ersten rekrutierten Immunzellen bilden die kurzlebigen neutrophilen Granulozyten welche in großer Zahl in den Bereich der Entzündung migrieren und dort wie Gewebemakrophagen Pathogene über PRRs erkennen und phagozytieren. Anschließend wandern Monozyten in das Gewebe ein, wo sie zu weiteren Makrophagen differenzieren, welche neben der Abwehr infektiöser Organismen die Aufgabe übernehmen, Zelltrümmer apoptotischer Gewebezellen und Granulozyten zu beseitigen. NK-Zellen exprimieren ebenfalls PRRs, und sind in der Lage PAMPs auf der Oberfläche von Mikroorganismen zu erkennen. Ihre besondere Aufgabe bei der Abwehr von Pathogenen liegt jedoch in der Bekämpfung intrazellulärer Virusinfektionen. Durch die Expression einer Vielzahl aktivierender und inhibierender Rezeptoren - welche Strukturen auf körpereigenen Zellen erkennen - identifizieren NK-Zellen infizierte Zellen und zerstören diese. Im Gegensatz zu Phagozyten nehmen sie ihre Zielzellen jedoch nicht auf und lysieren sie im Zellinnern, sondern induzieren ihre Apoptose indem sie sich an ihre Oberfläche binden und gerichtet zytotoxische Granula auf ihrer Zellmembran freisetzen. Durch die Produktion regulatorischer und inflammatorischer Zytokine sind NK-Zellen darüber hinaus in der Lage, modulierend Einfluss auf die Immunantwort zu nehmen.

Zum angeborenen Immunsystem gehören neben zellulären auch humorale Bestandteile wie die löslichen Serumproteine des Komplementsystems. Dieses besteht aus etwa 30 verschiedenen Proteinen, welche hauptsächlich in der Leber synthetisiert werden, und anschließend frei im Blut zirkulieren. Einige Bestandteile binden dabei, ähnlich den PRRs, an Strukturen auf der Oberfläche von Mikroorgansimen, und induzieren dadurch eine Aktivierungskaskade, welche die Bindung weiterer Komplementfaktoren auf der Membran zur Folge hat. Diese formieren anschließend einen porenförmigen, wasserdurchlässigen Komplex in der Membran, wodurch die osmotische Lyse des Pathogens ausgelöst wird. Komplementfaktoren liegen zu geringen Anteilen auch ohne vorherige Bindung eines Pathogens in aktiviertem Zustand im Blut und entzündetem Gewebe vor. Binden sie an die Oberfläche körpereigener Zellen, werden sie dort durch membrangebundene inhibitorische Faktoren an der Fortsetzung der Aktivierungskaskade gehindert. Mikroorgansimen, welche nicht über solche inhibitorischen Faktoren verfügen, werden lysiert. Ein weiterer Mechanismus der angeborenen Immunität ist die Komplement-vermittelte Opsonisierung fremdartiger Strukturen. Neutrophile Granulozyten, Makrophagen und NK-Zellen exprimieren Rezeptoren, über welche sie gebundene Komplementfaktoren auf der Oberfläche von Mikroorganismen erkennen, was zur Phogozytose oder zellvermittelten Lyse des Pathogens führt (Todd 1996; Degn and Thiel 2013).

Durch die angeborene Immunität wird ein Großteil invasiver Mikroorganismen bereits kurz nach seinem Eindringen eliminiert. Bei einigen Invertebraten hängt die Infektionsabwehr allein von vergleichbaren Mechanismen ab. In Vertebraten werden Pathogene, welche diese Abwehrmechanismen überwinden, zusätzlich durch eine Aktivierung des adaptiven Immunsystems bekämpft. Auch dabei spielen die Zellen des angeborenen Immunsystems, und insbesondere DC, eine wichtige Rolle. Wie Makrophagen nehmen DC Pathogene, aber auch körpereigene Strukturen, durch Phagozytose auf, und verdauen sie. Anschließend migrieren DC aus dem infizierten Gewebe in drainierende Lymphknoten, wo sie Bausteine der lysierten Strukturen in Form kurzer Peptide auf ihrer Oberfläche den Zellen des adaptiven Immunsystems präsentieren.

1.2 Das adaptive Immunsystem

T- und B-Zellen bilden die zellulären Bestandteile des adaptiven Immunsystems, welche durch die Expression von Rezeptoren mit variabler Erkennungsregion in der Lage sind, Pathogene hochspezifisch zu bekämpfen. Der von T-Zellen exprimierte T-Zell Rezeptor (TCR) erkennt kurze Peptide, die ihm von anderen Zellen des Körpers mithilfe von Molekülen des

Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC) auf der Zelloberfläche präsentiert werden. Auf MHC-Molekülen gebundene Peptide sind kurze Fragmente von Proteinen, welche sowohl aus physiologischen, als auch pathophysiologischen, intrazellulären Prozessen stammen. MHC-Moleküle werden nach der Herkunft, der von ihren präsentierten Peptide in zwei Klassen unterteilt: MHC-Klasse I Moleküle werden von allen kernhaltigen Zellen des Körpers exprimiert, und binden intrazelluläre Peptide, welche aus der Proteinbiosynthese im Zytosol der Zelle stammen. In virusinfizierten Zellen werden neben Fragmenten zelleigener Proteine von diesen daher auch Fragmente viraler Proteine auf der Zellmembran präsentiert. MHC-Klasse II Moleküle werden nur von sogenannten Antigen-präsentierenden Zellen (APC) des Immunsystems exprimiert und binden Fragmente extrazellulärer Proteine aus phagozytierten Vesikeln, die aus der Umgebung aufgenommene Peptide enthalten. Zu den wichtigsten APC zählen Makrophagen und DC, welche auf MHC-Klasse II Molekülen Peptide präsentierten, die z.B. von phagozytierten Pathogenen stammen. MHC Klasse I und II Moleküle und die darauf präsentierten Antigene werden von phänotypisch und funktionell lassen unterschiedlichen T-Zell Populationen erkannt. Unterscheiden sich die Subpopulationen anhand der Expression ihres Korezeptors, welcher jeweils eines der beiden MHC Moleküle bindet. T-Zellen, welche den Korezeptor CD8 (für engl. "Cluster of Differentiation") exprimieren, erkennen das Antigen ihres TCR nur, wenn es auf MHC Klasse I Molekülen gebunden ist; CD4 positive T-Zellen erkennen ihr Antigen auf MHC-II Molekülen. T-Zellen (und auch B-Zellen), welche noch keinen Antigenkontakt hatten, zirkulieren in einem inaktiven, naïven Zustand zwischen Blut und sekundären lymphatischen Organen. Um aktiviert zu werden, benötigen sie eine Bindung ihres TCR an seinen spezifischen MHC:Antigen-Komplex auf der Oberfläche einer APC. Wie weiter oben beschrieben, migrieren DC, welche im Kontext einer Infektion ein Pathogen aufgenommen haben, in einen lokalen Lymphknoten, wobei sie unterwegs einen Prozess der Reifung durchlaufen. Reife DC tragen eine erhöhte Menge antigenbeladener MHC-Moleküle auf ihrer Zellmembran, und exprimieren sogenannte kostimulatorische Signale, welche neben der spezifischen Antigenerkennung für die Aktivierung von T-Zellen erforderlich sind. Für die Aktivierung von CD8⁺ T-Zellen ist zusätzlich der Vorgang der Kreuzpräsentation notwendig, bei welchem extrazelluläre Antigene, welche typischerweise auf MHC-II gebunden werden, von einigen DC dennoch auf MHC-I präsentiert werden. Erkennt eine naïve T-Zelle ihren spezifischen MHC:Antigen-Komplex auf der Oberfläche einer reifen DC und erhält

gleichzeitig ein zweites, kostimulatorisches Signal, geht sie in einen aktivierten Zustand über. In naïven T-Zellen wird durch eine Aktivierung zunächst eine klonale Expansion induziert. Dabei durchläuft die Zelle mehrere Mitosezyklen, wodurch eine große Menge aktivierter T-Zellen gleicher Spezifität entstehen. Aktivierte CD8⁺ T-Zellen migrieren, durch Chemokine geleitet, an den Ort der Infektion, wo sie ihren MHC-I:Antigen-Komplex auf körpereigenen Zellen aufspüren. Erkennt eine CD8⁺ T-Zelle ihr spezifisches Antigen, wird die gebundene Zelle durch Freisetzung zytotoxischer Granula in die Apoptose geführt. Durch diese Funktion spielen zytotoxische CD8 * T-Zellen eine wichtige Rolle bei der Bekämpfung intrazellulärer Virusinfektionen. Nach der klonalen Expansion exprimieren aktivierte CD4⁺ T-Zellen ihrerseits kostimulatorische Signale, und sind in der Lage, abhängig von vorherrschenden Zytokinen und weiteren Faktoren, unterschiedliche Effektorfunktionen auszuüben. Antigenspezifisch aktivieren sie DC, welche daraufhin wiederum in der Lage sind, zytotoxische CD8⁺ T-Zellen effektiver und langfristiger zu aktivieren. Durch die Produktion von Zytokinen im infizierten Gewebe lösen sie Endzündungsreaktionen aus, wodurch sie die Rekrutierung, Differenzierung und Aktivierung von Makrophagen fördern, und ihre Antigenpräsentierende Funktion verbessern. Des Weiteren sind sie in der Lage, Antigen-spezifische B-Zellen zu aktivieren, wodurch eine humorale Immunantwort des adaptiven Immunsystems induziert wird.

Wie T-Zellen, exprimieren B-Zellen Rezeptoren mit hochvariablen Erkennungsregionen, welche durch die zufällige somatische Rekombination spezieller Gensegmente zustande kommen. Jede B-Zell exprimiert Rezeptoren, die spezifisch ein Antigen erkennen. Anders als der TCR, welcher sein Antigen nur im Komplex mit dem passenden MHC-Molekül auf der Oberfläche körpereigener Zellen erkennt, bindet der B-Zell Rezeptor (BCR) sein spezifisches Epitop direkt auf einem freien Antigen in seiner Umgebung. Bindet eine naïve B-Zelle ihr spezifisches Antigen, während sie zwischen Blut und Lymphe patrouilliert, nimmt sie dieses zusammen mit dem Rezeptor durch rezeptorvermittelte Endozytose auf. In intrazellulären Vesikeln wird das Antigen durch Proteasen in kurze Peptide gespalten, welche anschließend auf MHC-II Molekülen auf der Oberfläche der B-Zelle präsentiert werden. Wird ein so präsentiertes Peptid von einer aktivierten CD4⁺ T-Zelle erkannt, wird wiederum die B-Zelle von dieser aktiviert. Dafür ist neben der Antigen-spezifischen TCR-Bindung ein zweites kostimulatorisches Signal nötig, sodass B-Zellen nur von aktivierten CD4⁺ T-Zellen aktiviert werden können. Wie T-Zellen durchlaufen aktivierte B-Zellen zunächst eine klonale

Expansion. Aus den proliferierenden B-Zellen differenzieren sich Plasmazellen, die in großer Menge eine lösliche Form des BCR sezernieren, welcher das gleiche Antigen erkennt, das zuvor von der naïven B-Zelle aufgenommen wurde. Für die Umstellung von membranständigen auf lösliche Rezeptoren werden von der zugrundeliegenden prä-RNA, durch differenzielles Spleißen, die Sequenzen für transmembrane und zytoplasmatische Domänen entfernt. Die dadurch entstehenden Immunglobuline oder Antikörper besitzen, wie der BCR, zwei variable, antigenspezifische (Fab für engl. "fragment of antibody binding") Regionen, über welche Epitope des Antigens gebunden werden, sowie eine konstante (Fc für engl. "fragment crystallizable") Region (Abb. I-1).



Abbildung I-1: Schematische Darstellung B-Zell Rezeptor und Immunglobulin

B-Zellen exprimieren auf ihrer Zellmembran den B-Zell Rezeptor (BCR) bestehend aus zwei schweren (hellblau) und zwei leichten (dunkelblau) Aminosäureketten. Jeder BCR besitzt zwei hoch variable antigenbindende Regionen über welche die B-Zelle ihr spezifisches Antigen bindet. Kommt es zur Aktivierung der B-Zelle, differenziert sie zur Plasmazelle, welche große Mengen löslicher Immunglobuline der gleichen Spezifität sezerniert. Für die Expression von Immunglobulinen werden von dem BCR auf Ebene der prä-RNA durch differenzielles Spleißen die Sequenzen für transmembrane und zytoplasmatische Domänen (schraffierter Bereich) entfernt. Die so gebildeten Immunglobuline lassen sich durch Proteasen in jeweils zwei F_{ab} ("fragment of antibody binding") Fragmente und ein F_c ("fragment crystallizable") Fragment spalten.

Immunglobuline bilden den humoralen Bestandteil des adaptiven Immunsystems und besitzen zahlreiche Effektorfunktionen:

 Neutralisierende Antikörper können allein durch die Bindung ihres Epitops auf der Oberfläche eines Antigens dessen pathologische Eigenschaften blockieren. Bindet ein Antikörper z.B. einen Virus, kann dieser dadurch am Eintritt in eine Zelle gehindert werden.

- Komplementaktivierung: Durch die Bindung eines Antikörpers werden Bestandteile des Komplementsystems auf die Oberfläche des Antigens rekrutiert, wodurch dieses durch osmotische Lyse zerstört wird.
- Opsonisierung: Die Bindung eines Antikörpers kann Antigene oder Zellen für die Phagozytose oder Lyse durch Immunzellen markieren (siehe oben). Zahlreiche Immunzellen des angeborenen und adaptiven Immunsystems exprimieren Rezeptoren, welche die konstante Region von Immunglobulinen binden (FcR) und sind dadurch in der Lage, antikörpergebundene Strukturen zu erkennen und zu eliminieren.

Immunglobuline lassen sich anhand von strukturellen Differenzen der Fc-Region in die Klassen IgA (für Immunglobulin A), IgD, IgE, IgG und IgM unterteilen, welche in verschiedenen Phasen der Immunantwort exprimiert werden, und sich in der Effektivität unterscheiden, mit welcher sie die beschriebenen Mechanismen in Gang setzen können. Mit etwa 75 % stellen IgG den weitaus größten Anteil der Immunglobuline im peripheren Blut, und sind zudem in der Lage in beinahe alle Gewebe zu diffundieren. IgG werden von FcyR auf der Oberfläche von Immunzellen erkannt, und tragen durch die Opsonisierung von Pathogenen und Toxinen effektiv zu ihrer Phagozytose oder Lyse bei. Zudem führt ihre Bindung zur Rekrutierung der Komplementfaktoren.

1.2.1 Selbsttoleranz des adaptiven Immunsystems

Eine wesentliche Voraussetzung für die Funktionalität des Immunsystems ist die erfolgreiche Unterscheidung zwischen körpereigenen (selbst-) und pathogenen Strukturen. Wie zuvor beschrieben, exprimieren T- und B-Zellen Rezeptoren mit hochvariablen Erkennungsregionen, die während der Reifung der Zelle durch zufällige Rekombination entstehen, wobei jede Zelle am Ende einen individuellen Rezeptor für ein spezifisches Antigen exprimiert. Durch die zufällige Entstehung der Erkennungsregion ist nicht gewährleistet, dass bei diesem Prozess keine Rezeptoren gegen autogene Strukturen gebildet werden. Um die Selbsttoleranz des adaptiven Immunsystems sicher zu stellen, durchlaufen T- und B-Zellen daher strenge Selektionsmechanismen. Die Funktionalität und Spezifität des TCR wird während der T-Zell Reifung im Thymus überwacht. Zunächst werden bei einer Positivselektion T-Zellen selektiert, die in der Lage sind über ihren TCR MHC-I oder MHC-II Moleküle auf thymischen Epithelialzellen zu binden. Binden sie dort nicht, sterben sie durch

Apoptose. T-Zellen, die diesen Schritt überstehen, werden während einer Negativselektion auf eine potentielle Autoreaktivität ihres TCR getestet. Dazu werden ihnen von thymusresidenten DC Selbstpeptide präsentiert. Erkennt eine T-Zelle über ihren TCR dabei ihr spezifisches Autoantigen, wird sie ausselektiert und stirbt durch Apoptose. Diese Mechanismen haben zur Folge, dass von den gebildeten unreifen T-Zellen nur ca. 2-3 % den Thymus als naïve T-Zellen verlassen. Eine Negativselektion putativ autoreaktiver B-Zellen findet im Knochenmark statt. Bindet eine unreife B-Zelle dort mit hoher Affinität an Selbstantigene im Gewebe wird sie deletiert. Entgehen autoreaktive T- oder B-Zellen diesen Mechanismen der zentralen Toleranz, existieren weitere periphere Toleranzmechanismen, welche sie an der Zerstörung endogener Strukturen hindern. Dabei spielen vor allem die zur T- und B-Zell Aktivierung notwendigen kostimulatorischen Signale eine wichtige Rolle. Bindet eine naïve autoreaktive T-Zelle ihren spezifischen MHC:Antigen-Komplex auf einer unreifen, nicht aktivierten DC, so fehlt das notwendige kostimulatorische Signal und die T-Zelle geht in einen funktionell inaktivierten "anergen" Zustand über, woraus sie auch in Zukunft nicht wieder aktiviert werden kann. Die Expression kostimulatorischer Signale wird auf DC während einer akuten Entzündungsreaktion durch inflammatorische Zytokine induziert. Werden naïve autoreaktive B-Zellen, welche ihr Antigen aufgenommen haben und Peptide davon auf MHC-II Molekülen präsentieren, nicht durch Antigen-spezifische TCR-Bindung und zusätzliche kostimulatorische Signale einer aktivierten CD4⁺ T-Zelle aktiviert, werden auch sie anerg.

Eine weitere wichtige Funktion bei der Vermittlung der Selbsttoleranz übernehmen sogenannte regulatorische T-Zellen (Treg). Diese entstehen während der T-Zell Reifung im Thymus aus unreifen CD4⁺ T-Zellen, welche mit besonders hoher Affinität an die dort präsentierten Selbstantigene binden. Erkennt eine Treg anschließend ihren spezifischen MHC-II:Selbstantigen-Komplex auf der Oberfläche einer APC, ist sie in der Lage, die potenzielle Aktivierung autoreaktiver T-Zellen, durch diese APC, durch die Freisetzung inhibitorischer Zytokine zu unterdrücken. Andererseits können CD4⁺ T-Zellen auch in der Peripherie in Anwesenheit anti-inflammatorischer Zytokine zu Treg differenzieren.

Wenn nicht anders angegeben, diente die achte Auflage von "Janeway's Immunobiology" von Kenneth Murphy et al. als Quelle für das Kapitel der Immunbiologischen Grundlagen (Murphy, Travers et al. 2011).

2 Natürliche-Killerzellen

NK-Zellen sind Teil des angeborenen Immunsystems und übernehmen wichtige Funktionen bei der Bekämpfung virusinfizierter und pathologisch veränderter Zellen. Neben ihrer Fähigkeit, Zielzellen durch die gerichtete Freisetzung zytotoxischer Vesikel zu eliminieren, sind sie zudem in der Lage, durch die Sekretion sowohl inflammatorischer als auch antiinflammatorischer Zytokine Immunantworten zu regulieren. Darüber hinaus wirken sie über Zell-Zell-Kontakte direkt auf regulatorische Zellen des Immunsystems ein, und üben dadurch zusätzlichen Einfluss auf die generierte Immunantwort aus. NK-Zellen erkennen ihre Zielzellen über eine Vielzahl Keimbahn-kodierter Rezeptoren, wodurch sie im Gegensatz zu und T- Lymphozyten keine vorherige Sensibilisierung zur Ausübung ihrer B-Effektorfunktionen benötigen. Bei gesunden Menschen machen NK-Zellen etwa 10 % der Lymphozytenpopulation im peripheren Blut aus. Sie patrouillieren zur Immunüberwachung aber auch in verschiedene Gewebe und Organe um dort frühzeitig die Vermehrung schadhafter Zellen und Vieren zu stoppen. Im Zuge von Infektionen migrieren sie rasch zum Ort der Entzündung, wo sie Pathogene und infizierte Zellen abtöten, und zur Aktivierung und Regulation des adaptiven Immunsystems beitragen. Nach erfolgreicher Pathogen Abwehr sind NK-Zellen zudem an der Limitierung der Immunaktivität und der Terminierung der Endzündungsreaktion beteiligt (Murphy, Travers et al. 2011).

2.1 Rezeptoren

NK-Zellen exprimieren auf ihrer Oberfläche eine Vielzahl verschiedener Rezeptoren, mit welchen sie körpereigene, gesunde von infizierten oder schadhaften Zellen und pathogene Strukturen erkennen und unterscheiden können. Unter diesen befinden sich sowohl inhibierende Rezeptoren, welche nach Bindung ihres Liganden die NK-Zell Aktivität hemmen, als auch aktivierende Rezeptoren, welche stimulierend auf die NK-Zell Aktivität wirken. Zu den wichtigsten NK-Zell Rezeptoren gehören die Killerzell-Immunglobulinähnlichen Rezeptoren (KIR), über welche NK-Zellen die Expression von MHC-I Molekülen auf der Oberfläche körpereigener Zellen überwachen. Humane NK-Zellen exprimieren eine variable Anzahl sowohl inhibierender als auch aktivierender KIR, wobei die Expression inhibierender KIR überwiegt. Entartete oder infizierte Zellen, welche durch eine verminderte Expression von MHC-I Molekülen der Erkennung durch CD8⁺ T-Zellen entgehen, vermitteln dadurch kein

ausreichendes inhibierendes Signal an NK-Zellen, wodurch diese aktiviert werden. Neben den KIR, werden MHC-I Moleküle auch von Mitgliedern der auf NK-Zellen exprimierten NKG2-Rezeptorfamilie (NKG2A, -B, -C, -D, -E, -F, -H) erkannt. Unter ihnen befinden sich sowohl inhibierende (NKG2A, -B) als auch aktivierende (NKG2C, -D, -E, -H) Rezeptoren (NKG2F bisher unbekannt). Bis auf NKG2D, welches als Homodimer auf der Zelloberfläche vorkommt, bilden alle Mitglieder der NKG2 Rezeptorfamilie Heterodimere mit CD94. Sowohl inhibierende als auch aktivierende CD94/NKG2 Rezeptorkomplexe dienen der Erkennung des nichtklassischen MHC-I Moleküls HLA-E (für "humanes Leukozytenantigen"), über welches z.B. Peptidfragmente klassischer MHC-I Moleküle auf der Zelloberfläche präsentiert werden. Der biologische Nutzen dieser inhibierenden und aktivierenden Rezeptoren der gleichen Spezifität ist bisher nicht bekannt. Es wurde jedoch gezeigt, dass verschiedene CD94/NKG2 Rezeptoren HLA-E in Abhängigkeit des präsentierten Peptids mit unterschiedlicher Affinität binden. Über diesen Mechanismus könnte, neben der KIR vermittelten, eine zusätzliche Überwachung der Expression klassischer MHC-I Moleküle erfolgen (Borrego, Masilamani et al. 2006). Wie KIR, so werden auch die verschiedenen NKG2/CD94-Rezeptorkomplexe nicht auf allen NK-Zellen gleichermaßen exprimiert. Vielmehr exprimiert jede NK-Zelle nur ein zufällig verteiltes Repertoire dieser Rezeptoren. Anders als die CD94/NKG2 Rezeptorkomplexe erkennt NKG2D verschiedene Liganden, welche auf gesunden Zellen normalerwiese nicht exprimiert werden. Erst durch zellulären Stress, welchem z.B. infizierte oder entartete Zellen ausgesetzt sind, wird ihre Expression hochreguliert, wodurch sie von NK-Zellen erkannt und zerstört werden können (Raulet, Gasser et al. 2013). Eine ähnliche Funktion scheinen auch die natürlichen Zytotoxizitäts-Rezeptoren (NCR für "natural cytotoxicity receptors") NKp30, NKp44 und NKp46 zu haben, welche darüber hinaus jedoch auch Pathogen-assoziierte Liganden erkennen. Einige der auf infizierten und entarteten Zellen vermuteten Liganden dieser aktivierenden NK-Zell Rezeptoren konnten bisher jedoch noch nicht identifiziert werden (Kruse, Matta et al. 2014; Horton and Mathew 2015). Ein weiterer aktivierender Rezeptor, über welchen NK-Zellen potentielle Zielzellen erkennen, ist FcyRIIIA oder auch CD16. CD16 bindet die Fc-Region von IgG, wodurch NK-Zellen in der Lage sind, Pathogene zu erkennen, gegen welche bereits eine Antikörperantwort generiert wurde. Da CD16 nur eine geringe Affinität für IgG besitzt, bedarf es für eine antikörpervermittelte NK-Zell Aktivierung die Bindung von Immunkomplexen, bei welchen es zur simultanen Bildung mehrerer IgG-CD16 Paare kommt. Wie viele Zelltypen des angeborenen

Immunsystems, so exprimieren auch NK-Zellen PRR auf ihrer Oberfläche, über welche sie einige Pathogene wie Bakterien oder Viren direkt erkennen können. Anders als bei Phagozyten wie Makrophagen oder DC, welche über PRR erkannte Pathogene aufnehmen und zerstören, führt die Aktivierung über PRR in NK-Zellen zu einer erhöhten Produktion und Ausschüttung inflammatorischer Zytokine und somit zur Initialisierung oder Verstärkung einer Immunantwort (Adib-Conquy, Scott-Algara et al. 2014). Bindet der NK-Zell Rezeptor CD161 seinen Liganden LLT-1 (für "lectin-like-transkript"-1), erhalten NK-Zellen ein inhibierendes Signal, was zu einer verminderten Ausschüttung inflammatorischer Zytokine und reduzierten zytotoxischen Aktivität führt. LLT-1 wird vor allem auf der Zelloberfläche aktivierter DC und B-Zellen exprimiert, wodurch diese vor einer Zerstörung durch NK-Zellen geschützt werden, und zu einer Modulierung der Immunreaktion führen (Rosen, Cao et al. 2008). Neben den Rezeptoren zur Erkennung oberflächengebundener Liganden exprimieren NK-Zellen eine Reihe verschiedener Rezeptoren für lösliche Zytokine, über welche eine weitere Aktivierung oder Inhibition der NK-Zell Aktivität stattfindet. Das Gleichgewicht aus der Gesamtheit inhibierender und aktivierender Signale, welche NK-Zellen aus Kontakten mit körpereigenen Zellen oder Pathogenen und löslichen Strukturen erhalten, entscheidet, ob es zu einer Aktivierung der NK-Zelle kommt oder nicht.

2.2 Effektor-Funktionen

NK-Zellen patrouillieren durch Blut und Gewebe, und haben dabei häufigen Kontakt zu körpereigenen Zellen. Der Großteil dieser Kontakte resultiert, aufgrund inhibierender Signale, in einer raschen Dissoziation der NK-Zelle. Erhält die NK-Zelle jedoch starke stimulierende Signale, z.B. durch stressinduzierte Liganden auf der Zielzelle oder inflammatorische Zytokine am Ort einer Infektion, kommt es zu ihrer Aktivierung. Eine wichtige Funktion aktivierter NK-Zellen ist die Induktion des kontrollierten Zelltods der Zielzelle. Reife NK-Zellen exprimieren konstitutiv lytische Proteine wie Perforin und Granzym B welche in der Zelle in Lysosomen gespeichert werden. Sie sind in der Lage, bereits wenige Minuten nach erfolgter Aktivierung, die gerichtete Degranulation der Lysosomen auf die Zellmembran der Zielzelle und damit deren Apoptose einzuleiten (Trapani 2001). Dabei kommt es zunächst zu der Ausbildung einer engen Bindung zwischen NK-Zelle und Zielzelle und der Formation einer sog. lytischen Synapse. Diese besteht aus einer ringförmigen Anordnung von Adhäsionsmolekülen und Rezeptoren, und dient der zielgerichteten

werden.

Exozytose der lytischen Proteine auf die Plasmamembran der Zielzelle, ohne angrenzende Zellen zu gefährden. Durch die intrazelluläre Akkumulation der Lysosomen an der lytischen Synapse und die dortige Fusion der lysosomalen-Membranen mit der Plasmamembran der NK-Zelle kommt es zur Freisetzung von Perforin und Granzym B in den synaptischen Spalt (Orange 2008). Gleichzeitig führt die Membranfusion dazu, dass das Lysosom-assoziierte Membranprotein-1 (LAMP-1 oder CD107a), welches normalerweise auf der Innenseite der lysosomalen-Membran vorliegt, auf der Plasmamembran der NK-Zelle erscheint, wo es zur Messung der zytotoxischen Zell-Aktivität eingesetzt werden kann (Bryceson, March et al. 2005). Das sekretierte Perforin diffundiert durch den synaptischen Spalt und bildet Poren in der Plasmamembran der Zielzelle (Lichtenheld, Olsen et al. 1988). Durch diese gelangt Granzym B ins Innere der Zielzelle und leitet die Apoptose ein (Heusel, Wesselschmidt et al. 1994). Neben der Rezeptor-vermittelten Zytotoxizität sind NK-Zellen durch die Expression des FcyRIIIA zudem in der Lage, IgG markierte Zielzellen durch Antikörper-vermittelte zelluläre Zytotoxizität (ADCC für engl. "antibody-dependent cellular cytotoxicity") zu zerstören. Dabei kommt es ebenfalls zur Ausbildung einer lytischen Synapse und gerichteten Degranulation von Lysosmen. Ein aktivierendes Signal über CD16 ist jedoch ausreichend, um auch ohne die Formation einer lytischen Synapse die Sekretion von Lysosomen zu induzieren (Bryceson, March et al. 2005). Zusätzlich können aktivierte NK-Zellen die Apoptose ihrer Zielzellen auch über den sog. Todesrezeptor "Fas" induzieren. Durch die Hochregulierung der Expression des Fas-Liganden (FasL) auf NK-Zellen kommt es in Fas exprimierenden Zielzellen zur Induktion einer proteolytischen Kaskade, wodurch diese in den Zelltod getrieben

Eine Aktivierung von NK-Zellen führt neben ihrer zytotoxischen und Apoptose-induzierenden Aktivität gegen Zielzellen auch zur Produktion und Freisetzung verschiedener, sowohl inflammatorischer als auch anti-inflammatorischer Zytokine. Dadurch sind sie in der Lage Immunreaktionen zu initiieren oder ihren Verlauf zu beeinflussen. Zu den wichtigsten inflammatorischen Zytokinen, welche von NK-Zellen sezerniert werden, gehören Interferon- γ (IFN- γ) und Tumornekrosefaktor- α (TNF- α). Die Produktion anti-inflammatorischer Zytokine wird in NK-Zellen überwiegend durch eine Aktivierung mit exogenen Zytokinen stimuliert (Fauriat, Long et al. 2010). Darüber hinaus wirken NK-Zellen auch über direkten Zellkontakt zu regulatorischen Immunzellen wie DC modulierend auf Zellen des adaptiven Immunsystems ein (Piccioli, Sbrana et al. 2002). Zudem sind sie in der Lage, durch die direkte Lyse unreifer DC, Mikrogliazellen und aktivierter T-Zellen und Makrophagen limitierend in eine ablaufende Immunantwort einzugreifen (Ferlazzo, Tsang et al. 2002; Rabinovich, Li et al. 2003; Nedvetzki, Sowinski et al. 2007; Lunemann, Lunemann et al. 2008).

2.3 Subpopulationen und Entwicklung

NK-Zellen lassen sich anhand der Oberflächenexpression des neuralen Zell-Adhäsionsmoleküls-1 (NCAM-1 für "neural cell adhesion molecule-1" oder CD56) in Subpopulationen unterteilen, welche sich in ihrer Verteilung in Geweben, Expression von Rezeptoren und primären Effektorfunktionen unterscheiden. CD56 ist ein homophilbindendes Glykoprotein, welches neben NK-Zellen auch von Muskel- und Nervenzellen exprimiert wird, wo es die Adhäsion zwischen den Zellen vermittelt. Anhand des Expressionslevels lassen sich NK-Zellen in schwach CD56 positive (CD56^{dim}) und stark CD56 positive (CD56^{bright}) Subpopulationen unterteilen. Im peripheren Blut bilden NK-Zellen ca. 10 % der Lymphozytenpopulation, wovon ca. 95 % CD56^{dim} NK-Zellen sind. Im Gegensatz dazu bilden NK-Zellen zwischen 1-5 % der mononukleären Zellen in Lymphknoten, wovon ca. 75 % CD56^{bright} NK-Zellen sind. Da jedoch ca. 40 % aller Lymphozyten in Lymphknoten und nur ca. 2 % im peripheren Blut lokalisiert sind, bilden CD56^{bright} NK-Zellen den weitaus größeren Anteil der NK-Zell Population (Ferlazzo and Munz 2004). Während einige Rezeptoren wie beispielsweise NKG2D und CD161 von beiden Subpopulationen gleichermaßen exprimiert werden, unterscheiden sie sich stark in der Expression wichtiger Rezeptoren wie CD16, KIR und NKG2A/CD94: CD56^{dim} NK-Zellen sind größtenteils CD16 und KIR positiv, exprimieren NKG2A/CD94 aber nur teilweise. Dagegen sind die meisten CD56^{bright} NK-Zellen negativ für CD16 und KIR, exprimieren aber NKG2A/CD94. Zusätzlich unterscheiden sich CD56^{dim} und CD56^{bright} NK-Zellen in den von ihnen ausgeführten Effektorfunktionen. CD56^{dim} NK-Zellen weisen eine hohe zytotoxische Aktivität auf, und enthalten eine dementsprechend große Anzahl Perforin und Granzym B beladener Lysosomen. Durch die Expression von CD16 sind sie zudem in der Lage, ihre Zielzellen durch ADCC zu eliminieren. Im Gegensatz dazu zeigen CD56^{bright} NK-Zellen eine weitaus geringere zytotoxische Aktivität, besitzen weniger gespeichertes Perforin und Granzym B in ihren Lysosomen und besitzen, mangels CD16, nicht die Fähigkeit zur ADCC. Auf der anderen Seite produzieren CD56^{bright} NK-Zellen im Vergleich zu CD56^{dim} NK-Zellen nach Aktivierung die bis zu 20- bis 30-fache Menge an Zytokinen (Poli, Michel et al. 2009). Trotz der beschriebenen

Unterschiede handelt es sich bei CD56^{dim} und CD56^{bright} NK-Zellen nicht um unabhängige Immunzellpopulationen, sondern um unterschiedliche Entwicklungsstadien einer Zelllinie. Nach ihrer Differenzierung aus pluripotenten Vorläuferzellen im Knochenmark migrieren NK-Zell Vorläufer in sekundäre Lymphgewebe, wo sie sich zunächst zu CD56^{bright} NK-Zellen entwickeln. Diese migrieren anschließend ins periphere Blut und Gewebe, wo sie zu CD56^{dim} NK-Zellen ausdifferenzieren (Yu, Freud et al. 2013). Dieser Vorgang wird durch Befunde bestätigt, dass sich in CD56^{bright} NK-Zellen aus sekundären Lymphgeweben, durch eine *in vitro* Behandlung mit Interleukin-2 (IL-2), sowohl die Expression von CD16 und KIR, als auch die Produktion von Perforin und eine erhöhte Zytotoxizität induzieren lassen (Ferlazzo, Thomas et al. 2004).

2.4 NK-Zellen in Autoimmunerkrankungen

In verschiedenen Autoimmunerkrankungen, wie beispielsweise Multiple Sklerose (MS), systemischer Lupus erythematodes (SLE), rheumatoide Arthritis (RA), Typ I Diabetes (T1D) und Guillain-Barré Syndrom (GBS) wurden eine reduzierte Anzahl an NK-Zellen und/oder Beeinträchtigung der zytotoxischen NK-Zell Aktivität im peripheren Blut festgestellt (Yoshii and Shinohara 1998; Fogel, Yokoyama et al. 2013). Bisher ist jedoch unklar, ob diese Beobachtung eine tatsächliche Reduktion zytotoxischer NK-Zellen darstellt, oder ob sie lediglich eine Abwanderung von NK-Zellen aus dem peripheren Blut in betroffene Gewebe widerspiegelt. Für letzteres sprechen z.B. Beobachtungen infiltrierter NK-Zellen in den Langerhans-Inseln des Pankreas in NOD-Mäusen (für engl. "non obese diabetic") und Patienten mit T1D (Dotta, Censini et al. 2007; Gur, Porgador et al. 2010) oder in Synovien betroffener Gelenke in Patienten mit RA (Conigliaro, Scrivo et al. 2011). Ebenso unklar ist, ob es sich bei den Veränderungen der NK-Zell Population um einen primären Effekt, welcher zur Etablierung der Erkrankung beigetragen hat, oder um einen sekundären, durch die Krankheit ausgelösten Effekt handelt.

Studien aus humanen Patienten und Tiermodellen autoimmuner Erkrankungen zeigen, dass NK-Zellen sowohl eine regulatorische als auch verstärkende Wirkung auf die fehlgeleitete Immunreaktion haben können, wobei die Datenlage zu Gunsten der regulatorischen Funktion überwiegt. Zum Teil werden jedoch selbst innerhalb einzelner Erkrankungen gegensätzliche Funktionen der NK-Zell Population beschrieben. So tritt die bei T1D beschriebene Infiltration von NK-Zellen in den Langerhans-Inseln des Pankreas verstärkt zu

Beginn der Autoimmunreaktion in frühen Phasen der Erkrankung auf, und nimmt im späteren Verlauf wieder ab, was für eine Beteiligung von NK-Zellen an der Initiierung der Immunreaktion bei T1D spricht (Brauner, Elemans et al. 2010). Dies wird zusätzlich unterstützt durch die Beobachtungen, dass NOD-Mäuse, in welchen die Signalweiterleitung der aktivierenden NK-Rezeptoren NKG2D oder NKp46 blockiert wurden, vor dem Ausbruch der Erkrankung geschützt sind (Ogasawara, Hamerman et al. 2004; Gur, Porgador et al. 2010). Im Gegensatz dazu zeigt eine weitere Studie an NOD-Mäusen, dass eine Depletion von NK-Zellen den Ausbruch der Erkrankung nicht verhindern kann (Beilke, Meagher et al. 2012). Ähnlich kontroverse NK-Zell Funktionen werden auch bei Patienten und Tiermodellen der RA beschrieben: Patienten mit RA zeigen in betroffenen Gelenken eine große Anzahl CD56^{bright} NK-Zellen, welche dort durch die Produktion inflammatorischer Zytokine die fehlgeleitete Immunantwort verstärken (Conigliaro, Scrivo et al. 2011). Im Gegensatz dazu wurde in zwei Tiermodellen inflammatorischer Arthritis festgestellt, dass eine Depletion von NK-Zellen ein frühzeitiges Ausbrechen der Erkrankung und einen drastischeren Krankheitsverlauf zur Folge hat (Lo, Lam et al. 2008; Gur, Porgador et al. 2010). Zusätzlich wurde gezeigt, dass eine Aktivierung von NK-Zellen, durch die Blockierung der NKG2A-Interaktion zwischen NK-Zellen und T-Zellen, die zytotoxische Lyse autoreaktiver T-Zellen induziert, und so die Entstehung der Erkrankung verhindern kann (Leavenworth, Wang et al. 2011). Eine entsprechende Beobachtung wurde auch in der experimentellen autoimmunen Enzephalitis (EAE), dem Tiermodell der MS, gemacht (Lu, Ikizawa et al. 2007). Dort wurde zudem gezeigt, dass im zentralen Nervensystem (ZNS) lokalisierte NK-Zellen regulatorisch auf die T-Zell vermittelte Autoimmunreaktion einwirken. Wird in EAE-Mäusen die Migration von NK-Zellen ins ZNS durch eine Mutation des Chemokinrezeptors CX3CR1 inhibiert, zeigen diese Tiere einen drastischeren Krankheitsverlauf mit einer erhöhten Sterberate. Gleiches gilt auch in NK-Zell depletierten EAE-Tieren (Huang, Shi et al. 2006). Im Einklang mit dieser Beobachtung wurde in Patienten mit MS eine verringerte CX3CR1 Expression auf NK-Zellen festgestellt, welche zudem eine Korrelation zum klinischen Verlauf der Erkrankung aufweist (Infante-Duarte, Weber et al. 2005). Bei der Therapie der MS wird NK-Zellen ebenfalls eine regulatorische Funktion zugeschrieben. MS Patienten welche mit Daclizumab behandelt werden, zeigen eine Expansion von CD56^{bright} NK-Zellen im peripheren Blut, welche mit einer Reduktion neu auftretender oder sich vergrößernder Läsionen einhergeht (Elkins, Sheridan et al. 2015). Bei Daclizumab handelt es sich um einen monoklonalen Antikörper gegen die

alpha Kette des hoch affinen IL-2 Rezeptors (IL-2RA oder CD25) welcher vor allem auf aktivierten T-Zellen und Treg exprimiert wird. NK-Zellen exprimieren einen IL-2 Rezeptor mit geringerer Affinität, welcher nicht von Daclizumab erkannt wird. Durch eine Behandlung mit Daclizumab wird die Interaktion zwischen IL-2 und dem hoch affinen IL-2 Rezeptor blockiert, wodurch mehr IL-2 für die Bindung durch NK-Zell zur Verfügung steht. Dadurch wird eine Aktivierung und Expansion von CD56^{bright} NK-Zellen induziert, welche in der Lage sind, autoreaktive T-Zellen durch zelluläre Zytotoxizität zu lysieren, was zu der gleichzeitig beobachteten Abnahme von T-Zellen beitragen könnte (Bielekova, Catalfamo et al. 2006; Elkins, Sheridan et al. 2015). Bei der Behandlung von MS Patienten mit IFN-β kommt es, neben weiteren multifaktoriellen Auswirkungen, ebenfalls zu einer Expansion von CD56^{bright} NK-Zellen im peripheren Blut der Patienten, wobei zudem eine Reduktion der CD56^{dim} Subpopulation beobachtet wurde (Saraste, Irjala et al. 2007; Kieseier 2011).

Insgesamt lässt sich zusammenfassen, dass die bei verschiedenen Autoimmunerkrankungen festzustellende Beeinträchtigung der NK-Zell Population zu einer verminderten Regulation autoreaktiver Zellen und damit zur Etablierung der Erkrankungen beitragen könnte.

3 Chronisch inflammatorische demyelinisierende Polyneuropathie

Die chronische inflammatorische demyelinisierende Polyneuropathy (CIDP) ist eine erworbene Erkrankung des peripheren Nervensystems (PNS) mit einer Prävalenz zwischen 1,6 und 8,9 pro 100.000 Einwohner, wobei Männer etwa doppelt so häufig betroffen sind wie Frauen. Die Erkrankung tritt meist in Patienten mittleren oder fortgeschrittenen Alters auf, seltener auch schon früher (McLeod, Pollard et al. 1999; Chio, Cocito et al. 2007; Iijima, Koike et al. 2008; Laughlin, Dyck et al. 2009; Mahdi-Rogers and Hughes 2014). Betroffene Patienten leiden unter meist symmetrischen Paresen proximaler und distaler Muskeln, verminderten oder fehlenden Muskeleigenreflexen sowie Sensibilitätsstörungen. Die Krankheitssymptome schreiten mit einem chronisch-rezidivierenden oder chronischprogredienten Verlauf über einen Zeitraum von mindestens acht Wochen voran. Darin unterscheidet sich die CIDP von der akuten inflammatorischen demyelinisierenden Polyneuropathie (auch bezeichnet als Guillain-Barré Syndrom) bei welcher die Progression der Symptome maximal vier Wochen andauert. Hervorgerufen werden die Symptome durch Funktionsverlust motorischer und sensorischer Neurone, für die eine fehlgeleitete Aktivierung des körpereigenen Immunsystems verantwortlich gemacht wird. Dabei kommt es aus bisher ungeklärter Ursache zu zellulären und humoralen Autoimmunreaktionen gegen Myelinstrukturen und axonale Bestandteile welche eine Demyelinisierung und/oder axonale Degeneration peripherer Nerven zur Folge haben.

3.1 Immunpathogenese

Eine Ursache für die Initiierung der Immunreaktionen gegen Bestandteile der peripheren Nerven in Patienten mit CIDP ist nicht bekannt. Die Theorie der "molekularen Mimikry" besagt, dass mögliche Übereinstimmungen zwischen endogenen und pathogenen Strukturen die Selbsttoleranz des Immunsystems stören, und eine autoimmune Reaktion auslösen könnten. Beobachtungen in Patienten mit GBS zeigen, dass molekulare Mimikry eine Ursache für die immunvermittelte periphere Neuropathie sein könnte (Ang, Jacobs et al. 2004). Dort werden bei einem Großteil betroffener Patienten Zusammenhänge zwischen der Initiierung der autoimmunen Reaktionen und Infektionen mit bestimmten Pathogenen festgestellt. Diese Pathogene tragen Strukturen auf der Oberfläche, welche ebenfalls im peripheren Nerven zu finden sind, und betroffene Patienten zeigen häufig spezifische Antikörper gegen Epitope dieser Strukturen. Des Weiteren induziert eine Injektion der isolierten Strukturen im Tiermodell eine akute Neuropathie mit vergleichbarer Antikörperantwort (Ang, De Klerk et al. 2001). In bis zu 30 % der Patienten mit CIDP wurden in einem Zeitraum von sechs Wochen vor Krankheitsbeginn ebenfalls Infektionen beobachtet, jedoch konnten bisher keine Zusammenhänge mit bestimmten Pathogenen gezeigt werden (McCombe, Pollard et al. 1987; Bouchard, Lacroix et al. 1999). Als weitere putative Quellen für molekulare Mimikry in der CIDP werden Strukturen in Impfstoffen oder Melanomen vermutet (Kieseier, Dalakas et al. 2002).

Bisherige Erkenntnisse über die Immunpathogenese der CIDP stammen zum einen aus Beobachtungen von Gewebe-, Liquor- und Blutproben betroffener Patienten, zum anderen aus Tiermodellen der akuten und chronischen immunvermittelten Neuropathien. Aufgrund der limitierten Zugänglichkeit des PNS ist es meist nicht möglich schwer betroffene Nerven zu analysieren. Der sich im Bereich des Unterschenkels befindende *Nervus suralis* lässt sich jedoch durch einen vergleichsweise kleinen Eingriff und ohne schwerwiegende Folgen für den Patienten entnehmen. Bereits in frühen Krankheitsstadien und ohne symptomatische Beteiligung des Nerven lassen sich in Suralisbiopsien von Patienten mit CIDP durch histologische Analysen häufig deutliche Anzeichen inflammatorischer Vorgänge mit teilweise bereits fortgeschrittenen Gewebeschädigungen nachweisen. Zu den beobachteten Nervinfiltrierenden Immunzellen gehören sowohl aktivierte CD8⁺ und CD4⁺ T-Zellen als auch Makrophagen, welche eine erhöhte Expression pro-inflammatorischer Zytokine und weiterer inflammatorischer Mediatoren aufweisen. Den Großteil endoneuraler Immunzellen bilden dabei geweberesidente und rekrutierte Makrophagen, welche neben der Freisetzung proinflammatorischer Substanzen, durch ihre antigenpräsentierende Funktion zu einer lokalen Reaktivierung von T-Zellen beitragen können. Zusätzlich spielen Makrophagen eine wichtige Rolle bei der Demyelinisierung der Nervenfasern, indem sie in der Lage sind, zwischen die eng gewickelten Lagen der Schwann-Zell-Membranen zu dringen und so Schäden an der Myelinscheide zu verursachen und diese anschließend zu phagozytieren. Eine Beteiligung zytotoxischer CD8⁺ T-Zellen an der Lyse von Schwann- und Nervenzellen wird ebenfalls vermutet, ein direkter Kontakt zwischen T- und Zielzelle konnte bislang jedoch nicht gezeigt werden. Durch die Freisetzung pro-inflammatorischer Zytokine im Nerven und angrenzenden Blutgefäßen kommt es zu einer erhöhten Expression von Adhäsionsmolekülen an Endothelzellen der Blut-Nerven-Schranke (BNB für "blood nerve barrier") sowie zu einer gesteigerten Permeabilität derselben (Mathey, Park et al. 2015).

Neben zellulären werden bei einigen Patienten mit CIDP auch humorale Bestandteile des Immunsystems in Suralisbiopsien nachgewiesen, wobei sowohl Antikörper als auch Komplementfaktoren an die Oberfläche von Schwann-Zellen und kompaktem Myelin binden. Im Serum einiger Patienten werden Antikörper festgestellt, welche Antigene gesunder Nervenschnitte binden, und nach Injektion in Tiermodelle zu Demyelinisierung und Reduktion der Nervenleitgeschwindigkeit führen (Heininger, Liebert et al. 1984). Als Antigen für diese Antikörper wurde das Myelin-Protein P0 ermittelt. Dies steht im Einklang mit der Beobachtung, dass durch Injektion von P0 in Ratten eine periphere Neuropathie ausgelöst werden kann (Tiermodell der experimentellen autoimmunen Neuritis, EAN) (Milner, Lovelidge et al. 1987). Neben Patienten mit CIDP, welche Antikörper gegen weitere Myelinstrukturen bilden, können in einigen Patienten Autoantikörper nachgewiesen werden, welche Antigene in der nodalen und paranodalen Region der Ranvierschen Schnürringe binden. Da Antigene im paranodalen Bereich im gesunden Nerven nicht zugänglich für eine Erkennung durch Antikörper sind, wird vermutet, dass dort bindende Antikörper nicht an der initialen Immunreaktion beteiligt sind, sondern erst nach Beschädigung des Nervengewebes durch sogenanntes "Epitope spreading" gebildet werden. Zusätzlich erweitert das Epitope spreading das Repertoire der Antikörperaffinitäten, weshalb es bei chronischen Erkrankungen oft schwer ist, das auslösende Epitop zu definieren. Obwohl in Suralisbiopsien Autoantikörper nachgewiesen wurden, können für den Großteil von Patienten mit CIDP keine spezifischen Antigene identifiziert werden. Durch autoreaktive Antikörper können gebundene Strukturen, z.B. von Phagozyten durch FcR vermittelte Phagozytose aufgenommen, durch rekrutierte Faktoren des Komplementsystems opsonisiert, oder durch osmotische Lyse zerstört werden. Des Weiteren können neutralisierende Antikörper, welche z.B. Ionenkanäle im nodalen Bereich binden, zu einem verminderten Membranpotential führen, und somit die Weiterleitung von Aktionspotentialen stören (Mathey, Park et al. 2015).

Wie bereits beschrieben, spielen Tregs eine wichtige Rolle bei der Vermittlung der Selbsttoleranz, indem sie die Aktivierung autoreaktiver T-Zellen, welche der Selektion im Thymus entkommen konnten, in der Peripherie durch die Freisetzung inhibitorischer Zytokine unterdrücken. In Patienten mit CIDP wurde im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe eine reduzierte Anzahl Tregs im peripheren Blut festgestellt, welche zudem eine Reduktion ihres inhibitorischen Potentials aufwiesen (Chi, Wang et al. 2008). Dass dies bei der Entstehung einer Polyneuropathie von Bedeutung sein könnte, zeigen Versuche mit transgenen Mäusen, welche auf ihren CD4⁺ T-Zellen konstitutiv einen TCR exprimieren, über den sie spezifisch ein Peptid des Myelin Proteins P0 in Assoziation mit MHC-II erkennen. Werden diese Tiere in einen Treg-defizienten Hintergrund gekreuzt, entwickeln sie eine drastische Neuropathie, welche im Alter von drei bis vier Wochen zum Tod führt. Tregkompetente Tiere entwickeln im Gegensatz dazu keine Neuropathie (Louvet, Kabre et al. 2009).

19



Abbildung I-2: Modell zur Immunpathogenese der CIDP

Werden nervenähnliche Strukturen im Kontext einer Infektion oder eines Melanoms von APC wie DC oder Makrophagen aufgenommen, kann es zu einer Präsentation von Autoantigenen auf MHC Molekülen kommen. Bei gleichzeitigem kostimulatorischen Signal der APC wird dadurch eine Aktivierung (roter Pfeil) und klonale Expansion autoreaktiver CD4⁺ T-Zellen induziert. Diese wiederum aktivieren über Zell-Zell Kontakte und die Produktion inflammatorischer Zytokine weitere Zellen des Immunsystems wie antigenspezifische B-Zellen und Makrophagen. Aktivierte, autoreaktive B-Zellen differenzieren zu Plasmazellen und produzieren Autoantikörper gegen Epitope von Schwann-Zellen und Neuronen. Gelangen aktivierte CD4⁺ T-Zellen in Blutgefäße der peripheren Nerven, binden sie dort mittels Adhäsionsmolekülen wie ICAM-1 ("intercellular adhesion molecule"-1) an Endothelzellen der Blut-Nerven-Schranke (BNB für "blood nerve barrier") und transmigrieren ins Endoneurium. Dabei führen sie durch die Produktion inflammatorischer Mediatoren und Zytokine zu einer Schwächung der BNB, einer Aktivierung gewebeständiger Makrophagen und einer zusätzlichen Rekrutierung aktivierter Immunzellen in den Nerv. Durch die erhöhte Permeabilität der BNB infiltrieren Autoantikörper nun ungehindert den Nerv, binden an ihre Zielstrukturen und führen zu Komplementaktivierung und Opsonisierung der Zielzellen, wodurch diese durch osmotische Lyse zerstört, oder von Makrophagen erkannt und phagozytiert werden können. Des Weiteren können aktivierte Makrophagen durch die Freisetzung toxischer Substanzen im Endoneurium unspezifische Myelinschädigungen und axonale Degeneration hervorrufen. Durch APC aktivierte autoreaktive CD8⁺ T-Zellen wandern ebenfalls ins Endoneurium ein, und führen nach Bindung ihres spezifischen Antigens in Assoziation mit Klasse I MHC-Molekülen zur direkten Lyse der Zielzelle.

3.2 Phänotypische Varianten

Die in der CIDP auftretende Demyelinisierung ist multifokal, wobei spinale Wurzeln, Nervengeflechte und proximale und distale Nerven unterschiedlich betroffen sein können. Die typische CIDP tritt als symmetrische sensomotorische Polyneuropathie mit Areflexie und Schwäche der proximalen und distalen Muskeln auf. Die Krankheit kann sich bei betroffenen Patienten jedoch klinisch und pathophysiologisch, je nach Verteilung der Symptome und Befunde, unterschiedlich darstellen (Vallat, Sommer et al. 2010). Die klassische Form kommt ca. in der Hälfte aller Patienten vor (Viala, Maisonobe et al. 2010). Die bekanntesten Varianten schließen die asymmetrische, unifokale oder multifokale motorisch-sensorische Form (Lewis-Sumner-Syndrom) (Lewis, Sumner et al. 1982), die rein motorische Form (Sabatelli, Madia et al. 2001), die rein sensorische Form (Oh, Joy et al. 1992), die sensorisch-ataktische Form (Sinnreich, Klein et al. 2004), und die rein distale Form (Katz, Saperstein et al. 2000) ein. Während die Krankheitssymptome bei der CIDP über einen Zeitraum von mindestens acht Wochen voranschreiten, entwickelt sich das GBS über maximal vier Wochen. Einige Patienten mit CIDP zeigen jedoch einen subakuten und monophasischen Verlauf, der sich zwischen den Zeitrahmen von CIDP und GBS bewegt. Die diagnostische Abgrenzung von GBS und subakuter CIDP kann aufgrund der überlappenden Zeitverläufe schwierig sein (Ruts, van Koningsveld et al. 2005). Bisher ist weiterhin unklar, ob es sich bei den verschiedenen phänotypischen Varianten der CIDP um eine einheitliche Erkrankung oder um ein Spektrum mehrerer, eng verwandter Krankheitsbilder handelt (Mathey, Park et al. 2015).

3.3 Diagnosekriterien

Bei der Diagnose der CIDP kommen vor allem elektrophysiologische Untersuchungen zum Einsatz, welche verschiedene typische Hinweise auf Demyelinisierung bei motorischen und sensorischen Nervenfasern liefern. Diese Befunde schließen verlangsamte Nervenleitgeschwindigkeiten, verlängerte distale motorische oder sensorische Latenzen, verlängerte F-Wellen Latenzen, und Leitungsblocks mit Dispersion der Muskelsummenaktionspotentiale ein. Weitere typische Befunde umfassen assoziierten axonalen Verlust, verminderte Amplituden von evozierten Potentialen und Zeichen der Muskeldenervierung in der Elektromyographie (Lewis and Sumner 1982; Brannagan 2011; Bromberg 2011). Die derzeitigen diagnostischen Kriterien legen den Schwerpunkt darauf, wie viele Anomalitäten, die für eine Demyelinisierung sprechen, für die Diagnose einer CIDP notwendig sind, und wie viele Nerven untersucht werden sollten, um einen primären demyelinisierenden Prozess zu erfassen (Dalakas 2011). Demgegenüber hat der Grad der Nervenleitungsverlangsamung eine untergeordnete Bedeutung (Brannagan 2011; Bromberg 2011).

Routinemäßige Liquoruntersuchungen und Nervenbiopsien sind für die Diagnose einer CIDP nicht zwingend notwendig, können aber hilfreich sein, wenn elektrophysiologische Tests nicht aussagekräftig sind (Koller, Kieseier et al. 2005; Hughes, Allen et al. 2006; Vallat,

Sommer et al. 2010). Ein erhöhter Eiweißgehalt im Liquor bei fehlender Pleozytose (zytoalbuminäre Dissoziation) wird typischerweise bei etwa 90% der Patienten mit CIDP gefunden (Laughlin, Dyck et al. 2009). Die Nervenbiopsie zeigt Zeichen der De- und Remyelinisierung, Zwiebelschalenbildungen, Ödeme, gelegentliche epineurale oder endoneurale T-Zellen (Viala, Maisonobe et al. 2010), und Makrophagen, die entweder im gesamten Endoneurium verstreut oder in kleinen perivaskulären Haufen im Endoneurium liegen (Sommer, Koch et al. 2005).

3.4 Therapie

Als weiteres Indiz für die autoimmune Ursache der CIDP gilt das gute Ansprechen betroffener Patienten auf immunmodulierende Therapien. Daten aus klinischen Studien belegen, dass Kortikosteroide, intravenöse Immunglobuline (IVIg) und Plasmapherese sowohl kurz- wie auch langfristige Besserungen erreichen können, wobei etwa 80 % der Patienten auf mindestens eine der drei Therapien ansprechen (Leger, Guimaraes-Costa et al. 2016). Ein therapeutisches Ansprechen wird durch eine messbare Besserung von Kraft und Empfinden und beim Verrichten von Alltagsaktivitäten gemessen. Ein möglichst frühzeitiger Beginn der Therapie kann die mit der Demyelinisierung assoziierte axonale Degeneration abschwächen und damit die Langzeitprognose der Erkrankung verbessern (Koller, Kieseier et al. 2005). Obwohl eine Erhaltungstherapie nötig ist, sollte die Notwendigkeit langfristiger Therapien periodisch überprüft werden, um Übertherapien zu vermeiden (Dalakas 2011).

Historisch wird die CIDP als auf Steroide ansprechende Polyneuropathie beschrieben (Austin 1958). Wegen ihrer anti-inflammatorischen Wirkungen und ihrer Wirksamkeit bei verschiedenen autoimmunen Erkrankungen wurden Kortikosteroide als Behandlung für CIDP eingesetzt, und ihre Wirksamkeit in kontrollierten Studien gezeigt (Dyck, O'Brien et al. 1982; Hughes, Bensa et al. 2002). Eine Besserung kann bereits 2 Wochen nach Beginn der Therapie einsetzen, obwohl es bis zu einem befriedigenden Ansprechen durchschnittlich etwa zwei Monate dauert (Dalakas and Engel 1981). Eine Langzeitbehandlung mit Kortikosteroiden kann eine Vielzahl schwerwiegender Nebenwirkungen hervorrufen, weswegen bei älteren Patienten mit zusätzlichen Erkrankungen eine regelmäßige Überwachung notwendig ist (Gorson 2012).

Die Plasmapherese entfernt vermutete pathogene Antikörper oder zirkulierende Immunfaktoren, die mit Demyelinisierung oder Leitungsblocks einhergehen. Kontrollierte Studien haben die Wirksamkeit der Plasmapherese in der Therapie der CIDP gezeigt (Dyck, Daube et al. 1986; Hahn, Bolton et al. 1996). An eine initiale Serie von 6 Plasmaaustauschen innerhalb von 2 Wochen kann anschließend eine Erhaltungstherapie mit wenigstens einer Plasmapherese alle 6 bis 8 Wochen notwendig werden, entweder als Monotherapie oder in Kombination mit anderen immunmodulierenden Therapien. Die Behandlung erfordert spezielles Equipment und geschultes Personal, und ist daher nur in entsprechend ausgestatteten medizinischen Einrichtungen möglich. Neben der allgemein erhöhten Invasivität der Plasmapherese, kann in Patienten mit eingeschränkter Zugänglichkeit peripherer Venen ein permanenter zentraler Venenkatheter notwendig sein, was mit zusätzlichen Risiken verbunden ist (Gorson 2012).

Die Therapie mit IVIg, die allgemein gegenüber der Plasmapherese bevorzugt wird, da sie sicherer, besser zugänglich und weniger invasiv ist, wird im Folgenden besprochen.

4 Intravenöse Immunglobuline

Intravenöse Immunglobuline sind ein natürliches Produkt, welches aus humanem polyklonalen IgG aus dem Blutplasma tausender gesunder Spender bestehen. Neben einem Anteil von bis zu 98% IgG sind isolationsbedingt geringe Anteile IgA, IgE und IgM sowie weitere lösliche Plasmabestandteile wie z.B. Zytokine in variablen Mengen enthalten. Die Antigenspezifität der isolierten Antikörper spiegelt die immunologische Geschichte der bis zu 100.000 Spender wider und beinhaltet sowohl natürliche Antikörper als auch Antikörper gegen exponierte Pathogene (Barahona Afonso and Joao 2016).

Vor ca. 120 Jahren beschrieb Emil von Behring erstmals die heilende Wirkung vom Serum Diphterie- und Tetanus-immuner Kaninchen auf erkrankte Mäuse (Behring 1890). Kurze Zeit später wurden Seren sich erholender Patienten bereits zur Behandlung von Diphterie, Tetanus und Masern im Menschen eingesetzt. Die Identifikation und Isolation von IgG als wirksamem Bestandteil und die Beobachtungen, dass ein höherer Schutz und verminderte Nebenwirkungen durch den Einsatz gesunder Spender erreicht wurden, führten bis Ende des zweiten Weltkriegs zur Verwendung von intravenös verabreichtem IgG gegen eine Vielzahl von Infektionserkrankungen. Seit Anfang der 1950er Jahre wird IVIg bei der Behandlung von Patienten mit angeborenen und sekundären Immundefizienzen zum Schutz vor Infektionen eingesetzt (Good and Lorenz 1991). Vor ca. 35 Jahren wurde für IVIg neben den bekannten

Mechanismen der präventiven und therapeutischen Infektionsabwehr erstmals eine immunmodulierende Wirkung beobachtet. Dabei wurde IVIg bei der Behandlung der autoimmunvermittelten idiopathisch thrombozytopenischen Purpura (ITP) eingesetzt, was zu einem Wiederanstieg der Thrombozytenzahl führte (Imbach, Barandun et al. 1981). Seitdem wurden anti-inflammatorische Effekte bei einer großen Zahl weiterer Autoimmunerkrankungen beobachtet. Vor allem von hoch dosierten IVIg-Behandlungen profitieren Patienten mit Erkrankungen autoimmunen Ursprungs, wie autoimmunhämolytischer Anämie, autoimmuner Neutropenie, Kawasaki-Syndrom, Polymyositis und Dermatomyositis, Myasthenia gravis, multifokaler motorischer Neuropathie, SLE, RA, GBS und CIDP (Good and Lorenz 1991; Lunemann, Nimmerjahn et al. 2015). 1989 wurden erstmals Frauen, welche unter wiederkehrenden Fehlgeburten litten, für deren Ursache Abstoßungsreaktionen des maternalen Immunsystems gegen den Fötus vermutet wurden, mit IVIg behandelt, was zu einer erhöhten Rate erfolgreicher Schwangerschaften führte (Mueller-Eckhardt, Heine et al. 1989). Im Einklang mit dieser Beobachtung wurde kurze Zeit später gezeigt, dass IVIg zu einer Reduktion der Abstoßungsreaktionen bei Organtransplantationen beitragen kann (Glotz, Haymann et al. 1993). Trotz des breiten Anwendungsbereiches sind die immunmodulierenden Wirkmechanismen einer IVIg-Behandlung nicht vollständig entschlüsselt. Ebenfalls unklar ist, ob den verschiedenen Erkrankungen ein gemeinsamer IVIg-Wirkmechanismus zugrunde liegt, oder ob IVIg seine anti-inflammatorischen Eigenschaften durch krankheitsspezifische Mechanismen vermittelt.

4.1 Wirkmechanismen

Bisherige Erkenntnisse über die immunmodulierende Wirkung einer IVIg-Behandlung gründen auf Beobachtungen aus den verschiedenen Anwendungsbereichen, sowie aus Tiermodellen von Erkrankungen, bei welchen IVIg zum Einsatz kommt. Anhand der Struktur von Immunglobulinen lassen sich die Wirkmechanismen in F(ab)₂-vermittelte und Fc-vermittelte Mechanismen unterteilen. Zu den potenziellen F(ab)₂-vermittelten Mechanismen gehört die antigenspezifische Bindung und Neutralisierung von immunassoziierten Strukturen: In verschiedenen IVIg-Präparaten wurden Antikörper nachgewiesen, welche z.B. Zytokine, Adhäsionsmoleküle oder Zellrezeptoren des Empfängers binden können. Dass dies eine Rolle bei der IVIg-vermittelten Immunmodulierung spielen kann, zeigt die Behandlung von Patienten mit toxisch epidermaler Nekrolyse (TEN). In diesen Patienten kommt es durch

die Interaktion von Fas mit seinem Liganden FasL zur Apoptose von Keratinozyten in der Epidermis, wodurch sich große Bereiche der Haut ablösen. In einem *in vitro* Modell wurde gezeigt, dass IVIg die Fas-FasL Interaktion durch Bindung an Fas auf der Oberfläche von Keratinozyten blockiert und so ihre Apoptose inhibiert, was in Patienten mit TEN vermutlich zur IVIg-induzierten Linderung der Symptome beiträgt (Viard, Wehrli et al. 1998). Ein weiterer F(ab)₂-vermittelter Mechanismus ist die Inaktivierung autoreaktiver Antikörper durch Bindung ihrer variablen Region. Sogenannte anti-idiotypische Antikörper in IVIg sind *in vitro* in der Lage Autoantikörper von Patienten mit GBS zu neutralisieren und tragen so vermutlich zum therapeutischen Effekt der IVIg-Behandlung bei (Buchwald, Ahangari et al. 2002).

Deutlichere Hinweise existieren jedoch für die Beteiligung Fc-abhängiger Mechanismen an der Vermittlung der immunmodulierenden IVIg-Wirkung. Eine klinische Studie zur Behandlung von Kindern mit ITP zeigte beispielsweise, dass eine Verabreichung von isolierten Fc-Fragmenten ausreicht um eine Linderung der Krankheitssymptome hervorzurufen (Debre, Bonnet et al. 1993). Des Weiteren zeigen Untersuchungen, dass in Abhängigkeit eines Glycosylierungsmotives der Fc-Region Unterschiede in der Wirksamkeit von IVIg erreicht werden können. Dabei scheint vor allem die Anwesenheit einer terminalen Sialinsäure ein kritischer Faktor zu sein. Durch eine Anreicherung von Sialinsäure-tragenden Fc-Fragmenten konnte die anti-inflammatorische Wirkung von IVIg-Präparationen in Tiermodellen um das 10-fache erhöht werden. In Abwesenheit der terminalen Sialinsäure oder des kompletten Glycosylierungsmotivs ging der therapeutische IVIg-Effekt hingegen verloren (Kaneko, Nimmerjahn et al. 2006). Diese Beobachtungen sprechen dafür, dass die Fc-Region und die von ihr vermittelten Effektorfunktionen eine entscheidende Rolle bei der IVIg-induzierten Immunmodulation spielen. Durch die Verabreichung hochdosierter Immunglobuline kommt es zu einem raschen Anstieg der Serumkonzentration von IgG im Blut des behandelten Patienten (Bonilla 2008). Es wird vermutet, dass es dadurch zu einer kompetitiven Verdrängung autoreaktiver Antikörper von FcR des Immunsystems kommt. Wie im Falle des neonatalen FcR (FcRn), welcher gebundene Antikörper vor der Degradierung schützt, könnte es dadurch zu einer Verkürzung der Halbwertszeit von Autoantikörpern kommen. Im Tiermodell wurde gezeigt, dass IVIg, in Abhängigkeit von FcRn, zu einer um ca. 40 % verkürzten Halbwertszeit von Immunglobulinen führt (Hansen and Balthasar 2002). Des Weiteren könnte eine Blockierung aktivierender FcyR auf Immunzellen,

wie beispielsweise Makrophagen, zu einer verminderten Bindung von Autoantikörpern und damit zu einer Verminderung zellinduzierter Gewebeschäden führen (Nagelkerke, Dekkers et al. 2014). Eine wichtige Rolle bei der Vermittlung der immunmodulierenden IVIg-Effekte scheint auch der inhibierende FcyRIIB zu spielen, welcher hauptsächlich auf Makrophagen und B-Zellen exprimiert wird. In Tiermodellen autoimmuner Erkrankungen wurde gezeigt, dass ein Ausschalten der FcyRIIB Funktion, durch genetische Deletion oder blockierende Antikörper, zu einer Verminderung des therapeutischen IVIg-Effekts führt (Samuelsson, Towers et al. 2001; Kaneko, Nimmerjahn et al. 2006). Gleichzeitig wurde beobachtet, dass die Expression von FcyRIIB in Tiermodellen und in Patienten nach einer IVIg-Gabe ansteigt. Die gesteigerte Expression des inhibierenden Rezeptors auf B-Zellen und Makrophagen könnte den zu erreichenden Schwellenwert der Immunzellaktivierung erhöhen (Bruhns, Samuelsson et al. 2003). In Patienten mit CIDP ist bekannt, dass sie, im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe, eine reduzierte FcyRIIB auf B-Zellen aufweisen, welche sich durch eine IVIg-Behandlung erhöht (Tackenberg, Jelcic et al. 2009).

Als weitere Mechanismen der immunmodulierenden IVIg-Wirkung kommen die Induktion und Hemmung regulatorisch aktiver Zellpopulationen in Frage, welche dazu beitragen können, die gestörte Selbsttoleranz wiederherzustellen. In der EAE sowie in Patienten verschiedener autoimmuner Erkrankungen, führt eine Behandlung mit IVIg zu einem Anstieg regulatorischer T-Zellen. In Treg-defizienten Tieren blieb der zuvor beobachtete therapeutische IVIg-Effekt dagegen aus (Ephrem, Chamat et al. 2008; Barreto, Ferreira et al. 2009; Bayry, Mouthon et al. 2012). De Groot et al. postulieren, dass die Expansion regulatorischer T-Zellen durch spezielle Aminosäuresequenzen von Immunglobulinen hervorgerufen wird (De Groot, Moise et al. 2008; De Groot, Cousens et al. 2013). Diese Aminosäuresequenzen werden nach der Aufnahme verabreichter IgG durch APC auf MHC-II Molekülen präsentiert, wo sie von antigenspezifischen Tregs, TCR-abhängig erkannt werden. Daher werden diese Aminosäuresequenzen auch als Treg-Epitope bzw. "Tregitope" bezeichnet. Durch die antigenspezifische Bindung kommt es zur Aktivierung und Expansion von Tregs, welche dann in der Lage sind, durch direkte Zellinteraktion und die Produktion anti-inflammatorischer Zytokine, regulatorischen Einfluss auf die fehlgeleitete Immunantwort zu nehmen (Kessel, Ammuri et al. 2007). Chong et al. haben gezeigt, dass NK-Zellen bei der Vermittlung der IVIg induzierten Treg-Expansion eine zentrale Rolle spielen. In der EAE kommt es nur in Anwesenheit von NK-Zellen zu einem Anstieg der Treg Population
und zur Linderung der Krankheitssymptome (Chong, Ling et al. 2013). Neben der Aktivierung und Expansion von Tregs zeigen in vitro Modelle, dass IVIg zu einer verminderten Aktivierung potentiell autoreaktiver T-Zellen durch DC führt, was zu einer weiteren Abschwächung der Immunantwort beitragen könnte. Nach einer Inkubation mit Immunglobulinen zeigen DC eine stark reduzierte Expression kostimulatorischer Moleküle und produzieren weniger inflammatorische und verstärkt anti-inflammatorische Zytokine (Bayry, Lacroix-Desmazes et al. 2003). Zusätzlich wurde gezeigt, dass es durch IVIg zu einer Aktivierung zytotoxischer NK-Zellen kommt, welche reife DC zur Apoptose führen können. Dabei erkennt die NK-Zelle mittels CD16 gebundene Immunglobuline auf der Zellmembran der DC, und zerstört diese durch ADCC (Tha-In, Metselaar et al. 2007). Jacobi et al. postulieren, dass IVIg in NK-Zellen zudem die ungerichtete Degranulation zytotoxischer Vesikel im Blut behandelter Patienten auslöst, was die Erschöpfung der NK-Zell Population zur Folge haben könnte (Jacobi, Claus et al. 2009). Des Weiteren beschreiben Jacobi et al. eine IVIg induzierte Freisetzung von Zytokinen durch NK-Zellen, was ebenfalls zum immunmodulierenden IVIg-Effekt beitragen könnte. Aus der Behandlung von Frauen mit wiederkehrenden Fehlgeburten ist seit längerem bekannt, dass IVIg dort zu einer Reduktion der NK-Zell Population im peripheren Blut führt, und dass dieser Effekt vermutlich zu einer erfolgreichen Schwangerschaft verhilft (Kwak, Kwak et al. 1996; Perricone, Di Muzio et al. 2006). Vor kurzem wurden ähnliche Beobachtungen bei der IVIg-Behandlung von Patienten mit CIDP und weiteren immunvermittelten Erkrankungen gemacht (Jacobi, Claus et al. 2009; Bohn, Nederby et al. 2011). Es wird jedoch vermutet, dass es sich bei dem beobachteten Effekt nicht um eine IVIg-induzierte Apoptose von NK-Zellen handelt. Vielmehr wird davon ausgegangen, dass durch die IVIg-Behandlung eine Migration von NK-Zellen aus dem zirkulierenden Blut in

periphere Gewebe induziert wird, wo sie vermehrt mit regulatorischen Zellen wie Treg und DC zusammentreffen, und in der Lage sind, die zuvor beschriebenen Mechanismen in Gang zu setzen (Chong, Ling et al. 2013).

4.2 IVIg-Behandlung von Patienten mit CIDP

In randomisiert kontrollierten Studien wurde die Wirksamkeit von IVIg für einige der oben genannten Erkrankungen nachgewiesen, und gilt heute bei der CIDP - aber auch bei der akuten Autoimmunen Neuropathie, dem GBS - als wichtige Primärtherapie (Hughes, Donofrio et al. 2008). Bei der IVIg-Therapie von Patienten mit CIDP wird meist zunächst eine

Initialdosis von 2 g/kg Körpergewicht verabreicht, welche betroffene Patienten, verteilt an zwei aufeinanderfolgenden Tagen, erhalten. Aufgrund der Halbwertszeit verabreichter IgG von durchschnittlich 23 Tagen (Bonilla 2008) erhalten Patienten in ca. monatlichen Intervallen eine Erhaltungstherapie von meist 1 g/kg Körpergewicht. Die individuelle Dosierung und Dauer der Behandlungsintervalle richten sich dabei nach der Dauer der klinischen Remission und der Effizienz der Therapie. Bei den meisten Patienten zeigen sich erste Behandlungserfolge sechs Wochen nach Behandlungsinitialisierung, also erst nach der zweiten Infusion (Latov, Deng et al. 2010). Etwa ein Drittel der Patienten mit CIDP spricht nicht auf eine Therapie mit Immunglobulinen an (Hughes, Donofrio et al. 2008). Therapierefraktäre Patienten, sogenannte "Non-Responder", erhalten aufgrund der Wirkungslatenz mindesten zwei, in vielen Fällen jedoch bis zu ca. 6 und mehr Infusionen bis ihr Therapieversagen diagnostiziert werden kann. In bis zu 20 % der Patienten mit CIDP stellt sich nach einiger Zeit eine chronische Stabilisierung oder Inaktivität der Erkrankung ein. Um in diesen Patienten eine unnötige Fortsetzung der kostspieligen Behandlung zu vermeiden, werden zeitweise Behandlungsintervalle übersprungen und die Behandlung bei günstigem Verlauf eingestellt (Lunemann, Nimmerjahn et al. 2015).

5 ICAM-1 defiziente NOD Mäuse als Tiermodell der CIDP

Um ein besseres Verständnis über pathophysiologische Mechanismen humaner Erkrankungen oder die Wirkweise und Verträglichkeit neuer Therapeutika zu erhalten, ist der Einsatz von Modelorganismen häufig unvermeidbar. Für Mäuse des NOD-Stammes ist bekannt, dass sie durch eine spontan entstehende Autoimmunreaktion gegen die Insulin produzierenden β -Zellen des Pankreas einen Typ-1-Diabetes entwickeln (Anderson and Bluestone 2005). Der Stamm wurde 1980 entdeckt und wird seither als Tiermodell in der Diabetesforschung eingesetzt (Makino, Kunimoto et al. 1980). Neben der T-Zell vermittelten Zerstörung von β -Zellen weisen NOD-Mäuse eine hohe Prädisposition für autoimmune Reaktionen gegen weitere Organe und Gewebe auf. Durch genetische Manipulationen lässt sich das Ziel der Immunreaktion vom Pankreas z.B. auf Schilddrüse, Herz, Skelettmuskeln oder periphere Nerven verschieben (Aoki, Borchers et al. 2005). 2014 beschrieben Meyer zu Hörste et al., dass NOD-Mäuse, welche eine Mutation im Gen für das interzelluläre Adhäsionsmolekül-1 (ICAM-1 für engl. "intercellular adhesion molecule"-1) tragen (ICAM-1

NOD Tiere), zwar kein T1D, aber dafür eine chronisch inflammatorische demyelinisierende Neuropathie entwickeln (Meyer zu Horste, Mausberg et al. 2014). ICAM-1 ist ein Transmembranprotein, welches auf der Oberfläche vaskulärer Endothelzellen und APC exprimiert wird, und dort sowohl als Adhäsionsmolekül dient, als auch an der Übermittelung kostimulatorischer Signale beteiligt ist. Wichtige Funktionen erfüllt ICAM-1 z.B. bei der Transmigration von Leukozyten aus Blutgefäßen in angrenzende Gewebe (Ley, Laudanna et al. 2007), Ausbildung immunologischer Synapsen, initialen Bindung zwischen diversen Immunzellen und APC (Davis 2009), und bei der T-Zell-Aktivierung (Van Seventer, Shimizu et al. 1990; Ley, Laudanna et al. 2007; Davis 2009). Die ICAM-1 Defizienz führt in NOD-Mäusen ab einem Alter von ca. sieben Monaten zu einer spontanen Infiltration autoreaktiver CD4⁺ T-Zellen, B-Zellen und Makrophagen ins PNS (Meyer zu Horste, Mausberg et al. 2014). Durch Myelin-spezifische CD4⁺ T-Zellen und Autoantikörper kommt es zur immunvermittelten Demyelinisierung peripherer Nerven, was eine langsam voranschreitende Lähmung aller Extremitäten zur Folge hat, und bis zum Tod der Tiere führen kann. Für die Verschiebung der Immunreaktion vom Pankreas ins PNS scheint vor allem die Funktion von ICAM-1 bei der Selbsttoleranz vermittelnden negativen Selektion autoreaktiver T-Zellen im Thymus eine wichtige Rolle zu spielen. Eine Transplantation des Thymusepithels aus ICAM-1^{-/-} NOD Tieren ist ausreichend, um in Tieren eines Thymus-defizienten Mausstammes eine periphere Neuropathie zu induzieren. Diese Beobachtungen verdeutlichen die Wichtigkeit der zentralen Toleranzmechanismen bei der Entstehung autoimmuner Erkrankungen. Der chronische Verlauf der immunvermittelten Neuropathie macht den ICAM-1^{-/-} NOD Mausstamm zu einem Modellorganismus der CIDP.

Wie Patienten mit CIDP so profitieren auch ICAM-1^{-/-} NOD Tiere, von einer Behandlung mit Immunglobulinen (Meyer zu Horste, Cordes et al. 2016). Dabei zeigten Tiere, welche über einen Zeitraum von neun Wochen 3-mal wöchentlich mit 100 µl Kiovig 100 mg/ml Infusionslösung behandelt wurden, einen positiveren Krankheitsverlauf als Tiere einer Kontrollgruppe. Ähnlich wie bei der IVIg-Behandlung von Patienten mit CIDP wurden jedoch auch im Tiermodell interindividuelle Differenzen bei der Therapieeffizienz festgestellt. Während bei ca. 60 % der behandelten Tiere eine Verbesserung oder Stagnation des Krankheitsverlaufs festgestellt werden konnte (Responder), zeigten die verbleibenden 40 % kein erkennbares Ansprechen auf die Therapie (Non-Responder). Bisher unveröffentlichte Daten von Meyer zu Hörste et al. deuten darauf hin, dass eine mögliche Ursache für das

unterschiedliche Ansprechen auf die Therapie in der NK-Zell Population der behandelten Tiere liegen könnte. Dabei wurden vor Initiierung der Therapie entnommene Blutproben von fünf respondierenden und fünf therapierefraktären Tieren mittels einer genomweiten Expressionsanalyse (Microarray Analyse) auf die differenzielle Expression von etwa 32.000 Genen untersucht. Bei diesem Screening wiesen mehrere mRNA Level von Genen, die typischerweise in NK-Zellen exprimiert werden, einen Zusammenhang zur Therapieeffizienz der Immunglobulin-Behandlung auf. Im Vergleich zu therapierefraktären Tieren, wurden in Blutproben respondierender Tiere bereits vor Beginn der Behandlung signifikant höhere mRNA Level mehrerer NK-Zell Rezeptoren festgestellt. Durch die großen Übereinstimmungen im Phänotyp und den pathophysiologischen Mechanismen der peripheren Neuropathie von ICAM-1^{-/-} NOD Tieren und Patienten mit CIDP lassen sich aus diesen Beobachtungen möglicherweise Rückschlüsse auf die IVIg-Behandlung, und die frühzeitige Identifizierung therapierefraktärer Patienten ziehen.

6 Zielsetzung und Fragestellung

Intravenöse Immunglobuline stellen eine wichtige Therapieoption in der Behandlung von Patienten mit CIDP dar, der zugrundeliegende Mechanismus der immunmodulierenden IVIg-Wirkung ist bisher jedoch nicht abschließend geklärt. Zudem besitzt IVIg in der Behandlung der CIDP eine heterogene Therapieeffizienz, wobei etwa ein Drittel der Patienten nicht auf die Therapie anspricht. Ziel dieser Arbeit ist es, einen Beitrag zur Entschlüsselung des IVIg-Wirkmechanismus zu leisten und so möglicherweise Aufschluss über die teilweise unzureichende Therapieeffizienz zu erhalten. Zusätzlich besteht das Ziel darin, einen Marker zur Identifizierung therapierefraktärer Patienten ausfindig zu machen, um eine wirkungslose IVIg-Behandlung dieser Patienten möglichst frühzeitig zu verhindern.

Untersuchungen im ICAM-1^{-/-} NOD Mausmodell der CIDP deuten auf eine Beteiligung der NK-Zell Population im Wirkmechanismus einer IVIg-Behandlung. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit soll untersucht werden, welche Rolle NK-Zellen im IVIg-Wirkmechanismus des Tiermodells und in Patienten mit CIDP spielen. Dazu wird zunächst die im Tiermodell beobachtete Korrelation zwischen der NK-Zell Population und der Therapieeffizienz einer IVIg-Behandlung verifiziert, und eine mögliche Translation der Ergebnisse vom Tiermodell in humane Patienten überprüft. Die Analyse der *in vitro* und *in*

vivo Einflüsse von IVIg auf die NK-Zellen humaner Patienten mit CIDP sollen Hinweise darauf liefern, wie NK-Zellen an der IVIg-vermittelten Regulation der Neuropathie beteiligt sein könnten. Eine retrospektive Unterteilung der Patienten anhand der Therapieeffizienz der IVIg-Behandlung soll zeigen, ob Eigenschaften der NK-Zell Population oder IVIg-induzierte Änderungen dieser, mit der Wirksamkeit der Behandlung korrelieren. Unterschiede zwischen respondierenden und therapierefraktären Patienten könnten dann möglicherweise als Surrogatmarker für das Ansprechen der Patienten auf die Behandlung genutzt werden. Für Tregs werden wichtige Funktionen im IVIg-Wirkmechanismus vermutet, für welche in der EAE zudem eine Abhängigkeit von der NK-Zell Population beobachtet wurde. Um mögliche Rückschlüsse auf einen Zusammenhang zur Rolle der NK-Zell Population zuzulassen, soll hier eine Beteiligung von Tregs im IVIg-Wirkmechanismus von Patienten mit CIDP überprüft werden. Eine Analyse der NK-Zell Population behandlungsnaïver Patienten mit CIDP, in Abhängigkeit zum Schweregrad der Erkrankung, soll zudem zu einem besseren Verständnis der Rolle von NK-Zellen in der Pathophysiologie der CIDP beitragen.

II Ergebnisse

1 Zusammenhang zwischen der Therapieeffizienz einer IVIg-Behandlung und der NK-Zell Population im ICAM-1^{-/-} NOD Mausmodell der CIDP

Vorbefunde unserer Arbeitsgruppe liefern Hinweise auf einen möglichen Zusammenhang zwischen der NK-Zell Population im peripheren Blut des ICAM-1^{-/-} NOD Mausstammes mit dem Ansprechen auf eine IVIg-Behandlung. Bei der dabei durchgeführten Microarray-Analyse wiesen Blutproben respondierender Tiere bereits vor Beginn der Behandlung signifikant höhere mRNA Level mehrerer NK-Zell Rezeptoren auf, als Blutproben therapierefraktärer Tiere. Besonders auffällig waren dabei Gene, die für NK-Zell Rezeptoren der KLRA- (Ly49), KLRB- (NKR-P1) und KLRC- (NKG2) Familien kodieren. Um diese Beobachtung zu überprüfen und zu quantifizieren, wurde die RNA von sechs Tieren der gleichen Versuchsreihe mittels relativer qPCR auf mRNA-Expressionsunterschiede der ermittelten NK-Zell Gene analysiert.

1.1 In ICAM-1^{-/-} NOD Mäusen korreliert die Expression von NK-Zell Genen vor Initiierung einer IVIg-Behandlung mit der Therapieeffizienz

Als Maß für die Therapieeffizienz der IVIg-Behandlung wurde die Änderung des versuchsspezifischen Scores (auf einer Skala von 0 - 6) zwischen der ersten und letzten Behandlungswoche (Δscore) herangezogen. Die sechs hier analysierten ICAM-1^{-/-} NOD Mäuse zeigten zu Beginn der Behandlung mit Immunglobulinen einen Krankheits-Score zwischen 1 und 3,5. Während der 9-wöchigen Behandlung verbesserten sich drei der Tiere um einen Δscore von -1,5 bzw. -1 und -0,3. Bei drei weiteren Tieren nahmen die Krankheitssymptome zu – zwei verschlechterten sich um einen Δscore von 0,3, ein Tier um einen Δscore von 1,5 (Abb. II-1A). In Blutproben, die den Tieren vor Initiierung der Immunglobulin-Therapie entnommen wurden, wurden die relativen mRNA Level der im Microarray ermittelten NK-Zell Gene mittels qPCR quantifiziert. Dabei zeigt sich für die relative Expression der Gene *Nkg2a, Nkg2c, Nkr-p1c, Ly49i* und *Klri2* eine lineare Korrelation zur Therapieeffizienz der nachfolgenden IVIg Behandlung (Abb. II-1B und C).

In einem Kontrollversuch mit sechs unbehandelten ICAM-1^{-/-} NOD Mäusen zeigt sich keine Korrelation zwischen dem Krankheitsverlauf und der relativen Expression der analysierten NK-Zell Gene (Daten nicht gezeigt).



Abbildung II-1: Korrelation zwischen der Therapieeffizienz einer IVIg-Behandlung und der Expression von NK-Zell Rezeptoren vor Beginn der Therapie in ICAM-1^{-/-} NOD Mäusen

Sechs ICAM-1^{-/-} NOD Tiere wurden über einen Zeitraum von neun Wochen dreimal wöchentlich mit 10 μ l/g Körpergewicht Kiovig behandelt. Der Therapieerfolg wurde über die Änderung des versuchsspezifischen Scores zwischen Beginn und Ende der Behandlung (Δ score) ermittelt (A). Vor Beginn der Behandlung wurden den Tieren PBMC Proben entnommen und mittels qPCR die mRNA Expression funktioneller NK-Zell Rezeptoren analysiert (B) und mit dem Δ score korreliert (C) (repräsentativ dargestellt für Nkg2c und Klrb1c). Relative Expression entspricht 2^- Δ Ct Werten, normalisiert zu *Gapdh*.

Diese Beobachtungen bestätigen die Ergebnisse der Microarray-Analyse und legen einen Zusammenhang zwischen dem Status/der Anzahl der NK-Zellen in ICAM-1^{-/-} NOD Mäusen und dem Therapieerfolg einer Behandlung mit Immunglobulinen nahe, welcher in dieser Arbeit untersucht werden soll.

2 Einfluss von Immunglobulinen auf murine und humane NK-Zellen *in vitro*

Um einen Hinweis darauf zu bekommen, ob die Ergebnisse des ICAM-1^{-/-} NOD Tiermodells eine mögliche Projektion auf die humane Situation zulassen, wurde überprüft, welche Wirkung eine Inkubation mit humanen Immunglobulinen auf murine NK-Zellen hat, und ob diese den Effekten auf humane NK-Zellen entspricht. Gleichzeitig sollen die Versuche Hinweise darauf liefern, wie NK-Zellen an der IVIg-vermittelten Regulation der peripheren Neuropathie beteiligt sein könnten. Dazu wurden sowohl humane, als auch murine PBMC (für engl. "Peripheral Blood Mononuclear Cells") *in vitro* mit verschiedenen Konzentrationen humaner IgG inkubiert und mittels Durchflusszytometrie die dadurch induzierten Änderungen der Proteinexpression funktioneller NK-Zell Rezeptoren und der NK-Zell Aktivität analysiert.

2.1 Eine *in vitro* Inkubation mit Immunglobulinen hat vergleichbare Effekte auf die Rezeptorexpression humaner und muriner NK-Zellen

Um die Auswirkungen einer Inkubation mit Immunglobulinen auf die Oberflächenexpression humaner und muriner NK-Zellen vergleichen zu können, wurden NK-Zell Rezeptoren untersucht für welche Homologe in beiden Organismen existieren. Bei denen im Microarray des Mausmodells auffällig gewordenen NK-Zell Rezeptoren wurde der Effekt der in vitro Inkubation auf die Expression von NKG2A untersucht. Des Weiteren wurden Änderungen in den Expressionen von NKP46 (auch bezeichnet als CD335) und CD16 analysiert. Sowohl in murinen CD3⁻ CD335⁺ NK-Zellen als auch in humanen CD3⁻ CD56⁺ NK-Zellen führt die Inkubation mit Immunglobulinen zu Änderungen in der Expression membranständiger Rezeptoren (Abb. II-2). In NK-Zellen beider Organismen wird mit zunehmender IVIg-Konzentration eine Abnahme der CD335 Expression festgestellt. Dabei zeigen murine im Vergleich zu humanen Zellen erst bei einer 4-fach erhöhten IVIg-Konzentration eine vergleichbare Abnahme der Expression. Die in humanen Proben beobachtete IVIg-bedingte Zunahme der NKG2A exprimierenden NK-Zellen kann in murinen Proben jedoch nicht festgestellt werden. Sowohl in murinen als auch in humanen NK-Zellen induziert IVIg eine starke Reduktion der detektierten Menge CD16. Dabei zeigen humane Proben erneut bereits bei geringeren Konzentrationen einen stärkeren Effekt.





Aufgereinigte PBMC-Proben von 12 ICAM-1^{-/-} NOD Mäusen ohne Krankheitssymptome und 6 humanen gesunden Spendern wurden ohne oder mit verschiedenen Konzentrationen von Immunglobulinen inkubiert (eingesetzte Konzentrationen IVIg in mg/ml, murin: 5; 10; 20 human: 0,1; 0,5; 1; 5) und anschließend mittels Durchflusszytometrie analysiert. Dabei wurde zunächst die Lymphozytenpopulation anhand ihrer bekannten Größe und Granularität in der SSC/FSC-Darstellung bestimmt. Über die Oberflächenfärbung des T-Zell-Markers CD3 und der NK-Zell Marker CD56 in humanen bzw. CD335 in murinen Proben wurden NK-Zellen innerhalb dieser als CD56⁺CD3⁻ bzw. CD335⁺CD3⁻ identifiziert. Innerhalb der NK-Zell Population wurde die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) der eingesetzten Fluorophor-markierten Antikörper gegen CD335 und CD161 ermittelt. Über weitere Antikörper-färbungen wurden die Anteile CD16 oder NKG2A exprimierender NK-Zellen bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte der untersuchten Tiere/Probanden mit Standardfehler (SEM).

Ein weiterer NK-Zell Rezeptor, welcher durch die Microarray-Analyse des Tiermodells auffällig geworden war, ist der aktivierende Rezeptor NKR-P1C. In murinen Proben wurde der Einfluss von IVIg auf die Oberflächenxpression von NKR-P1C nicht überprüft, da für die von der Mauslinie exprimierte Proteinvariante kein kommerzieller Antikörper für die durchflusszytometrische Analyse existiert. Das einzige humane Homolog der murinen NKR-P1 Rezeptorfamilie ist der inhibitorische Rezeptor CD161 (Aldemir, Prod'homme et al. 2005). Humane NK-Zellen zeigen bei einer geringen IVIg-Konzentrationen zunächst eine Zunahme der CD161-Expression, welche bei einer Erhöhung der Konzentration wieder leicht zurückgeht. Die Inkubation mit Immunglobulinen hat keinen Einfluss auf die Größe der NK-Zell Populationen oder die Anteile von CD56^{dim} und CD56^{bright} NK-Zellen (Daten nicht gezeigt).

2.2 Immunglobuline senken das zytotoxische und regulatorische Potential humaner und muriner NK-Zellen *in vitro*

Die Auswirkungen von IVIg auf die Aktivität von NK-Zellen wurden untersucht, indem humane und murine PBMC nach *in vitro* Inkubation mit Immunglobulinen durch eine Ko-Kultur mit NK-Zielzellen stimuliert, und ihre zytotoxische Aktivität und Zytokinproduktion gemessen wurden. Als Maß für die zytotoxische Aktivität wurde dazu die Oberflächenfärbung des lysosomal assoziierten Membranproteins 1 (LAMP-1/CD107) gemessen, welches bei der Degranulation zytotoxischer Vesikel an die Zelloberfläche gelangt (Bryceson, March et al. 2005). Die Zytokinproduktion wurde durch eine intrazelluläre Färbung von IFN- γ und TNF- α ermittelt. Als Kontrolle dienten unstimulierte PBMC-Kulturen welche ohne NK-Zielzellen kultiviert wurden. Die Differenz zwischen stimulierter und unstimulierter NK-Zell Aktivität wird im weiteren Verlauf der Arbeit als zytotoxisches bzw. regulatorisches Potential der NK-Zellen bezeichnet.

In murinen Proben führt die Inkubation mit humanen IgG zu einer Abnahme der NK-Zellen, welche lysosomale Vesikel gegen NK-Zielzellen ausschütten. Der Anteil CD107 positiver NK-Zellen nimmt bei einer IVIg Konzentration von 5 mg/ml signifikant ab (ohne IVIg: 19,55 % ± 1,64; 5 mg/ml IVIg: 13,57 % ± 0,65; p = 0,0004)(Abb. II-3). Im Gegensatz dazu steigt die Degranulation von NK-Zellen in PBMC-Kulturen ohne NK-Zielzellen bei 5 mg/ml IVIg signifikant an (ohne IVIg: 4,58 % ± 0,50; 5 mg/ml IVIg: 6,69 % ± 0,42; p = 0,0012). In humanen Proben führt eine Inkubation mit Immunglobulinen nur zu einer geringen Hemmung der zytotoxischen Aktivität stimulierter NK-Zellen. Ähnlich murinen Proben, zeigen unstimulierte

humane NK-Zellen, bei einer Inkubation mit 5 mg/ml IVIg, einen starken Anstieg der zytotoxischen NK-Zell Aktivität (ohne IVIg: 7,44 % \pm 1,18; 5 mg/ml IVIg: 42,32 % \pm 2,59; *p* < 0,0001).



Abbildung II-3: Einfluss einer *in vitro* Inkubation mit Immunglobulinen auf die Zytokinproduktion und zytotoxische NK-Zell Aktivität in murinen und humanen PBMC

PBMC von 12 ICAM-1^{-/-} NOD Mäusen ohne Krankheitssymptome und 6 humanen gesunden Spendern wurden ohne oder mit verschiedenen Konzentrationen von Immunglobulinen inkubiert (eingesetzte Konzentrationen in mg/ml, murin: 5; 10; 20 human: 0,1; 0,5; 1; 5). Durch eine Ko-Kultur mit NK-Zielzellen (murin: YAC-1; human: K562) wurde die NK-Zell Aktivität stimuliert, in unstimulierten Proben wurde die Ausgangsaktivität ermittelt. Als Maß für die zytotoxische NK-Zell Aktivität wurde die Degranulation lysosomaler Vesikel durch eine Analyse der CD107 Oberflächenexpression innerhalb der NK-Zell Population ermittelt. Die Produktion von Zytokinen wurde in NK-Zellen durch eine intrazelluläre Antikörperfärbung der Zytokine IFN-γ und TNF-α gemessen. Das NK-Zell Potential stellt die Differenz der stimulierten und unstimulierten PBMC-Kulturen dar (ΔNK-Zell Aktivität). Dargestellt sind die Mittelwerte der untersuchten Tiere/Probanden mit SEM. In stimulierten murinen Proben kommt es durch eine Inkubation mit IVIg zu einer Abnahme des Anteils zytokinproduzierender NK-Zellen (ohne IVIg: 13,83 % ± 1,53; 10 mg/ml IVIg: 9,38 % ± 1,09; p = 0,003). Die Zytokinproduktion muriner NK-Zellen wird in unstimulierten Proben durch IVIg nur wenig beeinflusst. In stimulierten humanen Proben sinkt der Anteil zytokinproduzierender NK-Zellen durch die Zugabe von Immunglobulinen ebenfalls (ohne IVIg: 33,08 % ± 3,00; 1 mg/ml IVIg: 23,61 % ± 3,26; p = 0,0056). In unstimulierten humanen Proben führt IVIg dagegen zu einem Anstieg des Anteils zytokinproduzierender NK-Zellen (ohne IVIg: 3,95 % ± 0,50; 5 mg/ml IVIg: 19,04 % ± 2,75; p = 0,0016).

Sowohl in murinen, als auch humanen Proben führen die beschriebenen Effekte zu einer konzentrationsabhängigen Reduktion des NK-Zell Potentials (Abb. II-3). Das zytotoxische NK-Zell Potential sinkt durch die Inkubation mit Immunglobulinen in murinen Proben um etwa die Hälfte (ohne IVIg: 14,97 % ± 1,35; 5 mg/ml IVIg: 6,88 % ± 0,48; p < 0,0001) und in humanen Proben um etwa das 3,5-fache (ohne IVIg: 51,97 % ± 2,24; 5 mg/ml IVIg: 14,41 % ± 0,89; p < 0,0001). Das regulatorische Potential sinkt durch IVIg in murinen NK-Zellen ebenfalls um etwa die Hälfte (ohne IVIg: 9,54 % ± 1,17; 10 mg/ml IVIg: 4,36 % ± 0,66; p = 0,001) und in humanen NK-Zellen um etwa das 4-fache (ohne IVIg: 29,13 % ± 2,91; 1 mg/ml IVIg: 7,6 % ± 1,37; p = 0,0002).

Qualitativ weisen die Auswirkungen einer Inkubation mit humanem IgG auf murine und humane NK-Zellen ähnliche Tendenzen auf.

3 Effekte einer IVIg-Behandlung auf die NK-Zellen von Patienten mit CIDP

Die Ergebnisse der vorangegangenen Versuche legen nahe, dass NK-Zellen bei der IVIg-Therapie von Autoimmunerkrankungen des PNS eine wichtige Rolle spielen könnten. Im Folgenden soll überprüft werden, welche Auswirkungen eine IVIg-Behandlung von Patienten mit CIDP auf die NK-Zell Population der Patienten hat, und ob sich die *in vitro* Daten bestätigen. Dazu wurde Patienten mit CIDP unmittelbar vor und 24 h nach der ersten IVIg-Gabe Blutproben entnommen, und diese mittels qPCR und Durchflusszytometrie hinsichtlich ihrer Expression von NK-Zell Markern und NK-Zell Aktivität analysiert. Des Weiteren wurde untersucht, ob mögliche Effekte über die komplette Dauer eines Behandlungszyklus anhalten oder vorher wieder auf das Ausgangsniveau zurückfallen. Dazu wurden weitere Proben unmittelbar vor einer nachfolgenden IVIg-Gabe entnommen und analysiert.

3.1 IVIg reduziert den Anteil typischer NK-Zell Transkripte im peripheren Blut

Die Korrelation zwischen der IVIg-Therapieeffizienz und der Expression von NK-Zell Genen im ICAM-1^{-/-} NOD Tiermodell deutet auf eine Beteiligung der NK-Zell Population am Wirkmechanismus einer IVIg-Behandlung. Deshalb wurde im Folgenden zunächst untersucht, welche Auswirkungen eine IVIg-Behandlung auf die Expression von NK-Zellen in Patienten mit CIDP hat. Dazu wurden in PBMC-Proben vor und 24 h nach der ersten IVIg-Gabe mittels qPCR die relative mRNA Expression verschiedener NK-Zell Gene verglichen. Es wurden folgende NK spezifischen Gene untersucht:

- humane Homologe von Genen, die in Microarray und qPCR muriner Proben auffielen: NKG2A, NKG2C, NKR-P1 (CD161), sowie weitere Mitglieder dieser Rezeptorfamilien: NKG2D, NKG2F, KLRD1 (CD94)
- das Zell-Adhäsions Molekül NCAM1 (CD56), anhand dessen Oberflächenexpression humane NK-Zellen identifiziert werden
- *NKP46* (CD335), das in der *in vitro* Inkubation eine starke Modulation der Expression durch Immunglobuline zeigt

Abbildung II-4 zeigt repräsentativ die Änderungen der Expression von *CD335*, *NKG2C* und *CD161*. Die relative Expression von *CD335* nimmt nach der ersten IVIg-Gabe in 15 von 16 untersuchten Patienten ab, nur in einem steigt sie an. Im Durchschnitt sinkt die relative Expression in den untersuchten Patienten nach IVIg um 36,4 % \pm 4,99 (p = 0,0002). Die relative Expression von *NKG2C* sinkt in 13 und steigt in vier untersuchten Patienten. Die Abnahme beträgt durchschnittlich 28,3 % \pm 8,5 (p = 0,0151). Die relative *CD161* Expression sinkt in neun und steigt in acht untersuchten Patienten, so dass insgesamt keine signifikante Änderung festzustellen ist. Neben den dargestellten Genen zeigt die qPCR Analyse eine signifikante Abnahme der relativen mRNA Expression der Gene *NKG2F*, *CD94*, und *CD56* im peripheren Blut von Patienten mit CIDP nach der Behandlung mit IVIg. Die *NKG2A* Expression zeigt ebenfalls einen Abwärtstrend, während *NKG2D* im Durchschnitt aller Patienten keine Änderung aufweist. Die Werte der IVIg-induzierten Expressionsänderungen aller untersuchten Gene sind in Tabelle II-1 auf Seite 45 dargestellt.





17 Patienten mit CIDP wurden unmittelbar vor und 24 h nach der ersten IVIg-Gabe Blutroben entnommen und diese mittels qPCR auf Änderungen in der relativen mRNA Expression typischer NK-Zell Gene analysiert. Dargestellt sind 2^- Δ Ct Werte, normalisiert zu *GAPDH*. * indizieren Signifikanz der Änderung (p < 0.05 = *; p < 0.01 = **; p < 0.001 = ***; n.s. = nicht signifikant). Signifikanzen wurden mittels eines gepaarten t-Tests berechnet.

3.2 IVIg führt zu einer Reduktion der CD56^{dim} NK-Zell Subpopulation in den PBMC von Patienten mit CIDP

Um zu überprüfen, ob die IVIg-Behandlung der Patienten mit CIDP zu einer generellen Reduktion der NK-Zellen führt, wurde der Anteil der NK-Zell Population an den Lymphozyten in PBMC-Proben vor und 24 h nach der ersten IVIg-Gabe mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Dabei zeigen alle untersuchten Patienten eine IVIg-induzierte Reduktion der CD3⁻ CD56⁺ NK-Zell Population um durchschnittlich 39,4 % ± 5,3 (p = 0,0015)(Abb. II-5). Der durchschnittliche Anteil der NK-Zellen an der Lymphozytenpopulation sinkt dabei von 15,6 % ± 2,5 auf 9 % ± 1,4 (Abb. II-6A). Um eine Expansion einer weiteren Lymphozytenpopulation, als mögliche Ursache für den beobachteten Effekt, auszuschließen, wurden zusätzlich die Auswirkungen der IVIg-Infusion auf die Anteile der CD3⁺ T-Zellen und CD19⁺ B-Zellen untersucht. Dabei zeigen sich weder für die Anteile der T-, noch für die Anteile der B-Zellen, an der Lymphozytenpopulation Änderungen nach der IVIg-Gabe (Abb. II-5). Auch das Verhältnis der Lymphozyten- zur Monozytenpopulation bleibt nach einer IVIg Gabe stabil.



Abbildung II-5: Änderungen der Lymphozytenpopulation in PBMC von Patienten mit CIDP, 24 h nach der ersten IVIg-Gabe

14 Patienten mit CIDP wurden unmittelbar vor und 24 h nach der ersten IVIg-Gabe PBMC Proben entnommen und diese mittels Durchflusszytometrie auf Änderungen in den Anteilen der T-, B- und NK-Zellen an der Lymphozytenpopulation analysiert. T-Zellen wurden als $CD3^+$, B-Zellen als $CD19^+$ und NK-Zellen als $CD3^-$ CD56⁺ Lymphozyten definiert. * indizieren Signifikanz der Änderung (p < 0.05 = *; p < 0.01 = **; p < 0.001 = ***; n.s. =nicht signifikant). Signifikanzen wurden mittels eines gepaarten t-Tests berechnet.

Eine weitere Analyse der NK-Zell Population zeigt, dass sich die Reduktion der NK-Zellen im peripheren Blut hauptsächlich auf die CD56^{dim} Subpopulation bezieht (Abb. II-6A). Die CD56^{bright} Subpopulation zeigt, als Anteil der Lymphozytenpopulation, lediglich eine leichte Abnahme (vor IVIg: 0,85 % ± 0,23; 24 h nach IVIg: 0,73 % ± 0,21; p = 0,0323)(Abb. II-6B). Dadurch steigt der Anteil der CD56^{bright} NK-Zellen an der gesamt NK-Zell Population (vor IVIg: 6,8 % ± 1,5; 24 h nach IVIg: 10,3 % ± 2,3; p = 0,0088)(Abb. II-6C). Der Anteil der CD16⁺ NK-Zellen, das hauptsächlich auf CD56^{dim} NK-Zellen exprimiert wird (Abb. II-6D), nimmt nach einer IVIg-Gabe, sowohl im Verhältnis zur Lymphozytenpopulation (vor IVIg: 13,3 % ± 2,2; 24 h nach IVIg: 7,4 % ± 1,2; p = 0,0019)(Abb. II-6E), als auch zur gesamt NK-Zell Population (vor IVIg: 84,2 % ± 2,6; 24 h nach IVIg: 80,3 % ± 2,7; p = 0,0499)(Abb. II-6F) ab. NKG2A wird auf allen Zellen der CD56^{bright} Subpopulation, aber nur teilweise auf CD56^{dim} NK-Zellen an der Lymphozytenpopulation nach einer IVIg-Gabe ab (vor IVIg: 6,69 % ± 1,07; 24 h nach IVIg:

4,45 % ± 0,79; p = 0,0019)(Abb. II-6H). Im Verhältnis zur NK-Zell Population steigt der Anteil NKG2A exprimierender Zellen nach einer IVIg-Gabe (vor IVIg: 43,6 % ± 2,7; 24 h nach IVIg: 48,8 % ± 3,4; p = 0,0056)(Abb. II-6I). Der Anteil CD335 positiver NK-Zellen und die Expression von CD161 zeigen bei Patienten mit CIDP keine Änderung nach der IVIg-Behandlung (Daten nicht gezeigt).



Abbildung II-6: Änderungen der NK-Zell Population in PBMC von Patienten mit CIDP, 24 h nach der ersten IVIg-Gabe

14 Patienten mit CIDP wurden unmittelbar vor und 24 h nach der ersten IVIg-Gabe PBMC-Proben entnommen und diese mittels Durchflusszytometrie auf Änderungen der NK-Zell Population analysiert. (A) Anteile CD56^{bright} und CD56^{dim} NK-Zell Subpopulationen an der Lymphozytenpopulation. Dargestellt sind die Mittelwerte der untersuchten Patienten mit SEM. (B) Anteile CD56^{bright} NK-Zellen an der Lymphozytenpopulation. (C) Anteil CD56^{bright} NK-Zellen an der gesamt NK-Zell Population. (D) Repräsentatives FACS Diagramm der CD16 Expression in CD56^{bright} und CD56^{dim} NK-Zellen. Zahlen innerhalb der Quadranten geben Anteile in % wieder. (E) Anteile CD16⁺ NK-Zellen an der Lymphozytenpopulation. (F) Anteile CD16⁺ NK-Zellen an der gesamt NK-Zell Population. (G) Repräsentatives FACS Diagramm der NKG2A Expression in CD56^{bright} und CD56^{dim} NK-Zellen. Zahlen innerhalb der Quadranten geben Anteile in % wieder. (H) Anteil NKG2A⁺ NK-Zellen an der Lymphozytenpopulation. (I) Anteil NKG2A⁺ NK-Zellen an der gesamt NK-Zell Population. * indizieren Signifikanz der Änderung (p < 0.05 = *; p < 0.001 = **; p < 0.001 = ***). Signifikanzen wurden mittels eines gepaarten t-Tests berechnet.

3.3 Eine IVIg-Behandlung hat nur geringen Einfluss auf die *ex vivo* NK-Zell Aktivität

Die IVIg-induzierte Abnahme der CD56^{dim} NK-Zell Subpopulation legt nahe, dass es durch eine IVIg-Behandlung auch zu einer Änderung der NK-Zell Aktivität im peripheren Blut von Patienten mit CIDP kommt. Mittels *in vitro* Aktivitätstest wurden daher die Auswirkungen einer IVIg-Gabe auf die zytotoxische Aktivität und die Zytokinproduktion von NK-Zellen analysiert. Für die zytotoxische NK-Zell Aktivität können in den untersuchten Proben dabei nur tendenzielle Veränderungen nach einer IVIg-Behandlung festgestellt werden (Abb. II-7A): Mit NK-Zielzellen stimulierte Proben zeigen nach IVIg eine Tendenz zu weniger, unstimulierte Proben zu erhöhter zytotoxischer Aktivität. Auch die analysierte Zytokinproduktion von NK-Zellen ändert sich nur geringfügig durch die IVIg-Behandlung. Hier zeigen stimulierte NK-Zellen ebenfalls einen tendenziellen Rückgang der Zytokinproduktion nach IVIg. Unstimulierte NK-Zellen zeigen jedoch eine IVIg-induzierte Abnahme der Zytokinproduktion (vor IVIg: 6,81 % ± 1,59; 24 h nach IVIg: 4,67 % ± 1,29; *p* = 0,0349)(Abb. II-7B).





14 Patienten mit CIDP wurden unmittelbar vor und 24 h nach der ersten IVIg-Gabe PBMC Proben entnommen und diese mittels *in vitro* NK-Zell Aktivitätstest analysiert. Durch eine Ko-Kultur mit der Zelllinie K562 wurde NK-Zell Aktivität stimuliert, in unstimulierten Proben wurde die Ausgangsaktivität ermittelt. Als Maß für die zytotoxische NK-Zell Aktivität wurde die Degranulation lysosomaler Vesikel durch eine Analyse der CD107 Oberflächenexpression ermittelt (A). Die Produktion von Zytokinen wurde in NK-Zellen durch eine intrazelluläre Antikörperfärbung der Zytokine IFN- γ und TNF- α gemessen (B). * indizieren Signifikanz der Änderung (p < 0,05= *; p < 0,01 = **; p < 0,001 = ***). Signifikanzen wurden mittels eines gepaarten t-Tests berechnet. Dargestellt sind die Mittelwerte der untersuchten Patienten mit SEM.

3.4 Zum Ende eines Behandlungsintervalls steigt die mRNA Expression der NK-Zell Transkripte wieder auf ihr Ausgangsniveau an

Das Behandlungsintervall einer IVIg-Therapie von Patienten mit CIDP dauert zwischen drei und vier Wochen. Um zu untersuchen, ob die IVIg-induzierte Reduktion der NK-Zell Population über die gesamte Behandlungsdauer anhält oder ob sie zum Ende eines Behandlungsintervalls wieder ansteigt, wurden Proben unmittelbar vor einer nachfolgenden IVIg-Gabe entnommen und mittels qPCR analysiert. Erneut wurde dabei die relative mRNA Expression von NKG2A, NKG2C, NKG2D, NKG2F, CD56, CD94, CD161 und CD335 untersucht, und mit den zuvor ermittelten Werten verglichen. Abbildung II-8 zeigt repräsentativ die Expression von CD56, CD335 und NKG2C im Verlauf eines relative mRNA Behandlungsintervalls, jeweils normiert auf den Wert der IVIg-naïven Probe. Die drei dargestellten Gene zeigen die zuvor beschriebene Abnahme der relativen mRNA Expression 24 h nach der ersten IVIg-Gabe. In allen drei Genen lässt sich bis zum Ende des Behandlungsintervalls ein Wiederanstieg der relativen Expression beobachten. Die relative Expression von NKG2C steigt zum Ende des Behandlungsintervalls sogar signifikant über das Ausgangsniveau hinaus. Insgesamt steigt die relative Expression in sechs der acht untersuchten Gene im Zeitraum von 24 h nach der letzten bis unmittelbar vor der nächsten IVIg-Gabe signifikant an. In drei dieser Gene steigt die relative Expression am Ende des Behandlungsintervalls über das Expressionslevel der unbehandelten Proben hinaus. Bei den verbleibenden fünf untersuchten Genen befindet sich die relative Expression am Ende des Behandlungsintervalls auf dem gleichen Niveau wie in den IVIg-naïven Proben (Tab. II-1).



Abbildung II-8: Änderung der relativen mRNA Expression von NK-Zell Genen am Ende eines IVIg-Behandlungsintervalls in PBMC von Patienten mit CIDP

Patienten mit CIDP wurden am Ende eines IVIg-Behandlungsintervalls (unmittelbar vor einer nachfolgenden IVIg-Gabe) Blutproben entnommen und in diesen mittels qPCR die relative mRNA Expression typischer NK-Zell Gene analysiert. Die ermittelten Werte wurden mit Proben verglichen, die den Patienten unmittelbar vor und 24 h nach der ersten IVIg-Gabe entnommen wurden. Dargestellt ist die durchschnittliche Änderung der 2^- Δ Ct Werte zur IVIg-naïven Probe (mit SEM). * indizieren Signifikanz der Änderung (p < 0.05 = *; p < 0.01 = **; p < 0.001 = ***; n.s. = nicht signifikant). Signifikanzen wurden mittels eines gepaarten t-Tests berechnet.

Tabelle II-1: IVIg-induzierte Änderung der relativen mRNA Expression typischer NK-Zell Gene

Dargestellt ist die durchschnittliche Änderung der relativen mRNA Expression zwischen PBMC-Proben von Patienten mit CIDP die unmittelbar vor der ersten (naïv), 24 h danach oder am Ende eines Behandlungsintervalls (BI) entnommen wurden. Die Spalten "Sig." stellen die Signifikanz der jeweils vorangegangenen Änderung dar (p < 0.05 = *; p < 0.01 = **; p < 0.001 = ***; n.s. = nicht signifikant). Signifikanzen wurden mittels eines gepaarten t-Tests berechnet. n = 17 für "naïv – 24 h nach IVIg"; n = 10 für "24 h nach – Ende BI"; n = 16 für "naïv – Ende BI".

Transkript	Ø Änderung (%)							
	naïv – 24 h nach IVIg	Sig.	24 h nach – Ende Bl	Sig.	naïv – Ende Bl	Sig.		
CD56	- 30,4	**	+ 169,8	**	+ 52,1	n.s.		
CD94	- 31,1	***	+ 89,1	*	+ 42,9	*		
CD161	- 1,4	n.s.	+ 64,6	n.s.	+ 113,3	n.s.		
CD335	- 36,4	***	+ 137,0	**	+ 24,4	n.s.		
NKG2A	- 16,1	n.s.	+ 57,0	*	+ 65,5	**		
NKG2C	- 28,3	*	+ 128,4	***	+ 85,7	*		
NKG2D	+ 1,4	n.s.	+ 77,1	n.s.	+ 64,1	n.s.		
NKG2F	- 15,7	*	+ 67,3	*	+ 88,2	n.s.		

3.5 Reduktion und Wiederanstieg der mRNA Level von NK-Zell Transkripten wiederholt sich in jedem Behandlungsintervall

Einem Patienten mit CIDP wurden über einen Zeitraum von drei Behandlungsintervallen, jeweils unmittelbar vor und 24 h nach einer IVIg-Gabe, Proben entnommen und mittels qPCR analysiert. Dabei zeigt sich, dass sich die beobachteten Effekte einer IVIg-Behandlung auf die NK-Zellen bei diesem Patienten bei jedem Behandlungsintervall wiederholen. Abbildung II-9 zeigt repräsentativ den Verlauf der relativen Expression normiert auf den Wert der IVIg-naïven Probe für *CD56*, *NKG2A* und *NKG2C*. Die zuvor beschriebene Abnahme der relativen Expression 24 h nach der ersten und der Anstieg bis unmittelbar vor der nächsten IVIg-Gabe wiederholt sich in allen untersuchten Behandlungsintervallen.



Abbildung II-9: Änderung der relativen mRNA Expression von NK-Zell Genen in PBMC eines Patienten mit CIDP über vier IVIg-Behandlungsintervalle

Einem Patienten mit CIDP wurden über die Dauer von vier Behandlungsintervallen jeweils unmittelbar vor und 24 h nach einer IVIg-Gabe Blutproben entnommen, und in diesen mittels qPCR die relative mRNA Expression typischer NK-Zell Gene analysiert. Dargestellt ist die Änderung der 2^- Δ Ct Werte (normalisiert zu *GAPDH*) zur IVIg-naïven Probe. Pfeile indizieren den Zeitpunkt einer IVIg-Gabe.

Die Ergebnisse zeigen, dass IVIg im peripheren Blut von Patienten mit CIDP innerhalb von 24 h eine Reduktion hauptsächlich zytotoxischer NK-Zellen induziert, welche bis zur nachfolgenden IVIg-Gabe wieder auf das Ausgangsniveau ansteigt. Beobachtungen in einem Patienten suggerieren, dass sich diese IVIg-Effekte in jedem Behandlungsintervall wiederholen.

4 Zusammenhang zwischen dem NK-Zell Status vor Behandlungsbeginn und der Effizienz einer IVIg-Therapie in Patienten mit CIDP

Im ICAM-1^{-/-} NOD Tiermodell der peripheren Neuropathie wurde beobachtet, dass Tiere, die auf eine Therapie mit Immunglobulinen ansprechen, bereits vor Behandlungsbeginn eine höhere relative mRNA Expression mehrerer typischer NK-Zell Gene aufweisen als Tiere, die trotz Therapie eine Zunahme der Krankheitssymptome zeigen. Im Folgenden wurde untersucht, ob sich die Beobachtung aus dem Tiermodell direkt auf die humane Situation übertragen lässt, und ob sich der Effekt als Unterschied in der Größe der NK-Zell Population oder ihrer Expression feststellen lässt. Zusätzlich wurde überprüft, ob sich die NK-Zellen von Patienten, die auf eine IVIg-Therapie ansprechen und von therapierefraktären Patienten in ihrer Aktivität unterscheiden. Eine *in vitro* Inkubation mit Immunglobulinen sollte zudem zeigen, ob sich die Therapieeffizienz bei Patienten mit CIDP bereits vor Beginn der Behandlung in den Effekten auf die NK-Zell Population widerspiegelt.

4.1 Therapierefraktäre und -respondierende Patienten mit CIDP zeigen vor Beginn der IVIg-Behandlung keine Unterschiede in der mRNA Expression von NK-Zell Markern

Zunächst wurde überprüft, ob Patienten mit CIDP, die auf eine IVIg-Therapie ansprechen, vor Behandlungsbeginn eine höhere relative mRNA Expression von NK-Zell Genen im peripheren Blut aufweisen als therapierefraktäre Patienten. Dazu wurden PBMC Proben von IVIg-naïven Patienten mit CIDP mittels qPCR analysiert. Anhand ihres Ansprechens auf die IVIg-Therapie wurden die Patienten in die Gruppen "Responder" und "Non-Responder" unterteilt und die ermittelten Expressionswerte verglichen. Repräsentativ werden in Abbildung II-10 die Werte der relativen Expression für *NKG2A*, *NKG2C* und *CD161* gezeigt, und den entsprechenden Werten der murinen Homologe aus Abschnitt 1.1 gegenübergestellt. Während im Mausmodell eine erhöhte relative mRNA Expression der homologen Gene in respondierenden Tieren zu beobachten ist, kann im humanen System bei keinem der untersuchten Gene ein Expressionsunterschied zwischen den beiden Gruppen festgestellt werden (Responder n = 18; Non-Responder n = 11).



Abbildung II-10: Vergleich der relativen mRNA Expression von NK-Zell Genen zwischen respondierenden und therapierefraktären Patienten mit CIDP vor Beginn einer IVIg-Behandlung

Patienten mit CIDP wurden unmittelbar vor Beginn einer IVIg-Behandlung Blutproben entnommen und mittels qPCR die relative mRNA Expression von NK-Zell Genen analysiert. Anhand des Therapieerfolgs wurden die Patienten den Gruppen Responder (n = 18) oder Non-Responder (n = 11) zugeteilt. Zur Veranschaulichung wurden die qPCR Werte des ICAM-1^{-/-} NOD Tiermodells ebenfalls in den Gruppen zusammengefasst, und den humanen Werten gegenübergestellt. Dargestellt sind 2^- Δ Ct Mittelwerte mit SEM, normalisiert zu *GAPDH/ACTB*. Signifikanzen wurden mittels eines ungepaarten t-Tests ermittelt.

4.2 Responder und Non-Responder zeigen vor der ersten IVIg-Gabe keine Unterschiede in der Größe und Expression der NK-Zell Population

Um zu überprüfen, ob ein Zusammenhang zwischen der Therapieeffizienz einer IVIg-Behandlung von Patienten mit CIDP und der Größe oder Expression der NK-Zell Population im peripheren Blut besteht, wurden IVIg-naïve Proben durchflusszytometrisch analysiert und anhand des Ansprechens des Patienten auf die Therapie unterteilt und verglichen. Gemessen wurde die Größe der NK-Zell Population, die Anteile der CD56^{bright} und CD56^{dim} Subpopulationen sowie die Expression von CD16, NKG2A, CD161 und CD335. Wie schon für die Werte der qPCR Analyse, können auch beim Vergleich der Oberflächenexpression zwischen Therapie-Respondern und Non-Respondern keine Unterschiede festgestellt werden (Abb. II-11). (Responder n = 12; Non-Responder n = 9).



Abbildung II-11: Vergleich der Expression und Größe der NK-Zell Population zwischen respondierenden und therapierefraktären Patienten mit CIDP vor Beginn einer IVIg-Behandlung

Patienten mit CIDP wurden unmittelbar vor Beginn einer IVIg-Behandlung PBMC Proben entnommen und mittels Durchflusszytometrie die Größe und Oberflächenexpression der NK-Zell Population analysiert. Anhand des Therapieerfolgs wurden die Patienten den Gruppen Responder (n = 12) oder Non-Responder (n = 9) zugeteilt. Dargestellt sind Mittelwerte mit SEM. MFI = mittlere Fluoreszenzintensität.

ERGEBNISSE

4.3 Responder und Non-Responder zeigen vor Beginn der IVIg-Therapie nur tendenzielle Unterschiede in der NK-Zell Aktivität

Um mögliche Unterschiede in der NK-Zell Aktivität zwischen Patienten mit CIDP, die auf eine IVIg-Therapie ansprechen und therapierefraktären Patienten zu untersuchen, wurden IVIgnaïve PBMC-Proben mittels *in vitro* NK-Zell Aktivitätstest analysiert, und anhand des Ansprechens des Patienten auf die Therapie unterteilt und verglichen. Dazu wurden die PBMC durch eine Ko-Kultur mit NK-Zielzellen stimuliert, und die NK-Zell Aktivität durch Oberflächenfärbung von CD107 und intrazelluläre Färbung von IFN- γ und TNF- α gemessen. Als Kontrollwert diente eine Kultur der PBMC, die nicht mit NK-Zielzellen stimuliert wurde. Es zeigen sich keine signifikanten Unterschiede der NK-Zell Aktivität zwischen den IVIg-naïven Proben von respondierenden und nicht respondierenden Patienten mit CIDP. Sowohl für die zytotoxische NK-Zell Aktivität, als auch für die Produktion von Zytokinen werden in stimulierten Proben von nicht respondierenden Patienten jedoch tendenziell geringere Werte gemessen, als in den Proben von respondierenden Patienten (Abb. II-12).



Abbildung II-12: Vergleich der NK-Zell Aktivität zwischen respondierenden und therapierefraktären Patienten mit CIDP vor Beginn einer IVIg-Behandlung

Patienten mit CIDP wurden unmittelbar vor Beginn einer IVIg-Behandlung PBMC Proben entnommen, und diese mittels *in vitro* NK-Zell Aktivitätstest analysiert. Durch eine Ko-Kultur mit der Zelllinie K562 wurde NK-Zell Aktivität stimuliert, in unstimulierten Proben wurde die Ausgangsaktivität ermittelt. Als Maß für die zytotoxische NK-Zell Aktivität wurde die Degranulation lysosomaler Vesikel durch eine Analyse der CD107 Oberflächenexpression ermittelt. Die Produktion von Zytokinen wurde in NK-Zellen durch eine intrazelluläre Antikörperfärbung der Zytokine IFN- γ und TNF- α gemessen. Anhand des Therapieerfolgs wurden die Patienten den Gruppen Responder (n = 12) oder Non-Responder (n = 9) zugeteilt. Dargestellt sind die Mittelwerte mit SEM von drei unabhängigen Experimenten mit jeweils vier Respondern und drei Non-Respondern. Signifikanzen wurden mittels eines ungepaarten t-Tests ermittelt.

4.4 NK-Zellen von Respondern und Non-Respondern zeigen keine Unterschiede im Ansprechen auf eine *in vitro* Inkubation mit Immunglobulinen

Wie unter Punkt 2 beschrieben, hat eine *in vitro* Inkubation von PBMC mit Immunglobulinen Einfluss auf die Expression und Aktivität humaner NK-Zellen. Untersucht wurde ob IVIg-naïve NK-Zellen von respondierenden und nicht respondierenden Patienten unterschiedlich auf eine *in vitro* Inkubation mit Immunglobulinen ansprechen. Ein potenzieller Unterschied könnte dann bereits vor Therapiebeginn als Surrogat für einen Behandlungserfolg genutzt werden. Dazu wurden PBMC-Proben, die den Patienten vor der ersten IVIg-Gabe entnommen wurden, in Kultur mit unterschiedlichen Konzentrationen Immunglobulinen inkubiert und mittels Durchflusszytometrie und *in vitro* NK-Zell Aktivitätstest analysiert. Untersucht wurden dabei die Auswirkungen einer Inkubation mit 0,1 mg/ml und 1 mg/ml Immunglobulinen auf die Oberflächenexpression von CD161, CD335, NKG2A und CD16, die zytotoxische NK-Zell Aktivität und auf die Zytokinproduktion.



Abbildung II-13: Vergleich des *in vitro* IVIg-Effekts auf die NK-Zell Expression zwischen respondierenden und therapierefraktären Patienten mit CIDP vor Beginn einer IVIg-Behandlung

Patienten mit CIDP wurden unmittelbar vor Beginn ihrer IVIg-Behandlung PBMC Proben entnommen und *in vitro* ohne oder mit 0,1 oder 1 mg/ml IgG inkubiert. Anschließend wurde die Oberflächenexpression der NK-Zell Population mittels Durchflusszytometrie analysiert. Anhand des Therapieerfolgs wurden die Patienten den Gruppen Responder (n = 12) oder Non-Responder (n = 9) zugeteilt. Dargestellt sind die Mittelwerte mit SEM von drei unabhängigen Experimenten mit jeweils vier Respondern und drei Non-Respondern. Signifikanzen wurden mittels eines ungepaarten t-Tests ermittelt. MFI = mittlere Fluoreszenzintensität.

Es zeigen sich in ähnlicher Ausprägung die bereits beschriebenen Effekte der *in vitro* Inkubation mit Immunglobulinen auf die Rezeptorexpression von NK-Zellen: Sowohl für CD16, als auch CD335 ist eine Reduktion, für NKG2A und CD161 ein leichter Anstieg der Oberflächenexpression bei zunehmender IVIg-Konzentration zu beobachten (Abb. II-13). Allerdings zeigen sich dabei keine signifikanten Unterschiede zwischen den Proben respondierender und nicht respondierender Patienten.

Auch die zuvor beschriebenen Effekte einer *in vitro* Inkubation mit Immunglobulinen auf die NK-Zell Aktivität werden in den PBMC-Proben von Patienten mit CIDP beobachtet: Durch IVIg kommt es zu einer Hemmung der zytotoxischen Aktivität und Zytokinproduktion, welche von NK-Zellen als Antwort auf eine Stimulation mit NK-Zielzellen generiert wird (Abb. II-14). Gleichzeitig induziert IVIg in unstimulierten NK-Zellen eine erhöhte zytotoxische Aktivität und Zytokinproduktion. Es können jedoch keine signifikanten Unterschiede in der Ausprägung der IVIg-induzierten Effekte zwischen Respondern und Non-Respondern festgestellt werden.





Patienten mit CIDP wurden unmittelbar vor Beginn einer IVIg-Behandlung PBMC Proben entnommen, *in vitro* ohne oder mit 0,1 oder 1 mg/ml IgG inkubiert und mittels *in vitro* NK-Zell Aktivitätstest analysiert. Durch eine Ko-Kultur mit der Zelllinie K562 wurde NK-Zell Aktivität stimuliert, in unstimulierten Proben wurde die Ausgangsaktivität ermittelt. Als Maß für die zytotoxische NK-Zell Aktivität wurde die Degranulation lysosomaler Vesikel durch eine Analyse der CD107 Oberflächenexpression ermittelt. Die Produktion von Zytokinen wurde in NK-Zellen durch eine intrazelluläre Antikörperfärbung der Zytokine IFN- γ und TNF- α gemessen. Anhand des Therapieerfolgs wurden die Patienten den Gruppen Responder (n = 12) oder Non-Responder (n = 9) zugeteilt. Dargestellt sind die Mittelwerte mit SEM von drei unabhängigen Experimenten mit jeweils vier Respondern und drei Non-Respondern. Signifikanzen wurden mittels eines ungepaarten t-Tests ermittelt.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass sich bei Patienten mit CIDP vor Beginn einer IVIg-Behandlung der Phänotyp und die Funktion der NK-Zell Population nicht zwischen therapierespondierenden und -refraktären Patienten unterscheidet. Zudem spiegelt sich das unterschiedliche Ansprechen der Patienten auf eine IVIg-Therapie nicht in den Effekten einer *in vitro* Inkubation mit Immunglobulinen auf ihre NK-Zellen wider.

5 Die IVIg-induzierten Änderungen der NK-Zell Population 24 h nach Behandlungsbeginn in Relation zur Therapieeffizienz in Patienten mit CIDP

Bisher konnte gezeigt werden, dass eine IVIg-Behandlung die NK-Zell Population im peripheren Blut von Patienten mit CIDP beeinflusst. 24 h nach einer IVIg-Gabe sinkt die relative mRNA Expression NK-Zell typischer Gene aufgrund einer selektiven Reduktion der CD56^{dim} NK-Zell Subpopulation. Im Folgenden soll geklärt werden, ob die beobachteten Effekte gleichermaßen in respondierenden und nicht respondierenden Patienten auftreten, oder ob zwischen den beiden Gruppen Unterschiede in den oben beschriebenen Effekten einer IVIg-Gabe bestehen. Zu diesem Zweck wurden unmittelbar vor und 24 h nach einer IVIg-Gabe entnommene PBMC-Proben von Patienten mit CIDP mittels qPCR, Durchflusszytometrie und *in vitro* Aktivitätstest analysiert. Die untersuchten Patienten wurden retrospektiv entsprechend ihres Ansprechens auf die Therapie in die Gruppen "Responder" und "Non-Responder" unterteilt, und die IVIg-induzierten Änderungen der NK-Zell Population verglichen.

5.1 Non-Responder zeigen nach einer IVIg-Gabe keine Reduktion typischer NK-Zell Transkripte im peripheren Blut

Im Folgenden wurde untersucht, ob ein Zusammenhang zwischen der Therapieeffizienz einer IVIg-Behandlung und der zuvor gezeigten Reduktion der relativen mRNA Level mehrerer NK-Zell Gene besteht. Die qPCR Analyse des peripheren Blutes zeigt in respondierenden Patienten für alle untersuchten Gene, bis auf *CD161*, eine Abnahme der relativen mRNA Expression 24 h nach der ersten IVIg-Gabe (Abb. II-15). Im Gegensatz dazu kann in therapie-refraktären Patienten bei keinem der untersuchten Gene eine signifikante Reduktion der mRNA Expression nach einer IVIg-Gabe beobachtet werden. Für die Gene *CD161*, *NKG2D* und *NKG2F* wird in Non-Respondern nach IVIg sogar ein Trend in die entgegengesetzte Richtung festgestellt. Des Weiteren wird beobachtet, dass der IVIg-induzierte Effekt auf die relative mRNA Expression von *CD161*, *NKG2C*, *NKG2D* und *NKG2F* signifikant mit dem Ansprechen des Patienten auf die IVIg-Therapie zusammenhängt. Die Werte für die durchschnittliche Änderung der relativen mRNA Expression sind für alle untersuchten Gene in Tabelle II-2 auf Seite 55 dargestellt.



Abbildung II-15: Änderung der relativen mRNA Expression typischer NK-Zell Gene in Blutproben von respondierenden und therapierefraktären Patienten mit CIDP 24 h nach der ersten IVIg-Gabe

Patienten mit CIDP wurden unmittelbar vor und 24 h nach der ersten IVIg-Gabe Blutproben entnommen, und diese mittels qPCR auf Änderungen in der relativen mRNA Expression der angegebenen Gene analysiert. Anhand des Therapieerfolgs wurden die Patienten den Gruppen Responder (n = 11) oder Non-Responder (n = 6) zugeteilt. Dargestellt ist die mittlere Änderung der 2^- Δ Ct Werte (normalisiert zu *GAPDH*) zur IVIg-naïven Probe mit SEM. * über einem Balken indizieren Signifikanz der Änderung zur IVIg-naïven Probe, diese wurden mittels eines gepaarten t-Tests berechnet. * über einer Klammer indizieren Signifikanz des Unterschiedes zwischen Änderungen, diese wurden mittels eines ungepaarten t-Tests berechnet. (p < 0.05 = *; p < 0.01 = **; p < 0.001 = ***)

5.2 Responder zeigen nach einer IVIg-Gabe eine verstärkte Reduktion der CD56^{dim} NK-Zell Subpopulation im peripheren Blut

Mittels Durchflusszytometrie wurde ermittelt, ob sich der beobachtete Zusammenhang zwischen der IVIg-Therapieeffizienz und Reduktion der relativen mRNA Level mehrerer NK-Zell Gene auch in der Größe und Oberflächenexpression der NK-Zell Population widerspiegelt: Respondierende Patienten zeigen im Vergleich zu therapierefraktären Patienten nach IVIg eine verstärkte Reduktion der NK-Zell Population im peripheren Blut (Abb. II-16). Darüber hinaus beschränkt sich die Reduktion in respondierenden Patienten auf die CD16 exprimierende CD56^{dim} Subpopulation, wohingegen in Non-Respondern CD16⁺CD56^{dim} und CD56^{bright} NK-Zellen gleichermaßen betroffen sind. Dadurch steigt in IVIg-Respondern der Anteil CD56^{bright} NK-Zellen an der gesamt NK-Zell Population. Dieser IVIg-

induzierte Anstieg der CD56^{bright} Subpopulation hängt zudem signifikant mit der Therapieeffizienz bei den untersuchten Patienten zusammen. Die zuvor gezeigte Zunahme des Anteils NKG2A exprimierender NK-Zellen nach einer IVIg-Gabe kann nur in respondierenden Patienten festgestellt werden. Die CD335 Expression wird in Abhängigkeit des Ansprechens des Patienten auf die Behandlung unterschiedlich von einer IVIg-Gabe beeinflusst: In respondierenden Patienten findet 24 h nach der ersten IVIg-Gabe eine leichte Zunahme des Anteils CD335 exprimierender NK-Zellen, in nicht respondierenden Patienten eine leichte Abnahme statt. Die ermittelten Werte der durchschnittlichen Änderungen sind in Tabelle II-2 dargestellt.



Abbildung II-16: Unterschiede in den Auswirkungen einer IVIg-Gabe auf die NK-Zell Population in PBMC zwischen respondierenden und therapierefraktären Patienten mit CIDP

Patienten mit CIDP wurden unmittelbar vor und 24 h nach der ersten IVIg-Gabe PBMC Proben entnommen und diese mittels Durchflusszytometrie auf Änderungen in der Oberflächenexpression und Größe der NK-Zell Population analysiert. Anhand des Therapieerfolgs wurden die Patienten den Gruppen Responder (n = 8) oder Non-Responder (n = 6) zugeteilt. Dargestellt ist der Mittelwert der Änderung des Anteils an der Lymphozytenoder NK-Zell Population zur IVIg-naïven Probe mit SEM. * über einem Balken indizieren Signifikanz der Änderung zur IVIg-naïven Probe, diese wurden mittels eines gepaarten t-Tests berechnet. * über einer Klammer indizieren Signifikanz des Unterschiedes zwischen Änderungen, diese wurden mittels eines ungepaarten t-Tests berechnet. (p < 0.05 = *; p < 0.01 = **; p < 0.001 = ***; n.s. = nicht signifikant)

Tabelle II-2: Vergleich der IVIg-induzierten Änderungen der NK-Zell Population zwischen Respondern und Non-Respondern

Dargestellt ist die durchschnittliche Änderung der relativen mRNA Expression/Populationsgröße 24 h nach der ersten IVIg-Gabe. Hellgrau unterlegte Daten wurden mittels qPCR, dunkelgrau unterlegte mittels FACS Analyse ermittelt. Ein negativer Wert beschreibt eine durchschnittliche Abnahme, ein positiver Werte eine Zunahme der relativen Expression oder Populationsgröße 24 h nach einer IVIg-Gabe. Die Spalten "Sig." stellen die Signifikanz der jeweils vorangegangenen Änderung dar (p < 0,05 = *; p < 0,01 = **; p < 0,001 = ***; n.s. = nicht signifikanz). Die Signifikanzen wurden mittels eines gepaarten t-Tests berechnet. In der letzten Spalte ist die Signifikanz des Unterschieds zwischen den Änderungen der beiden Gruppen gezeigt. Diese wurde mittels eines ungepaarten t-Tests berechnet. qPCR: Responder n = 11; Non-Responder n = 6. FACS: Responder n = 8; Non-Responder n = 6.

Transkript/	∅ Änderung (%) naïv – 24 h nach IVIg				Sig. der	
Population	Responder Sig		Non-Responder	Sig.	Differenz	
CD56	- 39,7	**	- 13,3	n.s.	n.s.	
CD94	- 39,6	**	- 15,6	n.s.	n.s.	
CD161	- 29,7	n.s.	+ 50,6	n.s.	*	
CD335	- 39,9	**	- 28,6	n.s.	n.s.	
NKG2A	- 28,3	*	+ 6,3	n.s.	n.s.	
NKG2C	- 43,3	**	- 0,9	n.s.	*	
NKG2D	- 26,9	*	+ 57,9	n.s.	**	
NKG2F	- 34,5	*	+ 18,9	n.s.	*	
NK-Zellen/Lymphozyten	- 46,3	*	- 30,9	*	n.s.	
CD16 ⁺ CD56 ^{dim} NK-Zellen/ Lymphozyten	- 49,3	*	- 31,2	*	n.s.	
CD56 ^{bright} NK-Zellen/ Lymphozyten	- 13,4	n.s.	- 26,8	**	n.s.	
CD56 ^{bright} NK-Zellen	+ 78,6	*	+ 6,7	n.s.	*	
NKG2A ⁺ NK-Zellen	+ 16,5	*	+ 5,4	n.s.	n.s.	
CD335 ⁺ NK-Zellen	+ 17,6	n.s.	- 17,8	n.s.	*	

5.3 Non-Responder zeigen eine tendenziell reduzierte NK-Zell Aktivität nach einer IVIg-Gabe

Im Folgenden wurde untersucht, ob eine IVIg-Gabe unterschiedliche Auswirkungen auf die Aktivität der NK-Zell Population im peripheren Blut von Respondern und Non-Respondern hat. Der durchgeführte NK-Zell Aktivitätstest zeigt in respondierenden Patienten keine Änderung der zytotoxischen NK-Zell Aktivität 24 h nach einer IVIg-Gabe (Abb. II-17). NonResponder zeigen im Vergleich zu Respondern bereits in IVIg-naïven Proben eine tendenziell geringere zytotoxische NK-Zell Aktivität gegen NK-Zielzellen (vgl. Abb. II-12). Nach einer IVIg-Gabe kommt es bei diesen Patienten zusätzlich zu einer geringen Zunahme der zytotoxischen NK-Zell Aktivität in unstimulierten Proben. Dies führt dazu, dass das bereits vor einer IVIg-Behandlung tendenziell verringerte zytotoxische Potential therapierefraktärer Patienten durch eine IVIg-Gabe zusätzlich reduziert wird. Respondierende Patienten zeigen nach einer IVIg-Gabe sowohl in stimulierten als auch unstimulierten Proben eine leichte Abnahme zytokinproduzierender NK-Zellen. Dies führt jedoch nicht zu einer Änderung des regulatorischen NK-Zell Potentials in diesen Patienten. Non-Responder zeigen im Vergleich zu Respondern in stimulierten Proben bereits vor Beginn einer IVIg-Behandlung einen tendenziell geringeren Anteil zytokinproduzierender NK-Zellen (vgl. Abb. II-12). Dieser Effekt wird 24 h nach einer IVIg-Gabe durch eine weitere leichte Abnahme verstärkt, was eine zusätzliche tendenzielle Verringerung des regulatorischen NK-Zell Potentials zur Folge hat.



Abbildung II-17: Auswirkungen einer IVIg-Gabe auf die NK-Zell Aktivität in PBMC von respondierenden und therapierefraktären Patienten mit CIDP

Patienten mit CIDP wurden unmittelbar vor und 24 h nach der ersten IVIg-Gabe PBMC Proben entnommen und diese mittels *in vitro* NK-Zell Aktivitätstest analysiert. Durch eine Ko-Kultur mit der Zelllinie K562 wurde NK-Zell Aktivität stimuliert, in unstimulierten Proben wurde die Ausgangsaktivität ermittelt. Als Maß für die zytotoxische NK-Zell Aktivität wurde die Degranulation lysosomaler Vesikel durch eine Analyse der CD107 Oberflächenexpression ermittelt. Die Produktion von Zytokinen wurde in NK-Zellen durch eine intrazelluläre Antikörperfärbung der Zytokine IFN-γ und TNF-α gemessen. (Fortsetzung nächste Seite)

Die Unterteilung der Patienten anhand ihres Ansprechens auf die IVIg-Behandlung zeigt, dass die IVIg-induzierten Änderungen der NK-Zell Population verstärkt in respondierenden Patienten auftreten. Non-Responder zeigen 24 h nach einer IVIg-Gabe keine Abnahme der relativen mRNA Expression typischer NK-Zell Gene. Die durchflusszytometrisch ermittelte Abnahme der NK-Zell Population im peripheren Blut der Patienten, zeigt für IVIg Responder einen stärkeren Effekt, welcher sich ausschließlich auf die CD16⁺CD56^{dim} Subpopulation bezieht. Der schwächere Effekt in therapierefraktären Patienten betrifft dagegen sowohl CD16⁺CD56^{dim} als auch CD56^{bright} NK-Zellen. Für die IVIg-induzierten Änderungen der relativen mRNA Expressionen von *CD161, NKG2C, NKG2D* und *NKG2F* und der Anteile der CD56^{bright} und CD335⁺ NK-Zellen zeigt sich eine signifikante Abhängigkeit zur Therapieeffizienz bei den untersuchten Patienten. Im Gegensatz zu Therapie-Respondern zeigen Non-Responder eine tendenzielle Reduktion des zytotoxischen und regulatorischen NK-Zell Potentials nach einer IVIg-Gabe.

5.4 Mögliche Nutzung des IVIg-Effekts auf NK-Zellen zur Früherkennung der Therapieeffizienz in Patienten mit CIDP

In der Medizin werden immer häufiger Biomarker eingesetzt, die z.B. dazu beitragen können pathologische Prozesse aufzuspüren oder das Ergebnis einer Behandlung zu prognostizieren, mit dem Ziel dem betroffenen Patienten frühestmöglich eine zielgerichtete Behandlung zu ermöglichen. Im Folgenden wurde untersucht, ob die beobachteten Effekte einer IVIg-Gabe auf die NK-Zellen von Patienten mit CIDP möglicherweise zur Erstellung eines Biomarkers zur Früherkennung therapierefraktärer Patienten genutzt werden können. Dazu verwendete Merkmale sollten die zu trennenden Patientengruppen möglichst genau identifizieren. In den bisherigen Ergebnissen zeigen die IVIg-induzierten Änderungen der relativen mRNA Expressionen von *CD161, NKG2C, NKG2D* und *NKG2F* und der Anteile von CD56^{bright} und CD335⁺ NK-Zellen eine signifikante Abhängigkeit zur Therapieeffizienz bei der untersuchten Patientengruppe. Als mögliche Merkmale für Non-Responder wurden daher untersucht:

- Keine IVIg-induzierte Reduktion der *CD161* mRNA Expression (Änderung \geq 1)
- IVIg-induzierte Änderung der *NKG2C* mRNA Expression ≥ 1

- IVIg-induzierte Änderung der NKG2D mRNA Expression ≥ 1
- IVIg-induzierte Änderung der NKG2F mRNA Expression ≥ 1
- IVIg-induzierte Änderung des Anteils der CD56^{bright} Subpopulation an der NK-Zell
 Population < 1,25
- IVIg-induzierte Änderung des Anteils der CD335⁺ NK-Zellen an der NK-Zell Population ≤ 1

Da es bei der Verwendung von Biomarkern um die Erstellung einer individuellen patientenbezogenen Diagnose oder Prognose geht, wurden diese Merkmale für jeden Patienten einzeln untersucht. Dabei kann weder bei qPCR Analysen noch unter den durchflusszytometrisch analysierten Proben ein Merkmal gefunden werden, in welchem sich alle respondierenden von allen nicht respondierenden Patienten eindeutig unterscheiden. Abbildung II-18 stellt repräsentativ die Analyse der individuellen Änderungen der relativen *NKG2C* mRNA Expression und des Anteils der CD56^{bright} Subpopulation 24 h nach der ersten IVIg-Infusion dar. Für die Änderung der *NKG2C* Expression zeigt sich dabei, dass keiner der 11 untersuchten Responder das zuvor definierte Merkmal für Non-Responder (Änderung ≥ 1) aufweist. Von den sechs tatsächlichen Non-Respondern weisen jedoch nur vier das Merkmal auf. Für die IVIg-induzierte Änderung des Anteils der CD56^{bright} Subpopulation seist einer der acht untersuchten Responder das Merkmal für Non-Responder (Änderung < 1,25) auf. Bei fünf von sechs Non-Respondern lässt sich das Merkmal ebenfalls beobachten. Die Ergebnisse aller untersuchten Merkmale sind in Tabelle II-3 dargestellt.



Abbildung II-18: Individuelle Änderung der NK-Zell Population 24 h nach der ersten IVIg-Gabe in Abhängigkeit des Therapieerfolgs von Patienten mit CIDP

Patienten mit CIDP wurden unmittelbar vor und 24 h nach der ersten IVIg-Gabe Blutproben entnommen und in diesen mittels qPCR (NKG2C) oder Durchflusszytometrie (CD56^{bright}) die Änderungen in der relativen mRNA Expression oder Verteilung der angegebenen NK-Zell Subpopulation analysiert. Anhand des Therapieerfolgs wurden die Patienten den Gruppen "Responder" oder "Non-Responder" zugeteilt. (Fortsetzung nächste Seite)

Dargestellt ist die Änderung der Messwerte im Vergleich zur IVIg-naïven Probe für jeden untersuchten Patienten. Die rote Linie markiert einen Schwellenwert, welcher die untersuchten Patienten bestmöglich entsprechend ihres Ansprechens auf die IVIg-Therapie unterteilt.

Tabelle II-3: IVIg-induzierte Änderung der NK-Zellen als Merkmal zur Identifizierung von Non-Respondern Untersucht wurde, ob eine IVIg-induzierte Änderung der NK-Zell Population als Unterscheidungsmerkmal zur frühzeitigen Identifizierung therapierefraktärer Patienten genutzt werden könnte. Dazu wurde analysiert, wie viele der untersuchten Responder und Non-Responder mögliche Merkmale für Non-Responder aufweisen. Hellgrau unterlegte Daten wurden mittels qPCR, dunkelgrau unterlegte mittels FACS Analyse ermittelt.

Merkmal für Non-Responder (24 h nach IVIg-Gabe)		Anzahl Patienten die das Merkmal aufweisen/ Anzahl untersuchter Patienten			
		Responder	Non-Responder		
er NA	CD161	2/11	5/6		
Änderung d relativen mRI Expression ≥	NKG2C	0/11	4/6		
	NKG2D	1/10	4/5		
	NKG2F	0/11	4/6		
CD56^{bright} NK-Zellen Änderung < 1,25		1/8	5/6		
CD335⁺ NK-Zellen Änderung ≤ 1		1/8	5/6		

6 Zusammenhang zwischen der Therapieeffizienz einer IVIg-Behandlung und den regulatorischen T-Zellen in Patienten mit CIDP

Einige Beobachtungen deuten darauf hin, dass Tregs in der Pathophysiologie der CIDP und im Wirkmechanismus von IVIg eine entscheidende Rolle spielen könnten. Im Folgenden wurde untersucht, ob bei Patienten mit CIDP ein Zusammenhang zwischen der Therapieeffizienz einer IVIg-Behandlung und der Treg Population im peripheren Blut besteht. Außerdem wurde geprüft, ob es bei Patienten mit CIDP, wie für andere autoimmune Erkrankungen bereits gezeigt, nach einer IVIg-Behandlung ebenfalls zu einer Expansion von Tregs kommt.

6.1 Therapieresponder zeigen bereits vor Behandlungsinitiierung eine erhöhte *FOXP3*-Expression im peripheren Blut

Mittels qPCR Analyse wurde die relative mRNA Expression des Forkhead-Box-Proteins P3 (FOXP3) im peripheren Blut IVIg-naïver Patienten mit CIDP gemessen. FOXP3 ist ein

Transkriptionsfaktor welcher spezifisch von regulatorischen T-Zellen exprimiert wird, und dort eine wichtige Rolle bei der Entwicklung ihrer inhibitorischen Funktion übernimmt (Fontenot, Gavin et al. 2003). Die Untersuchung zeigt, dass respondierende Patienten vor Beginn der IVIg-Behandlung eine signifikant höhere relative *FOXP3* mRNA Expression aufweisen als therapierefraktäre Patienten mit CIDP (Abb. II-19).



Abbildung II-19: Vergleich der relativen *FOXP3* mRNA Expression zwischen respondierenden und therapierefraktären Patienten mit CIDP vor Beginn einer IVIg-Behandlung

Patienten mit CIDP wurden unmittelbar vor Beginn einer IVIg-Behandlung Blutproben entnommen, und mittels qPCR die relative *FOXP3* mRNA Expression analysiert. Anhand des Therapieerfolgs wurden die Patienten den Gruppen Responder (n = 18) oder Non-Responder (n = 11) zugeteilt. Dargestellt sind 2^- Δ Ct Mittelwerte mit SEM, normalisiert zu *GAPDH/ACTB*. Signifikanz wurde mittels eines ungepaarten t-Tests ermittelt (p < 0.05 = *; p < 0.01 = **; p < 0.001 = ***).

6.2 IVIg führt in Therapierespondern zu einer Expansion regulatorischer T-Zellen

Mittels einer durchflusszytometrischen Analyse wurde die Auswirkung von IVIg auf die Größe der Treg Population im peripheren Blut von therapierefraktären und respondierenden Patienten mit CIDP untersucht. Dazu wurde der Anteil $CD3^+CD4^+CD25^+FOXP3^+$ Tregs an der Lymphozytenpopulation in PBMC-Proben von Patienten unmittelbar vor und 24 h nach der ersten IVIg-Gabe bestimmt. In respondierenden Patienten kann vor IVIg ein tendenziell erhöhter Anteil Tregs beobachtet werden, welcher nach der ersten IVIg-Gabe zudem signifikant ansteigt (vor IVIg: 2,92 % ± 0,18; 24 h nach IVIg: 3,74 % ± 0,34; *p* = 0,0205)(Abb. II-20). In therapierefraktären Patienten führt IVIg nur zu einem tendenziellen Anstieg der Treg Population.



Abbildung II-20: Einfluss von IVIg auf die Größe der Treg Population in PBMC von respondierenden und therapierefraktären Patienten mit CIDP

Patienten mit CIDP wurden unmittelbar vor und 24 h nach der ersten IVIg-Gabe PBMC Proben entnommen, und diese mittels Durchflusszytometrie auf Änderungen in der Größe der Treg Population analysiert. Tregs wurden dabei als $CD3^+CD4^+CD25^+FOXP3^+$ Lymphozyten definiert. Anhand des Therapieerfolgs wurden die Patienten den Gruppen Responder (n = 8) oder Non-Responder (n = 6) zugeteilt. Dargestellt sind Mittelwerte mit SEM des Anteils an der Lymphozytenpopulation. Signifikanz zwischen Respondern und Non-Respondern wurde mittels eines ungepaarten t-Tests berechnet. Signifikanz zwischen behandelten und unbehandelten Patienten wurde mittels eines gepaarten t-Tests berechnet (p < 0.05 = *; p < 0.01 = **; p < 0.001 = ***).

7 Einfluss der NK-Zell Population auf den Schweregrad der motorischen Beeinträchtigung in Patienten mit CIDP

Im Folgenden wird untersucht, ob Patienten in Abhängigkeit des Schweregrads ihrer durch die Erkrankung verursachten motorischen Einschränkungen Unterschiede in der Größe ihrer NK-Zell Population im peripheren Blut aufweisen.

7.1 Die Expression typischer NK-Zell Transkripte korreliert mit dem Schweregrad der Erkrankung in Patienten mit CIDP

In Blutproben IVIg-naïver Patienten mit CIDP wurde die relative mRNA Expression typischer NK-Zell Gene mittels qPCR, und die Größe der NK-Zell Population durchflusszytometrisch analysiert. Der Schweregrad der Erkrankung der untersuchten Patienten wurde vom behandelnden Arzt auf Basis des 10 Punkte INCAT-Scores beurteilt. Die qPCR Analyse zeigt, dass die relative mRNA Expression von *CD94* und *CD56* negativ mit dem INCAT-Score der untersuchten Patienten korreliert (Abb. II-21). Die durchflusszytometrische Analyse der NK-Zell Population zeigt, dass motorisch nicht eingeschränkte Patienten (INCAT = 0) einen

signifikant höheren Anteil NK-Zellen an der Lymphozytenpopulation aufweisen, als Patienten deren Einschränkungen mit einem INCAT-Score von drei bewertet werden (Abb. II-21). Die Größe der NK-Zell Population von Patienten mit einem INCAT-Score von eins oder zwei liegt im Mittelwert zwischen diesen Gruppen.



Abbildung II-21: Korrelation des INCAT-Scores und der NK-Zell Population in behandlungsnaïven Patienten mit CIDP

Patienten mit CIDP wurden vor Behandlungsbeginn Blutproben entnommen und diese mittels qPCR bzw. durchflusszytometrisch analysiert. Mittels qPCR wurde die relative mRNA Expression typischer NK-Zell Gene ermittelt, und mit dem INCAT-Score der untersuchten Patienten korreliert (n = 26). Dargestellt sind Mittelwerte mit SEM von 2^- Δ Ct Werten, normalisiert zu *GAPDH/ACTB*. Durchflusszytometrisch wurde die Größe der CD3⁻ CD56⁺ NK-Zell Population ermittelt und die Werte nach INCAT-Scores der untersuchten Patienten unterteilt (n = 18). Dargestellt sind Mittelwerte mit SEM. Signifikanzen wurden mittels eines ungepaarten t-Tests berechnet (p < 0.05 = *; p < 0.001 = ***).
III Diskussion

1 Die Rolle von NK-Zellen in der Therapieeffizienz einer IVIg-Behandlung des ICAM-1^{-/-} NOD Mausstamms

NOD-Mäuse mit einer Mutation im ICAM-1 Gen entwickeln ab einem Alter von ca. 7 Monaten eine immunvermittelte periphere Neuropathie, welche aufgrund ihrer Pathophysiologie und dem chronischen Krankheitsverlauf dem humanen Krankheitsbild der CIDP ähnelt (Meyer zu Horste, Mausberg et al. 2014). Darüber hinaus sprechen ICAM-1 defiziente NOD Mäuse, ähnlich wie Patienten mit CIDP, sehr heterogen auf eine Behandlung mit IVIg an (Meyer zu Horste, Cordes et al. 2016). Eine Microarray Analyse von Blutproben dieser Tiere deutete darauf hin, dass NK-Zellen eine zentrale Rolle bei der Determinierung der Therapieeffizienz spielen könnten (unveröffentlichte Daten von Meyer zu Hörste et al.). Dabei zeigten Tiere, welche besser auf eine nachfolgende IVIg-Therapie ansprachen, eine erhöhte mRNA Expression von einer Reihe von Genen welche typischerweise von NK-Zellen exprimiert werden. In der vorliegenden Arbeit wurde bestätigt, dass der Krankheitsverlauf ICAM-1 defizienter NOD Mäuse unter der IVIg-Therapie mit der relativen mRNA Expression mehrerer NK-Zell Gene im peripheren Blut korreliert. Tiere welche unter der Behandlung eine Linderung der Krankheitssymptome zeigten, hatten vor Beginn der Therapie eine höhere Expression typischer NK-Zell Gene als Tiere deren Krankheitssymptome unter der Behandlung weiter zunahmen. Die dabei auffällig gewordenen Gene kodieren sowohl für aktivierende als auch inhibitorische NK-Zell Rezeptoren, was dafür spricht, dass diese Beobachtung nicht auf Unterschieden in der Differenzierung oder Aktivierbarkeit der NK-Zell Population beruht, sondern die generelle Größe der Population widerspiegelt. Da es sich bei der durchgeführten qPCR-Analyse nicht um eine absolute sondern relative Quantifizierung der mRNA handelte, ist nicht ausgeschlossen, dass der beobachtete Effekt durch die Größe einer oder mehrerer weiterer Immunzellpopulationen verursacht wurde. Im Zusammenhang mit den Ergebnissen des von Meyer zu Hörste durchgeführten Microarrays, bei dem die Expression von knapp 30.000 Genen analysiert wurde, spricht die Datenlage jedoch für einen von der NK-Zell Population hervorgerufenen Effekt. Die Feststellung, dass eine höhere Anzahl NK-Zellen einen positiven Effekt auf die Therapieeffizienz einer IVIg-Behandlung hat,

legt nahe, dass NK-Zellen im ICAM-1^{-/-} NOD Mausstamm eine wichtige regulatorische Funktion in der Immunmodulation des IVIg-Wirkmechanismus spielen.

2 Einfluss von IVIg auf murine und humane NK-Zellen in vitro

Mehrere Studien haben bei einer in vitro Inkubation von PBMC mit IVIg einen Einfluss auf die Aktivität und Expression humaner NK-Zellen festgestellt (Jacobi, Claus et al. 2009; Bohn, Nederby et al. 2011). Dabei zeigten NK-Zellen, wie auch bei den hier durchgeführten Analysen, eine IVIg-induzierte Verminderung der zytotoxischen Aktivität gegen NK-Zielzellen. Diese wurde begleitet von einer erhöhten Degranulation lysosomaler Vesikel in Zellkulturen ohne NK-Zielzellen. Ähnliche Auswirkungen hatte die Inkubation mit IVIg auf die intrazelluläre Zytokinproduktion (IFN- γ und TNF- α) von NK-Zellen: Die durch eine Ko-Kultur mit NK-Zielzellen stimulierte Zytokinproduktion nahm in IVIg-behandelten Zellkulturen stark ab. Gleichzeitig zeigten NK-Zellen in Abwesenheit von NK-Zielzellen einen IVIg-induzierten Anstieg intrazellulärer Zytokine. Bei den in diesen Versuchen durchgeführten Zellkulturen handelte es sich um isolierte PBMC, welche neben NK-Zellen auch die weiteren Lymphozyten sowie Monozyten und DC enthielten. Es ist daher nicht auszuschließen, dass die in Abwesenheit von NK-Zielzellen beobachtete NK-Zell Degranulation und Zytokinproduktion durch eine IVIg-induzierte NK-Zell Aktivierung gegen eine oder mehrere spendereigene Zellpopulationen hervorgerufen wurde. So wurde beispielsweise beschrieben, dass IVIg eine Aktivierung der zytotoxischen NK-Zell Aktivität und IFN-y Produktion gegen DC induziert (Tha-In, Metselaar et al. 2007). Da sich IVIg schon einige Zeit vor der Stimulation mit NK-Zielzellen im Kulturmedium befindet, könnte eine IVIg-induzierte Aktivierung von NK-Zellen gegen endogene Immunzellpopulationen die Erschöpfung der NK-Zell Population zur Folge haben, woraufhin diese nur noch ein vermindertes Potential aufweisen würde, auf eine nachfolgende Stimulation mit NK-Zielzellen zu reagieren.

Neben einer veränderten NK-Zell Aktivität beeinflusst eine Inkubation mit IVIg die Oberflächenexpression humaner NK-Zellen. Wie bereits von Jacobi et al. und Bohn et al. beschrieben, führte IVIg zu einer starken Reduktion der CD16 Oberflächenfärbung auf NK-Zellen (Jacobi, Claus et al. 2009; Bohn, Nederby et al. 2011). Der dabei zur CD16-Detektion verwendete monoklonale Antikörper (Klon 3G8) blockiert bei Bindung seines Epitops die Bindung des FcyR an IgG und umgekehrt (Fleit, Wright et al. 1982). Daher ist es wahrscheinlich, dass der beobachtete Effekt nicht durch eine reduzierte CD16-Oberflächenexpression, sondern durch eine kompetitive Verdrängung des CD16-Antikörpers durch IVIg hervorgerufen wurde (Bohn, Nederby et al. 2011). Dies zeigt, dass IVIg über CD16 an NK-Zellen bindet und so einen direkten Einfluss auf die CD16 exprimierende CD56^{dim} Subpopulation nehmen kann. Darüber hinaus hatte die *in vitro* Inkubation mit IVIg Auswirkungen auf die NK-Zell Oberflächenexpression von CD335, NKG2A und CD161. Besonders auffällig ist dabei, dass die Inkubation mit IVIg zu einer verminderten Expression des aktivierenden Rezeptors CD335 und einer erhöhten Expression der inhibitorischen Rezeptoren NKG2A und CD161 führte. Dies deutet darauf hin, dass eine Inkubation mit IVIg in NK-Zellen einen inaktiveren Phänotyp induziert, was einen weiteren Hinweis auf eine IVIginduzierte funktionelle Erschöpfung der NK-Zell Population darstellt. Für diese ist bekannt, dass sie eine verminderte Expression aktivierender und erhöhte Expression inhibitorischer NK-Zell Rezeptoren zur Folge hat (da Silva, Gallois et al. 2014). Die Inkubation mit IVIg hatte keinen Einfluss auf die Größe der NK-Zell Population oder die Anteile der CD56^{dim} und CD56^{bright} Subpopulationen.

Bei der *in vitro* Inkubation humaner PBMC zeigen NK-Zellen bereits bei 1 mg/ml IVIg starke Auswirkungen auf die Aktivität und Oberflächenexpression. Im humanen peripheren Blut sind IgGs in einer Konzentration von ca. 7 bis 18 mg/ml vorhanden (Gonzalez-Quintela, Alende et al. 2008). Die beschriebenen Effekte einer *in vitro* Inkubation konnten in frisch isolierten NK-Zellen jedoch nicht beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Die Ursache für die erhöhte immunmodulierende Aktivität therapeutischer im Vergleich zu endogener IgGs ist nicht abschließend geklärt. Ein Erklärungsansatz, welcher eine erhöhte Rate dimerisierter IgGs in therapeutischen Präparaten als mögliche Ursache vermutet, wurde inzwischen weitestgehend widerlegt (Tremblay, Pare et al. 2013). Djoumerska et al. postulieren, dass Prozesse während der Aufreinigung eine Polyreaktivität therapeutischer IgGs zur Folge haben und dies zu der erhöhten immunmodulierenden Wirkung beiträgt (Djoumerska, Tchorbanov et al. 2005).

Bei der IVIg-Behandlung ICAM-1 defizienter NOD Mäuse wird das murine Immunsystem humanen Immunglobulinen ausgesetzt. Fraglich ist, ob diese dort auf die gleiche Weise in die Pathophysiologie der Autoimmunerkrankung eingreifen wie im humanen System. Es ist bekannt, dass murine Effektorzellen humanes IgG über ihre Fcy-Rezeptoren binden und mit diesem interagieren, jedoch zeigen sich auch Differenzen zu den Interaktionen im humanen System (Overdijk, Verploegen et al. 2012). Um einen Hinweis darauf zu bekommen, ob die Ergebnisse des Tiermodells eine mögliche Schlussfolgerung auf die humane Situation zulassen, wurde überprüft, welche Effekte eine Inkubation mit IVIg auf die Oberflächenexpression und Aktivität muriner NK-Zellen hat, und ob diese den Effekten auf humane NK-Zellen entsprechen. Dabei zeigte sich, dass die Auswirkungen humaner IgGs auf murine und humane NK-Zellen qualitativ in hohem Maße übereinstimmen. Wie oben für humane Proben beschrieben, so zeigen auch murine PBMC Anzeichen einer IVIg-induzierten Erschöpfung der NK-Zell Population. Zudem reduziert IVIg die CD16 Oberflächenfärbung muriner NK-Zellen. Dies deutet darauf hin, dass murine NK-Zellen humane IgGs über ihren FcyR binden und es dadurch, wie in humanen Proben zu einer kompetitiven Verdrängung des CD16 detektierenden Antikörpers kommt. Diese Beobachtungen sprechen dafür, dass IVIg die NK-Zell Population in ICAM-1^{-/-} NOD Mäusen auf ähnliche Weise beeinflusst wie in humanen Patienten. Daher geben die Ergebnisse der Microarray und qPCR Analysen des Tiermodells Hinweise auf eine mögliche Beteiligung der NK-Zell Population am Wirkmechanismus und der Therapieeffizienz einer IVIg-Behandlung von Patienten mit CIDP. Jedoch war ebenfalls zu beobachten, dass die Änderungen der NK-Zell Expression und Aktivität in murinen Proben weniger stark ausgeprägt waren als in humanen Proben, oder eine vielfach höhere IVIg Konzentration benötigt wurde um quantitativ gleichwertige Änderungen zu erreichen. Dies könnte auf eine beeinträchtigte Kompatibilität muriner NK-Zellen mit humanem IgG zurückzuführen sein. Möglicherweise besteht jedoch auch ein Zusammenhang zur ICAM-1 Defizienz des untersuchten Tiermodells. Diese Vermutung wird in Kapitel 5 detaillierter behandelt.

3 Die Rolle von NK-Zellen in der IVIg-Behandlung von Patienten mit CIDP

3.1 Einfluss von IVIg auf die NK-Zellen von Patienten mit CIDP in vivo

Eine IVIg-Behandlung stellt für ein breites Spektrum an Erkrankungen eine essentielle Intervention dar (Jolles, Sewell et al. 2005). Insbesondere für immunvermittelte Polyneuropathien wie die chronisch inflammatorische demyelinisierende Polyneuropathie (CIDP), für die nur begrenzte therapeutische Möglichkeiten zur Verfügung stehen, ist sie eine wichtige Therapieoption. Trotz der routinemäßigen Verabreichung ist der zugrundeliegende Wirkmechanismus einer Behandlung mit Immunglobulinen noch nicht vollständig entschlüsselt (Schwab and Nimmerjahn 2013). Für einige Krankheitsbilder und Tiermodelle ist bekannt, dass NK-Zellen bei der Vermittlung des IVIg-Effekts eine essentielle Rolle einnehmen. Bei der EAE ist die IVIg-Behandlung in Abwesenheit von NK-Zellen beispielsweise erfolglos (Chong, Ling et al. 2013). Die hier gezeigten tierexperimentellen Daten des ICAM-1^{-/-} NOD Mausstammes legen nahe, dass NK-Zellen auch bei der IVIg-Therapie von Autoimmunerkrankungen des PNS eine Rolle spielen. Daher wurde überprüft, welche Auswirkungen eine IVIg-Behandlung von Patienten mit CIDP auf die Expression und Größe der NK-Zell Population im peripheren Blut der Patienten hat. Dabei zeigte sich, dass es bereits 24 h nach der ersten IVIg-Infusion zu einer Abnahme der relativen mRNA Expression mehrerer Gene kommt, welche typischerweise von NK-Zellen exprimiert werden. Die beobachtete Reduktion der relativen mRNA Menge mehrerer NK-Zell Gene als Folge einer IVIg-Gabe könnte jedoch verschiedene Vorgänge zur Ursache haben: Eine IVIg induzierte Modulation der Expression innerhalb der NK-Zell Population könnte die beobachteten Änderungen hervorrufen. Eine durch IVIg induzierte Expansion einer oder mehrerer Zell Populationen im peripheren Blut von Patienten würde zu einem Anstieg der Menge vorhandener GAPDH mRNA führen. Da in unserem Experiment die mRNA Menge der NK-Zell Gene in Relation zur detektierten Menge GAPDH mRNA dargestellt wurde, hätte dies eine Reduktion der relativen Expression der Zielgene zur Folge. Aus Arbeiten von Jacobi et al. und Bohn et al. ist bekannt, dass es in Patienten mit CIDP während einer IVIg-Behandlung zu einer Reduktion der NK-Zell Population im peripheren Blut kommt (Jacobi, Claus et al. 2009; Bohn, Nederby et al. 2011). Dies legt nahe, dass auch die beobachtete IVIg-induzierte Reduktion der relativen mRNA Expression von NK-Zell Genen auf diesen Effekt zurückzuführen ist. Die durchflusszytometrische Analyse von Blutproben behandelter Patienten bestätigt, dass es 24 h nach der ersten IVIg-Infusion zu einer Reduktion der NK-Zell Population kommt, wobei die Anteile von T- und B-Zellen und das Lymphozyten/Monozyten Verhältnis unverändert bleiben. Zudem konnte gezeigt werden, dass sich die Reduktion der NK-Zellen hauptsächlich auf die CD16⁺CD56^{dim} Subpopulation bezieht, wodurch es innerhalb der NK-Zell Population zu einem relativen Anstieg der CD56^{bright} Subpopulation kommt. Welchen Anteil die bei der in vitro Inkubation gezeigten Auswirkungen auf die NK-Zell Oberflächenexpression von NKG2A, CD161 und CD335 an den in vivo Effekten haben, kann nicht abschließend beantwortet werden. Da NKG2A auf allen CD56^{bright} aber nur teilweise

auf CD56^{dim} NK-Zellen exprimiert wird, spiegelt sich dies auch in einem Anstieg des Anteils NKG2A exprimierender NK-Zellen wider. Dieser Effekt könnte zudem durch den im *in vitro* Versuch gezeigten Anstieg der NKG2A Expression verstärkt werden. Auch CD335 wird vermehrt auf CD56^{bright} NK-Zellen exprimiert (Daten nicht gezeigt). Möglicherweise heben sich der Anstieg der CD56^{bright} Subpopulation und die im *in vitro* Versuch gezeigte Reduktion der CD335 Expression gegenseitig auf. CD161 wird auf den meisten NK-Zellen beider Subpopulationen exprimiert, weshalb die selektive Reduktion der CD56^{dim} NK-Zellen keinen Einfluss auf die Anteile CD161⁺ oder CD161⁻ NK-Zellen haben dürfte. Der im *in vitro* Versuch beobachtete Anstieg der CD161 Expression konnte *in vivo* jedoch nicht festgestellt werden. Bei der *in vitro* Inkubation humaner PBMC mit IVIg wurde weder eine NK-Zell Reduktion, noch eine veränderte Verteilung der Subpopulationen festgestellt. Daher ist es wahrscheinlich, dass der beobachtete Effekt *in vivo* nicht durch eine IVIg induzierte Apoptose von NK-Zellen hervorgerufen wird. Vielmehr könnte IVIg eine selektive Migration der CD56^{dim} Subpopulation aus dem peripheren Blut in angrenzende Gewebe vermitteln.

Untersuchungen an Patienten mit MS und ihrem Tiermodell zeigen, dass die Rekrutierung der CD56^{dim} NK-Zell Population in entzündete Gewebe eine wichtige Rolle in der Limitierung autoimmuner Erkrankungen spielen kann. Im Verlauf einer EAE kommt es aufgrund einer selektiven NK-Zell Migration ins ZNS zu einer Reduktion der NK-Zell Population im peripheren Blut der Tiere (Hertwig, Hamann et al. 2016). Wie einige weitere Immunzellpopulationen, so exprimiert auch ein Teil der zytotoxischen NK-Zell Subpopulation den Chemokinrezeptor CX3CR1, mit dessen Hilfe sie in der Lage sind, in endzündete Gewebe einzuwandern (Nishimura, Umehara et al. 2002; Hamann, Unterwalder et al. 2011). In der EAE wurde beobachtet, dass CX3CR1-defiziente Tiere eine verminderte Anzahl zytotoxischer NK-Zellen im endzündeten ZNS aufweisen, wohingegen die Anzahl regulatorischer NK-Zellen unverändert bleibt (Huang, Shi et al. 2006; Hertwig, Hamann et al. 2016). Gleichzeitig zeigen diese Tiere einen drastischeren Krankheitsverlauf und eine erhöhte Sterberate wie sie auch in NK-Zell defizienten Tieren zu beobachten sind. Dies deutet auf eine protektive Funktion der CX3CR1 exprimierenden NK-Zellen in der EAE. Es wird vermutet, dass zytotoxische NK-Zellen durch die direkte Lyse autoreaktiver T-Zellen (Hertwig, Hamann et al. 2016) oder Mikrogliazellen (Lunemann, Lunemann et al. 2008; Hao, Liu et al. 2010) im endzündeten ZNS zur Abschwächung der Immunreaktion beitragen. Im Einklang mit diesen Beobachtungen, zeigen MS Patienten eine verminderte Anzahl CX3CR1 exprimierender NK-Zellen im peripheren Blut, welche unmittelbar vor einem klinischen Rückfall auf das Niveau gesunder Probanden ansteigt (Infante-Duarte, Weber et al. 2005). Dies könnte darauf hinweisen, dass CX3CR1⁺ CD56^{dim} NK-Zellen in MS Patienten während der Remission ins ZNS migrieren und dort die Autoimmunreaktion inhibieren. Kommt es dann zu einer Mobilisierung dieser NK-Zellen aus dem ZNS ins periphere Blut, führt die fehlende lokale Immunsuppression möglicherweise zu einem Anstieg der Autoimmunreaktion und damit zu einem klinischen Rückfall.

Über eine NK-Zell Migration ins PNS ist bisher wenig bekannt. Da der Ligand für CX3CR1 (Fractalkine oder CX3CL1) wie im ZNS auch von Neuronen im PNS exprimiert wird, könnte eine CX3CR1 vermittelte selektive Rekrutierung zytotoxischer CD56^{dim} NK-Zellen auch in der CIDP eine Rolle spielen. Darüber hinaus exprimieren NK-Zellen eine Vielzahl weiterer Chemokinrezeptoren, welche ihnen eine rasche Migration in infizierte und endzündete Gewebe ermöglicht (Bernardini, Gismondi et al. 2012).

Wie IVIg eine mögliche Extravasation von NK-Zellen induzieren könnte ist unklar. Die Beobachtung aus der *in vitro* Inkubation, dass IVIg über CD16 auf der Oberfläche von NK-Zellen bindet, deutet darauf hin, dass dies ein direkter Effekt auf die CD16 exprimierende CD56^{dim} Subpopulation sein könnte. Denkbar wäre beispielsweise, dass es durch die IVIg induzierte Aktivierung der IFN-γ Produktion durch NK-Zellen zu einer Steigerung der CX3CL1 Expression von Endothelzellen oder Neuronen im endzündeten Nerven kommt, und dies eine erhöhte Rekrutierung zur Folge hat (Li, Chao et al. 2014).

In verschiedenen Geweben ist bekannt, dass insbesondere CD56^{dim} NK-Zellen im Zuge von Infektionen und Endzündungen effektiv rekrutiert werden, und dort durch Interaktionen mit DC Einfluss auf die Immunreaktion und die Aktivierung des adaptiven Immunsystems haben können (Campbell, Qin et al. 2001; Moretta 2002). Dabei sind sie z.B. in der Lage, unreife DC zu lysieren (Piccioli, Sbrana et al. 2002), wohingegen reife DC durch eine erhöhte Oberflächenexpression von MHC-I vor Attacken geschützt sind (Ferlazzo, Semino et al. 2001). Wie zuvor erwähnt, kann eine Behandlung mit IVIg dazu führen, dass CD16⁺CD56^{dim} NK-Zellen auch in der Lage sind reife DC mittels ADCC zu lysieren (Tha-In, Metselaar et al. 2007). Denkbar wäre, dass IVIg in Patienten mit CIDP eine Relokalisation von CD16⁺ CD56^{dim} NK-Zellen aus dem peripheren Blut in endzündete periphere Nerven induziert, und sie dort dazu befähigt, reife DC mittels ADCC zu attackieren. Darüber hinaus hat die *in vitro* Inkubation mit IgGs gezeigt, dass IVIg in NK-Zellen die Produktion von TNF-α und IFN-γ stimuliert. Da eine Aktivierung von CD16⁺ CD56^{dim} NK-Zellen über ADCC in diesen Zellen parallel die Produktion von TNF-α und IFN-γ induziert (Romee, Foley et al. 2013), könnte dieser Effekt ebenfalls durch eine IVIg vermittelte ADCC gegen DC hervorgerufen worden sein. Die Freisetzung von IFN-γ durch NK-Zellen kann eine Hemmung des DC Reifungsprozesses zur Folge haben, wodurch diese einen inhibitorischen Phänotypen annehmen (Rojas and Krishnan 2010; Kerkar, Chinnasamy et al. 2014). Die Lyse reifer DC durch ADCC und die Induktion inhibitorischer DC durch die Freisetzung von IFN-γ könnte in Patienten mit CIDP eine reduzierte Aktivierung autoreaktiver T-Zellen zur Folge haben. Darüber hinaus könnten mittels IVIg aktivierte NK-Zellen im endzündeten Nerv über eine direkte Lyse aktivierter Makrophagen (Nedvetzki, Sowinski et al. 2007) oder autoreaktiver T-Zellen (Crouse, Xu et al. 2015) zur Limitierung der Immunreaktion beitragen.

Die qPCR Analysen von Blutproben IVIg behandelter Patienten zeigen einen Wiederanstieg der relativen mRNA Expression der analysierten NK-Zell Gene am Ende eines Behandlungsintervalls. Dies spricht dafür, dass es sich bei der Reduktion der CD56^{dim} Subpopulation nicht um einen langfristigen Effekt handelt welcher über die gesamte Behandlungsdauer anhält. Vielmehr scheint die NK-Zell Population bis zur nachfolgenden IVIg-Infusion wieder ihr Ausgangsniveau zu erreichen. Ob der Wiederanstieg der NK-Zell Population auf einer Expansion der NK-Zell Population oder einer Rückmigration aus entzündetem Gewebe beruht ist dabei nicht geklärt. Die Analyse von Blutproben eines Patienten über den Zeitraum der ersten vier IVIg-Infusionen deutet darauf hin, dass sich die NK-Zell Reduktion 24 h nach einer IVIg-Infusion und der Wiederanstieg bis zur nachfolgenden in jedem Behandlungsintervall wiederholen. Interessanterweise entspricht die IVIg-induzierte Änderung der NK-Zell Population in gespiegelter Ausprägung einer typischen pharmakokinetischen Kurve intravenöser Immunglobuline (Bonilla 2008). Nach einer IVIg-Infusion kommt es zunächst zu einem raschen Anstieg der Serum IgG-Konzentration, welche aufgrund der Halbwertszeit von IgGs von etwa 23 Tagen bis zur nachfolgenden Gabe auf das Ausgangsniveau absinkt. Zudem deckt sich der Wiederanstieg der NK-Zell Population im peripheren Blut mit der Beobachtung, dass die Wirkung der IVIg-Behandlung bei einigen Patienten zum Ende eines Behandlungsintervalls nachlässt (end-ofdose Effekt)(Berger and Allen 2015).

3.1.1 Einfluss von IVIg auf die NK-Zell Aktivität behandelter Patienten

Wegen des starken Effekts einer in vitro Inkubation mit Immunglobulinen auf die zytotoxische Aktivität von NK-Zellen und der Beobachtung, dass der Anteil zytotoxischer CD56^{dim} NK-Zellen nach einer Behandlung mit IVIg in Patienten mit CIDP um fast die Hälfte abnimmt, wurde erwartet, dass eine IVIg-Gabe auch in vivo eine Reduktion des zytotoxischen NK-Zell Potentials zur Folge hätte. Dies konnte bei der Analyse der vor und nach einer IVIg-Gabe entnommenen PBMC-Proben jedoch nicht eindeutig festgestellt werden. Auch der Einfluss, den Immunglobuline in vitro auf die Zytokinproduktion von NK-Zellen ausüben, konnte bei der Behandlung von CIDP Patienten mit IVIg nicht festgestellt werden. Zwar zeigten auch hier die mit NK-Zielzellen stimulierten Proben einen tendenziellen Rückgang der Zytokinproduktion nach IVIg, die unstimulierten Proben zeigten entgegen der Erwartung jedoch keine Zunahme sondern eine Abnahme der Zytokinproduktion in NK-Zellen. Möglicherweise ist der Grund für die unerwarteten Ergebnisse in der verwendeten Methode zur Messung der NK-Zell Aktivität zu suchen. Bei der in vitro Inkubation mit Immunglobulinen erfolgt die Messung der NK-Zell Aktivität unmittelbar nachdem die Zellen der Substanz ausgesetzt waren. Zudem befindet sich im letzten Abschnitt der Inkubation Monensin und Brefeldin A im Kulturmedium, noch während die Inkubation mit IVIg stattfindet. Dies führt dazu, dass die IVIg-induzierte Degranulation der NK-Zellen in einer Akkumulation von CD107 auf der Zellmembran, und die induzierte Zytokinproduktion in einer Akkumulation von intrazellulärem TNF- α und IFN-y resultieren. Bei der Untersuchung der in vivo Auswirkungen von IVIg auf die NK-Zell Aktivität werden die NK-Zellen, nachdem sie der Substanz im Blut des Patienten ausgesetzt waren, zunächst mittels Ficoll-Dichtezentrifugation isoliert, kryokonserviert und nach dem Auftauen für weitere 16 h kultiviert. Erst dann folgt die Zugabe von Monensin und Brefeldin A und die anschließende Messung der NK-Zell Aktivität. Es ist anzunehmen, dass eine in vivo durch IVIg induzierte zytotoxische NK-Zell Aktivität und Zytokinproduktion auf diese Weise nicht messbar ist. Um einer Regeneration der NK-Zell Population zuvor zu kommen, wäre es möglicherweise sinnvoll, die Messungen unmittelbar nach erfolgter Blutentnahme in einem Vollblut Ansatz durchzuführen. Dabei könnte durch eine zeitnahe Zugabe von Monensin und Brefeldin A die Internalisierung von CD107 und die Freisetzung produzierter Zytokine inhibiert werden. Zudem wären die Zellen in diesem Ansatz weiterhin dem im Blut vorhandenen IVIg ausgesetzt. Nichtsdestotrotz könnte die beobachtete IVIg-induzierte Reduktion der Zytokinproduktion in unstimulierten, und die tendenzielle Verringerung in stimulierten Proben, auf eine Erschöpfung der NK-Zell Population hindeuten, wie sie auch im *in vitro* Versuch beobachtet wurde.

3.2 Zusammenhang zwischen der NK-Zell Population und der Therapieeffizienz einer IVIg-Behandlung

Etwa ein Drittel der Patienten mit CIDP spricht nicht auf eine Behandlung mit IVIg an (Hughes, Donofrio et al. 2008). Eine Entschlüsselung des Mechanismus der immunmodulierenden IVIg Wirkung würde ohne Zweifel dazu beitragen, Marker für das Ansprechen der Patienten auf die Therapie ausfindig zu machen. Andererseits können jedoch auch Differenzen zwischen Patienten mit unterschiedlichem Ansprechen einen Beitrag zur Entschlüsselung des Wirkmechanismus leisten. Im ICAM-1^{-/-} NOD Mausmodell der CIDP wurde bereits eine Korrelation zwischen der mRNA Expression von NK-Zell Markern und der Therapieeffizienz einer IVIg-Behandlung festgestellt. Die bisherigen Ergebnisse deuten zudem darauf hin, dass NK-Zellen auch in humanen Patienten mit CIDP eine Rolle im Wirkmechanismus der IVIg-Behandlung spielen. Um weitere Hinweise darauf zu erhalten, wie wichtig NK-Zellen im Wirkmechanismus von IVIg sind, wurde untersucht, ob in Patienten mit CIDP wie im Tiermodell schon vor Behandlungsbeginn ein Zusammenhang zwischen der Therapieeffizienz und der NK-Zell Population besteht. Anders als im Tiermodell konnte in Patienten mit CIDP vor Beginn einer IVIg-Behandlung jedoch kein Zusammenhang festgestellt werden. IVIg-naïve PBMC-Proben von therapierespondierenden und -refraktären Patienten mit CIDP zeigten keine signifikanten Unterschiede in der mRNA Expression der untersuchten NK-Zell Marker. Auch in den Anteilen der NK-Zellen an der Lymphozytenpopulation, den Anteilen der CD56^{dim} und CD56^{bright} Subpopulationen, der Oberflächenexpression von CD16 und weiterer Rezeptoren und der NK-Zell Aktivität zeigten therapierefraktäre und respondierende Patienten keine Unterschiede. Zudem wurde untersucht, ob sich die Effizienz der Therapie bei den Patienten bereits vor Behandlungsbeginn in den Auswirkungen widerspiegelt, welche eine in vitro Inkubation mit Immunglobulinen auf die NK-Zell Population hat. Es zeigten sich in ähnlicher Ausprägung die bereits beschriebenen Effekte der in vitro Inkubation auf die Rezeptorexpression und Aktivität der NK-Zellen und die IVIg-induzierte Hemmung der CD16 Detektion. Jedoch konnte bei keinem dieser Merkmale ein signifikanter Zusammenhang zur Therapieeffizienz bei der untersuchten Patientengruppe festgestellt werden.

Im Gegensatz zu behandlungsnaïven Patienten, konnten jedoch bereits 24 h nach der ersten IVIg-Behandlung signifikante Unterschiede in den IVIg-induzierten Änderungen der NK-Zell Population zwischen Respondern und Non-Respondern festgestellt werden. Dabei wurde geprüft, ob die zuvor beschriebenen Änderungen der NK-Zell Population 24 h nach der ersten IVIg-Behandlung gleichermaßen nach therapeutisch wirkungsvollen und unwirksamen Infusionen auftreten oder ob sie einen Zusammenhang zur Therapieeffizienz aufweisen. Die retrospektive Unterteilung der Patienten anhand ihres Krankheitsverlaufs unter der Behandlung zeigte, dass die IVIg-induzierten Änderungen der NK-Zell Population verstärkt oder sogar ausschließlich in respondierenden Patienten auftreten. Für therapierefraktäre Patienten kann 24 h nach der ersten IVIg-Gabe bei keinem der untersuchten NK-Zell Gene eine signifikante Abnahme der relativen mRNA Expression festgestellt werden. Für einige dieser Gene könnte das an der geringeren Gruppengröße von n = 6 liegen, für andere NK-Zell Gene wird bei Non-Respondern nach der IVIg-Infusion sogar eine tendenzielle Zunahme der Expression festgestellt. Für die mittels Durchflusszytometrie ermittelte IVIg-induzierte Abnahme der NK-Zell Population im peripheren Blut der Patienten wird für IVIg Responder ebenfalls ein stärkerer Effekt beobachtet. Bei diesen Patienten bezieht sich die Reduktion CD16⁺CD56^{dim} CD56^{bright} Subpopulation, wohingegen ausschließlich auf die die Subpopulation keine Abnahme zeigt. Der schwächere Effekt bei therapierefraktären Patienten betrifft dagegen sowohl CD16⁺CD56^{dim} als auch CD56^{bright} NK-Zellen. Dadurch kommt es ausschließlich bei respondierenden Patienten innerhalb der NK-Zell Population zu einem relativen Anstieg der CD56^{bright} Subpopulation, während sich das Verhältnis der Subpopulationen bei Non-Respondern nicht ändert. Auch der zuvor beschriebene relative Anstieg des Anteils NKG2A exprimierender NK-Zellen nach einer IVIg-Infusion kann nur bei respondierenden Patienten gezeigt werden. Bei der Analyse der gesamten Patientengruppe wurde für die Expression von CD335 keine Änderung nach einer IVIg-Gabe festgestellt. Durch die retrospektive Unterteilung anhand der Therapieeffizienz zeigt sich, dass die CD335 Expression in Abhängigkeit des Ansprechens des Patienten auf die Behandlung unterschiedlich von einer IVIg-Gabe beeinflusst wird. Da CD335 vermehrt auf CD56^{bright} NK-Zellen exprimiert wird, führt die relative Zunahme dieser Subpopulation in IVIg-Respondern gleichzeitig zu einem erhöhten Anteil der CD335⁺ NK-Zellen. Bei Non-Respondern kommt es durch IVIg nicht zu einer Verschiebung der Subpopulationen, möglicherweise zeigt sich dort die im *in vitro* Versuch beobachtete IVIg-induzierte Reduktion der CD335 Expression.

Die Ergebnisse zeigen, dass eine IVIg-Infusion sowohl bei respondierenden als auch therapierefraktären Patienten die zuvor beschriebene Migration der CD56^{dim} Subpopulation aus dem peripheren Blut induziert. Der quantitative Unterschied zwischen den Patientengruppen erreicht keine statistische Signifikanz, könnte jedoch auf eine Beeinträchtigung des Effekts bei therapierefraktären Patienten hinweisen, welche zum Ausbleiben des therapeutischen Erfolges beitragen könnte. Zusätzlich führt IVIg in Non-Respondern jedoch zu einer Reduktion der CD56^{bright} Subpopulation. Die damit verbundene Änderung des Anteils der CD56^{bright} Subpopulation korreliert signifikant mit dem Ansprechen der Patienten auf die Therapie, was dafür spricht, dass dieser Effekt ein kritischer Faktor im Wirkmechanismus darstellen könnte. Im Gegensatz zur CD56^{dim} Subpopulation exprimieren CD56^{bright} NK-Zellen ein Repertoire an Chemokinrezeptoren, das ihnen ermöglicht, effektiv in sekundäre lymphatische Organe wie beispielsweise Lymphknoten zu migrieren (Bernardini, Gismondi et al. 2012). Dort sind sie durch die Produktion von Zytokinen (Martin-Fontecha, Thomsen et al. 2004) oder den Zell-Zell Kontakt zu DC (Giroux, Yurchenko et al. 2007) in der Lage, stimulierend auf die Aktivität des adaptiven Immunsystems einzuwirken. Möglicherweise führt eine IVIg-induzierte Migration von CD56^{bright} NK-Zellen in sekundäre lymphatische Organe bei therapierefraktären Patienten zu einer erhöhten Autoimmunreaktion, welche der zuvor beschriebenen immunmodulierenden IVIg-Wirkung der CD56^{dim} Subpopulation entgegen wirkt. Im Zuge von Infektionen migrieren CD56^{bright} NK-Zellen als Reaktion auf verschiedene Stimuli effektiv in sekundäre lymphatische Organe (Martin-Fontecha, Thomsen et al. 2004). Wie IVIg in Non-Respondern eine solche Rekrutierung induzieren könnte ist bisher unklar. Da CD56^{bright} NK-Zellen keinen FcyR exprimieren, handelt es sich jedoch sehr wahrscheinlich nicht um einen direkten Effekt von IVIg.

Unter der Behandlung mit Daclizumab kommt es in MS Patienten zu einer massiven Expansion der CD56^{bright} Subpopulation, welche mit der Therapieeffizienz korreliert (Elkins, Sheridan et al. 2015). Auf den ersten Blick scheint der hier postulierte Mechanismus einer krankheitsfördernden Funktion der CD56^{bright} NK-Zellen den Beobachtungen aus der Behandlung von MS Patienten zu widersprechen. Durch Daclizumab kommt es neben der Expansion jedoch auch zu einer gesteigerten Perforin-Expression und zytotoxischen Aktivität der CD56^{bright} NK-Zellen, welche zudem vermehrt in der Lage sind, autoreaktive T-Zellen durch eine Degranulation lytischer Vesikel zu zerstören (Bielekova, Catalfamo et al. 2006;

Martin, Perry et al. 2010). Durch die erhöhte Verfügbarkeit von IL-2 in Daclizumabbehandelten Patienten erwerben CD56^{bright} NK-Zellen also typische Effektorfunktionen der CD56^{dim} Subpopulation und tragen so zur Limitierung der Autoimmunreaktion bei. Vor diesem Hintergrund besteht die Möglichkeit, dass CD56^{bright} NK-Zellen bei der IVIg-Behandlung von Patienten mit CIDP, ohne zusätzliche IL-2 Stimulation, keine limitierende, sondern eine verstärkende Wirkung auf die Autoimmunreaktion haben.

Die Abhängigkeit zwischen den Auswirkungen einer IVIg-Infusion auf die NK-Zellen von Patienten mit CIDP und der Therapieeffizienz der IVIg-Behandlung, deuten verstärkt auf eine zentrale Rolle der NK-Zell Population in der immunmodulierenden IVIg-Wirkung.

3.3 Mögliche Rolle von Tregs in der IVIg-induzierten Änderung der NK-Zellen und der Therapieeffizienz einer IVIg-Behandlung von Patienten mit CIDP

Für Patienten mit CIDP und weiteren Erkrankungen autoimmunen Ursprungs wurde eine reduzierte Treg Population oder eine Einschränkung ihrer regulatorischen Aktivität (oder beides) im peripheren Blut festgestellt, was vermutlich zur Ausprägung autoimmuner Erkrankungen beiträgt (Viglietta, Baecher-Allan et al. 2004; Valencia, Yarboro et al. 2007; Chi, Wang et al. 2008; Thiruppathi, Rowin et al. 2012). Tregs haben die Fähigkeit, auf vielfältige Weise suppressiv auf Zellen des adaptiven und angeborenen Immunsystems einzuwirken, und so Immunreaktionen zu regulieren (Sakaguchi, Yamaguchi et al. 2008; Tang and Bluestone 2008). Unter anderem sind Tregs in der Lage, direkten Einfluss auf die NK-Zell Population zu nehmen, und dadurch z.B. ihre Effektorfunktionen zu inhibieren, und ihre Proliferation und Rezeptorexpression zu steuern (Pedroza-Pacheco, Madrigal et al. 2013). Darüber hinaus ist bekannt, dass Tregs limitierend auf die Anzahl an NK-Zellen in drainierenden Lymphknoten wirken, und dadurch indirekt die Aktivierung des adaptiven Immunsystems kontrollieren (Giroux, Yurchenko et al. 2007; Kim, Rasmussen et al. 2007). Ob dies über die Regulation der Differenzierung reifer NK-Zellen aus NK-Vorläuferzellen oder die Regulation der Rekrutierung von NK-Zellen aus dem peripheren Blut oder Gewebe vermittelt wird, ist bisher jedoch nicht abschließend geklärt. In den hier untersuchten Patienten mit CIDP wurde festgestellt, dass Patienten, welche nicht auf eine IVIg-Therapie ansprechen, vor Behandlungsbeginn eine verminderte mRNA Expression des Treg-spezifischen Transkriptionsfaktors FOXP3 im peripheren Blut aufweisen. Auf zellulärer Ebene spiegelt sich dies aber nur in einer tendenziell verringerten Treg Population in Non-Respondern wider. Es wird jedoch vermutet, dass eine verminderte FOXP3 Expression in Tregs eine Einschränkung

der regulatorischen Aktivität andeuten könnte (Wan and Flavell 2007; Venken, Hellings et al. 2008). Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass Tregs nicht nur in der Pathophysiologie der CIDP eine wichtige Rolle spielen, sondern darüber hinaus bereits vor Behandlungsbeginn die Therapieeffizienz einer IVIg-Behandlung regulieren. Möglicherweise inhibieren Tregs in der IVIg-Behandlung von Patienten mit CIDP die Extravasation von CD56^{bright} NK-Zellen und die damit einhergehende Stimulation der Immunantwort. Funktionelle Defizite der Treg Population könnten dann einen negativen Einfluss auf die Therapieeffizienz der IVIg-Behandlung haben. Bei der EAE bleibt der protektive IVIg-Effekt in Abwesenheit von Tregs sogar aus (Ephrem, Chamat et al. 2008).

In der EAE und bei Patienten mit autoimmunen Erkrankungen induziert eine Behandlung mit IVIg eine Expansion der Treg Population im peripheren Blut (Ephrem, Chamat et al. 2008; Barreto, Ferreira et al. 2009; Bayry, Mouthon et al. 2012; Chong, Ling et al. 2013). De Groot et al. postulieren, dass dieser Effekt durch spezifische Peptidfragmente in IgG-Präparaten vermittelt wird, welche von APC im MHC-II Komplex präsentiert werden, und zur Aktivierung und Induktion von Tregs führen (De Groot, Cousens et al. 2013). In der EAE wurde gezeigt, dass eine IVIg-induzierte Treg-Expansion abhängig ist von der Anwesenheit einer intakten NK-Zell Population (Chong, Ling et al. 2013). Unsere Ergebnisse zeigen, dass eine IVIg-Behandlung auch bei Patienten mit CIDP zu einer Expansion der Treg Population im peripheren Blut führt. Der beobachtete IVIg-induzierte Anstieg regulatorischer T-Zellen kann jedoch nur bei therapierespondierenden Patienten festgestellt werden. Möglicherweise vermittelt eine IVIg-induzierte Extravasation der CD56^{dim} NK-Zellen und die Interaktionen mit DC im endzündeten Gewebe (Lyse reifer DC, Induktion inhibitorischer DC durch die Freisetzung von IFN-γ) eine Expansion von Tregs. Zudem könnte die gesteigerte IFN-γ Produktion IVIg-stimulierter NK-Zellen eine Differenzierung von CD4⁺ T-Zellen zu CD4⁺ CD25⁺ FOXP3⁺ Tregs induzieren (Wang, Hong et al. 2006; Huang, Li et al. 2009; Huang, Wang et al. 2015). In Non-Respondern könnte eine zusätzliche Rekrutierung der CD56^{bright} Subpopulation in sekundäre lymphatische Gewebe und daraus resultierende Stimulation des adaptiven Immunsystems, diesen Effekt möglicherweise neutralisieren.

4 NK-Zellen als Biomarker zur Identifizierung therapierefraktärer Patienten

Bis zur Identifizierung therapierefraktärer Patienten anhand ihres Krankheitsverlaufs unter der IVIg-Therapie vergeht häufig eine Zeitspanne von mehreren Monaten. Während dieser Dauer sind Non-Responder möglichen Nebenwirkungen der Behandlung ausgesetzt, und eine für sie möglicherweise wirkungsvollere Therapie wird hinausgezögert. Hinzu kommt, dass eine IVIg-Behandlung aufgrund der limitierten Verfügbarkeit und des damit verbundenen hohen Preises des Präparats und des benötigten großen personellen Aufwands sehr hohe Kosten für das Gesundheitswesen verursacht. Daher wäre es sowohl aus Sicht der betroffenen Patienten als auch aus ökonomischer Sicht wünschenswert, einen Marker zu haben anhand dessen sich therapierefraktäre Patienten möglichst früh identifizieren lassen. Für die IVIg-induzierten Änderungen der relativen mRNA Expressionen von CD161, NKG2C, *NKG2D* und *NKG2F* und der Anteile CD56^{bright} und CD335⁺ NK-Zellen zeigte sich eine signifikante Abhängigkeit zur Therapieeffizienz der untersuchten Patientengruppe. Diese Beobachtung macht die Analyse der NK-Zell Population zu einem vielversprechenden Kandidaten auf der Suche nach einem prognostischen Marker für die Therapieeffizienz einer IVIg-Behandlung von Patienten mit CIDP. Um als Biomarker genutzt werden zu können, müssen die verwendeten Merkmale die zu trennenden Gruppen möglichst genau identifizieren. Die Sensitivität eines Biomarkers gibt an, wie hoch der Anteil an der gesuchten Gruppe ist, der das verwendete Merkmal tatsächlich aufweist. Sie beschreibt die Wahrscheinlichkeit, ein Mitglied der gesuchten Gruppe anhand des Merkmals zu identifizieren. Die Spezifität eines Biomarkers beschreibt, wie hoch der Anteil der anderen Gruppe ist, der das gesuchte Merkmal nicht aufweist. Durch sie wird angezeigt wie hoch die Wahrscheinlichkeit ist, ein Mitglied der anderen Gruppe anhand der Abwesenheit des Merkmals zu identifizieren. Ein perfekter Biomarker der ausschließlich in allen Mitgliedern der gesuchten Gruppe gemessen wird, hätte eine Sensitivität und Spezifität von jeweils 100 %. Unter den IVIg-induzierten Änderungen der NK-Zell Population konnte kein einzelnes Merkmal festgestellt werden, in welchem sich alle respondierenden von allen nicht respondierenden Patienten unterschieden. Zu den Merkmalen mit der höchsten Trennschärfe gehörten die mittels Durchflusszytometrie gemessenen Änderungen der CD56^{bright} Subpopulation (als Anteil an der NK-Zell Population) und der CD335

exprimierenden NK-Zellen. Beide Merkmale erreichten jeweils eine Sensitivität von 83,3 % und eine Spezifität von 87,5 % bei der Identifizierung von Non-Respondern. Die IVIg induzierte Änderung der relativen mRNA Expression von NKG2C und NKG2F zeigten jeweils eine Spezifität von 100 %, jedoch nur eine Sensitivität von 66,6 %. Durch eine Verknüpfung dieser vier Merkmale war es jedoch möglich, therapierefraktäre Patienten mit einer Sensitivität und Spezifität von jeweils 100 % zu identifizieren (Abb. III-1). Dazu wurde für jeden Patienten der Mittelwert der IVIg-induzierten Änderung der vier Merkmale berechnet. Therapierespondierende Patienten zeigten für die mittels Durchflusszytometrie ermittelten Änderungen der CD56^{bright} und CD335⁺ NK-Zellen eine Zunahme, jedoch für die durch gPCR ermittelten Änderungen der NKG2C und NKG2F Expression eine Reduktion nach IVIg (vgl. Abb. II-18). Damit alle IVIg-induzierten Änderungen die gleichen Vorzeichen haben, und sich nicht gegenseitig aufheben, wurden zur Berechnung des Mittelwertes die Kehrwerte für die Änderungen der CD56^{bright} und CD335⁺ NK-Zellen eingesetzt. Auf diese Weise ist es in der untersuchten Patientengruppe möglich, einen Schwellenwert (rote Linie) festzulegen welcher alle respondierenden von allen therapierefraktären Patienten trennt. Wie zuvor gezeigt, induziert IVIg die Änderung der NK-Zell Population nicht nur nach der ersten, sondern auch nach nachfolgenden Infusionen. Daher ist es zudem denkbar, Patienten deren Werte sich nach der Initial-Gabe nahe dem Schwellenwert befinden (grau schraffierter Bereich) bei einer nachfolgenden Infusion erneut zu untersuchen.



Abbildung III-1: Verknüpfung IVIg-induzierter NK-Zell Änderung zur Früherkennung des Therapieerfolgs von Patienten mit CIDP

Patienten mit CIDP wurden unmittelbar vor und 24 h nach der ersten IVIg-Gabe Blutproben entnommen und in diesen mittels qPCR und Durchflusszytometrie Änderungen der NK-Zell Population analysiert. (Fortsetzung nächste Seite)

Anhand des Therapieerfolgs wurden die Patienten retrospektiv den Gruppen "Responder" oder "Non-Responder" zugeteilt. Dargestellt ist für jeden untersuchten Patienten der Mittelwert aus den IVIg-induzierten Änderungen (relative mRNA Expression von NKG2C und NKG2F und Kehrwerte der CD56^{bright} und CD335⁺ NK-Zell Subpopulationen, Details siehe Text) im Vergleich zur IVIg-naïven Probe. Die rote Linie markiert einen Schwellenwert welcher die untersuchten Patienten entsprechend ihres Ansprechens auf die IVIg-Therapie unterteilt. Die graue Schraffierung markiert einen Bereich nahe dem Schwellenwert. Patienten deren kombinierte Markeränderung nach der Initialgabe in diesem Bereich liegt, könnten bei einer nachfolgenden Infusion erneut untersucht werden.

Mit Hilfe eines solchen NK-Zell-basierten Biomarkers ließe sich bereits 24 h nach der ersten IVIg-Infusion eine Aussage über die Therapieeffizienz behandelter Patienten mit CIDP treffen. In der hier untersuchten Gruppe von 14 Patienten wären dadurch sechs Non-Responder frühzeitig identifiziert worden. Bevor die Therapierefraktärität dieser sechs Patienten anhand ihres Krankheitsverlaufs diagnostiziert wurde, erhielten sie, während einer durchschnittlichen Behandlungsdauer von etwa fünf Monaten, insgesamt 41 IVIg-Infusionen. D.h., es hätten allein durch die Analyse von Proben dieser 14 Patienten 35 IVIg-Infusionen verhindert werden können und die sechs Patienten hätten durchschnittlich etwa 5 Monate früher eine alternative Behandlung erhalten können.

Bevor die IVIg-induzierte Änderung der NK-Zell Population im klinischen Alltag als Surrogat-Marker für die Therapieeffizienz von Patienten mit CIDP eingesetzt werden kann, ist es notwendig, die Ergebnisse durch Untersuchungen einer unabhängigen größeren Patienten-Kohorte zu validieren und ggf. anzupassen. Da Messfehler schwerwiegende Auswirkungen auf die Therapieentscheidung der untersuchten Patienten haben könnten, ist bei den eingesetzten Analyseverfahren zudem ein hohes Maß Zuverlässigkeit an und Reproduzierbarkeit erforderlich, welche durch regelmäßige Qualitätskontrollen sichergestellt werden müssen.

Aufgrund der klinischen Heterogenität der CIDP ist es denkbar, dass es sich bei der Responder / Non-Responder Differenzierung zudem um eine Unterteilung eigenständiger Krankheitsentitäten handelt (Ripellino, Fleetwood et al. 2014). Demzufolge könnte der hier vorgestellte Marker neben der Hilfe bei Therapieentscheidungen möglicherweise auch zur Diagnose von CIDP-Subvarianten eingesetzt werden.

5 NK-Zellen in der Pathophysiologie der CIDP und des ICAM-1^{-/-} NOD Tiermodells

Die Rolle von NK-Zellen in Erkrankungen autoimmunen Ursprungs ist nicht hinreichend bekannt. Es existieren sowohl Berichte über die Beteiligung von NK-Zellen an der Zerstörung körpereigener Strukturen (Conigliaro, Scrivo et al. 2011) als auch solche über ihre regulatorische Wirkung auf fehlgeleitete Immunreaktionen (Infante-Duarte, Weber et al. 2005). Wie für weitere Autoimmunerkrankungen beschrieben, so besitzen auch Patienten mit CIDP im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe eine reduzierte Anzahl NK-Zellen im peripheren Blut (Sanvito, Makowska et al. 2009). Im Einklang mit dieser Beobachtung zeigen unsere Ergebnisse darüber hinaus einen Zusammenhang zwischen dem Schweregrad der Erkrankung und der NK-Zell Population im peripheren Blut behandlungsnaïver Patienten mit CIDP. Dabei korreliert eine schwere motorische Beeinträchtigung der untersuchten Patienten mit einer geringen mRNA Expression der NK-Zell Rezeptoren CD56 und CD94. Auf zellulärer Ebene zeigen Patienten, deren motorische Beeinträchtigungen mit drei Punkten auf der INCAT-Skala bewertet wurden, einen signifikant geringeren Anteil NK-Zellen an der Lymphozytenpopulation als Patienten ohne, oder mit nur geringen, motorischen Beeinträchtigungen (0 INCAT-Punkte). Diese Beobachtung unterstreicht die wichtige Rolle, die NK-Zellen bei der Entstehung und Progression der CIDP spielen. Aufgrund der vielseitigen Auswirkungen welche NK-Zellen auf eine Immunreaktion haben können, könnten dieser Beobachtung jedoch verschiedene Ursachen zu Grunde liegen. Zum einen könnte eine verminderte Anzahl NK-Zellen auf ein Defizit in der Proliferation oder im Reifungsprozess der NK-Zell Population zurück zu führen sein. Ein systemisches NK-Zell Defizit könnte dann eine eingeschränkte regulatorische NK-Zell Aktivität gegen beispielsweise autoreaktive T-Zellen (Pallmer and Oxenius 2016) oder aktivierte Makrophagen (Nedvetzki, Sowinski et al. 2007) zur Folge haben, was wiederum zu einer verstärkten Autoimmunreaktion gegen PNS-Strukturen führen kann. Zum anderen könnte eine verminderte Anzahl NK-Zellen im peripheren Blut auf eine erhöhte Extravasation der Zellen hindeuten. Durch eine Migration ins entzündete PNS (Noguchi, Yoshita et al. 2005) oder in sekundäre lymphatische Organe (Martin-Fontecha, Thomsen et al. 2004) sind NK-Zellen in der Lage, direkt oder indirekt (über eine Aktivierung des adaptiven Immunsystems) zur Zerstörung körpereigener Strukturen beizutragen. Wie für die EAE beschrieben, kann eine Rekrutierung von NK-Zellen in endzündete Gewebe jedoch auch auf eine lokale Limitierung der Immunreaktion hinweisen (Hertwig, Hamann et al. 2016). Bei der Behandlung von Patienten mit MS wurde für verschiedene Therapeutika ein direkter oder indirekter aktivierender Einfluss auf die NK-Zell Population festgestellt (Chanvillard, Jacolik et al. 2013). Es wird vermutet, dass dies zur Wiederherstellung einer gestörten, NK-Zell vermittelten Regulation autoreaktiver T-Zellen führt (Gross, Schulte-Mecklenbeck et al. 2016). Die hier gezeigten Ergebnisse der *in vitro* Inkubation zeigen ebenfalls eine aktivierende Wirkung von IVIg auf die NK-Zellen von Patienten mit CIDP und Tieren des ICAM-1^{-/-} NOD Mausstamms, welche wahrscheinlich zur therapeutischen IVIg-Wirkung beiträgt. Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass es sich bei der reduzierten NK-Zell Population im peripheren Blut von Patienten mit CIDP um ein systemisches NK-Zell Defizit handelt, welches zur Progression der Autoimmunreaktion beiträgt, oder diese zumindest begünstigt.

Wie bereits beschrieben, besitzt ICAM-1 vielfältige Funktionen in der Adhäsion, Transmigration und Aktivierung von Immunzellen. Unter anderem wird der ICAM-1 Rezeptor LFA-1 (leucocyte function associated molecule-1) auf der Oberfläche von NK-Zellen exprimiert, und spielt dort eine wichtige Rolle bei der Bindung potentieller Zielzellen, der Ausübung ihrer zytotoxischen Effektorfunktion (Barber, Faure et al. 2004; Wang, Jaw et al. 2012), und der Freisetzung von Zytokinen (Fauriat, Long et al. 2010). Dabei induziert die Freisetzung von IFN- γ und TNF- α durch NK-Zellen eine gesteigerte ICAM-1 Expression auf der Zielzelle, und führt zu einer erhöhten zytotoxischen Lyse (Wang, Jaw et al. 2012). Andererseits steigert eine Bindung über ICAM-1 bei Zell-Zell Kontakt in NK-Zellen die Produktion von IFN-γ (Fauriat, Long et al. 2010). ICAM-1 wird unter anderem auf DC (Cumberbatch, Peters et al. 1992), Makrophagen (Hubbard and Giardina 2000) und aktivierten CD4⁺ (Tohma, Ramberg et al. 1992) und CD8⁺ (Zumwalde, Domae et al. 2013) T-Zellen exprimiert. Eine gestörte Interaktion zwischen ICAM-1 und LFA-1 führt zu einer Beeinträchtigung der zytotoxischen Lyse aktivierter CD4⁺ T-Zellen durch NK-Zellen (Nielsen, Odum et al. 2012). In Makrophagen kommt es durch TNF-α zu einer gesteigerten Expression von ICAM-1 (Hubbard and Giardina 2000). Darüber hinaus spielt die ICAM-1/LFA-1 Interaktion eine wichtige Rolle bei der zytotoxischen Lyse aktivierter Makrophagen durch NK-Zellen (Nedvetzki, Sowinski et al. 2007). Patienten, bei denen es durch Mutationen von Bestandteilen der Degranulationsmaschinerie zu einer Störung der zytotoxischen NK-Zell

Aktivität kommt, zeigen eine Akkumulation aktivierter CD8⁺ T-Zellen und eine extensive Gewebeinfiltration aktivierter Makrophagen (Filipovich 2009; Sepulveda, Maschalidi et al. 2015). Neben zahlreichen weiteren Symptomen der Hämophagozytischen Lymphohistiozytose zeigen einige Patienten begleitend autoimmune Erkrankungen verschiedener Gewebe (Fukaya, Yasuda et al. 2008), unter anderem des PNS (De Armas, Sindou et al. 2004). Dies verdeutlicht, dass die NK-Zell vermittelte Regulation eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der Immunhomöostase spielt. Wahrscheinlich führt eine ICAM-1 Defizienz im NOD Mausstamm ebenfalls zu einer verminderten Regulation autoreaktiver Immunzellen durch NK-Zellen, was möglicherweise einen Beitrag zur Ausprägung der peripheren Neuropathie leistet.

Die NK-Zell vermittelte ADCC ist in Anwesenheit verschiedener Rezeptoren auch ohne eine Bindung der Zielzelle über ICAM-1 möglich, jedoch eingeschränkt (Bryceson, March et al. 2005). Dies zeigt sich auch in unserer in vitro Inkubation der murinen PBMC mit humanen IgGs: Da die Zellen der eingesetzten NK-Zielzelllinie "YAC-1" auf ihrer Oberfläche ICAM-1 exprimieren, stimulieren sie die zytotoxische Aktivität (Degranulation) der LFA-1 exprimierenden ICAM-1^{-/-} NOD NK-Zellen. In Abwesenheit von YAC-1 Zellen befinden sich in der Kultur ausschließlich ICAM-1 defiziente Zellen. Im Gegensatz zu humanen PBMC induziert die Zugabe von IVIg in murinen Proben nur einen leichten Anstieg der zytotoxischen NK-Zell Aktivität, wobei die ICAM-1 Defizienz der körpereigenen Zielzellen wahrscheinlich eine stärkere Aktivität verhindert. Für die in NK-Zellen mittels Zellkontakt induzierte Produktion von IFN-y spielt die Bindung über ICAM-1, selbst bei gleichzeitiger Aktivierung über CD16, eine fast essentielle Rolle (Fauriat, Long et al. 2010). Dies zeigt sich ebenfalls in unseren in vitro Versuchen: während IVIg in humanen NK-Zellen, in Abwesenheit von NK-Zielzellen, die Produktion von Zytokinen induziert, führt IVIg in murinen NK-Zellen, aufgrund der ICAM-1 Defizienz, nicht zu einer gesteigerten Zytokinproduktion. Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass die ICAM-1 Defizienz im Tiermodell eine abgeschwächte Therapieeffizienz einer IVIg-Behandlung zur Folge haben könnte. Wie im humanen System könnte IVIg im ICAM-1^{-/-} NOD Tiermodel zu einer NK-Zell vermittelten ADCC gegen beispielsweise reife DC führen, was eine verminderte Aktivierung autoreaktiver T-Zellen zur Folge hätte (Tha-In, Metselaar et al. 2007). Jedoch würde die IVIg-induzierte ADCC, anders als in Patienten mit CIDP, aufgrund der ICAM-1 Defizienz der Zielzellen keine IFN-y Produktion der NK-Zellen induzieren. Dies könnte eine verminderte IFN-y vermittelte Induktion inhibitorischer DC (Rojas and Krishnan 2010; Kerkar, Chinnasamy et al. 2014) oder Differenzierung von CD4⁺ T-Zellen zu CD4⁺ CD25⁺ FOXP3⁺ Tregs (Wang, Hong et al. 2006) zur Folge haben. Möglicherweise könnte dies die beobachteten Diskrepanzen zwischen Tiermodell und Patienten mit CIDP in der Korrelation der Therapieeffizienz mit der NK-Zell Population erklären. Im Tiermodell bestimmt die Größe der NK-Zell Population das Ansprechen auf die IVIg-Therapie, da NK-Zellen nur durch die direkte Lyse ihrer IVIgmarkierten Zielzellen regulatorischen Einfluss auf die Immunantwort nehmen können. In Patienten mit CIDP spielt die Größe der NK-Zell Population dagegen eine untergeordnete Rolle in der Therapieeffizienz, da die zusätzliche IVIg-induzierte Produktion von Zytokinen zu einer Induktion weiterer regulatorischer Immunzellen führt, wodurch die immunmodulierende Wirkung verstärkt wird.

6 Fazit und Ausblick

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, einen Beitrag zum Verständnis des Wirkmechanismus einer IVIg-Behandlung von Patienten mit CIDP zu leisten. Die tierexperimentellen Daten weisen auf eine Beteiligung der NK-Zell Population an der Vermittlung der IVIg-Wirkung, sowie auf eine mögliche Übertragbarkeit ins humane System. In vitro bindet IVIg über CD16 direkt an die Zellmembran humaner NK-Zellen, und induziert dort eine Steigerung der zytotoxischen Aktivität und Zytokinproduktion, was auf eine IVIg-vermittelte ADCC der NK-Zell Population gegen körpereigene Immunzellen hindeutet. Nach einer therapeutisch wirksamen IVIg-Infusion kommt es im peripheren Blut von Patienten mit CIDP in vivo zudem zu einer raschen Reduktion der CD56^{dim} NK-Zell Population, welche wahrscheinlich auf eine IVIg-induzierte selektive Extravasation der Subpopulation zurückzuführen ist. Zusammengenommen, liefern diese Beobachtungen Hinweise auf eine IVIg-induzierte Migration der CD56^{dim} NK-Zell Subpopulation in periphere Gewebe, wo sie durch die Lyse autoreaktiver Zellen und die Produktion von Zytokinen regulatorisch auf die Autoimmunreaktion einwirken könnten. Auf diese Weise könnten NK-Zellen z.B. die in respondierenden Patienten beobachtete IVIg-induzierte Expansion regulatorischer T-Zellen vermitteln. In therapierefraktären Patienten kommt es nach einer IVIg-Infusion neben der Reduktion von CD56^{dim} NK-Zellen zu einer gleichzeitigen Reduktion der CD56^{bright} Subpopulation. Möglicherweise führt IVIg in diesen Patienten, ähnlich wie im Zuge einer Infektion, zu einer Rekrutierung der CD56^{bright} NK-Zellen in sekundäre lymphatische Organe, wo sie durch Interaktionen mit APC und Zellen des adaptiven Immunsystems eine Progression der Autoimmunreaktion fördern könnten. Sowohl die NK-Zell Aktivität, als auch ihre Expression und Lokalisation stehen auf vielfältige Weise unter der Regulation von Tregs. Therapierefraktäre Patienten weisen bereits vor Initiierung einer IVIg-Behandlung eine reduzierte FOXP3 mRNA Expression auf, was auf eine verminderte regulatorische Aktivität der Treg Population hindeutet. Dieses Treg-Defizit könnte für die qualitativen Unterschiede der IVIg-induzierten NK-Zell Reduktion zwischen den Patientengruppen verantwortlich sein. Die vorgestellten Ergebnisse zeigen eine bisher unbekannte Rolle der NK-Zell Population bei der Vermittlung der immunmodulierenden IVIg-Wirkung in Patienten mit CIDP. In Zukunft müssen weitere Untersuchungen das Ziel der IVIg-induzierten Migration der NK-Zell Subpopulationen und dortige Interaktionen mit autoreaktiven oder regulatorischen

Immunzellen aufklären. Zudem könnte die Untersuchung einer IVIg-vermittelten Treg-NK-Zell Interaktion zu einem verbesserten Verständnis des Mechanismus beitragen, und dessen gezielte Modulation möglicherweise zu einer erhöhten Therapieeffizienz führen.

Neben Rückschlüssen auf den IVIg-Wirkmechanismus lassen die beobachteten Differenzen in den Effekten einer IVIg-Infusion auf die NK-Zell Subpopulationen zwischen therapierespondierenden und –refraktären Patienten mit CIDP bereits 24 h nach der ersten Verabreichung eine Unterteilung der beiden Patientengruppen zu. Dies ist ein wichtiger Schritt auf der Suche nach einem Biomarker zur Früherkennung der Therapieeffizienz, jedoch müssen die eingesetzten Unterscheidungsmerkmale vor einer klinischen Verwendung zunächst in Studien mit größeren unabhängigen Patientenkohorten retrospektiv und prospektiv validiert werden. Die Etablierung des Markers würde therapierefraktären Patienten mehrere Monate einer unwirksamen Behandlung ersparen, und die frühzeitige Initiierung einer für sie möglicherweise wirkungsvolleren Therapie ermöglichen. Zudem würden durch die Vermeidung unnötiger IVIg-Infusionen hohe Kosten für das Gesundheitssystem eingespart.

Die Analyse von Blutproben behandlungsnaïver Patienten mit CIDP zeigt einen Zusammenhang der NK-Zell Population mit dem Schweregrad der Erkrankung, wobei eine schwerere motorische Beeinträchtigungen mit einer geringeren Populationsgröße einhergeht. Zudem ist denkbar, dass die ICAM-1 Defizienz im Tiermodell der CIDP und die dadurch hervorgerufenen funktionellen Defizite der NK-Zellen an der Entstehung der peripheren Neuropathie beteiligt sein könnten. Dies deutet auf eine wichtige Rolle von NK-Zellen bei der Limitierung autoimmuner Erkrankungen, wodurch ein NK-Zell Defizit die Progression einer Autoimmunreaktion begünstigen könnte.

Insgesamt deuten meine Ergebnisse auf eine wichtige Funktion von NK-Zellen in der Aufrechterhaltung der Immunhomöostase. Durch eine IVIg-Behandlung könnte es in Patienten mit CIDP zu einer temporären Wiederherstellung einer defizitären NK-Zell vermittelten Regulation kommen.

IV Zusammenfassung

Obwohl intravenöse Immunglobuline (IVIg) eine wichtige Therapieoption der chronisch inflammatorischen demyelinisierenden Polyneuropathie (CIDP) darstellen, ist der zugrundeliegende Wirkmechanismus bisher nicht vollkommen aufgeklärt. Darüber hinaus spricht trotz der hohen Therapieeffizienz – ein signifikanter Anteil von Patienten mit CIDP nicht auf eine IVIg-Behandlung an. Ein Surrogatmarker für das Ansprechen auf die Therapie könnte therapierefraktäre Patienten vor einer für sie wirkungslosen Behandlung von bis zu mehreren Monaten bewahren, bevor sie anhand ihres Krankheitsverlaufs identifiziert werden können. In Studien des ICAM-1^{-/-} NOD Mausmodells der CIDP stellte unsere Arbeitsgruppe eine mögliche Beteiligung der Natürlichen-Killerzellen (NK-Zellen) im IVIg-Wirkmechanismus fest. NK-Zellen sind Teil des angeborenen Immunsystems und lassen sich anhand der CD56 Oberflächenexpression in zytotoxische CD56^{dim} und Zytokin-produzierende CD56^{bright} Subpopulationen unterteilen, welche wichtige Rollen bei der Bekämpfung virusinfizierter oder entarteter Körperzellen übernehmen. Durch die Analyse der Effekte die IVIg auf NK-Zellen hat möchte ich zum Verständnis der immunmodulierenden IVIg-Wirkung in Patienten mit CIDP beitragen und herausfinden, ob sich NK-Zellen als Marker zur Vorhersage der Therapieeffizienz einsetzen lassen.

Durch den Einsatz von Durchflusszytometrie und qPCR Analysen habe ich Effekte untersucht, welche IVIg *in vitro* und *in vivo* auf NK-Zellen des peripheren Blutes hat. Dabei konnte ich *in vitro* beobachten, dass IVIg über CD16 direkt an der NK-Zell Membran bindet und dort, trotz der Abwesenheit NK-Zell sensitiver Zielzellen, zu einer Steigerung der zytotoxischen Aktivität und Zytokinproduktion führt. Gleichzeitig induziert IVIg Anzeichen einer Erschöpfung der NK-Zell Population. *In vivo* führt eine IVIg-Behandlung von Patienten mit CIDP innerhalb von 24 h zu einer signifikanten Reduktion der NK-Zellen im peripheren Blut. Interessanterweise beschränkt sich die Reduktion in respondierenden Patienten auf die CD56^{dim} Subpopulation, wohingegen in therapierefraktären Patienten sowohl CD56^{dim} als auch CD56^{bright} NK-Zellen betroffen sind. Die Korrelation zur Therapieeffizienz deutet auf eine wichtige Funktion der NK-Zell Effekte in der immunmodulierenden IVIg-Wirkung. Die Reduktion der CD56^{dim} NK-Zellen könnte durch eine Migration in periphere Gewebe hervorgerufen werden wo sie durch eine IVIg-vermittelte ADCC gegen autoreaktive Zellen zur Linderung der Erkrankung

beitragen könnten. Hingegen könnte in Non-Respondern eine gleichzeitige Rekrutierung von CD56^{bright} NK-Zellen in sekundäre lymphatische Organe eine Verstärkung der Autoimmunreaktion zur Folge haben. Weiterführende Daten sprechen für eine Beteiligung regulatorischer T-Zellen (Treg) an der Vermittlung des IVIg-Effekts in Patienten mit CIDP. Dabei besitzen Tregs beispielsweise das Potential, die selektive Migration von NK-Zell Subpopulationen zu steuern.

Die Unterschiede in den IVIg-induzierten Änderungen der NK-Zell Population zwischen Respondern und Non-Respondern ermöglichen eine Unterteilung der Patienten entsprechend ihres Ansprechens auf die Behandlung. Prospektive Studien mit unabhängigen Patientengruppen müssen zeigen, ob die NK-Zell Effekte als Surrogatmarker für den Therapieerfolg einer IVI-Behandlung von Patienten mit CIDP dienen können.

Summary

Intravenous immunoglobulins (IVIg) are a first-line treatment for various autoimmune diseases in particular in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy (CIDP), however the exact mechanism of action still remains unknown. Despite the high efficiency of IVIg in treating CIDP there is still a significant proportion of patients that does not respond to therapy. The lack of a predictive marker for IVIg-responsiveness avoids the preservation of not responding patients from a treatment period of up to several months before discrimination into responders and non-responders is possible. Studying the ICAM-1^{-/-} NOD mouse model of CIDP our group found a possible role for Natural Killer (NK) cells in the immunomodulatory effects of IVIg. NK cells are part of the innate immune system with regulatory and effector functions playing an important role in early reactions in anti-viral and anti-tumour defences. By analysing the effects of IVIg on NK cells I want to contribute to the understandings of the immunomodulatory mechanisms of IVIg in patients with CIDP and examine if NK cells could serve as a marker in predicting the outcome of the treatment.

Using flow cytometry and qPCR analysis I studied the effects of IVIg on peripheral blood lymphocytes *in vitro* as *in vivo*. Thereby I found that *in vitro*, IVIg binds to the NK cell membrane via CD16 and induces both cytotoxic activity and cytokine production in the absence of NK cell sensitive target cells, whereas in parallel causes signs of NK cell exhaustion. In peripheral blood of patients with CIDP IVIg treatment leads to a decline in the proportion of NK cells within 24 h. Interestingly, I found that in patients responding to IVIg therapy the observed reduction is restricted to the cytotoxic CD56^{dim} subpopulation whereas in non-responders both CD56^{dim} and regulatory CD56^{bright} NK cells are affected. The observed differences in quantity and quality of IVIg induced NK cell changes and their correlations with treatment efficiency suggest that NK cells might play a crucial role in the immunomodulatory mechanism of IVIg. Furthermore, these observations point to an IVIg induced ADCC against autoreactive immune cells may limit autoimmunity. However in non-responders the concurrent homing of CD56^{bright} NK-cells could augment autoimmune reactions, contradicting this mechanism. Additional data suggest that regulatory T cells could be

involved in mediating the immunomodulatory IVIg-effects by regulating a selective NK cell migration.

Using the differences in IVIg-induced NK cell changes between responders and nonresponders I was able to set a threshold that discriminates all included patients according to their responsiveness to therapy. Future studies with independent groups of patients must prove if the effects on NK cells represent a potential surrogate marker in predicting the outcome of IVIg-treatment in patients with CIDP.

v Material und Methoden

1 Materialien

1.1 Bezugsquellennachweis

Alle Chemikalien wurden in pro Analysis-Qualität bezogen. Zum Ansetzen der Lösungen wurde steriles Wasser von B. Braun (Melsungen, Deutschland) verwendet, nachfolgend als Aqua dest. bezeichnet.

1.1.1 Chemikalien

BD Pharmlyse β-Mercaptoethanol (50 mM) Diethylpyrocarbonat (DEPC) Dimethylsulfoxid (DMSO) Ethanol Ethylendiamintetraacetat (EDTA) **Ficoll-Paque Plus** Fötales Kälberserum (FCS) Interleukin-2 human Interleukin-2 murin Isopropanol IVIg-Kontrollösung Kiovig 100 mg/ml L-Glutamin 200 mM Paraformaldehyd Phosphate Buffered Saline (PBS) Penicillin/Streptomycin Trypanblau

1.1.2 Geräte und Materialien

96-Well-Rundbodenplatte

BD Biosciences (San Diego, CA, USA) Invitrogen (Karlsruhe, DE) Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) Carl Roth (Karlsruhe, DE) Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) GE Healthcare (Uppsala, SE) Lonza (Verviers, BE) Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) Carl Roth (Karlsruhe, DE) Baxter (Wien, AT) Baxter (Wien, AT) Gibco (Paisley, UK) Merck (Darmstadt, DE) Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) Gibco (Grand Island, NY, USA) Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)

nunc (Roskilde, DK)

ABI Prism 7000 (qPCR Maschine)	Applied Biosystems (Foster City, CA, USA)
Combitips	Eppendorf (Hamburg, DE)
EDTA-Vacutainer (3 ml, 10 ml)	BD (Plymouth, UK)
Einfrierhilfe (Cryo 1°C Freezing Container)	Thermo Fisher (Waltham, MA, USA)
Einfrierröhrchen	greiner bio-one (Frickenhausen, DE)
Einmalspritzen (1 ml, 2 ml, 5 ml)	B. Braun (Melsungen, DE)
FACS Canto II	BD Biosciences (Heidelberg, DE)
FACS Röhrchen (75 mm x 12 mm)	Sarstedt (Nümbrecht, DE)
Heizschüttler	Eppendorf (Hamburg, DE)
Heraeus B5060 EK/CO2 (Brutschrank)	Thermo Fisher (Waltham, MA, USA)
Heraeus Fresco 17 (Zentrifuge)	Thermo Fisher (Waltham, MA, USA)
Heraeus Megafuge 40R (Zentrifuge)	Thermo Fisher (Waltham, MA, USA)
Kanülen	B. Braun (Melsungen, DE)
Mikroskop	Leica (Wetzlar, DE)
Multipette	Thermo Fisher (Waltham, MA, USA)
NanoDrop 1000	Thermo Fisher (Waltham, MA, USA)
Neubauer Zählkammer	Laboroptik (Lancing, UK)
Optical 96-Well Reaction Plate	Applied Biosystems (Foster City, CA, USA)
PAXgene Blood RNA Tube	PreAnalytix (Hombrechtikon, CH)
PCR Single Cap 8er-SoftStrips 0,2 ml	Biozym Scientific (Hessisch Oldendorf, DE)
Petrischalen 10 cm Durchmesser	greiner bio-one (Frickenhausen, DE)
Pipetten	Eppendorf (Hamburg, DE)
Pipettenspitzen (mit und ohne Filter)	Starlabg (Hamburg, DE)
Pipettierhilfe (Pipetboy 2)	Integra Biosciences (Zizers, CH)
Reaktionsgefäß (1,5 ml)	Sarstedt (Nümbrecht, DE)
Sterilwerkbank (Herasafe)	Heraeus (Hanau, DE)
Sterilfilter (0,2µm)	Sarstedt (Nümbrecht, DE)
Stripetten (5, 10, 25 ml)	Corning (Corning, NY, USA)
Thermocycler	Applied Biosystems (Foster City, CA, USA)
Vortex Mixer	Labinco (Breda, NL)
Zellkulturflaschen	greiner bio-one (Frickenhausen, DE)
Zellsieb (40μm, 70μm)	BD Biosciences (Heidelberg, DE)

Zentrifugationsröhrchen (15 ml, 50 ml)

greiner bio-one (Frickenhausen, DE)

1.2 Medien und Puffer

Blutentnahme (BE)-Puffer	PBS
	2 % (v/v) FCS
	10mM EDTA
	steril filtriert
Einfrierpuffer	FCS
	20 % DMSO
FACS-Puffer	PBS
	2 % (v/v) FCS
PRIMC-Medium	IMDM Medium (Lonza, Verviers, BE)
	10 % (v/v) FCS
	2 mM L-Glutamin
	1 % Penicillin/Streptomycin (v/v)
PBMC-Medium ⁺	PBMC-Medium
	100 U/ml IL-2
K562-Medium	DMFM (GlutaMAX-I) Medium (gibco, Paisley, LIK)
	2 mM L-Glutamin
	1 % Denicillia/Strentomycin (w/w)
YAC-1-Medium	RPMI 1640 Medium (gibco, Paisley, UK)
	10 % (v/v) FCS
	2 mM L-Glutamin
	1 % Penicillin/Streptomycin (v/v)

1.3 FACS Antikörper

Antigen	Fluorophore	Klon	Firma
CD3	Brilliant Violet 510	Okt 03	Biolegend
CD4	PacBlue	RPA-T4	BD Biosciences
CD8	PerCp-Cy5.5	RPA-T8	BD Biosciences
CD16	APC-Cy7	3G8	BD Biosciences
CD16	FITC	3G8	BD Biosciences
CD19	APC	SJ25C1	BD Biosciences
CD25	FITC	M-A251	Biolegend
CD56	Brilliant Violet 421	NCAM16.2	BD Biosciences
CD56	PE	NCAM16.2	BD Biosciences
CD107a	APC-Cy7	H4-A3	Biolegend
CD161	PE-Cy7	HP-3G10	Biolegend
CD335	PerCp-Cy5.5	9E2	Biolegend
FOXP3	PE	150D	Biolegend
IFN-γ	PacBlue	4S.B3	Biolegend
NKG2A	APC	REA110	Miltenyi
NKG2C	PE	REA205	Miltenyi
NKG2D	VioBright FITC	BAT221	Miltenyi
TNF-α	PacBlue	MAb11	Biolegend

FACS Antikörper gegen humane Antigene

FACS Antikörper gegen murine Antigene

Antigen	Fluorophore	Klon	Firma
CD3	Brilliant Violet 510	17A2	Biolegend
CD16	PE	93	Biolegend
CD107a	APC	1D4B	BD
CD161c	APC-Cy7	РК136	BD
CD335	PE-Cy7	29A1.4	Biolegend
FOXP3	eFluor450	FJK-16s	eBioscience
IFN-γ	PE	XMG1.2	BD

NKG2A/C/E	PerCP-eFluor710	20d5	eBioscience
TNF	PE	MP6-XT22	BD

1.4 Primer

Alle Primer stammen von Invitrogen[™] (Carlsbad, USA), wurden als Lyophilisat erhalten und in Aqua dest. zu einer Konzentration von 100 µM rekonstituiert.

Humane Primer

Bezeichnung	Primersequenz (5'→3')	Fragment Länge (nt)	
ACTB FWD	CTG GGA GTG GGT GGA GGC	57	
ACTB REV	TCA ACT GGT CTC AAG TCA GTG	57	
CD16a FWD	GTG TCA CTG TCC CAA GTT GC	205	
CD16a REV	GCT ACA CAG GAA TTA GAT ATT GAA GC	203	
CD25 FWD	ACG GGA AGA CAA GGT GGA C		
CD25 REV	TGC CTG AGG CTT CTC TTC A	65	
CD56 FWD	TGT GTG ATG TGG TCA GCT CC	162	
CD56 REV	TGC CCT CAC AGC GAT AAG TG	102	
CD94 FWD	CTC TTA CAG TGA GGA GCA CAC C		
CD94 REV	TTG TAT TAA AAG TTT CAA ATG ATG GAA	92	
CD161 FWD	AAA TGC AGT GTG GAC ATT CAA	91	
CD161 REV	CTC GGA GTT GCT GCC AATA		
CD335 FWD	CCC ACA GAG GGA CAT ACC GAT	100	
CD335 REV	AGG CTG GTG TTC TCA ATG TCG	109	
FOXP3 FWD	CTT CCT TGA ACC CCA TGC	70	
FOXP3 REV	GAG GGT GCC ACC ATG ACT A	70	
GAPDH FWD	TGG ACC TGA CCT GCC GTC TA	150	
GAPDH REV	AGG AGT GGG TGT CGC TGT TG		
IL-10 FWD	TGA AAA CAA GAG CAA GGC CG	83	
IL-10 REV	CAC TCA TGG CTT TGT AGA TGC C		
NKG2A FWD	ACC TAT CAC TGC AAA GAT TTA CCA	144	
NKG2A REV	GGA AGA ATT GTT GTG CCT CTG		
NKG2C FWD	CAA AAT CCT TCC CTG AAT CAT C	89	
NKG2C REV	ACC TCG GCA GTG AGC TTC T		
NKG2D FWD	GCT TCG AAG AAC TCT GAT CTG C	101	
NKG2D REV	TTC GTT TAG TTC AAA TGG CAA C	101	

NKG2E FWD	GCA GGC CTG TGC TTC AAA GA	101
NKG2E REV	CCC ATG GAT GAT GAC TGC TG	151
NKG2F FWD	ACT GCA AAG GTT TAC TGC CAC	127
NKG2F REV	AAA ATT GTT CTG CTC CAG TAC TCC	157

Murine Primer

Bezeichnung	Primersequenz (5'→3')	Fragment Länge (nt)	
mu GAPDH FOR	AGG TTG TCT CCT GCG ACT TCA	101	
mu GAPDH REV	CCA GGA AAT GAG CTT GAC AAA G		
mu Kira2 FOR	GAA TCG CAA CAG ATT GGT GA	107	
mu Klra2 REV	CAG GGA AAG AAA TCC ACA GG		
mu KIra3 FOR	AAC GCC AAC GTT TCA GAC A	93	
mu Klra3 REV	ACC TCT GGC TCA CTC ATC GT		
mu Kira8 FOR	CAA GAG TGT TTC AGA TTC TTC ACG	74	
mu Klra8 REV	AAC ATT TAG TAC CAT AGC AGA ACC AG		
mu Kira9 FOR	AGA CGG TTT TAG ATT CCT CAC G	70	
mu Klra9 REV	CAT TTA GTA CCA TAG CAG AAC CAG TG	70	
mu Klra10 FOR	TTG CAG TGT TGG CAG TAA AGA	103	
mu Klra10 REV	AAA TCC CTT TGC ATG TTG CT		
mu Klrb1b FOR	GGC ACA GCT TTC AAT TCT GA	109	
mu Kirb1b REV	TGT CTG AAG AAC AGC CCT CA	109	
mu Kirb1c FOR	TGG CAC AAC TTT CAA TTC TGA	103	
mu Klrb1c REV	AGC ACA GCT CTC AGG AGT CAC		
mu Klrc1 FOR	GCC ACA CCA TAT ACC GAA GC	05	
mu Klrc1 REV	CAA GGC TGT GCT GAA GAT AGA G	95	
mu Klrc2 FOR	AGT TTG GGG TCC TGC CTTT	101	
mu Klrc2 REV	CCA GTC CAT GAG ACC AGT GA	101	
mu Klri2 FOR	TCT TGA TCC TCT ATG TGA CAG GAA	78	
mu Klri2 REV	TTG TTT CCA AAA GCA ATC CA		

1.5 Kits

BD Cytofix/Cytoperm™ Plus	BD Biosciences, San Diego, USA	
FOXP3 Staining Buffer Set	eBioscience, San Diego, USA	
High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems, Foster City, USA	
PAXgene [®] Blood RNA Kit	PreAnalytiX, Hombrechtikon, Schweiz	
Power SYBR Green Master Mix	Thermo Fisher (Waltham, MA, USA)	
1.6 Zelllinien		
K562	zur Verfügung gestellt von Prof. Uhrberg	
YAC-1	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)	
1.7 Software		
Flowjo	TreeStar (Ashland, OR, USA)	
BD FACSDiva	BD Biosciences (San Diego, CA, USA)	
Prism	GraphPad Software (La Jolla, CA, USA)	

2 Methoden

2.1 Diagnose und Klassifizierung von Patienten mit CIDP

Die Diagnose der Patienten mit CIDP beruht auf den Kriterien der "European Federation of Neurological Societies/Peripheral Nerve Society" und erfolgte in der Neurologischen Klinik des Universitätsklinikums Düsseldorf. Der Schweregrad der Erkrankung der untersuchten Patienten wurde vom behandelnden Arzt auf Grundlage des 10 Punkte "Inflammatory Neuropathy Cause and Treatment overall disability sum score" (INCAT score) beurteilt (Hughes, Bensa et al. 2001). Dazu werden die Patienten zu Einschränkungen ihrer motorischen Fähigkeiten bei alltäglichen Abläufen befragt. Die Einschränkungen der oberen und unteren Extremitäten werden mit jeweils bis zu 5 Punkten bewertet und anschließend addiert. Behandlungsentscheidungen wurden vom jeweils behandelnden Arzt entsprechend internationaler Richtlinien getroffen. Patienten deren INCAT score über 6 Monate unverändert blieb, wurden als klinisch stabil eingestuft. Ein Patient wurde als "End-of-dose" positiv bezeichnet, wenn er innerhalb von 6 Monaten mindestens 5-mal Rückfall-Erscheinungen zum Ende des Behandlungsintervalls (Tag 14-40 nach der letzten IVIg-Gabe) beklagte, welche nach erneuter IVIg Verabreichung nachließen. Patienten wurden als Therapie-Responder eingestuft, wenn sie sich nach 4 Monaten Behandlung um mindestens einen INCAT Punkt verbesserten.

2.2 Entnahme humaner Blutproben

Es wurden sowohl die *in vitro* als auch *in vivo* Effekte untersucht, die eine Behandlung mit IVIg auf humane Zellen des peripheren Bluts hat. Dazu wurden Patienten mit CIDP Blutproben für verschieden Untersuchungen entnommen. Die Studie wurde von der lokalen Ethikkommission genehmigt (Ethikkommission Universität Düsseldorf, #4870) und alle Patienten haben eine schriftliche Einwilligungserklärung abgegeben. Für die nachfolgenden Untersuchungen, wurden den Patienten jeweils zwei 10 ml EDTA-Vacutainer Vollblut entnommen, und innerhalb von maximal 3 h die darin enthaltenen mononukleären Zellen isoliert. Des Weiteren wurde jedem Patienten ein PAXgene Blood RNA Tube für die RNA-Expressionsanalysen entnommen. Die Blutentnahmen der Patienten mit CIDP erfolgten zeitlich jeweils unmittelbar vor der ersten Verabreichung von IVIg, 24 h nach einer IVIg Gabe oder unmittelbar vor einer der nachfolgenden IVIg Gaben.

2.3 Zellbiologische Methoden

Alle Schritte der Zellkultivierung wurden unter sterilen Bedingungen mit sterilen Medien, Lösungen und Materialien an einer Sterilwerkbank durchgeführt, um so Kontamination mit Pilzen und Bakterien zu vermeiden.

2.3.1 Isolierung mononukleärer Zellen des peripheren Blutes (PBMC)

Mononukleäre Zellen wurden aus humanem, peripheren Blut mittels eines Ficoll-Dichtegradienten isoliert. Nach Abnahme wurde das Blut in einem Verhältnis von 1:2 mit PBS verdünnt, und vorsichtig auf 15 ml Ficoll-Paque Plus in einem 50 ml Zentrifugenröhrchen geschichtet. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation für 25 Minuten bei 840 x g, ohne aktivierte Bremse. Durch die Zentrifugation werden vier Schichten unterschiedlicher Dichte erzeugt: Die oberste, leichteste Schicht setzt sich aus Blutplasma und PBS zusammen. Unter ihr bildet sich ein farbloser Ring aus mononukleären Zellen, die sog. Interphase. Unter der Interphase sammelt sich der Ficoll, welcher die Interphase von der dichtesten, untersten Schicht aus roten Blutkörperchen (Erythrozyten) und Granulozyten trennt. Die Interphase wurde mit so wenig Ficoll wie möglich in ein frisches Röhrchen überführt, und zweimal mit PBMC-Medium gewaschen. Zentrifugiert wurde für 10 Minuten bei 560 x g mit eingeschalteter Bremse. Der Überstand wurde verworfen, und das Pellet in 1,5 ml PBMC-Medium resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen gezählt und eingefroren.

2.3.2 Auszählung vitaler Zellen

Aus einer Zellsuspension wurde ein Volumen von 10 μ l steril entnommen, 1:2 mit Trypanblau gemischt, davon 10 μ l in eine Neubauerzählkammer überführt, und am Lichtmikroskop ausgezählt. Gezählt wurden nur die lebenden, d. h. die nicht mit Trypanblau gefärbten Zellen. Die Zellen wurden in einem Großquadrat (16 Kleinquadrate) ausgezählt. Die Zellzahl pro ml Suspension ergibt sich aus der Formel: Zellzahl pro Großquadrat x Verdünnungsfaktor x 10⁴.

2.3.3 Einfrieren von Zellen

Die Zellen wurden für die Langzeitlagerung in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Beim Einfrieren wurde DMSO zugesetzt, welches die Bildung von Eiskristallen beim Einfriervorgang verhindert, und so die Zellen vor mechanischer Beschädigung schützt. Jeweils 0,5 ml einer 1,5 ml Zellsuspension wurden auf drei Einfrierröhrchen verteilt, in die zuvor je 0,5 ml Einfrierpuffer vorgelegt wurde. Die Röhrchen wurden in eine mit Isopropanol befüllte Einfrierhilfe überführt, und sofort auf Trockeneis gelagert. Dabei sorgt die Einfrierhilfe für eine langsame Absenkung der Temperatur um -1°C/min. Nach ca. 24 h wurden die Zellen für die endgültige Aufbewahrung in die Gasphase über flüssigem Stickstoff (- 196°C) in einem Stickstofftank überführt.

2.3.4 Auftauen von Zellen

Die eingefrorenen Zellen wurden auf Trockeneis ins Labor transportiert, zunächst durch Zugabe von 37°C warmem PBMC-Medium aufgetaut, und anschließend in 14 ml des Mediums aufgenommen. Nach einer Zentrifugation für 10 Minuten bei 472 x g wurden die Zellen erneut in 15 ml gewaschen, und anschließend gezählt, und auf die gewünschte Zelldichte eingestellt.
2.3.5 Zellkultur

Alle Zellkulturen wurden in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre bei 37 °C mit 5 % CO_2 inkubiert. Zelllinien K562 und YAC-1 wurden in entsprechenden Medien in 75 cm² Zellkulturflaschen kultiviert. Zelllinie K562 wurde alle 3-4 Tage mit einer Zelldichte von 1 x 10^5 Zellen/ml in frisches Medium überführt. Zelllinie YAC-1 wurde alle 2-3 Tage auf eine Dichte von 5 x 10^4 Zellen/ml gebracht.

2.4 Tierversuche

2.4.1 Mäuse

Als Tiermodell für die CIDP wurden ICAM-1^{-/-} NOD-Mäuse eingesetzt, die ab einem Alter von ca. sieben Monaten eine spontane periphere Neuropathie entwickeln.

2.4.2 ICAM-1^{-/-} NOD Neuropathie versuchsspezifischer Scoresheet

0 = normal

1 = reduzierter Tonus der Schwanzmuskulatur, hängende Schwanzspitze

- 2 = schlaffer Schwanz, Aufrichtreflex (beim Anheben des Tieres am Schwanz) beeinträchtigt
- 3 = Aufrichtreflex nicht möglich
- 4 = Gangataxie (Gangunsicherheit), abnormale Körperhaltung
- 5 = diskrete Paraparese (leichte Schwächung der Hinterläufe, Nachlassen der Muskelkraft,

Tiere können aber Hinterläufe noch bewegen)

6 = deutliche Paraparese beider Hinterläufe (Lähmung der Hinterläufe)

2.4.3 Blutentnahme bei Mäusen

Um Blutproben von Mäusen zu gewinnen, wurden die Tiere zunächst durch zervikale Dislokation getötet und der Brustkorb unterhalb des Sternums geöffnet. Durch Durchtrennen der Rippen und des Zwerchfells wurde das Herz freigelegt. Anschließend wurde durch Punktion des Herzmuskels Blut in eine mit Blutentnahme-Puffer (BE-Puffer) gefüllte Spritze aufgenommen, und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Blutentnahme wurde in der Tierversuchsanlage der Heinrich-Heine-Universität durchgeführt. Die Proben sind auf Eis in die Labore des Universitätsklinikums transportiert worden, die Blutentnahme und der Transport in die Universitätsklinik dauerten insgesamt nicht länger als 30 Minuten.

2.4.4 Isolierung von PBMC

Die in Punkt 2.4.3 entnommene Blutprobe muss für die weiteren Versuche und die durchflusszytometrische Analyse von Erythrozyten befreit werden. Dazu wurde die von Erythrozyten rot gefärbte Blutlösung mit der gleichen Menge (ca. 750 µl) BD-Pharmlyse Puffer vermengt, und für 5 min bei RT inkubiert. Nach einer Zentrifugation bei 2000 x g für 3 min. wurde der Überstand verworfen, und das Pellet erneut in 500 µl BD-Pharmlyse Puffer resuspendiert, und für 5 min bei RT inkubiert. Nach der anschließenden Zentrifugation wurde das Pellet 1-mal mit 1 ml PBMC-Medium gewaschen, und dann in 500 µl PBMC-Medium aufgenommen, und bis zur Weiterverarbeitung auf Eis gelagert.

2.5 Immunbiologische Methoden

2.5.1 Durchflusszytometrie

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie wurde die Expression von Oberflächen-, Intrazellulärenund Intranukleären-Antigenen der untersuchten Zellen des peripheren Blutes bestimmt. Dazu werden die Antigene mit entsprechenden Fluoreszenz-markierten Antikörpern gefärbt, und die Fluoreszenz der Zellen im Durchflusszytometer detektiert. Bei der Messung werden die gefärbten Zellen in einem Flüssigkeitsstrom vereinzelt, und die Fluorochrome der gebundenen Antikörper durch die Bestrahlung mit Laserstrahlen zur Fluoreszenz angeregt. Die daraufhin von den Fluorochromen emittierten Lichtstrahlen werden von Photodetektoren gemessen, wodurch eine Aussage über die Art und Menge der gebundenen Antikörper getroffen werden kann. Gleichzeitig wird die Streuung des Lichts durch die bestrahlte Zelle gemessen, wobei das Vorwärtsstreulicht (FSC für engl. "forward scatter") durch die Größe und das Seitwärtsstreulicht (SSC für engl. "side scatter") durch die Granularität der Zelle zunimmt. Die ermittelten Messdaten lassen Rückschlüsse über die Größe, Komplexität und Expression jeder einzelnen untersuchten Zelle zu.

2.5.1.1 Färbung membranständiger Oberflächenproteine

Zum Färben von Oberflächenproteinen wurden $1 \times 10^5 - 1 \times 10^6$ mononukleäre Zellen des peripheren Blutes in einem FACS-Röhrchen in 1 ml FACS-Puffer aufgenommen und zentrifugiert (10 min, 472 x g, 4°C). Anschließend wurden die Zellen in 50 µl Antikörper Mix (FACS-Puffer mit den zu analysierenden Antikörpern) resuspendiert, und 30 min bei 4°C lichtgeschützt inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen zweimal mit 1 ml FACS- Puffer gewaschen, und anschließend in 100 μ l FACS-Puffer aufgenommen, und im Durchflusszytometer gemessen.

Beim Färben in einer 96-Well Platte änderte sich das Waschvolumen zu 200 μl FACS-Puffer und das Färbevolumen zu 10 μl Antikörper Mix. Nach dem letzten Waschschritt wurden die Zellen in 100 μl FACS-Puffer aufgenommen, und in FACS-Röhrchen überführt.

2.5.1.2 Färbung intrazellulärer Zytokine

Zum Färben von intrazellulären Zytokinen wurden die Zellen nach dem letzten Waschschritt der Färbung der Oberflächenproteine behandelt wie im Protokoll des "BD Cytofix/Cytoperm[™] Plus" Kits beschrieben. Zum Fixieren wurden die Zellen in 250 µl (100 µl für 96-Well Platten) "Fixation/Permeabilization"-Puffer resuspendiert, und 20 min bei 4°C, lichtgeschützt inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit 1 ml (250 µl für 96-Well Platten) "BD Perm/Wash[™]-Puffer gewaschen, und dann in 50 µl (10 µl für 96-Well Platten) "BD Perm/Wash[™]-Puffer inklusive entsprechender Antikörper für 30 min bei 4°C, lichtgeschützt gefärbt. Zum Schluss wurden die Zellen erneut zweimal mit 1 ml (250 µl für 96-Well Platten) "BD Perm/Wash[™]-Puffer gewaschen, und dann in 100 µl FACS-Puffer aufgenommen, und im Durchflusszytometer gemessen.

2.5.1.3 Intranukleäre FOXP3 Färbung

Zur Färbung des intranukleären Transkriptionsfaktors FOXP3 wurden die Zellen nach dem letzten Waschschritt der Färbung der Oberflächenproteine behandelt, wie im Protokoll des "FOXP3 Staining Buffer Set" beschrieben. Zunächst wurden die Zellen in 1 ml "Foxp3 Fixation/Permeabilization"-Lösung resuspendiert, und 30 – 60 min bei 4°C lichtgeschützt inkubiert. Nach zweimaligem Waschen in 2 ml "Permeabilization"-Puffer wurden die Zellen in 50 μ l "Permeabilization"-Puffer inklusive FOXP3 Antikörper für 30 min bei Raumtemperatur, lichtgeschützt inkubiert. Nach erneutem zweimaligem Waschen in 2 ml "Permeabilization"-Puffer wurden die Zellen in 100 μ l FACS-Puffer aufgenommen, und im Durchflusszytometer gemessen.

2.5.2 in vitro Inkubation mit Immunglobulinen

Um Rückschlüsse darauf ziehen zu können, welche Auswirkungen eine Behandlung mit IVIg auf Zellen des peripheren Blutes hat, wurden PBMC *in vitro*, ohne oder mit verschiedenen Konzentrationen von IVIg inkubiert, und die Effekte auf verschiedene Zelltypen untersucht. Dazu wurden 2 x 10^5 PBMC in einer 96-Well Rundbodenplatte in 100 µl PBMC-Medium⁺ mit indizierten Konzentrationen von Kiovig oder IVIg-Kontrolllösung für 16 h bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert.

2.5.3 in vitro Test der zytotoxischen und regulatorischen NK-Zell Aktivität

NK-Zellen erkennen fremdartige oder infizierte Zellen und können, durch zytotoxische Aktivität, in diesen eine Apoptose auslösen. Dabei bindet die NK-Zelle an die Zielzelle, und entlässt Granzym B und Perforin enthaltende Lysosomen in die immunologische Synapse, was zur Apoptose der Zielzelle führt. Auf der Innenseite der Lysosomenmembran wird lysosomal assoziiertes Membranprotein 1 (LAMP-1), auch CD107a genannt, exprimiert. Während des Prozesses der Exozytose fusioniert die Lysosomenmembran mit der Zellmembran der NK-Zelle, wodurch CD107a auf die Außenseite der Zellmembran gelangt. Zusätzlich haben NK-Zellen die Fähigkeit, Zytokine zu produzieren, und so regulierend auf andere Zellen des Immunsystems und die Form der Immunantwort zu wirken.

Das Potential von NK-Zellen auf einen Reiz mit der Produktion von Zytokinen oder mit zytotoxischer Aktivität zu reagieren, kann in vitro durch die Stimulation mit geeigneten NK-Zielzellen untersucht werden. Für Versuche mit humanen Proben wurde die Tumor-Zelllinie K562 als NK-Zielzelle verwendet. Dabei handelt es sich um humane Zellen einer myeloischen Leukämie, die keine MHC-I-Moleküle auf ihrer Oberfläche exprimieren, wodurch sie von den KIR-Rezeptoren der NK-Zellen als fremdartig erkannt werden, und diese aktivieren. Für den Mausversuch wurde die virusinduzierte Tumor-Zelllinie YAC-1 verwendet, welche so gut wie keine MHC-I-Moleküle und zusätzlich den Liganden des aktivierenden NK-Rezeptors NKG2D, RAE-1y, exprimiert und daher zu einer Aktivierung von NK-Zellen führt. Als Maß für die NK-Zellen zytotoxische Aktivität der dient in diesem Versuchsaufbau die Oberflächenlokalisation von CD107a, die durch Fluoreszenz-markierte Antikörper gefärbt, und im Durchflusszytometer gemessen werden kann. Um die Internalisierung von CD107a nach erfolgter Degranulation der sekretorischen Lysosomen zu inhibieren, wurde der Ko-Kultur Monensin hinzugegeben. Die regulatorische Aktivität der NK-Zellen wurde über die Produktion von INF- γ und TNF- α bestimmt, deren Ausschüttung in das Kulturmedium durch die Zugabe von Brefeldin A inhibiert wurde. Die Menge an gebildeten Zytokinen wurde dann durch eine intrazelluläre Antikörperfärbung und anschließende Durchflusszytometrie bestimmt.

Es wurden 2 x 10⁵ PBMC in einem Well einer 96-Well Rundbodenplatte in 100 µl PBMC-Medium⁺ zunächst für 16 h bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Anschließend wurden dem Kulturmedium 10 µl PBMC-Medium mit oder ohne 2 x 10⁴ NK-Zielzellen und 0,5 µl CD107a Antikörper hinzugegeben. Nach 1 h Inkubationszeit wurden 2 µl PBS inklusive 0,07 µl GolgiStop[™] und 0,1 µl GolgiPlug[™] hinzugegeben. Nach weiteren 4 h Ko-Kultur wurde die NK-Zell Stimulation beendet, und die Zellen bei der Antikörperfärbung von Oberflächen- und ggf. intrazellulären oder intranukleären Proteinen weiterverarbeitet, und anschließend im Durchflusszytometer gemessen.

2.5.4 Auswertung Durchflusszytometrie

Die am Durchflusszytometer gemessenen Daten wurden mit Hilfe von Flowjo ausgewertet. Dabei wurde in der FSC/SSC-Ansicht zunächst die Lymphozytenpopulation definiert, und diese anhand der gemessenen Fluoreszenz weiter unterteilt.

Human: NK-Zellen wurden als CD56⁺ CD3⁻ definiert und weiter in zytotoxische (CD56^{dim} CD16⁺) und regulatorische (CD56^{bright} CD16⁻) NK-Zellen unterteilt. Außerdem wurde der Anteil NKG2A und CD335 positiver und negativer NK-Zellen bestimmt. Für CD161 wurde der Mittelwert der Fluoreszenzintensität (MFI) als Maß für die Höhe der Expressionen auf NK-Zellen verwendet. T-Zellen wurden als CD3⁺, regulatorische T-Zellen als CD3⁺ CD4⁺ CD25⁺ FOXP3⁺ und B-Zellen als CD19⁺ Lymphozyten definiert.

Murin: NK-Zellen wurden als CD335⁺ CD3⁻ definiert und die Anteile NKG2A⁺ und CD16⁺ NK-Zellen bestimmt. Des Weiteren wurde der MFI als Maß für die Höhe der CD335 Expressionen auf NK-Zellen verwendet.

2.6 Molekularbiologische Methoden

2.6.1 RNA Expressionsanalyse in humanem und murinem Vollblut

Zur Untersuchung von Expressionsunterschieden zwischen Patienten oder Auswirkungen einer Behandlung auf die Transkription bestimmter Gene eignet sich die Methode der Quantitativen Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (qPCR). Die Methode beruht auf der herkömmlichen PCR, bei der durch den Zusatz eines fluoreszierenden Farbstoffs Rückschlüsse über die Ausgangsmenge eines zu untersuchenden Transkripts gezogen werden können. Wie bei der PCR beruht das Prinzip der qPCR auf der Vervielfältigung spezifischer DNA-Stränge durch sich wiederholende Zyklen der DNA-Duplizierung. Dabei werden die drei Phasen der DNA-Duplizierung: DNA-Denaturierung, Primer Annealing und DNA-Elongation, durch zyklische Änderungen der Temperatur gesteuert. Während für die PCR häufig genomische DNA als Template dient, wird bei der qPCR cDNA verwendet die zuvor durch Reverse Transkription aus aufgereinigter RNA synthetisiert wird. Mit Transkriptspezifischen Primern werden bis ca. 250 Nukleotide lange Fragmente aus dem Pool der cDNA amplifiziert. Bei optimalen Bedingungen geht die Amplifikation der cDNA, nach einer anfänglichen Anlaufphase, in eine Phase des exponentiellen Wachstums über, in der sich das Produkt mit jedem Zyklus verdoppelt. Durch die Zugabe eines interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffs kann nach jedem Elongationsschritt die Menge doppelsträngiger cDNA gemessen werden. Dazu wird die Probe mit einer UV-Lampe bestrahlt, und die Intensität der emittierten Fluoreszenz des Farbstoffs gemessen. Je mehr Kopien der untersuchten cDNA in der Ausgangslösung vorhanden sind, desto früher erreicht sie die Phase des exponentiellen Wachstums und desto früher steigt die gemessene Fluoreszenz über den Wert der Hintergrundfluoreszenz. Der Zyklus in welchem die Fluoreszenz erstmals exponentiell über den Hintergrundwert ansteigt wird als Ct-Wert ("cycle threshold") bezeichnet. Untersucht man die Expression von zwei Genen in der gleichen Ausgangslösung und vergleicht ihre Ct-Werte, so lässt sich ihr relatives Mengenverhältnis in der Ausgangslösung bestimmen.

2.6.1.1 RNA-Isolation aus Vollblut

Für die RNA-Expressionsanalyse wurde Patienten mit CIDP Blut in PAXgene® blood RNA Röhrchen abgenommen, und mit dem PAXgene® Blood RNA Kit aufgereinigt. Die Blutentnahmeröhrchen enthalten einen Puffer, der die zelluläre RNA im Moment der Blutentnahme stabilisiert, und zusammen mit der standardisierten RNA-Aufreinigung ein hohes Maß an Reproduzierbarkeit bei der Genexpressionsanalyse ermöglicht. Nach der Blutentnahme wurde verfahren wie im Protokoll des PAXgene® Blood RNA Kit beschrieben: Nach 3 h bei RT wurden die Röhrchen bis zur RNA-Isolation bei -20°C gelagert. Nach dem Auftauen wurden die Röhrchen erneut für 2 h bei RT inkubiert und anschließend bei 4500 x g und 21°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen, und das Pellet in 4 ml RNasefreiem Wasser durch Vortexen resuspendiert. Nach wiederholter Zentrifugation wurde das Pellet in 350 µl BR1-Puffer gelöst, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, und dort wurden der Probe 300 µl BR2-Puffer und 40 µl Proteinase K hinzugegeben. Für den Proteinverdau wurde die Probe 10 min bei 55°C und 800 upm im Heizschüttler inkubiert, und das Lysat zum Entfernen der ausgefallenen Proteine anschließend auf eine PAXgene Shredder Säule aufgetragen, und bei 13.000 upm für 3 min zentrifugiert. Der Überstand des Durchlaufs wurde, ohne das Pellet zu beschädigen, in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, und mit 350 µl 99 %igem Ethanol durch Vortexen vermischt. 700 µl der Probe wurde auf eine PAXgene RNA Säule aufgetragen, für 1 min bei 13.000 upm zentrifugiert, und der Durchlauf verworfen. Die restliche Probe wurde auf dieselbe RNA Säule gegeben, erneut zentrifugiert, und der Durchlauf verworfen. Zum Waschen der Säule wurden 350 µl BR3 Puffer aufgetragen, für 1 min bei 13.000 upm zentrifugiert, und der Durchlauf verworfen. Zum Waschen der Säule wurden 350 µl BR3 Puffer aufgetragen, für 1 min bei 13.000 upm zentrifugiert, und der Durchfluss verworfen. Um die gebundene DNA von der Säule zu entfernen, wurden 10 µl DNase I in 70 µl RDD Puffer direkt auf die Säule pipettiert, für 15 min bei RT inkubiert, und die verdaute DNA mit 350 µl BR3 Puffer, wurde die Säule einmal trocken zentrifugiert. Die Elution der RNA erfolgte in zwei Schritten mit jeweils 40 µl BR5 Puffer und anschließender Zentrifugation. Durch Inkubation der RNA bei 65°C für 5 min wurden mögliche gebildete Sekundärstrukturen aufgebrochen, und die RNA so für die folgenden Arbeitsschritte vorbereitet. Nach der Denaturierung wurde die RNA sofort auf Trockeneis gefroren, und bis zur Weiterverarbeitung bei -80°C gelagert.

2.6.1.2 Photometrische Konzentrations- und Reinheitsbestimmung

Die Konzentration und Reinheit der isolierten RNA wurde im NanoDrop Spektrometer gemessen. Der NanoDrop bietet die Möglichkeit, Messungen in sehr kleinen Probenvolumen von 1 μ l durchzuführen. Dabei wird die optische Dichte (OD) der Probe bei verschiedenen Wellenlängen bestimmt: Nukleinsäuren besitzen ihr Absorptionsmaximum bei 260 nm, daher gilt die OD bei 260 nm (A₂₆₀) als Maß für die Nukleinsäure-Konzentration der Probe. Die Reinheit der Probe wird über das Verhältnis von A₂₆₀ zu A₂₈₀ (A₂₆₀/A₂₈₀) bestimmt. Bei reiner DNA beträgt A₂₆₀/A₂₈₀ 1,8, bei reiner RNA liegt das Verhältnis bei 2,0. Niedrigere Werte für diese Verhältnisse weisen auf eine Verunreinigung der Probe mit Proteinen oder Rückständen aus dem RNA-Isolationsverfahren hin, welche Einfluss auf nachfolgende Analyseverfahren haben können.

Als Blindprobe wurde der BR5 Puffer des PAXgene[®] Blood RNA Kit verwendet, in welchem die RNA eluiert wurde. Die Mengen isolierter RNA lagen bei den verwendeten Proben zwischen ca. 1,5 µg und 33,8 µg wobei die Werte für A_{260}/A_{280} zwischen 1,96 und 2,22 lagen.

2.6.1.3 Synthese der cDNA/Reverse Transkription

Da RNA nicht als Template für die DNA-Polymerase verwendet werden kann, muss die isolierte RNA vor ihrem Einsatz in der qPCR zunächst durch Reverse Transkription in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben werden. Für diesen Schritt wurde das High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit verwendet. Es wurde verfahren wie im Protokoll des Kits beschrieben:

Zunächst wurde ein 2x Mastermix hergestellt. Für jeden benötigten Ansatz wurden 10 μl Volumen mit folgenden Komponenten hinzugefügt:

Volumen pro Ansatz	10 µl
DEPC-Wasser	<u>3,2 µl</u>
RNase Inhibitor	1,0 µl
MultiScribe™ Reverse Transcriptase	1,0 µl
10x RT Random Primers	2 <i>,</i> 0 μl
25x dNTP Mix (100mM)	0,8 μl
10x RT Puffer	2,0 µl

Anschließend wurde die isolierte RNA in MicroAmp[™] 8-tube Streifen vorgelegt. Von den verwendeten Proben wurden jeweils 500 ng RNA in ein Reaktionsgefäß überführt, und mit DEPC-Wasser auf 10 µl aufgefüllt. Wenn die Konzentration nicht hoch genug war um 500 ng RNA in ≤10 µl zu enthalten, wurde auf 20 µl Probenvolumen aufgefüllt. Nun wurde zur RNA-Lösung das gleiche Volumen Mastermix hinzugegeben, und die Reverse Transkription im Thermocycler bei folgendem Programm durchgeführt:

Schritt 1:	25°C für 10 min
Schritt 2:	37°C für 120 min
Schritt 3:	85°C für 5 min
Schritt 4:	4°C bis zur Entnahme der Proben

Das Produkt dieser reversen Transkription ist eine einfache Abschrift aller in der Lösung enthaltenen RNA als einzelsträngige cDNA. Anschließend wurden die Proben bis zu ihrer Verwendung in einer qPCR bei -20°C gelagert.

2.6.1.4 Quantitative Echtzeit Polymerasekettenreaktion (qPCR)

Bei der hier angewendeten qPCR handelt es sich um eine relative Quantifizierung, bei der die Menge der untersuchten cDNA im Verhältnis zu einem oder mehreren Referenzgenen gemessen wird. Dabei wird die Menge des Referenz-cDNA in der Ausgangslösung als 1 festgelegt. Die Differenz der Ct-Werte (ΔCt) zwischen jedem Zielgen und dem Referenzgen dient als Ausgangswert zur Berechnung der relativen Menge des Zielgenes. Da sich mit jedem Zyklus der qPCR die Menge des Amplifikats verdoppelt, bedeutet jede Änderung von ΔCt um 1 eine Verdoppelung bzw. Halbierung der cDNA-Ausgangsmenge im Verhältnis zum Referenzgen. Für die Berechnung der relativen Menge der Zielgen-cDNA in der Ausgangslösung folgt daraus: 2^{-ΔCt}. Vergleicht man die Expression eines Gens zwischen zwei Gruppen miteinander, gibt die Differenz der Δ Ct-Werte ($\Delta\Delta$ Ct) und die daraus folgende Formel 2^{-ΔΔCt} das Verhältnis der Genexpression zwischen den beiden Gruppen wieder. Mit Hilfe einer Schmelzkurve, die am Ende einer qPCR durchgeführt wird, kann die Spezifität der DNA-Duplizierung überprüft werden. Bei einer Schmelzkurvenanalyse wird durch stetige Erhöhung der Temperatur die Denaturierung der gebildeten dsDNA herbeigeführt, und die dabei auftretende Abnahme der Fluoreszenz gemessen. Anschließend wird die erste Ableitung des entstandenen Graphen aufgetragen, was aufgrund unterschiedlicher Länge und Basenzusammensetzung für jedes DNA-Fragment eine spezifische Schmelzkurve ergibt.

Die qPCR wurde unter Verwendung des Power SYBR Green Master Mix durchgeführt. Pro Well einer Optical 96-Well Reaction Plate wurden 20 μ l der folgenden Reaktionslösung pipettiert:

DEPC-Wasser	3 µl
Power SYBR Green Master Mix	10 µl
Vorwärts Primer	1 µl
Rückwärts Primer	1 µl
<u>cDNA Lösung</u>	<u>5 µl</u>
Reaktionsvolumen	20 µl

Pro Reaktion wurden 1,25 ng cDNA und jeweils 0,5 nM Primer eingesetzt. Durchgeführt wurde die qPCR im ABI Prism 7000 Sequence Detection System unter folgenden Bedingungen:

Polymerase Aktivierung	10 min	95°C	1 Zyklus
Denaturierung	15 s	95°C	40 Zvklen
Primer Annealing + Elongation	60 s	60°C	

Alle Gene wurden in Triplets untersucht. Als Referenzgene dienten *GAPDH* und β -*Aktin*. Zur Δ Ct Berechnung wurde der Mittelwert der Ct-Werte beider Referenzgene verwendet.

2.7 Statistik

Wenn nicht anders angegeben, werden die präsentierten Daten als Mittelwert mit Standardfehler (SEM für "standard error of the mean") dargestellt. Signifikanzen wurden in GraphPad Prism mittels eines gepaarten oder ungepaarten t-test ermittelt. Signifikanzen zwischen Gruppen werden dargestellt als "*" (p < 0.05), "**" (p < 0.01), "***" (p < 0.001) oder "n.s." (nicht signifikant).

vı Referenzen

- Adib-Conquy, M., D. Scott-Algara, et al. (2014). "TLR-mediated activation of NK cells and their role in bacterial/viral immune responses in mammals." <u>Immunol Cell Biol</u> **92**(3): 256-62.
- Aldemir, H., V. Prod'homme, et al. (2005). "Cutting edge: lectin-like transcript 1 is a ligand for the CD161 receptor." J Immunol **175**(12): 7791-5.
- Anderson, M. S. and J. A. Bluestone (2005). "The NOD mouse: a model of immune dysregulation." <u>Annu Rev Immunol</u> **23**: 447-85.
- Ang, C. W., M. A. De Klerk, et al. (2001). "Guillain-Barre syndrome- and Miller Fisher syndromeassociated Campylobacter jejuni lipopolysaccharides induce anti-GM1 and anti-GQ1b Antibodies in rabbits." <u>Infect Immun</u> 69(4): 2462-9.
- Ang, C. W., B. C. Jacobs, et al. (2004). "The Guillain-Barre syndrome: a true case of molecular mimicry." <u>Trends Immunol</u> **25**(2): 61-6.
- Aoki, C. A., A. T. Borchers, et al. (2005). "NOD mice and autoimmunity." Autoimmun Rev 4(6): 373-9.
- 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." <u>Brain</u> 81(2): 157-92.
- Barahona Afonso, A. F. and C. M. Joao (2016). "The Production Processes and Biological Effects of Intravenous Immunoglobulin." <u>Biomolecules</u> **6**(1): 15.
- Barber, D. F., M. Faure, et al. (2004). "LFA-1 contributes an early signal for NK cell cytotoxicity." J Immunol **173**(6): 3653-9.
- Barreto, M., R. C. Ferreira, et al. (2009). "Low frequency of CD4+CD25+ Treg in SLE patients: a heritable trait associated with CTLA4 and TGFbeta gene variants." <u>BMC Immunol</u> **10**: 5.
- Bayry, J., S. Lacroix-Desmazes, et al. (2003). "Inhibition of maturation and function of dendritic cells by intravenous immunoglobulin." <u>Blood</u> **101**(2): 758-65.
- Bayry, J., L. Mouthon, et al. (2012). "Intravenous immunoglobulin expands regulatory T cells in autoimmune rheumatic disease." J Rheumatol **39**(2): 450-1.
- Behring, E. v. (1890). "Untersuchungen über das Zustandekommen der Diphtherie-Immunität bei Thieren." <u>Deutsche Medizinische Wochenschrift</u> **No. 50**.
- Beilke, J. N., C. T. Meagher, et al. (2012). "NK cells are not required for spontaneous autoimmune diabetes in NOD mice." <u>PLoS One</u> **7**(4): e36011.
- Berger, M. and J. A. Allen (2015). "Optimizing IgG therapy in chronic autoimmune neuropathies: a hypothesis driven approach." <u>Muscle Nerve</u> **51**(3): 315-26.
- Bernardini, G., A. Gismondi, et al. (2012). "Chemokines and NK cells: regulators of development, trafficking and functions." <u>Immunol Lett</u> **145**(1-2): 39-46.
- Bielekova, B., M. Catalfamo, et al. (2006). "Regulatory CD56(bright) natural killer cells mediate immunomodulatory effects of IL-2Ralpha-targeted therapy (daclizumab) in multiple sclerosis." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> **103**(15): 5941-6.
- Bohn, A. B., L. Nederby, et al. (2011). "The effect of IgG levels on the number of natural killer cells and their Fc receptors in chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy." <u>Eur J</u> <u>Neurol</u> **18**(6): 919-24.
- Bonilla, F. A. (2008). "Pharmacokinetics of immunoglobulin administered via intravenous or subcutaneous routes." <u>Immunol Allergy Clin North Am</u> **28**(4): 803-19, ix.
- Borrego, F., M. Masilamani, et al. (2006). "The CD94/NKG2 family of receptors: from molecules and cells to clinical relevance." <u>Immunol Res</u> **35**(3): 263-78.
- Bouchard, C., C. Lacroix, et al. (1999). "Clinicopathologic findings and prognosis of chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy." <u>Neurology</u> **52**(3): 498-503.
- Brannagan, T. H., 3rd (2011). "Current diagnosis of CIDP: the need for biomarkers." <u>J Peripher Nerv</u> Syst **16 Suppl 1**: 3-13.

- Brauner, H., M. Elemans, et al. (2010). "Distinct phenotype and function of NK cells in the pancreas of nonobese diabetic mice." J Immunol **184**(5): 2272-80.
- Bromberg, M. B. (2011). "Review of the evolution of electrodiagnostic criteria for chronic inflammatory demyelinating polyradicoloneuropathy." <u>Muscle Nerve</u> **43**(6): 780-94.
- Bruhns, P., A. Samuelsson, et al. (2003). "Colony-stimulating factor-1-dependent macrophages are responsible for IVIG protection in antibody-induced autoimmune disease." <u>Immunity</u> 18(4): 573-81.
- Bryceson, Y. T., M. E. March, et al. (2005). "Cytolytic granule polarization and degranulation controlled by different receptors in resting NK cells." J Exp Med **202**(7): 1001-12.
- Buchwald, B., R. Ahangari, et al. (2002). "Intravenous immunoglobulins neutralize blocking antibodies in Guillain-Barre syndrome." <u>Ann Neurol</u> **51**(6): 673-80.
- Campbell, J. J., S. Qin, et al. (2001). "Unique subpopulations of CD56+ NK and NK-T peripheral blood lymphocytes identified by chemokine receptor expression repertoire." <u>Journal of</u> <u>Immunology</u> **166**(11): 6477-82.
- Chanvillard, C., R. F. Jacolik, et al. (2013). "The role of natural killer cells in multiple sclerosis and their therapeutic implications." <u>Front Immunol</u> **4**: 63.
- Chi, L. J., H. B. Wang, et al. (2008). "Impairment of circulating CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy." <u>J Peripher Nerv</u> <u>Syst</u> 13(1): 54-63.
- Chio, A., D. Cocito, et al. (2007). "Idiopathic chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy: an epidemiological study in Italy." <u>J Neurol Neurosurg Psychiatry</u> **78**(12): 1349-53.
- Chong, W. P., M. T. Ling, et al. (2013). "Essential role of NK cells in IgG therapy for experimental autoimmune encephalomyelitis." <u>PLoS One</u> **8**(4): e60862.
- Conigliaro, P., R. Scrivo, et al. (2011). "Emerging role for NK cells in the pathogenesis of inflammatory arthropathies." <u>Autoimmun Rev</u> **10**(10): 577-81.
- Crouse, J., H. C. Xu, et al. (2015). "NK cells regulating T cell responses: mechanisms and outcome." <u>Trends Immunol</u> **36**(1): 49-58.
- Cumberbatch, M., S. W. Peters, et al. (1992). "Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression by lymph node dendritic cells: comparison with epidermal Langerhans cells." <u>Immunol Lett</u> 32(2): 105-10.
- da Silva, I. P., A. Gallois, et al. (2014). "Reversal of NK-cell exhaustion in advanced melanoma by Tim-3 blockade." <u>Cancer Immunol Res</u> **2**(5): 410-22.
- Dalakas, M. C. (2011). "Advances in the diagnosis, pathogenesis and treatment of CIDP." <u>Nat Rev</u> <u>Neurol</u> **7**(9): 507-17.
- Dalakas, M. C. and W. K. Engel (1981). "Chronic relapsing (dysimmune) polyneuropathy: pathogenesis and treatment." <u>Ann Neurol</u> **9 Suppl**: 134-45.
- Davis, D. M. (2009). "Mechanisms and functions for the duration of intercellular contacts made by lymphocytes." <u>Nat Rev Immunol</u> **9**(8): 543-55.
- De Armas, R., P. Sindou, et al. (2004). "Demyelinating peripheral neuropathy associated with hemophagocytic lymphohistiocytosis. An immuno-electron microscopic study." <u>Acta</u> <u>Neuropathol</u> **108**(4): 341-4.
- De Groot, A. S., L. Cousens, et al. (2013). "Tregitope peptides: the active pharmaceutical ingredient of IVIG?" <u>Clin Dev Immunol</u> **2013**: 493138.
- De Groot, A. S., L. Moise, et al. (2008). "Activation of natural regulatory T cells by IgG Fc-derived peptide "Tregitopes"." <u>Blood</u> **112**(8): 3303-11.
- Debre, M., M. C. Bonnet, et al. (1993). "Infusion of Fc gamma fragments for treatment of children with acute immune thrombocytopenic purpura." <u>Lancet</u> **342**(8877): 945-9.
- Degn, S. E. and S. Thiel (2013). "Humoral pattern recognition and the complement system." <u>Scand J</u> <u>Immunol</u> **78**(2): 181-93.
- Djoumerska, I., A. Tchorbanov, et al. (2005). "The autoreactivity of therapeutic intravenous immunoglobulin (IVIG) preparations depends on the fractionation methods used." <u>Scand J</u> <u>Immunol</u> **61**(4): 357-63.

- Dotta, F., S. Censini, et al. (2007). "Coxsackie B4 virus infection of beta cells and natural killer cell insulitis in recent-onset type 1 diabetic patients." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> **104**(12): 5115-20.
- Dyck, P. J., J. Daube, et al. (1986). "Plasma exchange in chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy." <u>N Engl J Med</u> **314**(8): 461-5.
- Dyck, P. J., P. C. O'Brien, et al. (1982). "Prednisone improves chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy more than no treatment." <u>Ann Neurol</u> **11**(2): 136-41.
- Elkins, J., J. Sheridan, et al. (2015). "CD56(bright) natural killer cells and response to daclizumab HYP in relapsing-remitting MS." <u>Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm</u> **2**(2): e65.
- Ephrem, A., S. Chamat, et al. (2008). "Expansion of CD4+CD25+ regulatory T cells by intravenous immunoglobulin: a critical factor in controlling experimental autoimmune encephalomyelitis." <u>Blood</u> **111**(2): 715-22.
- Fauriat, C., E. O. Long, et al. (2010). "Regulation of human NK-cell cytokine and chemokine production by target cell recognition." <u>Blood</u> **115**(11): 2167-76.
- Ferlazzo, G. and C. Munz (2004). "NK cell compartments and their activation by dendritic cells." <u>J</u> Immunol **172**(3): 1333-9.
- Ferlazzo, G., C. Semino, et al. (2001). "HLA class I molecule expression is up-regulated during maturation of dendritic cells, protecting them from natural killer cell-mediated lysis." <u>Immunology Letters</u> 76(1): 37-41.
- Ferlazzo, G., D. Thomas, et al. (2004). "The abundant NK cells in human secondary lymphoid tissues require activation to express killer cell Ig-like receptors and become cytolytic." <u>J Immunol</u> **172**(3): 1455-62.
- Ferlazzo, G., M. L. Tsang, et al. (2002). "Human dendritic cells activate resting natural killer (NK) cells and are recognized via the NKp30 receptor by activated NK cells." <u>J Exp Med</u> **195**(3): 343-51.
- Filipovich, A. H. (2009). "Hemophagocytic lymphohistiocytosis (HLH) and related disorders." <u>Hematology Am Soc Hematol Educ Program</u>: 127-31.
- Fleit, H. B., S. D. Wright, et al. (1982). "Human neutrophil Fc gamma receptor distribution and structure." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> **79**(10): 3275-9.
- Fogel, L. A., W. M. Yokoyama, et al. (2013). "Natural killer cells in human autoimmune disorders." <u>Arthritis Res Ther</u> **15**(4): 216.
- Fontenot, J. D., M. A. Gavin, et al. (2003). "Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells." <u>Nat Immunol</u> **4**(4): 330-6.
- Fukaya, S., S. Yasuda, et al. (2008). "Clinical features of haemophagocytic syndrome in patients with systemic autoimmune diseases: analysis of 30 cases." <u>Rheumatology (Oxford)</u> 47(11): 1686-91.
- Giroux, M., E. Yurchenko, et al. (2007). "T regulatory cells control numbers of NK cells and CD8alpha+ immature dendritic cells in the lymph node paracortex." <u>J Immunol</u> **179**(7): 4492-502.
- Glotz, D., J. P. Haymann, et al. (1993). "Suppression of HLA-specific alloantibodies by high-dose intravenous immunoglobulins (IVIg). A potential tool for transplantation of immunized patients." <u>Transplantation</u> 56(2): 335-7.
- Gonzalez-Quintela, A., R. Alende, et al. (2008). "Serum levels of immunoglobulins (IgG, IgA, IgM) in a general adult population and their relationship with alcohol consumption, smoking and common metabolic abnormalities." <u>Clin Exp Immunol</u> **151**(1): 42-50.
- Good, R. A. and E. Lorenz (1991). "Historic aspects of intravenous immunoglobulin therapy." <u>Cancer</u> **68**(6 Suppl): 1415-21.
- Gorson, K. C. (2012). "An update on the management of chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy." <u>Ther Adv Neurol Disord</u> **5**(6): 359-73.
- Gross, C. C., A. Schulte-Mecklenbeck, et al. (2016). "Impaired NK-mediated regulation of T-cell activity in multiple sclerosis is reconstituted by IL-2 receptor modulation." <u>Proc Natl Acad Sci</u> <u>U S A</u> **113**(21): E2973-82.
- Gur, C., A. Porgador, et al. (2010). "The activating receptor NKp46 is essential for the development of type 1 diabetes." <u>Nat Immunol</u> **11**(2): 121-8.

- Hahn, A. F., C. F. Bolton, et al. (1996). "Plasma-exchange therapy in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. A double-blind, sham-controlled, cross-over study." <u>Brain</u> 119 (Pt 4): 1055-66.
- Hamann, I., N. Unterwalder, et al. (2011). "Analyses of phenotypic and functional characteristics of CX3CR1-expressing natural killer cells." Immunology **133**(1): 62-73.
- Hansen, R. J. and J. P. Balthasar (2002). "Intravenous immunoglobulin mediates an increase in antiplatelet antibody clearance via the FcRn receptor." <u>Thromb Haemost</u> **88**(6): 898-9.
- Hao, J., R. Liu, et al. (2010). "Central nervous system (CNS)-resident natural killer cells suppress Th17 responses and CNS autoimmune pathology." J Exp Med **207**(9): 1907-21.
- Heininger, K., U. G. Liebert, et al. (1984). "Chronic inflammatory polyneuropathy. Reduction of nerve conduction velocities in monkeys by systemic passive transfer of immunoglobulin G." J <u>Neurol Sci</u> 66(1): 1-14.
- Hertwig, L., I. Hamann, et al. (2016). "CX3CR1-dependent recruitment of mature NK cells into the central nervous system contributes to control autoimmune neuroinflammation." <u>Eur J</u> <u>Immunol</u> 46(8): 1984-96.
- Heusel, J. W., R. L. Wesselschmidt, et al. (1994). "Cytotoxic lymphocytes require granzyme B for the rapid induction of DNA fragmentation and apoptosis in allogeneic target cells." <u>Cell</u> 76(6): 977-87.
- Horton, N. C. and P. A. Mathew (2015). "NKp44 and Natural Cytotoxicity Receptors as Damage-Associated Molecular Pattern Recognition Receptors." <u>Front Immunol</u> **6**: 31.
- Huang, D., F. D. Shi, et al. (2006). "The neuronal chemokine CX3CL1/fractalkine selectively recruits NK cells that modify experimental autoimmune encephalomyelitis within the central nervous system." <u>Faseb J</u> **20**(7): 896-905.
- Huang, S., L. Li, et al. (2009). "Conversion of peripheral CD4(+)CD25(-) T cells to CD4(+)CD25(+) regulatory T cells by IFN-gamma in patients with Guillain-Barre syndrome." J Neuroimmunol **217**(1-2): 80-4.
- Huang, S., W. Wang, et al. (2015). "Feasibility of up-regulating CD4(+)CD25(+) Tregs by IFN-gamma in myasthenia gravis patients." <u>BMC Neurol</u> **15**: 163.
- Hubbard, A. K. and C. Giardina (2000). "Regulation of ICAM-1 expression in mouse macrophages." <u>Inflammation</u> **24**(2): 115-25.
- Hughes, R., S. Bensa, et al. (2001). "Randomized controlled trial of intravenous immunoglobulin versus oral prednisolone in chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy." <u>Ann Neurol</u> 50(2): 195-201.
- Hughes, R., S. Bensa, et al. (2002). "Randomized controlled trial of intravenous immunoglobulin versus oral prednisolone in chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy."
 <u>Ann Neurol</u> 50(2): 195-201.
- Hughes, R. A., D. Allen, et al. (2006). "Pathogenesis of chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy." J Peripher Nerv Syst **11**(1): 30-46.
- Hughes, R. A., P. Donofrio, et al. (2008). "Intravenous immune globulin (10% caprylatechromatography purified) for the treatment of chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy (ICE study): a randomised placebo-controlled trial." <u>Lancet Neurol</u> 7(2): 136-44.
- Iijima, M., H. Koike, et al. (2008). "Prevalence and incidence rates of chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy in the Japanese population." <u>J Neurol Neurosurg Psychiatry</u> 79(9): 1040-3.
- Imbach, P., S. Barandun, et al. (1981). "High-dose intravenous gammaglobulin therapy of refractory, in particular idiopathic thrombocytopenia in childhood." <u>Helv Paediatr Acta</u> **36**(1): 81-6.
- Infante-Duarte, C., A. Weber, et al. (2005). "Frequency of blood CX3CR1-positive natural killer cells correlates with disease activity in multiple sclerosis patients." <u>Faseb J</u> **19**(13): 1902-4.
- Jacobi, C., M. Claus, et al. (2009). "Exposure of NK cells to intravenous immunoglobulin induces IFN gamma release and degranulation but inhibits their cytotoxic activity." <u>Clin Immunol</u> **133**(3): 393-401.

- Jolles, S., W. A. Sewell, et al. (2005). "Clinical uses of intravenous immunoglobulin." <u>Clin Exp Immunol</u> **142**(1): 1-11.
- Kaneko, Y., F. Nimmerjahn, et al. (2006). "Pathology and protection in nephrotoxic nephritis is determined by selective engagement of specific Fc receptors." J Exp Med **203**(3): 789-97.
- Kaneko, Y., F. Nimmerjahn, et al. (2006). "Anti-inflammatory activity of immunoglobulin G resulting from Fc sialylation." <u>Science</u> **313**(5787): 670-3.
- Katz, J. S., D. S. Saperstein, et al. (2000). "Distal acquired demyelinating symmetric neuropathy." <u>Neurology</u> 54(3): 615-20.
- Kerkar, S. P., D. Chinnasamy, et al. (2014). "Timing and intensity of exposure to interferon-gamma critically determines the function of monocyte-derived dendritic cells." <u>Immunology</u> 143(1): 96-108.
- Kessel, A., H. Ammuri, et al. (2007). "Intravenous immunoglobulin therapy affects T regulatory cells by increasing their suppressive function." <u>J Immunol</u> **179**(8): 5571-5.
- Kieseier, B. C. (2011). "The mechanism of action of interferon-beta in relapsing multiple sclerosis." <u>CNS Drugs</u> 25(6): 491-502.
- Kieseier, B. C., M. C. Dalakas, et al. (2002). "Immune mechanisms in chronic inflammatory demyelinating neuropathy." <u>Neurology</u> **59**(12 Suppl 6): S7-12.
- Kim, J. M., J. P. Rasmussen, et al. (2007). "Regulatory T cells prevent catastrophic autoimmunity throughout the lifespan of mice." <u>Nat Immunol</u> 8(2): 191-7.
- Koller, H., B. C. Kieseier, et al. (2005). "Chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy." <u>N Engl</u> <u>J Med</u> 352(13): 1343-56.
- Kruse, P. H., J. Matta, et al. (2014). "Natural cytotoxicity receptors and their ligands." <u>Immunol Cell</u> <u>Biol</u> **92**(3): 221-9.
- Kwak, J. Y., F. M. Kwak, et al. (1996). "Elevated peripheral blood natural killer cells are effectively downregulated by immunoglobulin G infusion in women with recurrent spontaneous abortions." <u>Am J Reprod Immunol</u> **35**(4): 363-9.
- Latov, N., C. Deng, et al. (2010). "Timing and course of clinical response to intravenous immunoglobulin in chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy." <u>Arch</u> <u>Neurol</u> 67(7): 802-7.
- Laughlin, R. S., P. J. Dyck, et al. (2009). "Incidence and prevalence of CIDP and the association of diabetes mellitus." <u>Neurology</u> 73(1): 39-45.
- Leavenworth, J. W., X. Wang, et al. (2011). "Mobilization of natural killer cells inhibits development of collagen-induced arthritis." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> **108**(35): 14584-9.
- Leger, J. M., R. Guimaraes-Costa, et al. (2016). "Immunotherapy in Peripheral Neuropathies." <u>Neurotherapeutics</u> **13**(1): 96-107.
- Lewis, R. A. and A. J. Sumner (1982). "The electrodiagnostic distinctions between chronic familial and acquired demyelinative neuropathies." <u>Neurology</u> **32**(6): 592-6.
- Lewis, R. A., A. J. Sumner, et al. (1982). "Multifocal demyelinating neuropathy with persistent conduction block." <u>Neurology</u> **32**(9): 958-64.
- Ley, K., C. Laudanna, et al. (2007). "Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated." <u>Nat Rev Immunol</u> **7**(9): 678-89.
- Li, Z. Y., H. H. Chao, et al. (2014). "IFN-gamma induces aberrant CD49b(+) NK cell recruitment through regulating CX3CL1: a novel mechanism by which IFN-gamma provokes pregnancy failure." <u>Cell Death Dis</u> 5: e1512.
- Lichtenheld, M. G., K. J. Olsen, et al. (1988). "Structure and function of human perforin." <u>Nature</u> **335**(6189): 448-51.
- Lo, C. K., Q. L. Lam, et al. (2008). "Natural killer cell degeneration exacerbates experimental arthritis in mice via enhanced interleukin-17 production." <u>Arthritis Rheum</u> **58**(9): 2700-11.
- Louvet, C., B. G. Kabre, et al. (2009). "A novel myelin PO-specific T cell receptor transgenic mouse develops a fulminant autoimmune peripheral neuropathy." J Exp Med **206**(3): 507-14.
- Lu, L., K. Ikizawa, et al. (2007). "Regulation of activated CD4+ T cells by NK cells via the Qa-1-NKG2A inhibitory pathway." Immunity **26**(5): 593-604.

- Lunemann, A., J. D. Lunemann, et al. (2008). "Human NK cells kill resting but not activated microglia via NKG2D- and NKp46-mediated recognition." J Immunol **181**(9): 6170-7.
- Lunemann, J. D., F. Nimmerjahn, et al. (2015). "Intravenous immunoglobulin in neurology--mode of action and clinical efficacy." <u>Nat Rev Neurol</u> **11**(2): 80-9.
- Mahdi-Rogers, M. and R. A. Hughes (2014). "Epidemiology of chronic inflammatory neuropathies in southeast England." <u>Eur J Neurol</u> **21**(1): 28-33.
- Makino, S., K. Kunimoto, et al. (1980). "Breeding of a non-obese, diabetic strain of mice." <u>Jikken</u> <u>Dobutsu</u> **29**(1): 1-13.
- Martin, J. F., J. S. Perry, et al. (2010). "An IL-2 paradox: blocking CD25 on T cells induces IL-2-driven activation of CD56(bright) NK cells." J Immunol **185**(2): 1311-20.
- Martin-Fontecha, A., L. L. Thomsen, et al. (2004). "Induced recruitment of NK cells to lymph nodes provides IFN-gamma for T(H)1 priming." <u>Nat Immunol</u> **5**(12): 1260-5.
- Mathey, E. K., S. B. Park, et al. (2015). "Chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy: from pathology to phenotype." <u>J Neurol Neurosurg Psychiatry</u> **86**(9): 973-85.
- McCombe, P. A., J. D. Pollard, et al. (1987). "Chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy. A clinical and electrophysiological study of 92 cases." <u>Brain</u> 110 (Pt 6): 1617-30.
- McLeod, J. G., J. D. Pollard, et al. (1999). "Prevalence of chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy in New South Wales, Australia." <u>Ann Neurol</u> **46**(6): 910-3.
- Meyer zu Horste, G., S. Cordes, et al. (2016). "Predicting the Response to Intravenous Immunoglobulins in an Animal Model of Chronic Neuritis." <u>PLoS One</u> **11**(10): e0164099.
- Meyer zu Horste, G., A. K. Mausberg, et al. (2014). "Thymic epithelium determines a spontaneous chronic neuritis in Icam1(tm1Jcgr)NOD mice." J Immunol **193**(6): 2678-90.
- Milner, P., C. A. Lovelidge, et al. (1987). "PO myelin protein produces experimental allergic neuritis in Lewis rats." Journal of the Neurological Sciences **79**(3): 275-85.
- Moretta, A. (2002). "Natural killer cells and dendritic cells: rendezvous in abused tissues." <u>Nat Rev</u> <u>Immunol</u> **2**(12): 957-64.
- Mueller-Eckhardt, G., O. Heine, et al. (1989). "Prevention of recurrent spontaneous abortion by intravenous immunoglobulin." <u>Vox Sang</u> **56**(3): 151-4.
- Murphy, K., P. Travers, et al. (2011). Janeway's immunobiology. New York, Garland Science.
- Nagelkerke, S. Q., G. Dekkers, et al. (2014). "Inhibition of FcgammaR-mediated phagocytosis by IVIg is independent of IgG-Fc sialylation and FcgammaRIIb in human macrophages." <u>Blood</u> **124**(25): 3709-18.
- Nedvetzki, S., S. Sowinski, et al. (2007). "Reciprocal regulation of human natural killer cells and macrophages associated with distinct immune synapses." <u>Blood</u> **109**(9): 3776-85.
- Nielsen, N., N. Odum, et al. (2012). "Cytotoxicity of CD56(bright) NK cells towards autologous activated CD4+ T cells is mediated through NKG2D, LFA-1 and TRAIL and dampened via CD94/NKG2A." <u>PLoS One</u> **7**(2): e31959.
- Nishimura, M., H. Umehara, et al. (2002). "Dual functions of fractalkine/CX3C ligand 1 in trafficking of perforin+/granzyme B+ cytotoxic effector lymphocytes that are defined by CX3CR1 expression." J Immunol **168**(12): 6173-80.
- Noguchi, M., M. Yoshita, et al. (2005). "Peripheral neuropathy associated with chronic natural killer cell lymphocytosis." J Neurol Sci **232**(1-2): 119-22.
- Ogasawara, K., J. A. Hamerman, et al. (2004). "NKG2D blockade prevents autoimmune diabetes in NOD mice." <u>Immunity</u> **20**(6): 757-67.
- Oh, S. J., J. L. Joy, et al. (1992). ""Chronic sensory demyelinating neuropathy": chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy presenting as a pure sensory neuropathy." <u>J Neurol Neurosurg Psychiatry</u> **55**(8): 677-80.
- Orange, J. S. (2008). "Formation and function of the lytic NK-cell immunological synapse." <u>Nat Rev</u> <u>Immunol</u> **8**(9): 713-25.
- Overdijk, M. B., S. Verploegen, et al. (2012). "Crosstalk between human IgG isotypes and murine effector cells." J Immunol **189**(7): 3430-8.

- Pallmer, K. and A. Oxenius (2016). "Recognition and Regulation of T Cells by NK Cells." <u>Front Immunol</u> 7: 251.
- Pedroza-Pacheco, I., A. Madrigal, et al. (2013). "Interaction between natural killer cells and regulatory T cells: perspectives for immunotherapy." <u>Cell Mol Immunol</u> **10**(3): 222-9.
- Perricone, R., G. Di Muzio, et al. (2006). "High levels of peripheral blood NK cells in women suffering from recurrent spontaneous abortion are reverted from high-dose intravenous immunoglobulins." Am J Reprod Immunol **55**(3): 232-9.
- Piccioli, D., S. Sbrana, et al. (2002). "Contact-dependent stimulation and inhibition of dendritic cells by natural killer cells." J Exp Med **195**(3): 335-41.
- Poli, A., T. Michel, et al. (2009). "CD56bright natural killer (NK) cells: an important NK cell subset." Immunology **126**(4): 458-65.
- Rabinovich, B. A., J. Li, et al. (2003). "Activated, but not resting, T cells can be recognized and killed by syngeneic NK cells." <u>J Immunol</u> **170**(7): 3572-6.
- Raulet, D. H., S. Gasser, et al. (2013). "Regulation of ligands for the NKG2D activating receptor." <u>Annu</u> <u>Rev Immunol</u> **31**: 413-41.
- Ripellino, P., T. Fleetwood, et al. (2014). "Treatment of chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy: from molecular bases to practical considerations." <u>Autoimmune Dis</u> 2014: 201657.
- Rojas, D. and R. Krishnan (2010). "IFN-gamma generates maturation-arrested dendritic cells that induce T cell hyporesponsiveness independent of Foxp3+ T-regulatory cell generation." <u>Immunol Lett</u> 132(1-2): 31-7.
- Romee, R., B. Foley, et al. (2013). "NK cell CD16 surface expression and function is regulated by a disintegrin and metalloprotease-17 (ADAM17)." <u>Blood</u> **121**(18): 3599-608.
- Rosen, D. B., W. Cao, et al. (2008). "Functional consequences of interactions between human NKR-P1A and its ligand LLT1 expressed on activated dendritic cells and B cells." <u>J Immunol</u> **180**(10): 6508-17.
- Ruts, L., R. van Koningsveld, et al. (2005). "Distinguishing acute-onset CIDP from Guillain-Barre syndrome with treatment related fluctuations." <u>Neurology</u> **65**(1): 138-40.
- Sabatelli, M., F. Madia, et al. (2001). "Pure motor chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy." J Neurol **248**(9): 772-7.
- Sakaguchi, S., T. Yamaguchi, et al. (2008). "Regulatory T cells and immune tolerance." <u>Cell</u> **133**(5): 775-87.
- Samuelsson, A., T. L. Towers, et al. (2001). "Anti-inflammatory activity of IVIG mediated through the inhibitory Fc receptor." <u>Science</u> **291**(5503): 484-6.
- Sanvito, L., A. Makowska, et al. (2009). "Circulating subsets and CD4(+)CD25(+) regulatory T cell function in chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy." <u>Autoimmunity</u> **42**(8): 667-77.
- Saraste, M., H. Irjala, et al. (2007). "Expansion of CD56Bright natural killer cells in the peripheral blood of multiple sclerosis patients treated with interferon-beta." <u>Neurol Sci</u> **28**(3): 121-6.
- Schwab, I. and F. Nimmerjahn (2013). "Intravenous immunoglobulin therapy: how does IgG modulate the immune system?" <u>Nat Rev Immunol</u> **13**(3): 176-89.
- Sepulveda, F. E., S. Maschalidi, et al. (2015). "A novel immunoregulatory role for NK-cell cytotoxicity in protection from HLH-like immunopathology in mice." <u>Blood</u> **125**(9): 1427-34.
- Sinnreich, M., C. J. Klein, et al. (2004). "Chronic immune sensory polyradiculopathy: a possibly treatable sensory ataxia." <u>Neurology</u> **63**(9): 1662-9.
- Sommer, C., S. Koch, et al. (2005). "Macrophage clustering as a diagnostic marker in sural nerve biopsies of patients with CIDP." <u>Neurology</u> **65**(12): 1924-9.
- Tackenberg, B., I. Jelcic, et al. (2009). "Impaired inhibitory Fcgamma receptor IIB expression on B cells in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> **106**(12): 4788-92.
- Tang, Q. and J. A. Bluestone (2008). "The Foxp3+ regulatory T cell: a jack of all trades, master of regulation." <u>Nat Immunol</u> **9**(3): 239-44.

- Tha-In, T., H. J. Metselaar, et al. (2007). "Intravenous immunoglobulins suppress T-cell priming by modulating the bidirectional interaction between dendritic cells and natural killer cells." <u>Blood</u> **110**(9): 3253-62.
- Thiruppathi, M., J. Rowin, et al. (2012). "Impaired regulatory function in circulating CD4(+)CD25(high)CD127(low/-) T cells in patients with myasthenia gravis." <u>Clin Immunol</u> **145**(3): 209-23.
- Todd, R. F., 3rd (1996). "The continuing saga of complement receptor type 3 (CR3)." <u>J Clin Invest</u> **98**(1): 1-2.
- Tohma, S., J. E. Ramberg, et al. (1992). "Expression and distribution of CD11a/CD18 and CD54 during human T cell-B cell interactions." J Leukoc Biol **52**(1): 97-103.
- Trapani, J. A. (2001). "Granzymes: a family of lymphocyte granule serine proteases." <u>Genome Biol</u> **2**(12): REVIEWS3014.
- Tremblay, T., I. Pare, et al. (2013). "Immunoglobulin G dimers and immune complexes are dispensable for the therapeutic efficacy of intravenous immune globulin in murine immune thrombocytopenia." <u>Transfusion</u> **53**(2): 261-9.
- Valencia, X., C. Yarboro, et al. (2007). "Deficient CD4+CD25high T regulatory cell function in patients with active systemic lupus erythematosus." J Immunol **178**(4): 2579-88.
- Vallat, J. M., C. Sommer, et al. (2010). "Chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy: diagnostic and therapeutic challenges for a treatable condition." <u>Lancet Neurol</u> **9**(4): 402-12.
- Van Seventer, G. A., Y. Shimizu, et al. (1990). "The LFA-1 ligand ICAM-1 provides an important costimulatory signal for T cell receptor-mediated activation of resting T cells." <u>J Immunol</u> 144(12): 4579-86.
- Venken, K., N. Hellings, et al. (2008). "Compromised CD4+ CD25(high) regulatory T-cell function in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis is correlated with a reduced frequency of FOXP3-positive cells and reduced FOXP3 expression at the single-cell level." <u>Immunology</u> **123**(1): 79-89.
- Viala, K., T. Maisonobe, et al. (2010). "A current view of the diagnosis, clinical variants, response to treatment and prognosis of chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy." J <u>Peripher Nerv Syst</u> 15(1): 50-6.
- Viard, I., P. Wehrli, et al. (1998). "Inhibition of toxic epidermal necrolysis by blockade of CD95 with human intravenous immunoglobulin." <u>Science</u> **282**(5388): 490-3.
- Viglietta, V., C. Baecher-Allan, et al. (2004). "Loss of functional suppression by CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with multiple sclerosis." J Exp Med **199**(7): 971-9.
- Wan, Y. Y. and R. A. Flavell (2007). "Regulatory T-cell functions are subverted and converted owing to attenuated Foxp3 expression." <u>Nature</u> **445**(7129): 766-70.
- Wang, R., J. J. Jaw, et al. (2012). "Natural killer cell-produced IFN-gamma and TNF-alpha induce target cell cytolysis through up-regulation of ICAM-1." <u>J Leukoc Biol</u> **91**(2): 299-309.
- Wang, Z., J. Hong, et al. (2006). "Role of IFN-gamma in induction of Foxp3 and conversion of CD4+ CD25- T cells to CD4+ Tregs." J Clin Invest **116**(9): 2434-41.
- Yoshii, F. and Y. Shinohara (1998). "Natural killer cells in patients with Guillain-Barre syndrome." J Neurol Sci **157**(2): 175-8.
- Yu, J., A. G. Freud, et al. (2013). "Location and cellular stages of natural killer cell development." <u>Trends Immunol</u> 34(12): 573-82.
- Zumwalde, N. A., E. Domae, et al. (2013). "ICAM-1-dependent homotypic aggregates regulate CD8 T cell effector function and differentiation during T cell activation." J Immunol **191**(7): 3681-93.

vıı Anhang

1 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ADCC	",antibody-dependent cellular cytotoxicity"
APC	Antigen-präsentierende Zelle
BCR	B-Zell Rezeptor
BI	Behandlungsintervall
BNB	Blut-Nerven-Schranke
CD	"cluster of differentiation"
cDNA	"complementary DNA"
CIDP	chronisch inflammatorische demyelinisierende Polyneuropathy
DC	Dendritische Zelle
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EAE	experimentelle autoimmune Enzephalitis
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
Exp.	Expression
Fab	"fragment of antibody binding"
FACS	"fluorescence-activated cell sorter"
Fc	"fragment crystallizable"
FcR	Fc Rezeptor
FCS	Fötales Kälberserum
FOXP3	Forkhead-Box-Proteins P3
FSC	"forward scatter"
GBS	Guillain-Barré Syndrom
HLA-E	humanes Leukozytenantigen
ICAM	"intercellular adhesion molecule"
IFN	Interferon
lg	Immunglobulin
IL	Interleukin
INCAT	"Inflammatory Neuropathy Cause and Treatment"
ITP	idiopathisch thrombozytopenische Purpura
IVIg	intravenöse Immunglobuline
KIR	Killerzell-Immunglobulinähnliche Rezeptoren
LAMP	Lysosom-assoziiertes Membranprotein
LFA	"leucocyte function associated molecule"
LLT	"lectin-like-transkript"
MHC	"major histocompatibility complex"
mRNA	"messenger RNA"
MS	Multiple Sklerose
NCAM	"neural cell adhesion molecule"
NCR	"natural cytotoxicity receptors"

NK-Zellen	Natürliche-Killerzellen
NOD	"non obese diabetic"
PAMP	"pathogen-associated molecular patterns"
PBMC	"peripheral blood mononuclear cells"
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
PNS	peripheres Nervensystem
PRR	",pattern recognition receptor"
qPCR	Quantitative PCR
RA	rheumatoide Arthritis
Rel.	relativ
RNA	Ribonukleinsäure
SEM	"standard error of mean"
Sig.	Signifikanz
SLE	systemischer Lupus erythematodes
SSC	"side scatter"
T1D	Typ 1 Diabetes
TCR	T-Zell Rezeptor
TEN	toxisch epidermale Nekrolyse
TNF	Tumornekrosefaktor
Treg	regulatorische T-Zelle
ZNS	zentrales Nervensystem

2 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt zunächst meinem Betreuer Prof. Dr. Bernd C. Kieseier, für die Möglichkeit, in seiner Arbeitsgruppe für klinische und experimentelle Neuroimmunologie zu promovieren, für sein großes Interesse am Voranschreiten meiner Forschungsarbeiten und die stets produktiven Projektabstimmungen.

Prof. Dr. Joachim Ernst danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens und die freundliche Betreuung meiner Doktorarbeit von Seiten der Naturwissenschaftlichen Fakultät.

Bei Dr. Anne Mausberg kann ich mich gar nicht genug bedanken, z.B. für die kompetente Betreuung und stetige Unterstützung, die amüsanten gemeinsamen Labortage und nicht zuletzt für die geduldige Korrektur dieser Arbeit.

Ebenso danke ich Prof. Dr. Dr. Mark Stettner für die fachkundige Betreuung aller medizinischen Fragestellungen und, zusammen mit Prof. Dr. Clemens Warnke, für die Übernahme der Arbeitsgruppenleitung und damit für die Möglichkeit meine Arbeit als Mitglied dieser zu beenden.

Andrea Stritzel, dem Pflegepersonal des IAC, den zuständigen Neurologen und insbesondere Prof. Dr. Harald Hofstetter danke ich für die zuverlässige Organisation und Beschaffung der erforderlichen Patientenproben.

Allen Mitgliedern unserer Arbeitsgruppe, aber besonders Anne, Thomas, Kathleen, Fabian, Mark, Clemens, Marcia, Angelika, Annette, Zippora und Leon-Phillip, aber auch den Mitgliedern der anderen Arbeitsgruppen der Neurologie, danke ich für die gute Stimmung und Arbeitsatmosphäre, welche das Arbeiten in Labor und Büro sehr angenehm gemacht haben.

Zusätzliche danke ich Thomas, Kathleen und Anne für die immer offenen Ohren und große Hilfsbereitschaft in allen Lebenslagen und die unterhaltsamen gemeinsamen Mittagspausen und Abende. Danke für euren großartigen Humor und dass Ihr die letzten Jahre zu einer unvergesslichen Zeit gemacht habt!

Zu guter Letzt möchte ich mich bei meiner Familie und meinen Freunden außerhalb des Labors für ihre liebevolle Unterstützung bedanken und ganz besonders bei meiner Verlobten Sara für alles, was sie für mich getan hat. Danke, dass Ihr immer an mich glaubt und für mich da seid!

3 Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere an Eides Statt, dass die Dissertation von mir selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der "Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf" erstellt worden ist.

M. Her

Maximilian Kurt Heininger

Düsseldorf, 29.03.2019