

**Aus dem Zentrum für Neurologie
Neurologische Universitätsklinik Tübingen / Hertie Institut für
klinische Hirnforschung
Abteilung Allgemeine Neurologie
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. Arthur Melms**

**Ergebnisse zur Untersuchung der Reaktivität von T-Zellen
aus dem peripheren Blut von Patienten mit der
Diagnose Multiple Sklerose**

**Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Medizinischen Fakultät
der
Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

**vorgelegt
von
Andreas Manuel Pailer
Stuttgart**

2012

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. M. Röcken

2. Berichterstatter: Professor Dr. T. Gasser

Aus dem Zentrum für Neurologie
Neurologische Universitätsklinik Tübingen / Hertie Institut für
klinische Hirnforschung
Abteilung Allgemeine Neurologie
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. Arthur Melms

Ergebnisse zur Untersuchung der Reaktivität von T-Zellen
aus dem peripheren Blut von Patienten mit der
Diagnose Multiple Sklerose

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Medizinischen Fakultät
der
Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt
von
Andreas Manuel Pailer
Stuttgart
2012

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. M. Röcken

2. Berichterstatter: Professor Dr. T. Gasser

MEINEN ELTERN IN DANKBARKEIT
GEWIDMET

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	5
1.1	Multiple Sklerose	5
1.2	Ätiologie und Pathogenese	12
1.3	B- und T-Zellen	14
1.4	Fragestellung der Arbeit	22
2	Material	25
2.1	Geräte	25
2.2	Material, Chemikalien und Reagenzien	26
2.3	Firmenliste	35
3	Methoden	37
3.1	Durchflusszytometrie bei extrazellulärer Färbung	37
3.2	Durchflusszytometrie bei intrazellulärer Färbung	38
3.3	Sorten und Proliferation-Assay	41
3.4	Elispot	44
4	Ergebnisse	47
4.1	Resultate der FACS-Analyse bei extrazellulärer Färbung	48
4.2	Resultate der FACS-Analyse bei intrazellulärer Färbung	106
4.3	Auswertung der Proliferation-Assays nach dem Sorten	121
4.4	Ergebnis der Elispot-Analyse 1. Teil	139
4.5	Ergebnis der Elispot-Analyse 2. Teil	143
4.6	Ergebnis der Elispot-Analyse gesamt	161
5	Diskussion	175
5.1	Differente Zellzahlen der CD4+25+ Zellen und anderer Zellen	175
5.2	Foxp3 in funktionsfähigen regulatorischen T-Zellen	203
5.3	Suppressionsfähigkeit der CD4+25+ regulatorischen T-Zellen	207
5.4	Stimulation der PBMCs durch Antigene	216
6	Zusammenfassung	224
7	Literaturverzeichnis	228

1 EINLEITUNG

1.1 Multiple Sklerose

Definition

Die Multiple Sklerose (MS, syn. Encephalomyelitis disseminata) wird definiert als eine entzündliche, chronisch verlaufende, demyelinisierende Erkrankung des zentralen Nervensystems (ZNS), kombiniert mit unterschiedlich stark ausgeprägtem Verlust an Axonen und reaktiver Gliose. (Gehlen & Delank, 2010, S. 271)

Im gesamten ZNS, also sowohl im Encephalon als auch in der Medulla spinalis kann es zu in der Substantia alba gelegenen Demyelinisierungsherden und damit durch Unterbrechung und/oder Abschwächung der Reiz- beziehungsweise Signalweiterleitung zu entsprechender auf die jeweilige Lokalisation des Entmarkungsherdes spezifischer Symptomatik kommen. Eine wichtige Komponente der Erkrankung ist außerdem die Neurodegeneration. (Gehlen & Delank, 2010, S. 271)

Epidemiologie

Die Epidemiologie zeigt, "dass die Multiple Sklerose eine Krankheit der gemäßigten Zonen des Erdballs ist" (Gehlen & Delank, 2010, S. 271).

Die Erkrankungswahrscheinlichkeit ist außerdem in nordeuropäischen Ländern höher als in südlichen, wobei Studien zeigen, dass der Aufenthaltsort bis einschließlich zur Pubertät des jeweiligen Individuums für das individuelle Risiko entscheidend ist. (Grehl & Reinhardt, 2005, S.439)

Die Prävalenz ist entsprechend abhängig vom Breitengrad und beträgt in unseren Breitengraden 30 - 80 / 100 000, die Inzidenz ca. 4 - 6 / 100 000 Einwohner. Es sind mehr Frauen als Männer betroffen (3:1). Der klinische Erkrankungsbeginn liegt zu 60 % zwischen dem 20. Lj. und dem 40. Lj., davor und danach bei jeweils 20 %. Multipel vorhandene Entzündungsherde im MRT bei Auftreten erster klinischer Symptome der MS deuten aber auf einen früheren Erkrankungsbeginn hin, welcher in den meisten Fällen während der Adoleszenz zu finden sein dürfte. (Grehl & Reinhardt, 2005, S.439)

Verlauf

Die Multiple Sklerose verläuft typischerweise schubförmig mit Remissionen, wobei die Definition eines Schubes die Dauer von mindestens 24 Stunden und ein mindestens 30-Tage-Intervall zwischen den Schüben beinhaltet und durch Änderung der Körpertemperatur (Uthoff-Phänomen) oder eine Infektion nicht zu erklären ist. (Trostdorf & v. Stuckrad-Barre, 2009, S. 1)

Die häufigste Verlaufsform der Multiplen Sklerose ist schubförmig mit eindeutig abgrenzbaren Schüben, bei denen es zu einer kompletten oder inkompletten Remission kommt. Nach initial schubförmigem Verlauf kommt es bei ca. 50 % zu einem Übergang in einen progredienten Verlauf mit oder ohne zusätzlich überlagerte Schubaktivität, die sekundär chronisch progrediente Verlaufsform. Des Weiteren wird die primär chronisch progrediente Verlaufsform abgegrenzt, bei der bereits initial ein schleichend progredienter Verlauf ohne abgrenzbare Schubaktivität vorherrscht. (Trostdorf & v. Stuckrad-Barre, 2009, S. 1)

Mögliche schubauslösende Faktoren können Infektionen, besonders starke psychische Belastung, Stress, Sonnenexposition/Hitze (DD Uthoff-Phänomen) oder Frauen post partum sein, wodurch die Abnahme der Schubfrequenz während der

Schwangerschaft wieder ausgeglichen wird, die Schwangerschaft netto also keinen positiven oder negativen Effekt aufweist. (Grehl & Reinhardt, 2005, S. 439)

Symptomatik

Charakteristisch für die Symptomatik der Multiplen Sklerose sind multilokuläre, der Lokalisation der Entmarkungsherde entsprechende Funktionsstörungen des ZNS, die meistens in Schüben und mit Remissionen in Erscheinung treten. (Gehlen & Delank, 2010, S.273)

Zu den häufigsten Symptomen gehören Pyramidenbahnzeichen, wie z. B. ein positiver Babinski, mit spastischen Lähmungen, zerebelläre Störungen wie Intentionstremor, Ataxie, Dysarthrie, Dysdiadochokinese oder Nystagmus und Beeinträchtigungen der Sensibilität wie Hyp-, Dys- oder Parästhesien mit eventuell positivem Lhermitte-Zeichen oder auch schmerzhaft Sensibilitätsstörungen in Form der Trigeminus-Neuralgie.

Als häufigste Frühsymptome treten die Retrobulbärneuritis (Neuritis nervi optici, einschließlich einer temporalen Papillenabblassung) und das Doppelbildersehen, ausgelöst durch eine internukleäre Ophthalmoplegie mit Augenmuskelparesen, auf, die aber beide mit einer besonders guten Rückbildungsfähigkeit einhergehen. (Gehlen & Delank, 2010, S.273-274)

Ein außerdem oft vernachlässigtes, nicht beachtetes oder sogar unbekanntes Trio der Symptomatik der MS sind kognitive Störungen, Depressionen und das Fatigue-Syndrom. (Ärzte Zeitung Ausgabe 62, 2010, S. 17)

Anfangs kann ein MS-typisches Einzelsymptom vorliegen, das bei gleichzeitigem Auftreten anderer paraklinischer Befunde bereits die Diagnosestellung der MS zulässt, was dann „klinisch isoliertes Syndrom“ (KIS) genannt wird. (Gehlen & Delank, 2010, S.273)

Bei der Symptomatik ist dabei differentialdiagnostisch u. a. auch an solche Erkrankungen wie die akute disseminierte Enzephalomyelitis (ADEM), eine Neuromyelitis optica, post- und/oder parainfektiose Enzephalitiden wie z. B. die Neuroborreliose oder auch die AIDS-Enzephalitis, Neurosarkoidose, Neoplasien, Vaskulitiden oder auch an einen Lupus erythematodes zu denken. (Stark & Gärtner, 2011)

Diagnostik

Bei der Diagnostik der Multiplen Sklerose haben natürlich wie bei jeder Diagnosestellung die Anamnese und die klinische Untersuchung eine große Bedeutung.

Eine große Rolle spielen bei der Diagnostik aber auch pathologische Liquorbefunde. Die charakteristische Liquorbefundkonstellation zeigt eine leichte (bis 150/3 Zellen), meist passager im akuten Schub vorkommende lymphoplasmozytäre Pleozytose, ein wenn überhaupt nur leicht erhöhtes Gesamtprotein, eine deutliche Erhöhung des IgG, welche sich elektrophoretisch oder quantitativ immunochemisch nachweisen lässt, sowie eine intrathekale, oligoklonale Produktion dieses IgG (sog. autochthones IgG). (Gehlen & Delank, 2010, S. 275)

Bei bis zu 95 % der MS-Patienten können bei isoelektrischer Fokussierung oligoklonale Liquor-IgG-Banden gefunden werden. (Gehlen & Delank, 2010, S. 275)

Zu guten diagnostischen Mitteln und Befunderhebungen sind inzwischen auch Latenzzeitverlängerungen von MEP und VEP und andere evozierte Potenzialmessungen geworden. (Gehlen & Delank, 2010, S. 275)

Schließlich spielt auch noch die Magnetresonanztomographie (MRT) eine zentrale Rolle in der bildgebenden Diagnostik, in der die Demyelinisierungsherde als kleinere hypodense Areale vor allem in der Substantia alba periventrikulär imponieren. Kontrastmittelunterstützte MR-Tomogramme mit Gadolinium (Gadoliniumanreicherung nur in Arealen der gestörten Blut-Hirn-Schranke) erlauben es sogar, gewisse Aus-

sagen über die Aktivität eines Demyelinisierungsherdes zu treffen. (Gehlen & Delank, 2010, S. 275-276)

Trotzdem kann und darf die MS nicht allein aufgrund des MR-tomographischen Befundes diagnostiziert werden, weil multilokuläre, vor allem periventrikulär gelegene, aber letztendlich im gesamten ZNS mögliche hyperintense Areale, hier also Entmarkungsherde, zwar für die MS charakteristisch, aber nicht spezifisch sind. (Gehlen & Delank, 2010, S. 276)

Insgesamt sind aber die McDonald-Kriterien für die Diagnosestellung der MS grundlegend, bei denen die bildgebenden kernspintomographisch zeitlich und örtlich disseminierten Läsionen Basis für die Beurteilung sind und so auch klinisch stumme Entzündungsherde aufgedeckt werden können und in die Beurteilung miteinfließen, ganz im Gegensatz zu den Poser-Kriterien, bei denen lediglich die Symptomatik bzw. deren zeitliche und örtliche Dissemination im Zentrum steht und klinisch stumme Läsionen folglich unentdeckt bleiben, nicht in die Beurteilung miteingehen und eine frühe Diagnosestellung eventuell verhindern. (Stark & Gärtner, 2011) (Petereit, 2008, S. 3)

Hat sich bei der Diagnostik eine MS herausgestellt, so kann der aktuelle Krankheitszustand bzw. die aktuelle Krankheitsschwere mithilfe der Behinderungsskala nach Kurtzke, abgekürzt EDSS (Expanded Disability Status Scale), festgehalten werden. Dabei reicht das Spektrum der Einteilung von 0, normaler neurologischer Befund, bis 10, Tod infolge MS. (Petereit, 2008, S. 3)

Therapie

Die therapeutische Vorgehensweise bei der Multiplen Sklerose erfolgt anhand von drei Therapiestrategien, der Therapie eines akuten Schubes, der Schubprophylaxe und der symptomatischen Therapie.(Gehlen & Delank, 2010, S. 276)

Bei der Behandlung des akuten Schubes ist die Therapie mit Kortikosteroiden von zentraler Bedeutung, z. B. mit 500-1000 mg Methylprednisolon als Pulstherapie über 3-5 Tage. (Gehlen & Delank, 2010, S. 276)

Zur Schubprophylaxe werden Immunmodulatoren, insbesondere Interferon β -1a (Avonex[®], Rebif[®]) und Interferon β -1b (Betaferon[®]) oder auch das Polypeptid Glatirameracetat (Copaxone[®]) und außerdem seit längerem schon Immunsuppressiva, vor allem Azathioprin, eingesetzt. (Gehlen & Delank, 2010, S. 276)

Des Weiteren kommt der monoklonale Antikörper Natalizumab (Tysabri[®]) bei entsprechender Befundkonstellation, z. B. bei Patienten mit hoher Krankheitsaktivität trotz Therapie mit einem Betainterferon zum Einsatz, auch wenn dabei das Risiko dessen gefürchtetster Nebenwirkung, das Auslösen einer meist tödlich verlaufenden Progressiven Multifokalen Leukenzephalopathie (PML), in Kauf genommen wird. (Gehlen & Delank, 2010, S. 276)

Bei der Therapie von Patienten mit chronisch progredienten Verlaufsformen werden Zytostatika wie z. B. Cyclophosphamid oder Mitoxantron eingesetzt. Selten kommen bei starker Krankheitsprogression und Therapieresistenz auch hoch dosierte Immunglobuline zur Anwendung oder es werden Plasmapheresen durchgeführt. (Gehlen & Delank, 2010, S. 276-277)

Statt einer Plasmapherese scheint bei besserer Verträglichkeit bzw. weniger Nebenwirkungen auch eine Immunadsorption in Frage zu kommen. (Ärzte Zeitung Ausgabe 30, 2010, S. 10)

Im Zusammenhang mit der symptomatischen Therapie der MS sind dann vor allem noch die antispastischen Medikamente und die medikamentöse Beeinflussung der Blasenaktivität zu nennen. (Gehlen & Delank, 2010, S. 277)

Als Letztes seien noch die therapeutischen Allgemeinmaßnahmen wie Krankengymnastik, Ergotherapie und Sporttherapie erwähnt. (Gehlen & Delank, 2010, S. 277)

Laut einem Vortrag von Dr. Wolfgang Feneberg ist es außerdem sehr wichtig, dass die MS schon früh therapiert wird, da es von Beginn an auch zu einer Degeneration von Axonen kommt, es keine Korrelation der Entmarkung mit dem Grad der Behinderung gibt, die Effektivität aller Basistherapeutika (Glatirameracetat, Rebif, Avonex und Betaferon) anfangs am größten ist, lediglich jeder fünfte bis zehnte Schub klinisch auffällt, der MS-Patient vom Anfang der Erkrankung an jedes Jahr ein Prozent seiner Neuronen einbüßt, die Wirksamkeit der Kortisontherapie beim nächsten Schub nicht garantiert ist und längerfristig nur 10 bis 20 Prozent der MS-Patienten einen gutartigen Krankheitsverlauf erwarten dürfen. (Bischoff, 2007)

Eine nach dem ersten Schubereignis abwartende Haltung bezüglich einer Basistherapie ist für mindestens 80 Prozent der MS-Patienten also die falsche Entscheidung. (Bischoff, 2007)

Der Nutzen eines frühen Therapiebeginns geht auch aus drei kontrollierten klinischen Studien hervor. Bei 309 einmal in der Woche mit 22 µg Interferon β-1a (Rebif) s. c. therapierten Patienten in der ETOMS-Studie (Early Treatment of Multiple Sclerosis with Rebif) wurde für die Entwicklung einer manifesten MS eine Risikoreduktion von 35 % festgestellt. Bei den 383 Patienten der CHAMPS-Studie (Controlled High Risk Avonex Multiple Sclerosis Study) mit einer einmal pro Woche erfolgten Injektion von 30 µg Interferon β-1a (Avonex) i. m. hat sich das Risiko, eine volle klinische Manifestation der MS zu entwickeln, sogar um 44 % reduziert. Schließlich hat sich auch noch bei der BENEFIT-Studie (Betaferon/ Betaseron in Newly Emerging Multiple Sclerosis For Initial Treatment) mit 468 Patienten, die jeden zweiten Tag mit 250 µg Interferon β-1b therapiert wurden, eine signifikante Risikoreduktion von 50 % für die Entwicklung einer klinisch gesicherten MS (CDMS, Clinically Definite Multiple Sclerosis) bei Patienten mit CIS (Clinically isolated syndrome) aufgezeigt. Eine frühe Therapie ist

insbesondere auch deshalb so wichtig, weil die Krankheitsaktivität initial sehr hoch ist. (Petereit, 2008, S. 5)

Wachsamkeit ist laut Feneberg bezüglich der Basistherapeutika bei den Interferonen insofern geboten, weil die Patienten gegen diese im Laufe der Therapie, insbesondere nach Gabe von höheren Dosen, neutralisierende Antikörper bis hin zu einem solch erhöhten Titer bilden können, dass die Wirkung der Interferone vollständig aufgehoben sein kann. (Bischoff, 2007)

Ein erfolgreicher Therapieansatz bei MS mit Fatigue übrigens scheint die Bemer-Magnetfeldtherapie über eine Aktivierung und Normalisierung der Vasomotion im Kapillargebiet zu sein, welche die Punktzahl im MFIS-Score (Modified Fatigue Impact Scale) bei MS-Patienten gegenüber einer Kontrollgruppe aus MS-Patienten (Placebogruppe) signifikant zu senken in der Lage war. (Ärzte Zeitung Ausgabe 148, 2011, S. 9)

1.2 Ätiologie und Pathogenese

Nach derzeitigem Kenntnisstand handelt es sich bei der Multiplen Sklerose um ein multifaktorielles Geschehen, bei dem es zu einer durch T-Lymphozyten vermittelten Autoimmunerkrankung kommt, bei welcher zusätzlich genetische und epidemiologische Aspekte, aber auch Umweltfaktoren, wie z. B. Stress, von Bedeutung sind. (Gehlen & Delank, 2010, S. 271)

Es wurde erkannt, dass bei MS-Erkrankten bestimmte genetische Konstellationen, genauer bestimmte auf der extrazellulären Seite der Zellmembran gelegene Histokompatibilitätsantigene, zu denen die HLA-Antigene A3, B7 und vor allem HLA-DR2 und HLA-DW2 gehören, signifikant häufiger vorkommen als bei gesunden Kontrollen. (Gehlen & Delank, 2010, S. 272)

Ist dieses genetische Merkmal vorhanden, so ist das Risiko, an einer MS zu erkranken, erhöht, was ebenfalls bei Verwandten ersten Grades eines MS-Erkrankten der Fall ist, bei denen die Erkrankungswahrscheinlichkeit etwa 10-mal höher ist als in der Normalbevölkerung. (Gehlen & Delank, 2010, S. 272)

Drei Hypothesen über die Pathogenese, die Neurodegenerationshypothese, die Infektionshypothese mit Aktivierung von T-Zellen infolge einer Virusinfektion, die auch schon im Kindesalter stattgefunden haben kann (z. B. Röteln, EBV, Masern, Varizellen/Zoster) und die Autoimmunhypothese stehen zur Diskussion, wovon allerdings keine alleine die komplexe Krankheit erklären kann. (Gehlen & Delank, 2010, S. 271)

Die Autoimmunhypothese beschreibt eine Autoimmunisation, in deren Verlauf ein körperfremdes Antigen (eines Pathogens) mit einem Epitop, welches eine Ähnlichkeit zu körpereigenen Peptidstrukturen, was laut Wucherpfennig & Strominger, 1995, auch als „molekulares Mimikry“ bezeichnet wird, wie beispielsweise der Plasmamembranproteine der Myelinscheide aufweist, von den antigenpräsentierenden Zellen präsentiert wird und damit über die Aktivierung von T-Zellen schließlich die Bildung von Auto-Antikörpern durch Plasmazellen und letztendlich Autoreaktivität auszulösen vermag, ähnlich wie bei der postvakzinalen und postinfektiösen Enzephalomyelitis, in deren Folge es zu Kreuzreaktivitäten mit körpereigenen Aminosäuresequenzen kommt, die durch die Positiv- und Negativ-Selektion bei der Entwicklung der T-Zellen im Thymus eigentlich ausgeschlossen sein sollten. Gestützt wird diese Hypothese vor allem durch tierexperimentelle Untersuchungen, bei denen es nach Immunisierung zu einer disseminierten Enzephalomyelitis mit Markscheidenuntergang kommt, besser bekannt auch als Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis (EAE) (Weißert Dr. Dr., 2002, S. 8), bei der es zu einem Angriff auf Proteo-

lipid Protein (PLP) und/oder vor allem auf basisches Myelinprotein (MBP) und Myelin Oligodendrozyten Glykoprotein (MOG) (Weißert Dr. Dr., 2002, S. 7), welche als Membranproteine auf der Oberfläche der Myelinscheide vorkommen und Angriffspunkte des Immunsystems darstellen, und deren Untergang kommt. (Gehlen & Delank, 2010, S. 271-272)

Dabei hat sich auch gezeigt, dass der demyelinisierende Antikörper nicht nur bei der MS eine Rolle spielt, sondern auch bei anderen Erkrankungen zu finden ist, bei denen es zur Zerstörung von Hirn- und Rückenmarksgewebe kommt. (Gehlen & Delank, 2010, S. 272)

Zusammengefasst deutet vieles darauf hin, "dass T-Zell-vermittelte Autoimmunreaktionen maßgeblich an der Pathogenese der Multiplen Sklerose beteiligt sind" (Gehlen & Delank, 2010, S. 272).

1.3 B- und T-Zellen

Immunsystem

Zunächst sollen kurz die für das Immunsystem wichtigsten anatomischen Strukturen beziehungsweise lymphatischen Organe erwähnt werden. Es werden zentrale oder primäre lymphatische Organe, in welchen die Bildung der Lymphozyten stattfindet, von peripheren oder sekundären lymphatischen Organen, in denen die adaptiven Immunantworten wie die Aktivierung, Proliferation und Differenzierung eingeleitet werden, unterschieden. Die primären lymphatischen Organe sind das Knochenmark, in dem sowohl die B- als auch die T-Zellen gebildet werden, und der Thymus, in welchem die T-Zellen ausreifen, wohingegen die B-Zellen im Knochenmark reifen. Zu den peripheren lymphatischen Organen gehören die Milz, die Lymphknoten und die

lymphatischen Gewebe der Schleimhäute, also die GALT (gut-associated lymphoid tissues), zu denen die Appendix und die Peyerschen Plaques aus dem Darm und die Rachen- und Gaumenmandeln zählen, die bronchienassoziierten lymphatischen Gewebe (BALT) und die mucosaassoziierten lymphatischen Gewebe (MALT). In diesen Organen, durch die die Lymphe aus dem Blut beziehungsweise aus dem extrazellulären Bindegewebe über ihre Lymphgefäße drainiert wird und zwischen diesen stets auch die Lymphozyten zirkulieren, wartet eine Vielzahl von Lymphozyten, bis es zu Wechselwirkungen zwischen den Lymphozyten und eventuell vorhandenen Antigenen und damit zu dem möglichst schnellen Erkennen und Bekämpfen eines pathogenen Erregers kommt. Ausdruck dessen wiederum ist die Lymphknotenschwellung. Durch diesen ständigen Durchfluss bzw. das ständige Zirkulieren sowohl des Blutes als auch der extrazellulären Flüssigkeit durch die sekundären lymphatischen Organe wird eine ständige Kontrolle und Überwachung des Körpers gewährleistet. (Janeway/Travers & Walport/Shlomchik, 2002, S. 7-13)

Unterscheiden muss man die angeborene Immunität von der erworbenen, adaptiven Immunität.

Angeborene Immunität

Bei der angeborenen Immunität spielen Makrophagen und neutrophile Granulozyten eine große Rolle, da sie Oberflächenrezeptoren tragen, die allgemein vorkommende Strukturmerkmale von Pathogenen, z. B. Proteoglykane der Bakterienzellwand, erkennen können, wodurch diese Zellen dazu befähigt sind, Pathogene zu endozytieren und intrazellulär abzubauen und zu zerstören. (Janeway/Travers & Walport/Shlomchik, 2002, S. 13)

Außerdem ist es z. B. den aus den Makrophagen weiterentwickelten unreifen dendritischen Zellen möglich, fortlaufend extrazelluläres Material über den rezeptor-unabhängigen Mechanismus der Makropinozytose und mit diesem eventuell vorhandene Viren und/oder Bakterien aufzunehmen. Allerdings haben die dendritischen Zellen primär nicht die Aufgabe, die Pathogene zu zerstören, sondern eher deren Transport in die peripheren lymphatischen Organe zu übernehmen, um dort die Antigene zu präsentieren. (Janeway/Travers & Walport/Shlomchik, 2002, S. 14)

Im Rahmen der Wechselwirkungen zwischen neutrophilen Granulozyten beziehungsweise Makrophagen und Pathogen werden von diesen Zellen Chemokine ausgeschüttet, wodurch Leukozyten angelockt werden und es nach deren Adhäsion an die Gefäßwand zu einer Leukozyteninfiltration ins Gewebe kommt. Außerdem werden diverse Cytokine wie Prostaglandine (vor allem Prostacyclin), ADP, Histamin und Bradykinin ausgeschüttet, welche zu einer Gefäßdilataion und Permeabilitätssteigerung der Gefäßwände führen und damit die Leukozyteninfiltration ins Gewebe zusätzlich fördern und die klassischen Zeichen einer Entzündung, also tumor, calor, dolor, rubor und functio laesa hervorrufen. (Janeway/Travers & Walport/ Shlomchik, 2002, S. 13)

Auch von Bedeutung ist das Komplementsystem mit seinen zahlreichen Plasmaproteinen, die nach einer proteolytischen Kaskade schließlich zur Zerstörung der pathogenen Zellwand und damit des Pathogens selbst führen. Hier gibt es einen zweiten, die proteolytische Kaskade auslösenden Weg, der aber nur in Kombination mit einem spezifisch gebundenen Antikörper startet. Dies zeigt, dass die angeborene und die erworbene Immunität sich gegenseitig beeinflussen beziehungsweise oft Hand in Hand gehen. (Janeway/Travers & Walport/Shlomchik, 2002, S. 12-14)

Als Letztes seien im Zusammenhang mit der angeborenen Immunität noch die Akute-Phase-Proteine erwähnt, die von Hepatozyten produziert und sezerniert werden,

nachdem diese wiederum durch vor allem IL-1 und IL-6 aktiviert und stimuliert wurden, welche zuvor von Makrophagen und anderen Zellen wie Endothelzellen oder Fibroblasten im entzündeten Gewebe sezerniert wurden. Diese Proteine helfen bei der Aktivierung des gesamten Organismus und bei der Bekämpfung von Pathogenen, z. B. werden Pathogene vom C-reaktiven Protein (CRP) opsonisiert, wodurch sie für Phagozyten aufnahmefähig gemacht werden, sie jetzt also endozytiert und zerstört werden können. Zu diesen Akute-Phase-Proteinen zählen neben dem C-reaktiven Protein unter anderem das Transportprotein Caeruloplasmin, die Gerinnungsfaktoren Prothrombin und Fibrinogen, die Komplementfaktoren C1-C9 des oben erwähnten Komplementsystems, Präkallikrein des Kallikrein-Kinin-Systems und die Proteinaseinhibitoren α_1 -Antitrypsin und α_1 -Antichymotrypsin. (Löffler & Petrides, 2003, S. 1107-1108)

Erworbene Immunität

Bei der erworbenen, adaptiven Immunabwehr spielen die B- und T-Zellen eine zentrale Rolle. Bei dieser Immunabwehr geht es nicht mehr um eine unspezifische Abwehr, bei der allgemeine Merkmale von Pathogenen für eine Abwehrreaktion ausreichen, sondern um eine gegen Epitope auf Antigenen gerichtete sehr spezifische Abwehrreaktion, welche dann gezielt gegen ein oder mehrere Pathogene zum Einsatz kommt. Hierbei sind die Oberflächenrezeptoren der B- und T-Zellen unersetzlich, da von deren „Spitze“, dem variablen Teil des Rezeptors die Spezifität der Rezeptoren und damit die der Zellen abhängt. Dabei ist anzumerken, dass der Rezeptor der B-Zellen von der Struktur her einem an die Oberfläche befestigten Antikörper gleicht, das heißt, dass dieser Rezeptor die klassische Y-Form besitzt, bestehend aus 4 mit Disulfidbrücken verbundenen Aminosäureketten mit mehreren konstanten Regionen von über der Y-Gabelung bis hin zum Y-Stamm, über den er mit der Zell-

oberfläche verbunden ist. Am offenen Ende des Y besteht der Antikörper bzw. der Rezeptor an jedem Arm aus je zwei variablen Regionen, die gemeinsam ein zum Epitop des Antigens entgegengesetzt verlaufendes Epitop (Aminosäuresequenz) zur spezifischen Antigenbindung aufweisen. Die Vielfalt dieser möglichen Epitope ergibt sich aus dem Genom, das heißt, es wird durch genetische Rekombination eine DNA-Sequenz irreversibel zusammengesetzt, die eine gesamte variable Region codiert. Zusätzlich wird durch Entfernen oder Hinzufügen von Nukleotiden an den Verknüpfungsstellen und durch die Verschiedenheit der variablen Regionen, die durch einen anderen Satz von Gensegmenten codiert werden, eine ungeheure Vielfalt möglich. (Janeway/Travers & Walport/Shlomchik, 2002, S. 17-19)

Darüber hinaus besitzt die B-Zelle wie alle Zellen desselben Organismus auf ihrer Zelloberfläche membrangebundene Glykoproteine, die von einer Gruppe von Genen, genannt Haupthistokompatibilitätskomplex (major histocompatibility complex, MHC) oder beim Menschen HLA, codiert werden. Über diese HLA werden den T-Zellen die Peptidantigene präsentiert. Es wird zwischen HLA I und HLA II unterschieden, wobei sowohl nach der Peptidlänge als auch nach dem Ursprung des Peptides, genauer dessen Weg in Form des Pathogens in die Zelle hinein und in Form des Peptidfragments auf dem HLA aus der Zelle heraus hin zu deren extrazellulärer Zelloberfläche, differenziert wird. So werden z. B. Viren über Pinozytose ins Zytoplasma aufgenommen, ubiquitinyliert, über das Proteasom abgebaut und deren Fragmente in einer Länge von 9-11 Aminosäuren auf dem HLA I an die Zelloberfläche transportiert und dort präsentiert. Andererseits werden Bakterien nach Bindung an einen Rezeptor endozytiert und nach Verschmelzung mit Lysosomen und Einbau von Protonenpumpen in die Phagolysosomenmembran im sauren Milieu durch Proteasen in Peptidfragmente zerkleinert. Anschließend werden die Peptidfragmente mit einer Länge von 10-30 Aminosäuren auf den HLA II platziert und durch Exozytose vom

endoplasmatischen Retikulum über den Golgi-Apparat an die äußere Seite der Zellmembran transportiert und dort präsentiert. (Janeway/Travers & Walport/Shlomchik, 2002, S. 25-31)

Lymphozyten

Alle Zellen können anhand ihrer Oberflächenstruktur bzw. der am äußeren Blatt der Zellmembran unterschiedlich vorkommender Proteine (Rezeptoren und Co-Rezeptoren) nach einem mit Antikörpern erstellten Differenzierungsschema, einer CD(Cluster of Differentiation)-Nummer, eingeteilt werden. So kann man die T-Lymphozyten oder T-Zellen in drei Populationen trennen, die CD3+4-8+ oder cytotoxische T-Zellen und die CD3+4+8- oder T-Helfer-Zellen, T_{H1}-Zellen und T_{H2}-Zellen.

Diese Differenzierung kommt im Laufe der Reifung der Zellen im Thymus zustande, nachdem sie zuvor im Knochenmark gebildet wurden und zum Thymus gewandert sind. Hier findet während der Ontogenese auch die Positiv- und Negativ-Selektion der T-Zellen statt. Da jedes Individuum Zellen mit einer eigenen, individuellen HLA-Sequenz besitzt, die auch als „eigen“ erkannt und damit toleriert werden müssen und alle fremden Zellen eine fremde HLA-Sequenz haben, die auch als „nicht eigen“ erkannt und bekämpft beziehungsweise zerstört werden müssen, kommt es im Thymus zuerst zur Positiv-Selektion, bei welcher alle T-Zellen, die eine eigene HLA-Struktur ohne Peptid beladen mit ihrem T-Zell-Rezeptor binden können, überleben. Bei allen anderen T-Zellen, die dazu nicht in der Lage sind, wird die Apoptose induziert. Die überlebenden T-Zellen unterliegen jetzt noch der Negativ-Selektion und werden der Apoptose zugeführt, wenn sie mit hoher Affinität an eine eigene mit einem Autoantigen beladene HLA-Struktur binden. Kann dies ausgeschlossen werden, darf die Zelle weiterleben. So soll schließlich ein individuell kompetentes und protektives Repertoire an T-Zellen aufgebaut werden, welches gleichzeitig auch eine Autoreaktivität,

also eine Autoimmunerkrankung verhindern soll. (Löffler & Petrides, 2003, S. 1127-1129)

Wird nun ein HLA II mit Peptid von einer B-Zelle präsentiert und eine T-Zelle, genauer eine T_{H2}-Zelle, lagert sich spezifisch mit ihrem T-Zell-Rezeptor, der übrigens nicht wie der B-Zell-Rezeptor einen heterotetramer gebundenen Antikörper darstellt, sondern nur ein Heterodimer ist, daran an, so kommt es mithilfe von Co-Rezeptoren von der T-Zelle wie dem CD3, CD4, CD28 und CTLA-4 (zu APCs) oder hier CD40L (Ligand), von Seiten der antigenpräsentierenden Zelle (APC) des CD80/86 oder B7-Molekül und bei der B-Zelle zusätzlich des CD40 zur Aktivierung der B-Zelle. Daraufhin kommt es zur Klonierung und schließlich Differenzierung zur Plasmazelle, welche den für das Peptid beziehungsweise für das Epitop spezifischen Antikörper sezerniert. Der Antikörper kann jetzt für Neutralisierung, Opsonisierung und Aktivierung des Komplementsystems und damit für eine wesentlich spezifischere und effektivere Bekämpfung des Pathogens sorgen. Die Plasmazellen haben eine kürzere Überlebensdauer als die B-Zellen, allerdings gibt es einige überlebende Zellen, die die Antikörperproduktion einstellen und sich zu Gedächtniszellen umwandeln, sich also an dieses Pathogen erinnern können. Das ist die Grundlage für die noch schnellere und noch effektivere Immunabwehr mit ImmunglobulinG(IgG)-Antikörpern bei einer Sekundärinfektion, wogegen bei der Primärinfektion oder Erstinfektion die Immunabwehr mit ImmunglobulinM(IgM)-Antikörpern noch nicht so schnell und effektiv arbeiten kann, da es noch keine parat stehenden Gedächtniszellen gibt. (Janeway/Travers & Walport/Shlomchik, 2002, S. 25-45) (Löffler & Petrides, 2003, S. 1130-1146)

Wichtig für das Verständnis der Reaktionen und Wirkungen der Zellen ist auch, dass diese Wechselwirkungen, Aktivierungen und Reifungen der Zellen nicht allein durch

Zell-Zell-Oberflächenproteinwechselwirkungen zustande kommen, sondern eben auch durch das Ausschütten von Cytokinen, die dann vor allem autokrin auf sich selbst und parakrin auf die Zellen in der direkten Umgebung, aber in diesem Zusammenhang eher seltener endokrin, wirken. Für die Entwicklung der naiven CD4+ Zelle hin zur T_{H0}-Zelle kommt Interleukin-2 (IL-2) eine zentrale Bedeutung zu. Auch bei der Weiterentwicklung ist IL-2 noch wichtig, zur Entstehung der T_{H2}-Zelle sind aber vor allem IL-4 und IL-10 zu nennen, wie zur Entwicklung der T_{H1}-Zelle IL-12 und IL-18 zu erwähnen sind. Die T_{H1}-Zelle sezerniert IL-2, Interferon- γ (IFN- γ) und Tumornekrosefaktor- β (TNF- β). Die T_{H2}-Zelle dagegen schüttet IL-3, IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 und IL-13 aus. (Löffler & Petrides, 2003, S. 1129-1130)

Im Gegensatz zu den T_{H2}-Zellen, die mit den B-Zellen in Wechselwirkung treten und, wie oben beschrieben, damit zur Bildung von Antikörpern führen, welche die extrazellulär gelegenen Pathogene angreifen, so sind die T_{H1}-Zellen für die Bekämpfung von intrazellulär gelegenen Pathogenen sehr wichtig.

Normalerweise werden Bakterien, die in Makrophagen gelangt sind, in dem sauren Milieu der Lysosomen proteolytisch und mithilfe bakterizider Stoffe zerstört. Doch gibt es auch Bakterien wie z. B. das Mycobakterium leprae oder das Mycobakterium tuberculosis, die sich intrazellulär in membranumschlossenen Vesikeln vermehren, was durch eine nicht stattfindende Fusionierung dieser Vesikel mit Lysosomen ermöglicht wird. Die T_{H1}-Zellen können solche Infektionen bekämpfen helfen, indem sie die Makrophagen aktivieren, infolge dessen den Zusammenschluss der Bakterien enthaltenden Vesikel mit den Lysosomen bewirken und damit für die Zerstörung der Bakterien sorgen. (Janeway/Travers & Walport/Shlomchik, 2002, S. 27-29)

Schließlich gibt es noch die CD3+4-8+ cytotoxischen T-Zellen, die die Fähigkeit besitzen, virusinfizierte Zellen beziehungsweise infizierte Zellen, die eine Virussequenz

auf ihrem HLA I tragen, über ihren T-Zell-Rezeptor zu erkennen. Nachdem eine infizierte Zelle lokalisiert ist, wird diese abgetötet, bevor die virale Replikation durch den vom Virus verwendeten Syntheseapparat der Wirtszelle abgeschlossen ist und das Virus selbst die Zelle zerstört, um neu synthetisierte Viren freizusetzen.

(Janeway/Travers & Walport/Shlomchik, 2002, S. 27-29)

Das Abtöten der Zelle geschieht durch die Induktion der Apoptose, die auf zwei Wegen ausgelöst werden kann. Erstens kommt es zur Exozytose von cytolytischen Granula durch die cytotoxische T-Zelle. Diese enthalten Perforin, ein in der Zellmembran der Zielzelle porenbildendes Protein, und Kathepsin C, welches Granzyme aktiviert, die wiederum über die Aktivierung von Caspasen zur Induktion der Apoptose führen. Zweitens wird auf aktivierten T-Zellen das Protein Fas-Ligand (Fas-L) exprimiert, welches über die Wechselwirkung mit Fas (CD95), das nicht konstitutiv auf Zellen vorkommt und nur auf z. B. durch eine Entzündung oder eine Infektion aktivierten Zellen exprimiert wird, die Apoptose über Aktivierung einer intrazellulären Signalkaskade bis hin zu den Caspasen induziert. (Löffler & Petrides, 2003, S. 1133-1134)

1.4 Fragestellung der Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit soll das Blut von MS-Patienten und das Blut von Nicht-MS-Patienten, also bezüglich der MS von gesunden Probanden (Kontrollen), während identischer experimenteller Untersuchungen verglichen werden. Dabei sollen nach Bearbeitung des Blutes vor allem die T-Zellen und deren Funktionalität in Augenschein genommen werden. Besonderes Augenmerk gilt dabei den CD4+25^{high} Zellen, den sogenannten regulatorischen T-Zellen (Treg), denen laut Sakaguchi, 2000 und

Shevach et al., 2001 bei der Homöostase des Immunsystems und insbesondere bei der Verhinderung von Autoimmunerkrankungen durch ihre Fähigkeit selbstreaktive T-Zellen, also T-Zellen die körpereigene Antigene angreifen, zu unterdrücken anscheinend eine Schlüsselrolle zukommt und die deshalb auch weltweit im Fokus vieler Untersuchungen stehen (Viglietta et al., 2004) (Baecher-Allan et al., 2006) (Jürgen Haas et al., 2005).

Unter Inanspruchnahme des FACSCalibur (Fluorescence Activated Cell Sorting) werden nach Fluoreszenzfarbstofffärbungen die einzelnen Zellpopulationen und Zellfraktionen quantitativ gemessen und miteinander verglichen beziehungsweise auf Signifikanzen überprüft. Dabei ist zu der CD4+25+ Zellpopulation zu sagen, dass bei dieser im Verlauf dieser Arbeit entsprechend der Abb. 3 immer ein Gate auf die CD25 hoch positiven Zellen gesetzt wurde. Da die Gatesetzung bezüglich der CD4+25+ Zellpopulation in dieser Arbeit bei allen Laboruntersuchungen dieselbe ist und es sich folglich immer um die CD4+25^{high} Zellpopulation handelt, wird im Folgenden nicht mehr von CD4+25^{high} Zellen, sondern nur noch von CD4+25+ Zellen gesprochen.

Des Weiteren soll die Färbung des intrazellulär in regulatorischen T-Zellen gelegenen Transkriptionsfaktors Foxp3 vorgenommen und ebenfalls eine quantitative Erfassung durchgeführt werden. Foxp3 konnte laut Yagi et al., 2004, Hori et al., 2003 und Fontenot et al., 2003 im Zusammenhang mit der Aktivierung und Funktionalität von regulatorischen T-Zellen und deren inhibitorischer Wirksamkeit auf T-Effektor-Zellen nachgewiesen werden und gilt als intrazellulärer Marker für aktivierte regulatorische T-Zellen (Baecher-Allan et al., 2006) (Jürgen Haas et al., 2005).

Mit Blick auf die inhibitorische Wirksamkeit der regulatorischen T-Zellen soll außerdem in einem Proliferation-Assay mithilfe des FACSAria Zellsorters durch Zugabe ansteigender Zellzahlen von regulatorischen T-Zellen zu Responder-Zellen die Hemmung der Proliferation demonstriert werden. Wiederum geht es bei der Betrachtung

der Fähigkeit zur Inhibition der Effektor- beziehungsweise der Responder-Zellen natürlich um den Vergleich dieser Fähigkeit und deren Intensität zwischen MS-Patienten und gesunden Kontrollen, wie dieser bereits von Viglietta et al., 2004 angestellt wurde.

Außerdem hat sich gezeigt, dass bei der Inhibition durch die regulatorischen T-Zellen nicht nur die Proliferation, sondern auch die Sekretion von Cytokinen gehemmt wird, von denen in diesem Zusammenhang das von T_{H1} -Zellen sezernierte Interferon- γ , welches bei der Aktivierung von selbstzerstörerischen, autoreaktiven T-Zellen ausgeschüttet wird, von besonderer Bedeutung ist (Viglietta et al., 2004) (Venken et al., 2006). Aufgrund dieser Erkenntnis sollen verschiedene Antigene, darunter unterschiedliche virale Antigene, wie zum Beispiel vom Adenovirus und vom Epstein-Barr-Virus, und Myelinoberflächenproteine wie das Myelin Oligodendrozyten Glykoprotein (MOG) mit der Aminosäuresequenz 1-125, was dem extrazellulären Teil dieses transmembranen Myelinproteines entspricht (Weissert et al., 2002), im Rahmen des Elispot mit den Zellen in Kontakt gebracht werden, mit der Hoffnung, dass diese Zellen einen MHC II- beziehungsweise einen HLA II-Komplex auf ihrer Zelloberfläche mit entsprechend gegenläufig codierter Aminosäuresequenz tragen, das Antigen also wiedererkennen, und darauf folglich mit einer Sekretion von Interferon- γ reagieren, das dann im Elispot nachgewiesen wird.

Sowohl beim Proliferation-Assay als auch beim Elispot werden wie zuvor auch schon quantitative Zählungen beziehungsweise Messungen von Patienten und Kontrollen erhoben, welche auf relevante Signifikanzen hin untersucht werden.

2 MATERIAL

2.1 Geräte

Arbeitsbank mit Abzug	renggli
Blutanalysegerät ADVIA 120	SIEMENS
Elispot-Analysgerät transtec 1300	AID (Autoimmun Diagnostika GmbH)
FACSCalibur	BECTON DICKINSON
Hochleistungswaage Explorer®Pro	OHAUS®
Hochleistungswaage mit Umgebungs- schutz SI-234	DENVER INSTRUMENTS
Inkubator (Hera _{CELL}) 37,0 °C, 5,0 % CO ₂	Heraeus
Sorter FACSAria™	BD Biosciences
Sterile Arbeitsbank	Heraeus
Mikroskop CX 40	OLYMPUS
Mikrowelle	SIEMENS
Multikanalpipette (12 Pipetten) CALIBRA 852, 20-200 µl	SOCOREX

Pipetierhelfer PIPETBOYplus	INTEGRA BIOSCIENCES
pipetman, 1-10 µl	GILSON
pipetman, 2-20 µl	GILSON
pipetman, 100 µl	GILSON
pipetman, 200 µl	GILSON
pipetman, 1000 µl	GILSON
Proliferation-Assay-Analysegerät 1450 MicroBeta [®] Trilux Harvester 1295-012 HEAT SEALER	EG&G WALLAC TOMTEC WALLAC
Vortex Mixer HeidolphREAXtop	neoLab [®] Labor- Spezialprodukte
Zentrifuge	Hettich ROTIXA/RP
Zentrifuge MULTIFUGE 3 S-R	Heraeus

2.2 Material, Chemikalien und Reagenzien

Material

CELLSTAR [®] TUBES (FALCON), 15 ml	greiner bio-one
CELLSTAR [®] TUBES (FALCON), 50 ml	greiner bio-one

EDTA-Blutentnahmeröhrchen S-MONOVETTE® 9 ml K3E	SARSTEDT
Erlenmeyerkolben, 100 ml	SCHOTT DURAN
Erlenmeyerkolben, 3 l	SCHOTT DURAN
FACS-Röhrchen Polystyrene Round-Bottom Tube, 5 ml	BD Falcon™
FACS-Röhrchen Polystyrene Round-Bottom Tube with Cell-Strainer Cap, 5 ml	BD Falcon™
Glaspipette 2 ml in 1/100	Costar®
Glaspipette 5 ml in 1/10	Costar®
Glaspipette 10 ml in 1/10	Costar®
Glaspipette 25 ml in 2/10	Costar®
Injekt Luer Solo, 20 ml Spritze	BRAUN
Pipettenspitzen 10 µl, farblos	Biozym Scientific GmbH
Pipettenspitzen 200 µl, gelb	SARSTEDT
Pipettenspitzen 1000 µl, blau	greiner bio-one
Printed Filtermat A for use with 1450 MicroBeta™	PerkinElmer®
Safe-Lock Tubes, 1,5 ml	Eppendorf AG

Safe-Lock Tubes, 2 ml	Eppendorf AG
Sample Bag for use with 1450 MicroBeta™	WALLAC
Sterilfilter 0,22 µm	MILLIPORE
Sterilfilter 0,45 µm	MILLIPORE
Wanne für Multipipetten Reagent Reservoir Polystrene, 50 ml	Costar® Corning Incorporated
Zellkammer nach Neubauer 0,100 mm Tiefe/Depth/Profondeur 0,0025 mm ²	Assistent
96-well Platte für Elispot mit Flachboden TISSUE CULTURE PLATE, 96W FLAT BOTTOM, WITH LID, STERILE	MILLIPORE
96-well Platte für Proliferation-Assay mit Rundboden PS-MICROPLATE, 96 well, U-SHAPE	greiner bio-one
Fertigprodukte	
BIOCOLL SEPARATING SOLUTION (FICOLL SEPARATING SOLUTION) Isotonic solution, Density 1,077 g/ml	BIOCHROM AG
DPBS Dulbecco's Phosphate Buffered Saline – 0,0095 (PO4) without Ca and Mg	BioWhittaker® LONZA

DPBS (10x) Dulbecco´s Phosphate Buffered Saline – 0,0095 (PO4) without Ca and Mg	BioWhittaker® LONZA
FACS™ Accudrop Beads Cat # 345249	BD
Foxp3 Staining Buffer Set Fixation/Permeabilization Concentrate Cat # 00-5123-43 Fixation/Permeabilization Diluent Cat # 00-5223-56 10x Permeabilization Buffer Cat # 00-8333-56	eBioscience
Hydrogen peroxide 30% Wasserstoffperoxid 30%	Fluka
Lyselösung für FACS (Lysing-Buffer) bei extrazellulärer Färbung 1000 ml enthalten: 8,2900 g Ammoniumchlorid z.A., 1,0000 g Kaliumhydrogencarbonat z.A., 0,0372 g Na2-EDTA-2H2O z.A.	Universitätsapotheke Tübingen
Medium RPMI 1640 (+ L-Glutamine) (+ 25 mM HEPES)	GIBCO® invitrogen™
N,N-DIMETHYLFORMAMIDE (DMF) 99+%	SIGMA
OptiPhase `Super Mix` für Analyse des Proliferation-Assay mit Harvester	WALLAC

Streptavidin, Peroxidase Conjugate
Cat # 189733

CALBIOCHEM®

Trypan Blue Solution (0,4%)
T 8154, 100 ml

SIGMA

2-MERCAPTOETHANOL
50 MM

GIBCO

3-AMINO-9-ETHYL-CARBAZOLE
A-5754-10g

SIGMA

[6-³H] Thymidine, Aqueous solution
925 GBq/mmol, 25.0 Ci/mmol
1 ml 37 MBq 1mCi

Amersham
LIFE SCIENCE

Zubereitete Produkte

Elispot - Buffer:

0,1 M Natriumazetat, ph 4,8

1 L 82,03 g/mol

0,1 mol (8,203 g) in 1 L Millipore-Wasser

Fix/Perm Buffer:

Mischung aus Fix/Perm Concentrate und

Fix/Perm Diluent im Verhältnis 1:3

Medium für Elispot:

Medium RPMI 1640 (500 ml)

(+ L-Glutamine)

(+ 25 mM HEPES)

mit: 5% FCS (Fötale KälberSerum)

1% GLU (5 ml Glutamine)

1% P/S (5 ml Penicillin/Streptomycin)

0,1% 2-ME (0,5 ml 2-MERCAPTOETHANOL)

Millipore-Wasser:

Demineralisiertes, 2x destilliertes Wasser, ultra pure
18,2 MΩ/cm, 25 °C, gefiltert durch einen 0,22 µm Sterilfilter

PBSA-Lösung (FACS-Flow) zur Waschung der FACS-Röhrchen:

1x PBS containing 0,2% (w/v) sodium azide (SIGMA cat # S-2002)
and 0,2% (w/v) bovine serum albumin (BSA) (SIGMA cat # A-2153)

1x Permeabilization Buffer:

10x Permeabilization Buffer 1:9 mit PBS verdünnen

Antigene

Verwendete humane Antigene:

Adenovirus Hexon EIA Antigen	VIRION SERION
Adenovirus Type 2. Strain Adenoid 6. Batch A128FAW, Cat # BA128VS 1 mg, 0,680 mls at 1,47 mg/ml (0,6 mg/10 ml) 20 µl pro well, 100 µl/ml	
CEF – Peptide – Pool	PANATECS
Cat # PA-CEF-001, 20 µl/ml contains 23 HLA class I-restricted T-cell epitopes from human Cytomegalovirus, Epstein-Barr virus and Influenza virus 20 µg/ml, Volumen 1/10 zum Medium, 0,2 µg/well	
CMV pp65 - Recombinant Protein	Miltenyi Biotec
Full-length protein	MACS
Human Cytomegalovirus (CMV), strain AD 169; recombinant from E. coli Cat # 130-091-824, 200 µl, (3 mg/ml), 10 µl/ml, 2 µl pro well oder 1/10 der Stocklösung	

EBNA-1 (Epstein-Barr-Virus, EBV)
Cat # 10-523-001
(260 µg/ml), 10 µl/ml, 2 µl pro well
oder 1/10 der Stocklösung

ABI, Advanced
Biotechnologies Inc

PHA-M (PHA) für Elispot
Phytohaemagglutinin als Positiv-Kontrolle
240 µg/ml, Volumen 1/10 zum Medium, 2,4 µg/ml

SIGMA

Universitär selbst hergestellte Antigene:

Adenovirus (ADV), Spezies C, inaktiviert, 10 µl/ml,
2 µl pro well oder 1/10 der Stocklösung,
Isoliert aus dem Plasma eines Kindes nach Stammzelltransplantation
Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von
Herrn Prof. Dr. Dr. Klaus Hamprecht, Institut für Virologie
Herrn PD Dr. Tobias Feuchtinger, Kinderklinik
Im Folgenden wird dieses Virus als „Glas“ bezeichnet

Humane Myelinproteine (Myelin Oligodendrozyten Glykoprotein, MOG):

rHuMOG 1-125 (Aminosäuresequenz) in acetate (löslich)
0,53 mg/ml, 10 µg/ml
Freundlicherweise her- und zur Verfügung gestellt von
Frau Dr. Kathy de Graaf, Hertie-Institut

rHu(recombinantHuman)MOG 1-125 in PBS (nicht löslich)
2 mg/ml, 10 µg/ml
Freundlicherweise her- und zur Verfügung gestellt von
Frau Dr. Kathy de Graaf, Hertie-Institut

rHuMOG 1-125 ref. (zurückgefaltet), 0,63 mg/ml, 10 µg/ml
Freundlicherweise her- und zur Verfügung gestellt von
Frau Dr. Kathy de Graaf, Hertie-Institut

Mit Fluoreszenzfarbstoffen beladene und unbeladene Antikörper

Verwendete extrazelluläre Antikörper (Anti-human) gegen:

CD3 – alle T-Zellen (1 mg/ml) unbeladen zur Stimulation des T-Zell-Rezeptors und beladen mit FITC oder PerCP	BD
CD4 – T-Helfer-Zellen, T _{H1} und T _{H2} beladen mit FITC oder APC	BD
CD8 – Cytotoxische T-Zellen beladen mit PE	BD
CD16/56 – NK (Natürliche Killer)- Zellen beladen mit PE	BD
CD19 – B-Zellen beladen mit APC	BD
CD25 – Regulatorische T-Zellen beladen mit APC	BD
CD28 Pure (low azide) – T-Zellen (1 mg/ml) unbeladen zur Stimulation des T-Zell-Rez. (TCR)	BD
CD45 – alle Lymphozyten beladen mit PerCP	BD
CD69 – aktivierte T-Zellen beladen mit PE	BD
CDDR – HLA DR, alle Zellen des Individuums, die MHC (HLA) II exprimieren; beladen mit PE	BD

Anti-human Interferon- γ mabtech
mAb 1-D1K
1 ml; 1 mg/ml
Code: 3420-3-1000
Batch No.: 49

Anti-human Interferon- γ mabtech
Mab 7-B6-1-Biotin
1 ml; 1 mg/ml
Batch: 3420-6-27

Kontrolle für extrazelluläre und intrazelluläre
Durchflusszytometrie
SimultestTM BD
Ig G γ 1 – FITC
Ig G γ 2a – PE
Cat # 342409

Verwendete intrazelluläre Antikörper (Anti-human):

PE Anti-human Foxp3 (clone PCH101) eBioscience
Cat # 12-4776

2.3 Firmenliste

AID Diagnostika GmbH, Straßberg, Deutschland

Advanced Biotechnologies Inc (ABI), Columbia, USA

Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg, Deutschland

Andreas Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen, Deutschland

Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland

Biochrom AG, Berlin, Deutschland

Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland

Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland

Corning B.V. Life Sciences, Amsterdam, Niederlande

Denver Instrument GmbH, Göttingen, Deutschland

Duran Group GmbH, Wertheim/Main, Deutschland

eBioscience, Inc., San Diego, USA

Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

Fluka Chemie GmbH, Oberhaching, Deutschland

Gilson, Inc., Middleton, USA

Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH &Co KG, Sondheim, Deutschland

Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland

Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland

Institut Virion\Serion GmbH, Würzburg, Deutschland

Integra Biosciences GmbH, Fernwald, Deutschland

Invitrogen GmbH, Darmstadt, Deutschland

Lonza Cologne GmbH, Köln, Deutschland

Mabtech AB, Nacka Strand, Schweden

Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

Millipore GmbH, Schwalbach/Ts., Deutschland
Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland
neoLab, Heidelberg, Deutschland
Ohaus Europe GmbH, Nänikon, Schweiz
Olympus Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland
Panatecs GmbH, Tübingen, Deutschland
PerkinElmer, Rodgau, Deutschland
PerkinElmer Life Sciences Wallac Oy, Turku, Finnland
Renggli AG, Rotkreuz, Schweiz
Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Schott Medica GmbH, Wertheim, Deutschland
Siemens AG, München, Deutschland
Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Socorex Isba S.A., Ecublens, Schweiz

3 METHODEN

3.1 Durchflusszytometrie bei extrazellulärer Färbung

Die Durchflusszytometrie wird hier am FACSCalibur durchgeführt, das einen Dual-Laser bestehend aus einem luftgekühlten Argon-Laser und einem roten Dioden-Laser besitzt, was eine gleichzeitige Mehrfachfarbenanalyse erlaubt.

Die Lymphozyten sollen aus dem Vollblut heraus angefärbt, also mit fluoreszenzhaltigen Substanzen besetzten Antikörpern markiert werden. Dies ist die Voraussetzung dafür, die markierten Zellpopulationen in der Durchflusszytometrie (FACS, Fluorescence Activated Cell Sorting) zählen zu können, um diese dann zwischen MS-Kranken und Gesunden zu vergleichen und daraus Erkenntnisse zu ziehen.

Als Fluoreszenzfarbstoffe, gekoppelt an den F_C-Teil der Antikörper, kommen FITC (Fluoreszeinisothiocyanat), PE (Phycoerythrin), PerCP (Peridin Chlorophyll) und APC (Allophycocyanin) zum Einsatz, die jeweils bei unterschiedlichen Wellenlängen im Nanometerbereich absorbieren und emittieren.

FACS aus Vollblut

Die Antikörper mit entsprechender Fluoreszenzfarbstoffkoppelung werden in 5 FACS-Röhrchen mit Vollblut folgendermaßen kombiniert:

1	2	3	4	5	
Kontrolle	CD3	CD3	CD4	CD4	FITC
	CD8	CD16/56	CDDR	CD69	PE
	CD45	CD45	CD3	CD3	PerCP
	CD4	CD19	CD25	CD25	APC

- 100 µl Vollblut in die FACS-Röhrchen geben → Vortex
- Antikörper gegen CDs und Kontroll-Antikörper im Überschuss in die Röhrchen geben, um die Bindungsstellen zu sättigen (20 µl Antikörper pro Röhrchen, nur bei APC mit 3 µl) → Vortex
- für 15-30 min dunkel bei + 4 °C abstellen (Kühlschrank)
- Röhrchen mit Lysepuffer füllen
- für 5-10 min in den Kühlschrank
- 7 min zentrifugieren bei 400 g → Abschütten und Vortex
- Röhrchen mit FACS-Flow (PBSA) füllen
- 7 min zentrifugieren bei 400 g → Abschütten und Vortex
- In jedes Röhrchen tröpfchenweise FACS-Flow zugeben und dann am FACSCalibur analysieren

Anschließend kann die zuvor vom Blutanalysegerät ADVIA 120 aus Vollblut bestimmte Leukozytenzellzahl mit den in Prozent gemessenen Zellfraktionen vom FACSCalibur verrechnet werden.

3.2 Durchflusszytometrie bei intrazellulärer Färbung

Zunächst sollen die Lymphozyten aus dem Blut der Patienten beziehungsweise der Kontrollen mithilfe von Ficoll durch die unterschiedliche Dichte der Bestandteile des Blutes und des Ficoll isoliert werden. Dabei zeigen sich wie in Abb. 1 dargestellt im 50 ml Falcon nach dem Zentrifugieren mehrere Abschnitte, die vom Boden bis zum Deckel hin aus einem mäßig großen Erythrozytenanteil und einer darüber gelegenen dünnen Granulozytenschicht besteht, gefolgt von einem relativ großen Abschnitt mit

Ficoll, auf dem eine dünne weiße Schicht zu liegen kommt. Diese dünne weiße Zellschicht, Interphase genannt, enthält die Monozyten/Lymphozyten, weswegen diese Zellen auch als MNC (Mononukleäre Zellen) oder als PBMCs (Peripheral Blood Mononuclear Cells) bezeichnet werden. Als Abschluss folgt auf die Interphase ein wieder größerer Abschnitt mit Serum und/oder PBS.

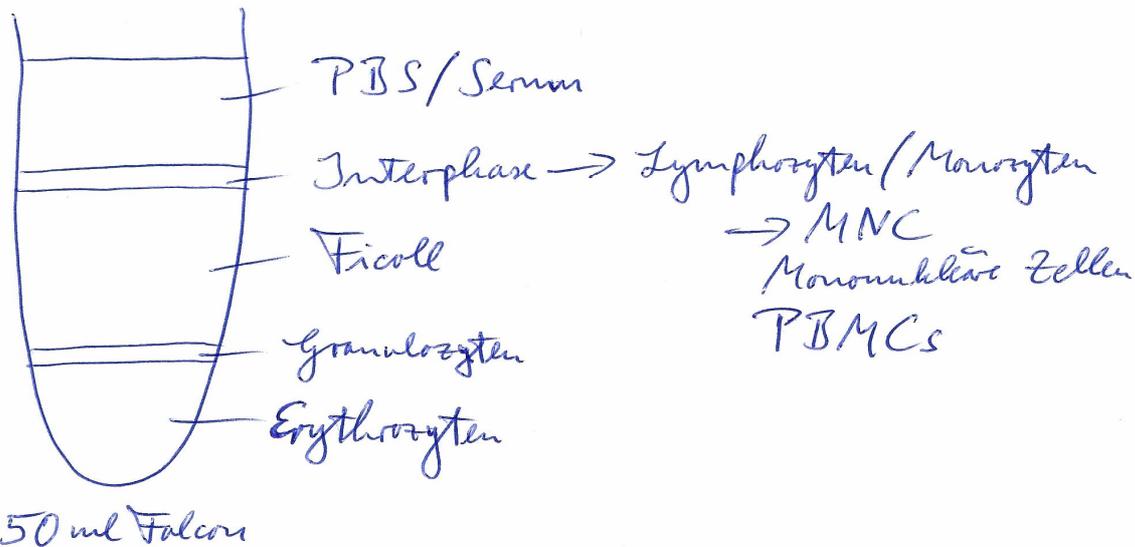


Abb. 1 Übersicht über die einzelnen Schichten beim Ficoll

Ficoll

- 1. Falcon (50 ml) mit 15 ml Ficoll füllen
- In dem 2. Falcon (50 ml) werden 2 EDTA-S-Monovetten Blut (ca. 17,5 ml) mit ca. 17,5 ml PBS 1:1 verdünnt (gesamt 35 ml)
- mithilfe von Glaspipetten wird das Blut-PBS-Gemisch (2. Falcon) in das schräg gehaltene 1. Falcon ganz langsam auf das Ficoll überschichtet
- 20 min zentrifugieren bei 800 g, Bremse 3
- Interphase vorsichtig mit Glaspipette abnehmen, in ein frisches 3. Falcon (50 ml) geben und mit PBS bis 50 ml auffüllen
- 10 min waschen (zentrifugieren) bei 400 g → Abschütten, mit wenigen ml PBS Zellpalette auflösen und mehrmals resuspendieren
- mit PBS bis 50 ml auffüllen und erneut 10 min bei 400 g waschen

- Abschütten und Zellpalette nach Zugabe von 1,5 ml PBS auflösen und mehrmals resuspendieren
- Zellzahl mithilfe von Trypanblau und Neubauer-Zellkammer genau bestimmen und auf 1 Mio/ml einstellen. Das Einstellen auf 1 Mio/ml wurde von mir über die gesamte Arbeit hinweg aber nicht gemacht, sondern vergessen. Stattdessen wurden nach Zugabe von 1,5 ml PBS, Auflösen der Zellpalette und mehrmaligem Resuspendieren zur Bestimmung des Foxp3 direkt 100 µl Zellen entnommen.

Foxp3

Kombination der entsprechenden Antikörper und Fluoreszenzfarbstoffkoppelungen:

1	2	
CD4	CD4	FITC
Kontrolle	Foxp3	PE
CD3	CD3	PerCP
CD25	CD25	APC

- 100 µl der pro Patient bzw. Kontrolle aus je 2 EDTA-Röhrchen Blut durch Ficoll vorbereiteten Zellen in jedes FACS-Röhrchen geben
- Zugabe der Antikörper gegen CD3, CD4 und CD25
- für 15 min in den Kühlschrank stellen
- mit FACS-Flow waschen, 5 min bei 400 g zentrifugieren → Abschütten und Vortex
- 1 ml frisch zubereiteten Fix/Perm Buffer in jedes Röhrchen geben → Vortex
- für 30 min bis 1 Stunde in den Kühlschrank stellen

- FACS-Flow zugeben und bei 400 g für 5 min zentrifugieren → Abschütten und Vortex
- Zellen mit 2 ml 1x Permeabilization Buffer waschen, also 5 min bei 400 g zentrifugieren → Abschütten und Vortex
- Zellen mit 2 ml 1x Permeabilization Buffer waschen, also 5 min bei 400 g zentrifugieren → Abschütten und Vortex
- Zugabe von 20 µl Anti-human Foxp3 Antikörper und Kontroll-Antikörper → für 30 min in den Kühlschrank stellen
- Zellen mit 2 ml 1x Permeabilization Buffer waschen, also 5 min bei 400 g zentrifugieren → Abschütten und Vortex
- Zellen mit 2 ml 1x Permeabilization Buffer waschen, also 5 min bei 400 g zentrifugieren → Abschütten und Vortex
- In jedes Röhrchen tröpfchenweise FACS-Flow zugeben und am FACSCalibur analysieren

3.3 Sorten und Proliferation-Assay

Der zum Einsatz kommende Sorter FACSAria™ ist ein Gerät mit 3 luftgekühlten Lasern bei 407 nm, 488 nm und 633 nm Wellenlänge, welcher dadurch zu einer Mehrfachfarbenanalyse bis hin zu 15 Parametern befähigt ist. Der Sorter kann Zellen nach Anfärbung mit Fluoreszenzfarbstoffen in 2 oder 4 FACS-Röhrchen gleichzeitig oder sogar in die Löcher einer 96-Loch(well)-Platte sortieren.

In der mit unbeladenen Antikörpern gegen CD28 und CD3 zur Stimulation der Proliferation vorbehandelten 96well-Platte sollen die abgezählt in Medium eingelegten Zellen nach einer ansteigenden Zugabe (Sorting) von CD4+25+ Zellen, einer mehrtägigen Inkubationszeit und nach Zugabe von radioaktivem Thymidin ³H und dessen

Einbau in den DNA-Strang der Zellen während der Proliferation detektiert, also gezählt werden.

Vorbereitung der 96well-Platte mit Rundboden (steril):

Zugabe von nicht markierten, also nicht mit Fluoreszenzfarbstoff beladenen Antikörpern gegen CD28 und CD3 zu PBS, so dass die Zellen mit einer Konzentration von 2 µg/ml über den TCR stimuliert werden.

- 100 µl davon pro well zugeben und für 1 Stunde im Brutschrank inkubieren (37 °C)
- steril abschütten
- 100 µl Medium pro well
- fertig zum Sorten

Auch für den Proliferation-Assay muss das Blut zuerst mit Ficoll bearbeitet werden, um die Lymphozyten zu gewinnen.

- Nach Ficoll aus mindestens 4 EDTA-Röhrchen Blut, um genug CD4+25+ regulatorische T-Zellen zu erhalten, die zu sortenden Zellen im 50 ml Falcon direkt mit CD4 FITC(50 µl)- und CD25 APC(25 µl)- Antikörpern im Überschuss anfärben, um die Bindungsstellen zu sättigen → Vortex
- für 20 min bei Raumtemperatur dunkel lagern (Schublade)
- bis 50 ml mit PBS auffüllen und für 10 min bei 400 g zentrifugieren
→ Abschütten und Zellpalette mit 1,5 ml PBS auflösen

- Diese Zellen dann durch einen im Verschluss eines sterilen FACS-Röhrchens integrierten Sieb in dieses hineinpipettieren
- SORTEN der Zellen in die vorbereitete 96well-Platte

Gewinnung von Responderzellen:

- Entnahme von ungefärbten Zellen nach Ficoll aus dem 50 ml Falcon als Responderzellen
- je 100 µl Zellen mit Medium auf 4 Mio/ml einstellen
- Davon dann direkt nach dem Sorten je 50 µl pro well zugeben, also 200 000 Zellen pro well

Sort-Schema der CD4+25+ Zellen für die 96well-Platte pro Individuum:

	1	2	3
A	—	—	—
B	2000	2000	2000
C	4000	4000	4000
D	10000	10000	10000
E	20000	20000	20000
F	40000	40000	40000

- Nach dem Sorten und nach Zugabe der Responderzellen wird die 96well-Platte für 5 Tage im Brutschrank bei 37 °C inkubiert
- Am 5. Tag wird Thymidin ³H im Verhältnis 1:20 mit Medium verdünnt
→ davon 25 µl pro well zugeben

- Nochmals 1 Tag im Brutschrank inkubieren
- Am insgesamt 6. Tag erfolgt dann die Auswertung mit dem 1450 MicroBeta[®] Trilux mit Harvester

3.4 Elispot

Beim Elispot geht es um den Nachweis eines Cytokins, bei dieser Arbeit des Interferon- γ , das nach Stimulation durch zupipettierte Antigene von den Lymphozyten, genauer den T-Zellen, ausgeschüttet wird. Bei der Analyse der Elispot-Platten (96-well-Platten mit Flachboden und Deckel) gilt es dann zu begutachten, wie stark auf welches Antigen reagiert wurde, also wie viele Spots (englisch: spot – Fleck, Tupfen) entstanden sind.

Zunächst muss der Boden der 96well-Platte mit Antikörpern gegen das gesuchte Cytokin, hier also Interferon- γ , benetzt werden (Coating):

Coating der 96well-Platten mit Flachboden:

- Anti-human Interferon- γ mAb 1-D1K in PBS geben
- davon 100 μ l pro well
- über Nacht (24 h) bei + 4 °C dunkel lagern (Kühlschrank)

Am nächsten Tag wird zunächst wieder aus mindestens 4 EDTA-Röhrchen Blut Ficoll gemacht, um die PBMCs inklusive der Lymphozytenfraktion zu erhalten. Diese Zellen werden wieder mit der Neubauer-Zellkammer und Trypanblau gezählt und auf 2 Mio/ml eingestellt.

- 2x waschen der 96well-Platte mit je 200 µl PBS pro well
- Platte blocken mit 200 µl Medium pro well, bei Raumtemperatur für 1 Stunde stehen lassen
- nachdem die Platte ausgekippt wurde, werden jetzt zunächst die Antigene pipettiert, 20 µl pro well bei natürlich 3 wells pro Antigen; dabei werden in die 3 wells der Negativ-Kontrolle (kein Antigen) je 20 µl Medium pipettiert
- anschließend werden die Zellen pipettiert, 200 µl pro well
- die 96well-Platte für 2 Tage im Brutschrank inkubieren

Entwicklung des Elispot:

Zunächst muss für die Waschung der 96well-Platte eine Waschlösung zubereitet werden. Dazu werden 300 ml 10x PBS in einen Erlenmeyerkolben gefüllt und dieser mit Millipore-Wasser bis auf 3 l voll gemacht.

- jetzt wird die 96well-Platte 5x damit in einer kleinen Wanne gewaschen, wobei die Waschlösung im Verlauf immer nach jeder zweiten Waschung erneuert wird
- nun wird Anti-human Interferon- γ Mab 7-B6-1-Biotin in einer Konzentration von 1 µg/ml in PBS pipettiert und davon werden 100 µl pro well zugegeben
- 2 Stunden bei Raumtemperatur stehen lassen
- 5x waschen
- Streptavidin-Peroxidase wird genauso zuerst in einer Konzentration von 1 µg/ml in PBS gegeben und davon werden schließlich wieder 100 µl pro well pipettiert
- 1 Stunde bei Raumtemperatur stehen lassen

Um diese Wartezeit sinnvoll zu nutzen, sollte die Entwicklungslösung hergestellt werden:

- 10 mg Carbazole abwiegen und 1 ml Dimethylformamide unter dem Abzug dazugeben
- 15 min unter dem Abzug stehen lassen
- in einen kleinen Erlenmeyerkolben kommen 25 ml 0,1 M Natriumazetat, ph 4,8. Zu diesen wird der 1 ml aus Carbazole/Dimethylformamide und anschließend noch 25 µl Wasserstoffperoxid pipettiert
- von dieser Entwicklungslösung werden 20 ml mit einer 20 ml Spritze aufgezogen und über einen 0,45 µm Sterilfilter in ein 50 ml Falcon gespritzt

Abschluss der Entwicklung:

- 8x waschen der 96well-Platte
- je 100 µl pro well von der Entwicklungslösung zupipettieren
- 10 min bei Raumtemperatur stehen lassen
- Abkippen und 1x kräftig mit destilliertem Wasser waschen
- Trocknen lassen

Nach dem Trocknen der 96well-Platte kann diese am Elispot-Analysegerät transtec 1300 ausgewertet werden.

4 ERGEBNISSE

Im Verlauf der Auswertung ist bei mir, vor allem aufgrund der Resultate des in 4.4 dargestellten Ergebnisses des 1. Teils des Elispot und der Tatsache, dass von der Erkrankung Multiple Sklerose mehr Frauen als Männer betroffen sind, die Erkenntnis gereift, dass im Rahmen der Bearbeitung und Auswertung der Daten nicht nur ein differenzierter Blick auf die Behandlung der Patienten, im Sinne von der Frage nach behandelten und unbehandelten Patienten und der Frage nach den einzelnen medikamentösen Therapien, sondern auch die Betrachtung der Geschlechterrollen, im Sinne von der Fragestellung nach signifikanten Differenzen zwischen den weiblichen und männlichen Patienten und auch zwischen den weiblichen und männlichen Kontrollen, sinnvoll ist.

Dies ist der Grund dafür, weshalb die Auswertungen der einzelnen Abschnitte jeweils nach einem Muster durchgeführt wurden. Dabei stand am Anfang immer die Betrachtung aller Patienten gegen alle Kontrollen. Anschließend erfolgte die Beurteilung der weibl. Patienten gegen die weibl. Kontrollen, der männl. Patienten gegen die männl. Kontrollen, aller Frauen (Patienten und Kontrollen) gegen alle Männer (Patienten und Kontrollen), der weibl. Patienten gegen alle Kontrollen, der männl. Patienten gegen alle Kontrollen und der weibl. Patienten gegen die männl. Patienten. Jetzt wurden auch noch die weibl. Kontrollen mit den männl. Kontrollen und beide Gruppen auch noch mit allen Patienten verglichen. Daraufhin wurden die therapierten mit den nicht therapierten Patienten, die therapierten Patienten mit allen Kontrollen, die nicht therapierten Patienten mit allen Kontrollen und die weibl. therapierten, die weibl. nicht therapierten, die männl. therapierten und die männl. nicht therapierten Patienten gegeneinander und gegen alle Kontrollen verglichen. Zu guter Letzt werden

Patienten im Schub mit therapierten und nicht therapierten Patienten und mit den einzelnen Therapien, also Glatirameracetat (Copaxone), Natalizumab (Tysabri), Avonex, Rebif, Interferon β -1a gesamt, Interferon β -1b (Betaferon), Interferon β gesamt und die einzelnen Therapien untereinander und die Patienten im Schub und die einzelnen Therapien jeweils gegen alle Patienten und alle Kontrollen miteinander verglichen. Aufgrund der immer weiteren Aufsplittung der Rohdaten kam es natürlich auch vor, dass nur noch 1 Patient oder sogar kein Patient in einer dieser Gruppen übrig blieb, was aber verständlich ist, da es sich bei dieser Arbeit ja nicht um eine Studie mit mehreren tausend Patienten oder noch mehr handelt. Sicherlich wäre dies auch in Bezug auf die Aussagekraft der statistischen Auswertung der Daten wünschenswert gewesen, mehr Patienten zu analysieren. Dies war im Rahmen dieser Arbeit aber nicht möglich und bleibt eine zukünftige Herausforderung.

Die im Folgenden präsentierten statistischen Ergebnisse wurden mit dem ungepaarten t-Test (two-tailed P value) bei einem 95 % Konfidenzintervall berechnet und sind bei Signifikanzen detailliert im Anhang aufgeführt. Signifikant differierende Mittelwerte sind im Rahmen der tabellarischen Darstellungen bei der direkten Gegenüberstellung zweier Gruppen rot eingerahmt, werden aber zum Teil auch nur im Text beschrieben.

4.1 Resultate der FACS-Analyse bei extrazellulärer Färbung

Zunächst sollen mithilfe der FACS-Analyse einzelne Zellfraktionen bzw. Zellpopulationen nach deren Quantität bestimmt werden. So geht es nach Färbung der Zellen mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen genauer um die quantitative Bestimmung der Zellpopulation der Lymphozyten insgesamt und deren anteiliger Zellfrak-

tionen der CD3+, CD4+, CD4+25+, CD8+, CD19+ und CD16/56+ Zellen. Von der Zellpopulation der CD3+ Zellen werden anschließend die Zellfraktionen der CD4+, CD4+25+ und CD8+ Zellen berechnet. Außerdem werden von der Zellpopulation der CD4+25+ Zellen noch die Zellfraktionen der CD69+ und der CDDR+ Zellen bestimmt. Dabei wird mit dem FACSCalibur entsprechend der Abb. 2 und Abb. 3 so vorgegangen, dass zuerst ein Gate auf die Lymphozytenzellfraktion eingestellt wird. Um die CD3+ Zellfraktion der Lymphozyten zu erhalten, wird das Gate auf die CD3+ und CD45+ Zellen gesetzt. Aus diesem Gate heraus werden nun die rein CD4+ und die rein CD8+ Zellen, sowie die rein CD19+ und die rein CD16/56+ Zellen gemessen. Außerdem wird ein Gate auf die hoch positiven CD25 Zellen von den CD4+ Zellen gesetzt, um die CD4+25+ Zellen zu erhalten. Zuletzt werden schließlich noch die CD69+ und CDDR+ Zellen aus dem Gate der CD4+25+ Zellen gemessen.

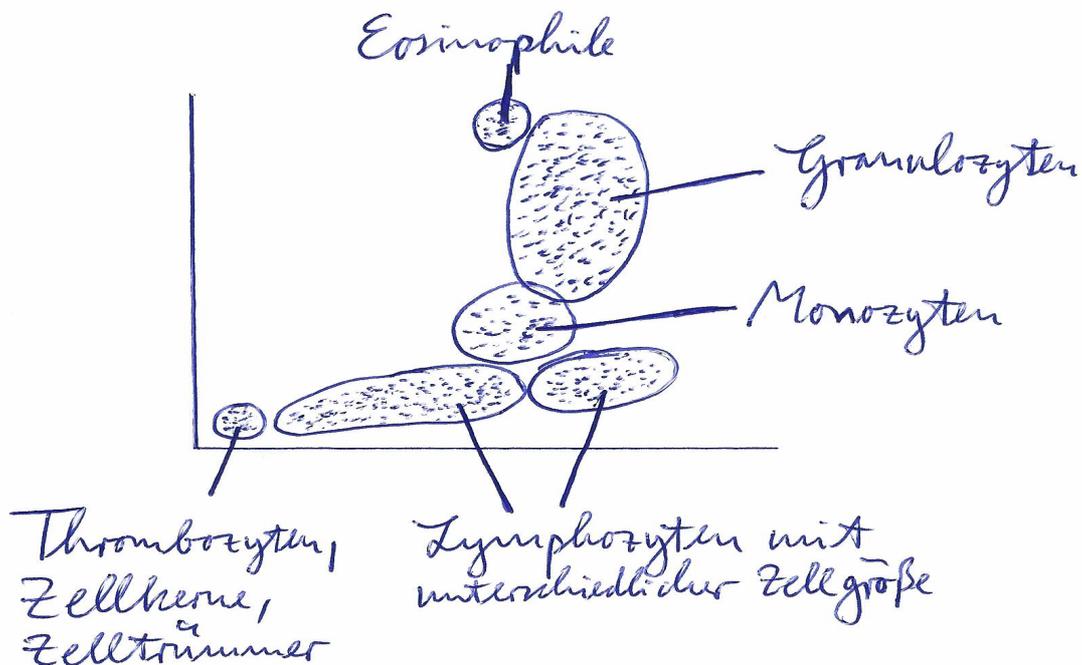


Abb. 2 Übersicht über die Lokalisationen der einzelnen Zellpopulationen beim FACS

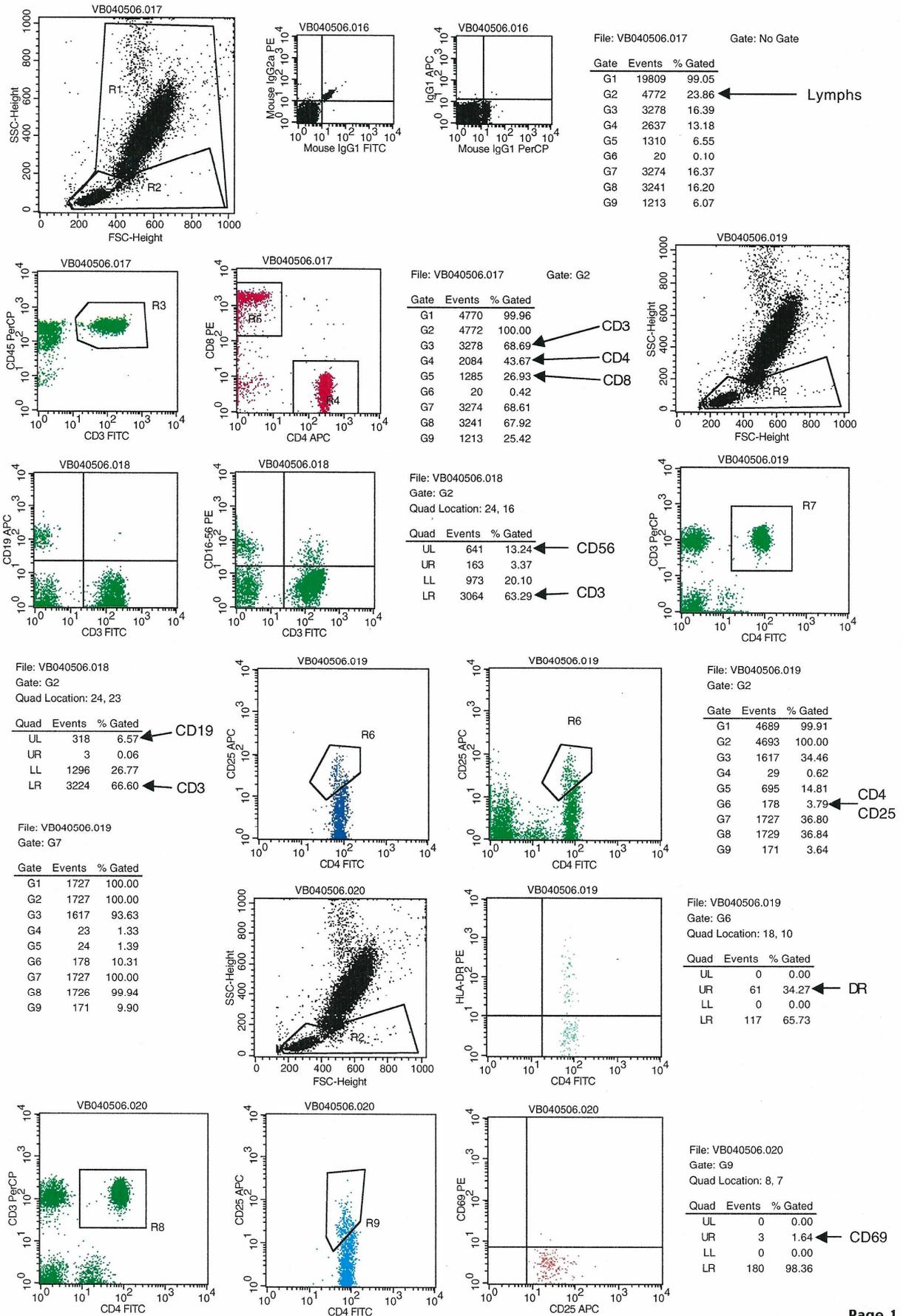


Abb. 3 (Zu Berechnungen der Daten dieser Abbildung siehe Anhang)

<u>Mittelwerte</u>	Lymphos 100%	<u>Davon:</u>	CD3+		CD4+		CD4+25+	
			%	Absolut	%	Absolut	%	Absolut
Patienten Gesamt (30)	1548		58,64	918	44,51	698	3,88	60
Kontrollen Gesamt (15)	1909		53,23	1034	39,57	775	2,81	54
Weibl. Patienten (20)	1580		58,70	935	45,72	731	3,88	61
Weibl. Kontrollen (11)	1968		55,47	1112	41,63	841	2,98	58
Alle Frauen (20P,11K)	1718		57,56	998	44,27	770	3,56	60
Männl. Patienten (10)	1484		58,51	884	42,09	630	3,88	58
Männl. Kontrollen (4)	1747		47,07	818	33,92	592	2,32	41
Alle Männer (10P,4K)	1559		55,24	865	39,76	619	3,43	53
Nicht therapierte Patienten (14)	1635		59,74	994	45,24	749	3,83	63
Therapierte Patienten (13)	1534		56,83	880	44,12	684	3,80	59
Glatirameracetat (3)	1775		46,41	879	43,79	798	4,24	78
Natalizumab (1)	2014		65,62	1322	37,22	750	3,04	61
Rebif (2)	1445		66,04	954	45,91	663	2,09	31
Avonex (7)	1388		57,41	796	44,74	631	4,21	60
Interferon β-1a gesamt (9)	1401		59,32	831	45,00	638	3,74	53
			CD8+		CD19+		CD16/56+	
			%	Absolut	%	Absolut	%	Absolut
Patienten Gesamt (30)			20,21	312	10,05	164	14,67	221
Kontrollen Gesamt (15)			21,71	418	8,96	167	13,58	249
Weibl. Patienten (20)			18,91	294	9,96	171	14,01	214
Weibl. Kontrollen (11)			22,05	437	8,23	158	13,17	245
Alle Frauen (20P,11K)			20,02	345	9,34	166	13,71	225
Männl. Patienten (10)			22,80	349	10,24	149	16,00	235
Männl. Kontrollen (4)			20,80	364	10,96	192	14,73	262
Alle Männer (10P,4K)			22,23	354	10,45	161	15,64	242
Nicht therapierte Patienten (14)			19,61	327	8,67	144	14,91	244
Therapierte Patienten (13)			20,98	314	10,79	188	15,15	210
Glatirameracetat (3)			21,24	354	10,46	260	23,49	329
Natalizumab (1)			32,31	651	11,15	225	11,11	224
Rebif (2)			21,60	312	10,64	154	13,62	197
Avonex (7)			19,07	249	10,92	161	12,59	161
Interferon β-1a gesamt (9)			19,63	263	10,85	159	12,82	169
<u>Mittelwerte</u>	CD3+	<u>Davon:</u>	CD4+		CD4+25+		CD8+	
	100%		%	Absolut	%	Absolut	%	Absolut
Patienten Gesamt (30)	918		77,14	698	6,76	60	34,86	312
Kontrollen Gesamt (15)	1034		75,20	775	5,36	54	41,32	418
Weibl. Patienten (20)	935		79,21	731	6,81	61	32,71	294
Weibl. Kontrollen (11)	1112		76,05	841	5,43	58	40,26	437
Alle Frauen (20P,11K)	998		78,09	770	6,32	60	35,39	345
Männl. Patienten (10)	884		72,99	630	6,66	58	39,16	349
Männl. Kontrollen (4)	818		72,87	592	5,15	41	44,24	364
Alle Männer (10P,4K)	865		72,96	619	6,23	53	40,61	354
Nicht therapierte Patienten (14)	994		76,74	749	6,47	63	32,85	327
Therapierte Patienten (13)	880		79,43	684	7,01	59	37,47	314
Glatirameracetat (3)	879		95,65	798	9,25	78	47,25	354
Natalizumab (1)	1322		56,72	750	4,63	61	49,24	651
Rebif (2)	954		69,67	663	3,18	31	32,67	312
Avonex (7)	796		78,52	631	7,48	60	32,97	249
Interferon β-1a gesamt (9)	831		76,55	638	6,52	53	32,90	263

<u>Mittelwerte</u>	CD4+25+ 100%	<u>Davon:</u>	CD69+ %	Absolut	CDDR+ %	Absolut
Patienten Gesamt (23)	60		1,57	1	27,78	17
Kontrollen Gesamt (15)	54		1,67	1	26,36	14
Weibl. Patienten (16)	60		1,33	1	29,08	18
Weibl. Kontrollen (11)	58		1,63	1	25,66	15
Alle Frauen (16P,11K)	59		1,45	1	27,69	17
Männl. Patienten (7)	60		2,11	1	24,82	14
Männl. Kontrollen (4)	41		1,80	1	28,27	11
Alle Männer (7P,4K)	53		2,00	1	26,07	13
Nicht therapierte Patienten (10)	58		2,06	1	26,39	15
Therapierte Patienten (12)	62		1,12	1	29,62	19
Glatirameracetat (3)	78		1,17	1	17,62	16
Natalizumab (1)	61		0,78	0	19,44	12
Rebif (1)	33		1,36	0	27,45	9
Avonex (7)	60		1,11	1	36,53	23
Interferon β -1a gesamt (8)	56		1,14	1	35,39	22

Mittelwerte

	Lymphos 100%	<u>Davon:</u>	CD3+ %	Absolut	CD4+ %	Absolut	CD4+25+ %	Absolut
Weibl. Nicht therapierte Patienten (9)	1730		59,39	1045	45,36	798	3,73	65
Männl. Nicht therapierte Patienten (5)	1464		60,36	902	45,02	661	4,01	60
Weibl. Therapierte Patienten (10)	1511		56,69	863	45,43	697	3,75	59
Männl. Therapierte Patienten (3)	1611		57,30	938	39,76	640	3,96	62

		CD8+ %	Absolut	CD19+ %	Absolut	CD16/56+ %	Absolut
Weibl. Nicht therapierte Patienten (9)		18,98	332	8,00	143	15,45	269
Männl. Nicht therapierte Patienten (5)		20,75	317	9,86	146	13,94	199
Weibl. Therapierte Patienten (10)		18,98	272	11,37	200	13,96	185
Männl. Therapierte Patienten (3)		27,64	454	8,84	146	19,12	295

	CD3+ 100%	<u>Davon:</u>	CD4+ %	Absolut	CD4+25+ %	Absolut	CD8+ %	Absolut
Weibl. Nicht therapierte Patienten (9)	1045		76,98	798	6,39	65	31,94	332
Männl. Nicht therapierte Patienten (5)	902		76,31	661	6,59	60	34,48	317
Weibl. Therapierte Patienten (10)	863		82,00	697	6,97	59	34,26	272
Männl. Therapierte Patienten (3)	938		70,87	640	7,11	62	48,15	454

	CD4+25+ 100%	<u>Davon:</u>	CD69+ %	Absolut	DR+ %	Absolut
Weibl. Nicht therapierte Patienten (7)	57		1,86	1	25,58	14
Männl. Nicht therapierte Patienten (3)	60		2,51	1	28,30	15
Weibl. Therapierte Patienten (9)	62		0,92	1	31,80	21
Männl. Therapierte Patienten (3)	62		1,73	1	23,09	14

Tab. 1

Im Folgenden werden alle mithilfe des FACSCalibur gewonnenen Mittelwerte der einzelnen Zellpopulationen der einzelnen Gruppen zunächst in Tab. 1 in einer Übersicht gegeneinander dargestellt, ohne dabei die signifikant differierenden Mittelwerte mit roter Farbe zu umrahmen. Erst bei der direkten Gegenüberstellung der einzelnen Gruppen sind dann die signifikant abweichenden Werte wie oben bereits erwähnt durch rote Rahmen optisch hervorgehoben. Außerdem werden signifikante Ergebnisse vor allem beim Vergleich der weibl. und männl. therapierten und der weibl. und männl. nicht therapierten Patienten untereinander und beim Vergleich der einzelnen Therapien untereinander, zu allen Patienten und zu allen Kontrollen hin auch noch rein im Text beschrieben, ohne eine tabellarische oder graphische Darstellung.

Außerdem ist noch kurz anzumerken, dass bei der Beurteilung der einzelnen Therapien insgesamt drei Patienten nicht berücksichtigt wurden, da sich zwei dieser Patienten zum Zeitpunkt der Blutentnahme fraglich im Schub befanden, nämlich Pat. 3 (m) vom 12.04.2006 und Pat. 1 (m) vom 29.09.2006, und der dritte dabei nicht berücksichtigte Patient, Pat. 2 (w) vom 19.04.2006, zusätzlich zur Diagnose MS auch noch die Diagnose Morbus Crohn hat und wegen diesem eine immunsuppressive Therapie mit Imurek (Azathioprin) zum Zeitpunkt der Blutentnahme erhielt, was auch der Rohdatenauflistung der jeweiligen Experimente im Anhang dieser Arbeit zu entnehmen ist. Des Weiteren ist der in den Rohdaten rot markierte Pat. 2 (m) vom 16.08.2006 einmal gar nicht in die Auswertung miteingegangen, da dieser Patient im Verlauf der Experimente sein Blut freundlicherweise zweimal, also an zwei unterschiedlichen Tagen, zum Bearbeiten zur Verfügung gestellt hat.

Beim Vergleich aller Patienten zu allen Kontrollen (Tab. 2 und 3; Abb. 4, 5, 6, 7 und 8) zeigen sich mehrere signifikante Unterschiede.

Zum einen ergibt sich eine signifikante Differenz der absoluten Lymphozytenanzahl von im Durchschnitt 361 Zellen, bei Mittelwerten von wie aus Tab. 2 und Abb. 4 ersichtlichen 1548 Zellen der gesamten Patienten zu 1909 Zellen der gesamten Kontrollen, bei einem p von 0,0356. Dabei sind die Varianzen nicht signifikant voneinander abweichend, was im Folgenden meistens der Fall ist und deshalb nicht mehr zu signifikanten Werten dazugeschrieben wird. Erwähnt wird also nur noch, wenn voneinander abweichende Varianzen bei signifikanten Veränderungen auftreten. Ebenfalls signifikant mit einem p von 0,0209 sind die Mittelwerte der absoluten CD8+ Zellen mit 312 zu 418 (Tab. 2 und Abb. 4). Demnach haben die Patienten sowohl signifikant weniger Lymphozyten als auch signifikant weniger absolute CD8+ Zellen oder entsprechend umgekehrt haben die Kontrollen signifikant mehr dieser Zellen.

Bei der Auswertung der prozentualen Anteile der einzelnen Zellpopulationen der gesamten Patienten und Kontrollen fällt zunächst auf, dass bei der von den Lymphozyten anteiligen Zellfraktion der CD3+ Zellen eine mit 5,41 Prozentpunkten von den Kontrollen mit 53,23 % zu den Patienten mit 58,64 % deutliche Differenz besteht, ohne jedoch signifikant zu sein. Trotzdem haben die Patienten deutlich mehr CD3+ Zellen.

FACS-Auswertung

Mittelwerte Gesamt

Absolut	100 % Lymphos	CD3+	CD4+	CD4+25+	CD8+	CD19+	CD16/56+
Patienten (30)	1548	918	698	60	312	164	221
Kontrollen (15)	1909	1034	775	54	418	167	249

Absolut	100% CD4+25+	CD69+	CDDR+
Patienten (23)	60	1	17
Kontrollen (15)	54	1	14

Tab. 2

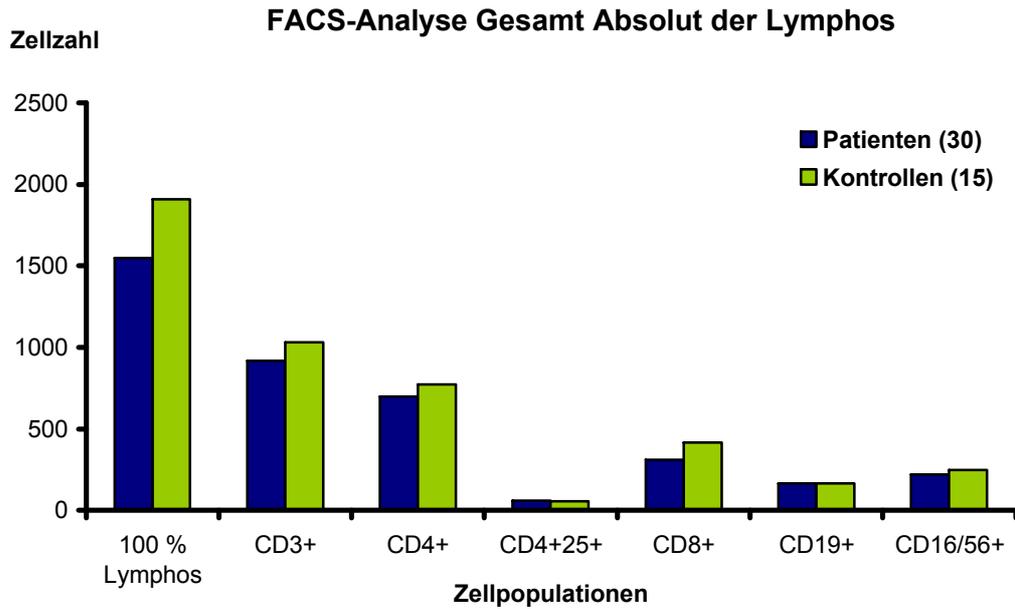


Abb. 4

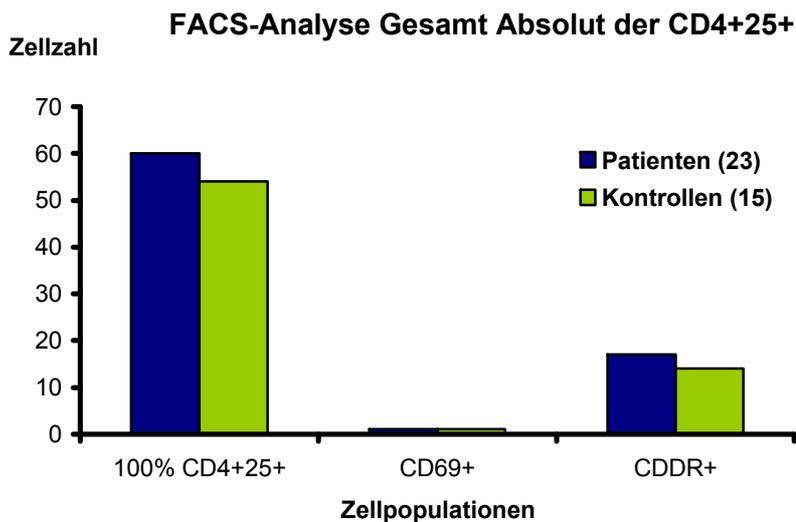


Abb. 5

Signifikant hingegen sind die CD4+ Zellen im Durchschnitt um 4,94 Prozentpunkte bei den Patienten mit einem p von 0,0226 erhöht, bei Mittelwerten von bei den Patienten 44,51 % und bei den Kontrollen von 39,57 % (Tab. 3 und Abb. 6). Auch signifikant und für diese Arbeit besonders interessant, obwohl mit wesentlich geringeren Zellzahlen bzw. prozentualen Anteilen, sind die CD4+25+ Zellen. Dabei haben die Patienten mit 3,88 % um 1,07 Prozentpunkte mehr als die Kontrollen mit 2,81 % bei einem hoch signifikantem p von 0,0031 (Tab. 3 und Abb. 6).

Bei den berechneten prozentualen Anteilen der CD3+ Zellen, waren wiederum die CD4+25+ Zellen mit 6,76 % bei den Patienten und 5,36 % bei den Kontrollen um 1,40 Prozentpunkte mit einem p von 0,0293 signifikant erhöht (Tab. 3 und Abb. 7). Schließlich ist hier auch noch die Zellfraktion der CD8+ Zellen anteilig der CD3+ Zellen signifikant verändert, allerdings bei den Patienten mit 34,86 % zu 41,32 % bei den Kontrollen mit 6,46 Prozentpunkten deutlich erniedrigt (Tab. 3 und Abb. 7). Das p beträgt dabei 0,0212.

Die Patienten haben also im Vergleich zu den Kontrollen anteilig der Lymphozyten signifikant mehr CD4+ und hoch signifikant mehr CD4+25+ Zellen. Wie anteilig der Lymphozyten, so sind die CD4+25+ Zellen auch anteilig der CD3+ Zellen bei den Patienten signifikant erhöht, wohingegen die CD8+ Zellen anteilig der CD3+ Zellen bei den Patienten signifikant erniedrigt sind.

Weder die Zellpopulationen der CD19+ und CD16/56+ Zellen noch die der CD69+ und CDDR+ Zellen waren bei dieser Gegenüberstellung signifikant verändert.

Mittelwerte Gesamt

Zellpopulationen der Lymphos in %

	CD3+	CD4+	CD4+25+	CD8+	CD19+	CD16/56+
Patienten (30)	58,64	44,51	3,88	20,21	10,05	14,67
Kontrollen (15)	53,23	39,57	2,81	21,71	8,96	13,58

Zellpopulationen der CD3+ in %

	CD4+	CD4+25+	CD8+
Patienten (30)	77,14	6,76	34,86
Kontrollen (15)	75,20	5,36	41,32

Zellpopulationen der CD4+25+ in %

	CD69+	CDDR+
Patienten (23)	1,57	27,78
Kontrollen (15)	1,67	26,36

Tab. 3

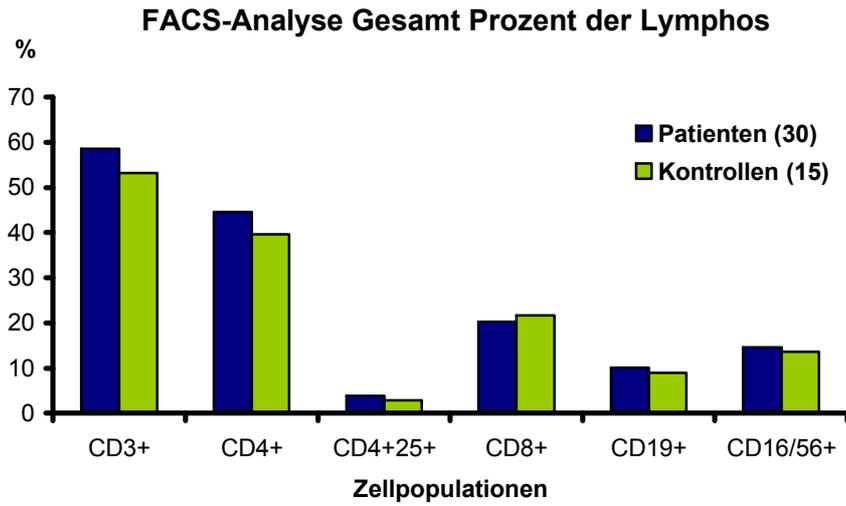


Abb. 6

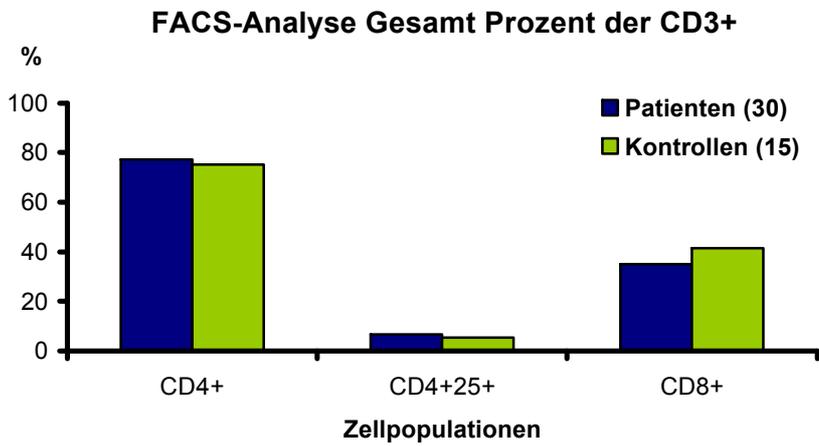


Abb. 7

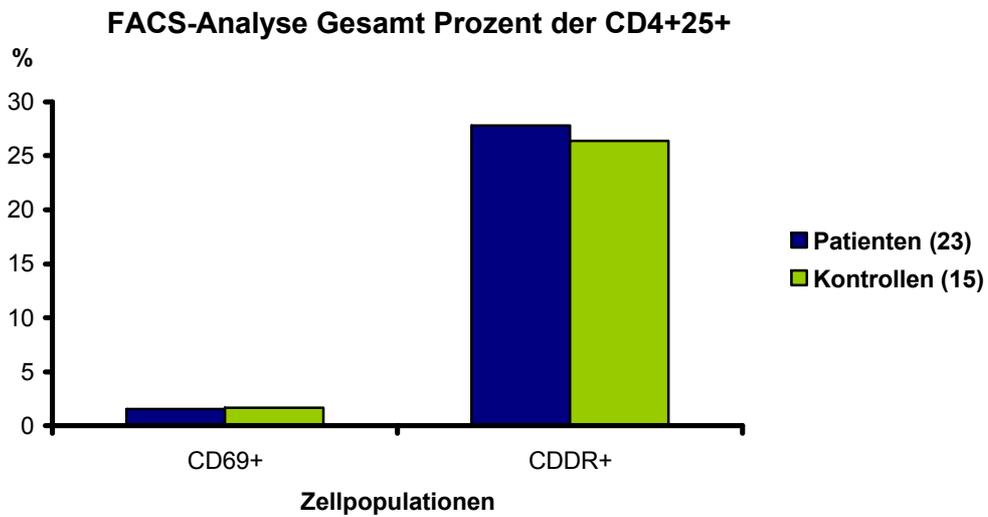


Abb. 8

Bei der Gegenüberstellung der weibl. Patienten gegen die weibl. Kontrollen waren die absoluten CD8+ Zellen mit einem p von 0,0090 hoch signifikant unterschiedlich. Dabei haben die weibl. Patienten mit durchschnittlich 294 Zellen deutlich weniger als die weibl. Kontrollen mit im Schnitt 437 Zellen (Tab. 4 und Abb. 9). Bei der prozentualen Auswertung ergab sich ebenfalls in Bezug auf die Zellfraktion der CD8+ Zellen,

FACS-Auswertung

Mittelwerte Frauen

Absolut	100 % Lymphos	CD3+	CD4+	CD4+25+	CD8+	CD19+	CD16/56+
Weibl. Patienten (20)	1580	935	731	61	294	171	214
Weibl. Kontrollen (11)	1968	1112	841	58	437	158	245

Absolut	100% CD4+25+	CD69+	CDDR+
Weibl. Patienten (16)	60	1	18
Weibl. Kontrollen (11)	58	1	15

Tab. 4

FACS-Analyse Frauen Absolut der Lymphos

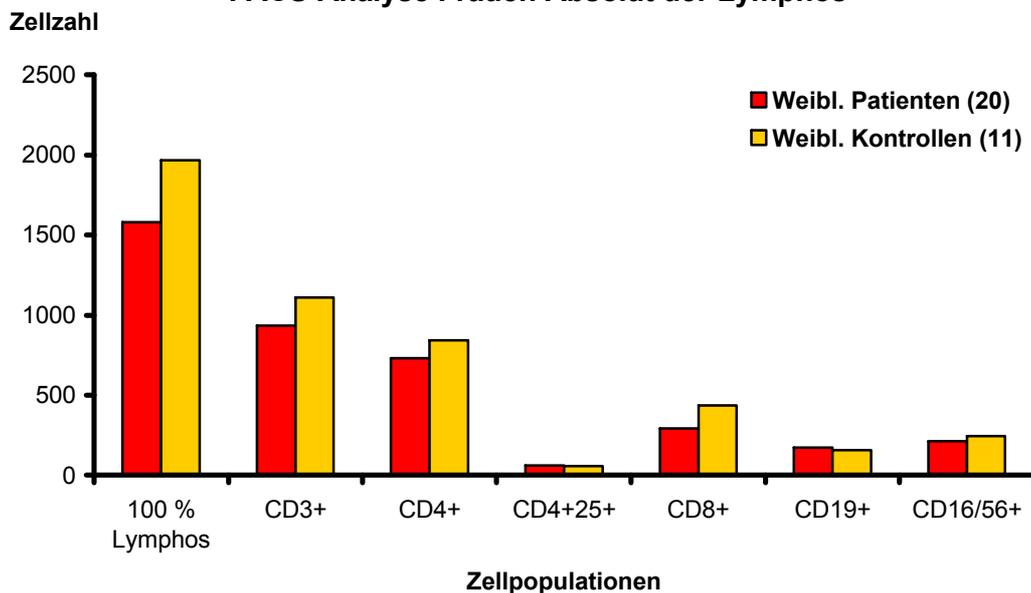


Abb. 9

allerdings anteilig der CD3+ Zellen, ein mit einem p von 0,0277 signifikanter Wert. Mit 32,71 % bei den weibl. Patienten und 40,26 % bei den weibl. Kontrollen zeigt sich eine mit 7,55 Prozentpunkten starke Abweichung zwischen den zwei Gruppen (Tab.

5 und Abb. 10). Die absoluten CD8+ Zellen sind bei den weibl. Patienten also gegenüber den weibl. Kontrollen hoch signifikant erniedrigt, genauso wie prozentual die CD8+ Zellen als Anteil der CD3+ Zellen deutlich erniedrigt und signifikant sind. Alle anderen Zellpopulationen zeigen bei diesem Vergleich keine Signifikanzen.

Frauen Mittelwerte

Zellpopulationen der Lymphos in %

	CD3+	CD4+	CD4+25+	CD8+	CD19+	CD16/56+
Weibl. Patienten (20)	58,70	45,72	3,88	18,91	9,96	14,01
Weibl. Kontrollen (11)	55,47	41,63	2,98	22,05	8,23	13,17

Zellpopulationen der CD3+ in %

Zellpopulationen der CD4+25+ in %

	CD4+	CD4+25+	CD8+		CD69+	CDDR+
Weibl. Patienten (20)	79,21	6,81	32,71	Weibl. Patienten (16)	1,33	29,08
Weibl. Kontrollen (11)	76,05	5,43	40,26	Weibl. Kontrollen (11)	1,63	25,66

Tab. 5

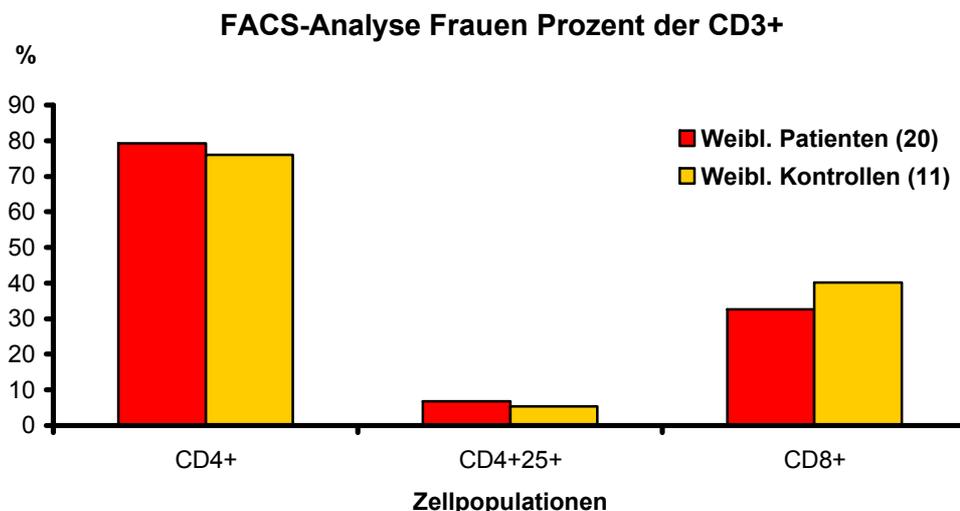


Abb. 10

Natürlich werden dann jetzt auch die männl. Patienten den männl. Kontrollen gegenübergestellt. Hierbei hat sich insgesamt nur ein signifikanter Unterschied herauskristallisiert.

Die CD4+25+ Zellen der Lymphozyten sind bei den männl. Patienten mit 3,88 % um 1,56 Prozentpunkte im Vergleich zu den männl. Kontrollen mit 2,32 % erhöht (Tab. 6 und Abb. 11) und haben bei einem p von 0,0083 eine hohe Signifikanz. Außer dieser

Erkenntnis waren alle anderen absoluten und prozentualen Zellpopulationen nicht signifikant verändert, obwohl durchaus starke Differenzen bei den einzelnen Zellpopulationen vorhanden sind. So sieht man beispielsweise bei den CD3+ Zellen (Tab. 6) einen Unterschied von 11,44 Prozentpunkten. Die männl. Patienten haben mit 58,51 % deutlich mehr CD3+ Zellen als die männl. Kontrollen mit 47,07 %. Auch bei der

Männer Mittelwerte

Zellpopulationen der Lymphos in %

	CD3+	CD4+	CD4+25+	CD8+	CD19+	CD16/56+
Männl. Patienten (10)	58,51	42,09	3,88	22,80	10,24	16,00
Männl. Kontrollen (4)	47,07	33,92	2,32	20,80	10,96	14,73

Zellpopulationen der CD3+ in %

Zellpopulationen der CD4+25+ in %

	CD4+	CD4+25+	CD8+	CD69+	CDDR+
Männl. Patienten (10)	72,99	6,66	39,16	2,11	24,82
Männl. Kontrollen (4)	72,87	5,15	44,24	1,80	28,27

Tab. 6

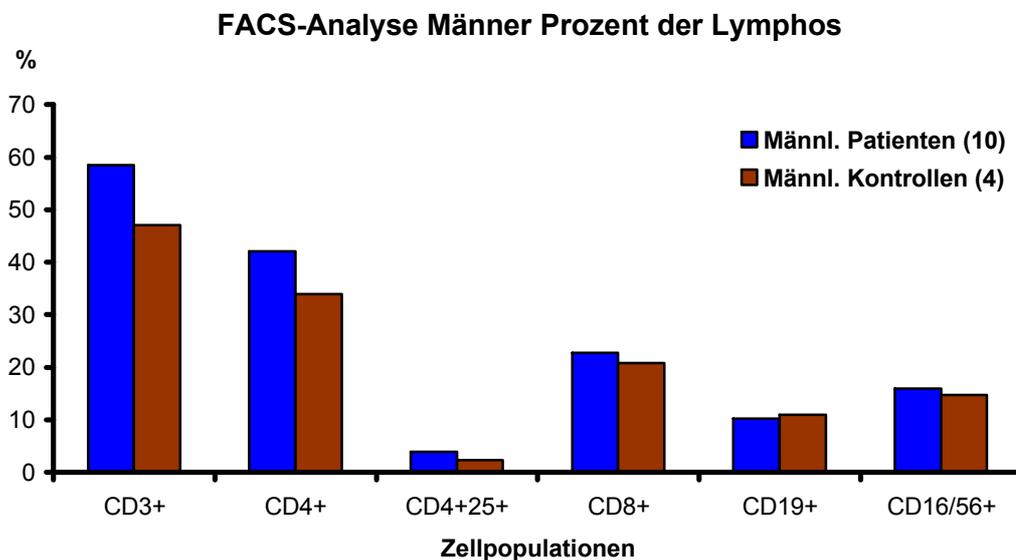


Abb. 11

Zellfraktion der CD4+ Zellen erkennt man sofort die ebenfalls große Differenz von 42,09 % zu 33,92 %, was 8,17 Prozentpunkten entspricht. Also haben die männl. Patienten auch hier deutlich mehr Zellen. 5,08 % weniger Zellen haben die männl. Patienten dagegen bei den CD8+ Zellen anteilig der CD3+ Zellen und 3,45 % weniger

Zellen bei den CDDR+ Zellen anteilig der CD4+25+, wiederum ohne dabei signifikant zu sein. Dies ist eventuell auch der Tatsache geschuldet, dass es hier nur vier männl. Patienten gibt, was ja zu Beginn dieses Kapitels auch schon als durchaus problematisch für die statistische Aussagekraft erwähnt wurde und es deshalb interessant wäre, dies bei einer größeren Patienten und Kontrollen umfassenden Studie zu wiederholen und zu vertiefen.

Letztendlich also haben bei den Männern die Patienten lediglich bei den CD4+25+ Zellen der Lymphozyten hoch signifikant mehr Prozent als die Kontrollen.

Als Nächstes wurde ein Blick auf alle Frauen und alle Männer geworfen, also weibl. Patienten und weibl. Kontrollen gegen männl. Patienten und männl. Kontrollen. Auch dieser Blick war nicht umsonst, da sich gezeigt hat, dass die CD4+ Zellen in Prozent der Lymphozyten bei den Frauen mit 44,27 % gegenüber den Männern mit 39,76 % um 4,51 % erhöht (Tab. 7 und Abb. 12) und mit einem p von 0,0420 signifikant verändert sind. Auch die CD4+ Zellen anteilig der CD3+ Zellen zeigen eine deutliche Differenz, wobei die Frauen mit 78,09 % um 5,13 % mehr Zellen als die Männer (72,96 %) haben, ohne aber signifikant zu sein. Auch nicht signifikant ist der um 5,22 % niedrigere Wert der CD8+ Zellfraktion anteilig der CD3+ Zellen bei den Frauen mit 35,39 % im Gegensatz zu den Männern mit 40,61 % (Tab. 7). Auch hier bleibt es bei

Mittelwerte
Frauen gegen Männer

Zellpopulationen der Lymphos in %

	CD3+	CD4+	CD4+25+	CD8+	CD19+	CD16/56+
Frauen (20P,11K)	57,56	44,27	3,56	20,02	9,34	13,71
Männer (10P,4K)	55,24	39,76	3,43	22,23	10,45	15,64

Zellpopulationen der CD3+ in %

	CD4+	CD4+25+	CD8+
Frauen (20P,11K)	78,09	6,32	35,39
Männer (10P,4K)	72,96	6,23	40,61

Zellpopulationen der CD4+25+ in %

	CD69+	CDDR+
Frauen (16P,11K)	1,45	27,69
Männer (7P,4K)	2,00	26,07

Tab. 7

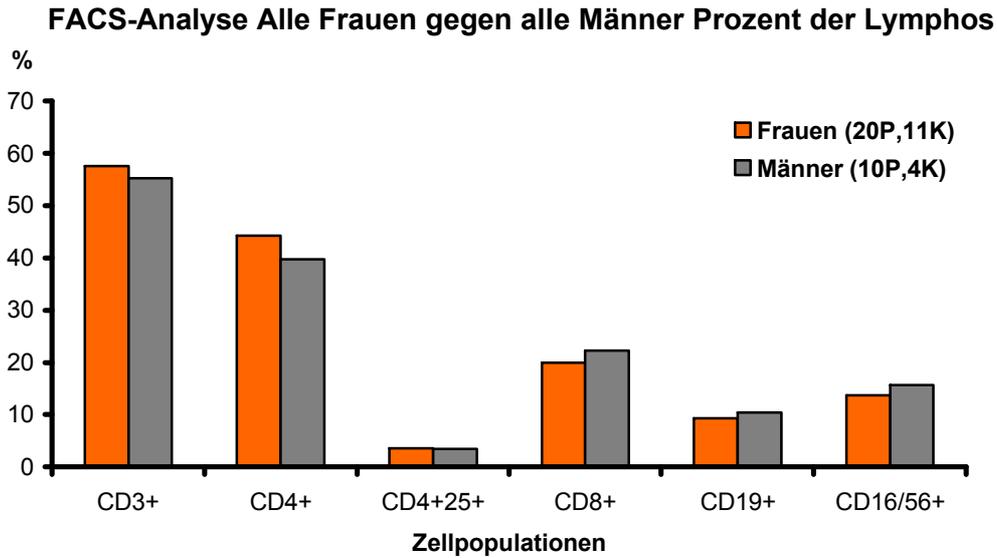


Abb. 12

einem signifikanten Unterschied bei den erhöhten Prozents der CD4+ Zellfraktion der Lymphozyten bei den Frauen.

Betrachtet man nun die weibl. Patienten im Vergleich zu allen Kontrollen, so ergeben sich gleich mehrere hoch signifikante Unterschiede.

Bei den absoluten Zellzahlen gibt es bei der Anzahl der Lymphozyten bei den weibl. Patienten mit 1580 zu 1909 bei den Kontrollen mit im Schnitt 329 Zellen weniger einen klaren Unterschied (Tab. 8 und Abb. 13), ohne aber signifikant zu sein. Mit einer hohen Signifikanz bei einem p von 0,0097 ist dagegen die Anzahl der CD8+ Zellen der Lymphozyten bei den weibl. Patienten mit im Schnitt 124 Zellen weniger

Mittelwerte

Patientinnen gegen alle Kontrollen

Absolut	100 % Lymphos	CD3+	CD4+	CD4+25+	CD8+	CD19+	CD16/56+
Weibl. Patienten (20)	1580	935	731	61	294	171	214
Kontrollen (15)	1909	1034	775	54	418	167	249

Absolut	100% CD4+25+	CD69+	CDDR+
Weibl. Patienten (16)	60	1	18
Kontrollen (15)	54	1	14

Tab. 8

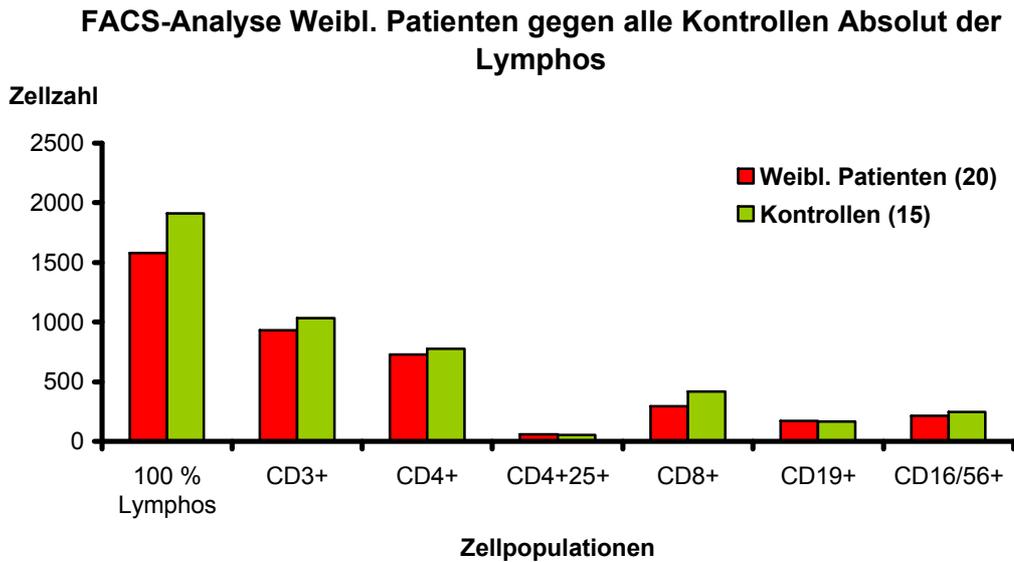


Abb. 13

bei 294 zu 418 Zellen erniedrigt (Tab. 8 und Abb. 13). Im Gegensatz zu den absoluten Zahlen mit nur einer Signifikanz zeigen die Prozentangaben gleich drei signifikante Unterschiede.

Zunächst sind die CD4+ Zellen in Prozent der Lymphozyten bei den weibl. Patienten mit 45,72 % zu 39,57 % bei den Kontrollen um 6,15 Prozentpunkte erhöht (Tab. 9 und Abb. 14) und mit einem p von 0,0068 hoch signifikant. Ebenfalls hoch signifikant mit einem p von 0,0094 sind die CD4+25+ Zellen anteilig der Lymphozyten mit 1,07 Prozentpunkten bei den weibl. Patienten mit 3,88 % zu 2,81 % bei den Kontrollen erhöht. Mit der hier deutlichsten hohen Signifikanz mit einem p von 0,0049 ist die Zellfraktion der CD8+ Zellen anteilig der CD3+ Zellen bei den weibl. Patienten mit 32,71 % zu 41,32 % bei den Kontrollen und damit einer Prozentpunktedifferenz von 8,61 klar erniedrigt (Tab. 9 und Abb. 15). Außerdem haben die weibl. Patienten nicht signifikant mehr CD3+ Zellen anteilig der Lymphozyten, obwohl sie mit 58,70 % zu 53,23 % im Schnitt 5,47 Prozentpunkte mehr Zellen haben. Ähnlich verhält es sich mit der Zellfraktion der CD4+ Zellen als Anteil der CD3+ Zellen, bei denen die weibl. Pati-

enten ohne Signifikanz mit 79,21 % genau 4,01 Prozentpunkte mehr haben als die Kontrollen mit 75,20 %. Die weibl. Patienten haben also in absoluten Zahlen signifi-

Patientinnen gegen alle Kontrollen

Mittelwerte

Zellpopulationen der Lymphos in %

	CD3+	CD4+	CD4+25+	CD8+	CD19+	CD16/56+
Weibl. Patienten (20)	58,70	45,72	3,88	18,91	9,96	14,01
Kontrollen (15)	53,23	39,57	2,81	21,71	8,96	13,58

Zellpopulationen der CD3+ in %

Zellpopulationen der CD4+25+ in %

	CD4+	CD4+25+	CD8+	CD69+	CDDR+
Weibl. Patienten (20)	79,21	6,81	32,71	1,33	29,08
Kontrollen (15)	75,20	5,36	41,32	1,67	26,36

Tab. 9

FACS-Analyse Weibl. Patienten gegen alle Kontrollen Prozent der Lymphos

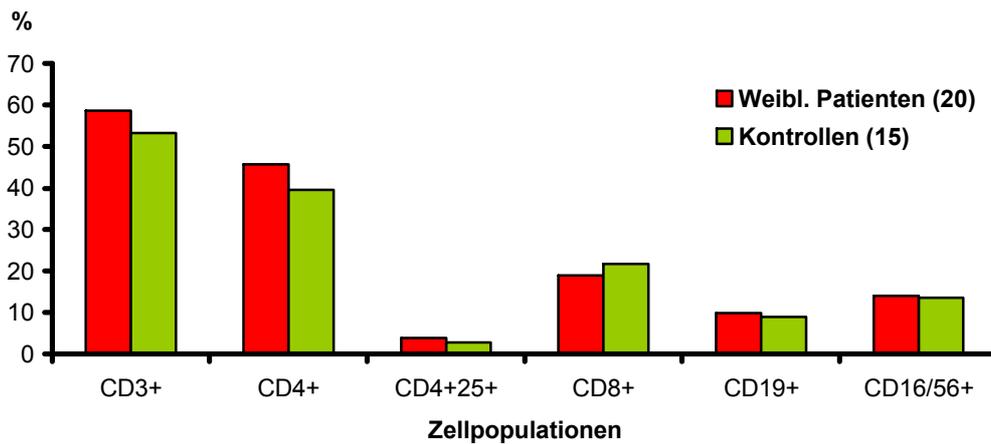


Abb. 14

FACS-Analyse Weibl. Patienten gegen alle Kontrollen Prozent der CD3+

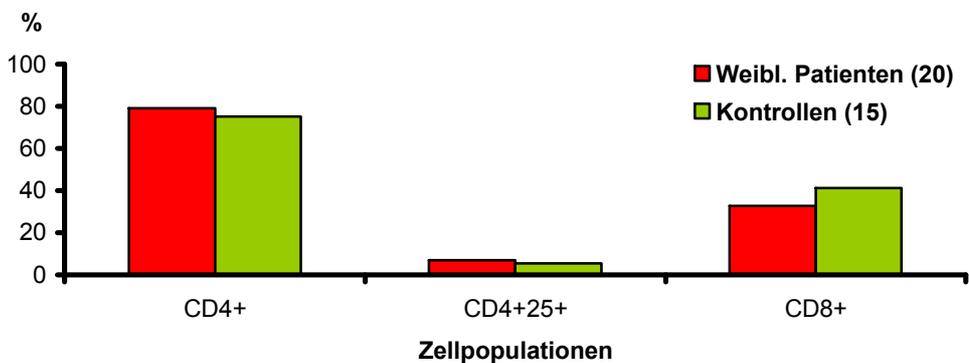


Abb. 15

kant weniger CD8+ Zellen anteilig der Lymphozyten und in Prozent signifikant mehr Zellen bei den Zellfraktionen der CD4+ und CD4+25+ Zellen der Lymphozyten, aber signifikant weniger Zellen der CD8+ Zellen in Prozent der CD3+ Zellen.

Natürlich folgt dann jetzt die Gegenüberstellung der männl. Patienten mit allen Kontrollen, bei der sich zwei prozentual signifikante Unterschiede aufzeigen.

Interessanterweise haben nach allen Patienten zusammen und den weibl. Patienten alleine jetzt auch die männl. Patienten beim Vergleich mit allen Kontrollen mehr CD4+25+ Zellen anteilig der Lymphozyten und zeigen dabei eine hohe Signifikanz. So gibt es bei den männl. Patienten mit 3,88 % zu 2,81 % bei den Kontrollen (Tab. 10 und Abb. 16) einen Abstand von 1,07 Prozentpunkten und ein p bei 0,0076. Außerdem ist zusätzlich zu den CD4+25+ Zellen anteilig der Lymphozyten auch die Zellfraktion der CD4+25+ Zellen anteilig der CD3+ Zellen bei den männl. Patienten mit einer Differenz von 1,30 Prozentpunkten von 6,66 % zu 5,36 % (Tab. 10 und Abb. 17) und einem p von 0,0411 signifikant erhöht. Auch bei den CD3+ Zellen anteilig der Lymphozyten gibt es eine Differenz von über 5 Prozentpunkten, genauer 5,28. Allerdings ohne signifikant zu sein, haben die männl. Patienten hier mit 58,51 % deutlich mehr Zellen als die Kontrollen mit 53,23 %.

Mittelwerte

Männl. Patienten gegen alle Kontrollen

Zellpopulationen der Lymphos in %

	CD3+	CD4+	CD4+25+	CD8+	CD19+	CD16/56+
Männl. Patienten (10)	58,51	42,09	3,88	22,80	10,24	16,00
Kontrollen (15)	53,23	39,57	2,81	21,71	8,96	13,58

Zellpopulationen der CD3+ in %

	CD4+	CD4+25+	CD8+
Männl. Patienten (10)	72,99	6,66	39,16
Kontrollen (15)	75,20	5,36	41,32

Zellpopulationen der CD4+25+ in %

	CD69+	CDDR+
Männl. Patienten (7)	2,11	24,82
Kontrollen (15)	1,67	26,36

Tab. 10

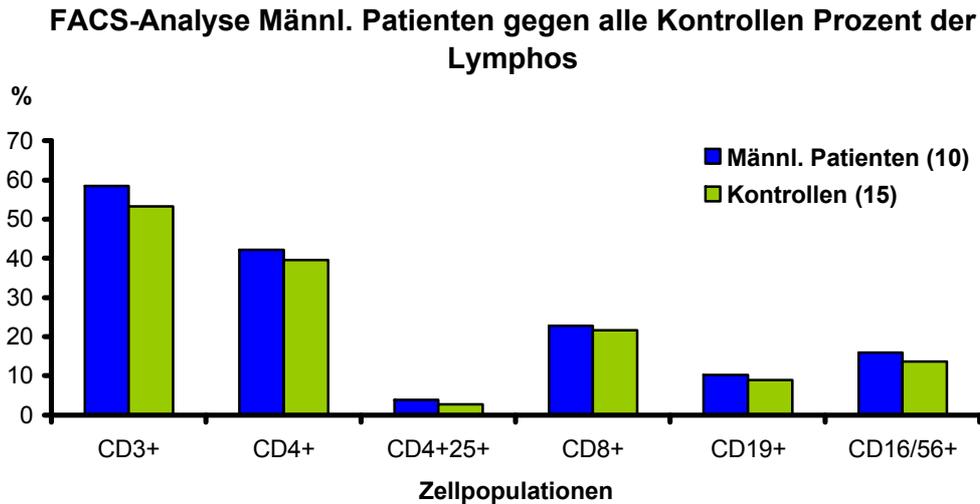


Abb. 16

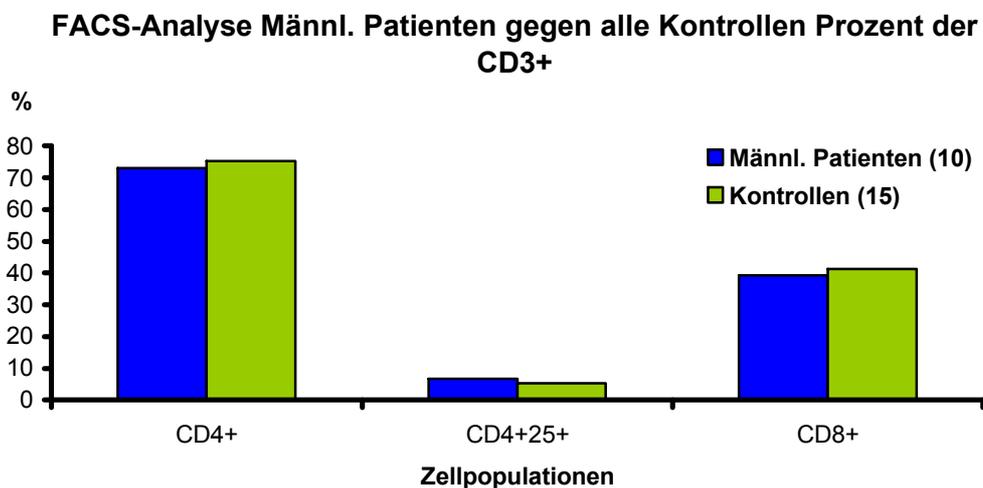


Abb. 17

Genauso synchron wie die drei Gruppen der Patienten insgesamt, der weibl. Patienten alleine und der männl. Patienten alleine gegenüber allen Kontrollen eine mit prozentual erhöhten Zellzahlen der CD4+25+ Zellen als Anteil der Lymphozyten einhergehende hohe Signifikanz aufweisen, so zeigen sich auch, zu einem gleichen Verhalten der Gruppen passend, überhaupt keine signifikanten Unterschiede im direkten Vergleich zwischen weibl. und männl. Patienten.

Interessanterweise hat sich auch beim Vergleich der weibl. Kontrollen mit den männl. Kontrollen eine Signifikanz ergeben. Hier haben die weibl. Kontrollen gegenüber den

männl. Kontrollen mit 41,63 % zu 33,92 % (Tab. 11 und Abb. 18) um 7,71 Prozentpunkte signifikant mehr der CD4+ Zellen in Prozent der Lymphozyten. Dabei liegt das p bei 0,0239. Aber auch bei den CD3+ Zellen anteilig der Lymphozyten haben die weibl. Kontrollen 8,40 Prozentpunkte mehr, ohne aber signifikant zu sein.

Bei den CD4+25+ Zellen anteilig der Lymphozyten haben die weibl. Kontrollen ebenfalls einen höheren Prozentsatz mit +0,66 Prozentpunkten. Das verwundert nicht, nachdem ja auch die CD4+ Zellen signifikant erhöht waren. Außerdem haben die weibl. Kontrollen gegenüber den männl. Kontrollen 2,73 Prozentpunkte weniger CD19+ Zellen in Prozent der Lymphozyten, 3,18 Prozentpunkte mehr der CD4+ Zellen in Prozent der CD3+ Zellen, wiederum auch leicht erhöhte Prozente bei den

Weibl. Kontrollen gegen Männl. Kontrollen

Zellpopulationen der Lymphos in %

	CD3+	CD4+	CD4+25+	CD8+	CD19+	CD16/56+
Weibl. Kontrollen (11)	55,47	41,63	2,98	22,05	8,23	13,17
Männl. Kontrollen (4)	47,07	33,92	2,32	20,80	10,96	14,73

Zellpopulationen der CD3+ in %

	CD4+	CD4+25+	CD8+
Weibl. Kontrollen (11)	76,05	5,43	40,26
Männl. Kontrollen (4)	72,87	5,15	44,24

Zellpopulationen der CD4+25+ in %

	CD69+	CDDR+
Weibl. Kontrollen (11)	1,63	25,66
Männl. Kontrollen (4)	1,80	28,27

Tab. 11

FACS-Analyse Weibl. Kontrollen gegen männl. Kontrollen Prozent der Lymphos

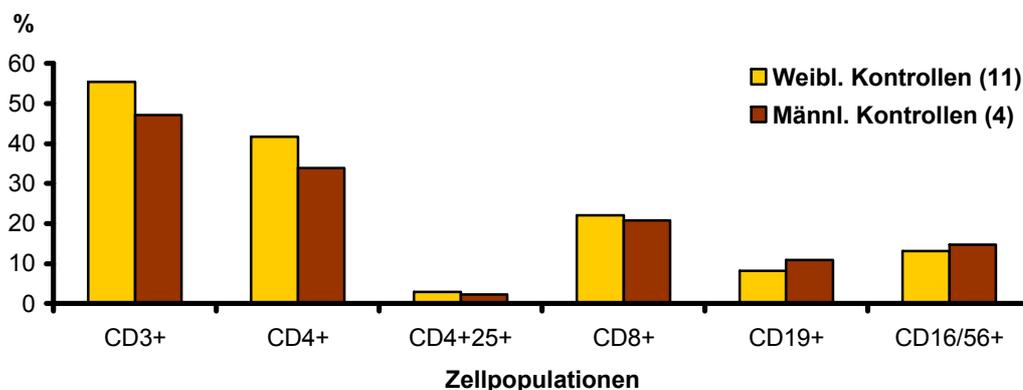


Abb. 18

CD4+25+ Zellen in Prozent der CD3+ Zellen und 3,98 Prozentpunkte weniger bei den CD8+ Zellen in Prozent der CD3+.

Nachdem hier eine Signifikanz gefunden wurde, ist es sehr interessant darüber nachzudenken, ob es zwischen gesunden Frauen und gesunden Männern tatsächlich signifikant unterschiedliche Zellzahlen gibt, die durch eine Verminderung oder Erhöhung einer bestimmten Zellpopulation vielleicht sogar erklären könnten, wieso eine bestimmte Erkrankung, so wie hier die MS, bei Frauen häufiger auftritt als bei Männern oder umgekehrt. Außerdem hat man sich bisher natürlich auf die Unterschiede zwischen Erkrankten und Gesunden konzentriert. Trotzdem war es mir aber auch wichtig, die weibl. Kontrollen mit den männl. Kontrollen zu vergleichen und die signifikante Differenz bei den CD4+ Zellen in Prozent der Lymphozyten zeigt auch, dass man bei einer größeren Probandenzahl, also nur aus gesunden Kontrollen bestehend, zwischen den Geschlechtern durchaus Unterschiede erwarten darf.

Auch beim Vergleich der weibl. Kontrollen mit allen Patienten gibt es signifikante Unterschiede.

Dabei sind zunächst die absoluten Lymphozytenzahlen bei den weibl. Kontrollen mit 1968 zu 1548 bei allen Patienten (Tab. 12 und Abb. 19) um im Schnitt 420 Zellen und mit einem p von 0,0355 signifikant erhöht. Bei der Lymphozytenzellzahl wird der

FACS-Auswertung

Weibl. Kontrollen gegen alle Patienten

Absolut	100 % Lymphos	CD3+	CD4+	CD4+25+	CD8+	CD19+	CD16/56+
Weibl. Kontrollen (11)	1968	1112	841	58	437	158	245
Patienten (30)	1548	918	698	60	312	164	221

Absolut	100% CD4+25+	CD69+	CDDR+
Weibl. Kontrollen (11)	58	1	15
Patienten (23)	60	1	17

Tab. 12

FACS-Analyse Weibl. Kontrollen gegen alle Patienten CD8+ Absolut

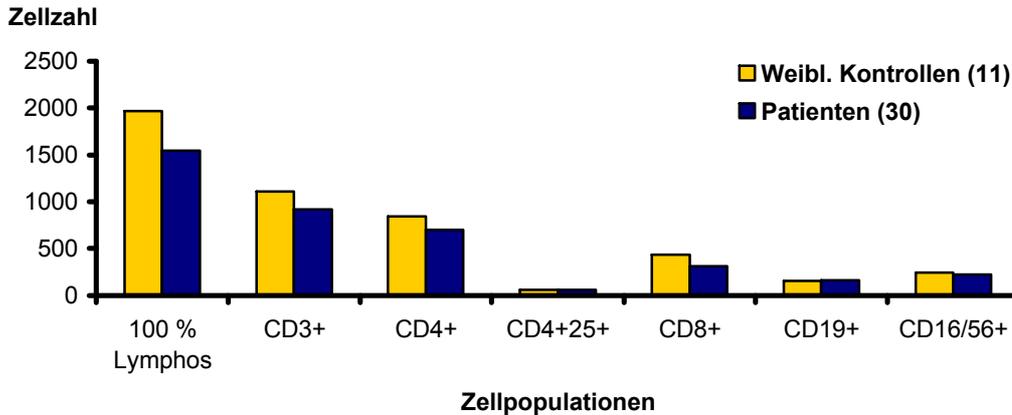


Abb. 19

signifikant erhöhte Mittelwert aller Kontrollen gegenüber allen Patienten also vor allem durch die weibl. Kontrollen verursacht, da die männl. Kontrollen hier zwar auch erhöhte Zahlen aufweisen, allerdings ohne Signifikanz. Außerdem sind die absoluten CD8+ Zellzahlen bei den weibl. Kontrollen mit 437 zu 312 bei allen Patienten mit durchschnittlich 125 Zellen mehr und einem p von 0,0174 signifikant erhöht.

Auch die CD4+25+ Zellen in Prozent der Lymphozyten sind bei dieser Gegenüberstellung signifikant. Hierbei haben die weibl. Kontrollen mit 2,98 % zu 3,88 % (Tab. 13 und Abb. 20) um 0,90 Prozentpunkte und mit einem p von 0,0278 signifikant weniger.

Weibl. Kontrollen gegen alle Patienten

Zellpopulationen der Lymphos in %

	CD3+	CD4+	CD4+25+	CD8+	CD19+	CD16/56+
Weibl. Kontrollen (11)	55,47	41,63	2,98	22,05	8,23	13,17
Patienten (30)	58,64	44,51	3,88	20,21	10,05	14,67

Zellpopulationen der CD3+ in %

	CD4+	CD4+25+	CD8+
Weibl. Kontrollen (11)	76,05	5,43	40,26
Patienten (30)	77,14	6,76	34,86

Zellpopulationen der CD4+25+ in %

	CD69+	CDDR+
Weibl. Kontrollen (11)	1,63	25,66
Patienten (23)	1,57	27,78

Tab. 13

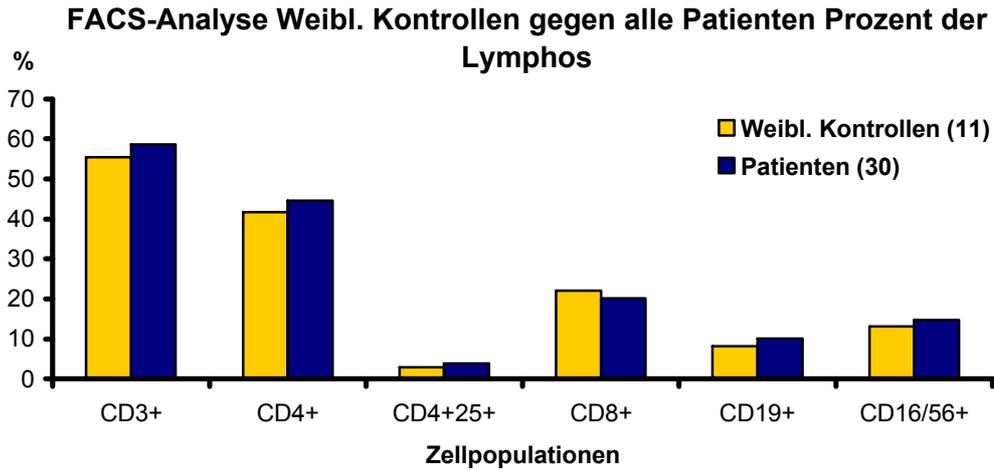


Abb. 20

Bei den männl. Kontrollen sind gegenüber allen Patienten die CD3+ Zellen in Prozent der Lymphozyten mit 47,07 % zu 58,64 % (Tab. 14 und Abb. 21) um 11,57 Prozentpunkte und einem p von 0,0324 signifikant vermindert. Auch die CD4+ Zellen in Pro-

Männl. Kontrollen gegen alle Patienten

Zellpopulationen der Lymphos in %

	CD3+	CD4+	CD4+25+	CD8+	CD19+	CD16/56+
Männl. Kontrollen (4)	47,07	33,92	2,32	20,80	10,96	14,73
Patienten (30)	58,64	44,51	3,88	20,21	10,05	14,67

Zellpopulationen der CD3+ in %

Zellpopulationen der CD4+25+ in %

	CD4+	CD4+25+	CD8+	Männl. Kontrollen (4)	CD69+	CDDR+
Männl. Kontrollen (4)	72,87	5,15	44,24	Männl. Kontrollen (4)	1,80	28,27
Patienten (30)	77,14	6,76	34,86	Patienten (23)	1,57	27,78

Tab. 14

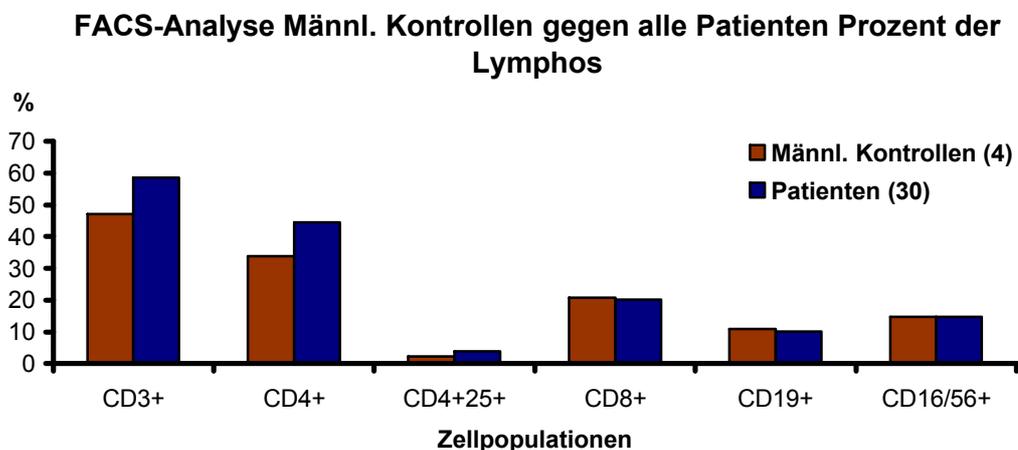


Abb. 21

zent der Lymphozyten sind bei den männl. Kontrollen mit 33,92 % zu 44,51 % bei allen Patienten um 10,59 Prozentpunkte erniedrigt, mit einem p von 0,0049 allerdings hoch signifikant. Außerdem sind noch die CD4+25+ Zellen in Prozent der Lymphozyten erneut bei den männl. Kontrollen mit 2,32 % zu 3,88 % um 1,56 Prozentpunkte und einem p von 0,0133 signifikant vermindert.

Weiter wurden die Patienten in die Gruppen therapierte und nicht therapierte Patienten aufgeteilt und miteinander verglichen, ohne aber signifikante Unterschiede festzustellen.

Die therapierten Patienten wurden aber auch noch neben alle Kontrollen gestellt, wobei wiederum die Zellfraktion der CD4+25+ Zellen anteilig der Lymphozyten als mit einem p von 0,0163 signifikant aufgefallen ist. Hier waren die Prozent der therapierten Patienten mit 3,80 % gegenüber 2,81 % der Kontrollen um 0,99 % erhöht (Tab. 15 und Abb. 22). Bei den therapierten Patienten gibt es sowohl bei den CD4+ Zellen anteilig der Lymphozyten einen mit 44,12 % zu 39,57 % um 4,55 Prozentpunkte als auch bei den CD4+ Zellen anteilig der CD3+ Zellen einen mit 79,43 % zu 75,20 % um 4,23 Prozentpunkte stärker erhöhten Wert, jedoch ohne Signifikanz. Außerdem

Mittelwerte

Therapierte Patienten gegen alle Kontrollen

Zellpopulationen der Lymphos in %

	CD3+	CD4+	CD4+25+	CD8+	CD19+	CD16/56+
Therap. Patienten (13)	56,83	44,12	3,80	20,98	10,79	15,15
Kontrollen (15)	53,23	39,57	2,81	21,71	8,96	13,58

Zellpopulationen der CD3+ in %

Zellpopulationen der CD4+25+ in %

	CD4+	CD4+25+	CD8+		CD69+	CDDR+
Therap. Patienten (13)	79,43	7,01	37,47	Therap. Patienten (12)	1,12	29,62
Kontrollen (15)	75,20	5,36	41,32	Kontrollen (15)	1,67	26,36

Tab. 15

FACS-Analyse Therapierte Patienten gegen alle Kontrollen Prozent der Lymphos

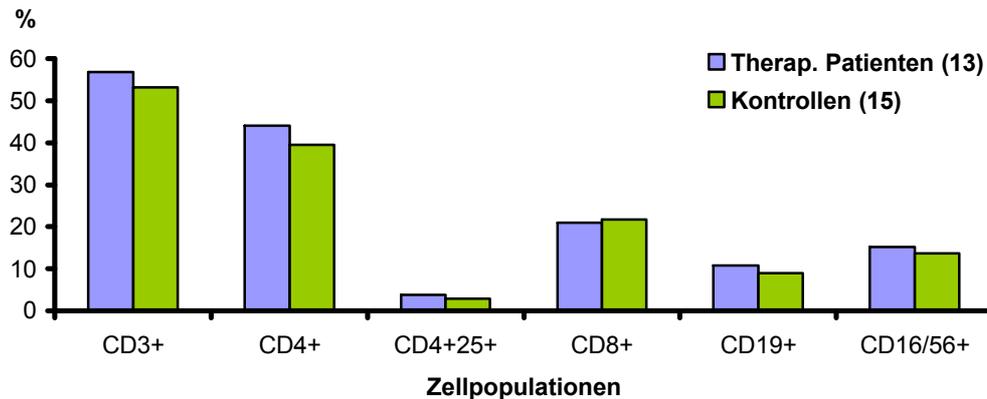


Abb. 22

wird bei den therapierten Patienten der mit 7,01 % dritthöchste Wert nach der Gruppe Glatirameracetat und Avonex bei den CD4+25+ Zellen anteilig der CD4+ Zellen erreicht, was wiederum einen durch überhaupt eine Therapie und/oder eine spezifische Therapie herbeigeführten veränderten Zellstatus andeuten könnte, zumal die Gruppen Glatirameracetat und Avonex auch bei den CD4+25+ Zellen anteilig der Lymphozyten die zwei mit Abstand höchsten Werte erreichen.

Selbstverständlich erfolgte dann auch der Vergleich der nicht therapierten Patienten mit allen Kontrollen, in dessen Verlauf drei signifikante Werte ausfindig gemacht werden konnten.

Zuerst einmal ist die Zellfraktion der CD4+ Zellen als Anteil der Lymphozyten bei den nicht therapierten Patienten mit 45,24 % zu 39,57 % bei den Kontrollen um 5,67 Prozentpunkte mit einem p von 0,0176 signifikant erhöht. Zusätzlich ist anteilig der Lymphozyten noch die Zellfraktion der CD4+25+ Zellen mit einem p von 0,0101 und 3,83 % bei den nicht therapierten Patienten zu 2,81 % bei den Kontrollen mit 1,02 Prozentpunkten signifikant erhöht (Tab. 16 und Abb. 23). Außerdem sind die an CD3+ Zellen anteiligen Zellen der Fraktion CD8+ mit einem großen Abstand von 8,47 Prozentpunkten mit 32,85 % bei den nicht therapierten Patienten zu 41,32 % bei den

Mittelwerte

Nicht therapierte Patienten gegen alle Kontrollen

Zellpopulationen der Lymphos in %

	CD3+	CD4+	CD4+25+	CD8+	CD19+	CD16/56+
Nicht therap. Pat. (14)	59,74	45,24	3,83	19,61	8,67	14,91
Kontrollen (15)	53,23	39,57	2,81	21,71	8,96	13,58

Zellpopulationen der CD3+ in %

Zellpopulationen der CD4+25+ in %

	CD4+	CD4+25+	CD8+	CD69+	CDDR+
Nicht therap. Pat. (14)	76,74	6,47	32,85	2,06	26,39
Kontrollen (15)	75,20	5,36	41,32	1,67	26,36

Tab. 16

**FACS-Analyse Nicht therapierte Patienten gegen alle Kontrollen
Prozent der Lymphos**

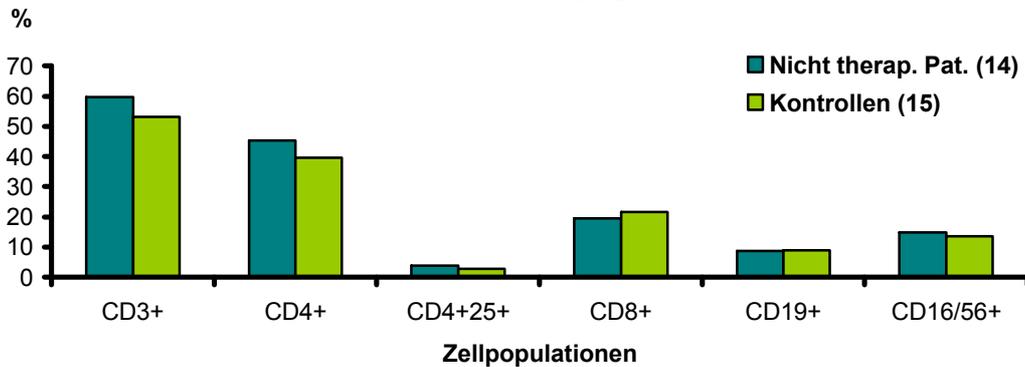


Abb. 23

**FACS-Analyse Nicht therapierte Patienten gegen alle Kontrollen
Prozent der CD3+**



Abb. 24

Kontrollen (Tab. 16 und Abb. 24) mit einem p von 0,0011 hoch signifikant erniedrigt.

Erwähnt sei auch noch die relativ große Differenz bei den CD3+ Zellen der Lympho-

zyten von 6,51 Prozentpunkten zwischen den nicht therapierten Patienten mit 59,74 % und den Kontrollen mit 53,23 %, die aber nicht signifikant ist.

Auch hier bestätigt sich wieder das Muster bezüglich der CD4+25+ Zellen, wie bereits zuvor bei den weibl. und männl. Patienten und allen Patienten zusammen, die alle wie jetzt auch die therapierten und nicht therapierten Patienten im Vergleich zu den Kontrollen einen signifikant höheren prozentualen Anteil der CD4+25+ Zellen an den Lymphozyten aufweisen. Ob weibl. oder männl., ob therapierte oder nicht therapierte Patienten, diesbezüglich verhalten sich alle Gruppen gleich. Des Weiteren wird das gleiche Verhalten der Gruppen bzw. deren Synchronizität erneut auch dadurch bestätigt, dass die zwei Gruppen der therapierten und nicht therapierten Patienten im direkten Vergleich keinerlei signifikante Unterschiede aufweisen, genau so, wie es auch im direkten Vergleich der weibl. und männl. Patienten der Fall war.

Im Folgenden werden signifikante Unterschiede bei weiteren Vergleichen ohne tabellarische und graphische Darstellungen rein im Text beschrieben. Um die Zahlen trotzdem direkt miteinander vergleichen zu können, wird auf Tab. 1 verwiesen, in der ja alle erarbeiteten Mittelwerte der einzelnen Gruppen dargestellt sind.

Teilt man nun die therapierten und die nicht therapierten Patienten weiter auf, und zwar in weibl. bzw. männl. therapierte und weibl. bzw. männl. nicht therapierte Patienten, so ergeben sich zusätzliche Vergleichsmöglichkeiten. Bei der Beurteilung der Ergebnisse ist aber vor allem im Hinblick auf die männl. therapierten Patienten, also bei Vergleichen mit dieser Gruppe, Vorsicht geboten, da diese Gruppe aus nur drei Patienten besteht. Dies gilt auch für die aus „nur“ fünf Patienten bestehende Gruppe der männl. nicht therapierten Patienten.

So hat sich ergeben, dass bei der Gegenüberstellung von weibl. therapierten und männl. therapierten Patienten die prozentualen CD8+ Zellen anteilig der Lymphozyten mit einer Differenz von 8,66 Prozentpunkten bei den weibl. therapierten Patienten mit 18,98 % zu 27,64 % bei den männl. therapierten Patienten mit einem p von 0,0324 signifikant erniedrigt sind. Außerdem gibt es gleich mehrere starke Zellzahlabweichungen, die aber alle nicht signifikant sind. Vor allem die Zellfraktion der CD8+ Zellen als Anteil der CD3+ Zellen ist bei den weibl. therapierten Patienten mit 34,26 % zu 48,15 % um ganze 13,89 Prozentpunkte stark erniedrigt. Als zweitgrößte Differenz von 11,13 Prozentpunkten und gleichzeitig zweithöchstem Wert bei den CD4+ Zellen anteilig der CD3+ Zellen nach der Gruppe Glatirameracetat ergibt sich die Erhöhung auf 82,00 % bei den weibl. therapierten Patienten zu 70,87 %. Deutlich erhöht (+8,71) sind bei den weibl. therapierten Patienten auch die CDDR+ Zellen als Anteil der CD4+25+ Zellen mit 31,80 % zu 23,09 %. Weniger stark, aber trotzdem noch erwähnenswert, sind bei den weibl. therapierten Patienten die CD4+ Zellen der Lymphozyten erhöht (+5,67 Prozentpunkte) und die CD16/56+ Zellen erniedrigt (-5,16 Prozentpunkte).

Sowohl beim Vergleich der weibl. nicht therapierten mit den männl. nicht therapierten Patienten als auch bei der Gegenüberstellung der weibl. therapierten gegen die weibl. nicht therapierten Patienten haben sich keine Signifikanzen ergeben.

Erst beim Betrachten der männl. therapierten und männl. nicht therapierten Patienten hat sich wieder ein signifikanter Unterschied gezeigt. Bei den männl. nicht therapierten Patienten ist die Zellfraktion der CD8+ Zellen anteilig der CD3+ Zellen mit 34,48 % zu 48,15 % bei den männl. therapierten Patienten mit einem p von 0,0121 um 13,67 Prozentpunkte signifikant erniedrigt. Allerdings sind dabei die Varianzen mit einem p von 0,0493 auch signifikant unterschiedlich. Ohne Signifikanz bleiben

andere Zellzahldifferenzen in diesem Vergleich. So ist die Zellfraktion der CD4+ Zellen der Lymphozyten bei den männl. nicht therapierten Patienten erhöht (+5,26 Prozentpunkte), wogegen die der CD8+ Zellen (-6,89 Prozentpunkte) der Lymphozyten genauso wie die der CD16/56+ Zellen (-5,18 Prozentpunkte) erniedrigt ist. Auch die CD4+ Zellen als Anteil der CD3+ Zellen sind bei den männl. nicht therapierten Patienten um 5,44 Prozentpunkte, ebenso wie die CDDR+ Zellen anteilig der CD4+25+ Zellen um 5,21 Prozentpunkte erhöht. Zuletzt sei noch gesagt, dass mit 4,01 % die CD4+25+ Zellen der Lymphozyten bei den männl. nicht therapierten Patienten den dritthöchsten Wert überhaupt erreichen.

Vergleicht man nun diese Gruppen mit allen Kontrollen, so ergibt sich für die weibl. therapierten Patienten ein mit einem p von 0,0382 signifikanter Unterschied bei den CD4+ Zellen der Lymphozyten. Dabei haben die weibl. therapierten Patienten mit 45,43 % zu 39,57 % genau 5,86 Prozentpunkte mehr als die Kontrollen. Ebenfalls signifikant differierend mit einem p von 0,0390 sind die CD4+25+ Zellen anteilig der Lymphozyten. Auch hier haben die weibl. therapierten Patienten mit 3,75 % zu 2,81 % um 0,94 Prozentpunkte mehr. Der dritte signifikante Wert ist beim Vergleich der Absolutzahlen der CD8+ Zellen aufgetreten. Hier haben die weibl. therapierten Patienten bei Mittelwerten von 272 zu 418 im Schnitt 146 Zellen weniger bei einem p von 0,0162. Bei den CD4+ Zellen anteilig der CD3+ Zellen haben die weibl. therapierten Patienten mit 82,00 % übrigens den zweithöchsten Wert nach der Gruppe Glatirameracetat und auch hier mit 6,80 Prozentpunkten deutlich mehr als die Kontrollen, ohne aber signifikant zu sein. Genauso ohne Signifikanz haben die weibl. therapierten Patienten bei den CDDR+ Zellen 5,44 Prozentpunkte mehr, bei den CD8+ Zellen anteilig der CD3+ Zellen 7,06 Prozentpunkte weniger und bei den absoluten

Zahlen der Lymphozyten mit durchschnittlich 1511 zu 1909 Zellen und damit einem Abstand von im Schnitt 398 Zellen deutlich weniger.

Die weibl. nicht therapierten Patienten weisen im Vergleich zu allen Kontrollen ebenfalls drei Signifikanzen auf. Zunächst sind die CD4+ Zellen anteilig der Lymphozyten bei den weibl. nicht therapierten Patienten mit 45,36 % zu 39,57 % und einem p von 0,0316 um 5,79 Prozentpunkte signifikant erhöht. Des Weiteren ist die Zellfraktion der CD4+25+ Zellen als Anteil der Lymphozyten mit einem p von 0,0346 und 3,73 % zu 2,81 % um 0,92 Prozentpunkte bei den weibl. nicht therapierten Patienten signifikant erhöht. Als dritte Signifikanz mit einem p von 0,0019 sind die Zellen der CD8+ anteilig der CD3+ bei den weibl. nicht therapierten Patienten hoch signifikant erniedrigt. Der Abstand beträgt hier fast 10 %, genauer 9,38 Prozentpunkte, bei 31,94 % zu 41,32 %. Ohne signifikant zu sein ist die Differenz bei den CD3+ Zellen anteilig der Lymphozyten von 6,16 Prozentpunkten, von 59,39 % bei den weibl. nicht therapierten Patienten zu 53,23 % bei den Kontrollen.

Die männl. therapierten Patienten haben bei der Betrachtung zu allen Kontrollen hin nur einen signifikanten Unterschied gezeigt. Und zwar sind bei den männl. therapierten Patienten die CD8+ Zellen als Anteil der Lymphozyten mit 27,64 % zu 21,71 % bei den Kontrollen um 5,93 Prozentpunkte und einem p von 0,0216 signifikant erhöht. Auch bei den männl. therapierten Patienten sind die CD4+25+ Zellen mit 3,96 % relativ hoch zu 2,81 % bei den Kontrollen mit einem Abstand von 1,15 Prozentpunkten, allerdings ohne signifikant zu sein. Bei den männl. therapierten Patienten gibt es mehrere stark abweichende Werte, nicht nur im Vergleich zu den Kontrollen, sondern auch zu anderen Gruppen. Nochmals sei deshalb darauf hingewiesen, dass die Gruppe der männl. therapierten Patienten nur aus drei Patienten besteht, weshalb deren Mittelwerte nur schwer einzuschätzen sind. Beispielsweise wäre hier zu

erwarten gewesen, dass die CD4+25+ Zellen anteilig der Lymphozyten signifikant erhöht sind. Zwar ist deren Zahl auch relativ hoch und wahrscheinlich würde sich die Signifikanz bei einer höheren Patientenzahl auch zeigen, da das p mit 0,0525 (siehe Anhang) bereits jetzt nahe an der Signifikanzgrenze von $p < 0,05$ liegt, aber es kann genauso gut auch sein, dass sich die Signifikanz zum Beispiel infolge der Therapie nicht einstellt.

Schließlich zeigt sich dann beim Vergleich der männl. nicht therapierten Patienten zu allen Kontrollen bei den CD4+25+ Zellen anteilig der Lymphozyten eine Signifikanz mit einem p von 0,0262, wobei die männl. nicht therapierten Patienten mit 4,01 % zu 2,81 % einen um 1,20 Prozentpunkte erhöhten Wert aufweisen. Der hier zweite signifikante Unterschied zeigt sich bei der Zellfraktion der CD8+ Zellen anteilig der CD3+ Zellen mit einem p von 0,0462 mit 34,48 % bei den männl. nicht therapierten Patienten zu 41,32 % bei den Kontrollen, also einer Prozentpunktdifferenz von 6,84. Nicht signifikante größere Unterschiede gibt es bei den Zellpopulationen der CD3+ und CD4+ Zellen anteilig der Lymphozyten, wobei in beiden Fällen die männl. nicht therapierten Patienten einmal mit +7,13 Prozentpunkten (CD3+) und das andere mal mit +5,45 Prozentpunkten (CD4+) höhere Prozentzahlen aufweisen.

Keine signifikanten Unterschiede haben die weibl. bzw. männl. therapierten Patienten im Vergleich zu allen therapierten Patienten und die weibl. bzw. männl. nicht therapierten Patienten bei der Gegenüberstellung mit allen nicht therapierten Patienten gezeigt, so dass diese Gruppen ein anscheinend ähnliches Verhalten an den Tag legen, also synchron laufen.

Erneut scheint es hinsichtlich der CD4+25+ Zellen anteilig der Lymphozyten keine Rolle zu spielen, ob weibl. bzw. männl. therapierte Patienten oder ob weibl. bzw. männl. nicht therapierte Patienten, denn bei allen vier Gruppen ist diese Zellfraktion

gegenüber derjenigen aller Kontrollen erhöht und bis auf die Gruppe der männl. therapierten Patienten, bei der trotz nur dreier Patienten die Signifikanzgrenze nur knapp verfehlt wurde und sich bei größerer Patientenzahl meiner Meinung nach die Signifikanz genauso zeigen würde, auch überall signifikant.

Jetzt wurden die Patienten, die einzelne Therapien erhalten, entsprechend ihres Medikamentes in einer jeweiligen Gruppe zusammengefasst und untereinander und mit den Gruppen der therapierten Patienten, der nicht therapierten Patienten, aller Patienten und aller Kontrollen verglichen. Dabei bestand die Gruppe Natalizumab leider aus nur einem Patienten und konnte deshalb nicht in die statistische Beurteilung mitgehen. Auch deshalb wäre wieder eine größere Patientenzahl wie schon erwähnt wünschenswert. Nun soll kurz erläutert werden, dass von mir im Folgenden eine Annäherung des Mittelwertes einer der einzelnen Therapien an den Mittelwert aller Kontrollen als therapeutischer Erfolg und umgekehrt, dass eine Entfernung des Mittelwertes von demjenigen aller Kontrollen bzw. eine Annäherung an den Mittelwert aller Patienten als Misserfolg oder Versagen der Therapie gewertet wird. Als medikamentös therapeutisches Ziel wird also das Erreichen des Mittelwertes aller Kontrollen angesehen. Dabei ist dann als positiv zu werten, wenn es beim Vergleich einer Gruppe der einzelnen Therapien mit allen Kontrollen keine signifikanten Unterschiede gibt und/oder wenn signifikante Unterschiede beim Vergleich mit allen Patienten vorhanden sind, sich die Werte also von denen der Patienten absetzen und denen der Kontrollen annähern. Umgekehrt ist dann als negativ zu werten, wenn es beim Vergleich der einzelnen Medikamentengruppen mit allen Patienten keine signifikanten Unterschiede gibt, sich die Mittelwerte also nicht von dem aller Patienten absetzen können, und/oder sich signifikante Unterschiede beim Vergleich mit allen Kontrollen ergeben, der Mittelwert der einzelnen Medikamentengruppe von dem aller Kontrollen

also stark abweicht. Theoretisch kann man hier sogar noch weiter Denken und einen anhand von den ermittelten Mittelwerten aller Kontrollen bzw. auch der einzelnen Untergruppen, also weibl. und männl. Kontrollen oder auch noch anderer Gruppen, einen Zielbereich mit Unter- und Obergrenze festlegen, in welchem der Mittelwert der therapierten Patienten, also der der einzelnen Medikamentengruppen, zu liegen kommen sollte.

Zunächst wird nun die leider auch nur aus 3 Patienten bestehende Gruppe Glatirameracetat (Copaxone) betrachtet.

Wenn man die Mittelwerte im Überblick begutachtet, so erkennt man sehr gut, dass die Mittelwerte der Gruppe Glatirameracetat insofern herausstechen, dass sie im Vergleich aller Mittelwerte gleich bei vier Zellpopulationen die höchsten und bei zwei Zellpopulationen die niedrigsten Mittelwerte bilden. Die CD4+25+ Zellen anteilig der Lymphozyten erreichen bei der Gruppe Glatirameracetat mit 4,24 % genauso wie die CD16/56+ Zellen mit 23,49 % und die CD4+ Zellen und CD4+25+ Zellen anteilig der CD3+ Zellen mit 95,65 % und 9,25 % ihren jeweils höchsten Wert im Vergleich aller Mittelwerte dieser Zellpopulationen. Andersherum weisen bei der Gruppe Glatirameracetat die Zellfraktionen der CD3+ Zellen anteilig der Lymphozyten mit 46,41 % und die der CDDR+ Zellen anteilig der CD4+25+ Zellen mit 17,62 % ihren jeweils niedrigsten Wert im Vergleich aller Mittelwerte dieser Zellpopulationen auf.

Das ist schon bemerkenswert und wirft natürlich sofort die Frage auf, ob dies mit der Therapie zusammenhängt, also ob im Vergleich aller medikamentös therapeutischer Optionen nur Glatirameracetat entweder die beste Wirkung zeigt oder alle anderen eingesetzten Medikamente besser wirken als Glatirameracetat und dieses in seiner Wirksamkeit bei der Therapie der MS eventuell den anderen Medikamenten unterlegen ist. Während Glatirameracetat es anscheinend im Gegensatz zu Natalizumab,

Rebif und Avonex gut schafft, die CD3+ Zellen in Prozent der Lymphozyten deutlich zu senken (unter den Mittelwert aller Kontrollen), so scheint es die CD4+25+ Zellen in Prozent der Lymphozyten noch über den Mittelwert aller Patienten (3,88 %) hinaus zu erhöhen, was außerdem auch der Gruppe Avonex mit einem Mittelwert von 4,21 % gelingt. Bei Natalizumab nähert sich der Wert wenigstens dem aller Kontrollen an, scheint hier also ganz gut zu wirken, zeigt seine beste Wirkung aber bei den CD4+ Zellen in Prozent der Lymphozyten, wo es deren Mittelwert unter den aller Patienten drückt und seine schwächste Wirkung bei den CD8+ Zellen, die sich auf den hier höchsten Mittelwert (32,31 %) stark erhöhen. Lediglich Rebif scheint es zu gelingen, den Mittelwert der Zellfraktion der CD4+25+ Zellen in Prozent der Lymphozyten unter den aller Kontrollen zu drücken. Damit erzielt Rebif hier die beste Wirkung. Schön zu erkennen ist auch, dass die zwei Interferon β -1a-Medikamente hier nicht dieselbe Wirkung erzielen.

Die Wirkung von Rebif auf die CD3+ Zellfraktion der Lymphozyten scheint dagegen nicht gut zu sein, da hier der weit über dem aller Patienten höchste Mittelwert überhaupt (66,04 %) erreicht wird.

Im Vergleich der Gruppen Glatirameracetat und Rebif ist die Zellpopulation der CD3+ Zellen anteilig der Lymphozyten bei Glatirameracetat mit 46,41 % zu 66,04 % bei Rebif um ganze 19,63 Prozentpunkte und einem p von 0,0499 signifikant erniedrigt. Des Weiteren sind die CD4+25+ Zellen anteilig der Lymphozyten bei der Gruppe Glatirameracetat mit einem p von 0,0056 hoch signifikant erhöht, wobei der Abstand von 4,24 % zu 2,09 % bei Rebif 2,15 Prozentpunkte beträgt. Auch bei den CD4+25+ Zellen anteilig der CD3+ Zellen zeigt sich bei Glatirameracetat mit 9,25 % zu 3,18 % bei Rebif und damit einer Differenz von 6,07 Prozentpunkten und einem p von 0,0038 eine hohe Signifikanz.

Übrigens treffen hier die Extreme aufeinander, sowohl bei den CD4+25+ Zellen anteilig der Lymphozyten als auch bei den CD4+25+ Zellen anteilig der CD3+ Zellen trifft der höchste Mittelwert im Feld der CD4+25+ Zellen auf den niedrigsten Wert in diesem Feld.

Bei der Gegenüberstellung der Gruppen Glatirameracetat und Avonex zeigen sich ebenfalls die CD3+ Zellen anteilig der Lymphozyten bei der Gruppe Glatirameracetat mit 46,41 % zu 57,41 % bei Avonex um exakt 11 Prozentpunkte und einem p von 0,0411 signifikant erniedigt. Außerdem waren hier die absoluten Zellzahlen der CD16/56+ Zellen bei Glatirameracetat mit einem p von 0,0086 bei im Durchschnitt 329 zu 161 Zellen, also einem Abstand von im Schnitt 168 Zellen, hoch signifikant erhöht.

Jetzt wurden die Gruppen Rebif und Avonex zu einer Gruppe Interferon β -1a gesamt zusammengefasst. Die Gruppe Glatirameracetat wurde folglich als Nächstes mit dieser neu gebildeten Gruppe verglichen.

Dabei sind wieder die CD3+ Zellen der Lymphozyten bei der Gruppe Glatirameracetat mit 46,41 % zu 59,32 % bei Interferon β -1a gesamt und einem p von 0,0171 signifikant erniedrigt (-12,91 Prozentpunkte). Erneut sind auch die Absolutzahlen der CD16/56+ Zellen bei der Gruppe Glatirameracetat mit im Schnitt 329 zu 169 Zellen (im Durchschnitt +160 Zellen) und einem p von 0,0079 hoch signifikant erhöht.

Keine signifikanten Unterschiede konnten beim Vergleich der Gruppe Glatirameracetat und den therapierten Patienten festgestellt werden.

Wieder signifikant differierende Mittelwerte ergaben sich allerdings dann beim Vergleich der Gruppe Glatirameracetat und den nicht therapierten Patienten. Dabei waren alle Zellpopulationen anteilig der CD3+ Zellen signifikant abweichend. Die

CD4+ Zellen als Anteil der CD3+ Zellen sind bei der Gruppe Glatirameracetat mit 95,65 % zu 76,74 % bei den nicht therapierten Patienten um 18,91 Prozentpunkte und einem p von 0,0020 hoch signifikant erhöht. Die nächste Zellfraktion der CD3+ Zellen, die CD4+25+ Zellen sind mit einem p von 0,0141 bei 9,25 % bei der Gruppe Glatirameracetat zu 6,47 % bei den nicht therapierten Patienten mit einer Differenz von 2,78 Prozentpunkten signifikant erhöht. Die dritte Signifikanz zeigt sich folglich bei der letzten der CD3+ Zellen anteiligen Zellfraktion, nämlich bei den CD8+ Zellen. Mit 47,25 % bei der Gruppe Glatirameracetat zu 32,85 % bei den nicht therapierten Patienten besteht eine mit einem p von 0,0109 um 14,40 Prozentpunkte signifikante prozentuale Erhöhung.

Vergleicht man nun die Gruppe Glatirameracetat mit allen Patienten, so ergeben sich bei den CD3+ Zellen anteilig der Lymphozyten mit einem p von 0,0466 bei der Gruppe Glatirameracetat mit 46,41 % zu 58,64 % bei den Patienten mit einer Differenz von 12,23 Prozentpunkten signifikant niedrigere Prozente. Auch bei den CD4+ Zellen als Anteil der CD3+ Zellen zeigt sich bei der Gruppe Glatirameracetat mit 95,65 % zu 77,14 % ein großer Abstand von 18,51 Prozentpunkten und mit einem p von 0,0206 auch eine signifikante Erhöhung. Schließlich sind auch noch die CD8+ Zellen anteilig der CD3+ Zellen bei der Gruppe Glatirameracetat mit 47,25 % zu 34,86 % bei den Patienten um 12,39 Prozentpunkte erhöht und mit einem p von 0,0455 signifikant. 47,25 % sind hier der dritthöchste Mittelwert nach der Gruppe Natalizumab (49,24 %) und den männl. therapierten Patienten (48,15 %).

Als Letztes wird die Gruppe Glatirameracetat mit allen Kontrollen verglichen. Wieder einmal sind die CD4+25+ Zellen anteilig der Lymphozyten mit einem p von 0,0154 bei der Gruppe Glatirameracetat mit 4,24 % zu 2,81 % bei den Kontrollen mit einem Unterschied von 1,43 Prozentpunkten signifikant erhöht. Bei diesem Vergleich sind

erstmalig auch die prozentualen CD16/56+ Zellen mit einem p von 0,0331 signifikant verändert, wobei die Gruppe Glatirameracetat mit 23,49 % zu 13,58 % bei den Kontrollen eine um 9,91 Prozentpunkte höhere Prozentzahl aufweist. Auch anteilig der CD3+ Zellen gibt es zwei signifikante Unterschiede. Erstens ist hier die CD4+ Zellfraktion bei der Gruppe Glatirameracetat mit 95,65 % zu 75,20 % bei den Kontrollen mit ganzen 20,45 Prozentpunkten und einem p von 0,0057 hoch signifikant erhöht. Zweitens ist bei der Gruppe Glatirameracetat die CD4+25+ Zellfraktion mit 9,25 % zu 5,36 % bei den Kontrollen um 3,89 Prozentpunkte und einem p von 0,0012 stark hoch signifikant höher. Zu guter Letzt sind bei der Gruppe Glatirameracetat auch noch die CDDR+ Zellen anteilig der CD4+25+ Zellen mit 17,62 % zu 26,36 % bei den Kontrollen um 8,74 Prozentpunkte und einem p von 0,0268 signifikant erniedrigt.

Es folgt die Gruppe Rebif, die leider auch nur aus sehr wenigen Patienten besteht, nämlich aus zwei. Deshalb wurden die Daten auch nur bis einschließlich der Zellpopulation der absoluten CD16/56+ Zellen ausgewertet, weil die Gruppe Rebif ab der Zellpopulation Prozent der CD69+ Zellen anteilig der CD4+25+ Zellen nur noch aus einem Patienten besteht. Das wiederum ist dem Anfang der Arbeiten im Labor geschuldet, da anfangs die Antikörper gegen CD69 und gegen CDDR noch nicht verfügbar waren, wie beim Blick auf die Rohdaten im Anhang schön zu erkennen ist. Dies ist auch der Grund dafür, dass in Tab. 1 ab eben der Zellpopulation der prozentualen CD69 Zellen die in Klammern hinter den Gruppen angegebene Patientenzahl der jeweiligen Gruppe abweicht.

Beim Vergleich der Gruppe Rebif mit der Gruppe Avonex sind die CD4+25+ Zellen anteilig der Lymphozyten mit einem p von 0,0394 signifikant unterschiedlich. Dabei hat die Gruppe Rebif mit 2,09 % zu 4,21 % bei Avonex um 2,12 Prozentpunkte weniger der CD4+25+ Zellen. 2,09 Prozent CD4+25+ Zellen anteilig der Lymphozyten

ist hier wie schon erwähnt der niedrigste Mittelwert, wogegen die 4,21 Prozent den zweithöchsten Mittelwert nach der Gruppe Glatirameracetat bilden. Auch anteilig der CD3+ Zellen sind die CD4+25+ Zellen bei der Gruppe Rebif mit 3,18 % zu 7,48 % bei Avonex mit einer Prozentpunktedifferenz von 4,30 und einem p von 0,0407 signifikant erniedrigt. Genauso wie bei den CD4+25+ Zellen anteilig der Lymphozyten ist auch hier der Mittelwert der Gruppe Rebif (3,18 %) der niedrigste und der der Gruppe Avonex (7,48 %) der zweithöchste nach dem der Gruppe Glatirameracetat. Allerdings stellt die Gruppe Rebif mit 66,04 % den höchsten Mittelwert in der Zellpopulation der CD3+ Zellen. Hier beträgt der Abstand zur Gruppe Avonex (57,41 %) ohne Signifikanz 8,63 Prozentpunkte. Bei der Zellpopulation CD4+ anteilig der Lymphozyten bildet der Mittelwert der Gruppe Rebif mit 45,91 % ebenfalls den höchsten Mittelwert. Nach dem Wert der Gruppe Natalizumab (56,72 %), der den niedrigsten Wert darstellt, ist der Mittelwert der Gruppe Rebif mit 69,67 % bei den CD4+ Zellen anteilig der CD3+ Zellen der zweitniedrigste. Außerdem stellt die Gruppe Rebif bei den CD8+ Zellen anteilig der CD3+ Zellen mit 32,67 % ebenfalls den zweitniedrigsten Mittelwert nach der Gruppe der weibl. nicht therapierten Patienten mit 31,94 %.

Keine signifikanten Unterschiede haben sich bei der Gegenüberstellung der Gruppe Rebif mit der Gruppe Interferon β -1a gesamt und den therapierten Patienten ergeben.

Beim Vergleich der Gruppe Rebif mit den nicht therapierten Patienten allerdings sind die CD4+25+ Zellen anteilig der Lymphozyten mit einem p von 0,0483 und einer Differenz von 1,74 Prozentpunkten bei der Gruppe Rebif mit 2,09 % zu 3,83 % bei den nicht therapierten Patienten signifikant erniedrigt. Zudem ist ebenfalls die Zellfraktion der CD4+25+ Zellen als Anteil der CD3+ Zellen bei der Gruppe Rebif mit 3,18 % zu

6,47 % bei den nicht therapierten Patienten um 3,29 Prozentpunkte und einem p von 0,0163 signifikant erniedrigt.

Stellt man nun die Gruppe Rebif allen Patienten gegenüber, so zeigt sich wieder bei den CD4+25+ Zellen anteilig der Lymphozyten, dass mit 2,09 % bei der Gruppe Rebif zu 3,88 % bei allen Patienten eine Differenz von 1,79 Prozentpunkten und damit bei der Gruppe Rebif mit einem p von 0,0396 eine signifikante Erniedrigung besteht. Und erneut sind auch die CD4+25+ Zellen als Anteil der CD3+ Zellen mit einem p von 0,0245 bei der Gruppe Rebif signifikant erniedrigt. Dabei beträgt die Prozentpunktdifferenz von 3,18 % zu 6,76 % bei allen Patienten -3,58.

Wiederum keine Signifikanz hat sich dann noch bei der Betrachtung der Gruppe Rebif im Vergleich zu allen Kontrollen gezeigt.

Jetzt richtet sich der Blick auf die Gruppe Avonex. Hierbei kam heraus, dass bei einer Gegenüberstellung mit der Gruppe Interferon β -1a gesamt, den therapierten Patienten, den nicht therapierten Patienten und den gesamten Patienten keinerlei Signifikanzen aufgetreten sind.

Lediglich im Vergleich zu allen Kontrollen haben sich signifikante Werte gezeigt. Die CD4+25+ Zellen anteilig der Lymphozyten sind bei der Gruppe Avonex mit 4,21 %, was bei dieser Zellpopulation den zweithöchsten Mittelwert darstellt, zu 2,81 % bei allen Kontrollen mit einem Unterschied von 1,40 Prozentpunkten und einem p von 0,0046 hoch signifikant erhöht. Die absoluten CD8+ Zellen sind mit einem p von 0,0114 bei der Gruppe Avonex mit im Durchschnitt 249 zu 418 Zellen bei allen Kontrollen mit einem Abstand von im Schnitt 169 Zellen signifikant vermindert. Nachdem die CD4+25+ Zellen als Anteil der Lymphozyten bei der Gruppe Avonex signifikant erhöht sind, ist nun auch die Zellfraktion der CD4+25+ Zellen anteilig der CD3+ Zel-

len mit einem p von 0,0215 und einer Prozentpunktedifferenz von 2,12 bei 7,48 % zu 5,36 % bei allen Kontrollen signifikant erhöht. Außerdem ist anteilig der CD3+ Zellen die Zellfraktion der CD8+ Zellen bei der Gruppe Avonex mit 32,97 % zu 41,32 % bei allen Kontrollen mit einer Differenz von 8,35 Prozentpunkten und einem p von 0,0342 signifikant erniedrigt. Als letzte Signifikanz bei diesem Vergleich zeigen sich die CDDR+ Zellen anteilig der CD4+25+ Zellen, die bei der Gruppe Avonex mit 36,53 % zu 26,36 % bei allen Kontrollen mit einem Prozentpunkteunterschied von 10,17 und einem p von 0,0271 signifikant erhöht sind. Die 36,53 % entsprechen dabei dem höchsten Mittelwert bei den CDDR+ Zellen.

Nach der Gruppe Natalizumab (11,11 %), die bei der Zellpopulation CD16/56+ den niedrigsten Wert zeigt, findet sich hier bei der Gruppe Avonex der mit 12,59 % zweitniedrigste Mittelwert. Kurz soll auch noch erwähnt werden, dass die Gruppe Avonex mit durchschnittlich 1388 Zellen die niedrigsten Lymphozytenzellzahlen aufweist, im Gegensatz zu den Kontrollen, die mit im Schnitt 1909 Zellen die dritthöchsten Lymphozytenzellzahlen nach Natalizumab (2014) und den weibl. Kontrollen (1968) zeigen, ohne dass diese Differenz jedoch signifikant wäre.

Schließlich wendet man sich noch der letzten Gruppe zu. Die Gruppe Interferon β -1a gesamt zeigt dabei im Vergleich zu den therapierten Patienten, den nicht therapierten Patienten und zu allen Patienten keine signifikanten Abweichungen.

Beim Vergleich mit allen Kontrollen jedoch finden sich gleich mehrere Signifikanzen. Zunächst einmal sind die Lymphozyten bei der Gruppe Interferon β -1a mit einem p von 0,0332 und einer durchschnittlichen Zellzahl von 1401 zu 1909 bei den Kontrollen um im Schnitt 508 Zellen signifikant vermindert. Des Weiteren sind auch die absoluten CD8+ Zellen um im Durchschnitt 155 Zellen bei der Gruppe Interferon β -1a mit durchschnittlich 263 zu 418 Zellen bei den Kontrollen und einem p von 0,0087

hoch signifikant erniedrigt. Außerdem ist anteilig der CD3+ Zellen die Zellfraktion der CD8+ Zellen bei der Gruppe Interferon β -1a mit 32,90 % zu 41,32 % bei den Kontrollen mit einer Differenz von 8,42 Prozentpunkten und einem p von 0,0167 signifikant vermindert. Als letzter Mittelwert ist derjenige der Zellfraktion der CDDR+ Zellen anteilig der CD4+25+ Zellen bei der Gruppe Interferon β -1a mit 35,39 % zu 26,36 % bei den Kontrollen um 9,03 Prozentpunkte und einem p von 0,0372 signifikant erhöht, wobei allerdings die Varianzen deutlich signifikant unterschiedlich sind. Dieser Prozentsatz von 35,39 % entspricht gleichzeitig auch dem zweithöchsten Mittelwert bei den CDDR+ Zellen. Bei der Zellpopulation der CD16/56+ Zellen bildet der Mittelwert der Gruppe Interferon β -1a mit 12,82 % schließlich noch den drittniedrigsten Wert.

Interessant ist bei den einzelnen Therapien, dass alle Gruppen sich zu den therapierten Patienten gleich verhalten. Keine Gruppe zeigt bei diesem Vergleich eine signifikante Differenz. Außerdem ist auch noch bemerkenswert, dass als einzige Gruppe dieser einzelnen Therapien diejenige von Rebif gegenüber allen Kontrollen keine Signifikanz aufweist, was als Indiz dafür gewertet werden könnte, dass die Therapie mit Rebif es als einzige schafft, die einzelnen Zellpopulationen denen aller Kontrollen am besten anzunähern, Rebif von allen therapeutischen Optionen also die beste Wirkung zeigt.

Bis hierher wurden die einzelnen gebildeten Gruppen und deren Signifikanzen im Vergleich betrachtet. Im Folgenden aber werden jetzt die einzelnen Zellpopulationen genauer angesehen. Entsprechend der Tab. 1 wird angefangen mit den Lymphozyten jede Zellpopulation der Reihe nach betrachtet. Außerdem soll im Anschluss an die jeweilige Zellpopulation mit einer tabellarischen Darstellung die Übersicht erleichtert werden. Dabei bedeutet * eine Signifikanz mit einem p von 0,0..., wogegen

ein p von 0,00.. einer hohen Signifikanz entsprechend mit ** und ein p von 0,000. höchst signifikant entsprechend mit *** gekennzeichnet ist.

Die absoluten Lymphozytenzahlen sind nur bei drei Vergleichen als signifikant unterschiedlich aufgefallen. Und zwar haben alle Patienten im Vergleich zu allen Kontrollen signifikant weniger Lymphozyten und die Gruppe Interferon β -1a gesamt hat bei der Gegenüberstellung mit allen Kontrollen auch signifikant weniger Lymphozyten, wobei die Lymphozytenzellzahl im Durchschnitt noch unter derjenigen aller Patienten liegt. Hieraus könnte man eventuell folgern, dass durch die Therapie mit Interferon β -1a die Lymphozytenzellzahl stärker und damit signifikant gesenkt wird als es bei einer Therapie mit Glatirameracetat und Natalizumab der Fall ist. Allerdings muss man sagen, dass an dieser Erniedrigung Avonex den Löwenanteil hat, Rebif die Lymphozyten also nicht so stark vermindert wie Avonex. Beide entfernen die Lymphozytenzahl also noch weiter von dem Mittelwert aller Kontrollen als es mit dem Mittelwert aller Patienten ja schon der Fall ist. Natalizumab übersteigt sogar den Mittelwert aller Kontrollen, wohingegen Glatirameracetat mit seinem zwischen den Mittelwerten aller Patienten und aller Kontrollen zu liegen kommt. Außerdem haben die weibl. Kontrollen signifikant mehr Lymphozyten als alle Patienten zusammen. Ähnlich wie später bei den absoluten CD8+ Zellen machen hier die weibl. Kontrollen den Hauptteil der Erhöhung der Zellen bei allen Kontrollen gegenüber allen Patienten aus. Es lohnt sich also schon jetzt, die Geschlechter genauer zu betrachten.

**Signifikante
Mittelwerte
Lymphozytenzellzahl**

Patienten gesamt 1548	< *	Kontrollen gesamt 1909
Weibl. Kontrollen 1968	> *	Patienten gesamt 1548
Interferon β-1a gesamt 1401	< *	Kontrollen gesamt 1909

Die Zellfraktion der CD3+ Zellen in Prozent der Lymphozyten ist insgesamt fünfmal signifikant differierend. Bemerkenswert dabei ist, dass viermal die Gruppe Glatirameracetat beteiligt ist. Dabei ist der Mittelwert der Gruppe Glatirameracetat gegenüber denjenigen der Gruppen Rebif, Avonex, Interferon β -1a gesamt und gegenüber allen Patienten immer signifikant erniedrigt. Hier könnte man nun schließen, dass der CD3+ Anteil an den Lymphozyten bei der Gruppe Glatirameracetat aufgrund der Therapie signifikant gegenüber den anderen therapeutischen Optionen und auch gegenüber allen Patienten vermindert ist, Glatirameracetat die CD3+ Zellen also besser unterdrückt als die anderen Medikamente, vor allem als die Interferone, die ohne den Anteil der CD3+ Zellen der Lymphozyten zu senken eher die Lymphozytenzahl insgesamt senken. Dies ist insofern wichtig, da als therapeutisches Mittel ja versucht werden kann, diese Zellen zu senken. Die Patienten insgesamt haben klar mehr der prozentualen CD3+ Zellfraktion als die Kontrollen und bei den therapierten Patienten insgesamt gelingt es auch gegenüber den nicht therapierten Patienten insgesamt diese leicht zu senken, wobei der Hauptanteil daran eben bei Glatirameracetat liegt. Als positiv kann auch gewertet werden, dass sich die Gruppe Glatirameracetat signifikant von allen Patienten absetzt. Die männl. Kontrollen haben zudem gegenüber allen Patienten signifikant weniger der CD3+ Zellen in Prozent der Lymphozyten. Hier unterscheiden sich die männl. Kontrollen deutlich von den weibl. Kontrollen, die sich zu allen Patienten nicht signifikant absetzen und mit 55,47 % zwischen dem Mittelwert aller Kontrollen (53,23 %) und dem aller Patienten liegen.

**Signifikante
Mittelwerte
CD3+ in
Prozent der
Lymphos**

Männl. Kontrollen	<	Patienten gesamt
47,07	*	58,64

Glatirameracetat 46,41	< *	Rebif 66,04
Glatirameracetat 46,41	< *	Avonex 57,41
Glatirameracetat 46,41	< *	Interferon β-1a gesamt 59,32
Glatirameracetat 46,41	< *	Patienten gesamt 58,64

Keinerlei signifikante Unterschiede gibt es dagegen bei den absoluten Zellzahlen der CD3+ Zellen.

Die CD4+ Zellen in Prozent der Lymphozyten zeigen mehrere signifikante Unterschiede, gerade auch in Bezug auf die Geschlechter. Zuerst einmal ist diese Zellfraktion bei allen Patienten signifikant gegenüber allen Kontrollen erhöht. Beim Vergleich der Geschlechter (weibl. Patienten und weibl. Kontrollen zusammen gegen männl. Patienten und männl. Kontrollen zusammen) zeigt sich eine signifikante Erhöhung dieser Zellfraktion bei allen Frauen. Bestätigt wird diese Erkenntnis durch die hoch signifikante Erhöhung der CD4+ Zellen in Prozent der Lymphozyten bei den weibl. Patienten gegenüber allen Kontrollen. Sogar beim Vergleich innerhalb der Kontrollen zeigt sich bei den weibl. Kontrollen gegenüber den männl. Kontrollen eine signifikante Erhöhung. Die männl. Kontrollen sind auch im Vergleich zu allen Patienten hoch signifikant vermindert. Außerdem ist diese Zellpopulation sowohl bei den weibl. therapierten Patienten als auch bei den weibl. nicht therapierten Patienten signifikant gegenüber allen Kontrollen erhöht. Zuletzt ist diese Zellfraktion auch bei den nicht therapierten Patienten im Vergleich mit allen Kontrollen signifikant erhöht. Hier zeigt sich also eine ganz klare Tendenz, bei der die CD4+ Zellen in Prozent der Lymphozyten zuerst bei allen Patienten, dann aber vor allem bei den weibl. Patienten, egal ob therapiert oder nicht therapiert, und zudem noch bei allen Frauen zusammen signifikant gegenüber allen Kontrollen erhöht sind. Und sogar unter den Kontrollen

haben die weibl. Kontrollen signifikant mehr als die männl. Kontrollen. Dies ist natürlich von besonderem Interesse gerade im Hinblick auf die Tatsache, dass mehr Frauen als Männer von der MS betroffen sind.

Auch bei den Männern zeigt sich eine prozentuale Differenz, vor allem zwischen männl. Kontrollen (leider nur vier männl. Kontrollen) und männl. Patienten, ohne allerdings signifikant zu sein. Beim Vergleich der männl. Kontrollen mit allen Patienten zeigt sich dafür eine hoch signifikante Erniedrigung bei den männl. Kontrollen. Insbesondere dies sollte mit einer größeren Probandenzahl nochmals überprüft werden.

Bei dieser Zellpopulation ist vor allem sehr interessant, dass im Vergleich der Kontrollen die weibl. Kontrollen gegenüber den männl. Kontrollen signifikant mehr CD4+ Zellen in Prozent der Lymphozyten aufweisen. Dieser Unterschied bei der Gegenüberstellung gesunder Frauen mit gesunden Männern sollte bei einer größeren Anzahl von gesunden Probanden nochmals bestätigt werden. Vielleicht zeigen sich dann bei anderen Zellpopulationen zusätzlich noch andere signifikante Differenzen, da ja auch jetzt schon unterschiedliche Prozentzahlen vorhanden sind, die aber noch nicht signifikant sind. Signifikante Unterschiede zwischen gesunden Frauen und gesunden Männern könnten dann beispielsweise erklären, warum bestimmte Erkrankungen, nicht nur die MS, bei einem Geschlecht gehäuft auftreten.

<u>Signifikante Mittelwerte CD4+ in Prozent der Lymphos</u>		
Patienten gesamt 44,51	> *	Kontrollen gesamt 39,57
Alle Frauen 44,27	> *	Alle Männer 39,76
Weibl. Patienten 45,72	> **	Kontrollen gesamt 39,57

Weibl. Kontrollen 41,63	> *	Männl. Kontrollen 33,92
Männl. Kontrollen 33,92	< **	Patienten gesamt 44,51
Nicht therapierte Patienten 45,24	> *	Kontrollen gesamt 39,57
Weibl. therapierte Patienten 45,43	> *	Kontrollen gesamt 39,57
Weibl. nicht therapierte Patienten 45,36	> *	Kontrollen gesamt 39,57

Wiederum keine Signifikanzen haben sich bei den absoluten Zellzahlen der CD4+ Zellen gezeigt.

Ein besonderes Augenmerk gilt natürlich den CD4+25+ Zellen, weil diesen Zellen, wie in der Einleitung erwähnt, eine besondere Bedeutung zugemessen wird. Erfreulicherweise zeigen diese Zellen in Prozent der Lymphozyten die meisten signifikanten Unterschiede, gefolgt von den CD8+ Zellen in Prozent der CD3+ Zellen mit den zweithäufigsten signifikanten Unterschieden.

Die CD4+25+ Zellen in Prozent der Lymphozyten sind zunächst bei allen Patienten im Vergleich zu allen Kontrollen hoch signifikant erhöht. Aufgeteilt in weibl. und männl. Patienten zeigen beide Gruppen gegen alle Kontrollen ebenfalls eine hoch signifikante Erhöhung dieser Zellfraktion. Umgekehrt zeigen die in weibl. und männl. Kontrollen aufgeteilten Kontrollen gegenüber allen Patienten beide eine signifikante Erniedrigung. Sogar beim Vergleich von männl. Patienten zu männl. Kontrollen zeigt sich bei der Zellpopulation der CD4+25+ Zellen in Prozent der Lymphozyten eine hoch signifikante Erhöhung bei den männl. Patienten. Auch signifikant erhöht ist diese Zellpopulation bei den therapierten Patienten und bei den nicht therapierten Patienten gegenüber allen Kontrollen. Außerdem ist diese Zellfraktion noch bei den weibl. therapierten Patienten, den weibl. nicht therapierten Patienten und bei den

männl. nicht therapierten Patienten gegenüber allen Kontrollen signifikant erhöht. Lässt man nun die männl. therapierten Patienten aufgrund der schon erwähnten Problematik der nur drei Patienten einmal außen vor, obwohl diese Gruppe trotzdem mit einem gegenüber den Kontrollen ebenfalls relativ stark erhöhten Mittelwert und einem p von 0,0525 nur ganz knapp an der Signifikanz vorbeischrämmt und ich fest davon überzeugt bin, dass sich diese bei einer höheren Patientenzahl einstellt, so zeigt sich ein beeindruckend gleiches Verhalten der Patientengruppen gegenüber den Kontrollen. So ist die Zellpopulation der CD4+25+ Zellen in Prozent der Lymphozyten nicht nur bei allen Patienten zusammen, sondern egal ob bei weibl. Patienten oder männl. Patienten, ob bei therapierten Patienten oder nicht therapierten Patienten und ob bei weibl. therapierten Patienten oder weibl. nicht therapierten Patienten oder bei männl. nicht therapierten Patienten, so ist diese Zellpopulation bei all diesen Gruppen signifikant erhöht gegenüber allen Kontrollen. Außerdem zeigen die weibl. Kontrollen gegenüber den männl. Kontrollen hier keinen signifikanten Unterschied, beide sind jedoch gegenüber allen Patienten signifikant vermindert. Auch dies bestätigt nochmals das gleiche Verhalten bzw. die Synchronizität der Gruppen. Bei solch einem eindeutigen Ergebnis ist es sogar erlaubt darüber nachzudenken, ob es möglich ist, die Diagnostik der MS zu erleichtern, indem sich aus diesem Ergebnis ein Bluttest entwickeln lässt, bei dem ein Grenzwert gefunden wird, ab welchem der Test bei einmaliger Testung als positiv zu werten ist und damit die Diagnosestellung MS oder zumindest die einer Autoimmunerkrankung allgemein erlaubt. Also sollte dann über einen solchen Test auch bei anderen Autoimmunerkrankungen nachgedacht werden.

Dies ist aber bei weitem noch nicht alles, so sind die CD4+25+ Zellen in Prozent der Lymphozyten bei der Gruppe Glatirameracetat gegenüber allen Kontrollen signifikant und gegenüber der Gruppe Rebif sogar hoch signifikant erhöht. Bei der Gruppe Rebif

wiederum ist diese Zellfraktion gegenüber der Gruppe Avonex, gegenüber den nicht therapierten Patienten und gegenüber allen Patienten signifikant erniedrigt. Als Letztes schließlich ist die Gruppe Avonex gegenüber allen Kontrollen bei dieser Zellpopulation hoch signifikant erhöht. Wie schon erwähnt, gelingt es hier von allen medikamentösen Optionen alleine Rebif, diesen Mittelwert sogar unter den aller Kontrollen zu senken. Außerdem zeigt Rebif als einzige der Therapien hier keine signifikanten Unterschiede zu allen Kontrollen, was ich als Zeichen dafür ansehe, dass es hier ausschließlich unter einer Therapie mit Rebif zu einer Annäherung der Mittelwerte an die Mittelwerte aller Kontrollen kommt und damit Rebif als die beste Therapie angesehen werden darf. Auch die signifikante Erniedrigung des Mittelwertes von Rebif gegenüber den Mittelwerten der anderen Therapien bei dieser Zellfraktion deutet darauf hin. Zudem gelingt es der Gruppe Rebif auch, sich mit seinem Mittelwert signifikant und deutlich von demjenigen aller Patienten abzusetzen, was in diesem Hinblick auch als therapeutischer Erfolg gedeutet werden kann.

Betrachtet man jedoch die therapierten Patienten (3,80 %) und die nicht therapierten Patienten (3,83 %), so sieht man, dass sich beide mit ihren Mittelwerten nicht von dem Mittelwert aller Patienten zusammen (3,88 %) entfernen können und sich gleichzeitig aber signifikant von dem Mittelwert aller Kontrollen (2,81 %) absetzen. Das würde bedeuten, dass die Therapien nicht greifen und es folglich egal wäre, ob therapiert wird oder nicht. Es macht also durchaus Sinn, wie oben geschehen, nicht nur alle therapierten Patienten zusammen, sondern die medikamentösen Therapien getrennt voneinander einzeln zu betrachten.

**Signifikante
Mittelwerte
CD4+25+ in
Prozent der
Lymphos**

Patienten gesamt
3,88

>
**

Kontrollen gesamt
2,81

Weibl. Patienten 3,88	> **	Kontrollen gesamt 2,81
Männl. Patienten 3,88	> **	Kontrollen gesamt 2,81
Männl. Patienten 3,88	> **	Männl. Kontrollen 2,32
Weibl. Kontrollen 2,98	< *	Patienten gesamt 3,88
Männl. Kontrollen 2,32	< *	Patienten gesamt 3,88
Therapierte Patienten 3,80	> *	Kontrollen gesamt 2,81
Nicht therapierte Patienten 3,83	> *	Kontrollen gesamt 2,81
Weibl. therapierte Patienten 3,75	> *	Kontrollen gesamt 2,81
Weibl. nicht therapierte Patienten 3,73	> *	Kontrollen gesamt 2,81
Männl. nicht therapierte Patienten 4,01	> *	Kontrollen gesamt 2,81
Glatirameracetat 4,24	> **	Rebif 2,09
Glatirameracetat 4,24	> *	Kontrollen gesamt 2,81
Rebif 2,09	< *	Avonex 4,21
Rebif 2,09	< *	Nicht therapierte Patienten 3,83
Rebif 2,09	< *	Patienten gesamt 3,88
Avonex 4,21	> **	Kontrollen gesamt 2,81

Bei den absoluten Zellzahlen der CD4+25+ Zellen anteilig der Lymphozyten gibt es keine signifikanten Differenzen.

Die Zellpopulation der CD8+ Zellen in Prozent der Lymphozyten zeigt geschlechter-spezifisch bei den männl. therapierten Patienten gegenüber den weibl. therapierten Patienten und gegenüber allen Kontrollen eine signifikante Erhöhung. Insofern könnte man darüber spekulieren, inwieweit sich beim Ansprechen der Therapie bei den Geschlechtern Unterschiede ausmachen lassen.

<u>Signifikante Mittelwerte CD8+ in Prozent der Lymphos</u>		
Männl. therapierte Patienten 27,64	> *	Weibl. therapierte Patienten 18,98
Männl. therapierte Patienten 27,64	> *	Kontrollen gesamt 21,71

Auch die absoluten Zellzahlen der CD8+ Zellen zeigen im Ergebnis eine interessante geschlechter- und therapiespezifische Konstellation.

Beim Vergleich der Absolutzahlen der CD8+ Zellen zeigt sich zunächst bei allen Kontrollen gegenüber allen Patienten (im Schnitt 312 Zellen) eine signifikante Erhöhung. Beim Überfliegen der Zahlen ist schnell auszumachen, dass diese Erhöhung den weibl. Kontrollen zuzuschreiben ist, die mit im Schnitt 437 Zellen sogar noch mehr Zellen aufweisen als alle Kontrollen zusammen mit 418 Zellen. Dies bestätigt sich dann auch beim Vergleich der weibl. Kontrollen mit den weibl. Patienten (294 Zellen), bei dem die weibl. Kontrollen eine hoch signifikant erhöhte Zellzahl zeigen und gegenüber allen Patienten, wo sie signifikant erhöhte Zellen zeigen. Weiter weisen dann auch alle Kontrollen bei der Gegenüberstellung mit den weibl. Patienten hoch signifikant erhöhte Zellzahlen auf. Interessanterweise gibt es nicht nur diese Geschlechterdifferenz, sondern auch noch eine medikamentöse Beeinflussung. So zeigen die absoluten CD8+ Zellen bei allen Kontrollen erneut eine hoch signifikant höhere Zellzahl beim Vergleich mit der Gruppe Interferon β -1a gesamt und eine sig-

nifikante Erhöhung bei der Gegenüberstellung mit der Gruppe Avonex, die hier mit im Schnitt 249 Zellen den niedrigsten Mittelwert aufweist. Dies lässt sich so erklären, dass die Therapie mit Avonex die Anzahl der CD8+ Zellen herunterdrückt bzw. vermindert und zwar stärker als dies anscheinend bei Rebif der Fall ist, weshalb Avonex auch den Löwenanteil an der deutlichen Signifikanz bei Interferon β -1a gesamt hat. Wiederum würde dies auch erklären, warum erneut bei allen Kontrollen gegenüber den weibl. therapierten Patienten eine signifikante Erhöhung der CD8+ Zellen vorliegt. Nun könnte man folgern, dass es ein unterschiedliches Ansprechen der Therapie mit Avonex gibt. Und zwar in der Weise, dass, wenn man die Inkorporation der Gruppe Avonex in die Gruppe der weibl. Patienten bzw. der männl. Patienten und in die Gruppe aller Patienten wahrgenommen hat, dieses Medikament bei den Frauen besser anspricht als bei den Männern. Deshalb soll kurz darauf hingewiesen werden, dass, wie in den Rohdaten im Anhang schön zu erkennen, es sich bei den insgesamt sieben mit Avonex behandelten Patienten um sechs Frauen und nur einen Mann handelt. Die Folgerung kann also richtig sein, es kann aber auch sein, dass sich die Wirkung von Avonex wie auf die weibl. Patienten genauso auch noch auf die männl. Patienten einstellt, sobald eine ausreichend große Anzahl von Patienten untersucht wurde. Was allerdings bleibt und in dieser Folgerung keinen Platz findet, sind die deutlich erhöhten absoluten CD8+ Zellzahlen bei vor allem den weibl. Kontrollen und damit auch bei allen Kontrollen zusammen.

Wie schon erwähnt, deutet sich im Bezug auf die Geschlechter bei den absoluten Lymphozytenzahlen ein ähnliches Verhalten bzw. eine ähnliche Zellzahlverteilung an, wie es hier der Fall ist.

	<u>Signifikante Mittelwerte Absolute Zellzahl CD8+</u>	
Patienten gesamt 312	< *	Kontrollen gesamt 418
Weibl. Patienten 294	< **	Weibl. Kontrollen 437
Weibl. Patienten 294	< **	Kontrollen gesamt 418
Weibl. Kontrollen 437	> *	Patienten gesamt 312
Weibl. therapierte Patienten 272	< *	Kontrollen gesamt 418
Avonex 249	< *	Kontrollen gesamt 418
Interferon β-1a gesamt 263	< **	Kontrollen gesamt 418

Keinerlei Signifikanzen zeigt die Zellpopulation der CD19+ Zellen (B-Zellen) in Prozent der Lymphozyten.

Und auch die absoluten Zellzahlen der CD19+ Zellen weisen keine signifikanten Differenzen auf.

Bei der Zellfraktion der CD16/56+ Zellen (Natürliche Killer(NK)-Zellen) in Prozent der Lymphozyten kommt es zu nur einem signifikanten Unterschied. Und zwar ist diese Zellpopulation bei der Gruppe Glatirameracetat gegenüber allen Kontrollen signifikant erhöht.

	<u>Signifikante Mittelwerte CD16/56+ in Prozent der Lymphos</u>	
Glatirameracetat 23,49	> *	Kontrollen gesamt 13,58

Die absoluten CD16/56+ Zellen sind besonders bei Patienten mit der Therapie Glatirameracetat mit im Schnitt 329 Zellen und damit dem höchsten Wert überhaupt erhöht. Hoch signifikant wird diese Erhöhung bei der Gruppe Glatirameracetat beim Vergleich mit der Gruppe Avonex und Interferon β -1a gesamt. Auch Rebif scheint diese Zellpopulation zu vermindern, aber nicht so stark wie Avonex. Bei der Gruppe Avonex dagegen findet sich hier mit durchschnittlich 161 Zellen der niedrigste Mittelwert. Deshalb trägt hier auch an der deutlichen Signifikanz von Interferon β -1a gesamt Avonex den Löwenanteil. Dies schlägt sich natürlich auch auf die weibl. therapierten Patienten nieder, die mit im Durchschnitt 185 Zellen den drittniedrigsten Mittelwert nach Avonex und Interferon β -1a gesamt (im Schnitt 169 Zellen) aufweisen. Insgesamt zeichnet sich hier also ein zu den absoluten CD8+ Zellzahlen ähnliches Bild für die Therapie mit Avonex ab.

	<u>Signifikante Mittelwerte</u> <u>Absolute Zellzahl CD16/56+</u>	
Glatirameracetat 329	> **	Avonex 161
Glatirameracetat 329	> **	Interferon β-1a gesamt 169

Betrachtet man nun die Zellpopulation der CD4+ Zellen in Prozent der CD3+ Zellen, so zeigen sich hierbei drei Signifikanzen. Dabei steht die Gruppe Glatirameracetat im Mittelpunkt der Betrachtung. Bei dieser Gruppe findet sich nämlich die CD4+ Zellen in Prozent der CD3+ Zellen betreffend gegenüber den nicht therapierten Patienten und gegenüber allen Kontrollen eine hoch signifikante Erhöhung. Zudem findet sich auch noch gegenüber allen Patienten ein signifikant höherer Prozentsatz dieser Zellpopulation bei der Gruppe Glatirameracetat. Auffällig ist hier einfach der besonders

hohe Prozentsatz bei der Gruppe Glatirameracetat, der natürlich auch wieder infolge der Therapie eben mit Glatirameracetat zustande gekommen sein kann.

<u>Signifikante Mittelwerte CD4+ in Prozent der CD3+</u>		
Glatirameracetat 95,65	> **	Nicht therapierte Patienten 76,74
Glatirameracetat 95,65	> *	Patienten gesamt 77,14
Glatirameracetat 95,65	> **	Kontrollen gesamt 75,20

Auch bei den CD4+25+ Zellen in Prozent der CD3+ Zellen bilden ja wie schon bei den CD4+25+ Zellen in Prozent der Lymphozyten die Gruppe Rebif den niedrigsten und die Gruppe Glatirameracetat den höchsten Mittelwert. Deshalb zeigen sich auch bei diesen zwei Gruppen die mit jeweils drei meisten Signifikanzen. Zunächst aber ist die Zellpopulation der CD4+25+ Zellen in Prozent der CD3+ Zellen bei allen Patienten gegenüber allen Kontrollen signifikant erhöht. Hier zeigt sich nun aber im Gegensatz zu den CD4+25+ Zellen in Prozent der Lymphozyten lediglich noch bei den männl. Patienten eine signifikante Erhöhung gegenüber allen Kontrollen, nicht mehr allerdings bei den weibl. Patienten, den therapierten Patienten, den nicht therapierten Patienten, den weibl. therapierten Patienten und den weibl. bzw. männl. nicht therapierten Patienten. Bei der Gruppe Glatirameracetat finden sich bei dieser Zellfraktion hoch signifikante Erhöhungen gegenüber allen Kontrollen und gegenüber der Gruppe Rebif, gegenüber den nicht therapierten Patienten allerdings findet sich nur eine signifikante Erhöhung. Bei der Gruppe Rebif dagegen finden sich signifikante Erniedrigungen dieser Zellpopulation gegenüber allen Patienten, gegenüber den nicht therapierten Patienten und gegenüber der Gruppe Avonex. Als Letztes schließlich hat die

Gruppe Avonex einen signifikant höheren Anteil dieser Zellen gegenüber allen Kontrollen. Wieder gelingt es der Gruppe Rebif, sich mit seinem Mittelwert von dem aller Patienten signifikant abzusetzen. Die Gruppen Glatirameracetat und Rebif schaffen es außerdem, sich als Therapien von den nicht therapierten Patienten signifikant abzusetzen.

<u>Signifikante Mittelwerte CD4+25+ in Prozent der CD3+</u>		
Patienten gesamt 6,76	> *	Kontrollen gesamt 5,36
Männl. Patienten 6,66	> *	Kontrollen gesamt 5,36
Glatirameracetat 9,25	> **	Rebif 3,18
Glatirameracetat 9,25	> *	Nicht therapierte Patienten 6,47
Glatirameracetat 9,25	> **	Kontrollen gesamt 5,36
Rebif 3,18	< *	Avonex 7,48
Rebif 3,18	< *	Nicht therapierte Patienten 6,47
Rebif 3,18	< *	Patienten gesamt 6,76
Avonex 7,48	> *	Kontrollen gesamt 5,36

Es folgt jetzt die Zellpopulation der CD8+ Zellen in Prozent der CD3+ Zellen, bei der sich die zweithäufigsten signifikanten Differenzen nach den CD4+25+ Zellen in Prozent der Lymphozyten finden lassen.

Zunächst einmal ist die Zellfraktion der CD8+ Zellen in Prozent der CD3+ Zellen bei allen Patienten gegenüber allen Kontrollen signifikant erniedrigt. Auch signifikant er-

niedrigt ist diese Zellpopulation bei den weibl. Patienten gegenüber den weibl. Kontrollen und gegenüber allen Kontrollen sogar hoch signifikant erniedrigt. Weiter ist diese auch bei den nicht therapierten Patienten und den weibl. nicht therapierten Patienten gegenüber allen Kontrollen hoch signifikant erniedrigt. Ebenfalls ist diese Zellfraktion der CD8+ Zellen in Prozent der CD3+ Zellen auch bei den männl. nicht therapierten Patienten gegenüber den männl. therapierten Patienten und gegenüber allen Kontrollen signifikant erniedrigt. Der bei dieser Zellpopulation höchste Wert liegt mit 49,24 % bei der Gruppe Natalizumab, gefolgt von dem Mittelwert der männl. therapierten Patienten mit 48,15 % und dem der Gruppe Glatirameracetat mit 47,25 %. Wie Natalizumab liegt auch die Gruppe Glatirameracetat mit diesem Mittelwert nicht nur deutlich über dem der Kontrollen (41,32 %), sondern sogar noch deutlicher auch über dem aller Patienten (34,86 %). So verwundert es auch nicht, dass diese Erhöhung bei der Gruppe Glatirameracetat gegenüber allen Patienten signifikant ist. Des Weiteren ist diese Zellfraktion bei der Gruppe Glatirameracetat auch noch gegenüber den nicht therapierten Patienten erhöht. Die Mittelwerte der Gruppen Avonex und Interferon β -1a gesamt sind dagegen im Vergleich zu allen Kontrollen signifikant erniedrigt. Insgesamt fällt hier schon auf, dass sich im Vergleich zu allen Kontrollen bei allen Patienten, bei den weibl. Patienten und auch bei den egal ob weibl. oder männl. nicht therapierten Patienten deutlich und auch signifikant erniedrigte Mittelwerte finden. Außerdem zeigt sich, dass die Interferon β -1a-Medikamente Rebif (32,67 %) und Avonex (32,97 %) bei ihren Gruppen deutlich niedrigere Mittelwerte aufweisen als die Gruppen Glatirameracetat und Natalizumab, deren Werte ja weit über dem aller Kontrollen liegen, wogegen Rebif und Avonex sogar noch unterhalb des Mittelwertes aller Patienten gelegen sind. Daraus könnte man schließen, dass die Annäherung an den Mittelwert aller Kontrollen bei Glatirameracetat und Natalizumab besser gelingt, allerdings sogar über das Ziel hinausschießt, während bei Rebif und Avonex

diese Annäherung überhaupt nicht gelingt, sondern im Gegenteil sich deren Mittelwerte sogar noch unter den aller Patienten drücken. Wenn eine solche Annäherung an den Mittelwert der Kontrollen nun das medikamentös therapeutische Ziel wäre, müsste man sagen, dass dann Glatirameracetat und Natalizumab als Therapie besser geeignet wären, zumal die Gruppe Glatirameracetat sich gegenüber allen Patienten und gegenüber den nicht therapierten Patienten signifikant absetzt und andererseits gegenüber allen Kontrollen keine signifikanten Unterschiede aufweist, sich hier also eben gerade nicht absetzt.

	<u>Signifikante Mittelwerte CD8+ in Prozent der CD3+</u>	
Patienten gesamt 34,86	< *	Kontrollen gesamt 41,32
Weibl. Patienten 32,71	< *	Weibl. Kontrollen 40,26
Weibl. Patienten 32,71	< **	Kontrollen gesamt 41,32
Nicht therapierte Patienten 32,85	< **	Kontrollen gesamt 41,32
Weibl. nicht therapierte Patienten 31,94	< **	Kontrollen gesamt 41,32
Männl. nicht therapierte Patienten 34,48	< *	Männl. therapierte Patienten 48,15
Männl. nicht therapierte Patienten 34,48	< *	Kontrollen gesamt 41,32
Glatirameracetat 47,25	> *	Nicht therapierte Patienten 32,85
Glatirameracetat 47,25	> *	Patienten gesamt 34,86
Avonex 32,97	< *	Kontrollen gesamt 41,32
Interferon β-1a gesamt 32,90	< *	Kontrollen gesamt 41,32

Keinerlei signifikante Unterschiede gibt es bei den absoluten CD4+25+ Zellzahlen.

Bei der Zellpopulation der CD69+ Zellen in Prozent der CD4+25+ Zellen hat sich kein signifikant differierender Mittelwert ergeben.

Genauso war auch bei den absoluten Zellzahlen der CD69+ Zellen keine Signifikanz zu finden.

Bei der Zellfraktion der CDDR+ Zellen in Prozent der CD4+25+ Zellen zeigen sich lediglich bei den einzelnen Therapien Signifikanzen. So ist hier die Gruppe Glatirameracetat gegenüber den Kontrollen signifikant erniedrigt. Des Weiteren ist die Zellpopulation der CDDR+ Zellen in Prozent der CD4+25+ Zellen sowohl bei der Gruppe Avonex als auch bei der Gruppe Interferon β -1a gesamt gegenüber den Kontrollen signifikant erhöht, wobei beide Gruppen auch eine deutlich signifikante Abweichung der Varianzen aufweisen. Natalizumab scheint sich hier wie Glatirameracetat zu verhalten, schafft es also, diese Zellen nach weit unterhalb der Mittelwerte aller Kontrollen und aller Patienten, die hier sehr nah beieinander liegen, stark zu vermindern. Im Gegensatz dazu sind die Mittelwerte der Gruppen Avonex und Interferon β -1a gesamt gegenüber denen aller Kontrollen und aller Patienten stark erhöht. Einzig Rebif liegt hier zwischen den Mittelwerten aller Kontrollen und aller Patienten, die sich sowieso nur minimal voneinander unterscheiden.

<u>Signifikante Mittelwerte CDDR+ in Prozent der CD4+25+</u>		
Glatirameracetat 17,62	< *	Kontrollen gesamt 26,36
Avonex 36,53	> *	Kontrollen gesamt 26,36

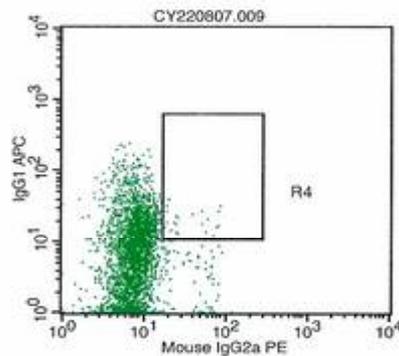
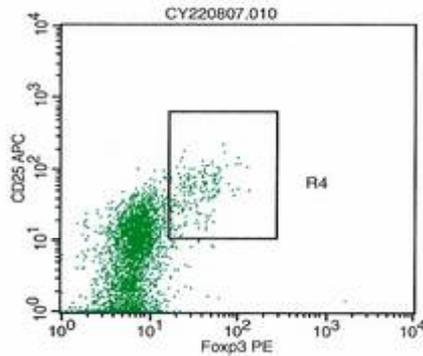
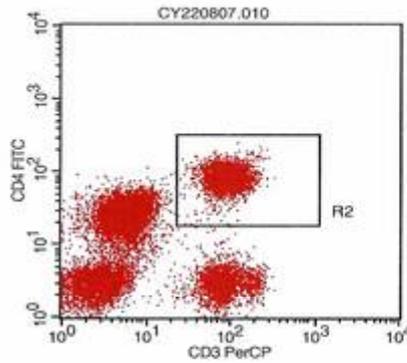
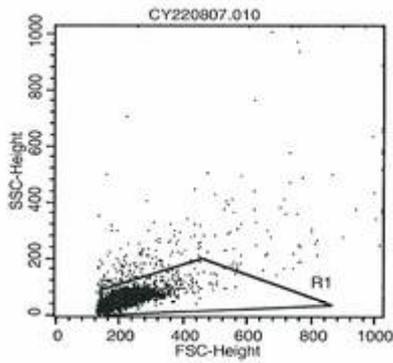
Interferon β-1a gesamt	>	Kontrollen gesamt
35,39	*	26,36

Die absoluten Zellzahlen der CDDR+ Zellen weisen keine signifikanten Differenzen auf.

Leider hat sich bei der Auswertung auch gezeigt, dass die anteiligen Zellfraktionen nicht immer zusammen 100 % ergeben, was wahrscheinlich ursächlich ist in einer unpräzisen Gatesetzung auf die Lymphozyten und damit eine Zumischung von Leukozyten bzw. Monozyten zur Folge hat. Ob und inwieweit diese Tatsache die Ergebnisse eventuell beeinflusst hat, lässt sich noch am ehesten im Vergleich mit den Ergebnissen anderer Arbeiten während der Diskussion in Kapitel 5 erörtern.

4.2 Resultate der FACS-Analyse bei intrazellulärer Färbung

Die intrazelluläre Färbung des Transkriptionsfaktors Foxp3 erfolgte immer parallel zur extrazellulären Färbung und entsprechend fand auch die Analyse am FACSCalibur immer miteinander statt. Von den unter 4.1 erstellten Zellpopulationen wurde entsprechend die absolute Zellzahl der Zellpopulation der CD3+4+ Zellen (absolute CD4+ Zellzahl der CD3+ Zellen) als die 100 % der Zellen genommen, von denen hier die absoluten Zellzahlen der Foxp3+ Zellen berechnet werden. Den Anteil der Foxp3+ Zellen in Prozent der CD3+4+ Zellen, dessen Prozentsatz auch zur Berechnung der Absolutzahlen der Foxp3+ Zellen dient, findet man dagegen auf den Analyseausdrucken des FACSCalibur. Einer dieser Analyseausdrucke ist hier beispielhaft unter Abb. 25 abgebildet, auf dem der Prozentsatz der Foxp3+ Zellen in der unteren linken Abbildung unter G4 und % Gated, hier also 5,63 %, gefunden werden kann. Die untere rechte Abbildung dient lediglich der Negativkontrolle. Man sieht außer-



Tube: tube #2
 Panel: CY Andreas
 Acquisition Date: 22-Aug-07
 Gate: G2
 Gated Events: 3483
 Total Events: 20000

Gate	Events	% Gated	% Total
G1	3483	100.00	17.41
G2	3483	100.00	17.41
G3	322	9.24	1.61
G4	196	5.63	0.98

Tube: tube #1
 Panel: CY Andreas
 Acquisition Date: 22-Aug-07
 Gate: G2
 Gated Events: 3889
 Total Events: 20000

Gate	Events	% Gated	% Total
G1	3889	100.00	19.45
G2	3889	100.00	19.45
G3	291	7.48	1.46
G4	30	0.77	0.15

Page 1

Abb. 25

dem, dass der Prozentsatz der Foxp3+ Zellen aus Gate 2 heraus, also als Anteil der CD3+4+ Zellen, bestimmt wird.

Auch hier wird darauf hingewiesen, dass die Rohdaten und bei Signifikanzen auch die statistischen Auswertungen im Anhang dieser Arbeit zu finden sind, wie es bei allen Unterpunkten des Kapitel 4 der Fall ist.

Zunächst sind alle erhobenen Mittelwerte wieder in einer Übersicht (Tab. 17) dargestellt. Anschließend werden wieder die einzelnen Gruppen betrachtet, wobei ausführ-

Mittelwerte

**Foxp3-positive Zellen
der CD3+4+**

	CD3+4+ 100%	Foxp3+ Zellen in % der CD3+4+	Absolut
Patienten gesamt (17)	678	6,73	48
Kontrollen gesamt (12)	821	4,13	33
Weibl. Patienten (12)	687	7,04	51
Weibl. Kontrollen (8)	936	3,60	34
Alle Frauen (12P,8K)	786	5,66	44
Männl. Patienten (5)	657	5,98	40
Männl. Kontrollen (4)	592	5,19	31
Alle Männer (5P,4K)	628	5,63	36
Therapierte Patienten (9)	685	7,36	53
Nicht therapierte Patienten (7)	655	6,07	41
Weibl. Therapierte Patienten (7)	673	7,54	55
Weibl. Nicht therapierte Patienten (5)	706	6,33	46
Männl. Therapierte Patienten (2)	727	6,73	49
Männl. Nicht therapierte Patienten (2)	528	5,43	29
Glatirameracetat (1)	704	6,66	47
Natalizumab (1)	750	6,80	51
Rebif (1)	756	5,71	43
Avonex (6)	659	7,85	57
Interferon β-1a gesamt (7)	673	7,54	55

Tab. 17

lich nur der Vergleich aller Patienten mit allen Kontrollen dargestellt und danach wie schon unter 4.1 nur noch bei Signifikanzen auf tabellarische und graphische Darstellungen zurückgegriffen wird.

Zu Beginn also werden alle Patienten wieder allen Kontrollen gegenübergestellt. Dabei haben die Patienten mit 6,73 % zu 4,13 % bei den Kontrollen 2,60 Prozentpunkte mehr (Tab. 18). Diese Erhöhung bei allen Patienten ist mit einem p von 0,0016 hoch signifikant. Allerdings liegt dabei auch das p für signifikant differierende Varianzen bei 0,0063, die Varianzen differieren also relativ stark. Auch sofort auszumachen ist, dass die Kontrollen mit durchschnittlich 821 absoluten CD3+4+ Zellen deutlich mehr dieser Zellen aufweisen als die Patienten mit im Schnitt 678 Zellen. Wären diese Zell-

zahlen etwa gleich, so hätten die Kontrollen noch weniger absolute Foxp3+ Zellen. Schön sind diese Unterschiede auch in den Abbildungen 26, 27 und 28 zu erkennen.

Gesamt

	CD3+4+ 100%	Foxp3+ in % der CD3+4+	Foxp3+ Absolut der CD3+4+
Patienten (17)	678	6,73	48
Kontrollen (12)	821	4,13	33

Tab. 18

CD3+4+ Zellen Gesamt Absolut

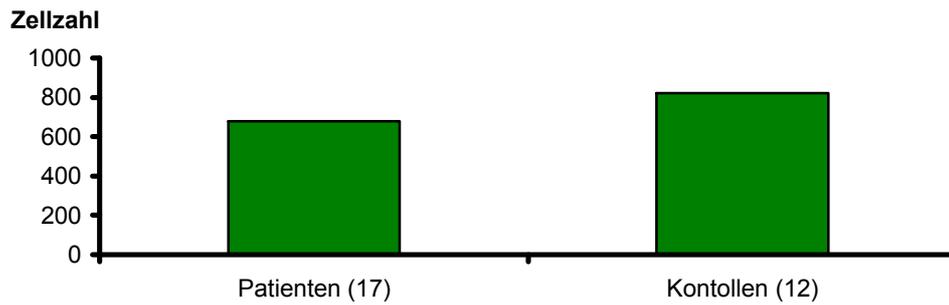


Abb. 26

Foxp3+ Zellen Gesamt in Prozent der CD3+4+

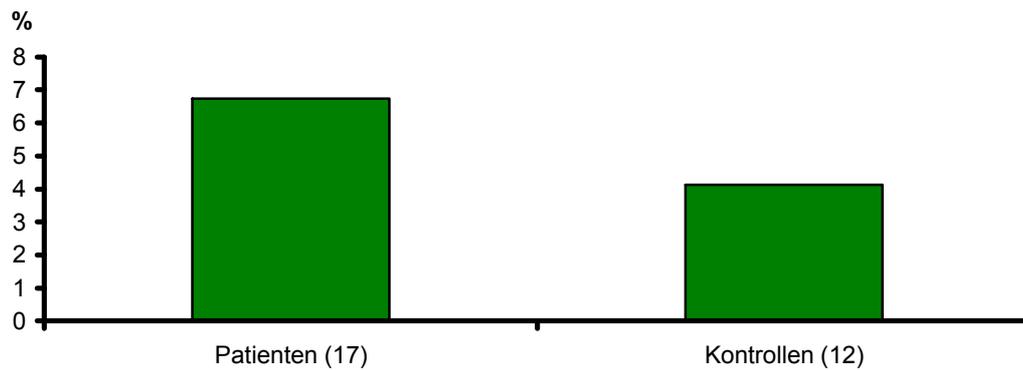


Abb. 27

Foxp3+ Zellen Gesamt Absolut der CD3+4+

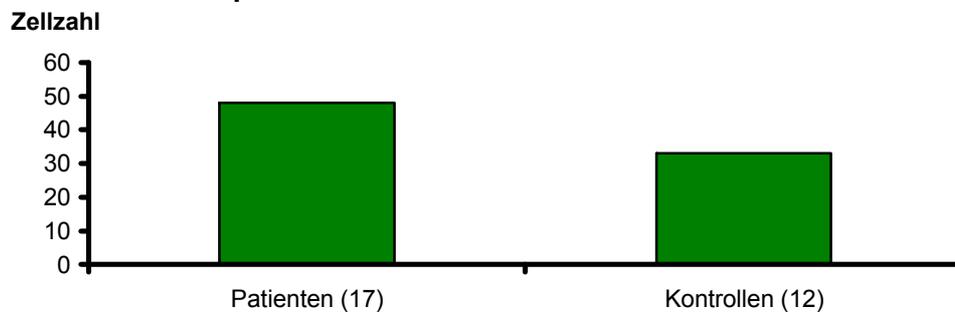


Abb. 28

Auch beim Vergleich der weibl. Patienten mit den weibl. Kontrollen zeigt sich eine Signifikanz. Wieder sind hier die Foxp3+ Zellen in Prozent der CD3+4+ Zellen bei den weibl. Patienten mit 7,04 % zu 3,60 % bei den weibl. Kontrollen (Tab. 19 und Abb. 29) um 3,44 Prozentpunkte und mit einem p von 0,0030 hoch signifikant erhöht. Der Prozentsatz ist hier bei den weibl. Patienten noch höher als bei allen Patienten zu-

<u>Frauen</u>	CD3+4+	Foxp3+ in % der CD3+4+	Foxp3+ Absolut der CD3+4+
	100%		
Weibl. Patienten (12)	687	7,04	51
Weibl. Kontrollen (8)	936	3,60	34

Tab. 19

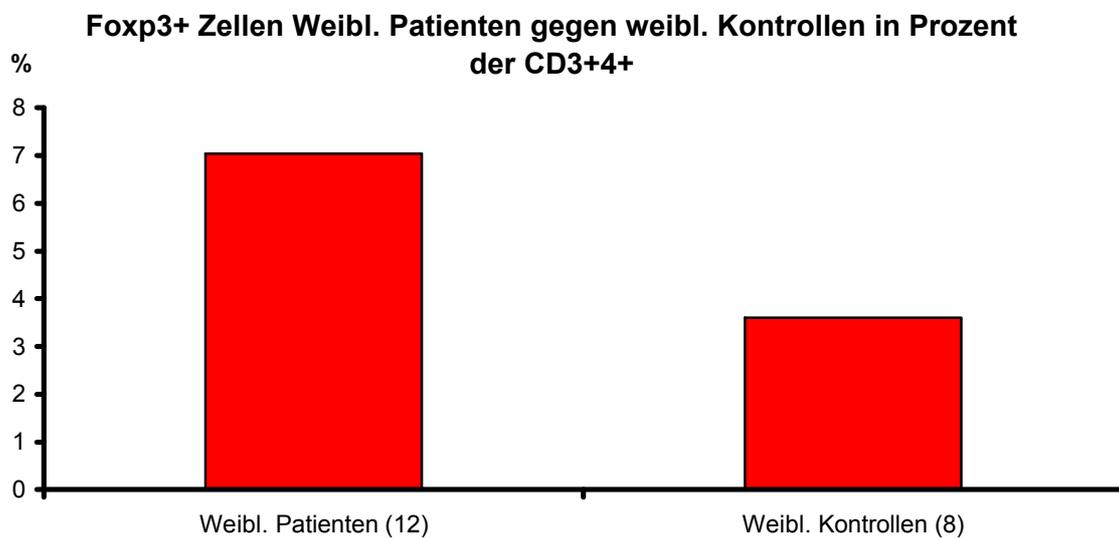


Abb. 29

sammen und bei den weibl. Kontrollen ist der Mittelwert von 3,60 % der mit Abstand niedrigste überhaupt. Erneut muss aber auch angemerkt werden, dass die Varianzen mit einem p von 0,0021 hier wieder relativ stark differieren.

Im Hinblick auf die Geschlechter konnte zwischen den männl. Patienten und den männl. Kontrollen dagegen keine Signifikanz ausgemacht werden. Deren Mittelwerte liegen mit 5,98 % zu 5,19 % aber auch relativ nah beieinander. Ebenfalls ohne Signifikanz blieb die Gegenüberstellung aller Frauen (12 Patienten und 8 Kontrollen) mit

5,66 % gegen alle Männer (5 Patienten und 4 Kontrollen) mit 5,63 %. Wie man sieht, liegen diese Mittelwerte ebenfalls sehr nah beieinander.

Wieder hoch signifikant sind die Foxp3+ Zellen in Prozent der CD3+4+ Zellen dagegen erneut bei den weibl. Patienten, diesmal im Vergleich mit allen Kontrollen, erhöht. Dabei haben die weibl. Patienten wieder 7,04 %, der Mittelwert aller Kontrollen liegt mit einer Prozentpunktedifferenz von -2,91 bei 4,13 % (Tab. 20, Abb. 30) und das p beträgt 0,0023. Auch hier sind die Varianzen mit einem p von 0,0027 deutlich different. Auch beim Vergleich der männl. Patienten gegen alle Kontrollen sind die

Weibl. Patienten gegen alle Kontrollen

	CD3+4+ 100%	Foxp3+ in % der CD3+4+	Foxp3+ Absolut der CD3+4+
Weibl. Patienten (12)	687	7,04	51
Kontrollen (12)	821	4,13	33

Tab. 20

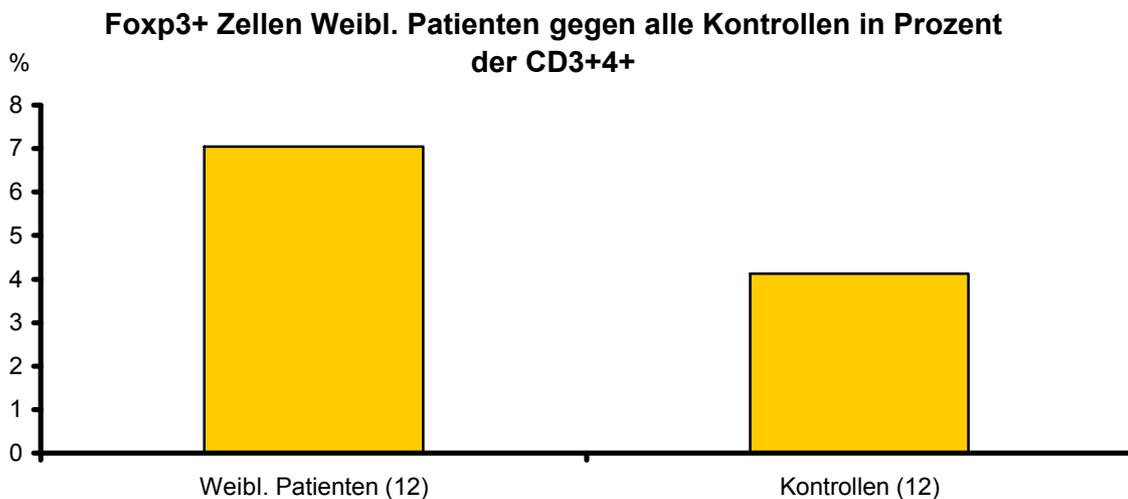


Abb. 30

Foxp3+ Zellen in Prozent der CD3+4+ Zellen bei den männl. Patienten mit 5,98 % zu 4,13 % (Tab. 21 und Abb. 31) bei allen Kontrollen mit einer Differenz von 1,85 Prozentpunkten hoch signifikant erhöht. Das p beträgt dabei 0,0054 und erfreulicherweise sind diesmal die Varianzen nicht signifikant different.

Männl. Patienten gegen alle Kontrollen

	CD3+4+ 100%	Foxp3+ in % der CD3+4+	Foxp3+ Absolut der CD3+4+
Männl. Patienten (5)	657	5,98	40
Kontrollen (12)	821	4,13	33

Tab. 21

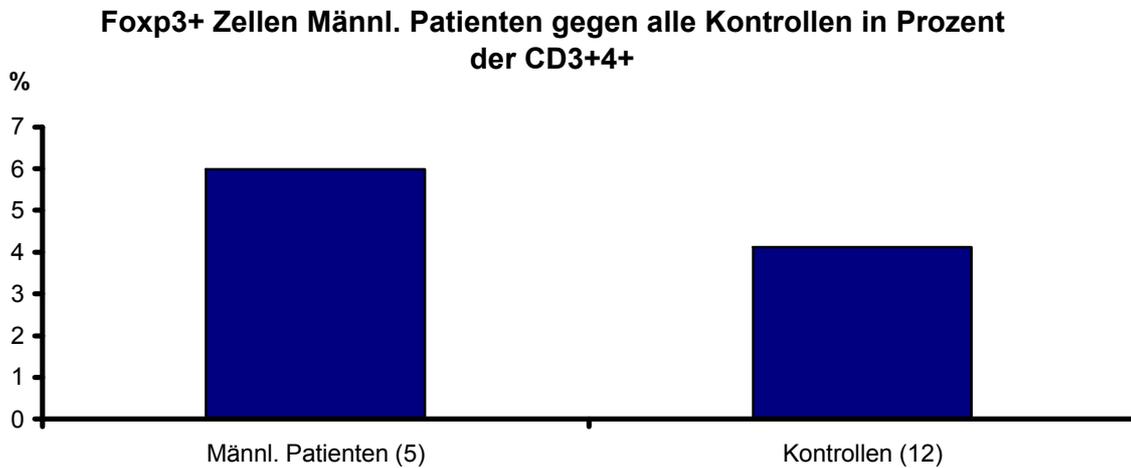


Abb. 31

Sehr interessant ist hier wie schon unter 4.1 der Vergleich zwischen den weibl. Kontrollen und den männl. Kontrollen. Dabei zeigt sich bei den weibl. Kontrollen mit 3,60 % zu 5,19 % (Tab. 22 und Abb. 32) bei den männl. Kontrollen eine Differenz von 1,59 Prozentpunkten und mit einem p von 0,0034 eine hoch signifikante Verminde-

Weibl. Kontrollen gegen männl. Kontrollen

	CD3+4+ 100%	Foxp3+ in % der CD3+4+	Foxp3+ Absolut der CD3+4+
Weibl. Kontrollen (8)	936	3,60	34
Männl. Kontrollen (4)	592	5,19	31

Tab. 22

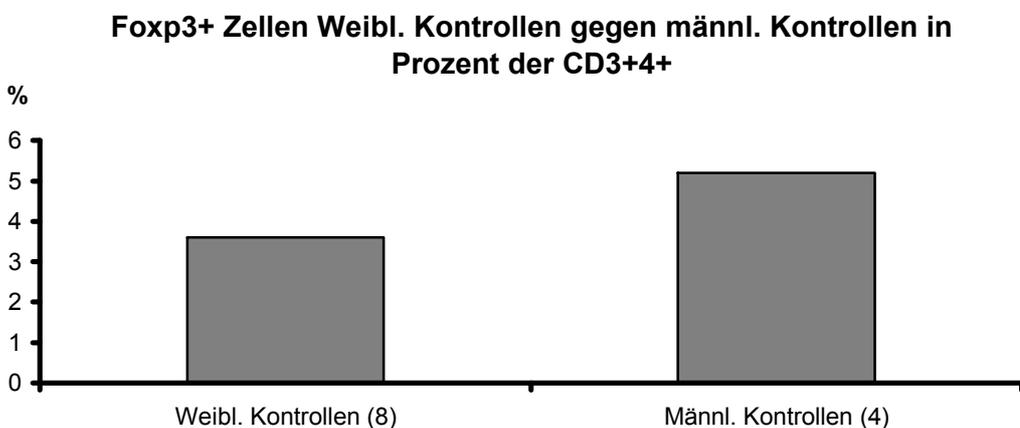


Abb. 32

zung der Foxp3+ Zellen in Prozent der CD3+4+ Zellen. Dabei sind die Varianzen nicht signifikant different. Die gesunden Frauen haben also hoch signifikant weniger der Foxp3+ Zellen in Prozent der CD3+4+ Zellen als die gesunden Männer und es stellt sich die Frage, ob die Verminderung des Mittelwertes aller Kontrollen gegenüber dem aller Patienten eventuell nur durch die weibl. Kontrollen verursacht wird.

Dies würde dadurch bestätigt werden, dass beim Vergleich der weibl. und männl. Kontrollen mit allen Patienten ein Unterschied zwischen den zwei Gruppen zu finden ist.

Tatsächlich findet sich bei der Gegenüberstellung der männl. Kontrollen mit allen Patienten keine Signifikanz, wogegen beim Vergleich der weibl. Kontrollen mit allen Patienten die Foxp3+ Zellen in Prozent der CD3+4+ Zellen bei den weibl. Kontrollen mit einem p von 0,0016 hoch signifikant vermindert sind. Dabei beträgt von 3,60 % zu 6,73 % (Tab. 23 und Abb. 34) die Prozentpunktedifferenz 3,13. Die Varianzen sind auch hier relativ stark different. Außerdem sind bei diesem Vergleich die absoluten CD3+4+ Zellzahlen bei den weibl. Kontrollen mit 936 Zellen gegenüber allen Pati-

Weibl. Kontrollen gegen alle Patienten

	CD3+4+ 100%	Foxp3+ in % der CD3+4+	Foxp3+ Absolut der CD3+4+
Weibl. Kontrollen (8)	936	3,60	34
Patienten gesamt (17)	678	6,73	48

Tab. 23

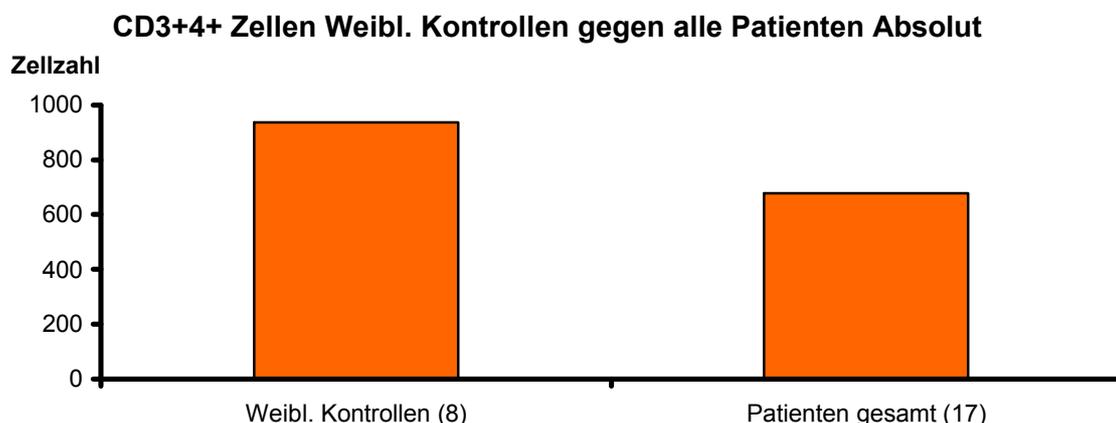


Abb. 33

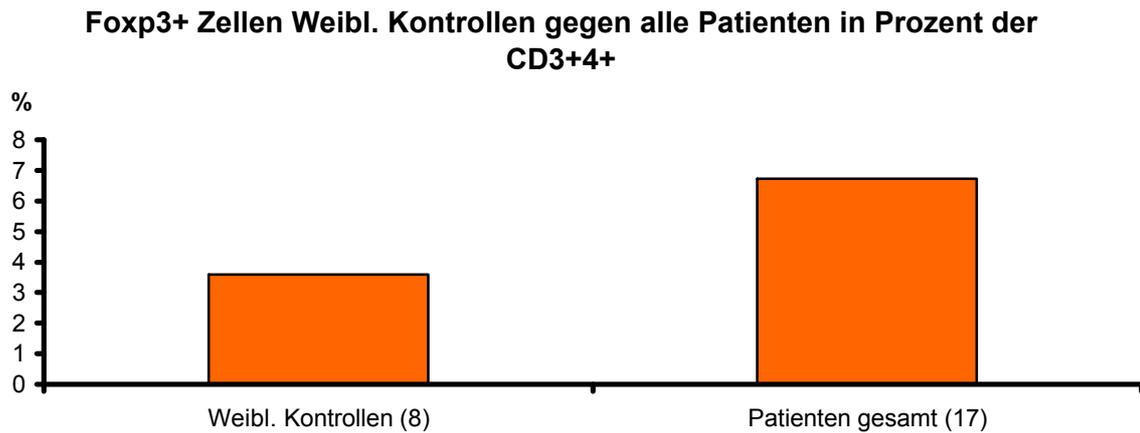


Abb. 34

enten mit 678 Zellen (Tab. 23 und Abb. 33) mit im Schnitt 258 Zellen und einem p von 0,0218 signifikant erhöht.

Beim Vergleich der weibl. Patienten mit den männl. Patienten und beim Vergleich der therapierten Patienten mit den nicht therapierten Patienten gibt es keinerlei Signifikanzen, was wiederum so gewertet wird, dass diese Gruppen sich gleich verhalten, sich also nicht voneinander absetzen können.

Zwischen den therapierten Patienten und allen Kontrollen ist die Zellpopulation der Foxp3+ Zellen in Prozent der CD3+4+ bei den therapierten Patienten mit 7,36 % zu 4,13 % (Tab. 24 und Abb. 35) bei allen Kontrollen um 3,23 Prozentpunkte und mit einem p von 0,0030 hoch signifikant erhöht. Aber erneut differieren hier die Varianzen mit einem p von 0,0013 relativ stark.

Therapierte Patienten gegen alle Kontrollen

	CD3+4+ 100%	Foxp3+ in % der CD3+4+	Foxp3+ Absolut der CD3+4+
Therapierte Patienten (9)	685	7,36	53
Kontrollen (12)	821	4,13	33

Tab. 24

Foxp3+ Zellen Therapierte Patienten gegen alle Kontrollen in Prozent der CD3+4+

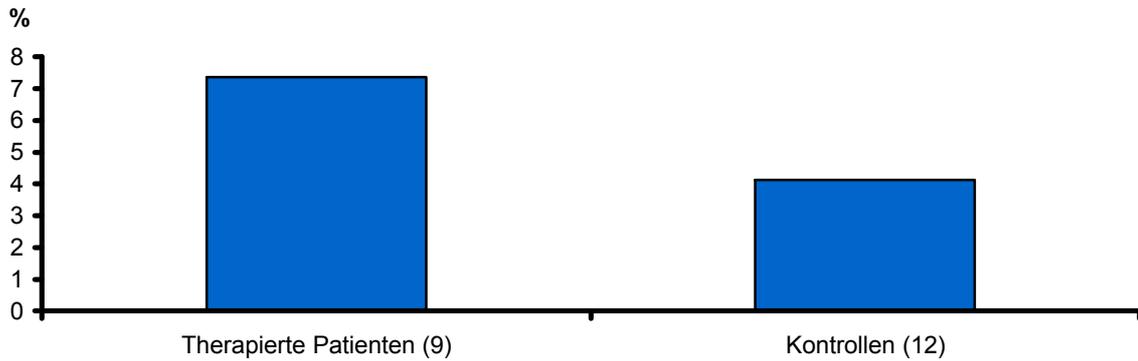


Abb. 35

Auch bei den nicht therapierten Patienten sind die Foxp3+ Zellen in Prozent der CD3+4+ gegenüber allen Kontrollen mit 6,07 % zu 4,13 % (Tab. 25 und Abb. 36) mit einer Prozentpunktedifferenz von 1,94 und einem p von 0,0013 hoch signifikant erhö-

Nicht therapierte Patienten gegen alle Kontrollen

	CD3+4+ 100%	Foxp3+ in % der CD3+4+	Foxp3+ Absolut der CD3+4+
Nicht therapierte Patienten (7)	655	6,07	41
Kontrollen (12)	821	4,13	33

Tab. 25

Foxp3+ Zellen Nicht therapierte Patienten gegen alle Kontrollen in Prozent der CD3+4+

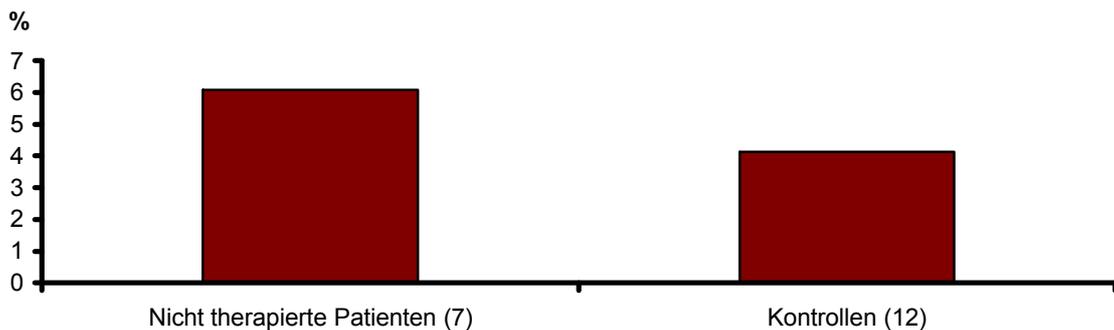


Abb. 36

ht, wobei die Varianzen hier nicht signifikant unterschiedlich sind.

Die weibl. therapierten Patienten zeigen sowohl gegenüber den weibl. nicht therapierten Patienten als auch gegenüber den männl. therapierten Patienten keine signifikanten Unterschiede.

Auch keine Signifikanz ergibt sich beim Vergleich der weibl. nicht therapierten Patienten mit den männl. nicht therapierten Patienten.

Vergleicht man nun die männl. therapierten Patienten mit den männl. nicht therapierten Patienten, so zeigt sich, dass die männl. therapierten Patienten bei den absoluten CD3+4+ Zellen mit durchschnittlich 727 Zellen zu im Schnitt 528 Zellen bei den männl. nicht therapierten Patienten um im Durchschnitt 199 Zellen signifikant mehr Zellen haben. Dabei beträgt das p genau 0,0209.

Genauso wenig wie sich eine Signifikanz bei der Gegenüberstellung der weibl. therapierten Patienten mit den therapierten Patienten finden lässt, so lässt sich auch keine Signifikanz zwischen den weibl. nicht therapierten Patienten und den nicht therapierten Patienten finden.

Allerdings weisen beide Gruppen, also die weibl. therapierten Patienten und die weibl. nicht therapierten Patienten, gegenüber allen Kontrollen eine Signifikanz bei den Foxp3+ Zellen in Prozent der CD3+4+ Zellen auf. Dabei haben die weibl. therapierten Patienten mit 7,54 % und damit dem zweithöchsten Mittelwert zu 4,13 % einen um 3,41 Prozentpunkte höher gelegenen Prozentsatz und sind mit einem p von 0,0056 hoch signifikant erhöht. Wieder aber sind hier die Varianzen relativ stark unterschiedlich. Auch bei den weibl. nicht therapierten Patienten ist mit 6,33 % zu 4,13 % der Prozentsatz um 2,20 Prozentpunkte und einem p von 0,0007 (***) diesmal sogar höchst signifikant erhöht, ohne signifikant differierende Varianzen zu bilden.

Auch bei den männl. therapierten Patienten finden sich gegenüber den therapierten Patienten und bei den männl. nicht therapierten Patienten gegenüber den nicht therapierten Patienten keinerlei signifikante Unterschiede.

Mit einem p von 0,0044 haben die männl. therapierten Patienten gegenüber allen Kontrollen bei den Foxp3+ Zellen in Prozent der CD3+4+ Zellen einen hoch signifikant höheren Prozentsatz. Bei 6,73 % zu 4,13 % haben die männl. therapierten Patienten 2,60 Prozentpunkte mehr.

Die männl. nicht therapierten Patienten geben im Vergleich mit allen Kontrollen allerdings keine Signifikanzen her.

Wendet man sich nun den einzelnen Therapien zu, so sieht man, dass die Gruppen Glatirameracetat, Natalizumab und Rebif jeweils nur aus einem Patienten bestehen, weshalb diese Gruppen auch nicht einem statistischen Test unterzogen wurden.

Bei der Gruppe Avonex dagegen konnte beim statistischen Vergleich mit der Gruppe Interferon β -1a gesamt, den therapierten Patienten, den nicht therapierten Patienten und allen Patienten zusammen keine Signifikanz ausgemacht werden. Lediglich bei der Gegenüberstellung mit allen Kontrollen waren die Foxp3+ Zellen in Prozent der CD3+4+ Zellen mit 7,85 %, dem höchsten Mittelwert, zu 4,13 % um 3,72 Prozentpunkte und einem p von 0,0049 bei der Gruppe Avonex hoch signifikant erhöht. Auch hier zeigen sich aber relativ stark differierende Varianzen.

Schließlich folgt noch die Gruppe Interferon β -1a gesamt, die gegenüber den therapierten Patienten, gegenüber den nicht therapierten Patienten und gegenüber allen Patienten zusammen keine signifikanten Unterschiede aufweist. Wahrscheinlich durch den hier von der Gruppe Avonex gebildeten Hauptanteil der Gruppe Interferon

β -1a gesamt verhält es sich auch hier so, dass bei den Foxp3+ Zellen in Prozent der CD3+4+ Zellen ein mit einem p von 0,0056 hoch signifikant höherer Prozentsatz bei der Gruppe Interferon β -1a gesamt gegenüber allen Kontrollen vorliegt. Hierbei gibt es mit 7,54 % zu 4,13 % eine Prozentpunktdifferenz von +3,41. Zu guter Letzt sind auch hier stark differierende Varianzen im Spiel.

Wie schon unter 4.1 werden auch hier nun kurz die einzelnen Zellpopulationen betrachtet. Sofern Signifikanzen vorhanden sind, folgt dann wiederum eine Übersicht der Signifikanzen der jeweiligen Zellpopulation zur besseren Anschauung.

Die absoluten CD3+4+ Zellen sind bei diesen Vergleichen lediglich zweimal mit signifikant veränderten Mittelwerten aufgefallen. So haben die weibl. Kontrollen signifikant mehr der CD3+4+ Zellen als alle Patienten und die männl. therapierten Patienten haben signifikant mehr dieser Zellen als die männl. nicht therapierten Patienten. Die weibl. Kontrollen erreichen dabei mit durchschnittlich 936 Zellen den höchsten Wert und haben damit sogar mehr als alle Kontrollen zusammen mit im Schnitt 821 Zellen, dem zweithöchsten Mittelwert. Da die männl. Kontrollen mit im Durchschnitt 592 Zellen sogar deutlich unter allen Patienten zusammen mit im Schnitt 678 Zellen liegen, ist es auch hier so, dass der Mittelwert der Kontrollen insgesamt durch die hohen Werte der weib. Kontrollen nach oben getrieben wird, auch wenn dies bisher ohne Signifikanz passiert.

		<u>Signifikante Mittelwerte CD3+4+ Zellen Absolut</u>		
Weibl. Kontrollen 936	> *		Patienten gesamt 678	
Männl. therapierte Patienten 727	> *		Männl. nicht therapierte Patienten 528	

Auch bei den Foxp3+ Zellen in Prozent der CD3+4+ Zellen zeigt sich ein deutliches Muster. Gegenüber dem Mittelwert aller Kontrollen ist nicht nur derjenige aller Patienten hoch signifikant erhöht, sondern auch die Mittelwerte der weibl. und männl. Patienten, der therapierten und nicht therapierten Patienten und die der weibl. und männl. therapierten Patienten. Der Mittelwert der weibl. nicht therapierten Patienten ist gegenüber dem aller Kontrollen sogar höchst signifikant erhöht. Die männl. nicht therapierten Patienten zeigen keinerlei Signifikanz. Besonders interessant ist, dass die männl. Kontrollen hoch signifikant erhöht sind gegenüber den weibl. Kontrollen, die mit 3,60 % auch den niedrigsten Mittelwert aufweisen. Gleichzeitig zeigen die männl. Kontrollen vor allem gegenüber allen Patienten keine Signifikanz. Daraus könnte nun wieder geschlossen werden, dass die hoch signifikante Verminderung des Mittelwertes aller Kontrollen gegenüber dem aller Patienten und gegenüber anderen nur durch die weibl. Kontrollen zustande kommt, die eben den Mittelwert aller Kontrollen so stark herunterdrücken. Stimmt das, so hätte die hoch signifikante Erhöhung des Mittelwertes aller Patienten gegenüber dem aller Kontrollen keine Bedeutung mehr und man müsste sich stattdessen fragen, warum ausgerechnet bei den weibl. Kontrollen dieser Mittelwert der Foxp3+ Zellen in Prozent der CD3+4+ Zellen so niedrig ist. Allerdings gilt auch hier wieder, dass zunächst noch mehr Patienten und Kontrollen untersucht werden müssen, um eine höhere Aussagekraft zu generieren. Außerdem zeigt sich hier, dass der Mittelwert der Gruppe Avonex und damit, bei 6:1 Patienten bei Avonex zu Rebif, auch derjenige der Gruppe Interferon β -1a gesamt gegenüber dem Mittelwert aller Kontrollen hoch signifikant erhöht ist. Dabei sind diese zwei Mittelwerte sogar noch höher als derjenige aller Patienten, sie nähern sich also nicht dem aller Kontrollen an, sondern entfernen sich sogar noch von diesem. Vielleicht wäre deshalb auch Rebif die bessere medikamentöse Alternative, da hier dessen Wert von allen anderen medikamentösen Optionen dem Mittelwert aller Kont-

rollen zumindest noch am nächsten kommt. Auch hier braucht man aber deutlich mehr Probanden. Ist außerdem die obige Folgerung richtig, so wäre der Therapieerfolg, wenn überhaupt, über die Foxp3+ Zellen nicht zu erahnen.

	<u>Signifikante Mittelwerte Foxp3+ in Prozent der CD3+4+</u>	
Patienten gesamt 6,73	> **	Kontrollen gesamt 4,13
Weibl. Patienten 7,04	> **	Weibl. Kontrollen 3,60
Weibl. Patienten 7,04	> **	Kontrollen gesamt 4,13
Männl. Patienten 5,98	> **	Kontrollen gesamt 4,13
Weibl. Kontrollen 3,60	< **	Männl. Kontrollen 5,19
Weibl. Kontrollen 3,60	< **	Patienten gesamt 6,73
Therapierte Patienten 7,36	> **	Kontrollen gesamt 4,13
Nicht therapierte Patienten 6,07	> **	Kontrollen gesamt 4,13
Weibl. therapierte Patienten 7,54	> **	Kontrollen gesamt 4,13
Weibl. nicht therapierte Patienten 6,33	> ***	Kontrollen gesamt 4,13
Männl. therapierte Patienten 6,73	> **	Kontrollen gesamt 4,13
Avonex 7,85	> **	Kontrollen gesamt 4,13
Interferon β-1a gesamt 7,54	> **	Kontrollen gesamt 4,13

4.3 Auswertung der Proliferation-Assays nach dem Sorten

Beim Proliferation-Assay wird eine ansteigende Zellzahl von 0, 2000, 4000, 10000, 20000 und 40000 CD4+25+ Zellen mit dem FACSria Zellsorter zu Responderzellen hinzusortiert und nach einer Inkubationszeit deren Reaktion darauf in Form der proliferierten Zellzahlen gemessen. Vor der Betrachtung der einzelnen Gruppen wird zunächst in Tab. 26 eine Übersicht über alle erhobenen Mittelwerte in absoluten Zahlen

Mittelwerte Absolut

	0	2000	4000	10000	20000	40000
Alle Patienten (15)	119983,77	146894,08	103383,96	58514,06	22730,79	11262,51
Alle Kontrollen (9)	79042,48	76015,59	72309,67	62808,89	29301,04	2295,07
Weibl. Patienten (8)	111200,31	118726,88	84455,43	51674,79	20420,60	2794,90
Weibl. Kontrollen (6)	79522,94	78406,78	65205,84	47361,45	18170,89	2564,56
Alle Frauen (8P,6K)	97624,30	94534,82	76205,60	49826,21	19456,44	2696,18
Männl. Patienten (7)	130022,00	203228,50	125016,57	66330,36	25371,00	22552,67
Männl. Kontrollen (3)	78081,56	71233,22	86517,33	93703,78	51561,33	1756,11
Alle Männer (7P,3K)	114439,87	124031,33	113466,80	74542,38	33228,10	15620,48
Therapierte Patienten (4)	106186,25	140579,67	91839,63	55590,63	21956,25	2488,75
Weibl. Therapierte Patienten (4)	106186,25	140579,67	91839,63	55590,63	21956,25	2488,75
Nicht therapierte Patienten (10)	114654,35	100011,75	92528,79	40825,93	21635,28	16314,69
Weibl. Nicht therapierte Patienten (4)	116214,38	53168,50	77071,23	47758,96	18884,96	3101,04
Männl. Nicht therapierte Patienten (6)	113614,33	146855,00	102833,83	36203,92	23468,83	26885,60
Glatirameracetat (2)	89997,50	100516,50	101407,00	45627,00	32472,00	3020,00
Rebif (1)	196778,00	220706,00	146647,00	112179,00	14769,00	2250,00
Betaferon (1)	47972,00		17897,50	18929,50	8112,00	1665,00

Mittelwerte Prozent

	0	2000	4000	10000	20000	40000
Alle Patienten (15)	100	118,62	88,12	45,68	21,90	10,12
Alle Kontrollen (9)	100	88,82	92,64	47,23	15,74	5,83
Weibl. Patienten (8)	100	110,08	75,16	46,23	21,97	3,36
Weibl. Kontrollen (6)	100	95,80	96,00	40,40	9,40	5,44
Alle Frauen (8P,6K)	100	101,51	84,09	43,73	16,58	4,25
Männl. Patienten (7)	100	135,70	102,93	45,06	21,83	19,13
Männl. Kontrollen (3)	100	74,86	85,94	60,89	28,42	6,61
Alle Männer (7P,3K)	100	99,19	97,84	49,81	23,81	14,96
Therapierte Patienten (4)	100	111,11	84,31	49,26	24,57	3,03
Weibl. Therapierte Patienten (4)	100	111,11	84,31	49,26	24,57	3,03
Nicht therapierte Patienten (10)	100	132,38	87,16	38,01	21,42	14,35
Weibl. Nicht therapierte Patienten (4)	100	107,00	66,02	43,20	19,37	3,68
Männl. Nicht therapierte Patienten (6)	100	157,76	101,26	34,54	22,78	22,88
Glatirameracetat (2)	100	110,58	112,70	50,29	36,94	3,76
Rebif (1)	100	112,16	74,52	57,01	7,51	1,14
Betaferon (1)	100		37,31	39,46	16,91	3,47

Tab. 26

und in Prozent dargestellt. Dabei werden als 100 % diejenigen Zahlen genommen, die von proliferierten Zellen stammen, auf die mit CD4+25+ Zellen kein Einfluss genommen wurde, die also 0 CD4+25+ Zellen erhalten haben. Außerdem wird ja bezogen auf die Fragestellung der Arbeit in der Einleitung davon ausgegangen, dass die CD4+25+ Zellen eine inhibitorische Wirkung auf die Proliferation (Viglietta et al., 2004) zeigen werden, weshalb bei einer Zugabe von 0 CD4+25+ Zellen die Proliferation der Responderzellen am stärksten zu erwarten sein sollte. Alle nach Zugabe von 2000, 4000, 10000, 20000 und 40000 CD4+25+ Zellen gemessenen proliferierten Zellzahlen werden entsprechend anteilig zu den 100 % berechnet. Von diesen erhaltenen absoluten Zahlen und berechneten Prozentzahlen der einzelnen Patienten und Kontrollen werden dann schließlich die Mittelwerte gebildet.

Beim Vergleich aller Patienten mit allen Kontrollen zeigt sich bei 2000 zugegebenen CD4+25+ Zellen in Prozent ein signifikanter Unterschied. Dabei haben die Patienten mit 118,62 % zu 88,82 % (Tab. 27 und Abb. 38) bei allen Kontrollen einen um 29,80 Prozentpunkte und mit einem p von 0,0211 signifikant erhöhten Prozentsatz. Es scheint also so zu sein, dass es bei der Zugabe einer relativ niedrigen Anzahl von CD4+25+ Zellen bei den Kontrollen auch dann noch zu einer entsprechend leichten Inhibition der Proliferation kommt, bei den Patienten jedoch kommt es bei Zugabe einer relativ geringen Anzahl an CD4+25+ Zellen nicht zu einer Inhibition, sondern zu einer Stimulation der Proliferation. Außerdem relativ stark abweichend sind die absoluten Zellzahlen zwischen den zwei Gruppen. Hier haben die Patienten bei einer Zugabe von 0 CD4+25+ Zellen mit im Durchschnitt 119983,77 Zellen deutlich mehr als die Kontrollen mit durchschnittlich 79042,48 Zellen, im Schnitt nämlich 40941,29 Zellen. Bei Zugabe von 2000 CD4+25+ Zellen vergrößert sich die Distanz sogar noch auf im Schnitt 70878,49 Zellen und bei Zugabe von 4000 CD4+25+ Zellen beträgt sie

Gesamt

Absolut

	0	2000	4000	10000	20000	40000
Patienten (15)	119983,77	146894,08	103383,96	58514,06	22730,79	11262,51
Kontrollen (9)	79042,48	76015,59	72309,67	62808,89	29301,04	2295,07

Prozent

	0	2000	4000	10000	20000	40000
Patienten (15)	100	118,62	88,12	45,68	21,90	10,12
Kontrollen (9)	100	88,82	92,64	47,23	15,74	5,83

Tab. 27

Proliferation-Assay Gesamt Absolut

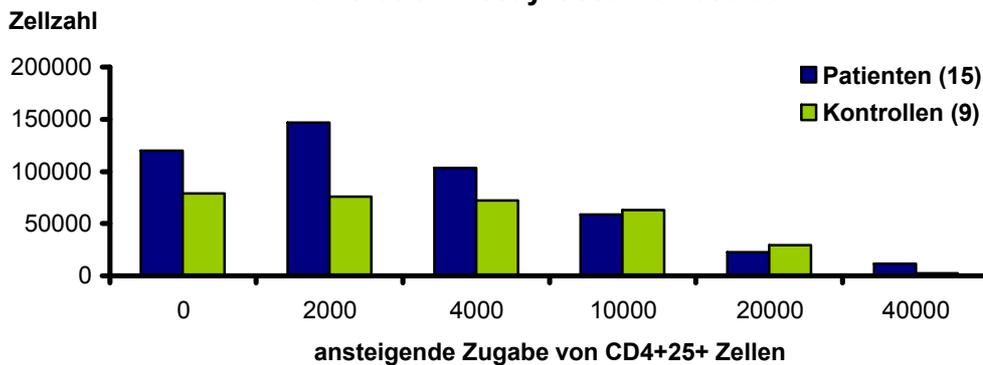


Abb. 37

Proliferation-Assay Gesamt in Prozent

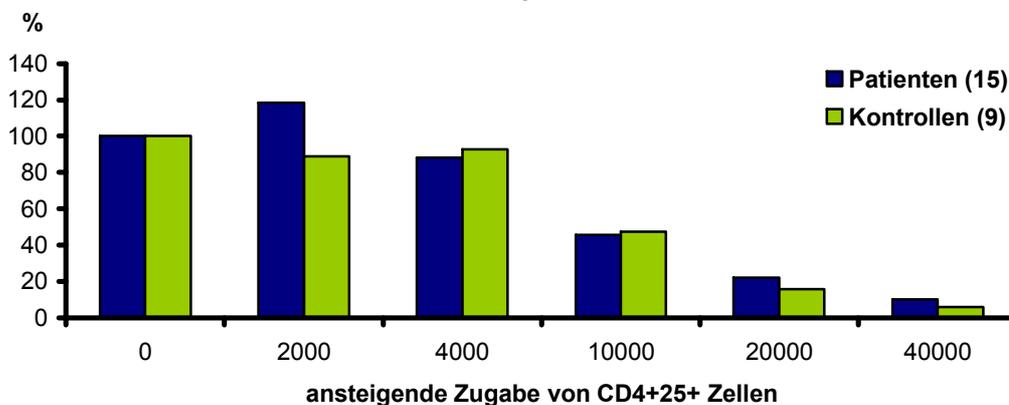


Abb. 38

immer noch durchschnittlich 31074,29 Zellen. Erst bei einer Zugabe von 10000 CD4+25+ Zellen sind die absoluten Mittelwerte fast gleichauf, wobei der der Kontrollen hier mit im Schnitt 4294,83 Zellen erstmals über dem der Patienten liegt. Dies ist mit sogar leicht gewachsenem Abstand auch noch bei 20000 CD4+25+ Zellen der Fall. Bei 40000 CD4+25+ Zellen schließlich fällt die Inhibition bei den Kontrollen mit

einer durchschnittlichen Differenz von 8967,44 Zellen zu dem Mittelwert der Patienten stärker aus, alles jedoch ohne eine Signifikanz aufzuweisen. Genauso ohne Signifikanz sind auch die restlichen prozentualen Vergleiche. Bei 4000 und 10000 CD4+25+ Zellen sind die zwei Gruppen relativ nahe beieinandergelegen, bei 20000 CD4+25+ Zellen hat der Mittelwert der Patienten mit 6,16 Prozentpunkten und bei 40000 CD4+25+ Zellen mit 4,29 Prozentpunkten jedoch einen höheren Prozentsatz als derjenige der Kontrollen. Die Responderzellen der Kontrollen werden durch hohe CD4+25+ Zellzahlen also besser bzw. stärker inhibiert als die Zellen der Patienten, ohne aber signifikant zu sein. Bei niedrigen CD4+25+ Zellzahlen dagegen werden die Zellen der Patienten signifikant zur Proliferation stimuliert. Die Zellen der Kontrollen aber lassen sich entsprechend der niedrigen CD4+25+ Zellen trotzdem leicht inhibieren.

Würde man es nun als therapeutische Option ansehen, die CD4+25+ Zellzahlen medikamentös zu erhöhen, so sollte man sich darüber im klaren sein, dass nur eine starke Erhöhung der CD4+25+ Zellen den gewünschten inhibitorischen Effekt zeigt, eine nur leichte Erhöhung der CD4+25+ Zellen dagegen würde zur Stimulation der Proliferation und damit des Immunsystems führen und könnte wahrscheinlich, wie es ja auch im Falle der MS z. B. bei einem durch eine Infektion stimulierten Immunsystem geschehen kann, einen Schub erst auslösen. Außerdem gebe ich zu bedenken, dass man einen stark erhöhten CD4+25+ Zellstatus nicht erreichen kann, ohne den Status der leicht erhöhten CD4+25+ Zellzahlen zu durchlaufen. Im Übrigen würde eine stark erhöhte CD4+25+ Zellzahl ja nicht nur die Autoreaktivität des Immunsystems unterdrücken, sondern auch jegliche andere nützliche Reaktivität des Immunsystems gegen pathogene Keime zum Schutz des Individuums.

Zu der leicht aktivierten Proliferation bzw. dem leicht aktivierten Immunsystem bei leicht erhöhtem Zellstatus der CD4+25+ Zellen passend ist zudem das Ergebnis aus

4.1, wo gezeigt werden konnte, dass die Patienten gegenüber den Kontrollen einen leicht erhöhten CD4+25+ Zellstatus aufweisen. Der Status des Immunsystems bei MS-Patienten könnte also ein dauerhaft aktivierter sein, der das Auftreten eines Schubes erleichtern oder sogar erst ermöglichen könnte. Um dieses eventuell dauerhaft aktivierte Immunsystem wieder zu „deaktivieren“ bzw. in seinen normalen Status zu überführen, sollte wie oben erläutert, nicht versucht werden den CD4+25+ Zellstatus therapeutisch medikamentös zu erhöhen, sondern im Gegenteil sollte versucht werden, den CD4+25+ Zellstatus therapeutisch medikamentös auf Normalniveau zu senken, d. h. man sollte versuchen, sich entweder dem Mittelwert aller Kontrollen oder sogar geschlechtsspezifisch dem der weibl. Kontrollen bzw. dem der männl. Kontrollen anzunähern. Dies könnte gewährleisten, dass das Immunsystem eventuell eine geringere oder sogar überhaupt keine Anfälligkeit mehr zeigt, einen Schub auszulösen und dass gegenüber pathogenen Keimen eine normale Reaktivität bzw. eine normale Funktionalität des Immunsystems aufrecht erhalten werden kann.

Keine signifikanten Unterschiede haben sich beim Vergleich der weibl. Patienten mit den weibl. Kontrollen und bei der Gegenüberstellung der männl. Patienten mit den männl. Kontrollen ergeben.

Bei der Betrachtung aller Frauen zusammen (weibl. Patienten und weibl. Kontrollen) gegenüber allen Männern zusammen (männl. Patienten und männl. Kontrollen) zeigt sich aber nach der Zugabe von 40000 CD4+25+ Zellen sowohl bei den absoluten Zellzahlen als auch in Prozent ein signifikanter Unterschied. Die Frauen zeigen dabei mit durchschnittlich 2696,18 Zellen zu im Schnitt 15620,48 Zellen bei den Männern (Tab. 28 und Abb. 39) einen mit im Durchschnitt 12924,30 Zellen und einem p von 0,0393 signifikant erniedrigten Mittelwert. Mit einem p von 0,0318 und einer Prozentpunktdifferenz von 10,71 bei 4,25 % zu 14,96 % bei den Männern (Tab. 28 und

Abb. 40) ist hier auch der Prozentsatz bei den Frauen signifikant vermindert. Es sei aber erwähnt, dass bei beiden Signifikanzen allerdings auch stark differierende Varianzen vorherrschen (siehe Anhang). Egal ob Patienten oder Kontrollen, den CD4+25+ Zellen gelingt es hier also die Responderzellen aller Frauen gegenüber de-

Alle Frauen gegen alle Männer

<u>Absolut</u>	0	2000	4000	10000	20000	40000
Frauen (8P,6K)	97624,30	94534,82	76205,60	49826,21	19456,44	2696,18
Männer (7P,3K)	114439,87	124031,33	113466,80	74542,38	33228,10	15620,48

<u>Prozent</u>	0	2000	4000	10000	20000	40000
Frauen (8P,6K)	100	101,51	84,09	43,73	16,58	4,25
Männer (7P,3K)	100	99,19	97,84	49,81	23,81	14,96

Tab. 28

Proliferation-Assay Alle Frauen gegen alle Männer Absolut

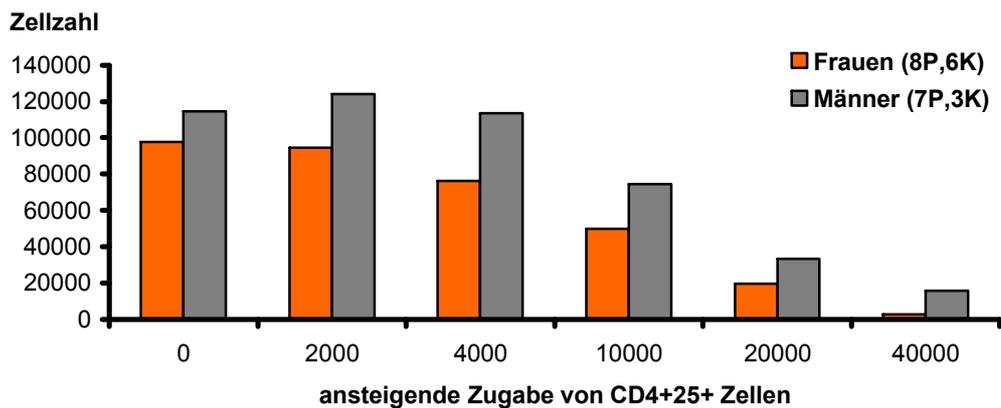


Abb. 39

Proliferation-Assay Alle Frauen gegen alle Männer in Prozent

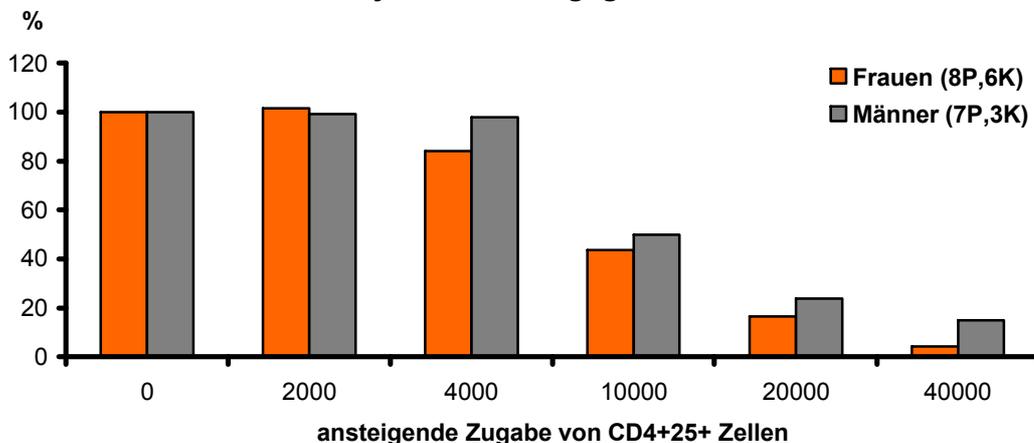


Abb. 40

nen aller Männer signifikant besser zu inhibieren. Außerdem erkennt man auf den Abbildungen sehr schön, dass es auch bei 4000, 10000 und bei 20000 CD4+25+ Zellen eine entsprechende Differenz zwischen den zwei Gruppen gibt, allerdings ohne Signifikanz. Die scheinbare Unabhängigkeit dieses Ergebnisses von Kontrollen, Patienten oder auch Unterschieden bei den Therapien ist schon sehr erstaunlich.

Die weibl. Patienten zeigen gegenüber allen Kontrollen keine signifikanten Unterschiede.

Allerdings weisen die männl. Patienten gegenüber allen Kontrollen signifikante Differenzen auf. Dabei ist bei Zugabe von 2000 CD4+25+ Zellen der Prozentsatz bei den männl. Patienten mit 135,70 % zu 88,82 % bei den Kontrollen (Tab. 29 und Abb. 42) um ganze 46,88 Prozentpunkte und mit einem p von 0,0324 signifikant erhöht. Hier zeigt sich, dass die ebenfalls signifikante Erhöhung dieser Zellzahlen nach Zugabe von 2000 CD4+25+ Zellen in Prozent bei allen Patienten gegenüber allen Kontrollen vor allem durch die männl. Patienten verursacht ist. Die weibl. Patienten liegen zwar mit 110,08 % gegenüber allen Kontrollen ebenfalls hoch, sind dabei aber nicht signifikant. Die 135,70 % sind hier übrigens nach den männl. nicht therapierten Patienten mit 157,76 % der zweithöchste Mittelwert. Dieser Mittelwert scheint also durch die Therapie heruntergedrückt zu werden, erreicht aber bei Weitem nicht den Mittelwert

Männl. Patienten gegen alle Kontrollen

<u>Absolut</u>		0	2000	4000	10000	20000	40000
Männl. Patienten (7)		130022,00	203228,50	125016,57	66330,36	25371,00	22552,67
Kontrollen (9)		79042,48	76015,59	72309,67	62808,89	29301,04	2295,07
<u>Prozent</u>		0	2000	4000	10000	20000	40000
Männl. Patienten (7)		100	135,70	102,93	45,06	21,83	19,13
Kontrollen (9)		100	88,82	92,64	47,23	15,74	5,83

Tab. 29

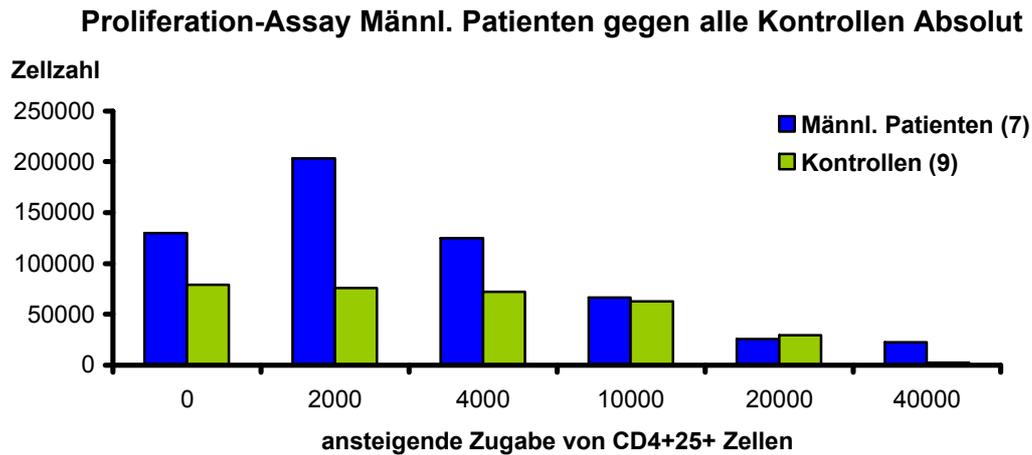


Abb. 41

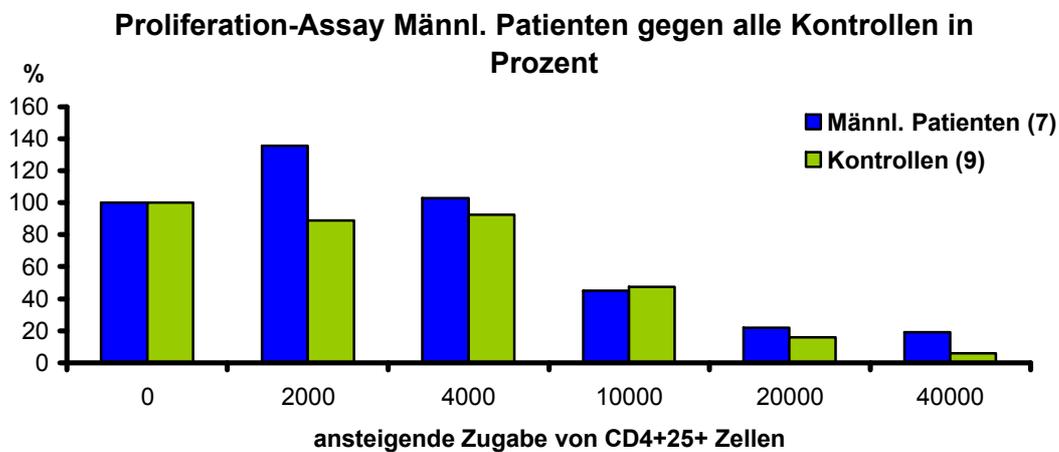


Abb. 42

der weibl. Patienten, geschweige denn den der Kontrollen. Umgekehrt kann man sagen, dass der Mittelwert bei 2000 CD4+25+ Zellen in Prozent bei den männl. Patienten ohne Therapie stark erhöht ist.

Außerdem ist bei den männl. Patienten der Mittelwert der absoluten Zellzahlen nach Zugabe von 40000 CD4+25+ Zellen mit 22552,67 Zellen zu 2295,07 Zellen bei den Kontrollen (Tab. 29 und Abb. 41) um durchschnittlich 20257,60 Zellen und mit einem p von 0,0271 signifikant erhöht, allerdings bei stark differierenden Varianzen. Auch prozentual liegen die männl. Patienten hier mit 19,13 % zu 5,83 % bei den Kontrollen um 13,30 Prozentpunkte deutlich über den Kontrollen, ohne aber signifikant zu sein. Die männl. Patienten zeigen also eine schwächere Suppression.

Beim Vergleich der weibl. Patienten mit den männl. Patienten sind bei der Zugabe von 40000 CD4+25+ Zellen sowohl absolut als auch prozentual signifikante Unterschiede vorhanden.

Absolut haben die weibl. Patienten mit im Durchschnitt 2794,90 Zellen zu durchschnittlich 22552,67 Zellen bei den männl. Patienten (Tab. 30 und Abb. 43) um im Schnitt 19757,77 Zellen und mit einem p von 0,0409 signifikant weniger Zellen. Auch prozentual haben die weibl. Patienten mit 3,36 %, was dem zweitniedrigsten Mittelwert nach dem der aus denselben Patienten bestehenden therapierten Patienten und weibl. therapierten Patienten mit 3,03 % entspricht, gegenüber den männl. Patienten mit 19,13 %, dem nach den männl. nicht therapierten Patienten mit 22,88 % zweithöchsten Mittelwert, einen um 15,77 Prozentpunkte und mit einem p

Weibl. Patienten gegen Männl. Patienten

Absolut	0	2000	4000	10000	20000	40000
Weibl. Patienten (8)	111200,31	118726,88	84455,43	51674,79	20420,60	2794,90
Männl. Patienten (7)	130022,00	203228,50	125016,57	66330,36	25371,00	22552,67

Prozent	0	2000	4000	10000	20000	40000
Weibl. Patienten (8)	100	110,08	75,16	46,23	21,97	3,36
Männl. Patienten (7)	100	135,70	102,93	45,06	21,83	19,13

Tab. 30

**Proliferation-Assay Weibl. Patienten gegen männl. Patienten
Absolut**

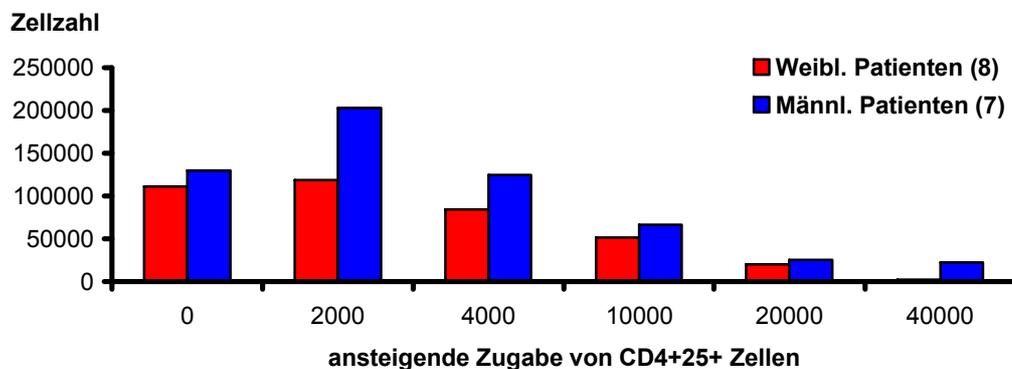


Abb. 43

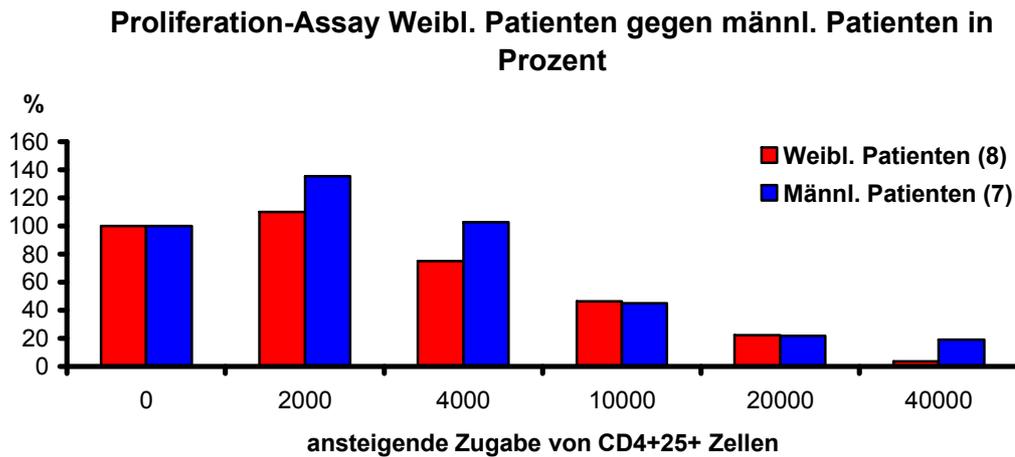


Abb. 44

von 0,0349 signifikant erniedrigten Prozentsatz (Tab. 30 und Abb. 44). Bei beiden Signifikanzen herrschen stark differierende Varianzen vor. Auffallend bei den weibl. Patienten sind außerdem die sowohl absoluten als auch prozentualen Erniedrigungen vor allem bei einer Zugabe von 2000 und 4000 CD4+25+ Zellen, die aber nicht signifikant sind.

Die weibl. Kontrollen zeigen sowohl gegenüber den männl. Kontrollen als auch gegenüber allen Patienten keinerlei Signifikanzen.

Vergleicht man dagegen die männl. Kontrollen mit allen Patienten, so haben die männl. Kontrollen bei Zugabe von 2000 CD4+25+ Zellen in Prozent mit 74,86 % zu 118,62 % bei allen Patienten (Tab. 31 und Abb. 45) einen um 43,76 Prozentpunkte und mit einem p von 0,0208 signifikant erniedrigten Prozentsatz. Besonders gut erkennt man auf der Abbildung 45 aber auch, dass umgekehrt die männl. Kontrollen bei einer Zugabe von 10000 und 20000 CD4+25+ Zellen dann einen relativ stark erhöhten Prozentsatz gegenüber dem aller Patienten zeigen, ohne dabei aber signifikant zu sein. Erst bei 40000 CD4+25+ Zellen ist der Prozentsatz bei den männl. Kontrollen wieder erniedrigt gegenüber dem aller Patienten, ohne aber signifi-

Männl. Kontrollen gegen alle Patienten

<u>Absolut</u>	0	2000	4000	10000	20000	40000
Männl. Kontrollen (3)	78081,56	71233,22	86517,33	93703,78	51561,33	1756,11
Patienten (15)	119983,77	146894,08	103383,96	58514,06	22730,79	11262,51

<u>Prozent</u>	0	2000	4000	10000	20000	40000
Männl. Kontrollen (3)	100	74,86	85,94	60,89	28,42	6,61
Patienten (15)	100	118,62	88,12	45,68	21,90	10,12

Tab. 31

Proliferation-Assay Männl. Kontrollen gegen alle Patienten in Prozent

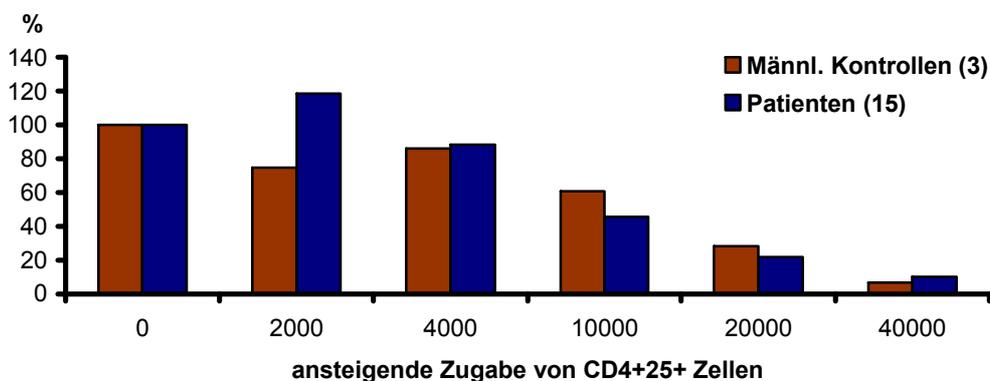


Abb. 45

kant zu sein. Bei 2000 CD4+25+ Zellen zeigt sich beim Blick auf die Abbildung 45 aber die eindeutigste Differenz zwischen diesen zwei Gruppen.

Keine Signifikanz hat die Gegenüberstellung der therapierten Patienten mit den nicht therapierten Patienten und mit allen Kontrollen ergeben.

Aber beim Vergleich der nicht therapierten Patienten mit allen Kontrollen hat sich wiederum bei der Zugabe von 2000 CD4+25+ Zellen ein signifikanter Unterschied aufgetan. Dabei haben die nicht therapierten Patienten mit 132,38 % zu 88,82 % bei allen Kontrollen (Tab. 32 und Abb. 46) einen um 43,56 Prozentpunkte und mit einem p von 0,0487 signifikant erhöhten Prozentsatz. Auch hier gibt es bei 4000, 10000,

20000 und 40000 zugegebenen CD4+25+ Zellen noch relativ große Differenzen zwischen den zwei Gruppen, die aber nicht signifikant sind. Der markanteste Unter-

Nicht therapierte Patienten gegen alle Kontrollen

Absolut

	0	2000	4000	10000	20000	40000
Nicht therapierte Patienten (10)	114654,35	100011,75	92528,79	40825,93	21635,28	16314,69
Kontrollen (9)	79042,48	76015,59	72309,67	62808,89	29301,04	2295,07

Prozent

	0	2000	4000	10000	20000	40000
Nicht therapierte Patienten (10)	100	132,38	87,16	38,01	21,42	14,35
Kontrollen (9)	100	88,82	92,64	47,23	15,74	5,83

Tab. 32

Proliferation-Assay Nicht therapierte Patienten gegen alle Kontrollen in Prozent

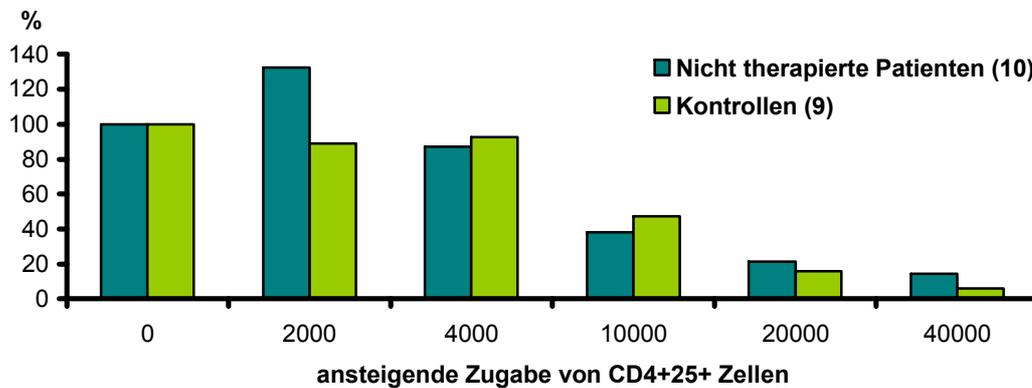


Abb. 46

schied bleibt jedoch derjenige bei 2000 zugegebenen CD4+25+ Zellen.

Genauso wie es beim Vergleich der weibl. therapierten Patienten mit den weibl. nicht therapierten Patienten keine signifikanten Unterschiede gibt, so zeigen sich auch beim Vergleich der weibl. nicht therapierten Patienten mit den männl. nicht therapierten Patienten keinerlei Signifikanzen.

Weder bei der Gegenüberstellung der weibl. nicht therapierten Patienten mit den nicht therapierten Patienten noch beim Vergleich der männl. nicht therapierten Pati-

enten mit den nicht therapierten Patienten sind signifikante Differenzen auszumachen.

Und auch beim Vergleich der Gruppe der weibl. therapierten Patienten, die ja der Gruppe der therapierten Patienten entspricht, mit allen Kontrollen findet sich genauso wenig eine Signifikanz wie beim Vergleich der weibl. nicht therapierten Patienten mit allen Kontrollen.

Stellt man allerdings die männl. nicht therapierten Patienten allen Kontrollen gegenüber, so zeigen sich nach Zugabe von 40000 CD4+25+ Zellen sowohl bei den absoluten Zellzahlen als auch in Prozent signifikante Unterschiede. Prozentual haben die männl. nicht therapierten Patienten dabei mit einem p von 0,0250 und mit 22,88 %, welches hier den höchsten Prozentsatz darstellt, zu 5,83 % bei allen Kontrollen einen um 17,05 Prozentpunkte signifikant erhöhten Prozentsatz. Die Varianzen sind dabei different. Im Mittel der absoluten Zahlen ist der Mittelwert der männl. nicht therapierten Patienten mit 26885,60 zu dem aller Kontrollen mit 2295,07 um im Durchschnitt 24590,53 Zellen und mit einem p von 0,0104 signifikant erhöht. Hierbei gibt es stark differierende Varianzen.

Es folgen nun wieder die einzelnen Medikamentengruppen.

Die Gruppe Glatirameracetat besteht aus nur zwei Patienten, wird aber trotzdem auf Signifikanzen geprüft.

Dabei finden sich beim Vergleich der Gruppe Glatirameracetat mit den therapierten Patienten, mit den nicht therapierten Patienten, mit allen Patienten und auch mit allen Kontrollen keinerlei signifikante Unterschiede.

Die Gruppen Rebif und Betaferon dagegen bestehen leider aus nur jeweils einem Patienten und werden deshalb nicht statistisch getestet.

Wie schon unter 4.1 und 4.2 geschehen, wendet sich jetzt der Blick weg vom Vergleich der einzelnen Gruppen hin zur Betrachtung der entsprechend der Zugabe von CD4+25+ Zellen in Prozent und in absoluten Zellzahlen angegebenen jeweiligen Spalten und deren Signifikanzen. Diese werden jeweils wieder auf die Betrachtung der einzelnen Spalten folgend in einer Übersicht dargestellt, sofern signifikante Unterschiede vorhanden sind.

Mit Signifikanzen aufgefallen sind lediglich die drei Spalten nach Zugabe von 2000 CD4+25+ Zellen in Prozent und nach Zugabe von 40000 CD4+25+ Zellen sowohl prozentual als auch absolut, die im Folgenden nun jeweils in der Übersicht betrachtet werden.

Nach Zugabe von 2000 CD4+25+ Zellen kommt es in Prozent zu dem einzigen signifikanten Unterschied zwischen allen Patienten und allen Kontrollen, wobei die Patienten hier einen deutlich höheren Prozentsatz aufweisen. Dies ist sehr interessant, da das Augenmerk bisher vor allem auf der Differenz der Inhibitionsfähigkeit zwischen allen Patienten und allen Kontrollen bei einer viel größeren Zugabe bzw. einer viel höheren zugegebenen Zellzahl von CD4+25+ Zellen (regulatorischen T-Zellen) lag (Jürgen Haas et al., 2005) (Vukmanovic-Stejic et al., 2006) (Wang et al., 2006) (Haas et al., 2007) (Saresella et al., 2008), zu deren Betrachtung ich nachher bei einer Zugabe von 20000 und 40000 CD4+25+ Zellen auch noch komme. Vielleicht aber sollte sich der Blick eben eher auf eine niedrige zugegebene Zellzahl von CD4+25+ Zellen richten, wie hier 2000 Zellen. Zumindest zeigt sich hier eben die einzige Signifikanz beim Vergleich zwischen allen Patienten und allen Kontrollen. Sehr gut passt dieses Ergebnis jedenfalls zum Ergebnis aus 4.1, wo gezeigt werden

konnte, dass die MS-Patienten einen leicht erhöhten Zellstatus an CD4+25+ Zellen aufweisen. Führt dieser leicht erhöhte Zellstatus der CD4+25+ Zellen aber wie hier gezeigt zu einer Stimulation der Proliferation und damit schließlich zu einer Stimulation des Immunsystems bei den MS-Patienten, so könnte man von einem dauerhaft leicht erhöhten CD4+25+ Zellstatus ausgehend daraus schließen, dass das Immunsystem bei MS-Patienten ein dauerhaft stimuliertes bzw. aktiviertes Immunsystem ist, was die Anfälligkeit für schubauslösende Faktoren bzw. die Wahrscheinlichkeit, einen Schub zu entwickeln, erhöht. Diese Konstellation könnte also das Auftreten bzw. das Auslösen eines Schubes erleichtern oder noch weiter gedacht, einen Schub überhaupt erst ermöglichen, wenn diese Konstellation die Basis bzw. die entscheidende Grundvoraussetzung für die Entstehung eines Schubes sein sollte. Diesem Verständnis folgend wäre es also als medikamentös therapeutisches Ziel sinnvoll, den leicht erhöhten CD4+25+ Zellstatus bei MS-Patienten nicht noch weiter zu erhöhen, um beispielsweise die inhibitorische Wirkung der CD4+25+ Zellen auszunutzen, sondern den CD4+25+ Zellstatus dem Mittelwert der Kontrollen anzunähern bzw. anzugleichen, den CD4+25+ Zellstatus also zu senken. Auch hier könnte man weiterdenkend überlegen, einen Zielbereich mit Unter- und Obergrenze festzulegen. Außerdem ist zu erörtern, ob sogar ein geschlechtsspezifischer Zielbereich festgelegt werden kann. Wäre es möglich, den CD4+25+ Zellstatus zu normalisieren, so würde sich eventuell die Schubfrequenz senken oder vielleicht würden sogar überhaupt keine Schübe mehr auftreten. Zumindest aber wäre eine normale Funktionalität des Immunsystems gegenüber pathogenen Keimen, also der Schutz des Individuums vor Infektionen, gewährleistet.

Weiter zeigt sich bei der Zugabe von 2000 CD4+25+ Zellen in Prozent aber auch noch eine interessante geschlechterspezifische Differenz. So weisen die männl. Patienten gegenüber allen Kontrollen einen signifikant erhöhten Prozentsatz auf. Gleich-

zeitig zeigt sich aber gegenüber den weibl. Patienten keine Signifikanz. Die weibl. Patienten zeigen auch gegenüber allen Kontrollen keine signifikanten Unterschiede, was beides die Signifikanz der männl. Patienten gegenüber allen Kontrollen stärkt. Auch weisen die männl. Kontrollen gegenüber allen Patienten einen signifikant erniedrigten Prozentsatz auf. Die männl. Patienten, die hier nach den männl. nicht therapierten Patienten (157,76 %) den zweithöchsten Mittelwert bilden, zeigen aber bei dieser geringen Probandenzahl leider noch keine Signifikanz gegenüber den männl. Kontrollen, die hier nach allen Kontrollen den niedrigsten Mittelwert zeigen. Trotzdem lässt sich hier dann, auch mit dem nochmals gestiegenen Mittelwert bei den männl. nicht therapierten Patienten, eine deutliche Geschlechterspezifität ausmachen. Auch der signifikant erhöhte Prozentsatz der nicht therapierten Patienten gegenüber allen Kontrollen wird vor allem durch den nochmals erhöhten Mittelwert der männl. nicht therapierten Patienten getragen. Insgesamt kann man also sagen, dass die Responderzellen der männl. Kontrollen sich mit nur 2000 CD4+25+ Zellen am stärksten inhibieren lassen, wogegen die Responderzellen der männl. Patienten sich durch diese 2000 CD4+25+ Zellen am zweitstärksten stimulieren lassen und sich nur die Responderzellen der männl. Patienten ohne Therapie noch stärker stimulieren lassen. Hier scheint die Therapie zumindest bei den männl. Patienten also durchaus zu greifen, da schon ein therapiertes Patient in der Lage ist, den Mittelwert der männl. Patienten drastisch zu senken. Dieser eine Patient ist hier nicht weiter in die Bewertungen miteingegangen, da er sich zum Zeitpunkt der Blutentnahme in einem engen zeitlichen Fenster zwischen zweierlei Therapien befand, bei dieser Interpretation aber trotzdem als ein therapiertes Patient gewertet werden kann. Im Gegensatz dazu zeigen die weibl. therapierten Patienten (111,11 %) gegenüber den weibl. nicht therapierten Patienten (107,00 %) keine Annäherung an den Mittelwert aller Kontrollen, sondern sogar eine leichte weitere Entfernung von diesem. Hier scheinen die Thera-

pien also nicht zu greifen. Natürlich sollte dies alles mit einer höheren Probandenzahl nochmals bestätigt werden.

<u>Signifikante</u> <u>Mittelwerte</u> <u>bei 2000</u> <u>CD4+25+</u> <u>Zellen</u> <u>Prozent</u>		
Patienten gesamt 118,62	> *	Kontrollen gesamt 88,82
Männl. Patienten 135,70	> *	Kontrollen gesamt 88,82
Männl. Kontrollen 74,86	< *	Patienten gesamt 118,62
Nicht therapierte Patienten 132,38	> *	Kontrollen gesamt 88,82

Auch bei der Zugabe von 40000 CD4+25+ Zellen ergeben sich in Prozent Geschlechterspezifitäten.

Dabei werden bei allen Frauen (weibl. Patienten und weibl. Kontrollen) im Vergleich zu allen Männern (männl. Patienten und männl. Kontrollen) die Responderzellen mit 40000 zugegebenen CD4+25+ Zellen bei ihrer Proliferation signifikant stärker inhibiert, so dass deren Prozentsatz gegenüber dem aller Männer deutlich erniedrigt ist. Genauso ist dieser Prozentsatz auch bei den weibl. Patienten gegenüber den männl. Patienten signifikant vermindert, auch hier werden die Responderzellen der weibl. Patienten bei der Proliferation also stärker inhibiert. Umgekehrt zeigt sich dann bei den männl. nicht therapierten Patienten ein signifikant höherer Prozentsatz gegenüber allen Kontrollen, die Responderzellen der männl. nicht therapierten Patienten werden also bei der Proliferation signifikant weniger gehemmt als bei allen Kontrollen. Insgesamt lassen sich die Responderzellen also sowohl bei allen Frauen als auch nur bei den weibl. Patienten signifikant besser bei der Proliferation hemmen.

Die Responderzellen der männl. nicht therapierten Patienten lassen sich dagegen signifikant schwächer inhibieren als diejenigen aller Kontrollen. Dies spiegelt insofern das Bild bei Zugabe von 2000 CD4+25+ Zellen wieder, als dass sich dort die Responderzellen bei den männl. Patienten stärker in ihrer Proliferation stimulieren lassen als bei den weibl. Patienten. Außerdem findet sich dort bei den männl. nicht therapierten Patienten auch die stärkste Proliferation. Das soll heißen, dass es nachvollziehbar ist, wenn die Responderzellen, die durch 2000 zugegebene CD4+25+ Zellen stärker stimuliert wurden und damit dort einen höheren Prozentsatz aufweisen, sich dann bei 40000 zugegebenen CD4+25+ Zellen eben auch minder stark inhibieren lassen und auch hier einen höheren Prozentsatz haben bzw. auf einem höheren Prozentniveau bleiben. Es herrscht also eine Differenz zwischen den Geschlechtern vor.

<u>Signifikante Mittelwerte bei 40000 CD4+25+ Zellen Prozent</u>		
Alle Frauen 4,25	< *	Alle Männer 14,96
Weibl. Patienten 3,36	< *	Männl. Patienten 19,13
Männ. nicht therapierte Patienten 22,88	> *	Kontrollen gesamt 5,83

Entsprechend der prozentualen Unterschiede zeigen sich hier auch die absoluten Zellzahlen bei 40000 zugegebenen CD4+25+ Zellen mit ihren Signifikanzen übereinstimmend. Hier kommt allerdings noch eine Signifikanz hinzu, bei der die männl. Patienten durchschnittlich signifikant mehr Zellen aufweisen als alle Kontrollen. Auch dies passt in das hier beschriebene Bild der Geschlechterspezifität.

		<u>Signifikante Mittelwerte bei 40000 CD4+25+ Zellen Absolut</u>		
Alle Frauen 2696,18	< *		Alle Männer 15620,48	
Männl. Patienten 22552,67	> *		Kontrollen gesamt 2295,07	
Weibl. Patienten 2794,90	< *		Männl. Patienten 22552,67	
Männ. nicht therapierte Patienten 26885,60	> *		Kontrollen gesamt 2295,07	

4.4 Ergebnis der Elispot-Analyse 1. Teil

Beim Elispot geht es darum, dass eine spezifische Aminosäuresequenz einer körpereigenen oder körperfremden Struktur bzw. eines Moleküls (Pathogens), also einem Antigen, durch die Zelle über eine vom MHC II- bzw. beim Menschen HLA II-Komplex präsentierte entgegengesetzte Aminosäuresequenz spezifisch erkannt werden soll und dadurch eine Reaktion der Zelle in Form einer intrazellulären Signaltransduktion bis hin zur Sekretion von Cytokinen provoziert bzw. stimuliert wird. Diese sezernierten Cytokine können dann im Elispot wiederum über eine am Antikörper gebundene Farbe spezifisch nachgewiesen werden. Dabei wird der Boden der 96-well-Platte mit farbungebundenen Antikörpern gegen das Cytokin benetzt. Das Cytokin wird also zwischen diesen zwei spezifisch gegen das Cytokin gerichteten Antikörpern festgehalten, von unten her mit dem farbungebundenen und von oben her mit dem farbungebundenen Antikörper, und gleichzeitig farbig markiert. So werden schließlich am Boden der Löcher der 96-well-Platte (96-Loch-Platte) farbige Punkte, sogenannte Spots, gebildet (Abb. 47), die cytokinsezernierenden Zellen entsprechen. Da dasselbe Antigen immer gleichzeitig in drei Löchern getestet wird, werden diese cytokin-

sezernierenden Zellen dann jeweils aus diesen drei Löchern mithilfe des Elispot-Analysegerät transtec 1300 gezählt und der Mittelwert gebildet. Bei dem in dieser Arbeit nachgewiesenen Cytokin handelt es sich um Interferon- γ .

Kurz soll auch noch erläutert werden, warum das Ergebnis des Elispot in drei Teile aufgeteilt wird.

Im Verlauf der Elispot-Laboruntersuchungen hat sich bei immer gleicher Vorgehensweise leider ein Bruch in der Qualität der nach der Entwicklung erhaltenen Spots aufgetan. Und zwar in der Weise, dass bis zu einem im Verlauf der Elispot-Laboruntersuchungen leider relativ frühen Zeitpunkt die erhaltenen Spots der gesamten 96-well-Platte in einer sehr guten (normalen) Qualität (Abb. 47) waren, bis es dann eben ab diesem Zeitpunkt zu einer Verschlechterung dieser Qualität gekommen ist. Leider konnte die Ursache für diese Verschlechterung nicht gefunden werden, so dass diese bis zum Ende der Elispot-Laboruntersuchungen angehalten hat. Der 1. Teil der Ergebnisse der Elispot-Analyse bezieht sich folglich auf den Zeitraum vom Anfang der Elispot-Laboruntersuchungen bis zum Zeitpunkt des Bruches in der Qualität und der 2. Teil entspricht dem Zeitraum ab diesem Bruch bis zum Ende der Elispot-Laboruntersuchungen. Der Vollständigkeit halber werden dann unter 4.6 die Daten des gesamten Zeitraums der Elispot-Laboruntersuchungen betrachtet, also der 1. Teil (4.4) und der 2. Teil (4.5) zusammen.

Außerdem ist die Entscheidung über die Unterteilung der Elispot-Analyse bzw. des Zeitraums der Elispot-Laboruntersuchungen nicht alleine mit einer Qualitätsverschlechterung begründet. Sondern vielmehr auch damit, dass sich nämlich gezeigt hat, dass das Wetter bzw. das Klima der Jahreszeiten anscheinend den Status der Krankheit der MS und entsprechend auch die Ergebnisse von Laboruntersuchungen beeinflussen kann (Stuttgarter Nachrichten, 2010, S. 28). So ist nicht auszuschließen, dass z. B. der besonders deutliche Unterschied des Ergebnisses des Elispot

bezüglich des Antigens MOG ref. im 1. Teil (4.4) verglichen mit dem des 2. Teils (4.5) des Zeitraums der Elispot-Laboruntersuchungen darin begründet sein könnte, zumal bei der labor- und versuchstechnischen Fehleranalyse keine Fehler zu entdecken waren. Dies könnte also eventuell sogar überhaupt die Ursache für die Verschlechterung sein.



Abb. 47 a

Abb. 47 b



Abb. 47 c

Abb. 47 d

Abb. 47:

Diese 4 Bilder stammen alle von der ersten Kontrolle vom 07.03.07. Dabei ist jeweils eines von drei mit demselben Antigen behandelten Löchern der 96-Loch-Platte dargestellt. Auf Abb. 47 a ist ein Bild zu erkennen, das den Boden eines der drei Löcher zeigt, die kein Antigen erhalten hatten (Negativkontrolle). Auf Abb. 47 b dagegen ist ein Bild nach Verwendung von PHA (Positivkontrolle) als Antigen abgebildet. Abb. 47 c zeigt eines der drei Ergebnisse nach Behandlung mit dem Antigen CEF (Peptide-Pool). Das Bild von Abb. 47 d zeigt den Lochboden nach Verwendung des rHuMOG ref. (zurückgefaltet) als Antigen.

Beispielhaft sind in Abb. 47 vier Bilder nach Entwicklung einer Elispot-96-Loch-Platte aus dem oben beschriebenen Zeitraum des 1. Teils der Elispot-Laboruntersuchungen dargestellt.

Beim Vergleich aller Patienten mit allen Kontrollen zeigt sich eine Signifikanz, die beim Blick auf Abb. 48 sofort heraussticht. Hierbei handelt es sich um eine Differenz von durchschnittlich 202,38 Spots bei im Durchschnitt 61,09 Spots bei allen Patienten zu im Schnitt 263,47 Spots bei allen Kontrollen (Tab. 33 und Abb. 48). Dieser Unterschied ist mit einem p von 0,0006 sogar höchst signifikant. Außer dieser deutlichen Signifikanz zeigt sich leider kein weiterer signifikanter Unterschied mehr. Nichtsdestotrotz gibt es aber durchaus noch relevante Differenzen. So haben die Pa-

1. Teil Elispot

	0 Ag	MOG PBS	MOG Acetat	MOG ref.	CEF	Hexon (ADV)	Glas (ADV)
Patienten (4)	1,92	17,83	54,67	61,09	130,75	55,67	19,50
Kontrollen (5)	4,73	38,60	56,07	263,47	101,40	36,93	33,20
					PP65 (CMV)	EBNA-1 (EBV)	PHA
Patienten (4)					185,67	49,00	293,92
Kontrollen (5)					119,60	13,67	272,80

Tab. 33

1. Teil Elispot Alle Patienten gegen alle Kontrollen

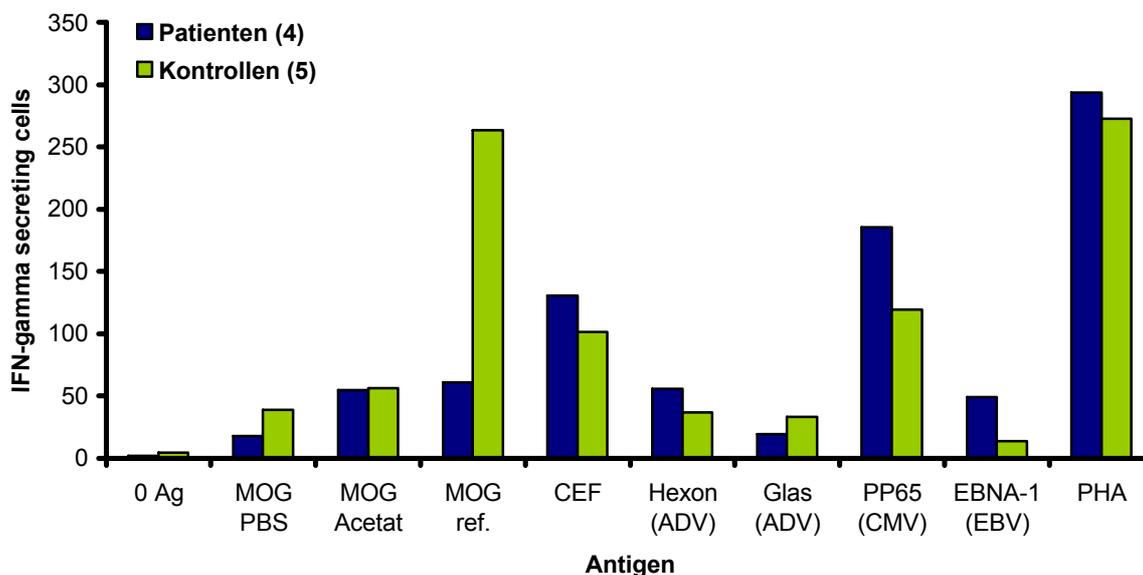


Abb. 48

tienten gegenüber den Kontrollen im Durchschnitt bei MOG PBS -20,77 Spots, bei CEF +29,35 Spots, bei Hexon +18,74 Spots, bei Glas -13,70 Spots, bei pp65 +66,07 Spots und bei EBNA-1 +35,33 Spots. Lediglich bei MOG Acetat liegen die Patienten und die Kontrollen fast gleichauf. Unbedingt noch angemerkt werden sollte, dass bis zu diesem Zeitpunkt die Patienten nur weibl. Patienten und die Kontrollen nur weibl. Kontrollen waren (siehe Anhang). Dieses Ergebnis entspricht damit exakt auch dem Ergebnis des Vergleiches der weibl. Patienten mit den weibl. Kontrollen und könnte folglich nicht nur auf einen höchst signifikanten Unterschied zwischen allen Patienten und allen Kontrollen, sondern außerdem noch auf eine Geschlechterdifferenz hindeuten.

<u>Signifikante Mittelwerte</u>		
<u>rHuMOG ref.</u>		
Patienten gesamt 61,09	< ***	Kontrollen gesamt 263,47
Dies entspricht gleichzeitig:		
Weibl. Patienten 61,09	< ***	Weibl. Kontrollen 263,47

4.5 Ergebnis der Elispot-Analyse 2. Teil

Hier geht es nun also um den Zeitraum der Elispot-Laboruntersuchungen ab dem Qualitätseinbruch bis hin zum Ende der Elispot-Laboruntersuchungen. Wieder wird zu Beginn in Tab. 34 eine Übersicht aller erhobenen Mittelwerte dargestellt.

Mittelwerte Elispot 2. Teil

	0 Ag	MOG PBS	MOG Acetat	MOG ref.	New MOG ref.	CEF
Alle Patienten (20)	3,47	36,48	40,43	41,27	17,49	66,87
Alle Kontrollen (18)	2,78	24,82	28,50	14,32	14,39	39,15
Weibl. Patienten (11)	3,97	22,15	26,21	28,91	22,22	58,06
Weibl. Kontrollen (11)	3,42	20,55	22,12	9,82	12,90	47,88
Alle Frauen (11P,11K)	3,70	21,35	24,17	19,36	16,40	52,97
Männl. Patienten (9)	2,85	54,00	57,82	56,37	13,43	77,63
Männl. Kontrollen (7)	1,76	31,52	38,52	21,38	19,33	25,43
Alle Männer (9P,7K)	2,37	44,17	49,38	41,06	15,20	54,79
Therapierte Patienten (11)	4,00	28,30	40,82	18,33	19,88	73,97
Nicht therapierte Patienten (7)	2,05	52,43	43,24	87,24	9,89	47,05
Weibl. therapierte Patienten (7)	3,67	25,10	31,24	21,29	23,67	60,43
Weibl. Nicht therapierte Patienten (2)	3,50	8,34	6,34	78,00		10,67
Männl. therapierte Patienten (4)	4,58	33,92	57,59	13,17	16,09	97,67
Männl. Nicht therapierte Patienten (5)	1,47	70,07	58,00	90,93	9,89	61,60
Glatirameracetat (2)	2,84	7,50	5,67	50,00		100,00
Natalizumab (2)	4,00	91,67	148,83	28,00	53,50	35,84
Rebif (3)	3,00	25,67	37,45	9,45	6,33	101,67
Avonex (1)	3,33	6,00	4,00	2,67	3,33	84,00
Interferon β -1a gesamt (4)	3,08	20,75	29,09	7,75	5,58	97,25
Interferon β -1b (3)	6,00	10,00	7,89	4,89	14,84	51,00
Interferon β gesamt (7)	4,33	16,14	20,00	6,53	8,67	77,43
Patienten im Schub (2)	5,50	25,67	28,50	6,50	19,34	97,17
		Hexon (ADV)	Glas (ADV)	PP65 (CMV)	EBNA-1 (EBV)	PHA
Alle Patienten (20)		53,83	33,50	81,28	10,00	353,95
Alle Kontrollen (18)		61,21	42,12	90,75	9,33	336,02
Weibl. Patienten (11)		52,67	29,97	40,58	11,70	377,79
Weibl. Kontrollen (11)		74,04	54,59	119,22	13,75	323,45
Alle Frauen (11P,11K)		62,28	41,05	75,97	12,33	350,62
Männl. Patienten (9)		55,26	37,81	131,04	7,81	324,82
Männl. Kontrollen (7)		44,71	26,09	54,14	6,39	355,76
Alle Männer (9P,7K)		50,65	32,69	97,40	7,15	338,36
Therapierte Patienten (11)		52,64	37,91	77,67	9,71	362,94
Nicht therapierte Patienten (7)		46,10	14,38	105,57	8,09	321,10
Weibl. therapierte Patienten (7)		47,38	24,76	52,53	11,60	373,10
Weibl. Nicht therapierte Patienten (2)		36,34	2,00	23,17	6,00	352,50
Männl. therapierte Patienten (4)		61,83	60,92	121,67	5,00	345,17
Männl. Nicht therapierte Patienten (5)		50,00	19,33	138,53	8,93	308,53
Glatirameracetat (2)		12,84	9,84	79,00	15,00	353,84
Natalizumab (2)		85,50	78,84	113,67	4,67	328,50
Rebif (3)		71,67	33,00	131,00		374,22
Avonex (1)		25,67	28,67	8,00		364,00
Interferon β -1a gesamt (4)		60,17	31,92	100,25		371,67
Interferon β -1b (3)		47,22	37,34	22,67	9,56	380,33
Interferon β gesamt (7)		54,62	34,24	67,00	9,56	375,38
Patienten im Schub (2)		87,50	76,17	16,17	17,67	419,50

Tab. 34

Beim Vergleich aller Patienten mit allen Kontrollen zeigt sich trotz so manchem Unterschied (Tab. 35 und Abb. 49) keine Signifikanz. So ergeben sich bei den Patienten gegenüber den Kontrollen bei MOG PBS +11,66 Spots, bei MOG Acetat +11,93 Spots, bei MOG ref. +26,95 Spots, bei New MOG ref. (neues Batch) +3,10

Gesamt

	0 Ag	MOG PBS	MOG Acetat	MOG ref.	New MOG ref.	CEF	Hexon (ADV)	Glas (ADV)	PP65 (CMV)	EBNA-1 (EBV)	PHA
Patienten (20)	3,47	36,48	40,43	41,27	17,49	66,87	53,83	33,50	81,28	10,00	353,95
Kontrollen (18)	2,78	24,82	28,50	14,32	14,39	39,15	61,21	42,12	90,75	9,33	336,02

Tab. 35

2. Teil Elispot Alle Patienten gegen alle Kontrollen

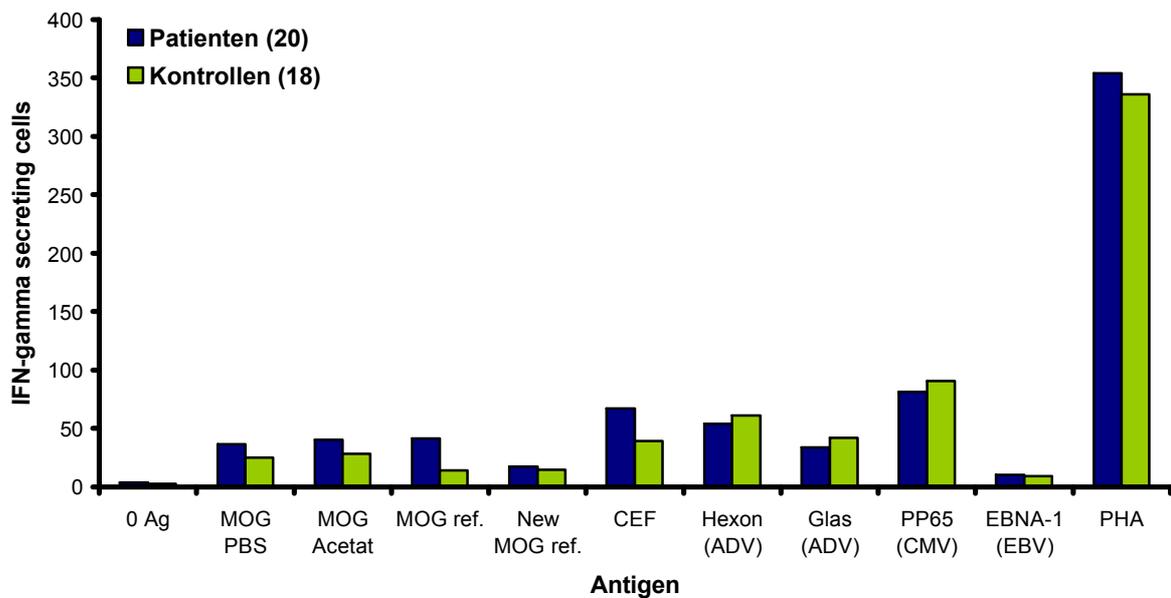


Abb. 49

Spots, bei CEF +27,72 Spots, bei Hexon (ADV) -7,38 Spots, bei Glas (ADV) -8,62 Spots, bei pp65 (CMV) -9,47 Spots und bei EBNA-1 (EBV) nur +0,67 Spots als Differenz. Dabei liegen die zwei größten Abstände bei CEF und MOG ref., die aber wie auch die anderen trotzdem nicht signifikant sind.

Ebenfalls keine signifikanten Differenzen haben sich bei der Gegenüberstellung der weibl. Patienten mit den weibl. Kontrollen und der männl. Patienten mit den männl. Kontrollen gezeigt.

Auch keine signifikant differierenden Werte lassen sich beim Vergleich aller Frauen (weibl. Patienten und weibl. Kontrollen) mit allen Männern (männl. Patienten und männl. Kontrollen) finden.

Erneut zeigen sich sowohl bei der Gegenüberstellung der weibl. Patienten mit allen Kontrollen als auch bei der Gegenüberstellung der männl. Patienten mit allen Kontrollen keine Signifikanzen.

Allerdings findet sich dann bei pp65 (CMV) bei den weibl. Patienten mit 40,58 Spots gegenüber den männl. Patienten mit 131,04 Spots (Tab. 36 und Abb. 50) eine um

Weibl. Patienten gegen Männl. Patienten

	0 Ag	MOG PBS	MOG Acetat	MOG ref.	New MOG ref.	CEF	Hexon (ADV)	Glas (ADV)	PP65 (CMV)	EBNA-1 (EBV)	PHA
Weibl. Patienten (11)	3,97	22,15	26,21	28,91	22,22	58,06	52,67	29,97	40,58	11,70	377,79
Männl. Patienten (9)	2,85	54,00	57,82	56,37	13,43	77,63	55,26	37,81	131,04	7,81	324,82

Tab. 36

2. Teil Elispot Weibl. Patienten gegen männl. Patienten

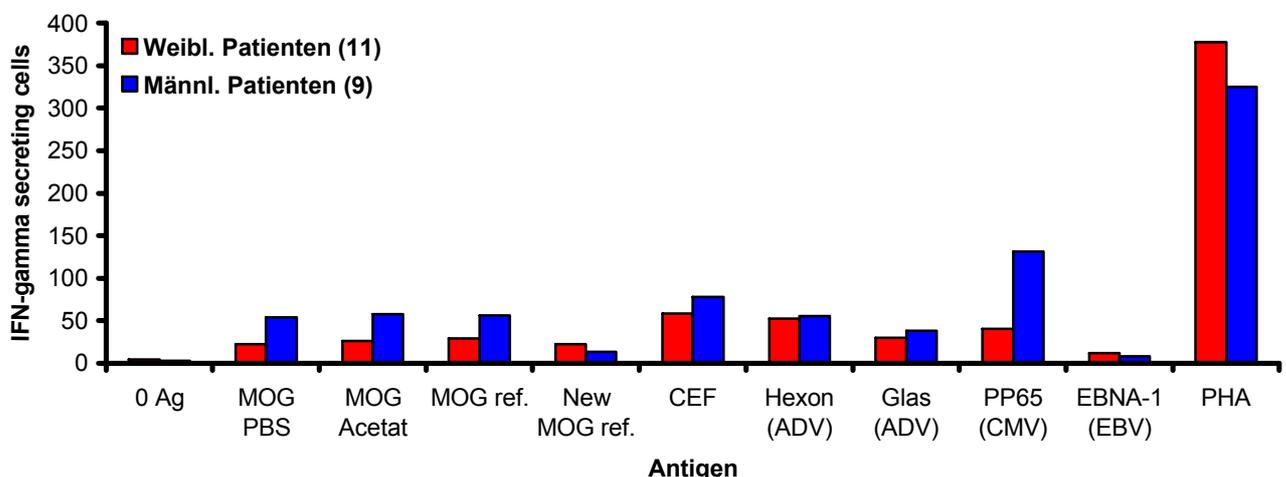


Abb. 50

durchschnittlich 90,46 Spots und mit einem p von 0,0197 signifikante Erniedrigung. Dabei differieren aber auch die Varianzen. Schöne Unterschiede gibt es auch noch bei MOG PBS, MOG Acetat, MOG ref., CEF und Glas (ADV), wobei die männl. Patienten genauso wie bei pp65 (CMV) immer mehr Spots aufweisen als die weibl. Patienten, ohne aber dass dies signifikant wäre.

Weder zeigen dann beim Vergleich unter den Kontrollen die weibl. Kontrollen gegenüber den männl. Kontrollen irgendeine Signifikanz, noch zeigen diese zwei Gruppen im Vergleich mit allen Patienten Signifikanzen.

Die therapierten Patienten zeigen gegenüber den nicht therapierten Patienten und gegenüber allen Kontrollen keine signifikanten Unterschiede.

Die nicht therapierten Patienten jedoch weisen beim Vergleich mit allen Kontrollen eine Signifikanz auf. Hierbei haben die nicht therapierten Patienten mit 87,24 Spots zu 14,32 Spots bei allen Kontrollen (Tab. 37 und Abb. 51) um im Durchschnitt 72,92 Spots und mit einem p von 0,0226 signifikant mehr Spots. Auch hier sind die Varianzen sogar stark differierend. Wieder gibt es auch hier noch andere zum Teil relativ große Abstände zwischen den zwei Gruppen, die aber nicht signifikant sind. Das Fehlen einer Therapie führt hier also zu einem signifikanten Unterschied, bei welchem die nicht therapierten Patienten mehr IFN- γ sezernieren.

Nicht therapierte Patienten gegen alle Kontrollen

	0 Ag	MOG PBS	MOG Acetat	MOG ref.	New MOG ref.	CEF	Hexon (ADV)
Nicht therapierte Patienten (7)	2,05	52,43	43,24	87,24	9,89	47,05	46,10
Kontrollen (18)	2,78	24,82	28,50	14,32	14,39	39,15	61,21
		Glas (ADV)	PP65 (CMV)	EBNA-1 (EBV)	PHA		
Nicht therapierte Patienten (7)		14,38	105,57	8,09	321,10		
Kontrollen (18)		42,12	90,75	9,33	336,02		

Tab. 37

2. Teil Elispot Nicht therapierte Patienten gegen alle Kontrollen

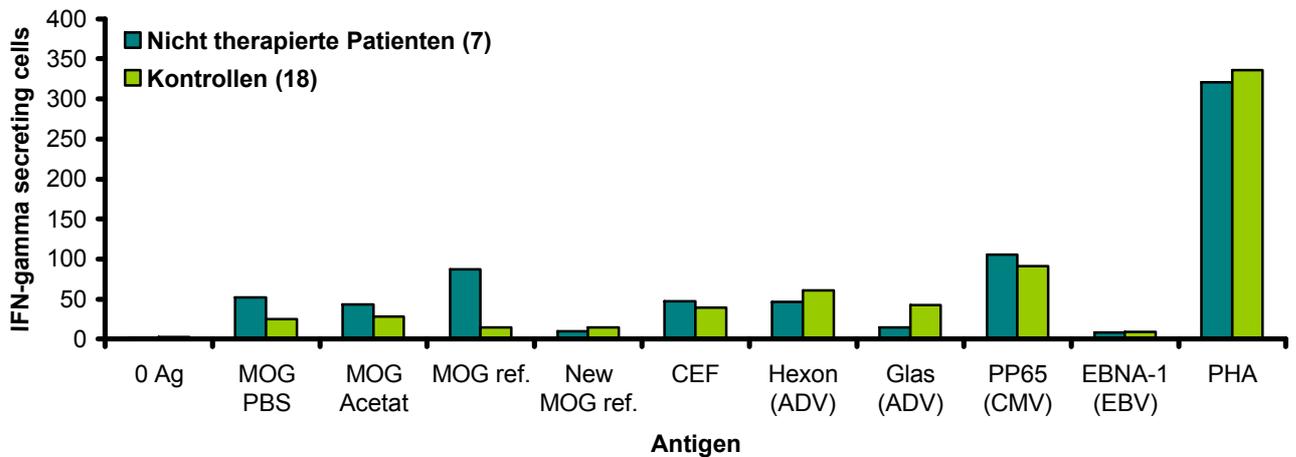


Abb. 51

Bei den weibl. therapierten Patienten zeigt sich exakt wie auch bei den männl. therapierten Patienten im direkten Vergleich miteinander und beim Vergleich der weibl. therapierten Patienten mit den weibl. nicht therapierten Patienten, den männl. therapierten Patienten mit den männl. nicht therapierten Patienten und bei den weibl. bzw. männl. therapierten Patienten gegenüber den therapierten Patienten und gegenüber allen Kontrollen kein signifikanter Unterschied.

Genauso zeigen auch die weibl. nicht therapierten Patienten und die männl. nicht therapierten Patienten im direkten Vergleich miteinander und jeweils im Vergleich mit den nicht therapierten Patienten keine Signifikanzen. Allerdings weisen beide Gruppen gegenüber allen Kontrollen signifikante Differenzen auf.

Dabei haben die weibl. nicht therapierten Patienten bei MOG ref. mit 78,00 Spots zu 14,32 Spots bei den Kontrollen einen um im Schnitt 63,68 Spots und mit einem p von 0,0157 signifikant erhöhten Mittelwert. Stark differierend sind dabei die Varianzen.

Die männl. nicht therapierten Patienten zeigen zunächst bei MOG PBS mit 70,07 Spots zu 24,82 Spots bei den Kontrollen einen um im Durchschnitt 45,25 Spots und mit einem p von 0,0337 signifikant erhöhten Mittelwert. Und auch bei MOG ref. ist der Mittelwert der männl. nicht therapierten Patienten mit 90,93 Spots gegenüber dem

der Kontrollen mit 14,32 Spots um durchschnittlich 76,61 Spots und mit einem p von 0,0320 signifikant erhöht. Bei beiden Signifikanzen sind die Varianzen jedoch stark different.

Bevor nun die einzelnen nach medikamentösen Therapien aufgeteilten Gruppen betrachtet werden, wird die Gruppe der Patienten im Schub beurteilt.

Kurz sei zu dieser Gruppe der zum Zeitpunkt der Blutentnahme im Schub befindlichen Patienten gesagt, dass diese Gruppe hier unabhängig von einer Langzeittherapie und einer Akuttherapie gebildet wurde. Die Gruppe besteht hier sowieso nur aus zwei Patienten, die beide Rebif als Langzeittherapie erhielten. Mit einer größeren im Schub befindlichen Patientenzahl wäre aber dann natürlich auch noch eine weitere Einteilung in zum Schub zusätzliche Kriterien wie eben der Langzeittherapie, der Akuttherapie und sogar deren Dosierungen möglich.

Hier zeigt diese Gruppe der im Schub befindlichen Patienten gegenüber der Gruppe Glatirameracetat, der Gruppe Rebif, der Gruppe Interferon β -1a gesamt, der Gruppe Interferon β -1b, der Gruppe Interferon β gesamt, den therapierten Patienten, den nicht therapierten Patienten, gegenüber allen Patienten und schließlich gegenüber allen Kontrollen keinerlei signifikante Unterschiede. Lediglich im Vergleich dieser Gruppe mit der Gruppe Natalizumab ergeben sich Signifikanzen. Hierbei hat diese Gruppe bei MOG PBS mit 25,67 Spots zu 91,67 Spots einen um im Durchschnitt 66,00 Spots und mit einem p von 0,0497 signifikant erniedrigten Mittelwert. Noch deutlicher ist der Abstand bei MOG Acetat, wo der Mittelwert mit 28,50 Spots zu 148,83 Spots bei der Gruppe Natalizumab um im Schnitt 120,33 Spots und mit einem p von 0,0177 signifikant vermindert ist. Obwohl der Abstand bei MOG ref. geringer geworden ist, so herrscht hier doch eine mit einem p von 0,0074 hoch signifikante Erniedrigung des Mittelwertes der im Schub befindlichen Patienten vor. Dabei liegt

mit 6,50 Spots zu 28,00 Spots bei der Gruppe Natalizumab eine Differenz von durchschnittlich -21,50 Spots vor. Hier herrschen außerdem bei allen drei Signifikanzen keine differierenden Varianzen vor.

Die Gruppe Glatirameracetat hat bei MOG PBS mit 7,50 Spots zu 91,67 Spots bei der Gruppe Natalizumab einen um im Durchschnitt 84,17 Spots und mit einem p von 0,0040 hoch signifikant erniedrigten Mittelwert. Die Varianzen sind hier differierend. Noch signifikanter, also mit einem p von 0,0002 höchst signifikant, ist der Mittelwert der Gruppe Glatirameracetat bei MOG Acetat mit 5,67 Spots zu 148,83 Spots bei der Gruppe Natalizumab um durchschnittlich 143,16 Spots vermindert. Des Weiteren zeigt die Gruppe Glatirameracetat gegenüber der Gruppe Rebif, der Gruppe Interferon β -1a gesamt, der Gruppe Interferon β -1b, der Gruppe Interferon β gesamt, den therapierten Patienten, den nicht therapierten Patienten, gegenüber allen Patienten und auch gegenüber allen Kontrollen keine signifikanten Unterschiede.

Die Gruppe Natalizumab weist gegenüber der Gruppe Rebif gleich vier signifikante Differenzen auf. Dabei ist bei MOG PBS der Mittelwert mit 91,67 Spots gegenüber 25,67 Spots bei Rebif um im Schnitt 66,00 Spots und mit einem p von 0,0171 signifikant erhöht. Auch der Mittelwert bei MOG Acetat ist mit 148,83 Spots zu 37,45 Spots bei Rebif um durchschnittlich 111,38 Spots und einem p von 0,0034 hoch signifikant erhöht. Mit einem p von 0,0069 ist auch bei MOG ref. der Mittelwert von Natalizumab mit 28,00 Spots zu 9,45 Spots bei der Gruppe Rebif um im Durchschnitt 18,55 Spots hoch signifikant erhöht. Zu guter Letzt ist noch der Mittelwert bei dem neuen Batch von MOG ref., dem New MOG ref., bei Natalizumab mit 53,50 Spots zu 6,33 Spots bei dem der Gruppe Rebif um im Schnitt 47,17 Spots und mit einem p von 0,0037 hoch signifikant erhöht.

Und auch beim Vergleich der Gruppe Natalizumab mit der Gruppe Interferon β -1a gesamt ergeben sich dieselben vier Signifikanzen bei MOG PBS, MOG Acetat, MOG ref. und New MOG ref.. Bei MOG PBS ist der Mittelwert von Natalizumab mit 91,67 Spots zu 20,75 Spots bei Interferon β -1a gesamt um im Schnitt 70,92 Spots und mit einem p von 0,0062 hoch signifikant erhöht. Auch bei MOG Acetat ist der Mittelwert bei Natalizumab mit 148,83 Spots zu 29,09 Spots um durchschnittlich 119,74 Spots und mit einem p von 0,0019 ebenfalls hoch signifikant erhöht. Der Mittelwert bei Natalizumab ist auch bei MOG ref. mit 28,00 Spots zu 7,75 Spots um im Durchschnitt 20,25 Spots und einem p von 0,0041 hoch signifikant erhöht. Zuletzt ist auch noch bei New MOG ref. der Mittelwert von Natalizumab mit 53,50 Spots zu 5,58 Spots um im Schnitt 47,92 Spots und mit einem p von 0,0006 sogar höchst signifikant erhöht.

Auch beim Vergleich der Gruppe Natalizumab mit der Gruppe Interferon β -1b zeigen sich insgesamt vier Signifikanzen. Der Mittelwert von MOG PBS ist bei der Gruppe Natalizumab mit 91,67 Spots zu 10,00 Spots um im Schnitt 81,67 Spots und mit einem p von 0,0030 hoch signifikant erhöht. Der Mittelwert von MOG Acetat ist bei der Gruppe Natalizumab mit 148,83 Spots zu 7,89 Spots bei der Gruppe Interferon β -1b um im Durchschnitt 140,94 Spots und mit einem p von $< 0,0001$ sogar höchst signifikant erhöht. Bei der Gruppe Natalizumab ist zudem der Mittelwert von MOG ref. mit 28,00 Spots zu 4,89 Spots um durchschnittlich 23,11 Spots und einem p von 0,0080 hoch signifikant erhöht. Zuletzt ist bei diesem Vergleich der Mittelwert von Natalizumab bei pp65 (CMV) mit 113,67 Spots zu 22,67 Spots bei der Gruppe Interferon β -1b um im Schnitt 91,00 Spots und mit einem p von 0,0361 signifikant erhöht.

Vergleicht man weiter die Gruppe Natalizumab mit der Gruppe Interferon β gesamt, die aus den zwei zusammengeführten Gruppen Interferon β -1a gesamt und Interferon β -1b besteht, so ergeben sich gleich drei höchst signifikante Unterschiede und ein hoch signifikanter Unterschied. Betroffen sind dabei erneut MOG PBS, MOG Acetat,

MOG ref. und New MOG ref.. Bei MOG PBS ist der Mittelwert der Gruppe Natalizumab mit 91,67 Spots zu 16,14 Spots bei Interferon β gesamt um im Schnitt 75,53 Spots und mit einem p von 0,0003 höchst signifikant erhöht. Der Mittelwert von Natalizumab bei MOG Acetat ist mit 148,83 Spots zu 20,00 Spots um durchschnittlich 128,83 Spots und einem p von $< 0,0001$ ebenfalls höchst signifikant erhöht. Der mit einem p von 0,0003 nächste höchst signifikant erhöhte Mittelwert ist der von Natalizumab bei MOG ref., der um im Durchschnitt 21,47 Spots bei 28,00 Spots zu 6,53 Spots höher liegt. Außerdem ist der Mittelwert von Natalizumab bei New MOG ref. mit 53,50 Spots zu 8,67 Spots bei der Gruppe Interferon β gesamt um durchschnittlich 44,83 Spots und mit einem p von 0,0010 hoch signifikant erhöht.

Auch gegenüber den therapierten Patienten zeigt die Gruppe Natalizumab zwei signifikante Unterschiede. Bei MOG PBS hat die Gruppe Natalizumab mit 91,67 Spots zu 28,30 Spots einen bei den therapierten Patienten um im Durchschnitt 63,37 Spots und mit einem p von 0,0265 signifikant erhöhten Mittelwert. Die zweite Signifikanz liegt bei MOG Acetat, bei dem die Gruppe Natalizumab mit 148,83 Spots zu 40,82 Spots um durchschnittlich 108,01 Spots und mit einem p von 0,0229 einen ebenfalls signifikant höheren Mittelwert hat.

Die Gruppe Natalizumab besitzt im Vergleich zu den nicht therapierten Patienten bei MOG Acetat mit 148,83 Spots zu 43,24 Spots einen um im Schnitt 105,59 Spots und mit einem p von 0,0395 signifikant erhöhten Mittelwert. Und auch bei New MOG ref. findet sich bei der Gruppe Natalizumab mit 53,50 Spots zu 9,89 Spots bei den nicht therapierten Patienten ein um durchschnittlich 43,61 Spots und mit einem p von 0,0014 sogar hoch signifikant erhöhter Mittelwert.

Dieselben zwei Signifikanzen zeigen sich auch beim Vergleich der Gruppe Natalizumab mit allen Patienten. Bei MOG Acetat hat die Gruppe Natalizumab dabei mit 148,83 Spots zu 40,43 Spots bei allen Patienten einen um im Durchschnitt 108,40

Spots und mit einem p von 0,0090 hoch signifikant erhöhten Mittelwert. Und bei New MOG ref. ist der Mittelwert der Gruppe Natalizumab mit 53,50 Spots zu 17,49 Spots um im Schnitt 36,01 Spots und mit einem p von 0,0210 signifikant erhöht.

Zuletzt zeigt die Gruppe Natalizumab im Vergleich mit allen Kontrollen dreimal eine höchst signifikante Differenz. Bei MOG PBS ist der Mittelwert der Gruppe Natalizumab mit 91,67 Spots zu 24,82 Spots bei allen Kontrollen um durchschnittlich 66,85 Spots und mit einem p von 0,0007 höchst signifikant erhöht. Bei MOG Acetat ist das p sogar noch kleiner mit $< 0,0001$. Hier ist der Mittelwert der Gruppe Natalizumab mit 148,83 Spots zu 28,50 Spots um im Schnitt 120,33 Spots höchst signifikant erhöht. Ebenfalls höchst signifikant erhöht mit einem p von 0,0002 ist dann schließlich noch der Mittelwert der Gruppe Natalizumab bei New MOG ref. mit 53,50 Spots zu 14,39 Spots bei allen Kontrollen mit einer Differenz von durchschnittlich 39,11 Spots.

Bei der Betrachtung der Gruppe Natalizumab hat sich also gezeigt, dass diese sehr auffallend mit dem höchsten Mittelwert bei MOG PBS, MOG Acetat und New MOG ref. bei den Vergleichen sehr oft signifikant, zum Teil sogar höchst signifikant, sind. Dies sollte natürlich auch wieder anhand einer größeren Patientenzahl bestätigt werden, da hier die Gruppe Natalizumab aus nur zwei Patienten besteht.

Die Gruppe Rebif zeigt keinerlei Signifikanz gegenüber der Gruppe Interferon β -1a gesamt, der Gruppe Interferon β gesamt, den therapierten Patienten, den nicht therapierten Patienten, gegenüber allen Patienten und auch gegenüber allen Kontrollen. Gegenüber der Gruppe Interferon β -1b allerdings ist bei der Gruppe Rebif der Mittelwert von MOG Acetat mit 37,45 Spots zu 7,89 Spots um durchschnittlich 29,56 Spots und mit einem p von 0,0463 signifikant erhöht.

Die Gruppe Interferon β -1a gesamt weist gegenüber der Gruppe Interferon β -1b, der Gruppe Interferon β gesamt, den therapierten Patienten, den nicht therapierten Pati-

enten, gegenüber allen Patienten und gegenüber allen Kontrollen keine signifikanten Unterschiede auf.

Und auch die Gruppe Interferon β -1b zeigt im Vergleich mit der Gruppe Interferon β gesamt, den therapierten Patienten, den nicht therapierten Patienten, allen Patienten und mit allen Kontrollen keine Signifikanzen.

Abschließend zeigt auch die Gruppe Interferon β gesamt keinerlei signifikante Unterschiede gegenüber den therapierten Patienten, den nicht therapierten Patienten, allen Patienten und gegenüber allen Kontrollen.

Im Folgenden sollen nun wieder die einzelnen Spalten, hier also die einzelnen verschiedenen Antigene, und deren Signifikanzen betrachtet werden.

Zunächst wird der Blick auf MOG PBS gerichtet. Hier haben die männl. nicht therapierten Patienten signifikant stärker auf das Antigen MOG in PBS reagiert als alle Kontrollen. Weiter ist die Reaktivität bei mit Natalizumab therapierten Patienten auf das Antigen MOG in PBS (nicht löslich) sehr stark, da hier der höchste Mittelwert erreicht wird. Dies spiegelt sich auch in den Signifikanzen wieder. So ist der Mittelwert der Gruppe Natalizumab signifikant erhöht gegenüber dem der Patienten im Schub, dem der Gruppe Rebif und dem der therapierten Patienten. Gegenüber der Gruppe Glatirameracetat, der Gruppe Interferon β -1a gesamt und der Gruppe Interferon β -1b ist der Mittelwert sogar hoch signifikant erhöht. Und höchst signifikant erhöht ist der Mittelwert der Gruppe Natalizumab dann noch gegenüber der Gruppe Interferon β gesamt und gegenüber allen Kontrollen. Insgesamt überragen hier ganz klar die Signifikanzen von Natalizumab. Es lässt sich auch sagen, dass im Vergleich zu den anderen Therapien die Gruppe Natalizumab trotz oder vielleicht gerade wegen der Therapie eine verhältnismäßig starke Reaktivität gegenüber diesem Anti-

gen aufweist. Stellt sich die Frage, ob es gut für den Patienten ist, wenn er trotz einer Therapie eine solch starke Reaktion auf dieses Antigen zeigt. Daraus lässt sich doch schließen, dass es trotz der Therapie bei entsprechendem Kontakt mit dem Immunsystem dieser Patienten zu einer entsprechend stärkeren Reaktion dieser Immunsysteme kommt und so sogar zu einem Schubereignis führen könnte. Wenn es also physiologischerweise zu dem Kontakt dieses Antigens mit dem Immunsystem kommen sollte, so ist die Wahl des Medikamentes Natalizumab, mal abgesehen von dessen möglicher Nebenwirkung, zumindest in Frage zu stellen. Jedenfalls setzt sich auch der Mittelwert von Natalizumab signifikant von dem der therapierten Patienten und sogar höchst signifikant von dem aller Kontrollen ab. Vor allem die Interferone weisen hier dagegen signifikant erniedrigte Mittelwerte auf.

<u>Signifikante Mittelwerte Ausschüttung Interferon-γ Elispot MOG PBS</u>		
Männl. nicht therapierte Patienten 70,07	> *	Kontrollen gesamt 24,82
Patienten im Schub 25,67	< *	Natalizumab 91,67
Glatirameracetat 7,50	< **	Natalizumab 91,67
Natalizumab 91,67	> *	Rebif 25,67
Natalizumab 91,67	> **	Interferon β-1a gesamt 20,75
Natalizumab 91,67	> **	Interferon β-1b 10,00
Natalizumab 91,67	> ***	Interferon β gesamt 16,14
Natalizumab 91,67	> *	Therapierte Patienten 28,30

Natalizumab
91,67

>

Kontrollen gesamt
24,82

Bei der Betrachtung des Antigens MOG in Acetat (löslich) fällt sofort auf, dass auch hier Natalizumab den mit Abstand höchsten Mittelwert bildet und für alle außer einer der Signifikanzen verantwortlich ist. Dabei ist der Mittelwert der Gruppe Natalizumab signifikant gegenüber dem der Patienten im Schub, dem der therapierten Patienten und dem der nicht therapierten Patienten erhöht. Hoch signifikant erhöht ist sein Mittelwert gegenüber dem der Gruppe Rebif, dem der Gruppe Interferon β -1a gesamt und dem aller Patienten. Sogar höchst signifikant erhöht ist der Mittelwert der Gruppe Natalizumab schließlich gegenüber dem der Gruppe Glatirameracetat, dem der Gruppe Interferon β -1b, dem der Gruppe Interferon β gesamt und dem aller Kontrollen. Außerdem ist der Mittelwert der Gruppe Rebif signifikant erhöht gegenüber dem der Gruppe Interferon β -1b. Auch hier zeigen die Interferone wie schon bei MOG PBS signifikant erniedrigte Mittelwerte und zwar nicht nur gegenüber Natalizumab, sondern bestätigend auch gegenüber Rebif. Für Natalizumab gilt dasselbe wie schon bei MOG PBS. Die Zellen der mit Natalizumab therapierten Patienten reagieren besonders stark auf das Antigen MOG in Acetat, sogar noch stärker als bei MOG in PBS, und schütten Interferon- γ aus. Wieder muss man sich fragen, ob der Kontakt dieses Antigens MOG in Acetat mit dem Immunsystem eines mit Natalizumab therapierten Patienten physiologischerweise zustande kommt. Ist dies der Fall, so kommt es zu einer starken Reaktion des Immunsystems, die bis hin zur Entstehung eines Schubes führen könnte. Die Therapie mit Natalizumab sollte also, nicht nur wegen der möglichen fatalen Nebenwirkung einer Progressiven Multifokalen Leukenzephalopathie (PML) (Gehlen & Delank, 2010, S.276), in Frage gestellt werden. Im Gegensatz dazu zeigen die Zellen der mit Interferonen, vor allem Avonex und Interferon β -1b (Betaferon) behandelten Patienten eine signifikant erniedrigte Anzahl an

Interferon- γ sezernierenden Zellen. Die Interferone setzen sich auch signifikant gegenüber Natalizumab ab. Betrachtet man einmal die Mittelwerte aller Patienten und aller Kontrollen, auch wenn diese im direkten Vergleich bei keinem Antigen signifikant unterschiedlich sind, so erkennt man doch, dass bei allen MOG-Antigenen (MOG PBS, MOG Acetat, MOG ref. und New MOG ref.) der Mittelwert der Patienten z. T. deutlich über dem der Kontrollen liegt. Geht man nun wieder davon aus, dass eine Annäherung an den Mittelwert aller Kontrollen bei den einzelnen Therapien als therapeutischer Erfolg gewertet wird, so muss man sagen, dass Avonex und vor allem Interferon β -1b (Betaferon) hier die beste Wirkung zeigen, wogegen Rebif, von dem sich Interferon β -1b ja auch signifikant absetzen kann, sich dem Mittelwert aller Patienten naht und somit keine erfolversprechende Therapie zu sein scheint. Der Mittelwert von Natalizumab zeigt hier eine sehr starke Erhöhung, weit über den Mittelwert aller Patienten hinaus und scheidet nach dieser Schlussfolgerung als erfolversprechende Therapie nicht nur aus, sondern könnte durch seine starke Interferon- γ -Ausschüttung nach Kontakt mit dem Antigen die Situation sogar noch verschlimmern, indem das Immunsystem ja geradezu stimuliert bzw. zu einer Reaktion vielleicht bis hin zum Auslösen eines Schubes provoziert wird.

**Signifikante
Mittelwerte
Ausschüttung
Interferon- γ
Elispot
MOG Acetat**

Patienten im Schub 28,50	< *	Natalizumab 148,83
Glatirameracetat 5,67	< ***	Natalizumab 148,83
Natalizumab 148,83	> **	Rebif 37,45
Natalizumab 148,83	> **	Interferon β-1a gesamt 29,09

Natalizumab 148,83	> ***	Interferon β-1b 7,89
Natalizumab 148,83	> ***	Interferon β gesamt 20,00
Natalizumab 148,83	> *	Therapierte Patienten 40,82
Natalizumab 148,83	> *	Nicht therapierte Patienten 43,24
Natalizumab 148,83	> **	Patienten gesamt 40,43
Natalizumab 148,83	> ***	Kontrollen gesamt 28,50
Rebif 37,45	> *	Interferon β-1b 7,89

Betrachtet man nun das Antigen MOG ref., so ergibt sich ein etwas von Natalizumab unabhängigeres Bild. Hierbei sticht ins Auge, dass die weibl. nicht therapierten Patienten und die männl. nicht therapierten Patienten beide signifikante Erhöhungen gegenüber allen Kontrollen aufweisen. Folglich ist dies auch bei den nicht therapierten Patienten zusammen der Fall. Man könnte hier annehmen, dass die Therapie also tatsächlich eine Wirkung zeigt, da sich die therapierten Patienten mit ihrem Mittelwert demjenigen aller Kontrollen annähern und sich der Mittelwert eben auch nicht signifikant von dem aller Kontrollen abhebt. Umgekehrt sieht man, dass der Mittelwert der nicht therapierten Patienten sich nicht nur weit von dem aller Kontrollen entfernt, sondern sogar noch weit über dem aller Patienten hinaus gelegen ist. Durch die fehlende Therapie scheint sich bei Kontakt mit dem Antigen die Interferon- γ -Ausschüttung also zu erhöhen und umgekehrt scheint es durch die Therapie und hier wieder vor allem durch die Therapie mit Interferonen (diesmal auch durch Rebif) zu gelingen, die Interferon- γ -Ausschüttung nach Kontakt mit dem Antigen zu senken. Nicht gelingt dies jedoch Glatirameracetat und Natalizumab. Die Gruppe Natalizumab zeigt auch hier wieder hoch signifikante Erhöhungen gegenüber den Patienten im

Schub, der Gruppe Rebif, der Gruppe Interferon β -1a gesamt, der Gruppe Interferon β -1b und sogar eine höchst signifikante Erhöhung gegenüber der Gruppe Interferon β gesamt. Nicht zu vergessen ist außerdem, dass die zwei Patienten im Schub eine Langzeittherapie mit Rebif erhalten, aber die Zellen natürlich auch durch eine Akuttherapie in ihrer Fähigkeit, Interferon- γ auszuschütten, beeinflusst werden.

		<u>Signifikante</u> <u>Mittelwerte</u> <u>Ausschüttung</u> <u>Interferon-γ</u> <u>Elispot</u> <u>MOG ref.</u>		
Nicht therapierte Patienten 87,24	> *		Kontrollen gesamt 14,32	
Weibl. nicht therapierte Patienten 78,00	> *		Kontrollen gesamt 14,32	
Männl. nicht therapierte Patienten 90,93	> *		Kontrollen gesamt 14,32	
Patienten im Schub 6,50	< **		Natalizumab 28,00	
Natalizumab 28,00	> **		Rebif 9,45	
Natalizumab 28,00	> **		Interferon β-1a gesamt 7,75	
Natalizumab 28,00	> **		Interferon β-1b 4,89	
Natalizumab 28,00	> ***		Interferon β gesamt 6,53	

Bei dem neuen Batch des Antigens MOG ref., also dem New MOG ref., spielt Natalizumab die Hauptrolle bei den Signifikanzen. Signifikant erhöht ist der Mittelwert der Gruppe Natalizumab gegenüber dem aller Patienten. Hoch signifikant erhöht ist sein Mittelwert gegenüber den nicht therapierten Patienten, der Gruppe Rebif und der Gruppe Interferon β gesamt. Gegenüber der Gruppe Interferon β -1a gesamt und ge-

genüber allen Kontrollen ist der Mittelwert der Gruppe Natalizumab sogar höchst signifikant erhöht.

<u>Signifikante Mittelwerte Ausschüttung Interferon-γ Elispot New MOG ref.</u>		
Natalizumab 53,50	> **	Rebif 6,33
Natalizumab 53,50	> ***	Interferon β-1a gesamt 5,58
Natalizumab 53,50	> **	Interferon β gesamt 8,67
Natalizumab 53,50	> **	Nicht therapierte Patienten 9,89
Natalizumab 53,50	> *	Patienten gesamt 17,49
Natalizumab 53,50	> ***	Kontrollen gesamt 14,39

Abschließend haben sich nur noch bei dem Antigen pp65 (CMV) signifikante Unterschiede finden lassen. Dabei scheint es bei den Geschlechtern eine deutliche Differenz zu geben, da hier die männl. Patienten nach Kontakt mit dem Antigen signifikant mehr Interferon- γ ausschütten als die weibl. Patienten. Interessant ist außerdem, dass fast spiegelbildlich die männl. Kontrollen (54,14) verglichen mit den weibl. Kontrollen (119,22) deutlich weniger Interferon- γ nach Stimulation durch dieses Antigen ausschütten. Umgekehrt weisen die weibl. Kontrollen auf die Stimulation mit CMV eine deutliche Reaktion in Form der Ausschüttung von Interferon- γ auf. Ohne jedoch signifikant zu sein, ist dieser Unterschied bei gesunden Probanden trotzdem erstaunlich. Diese Geschlechterdifferenz spiegelt sich unabhängig von einer Therapie auch bei den weibl. therapierten Patienten (52,53) bzw. den weibl. nicht therapierten Patienten (23,17), die beide niedrigere Mittelwerte aufweisen, und bei den männl. thera-

pierten Patienten (121,67) bzw. männl. nicht therapierten Patienten (138,53), die beide erhöhte Mittelwerte zeigen, wieder. Schließlich zeigt sich wie schon zuvor auch hier der signifikante Unterschied zwischen dem Mittelwert der Gruppe Natalizumab und der Interferontherapie, genauer dem Mittelwert der Gruppe Interferon β -1b, der sich fast wie ein roter Faden bei der entgegengesetzten Beeinflussung der Zellen zur Ausschüttung von Interferon- γ durchzuziehen scheint.

<u>Signifikante Mittelwerte Ausschüttung Interferon-γ Elispot pp65 (CMV)</u>		
Weibl. Patienten 40,58	< *	Männl. Patienten 131,04
Natalizumab 113,67	> *	Interferon β-1b 22,67

Bei keinem anderen Antigen kam es ansonsten zu signifikanten Unterschieden.

4.6 Ergebnis der Elispot-Analyse gesamt

Der Vollständigkeit halber sind jetzt der 1. Teil und der 2. Teil der Elispot-Laboruntersuchungen zu einem gesamten Teil zusammengefasst, der hier abschließend noch betrachtet wird.

Auch hier steht am Anfang wieder eine Übersicht über alle erhobenen Mittelwerte (Tab. 38).

Mittelwerte Elispot gesamt						
	0 Ag	MOG PBS	MOG Acetat	MOG ref.	New MOG ref.	CEF
Alle Patienten (24)	3,21	33,38	41,73	44,57	17,49	77,51
Alle Kontrollen (20)	3,38	28,90	35,63	76,50	16,39	45,27
Weibl. Patienten (15)	3,42	21,00	30,59	37,49	22,22	77,45
Weibl. Kontrollen (13)	4,26	27,49	34,08	106,18	15,29	55,95
Alle Frauen (15P,13K)	3,81	24,01	32,33	69,38	18,26	67,46
Männl. Patienten (9)	2,85	54,00	57,82	56,37	13,43	77,63
Männl. Kontrollen (7)	1,76	31,52	38,52	21,38	19,33	25,43
Alle Männer (9P,7K)	2,37	44,17	49,38	41,06	15,20	54,79
Therapierte Patienten (11)	4,00	28,30	40,82	18,33	19,88	73,97
Nicht therapierte Patienten (10)	1,67	41,67	45,78	82,73	9,89	63,27
Weibl. therapierte Patienten (7)	3,67	25,10	31,24	21,29	23,67	60,43
Weibl. Nicht therapierte Patienten (5)	1,87	13,27	30,50	74,53		64,94
Männl. therapierte Patienten (4)	4,58	33,92	57,59	13,17	16,09	97,67
Männl. Nicht therapierte Patienten (5)	1,47	70,07	58,00	90,93	9,89	61,60
Glatirameracetat (2)	2,84	7,50	5,67	50,00		100,00
Natalizumab (2)	4,00	91,67	148,83	28,00	53,50	35,84
Rebif (3)	3,00	25,67	37,45	9,45	6,33	101,67
Avonex (1)	3,33	6,00	4,00	2,67	3,33	84,00
Interferon β -1a gesamt (4)	3,08	20,75	29,09	7,75	5,58	97,25
Interferon β -1b (3)	6,00	10,00	7,89	4,89	14,84	51,00
Interferon β gesamt (7)	4,33	16,14	20,00	6,53	8,67	77,43
Patienten im Schub (3)	5,44	24,33	28,50	13,56	19,34	138,00
		Hexon (ADV)	Glas (ADV)	PP65 (CMV)	EBNA-1 (EBV)	PHA
Alle Patienten (24)		54,00	32,23	90,77	14,33	343,94
Alle Kontrollen (20)		56,13	40,80	93,95	9,19	316,80
Weibl. Patienten (15)		53,13	28,36	62,90	18,48	355,42
Weibl. Kontrollen (13)		62,28	48,72	115,39	11,29	295,82
Alle Frauen (15P,13K)		57,71	38,54	89,14	15,46	327,75
Männl. Patienten (9)		55,26	37,81	131,04	7,81	324,82
Männl. Kontrollen (7)		44,71	26,09	54,14	6,39	355,76
Alle Männer (9P,7K)		50,65	32,69	97,40	7,15	338,36
Therapierte Patienten (11)		52,64	37,91	77,67	9,71	362,94
Nicht therapierte Patienten (10)		48,22	15,52	123,37	17,18	303,90
Weibl. therapierte Patienten (7)		47,38	24,76	52,53	11,60	373,10
Weibl. Nicht therapierte Patienten (5)		46,00	10,75	104,42	27,50	299,27
Männl. therapierte Patienten (4)		61,83	60,92	121,67	5,00	345,17
Männl. Nicht therapierte Patienten (5)		50,00	19,33	138,53	8,93	308,53
Glatirameracetat (2)		12,84	9,84	79,00	15,00	353,84
Natalizumab (2)		85,50	78,84	113,67	4,67	328,50
Rebif (3)		71,67	33,00	131,00		374,22
Avonex (1)		25,67	28,67	8,00		364,00
Interferon β -1a gesamt (4)		60,17	31,92	100,25		371,67
Interferon β -1b (3)		47,22	37,34	22,67	9,56	380,33
Interferon β gesamt (7)		54,62	34,24	67,00	9,56	375,38
Patienten im Schub (3)		87,50	76,17	16,17	17,67	407,78

Tab. 38

Zuerst werden wieder alle Patienten mit allen Kontrollen verglichen. Hierbei haben sich keine signifikanten Unterschiede finden lassen (Tab. 39 und Abb. 52). Trotzdem gibt es aber z. T. relativ große Abstände. So differiert der Mittelwert aller Patienten

Gesamt

	0 Ag	MOG PBS	MOG Acetat	MOG ref.	New MOG ref.	CEF	Hexon (ADV)
Patienten (24)	3,21	33,38	41,73	44,57	17,49	77,51	54,00
Kontrollen (20)	3,38	28,90	35,63	76,50	16,39	45,27	56,13

	Glas (ADV)	PP65 (CMV)	EBNA-1 (EBV)	PHA
Patienten (24)	32,23	90,77	14,33	343,94
Kontrollen (20)	40,80	93,95	9,19	316,80

Tab. 39

Elispot gesamt Alle Patienten gegen alle Kontrollen

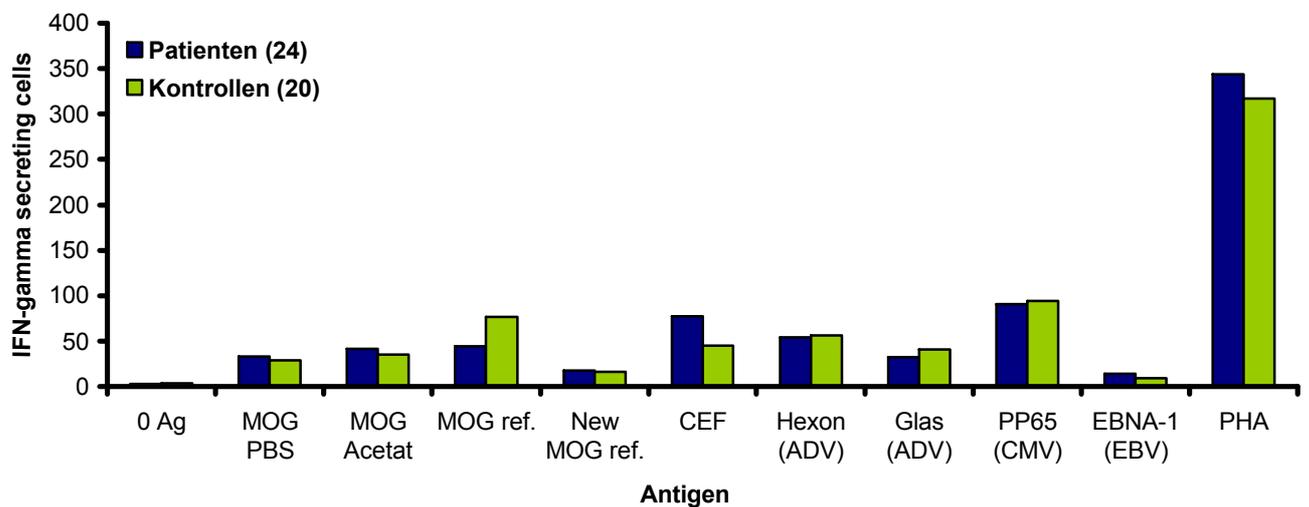


Abb. 52

gegenüber dem aller Kontrollen bei MOG PBS um +4,48 Spots, bei MOG Acetat um +6,1 Spots, bei MOG ref. um -31,93 Spots, bei New MOG ref. um nur +1,1 Spots, bei CEF um +32,24 Spots, bei Hexon um nur -2,13 Spots, bei Glas um -8,57 Spots, bei pp65 um -3,18 Spots und bei EBNA-1 um durchschnittlich +5,14 Spots. Dabei fallen besonders zwei relativ große Unterschiede auf. Und zwar sind die Unterschiede bei MOG ref. und bei CEF besonders groß, wobei vor allem der Mittelwert von MOG ref. durch die stark unterschiedlichen Ergebnisse des 1. Teils der Elispot-Analyse (4.4) und des 2. Teils der Elispot-Analyse (4.5) deutlich beeinflusst wird, was

man im Vergleich der Abb. 48 zu Abb. 49 und wiederum zu Abb. 52 sehr schön erkennen kann.

Kein signifikanter Unterschied findet sich beim Vergleich der weibl. Patienten mit den weibl. Kontrollen und beim Vergleich der männl. Patienten mit den männl. Kontrollen.

Auch bei der Gegenüberstellung aller Frauen (weibl. Patienten und weibl. Kontrollen) gegen alle Männer (männl. Patienten und männl. Kontrollen) lässt sich keine Signifikanz ausmachen.

Sowohl bei den weibl. Patienten als auch bei den männl. Patienten kann gegenüber allen Kontrollen keine signifikante Differenz gefunden werden.

Vergleicht man nun die Geschlechter innerhalb der Kontrollen, also die weibl. Kontrollen mit den männl. Kontrollen, so ergibt sich auch hier kein signifikanter Unterschied.

Und auch gegenüber allen Patienten zeigen weder die weibl. Kontrollen noch die männl. Kontrollen Signifikanzen.

Die therapierten Patienten weisen im direkten Vergleich mit den nicht therapierten Patienten genauso wenig einen signifikanten Unterschied auf, wie sowohl die therapierten Patienten als auch die nicht therapierten Patienten gegenüber allen Kontrollen keinerlei Signifikanz aufweisen.

Werden die weibl. therapierten Patienten den männl. therapierten Patienten gegenübergestellt, so lassen sich auch hier keine Signifikanzen finden. Vergleicht man weiter die weibl. therapierten Patienten mit den weibl. nicht therapierten Patienten und die männl. therapierten Patienten mit den männl. nicht therapierten Patienten

und stellt man außerdem die weibl. nicht therapierten Patienten den männl. nicht therapierten Patienten vergleichend gegenüber, so ergeben sich auch hier keine signifikanten Unterschiede nach antigener Stimulation.

Wieder ist dann auch beim Vergleich sowohl der weibl. therapierten Patienten als auch der männl. therapierten Patienten mit den therapierten Patienten keine signifikante Differenz zu finden.

Ebenfalls ohne signifikante Unterschiede bleibt die Gegenüberstellung der weibl. nicht therapierten Patienten und auch der männl. nicht therapierten Patienten gegen die nicht therapierten Patienten.

Zuletzt zeigt sich dann, dass diese vier Gruppen, also die weibl. und männl. therapierten Patienten und die weibl. und männl. nicht therapierten Patienten, auch gegenüber allen Kontrollen keine Signifikanz aufweisen.

Sich jetzt der Gruppe der im Schub befindlichen Patienten zuwendend, zeigt sich bei dieser Gruppe gegenüber der Gruppe Natalizumab bei MOG PBS mit 24,33 Spots zu 91,67 Spots ein um durchschnittlich 67,34 Spots und mit einem p von 0,0100 signifikant erniedrigter Mittelwert. Zudem ist auch der Mittelwert dieser Gruppe bei MOG Acetat mit 28,50 Spots zu 148,83 Spots um im Durchschnitt 120,33 Spots und mit einem p von 0,0177 signifikant erniedrigt.

Und vergleicht man diese Gruppe mit den nicht therapierten Patienten, so ergibt sich bei dem Antigen Glas (ADV) mit 76,17 Spots zu 15,52 Spots ein um im Schnitt 60,65 Spots und mit einem p von 0,0357 signifikant erhöhter Mittelwert. Dabei differieren allerdings die Varianzen relativ stark.

Gegenüber der Gruppe Glatirameracetat, der Gruppe Rebif, der Gruppe Interferon β -1a gesamt, der Gruppe Interferon β -1b, der Gruppe Interferon β gesamt, den thera-

pierten Patienten, gegenüber allen Patienten und gegenüber allen Kontrollen zeigt die Gruppe der Patienten im Schub keine weitere Signifikanz mehr.

Nun werden noch die Gruppen der einzelnen Medikamente betrachtet. Dazu sei gesagt, dass sich im Vergleich zu 4.5 nicht alle Gruppen verändert haben, so dass manche Gruppendaten mit denen aus 4.5 identisch sind. Deshalb werden diese Daten hier nicht nochmals analysiert, sondern es wird im Folgenden an entsprechenden Stellen auf die jeweiligen Datenanalysen aus 4.5 verwiesen. In der später folgenden Übersicht der Signifikanzen der einzelnen Antigene sind dann natürlich alle Signifikanzen aufgeführt, also auch die, die schon unter 4.5 ermittelt wurden.

Bei der Betrachtung der Gruppe Glatirameracetat sind nun im Vergleich mit den einzelnen Medikamentengruppen, also mit der Gruppe Natalizumab, der Gruppe Rebif, der Gruppe Interferon β -1a gesamt, der Gruppe Interferon β -1b der Gruppe Interferon β gesamt und den therapierten Patienten, alle Daten identisch mit denen aus 4.5 und es wird hier deshalb auf 4.5 verwiesen. Nicht identisch sind die Daten der nicht therapierten Patienten, aller Patienten und aller Kontrollen, die aber beim Vergleich mit der Gruppe Glatirameracetat alle keine signifikanten Unterschiede zeigen. Insgesamt weist diese Gruppe hier dieselben Signifikanzen auf wie unter 4.5.

Auch für die Gruppe Natalizumab gilt, dass alle Vergleiche mit den Gruppen der einzelnen Medikamente, also mit der Gruppe Rebif, der Gruppe Interferon β -1a gesamt, der Gruppe Interferon β -1b und der Gruppe Interferon β gesamt, und außerdem mit den therapierten Patienten identisch zu den Daten aus 4.5 sind und deshalb dort einzusehen sind.

Gegenüber den nicht therapierten Patienten allerdings ist der Mittelwert der Gruppe Natalizumab bei MOG Acetat mit 148,83 Spots zu 45,78 Spots um durchschnittlich

103,05 Spots und einem p von 0,0342 signifikant erhöht. Weiter ist bei diesem Vergleich auch der Mittelwert von New MOG ref. bei der Gruppe Natalizumab mit 53,50 Spots zu 9,89 Spots um im Durchschnitt 43,61 Spots und mit einem p von 0,0014 hoch signifikant erhöht. Außerdem zeigt sich mit einem p von 0,0415 auch noch bei Glas (ADV) mit 78,84 Spots zu 15,52 Spots bei den nicht therapierten Patienten ein bei der Gruppe Natalizumab um im Schnitt 63,32 Spots signifikant erhöhter Mittelwert. Hierbei herrschen aber stark differierende Varianzen vor.

Die Gruppe Natalizumab zeigt gegenüber allen Patienten bei MOG Acetat mit 148,83 Spots zu 41,73 Spots einen um durchschnittlich 107,10 Spots und mit einem p von 0,0095 hoch signifikant erhöhten Mittelwert. Erneut ist hier bei der Gruppe Natalizumab auch der Mittelwert für New MOG ref. mit 53,50 Spots zu 17,49 Spots bei allen Patienten um im Schnitt 36,01 Spots und mit einem p von 0,0210 signifikant erhöht.

Schließlich wird die Gruppe Natalizumab noch mit allen Kontrollen verglichen. Dabei ergibt sich, dass der Mittelwert der Gruppe Natalizumab bei MOG PBS mit 91,67 Spots zu 28,90 Spots bei allen Kontrollen um im Durchschnitt 62,77 Spots und mit einem p von 0,0154 signifikant erhöht ist. Mit einem p von 0,0013 ist der Mittelwert der Gruppe Natalizumab bei diesem Vergleich bei MOG Acetat mit 148,83 Spots zu 35,63 Spots um durchschnittlich 113,20 Spots sogar hoch signifikant erhöht. Noch überboten wird dies mit einem p von 0,0004 bei dem Mittelwert von New MOG ref., der bei der Gruppe Natalizumab mit 53,50 Spots zu 16,39 Spots bei allen Kontrollen um im Schnitt 37,11 Spots höchst signifikant erhöht ist.

Die Gegenüberstellungen der Gruppe Rebif mit der Gruppe Interferon β -1a gesamt, der Gruppe Interferon β -1b, der Gruppe Interferon β gesamt und mit den therapierten Patienten wurden bereits unter 4.5 dargestellt und werden aufgrund identischer Datensätze hier nicht erneut erläutert.

Wegen neuer Datensätze wurden aber die nicht therapierten Patienten, alle Patienten und alle Kontrollen mit der Gruppe Rebif verglichen, allerdings ohne eine Signifikanz aufzuweisen.

Identisch zu den Datensätzen bei 4.5 sind die Daten der Gruppe Interferon β -1a gesamt im Vergleich mit der Gruppe Interferon β -1b, der Gruppe Interferon β gesamt und im Vergleich mit den therapierten Patienten und können entsprechend unter 4.5 eingesehen werden.

Bei den hier neu angestellten Vergleichen der Gruppe Interferon β -1a gesamt mit den nicht therapierten Patienten, mit allen Patienten und mit allen Kontrollen lassen sich keine signifikanten Unterschiede finden.

Wiederum wird bei den Vergleichen der Gruppe Interferon β -1b mit der Gruppe Interferon β gesamt und den therapierten Patienten wegen identischer Daten auf die Ausführungen in 4.5 verwiesen.

Auch hier zeigen sich keine Signifikanzen bei der Gruppe Interferon β -1b gegenüber den nicht therapierten Patienten, allen Patienten und gegenüber allen Kontrollen.

Zuletzt wird noch die Gruppe Interferon β gesamt betrachtet. Der Vergleich mit den therapierten Patienten wird bei identischen Daten hier nicht wiederholt und ist unter 4.5 zu finden.

Was hier allerdings überprüft wurde, ist die Gegenüberstellung der Gruppe Interferon β gesamt gegen die nicht therapierten Patienten, alle Patienten und gegen alle Kontrollen. Dabei hat sich keinerlei Signifikanz herauskristallisiert.

Nun werden wieder die einzelnen Antigene und deren Signifikanzen betrachtet.

Bei der Betrachtung des Antigens MOG in PBS und dessen Signifikanzen fällt auf, dass die Signifikanzen hier alle mit den Signifikanzen aus 4.5 bezüglich des MOG PBS übereinstimmen. Hier fehlt lediglich der signifikant erhöhte Mittelwert der männl. nicht therapierten Patienten gegenüber allen Kontrollen, der unter 4.5 noch vorhanden war. Durch das Fehlen dieser Signifikanz kommt der Gruppe Natalizumab, die sowieso schon eine besonders hohe Beteiligung an Signifikanzen aufweist, eine noch größere Bedeutung zu, da diese hier nun an allen signifikanten Unterschieden beteiligt ist. Aufgrund der fast vollständigen Übereinstimmung der signifikanten Differenzen bezüglich des MOG PBS zu denen unter 4.5, wird deshalb zu den weiteren Ausführungen auch auf den entsprechenden Abschnitt in 4.5 verwiesen.

<u>Signifikante Mittelwerte Ausschüttung Interferon-γ Elispot MOG PBS</u>		
Patienten im Schub 24,33	< *	Natalizumab 91,67
Glatirameracetat 7,50	< **	Natalizumab 91,67
Natalizumab 91,67	> *	Rebif 25,67
Natalizumab 91,67	> **	Interferon β-1a gesamt 20,75
Natalizumab 91,67	> **	Interferon β-1b 10,00
Natalizumab 91,67	> ***	Interferon β gesamt 16,14
Natalizumab 91,67	> *	Therapierte Patienten 28,30
Natalizumab 91,67	> *	Kontrollen gesamt 28,90

Jetzt wird das Antigen MOG in Acetat mit seinen signifikanten Differenzen betrachtet. Vergleicht man hier die Signifikanzen mit denen unter 4.5 bezüglich des MOG Acetat, so stellt man fest, dass es hier zu einer vollständigen Übereinstimmung der signifikanten Unterschiede kommt, weshalb zu den weiteren Ausführungen wiederum auf den entsprechenden Abschnitt unter 4.5 verwiesen wird.

<u>Signifikante Mittelwerte Ausschüttung Interferon-γ Elispot MOG Acetat</u>		
Patienten im Schub 28,50	< *	Natalizumab 148,83
Glatirameracetat 5,67	< ***	Natalizumab 148,83
Natalizumab 148,83	> **	Rebif 37,45
Natalizumab 148,83	> **	Interferon β-1a gesamt 29,09
Natalizumab 148,83	> ***	Interferon β-1b 7,89
Natalizumab 148,83	> ***	Interferon β gesamt 20,00
Natalizumab 148,83	> *	Therapierte Patienten 40,82
Natalizumab 148,83	> *	Nicht therapierte Patienten 45,78
Natalizumab 148,83	> **	Patienten gesamt 41,73
Natalizumab 148,83	> **	Kontrollen gesamt 35,63
Rebif 37,45	> *	Interferon β-1b 7,89

Bei dem Antigen MOG ref. ist, wie hier deutlich zu erkennen ist, die Gruppe Natalizumab an allen Signifikanzen beteiligt. Dabei findet sich hier gegenüber den Inter-

feronen wie schon unter 4.5 bei der Gruppe Natalizumab ein hoch signifikant erhöhter Mittelwert gegenüber der Gruppe Interferon β -1a gesamt und der Gruppe Interferon β -1b und ein höchst signifikant erhöhter Mittelwert des sezernierten Interferon- γ gegenüber der Gruppe Interferon β gesamt. Dies bestätigt wieder den unter 4.5 bereits erwähnten großen Unterschied zwischen den Medikamenten Natalizumab und den Interferonen in ihrer offensichtlich vorhandenen Fähigkeit, die Ausschüttung des Cytokins Interferon- γ durch die Zellen der Patienten zu beeinflussen, also wie bei den Interferonen, und entsprechend auch bei dem zu den Interferonen β -1a gehörigen Rebif, diese Ausschüttung eher zu drosseln bzw. zu inhibieren oder wie bei Natalizumab diese Ausschüttung eher zu fördern bzw. zu stimulieren. Im Gegensatz zu den signifikanten Differenzen bezüglich des MOG ref. unter 4.5 bei den weibl. bzw. männl. nicht therapierten Patienten und den nicht therapierten Patienten gegenüber allen Kontrollen und den Patienten im Schub gegenüber der Gruppe Natalizumab zeigt sich hier keine weitere Signifikanz.

<u>Signifikante Mittelwerte Ausschüttung Interferon-γ Elispot MOG ref.</u>		
Natalizumab 28,00	> **	Rebif 9,45
Natalizumab 28,00	> **	Interferon β-1a gesamt 7,75
Natalizumab 28,00	> **	Interferon β-1b 4,89
Natalizumab 28,00	> ***	Interferon β gesamt 6,53

Eine vollständige Übereinstimmung der Signifikanzen findet sich bei dem Antigen New MOG ref., also dem neuen Batch des Antigens MOG ref., mit den Signifikanzen

bezüglich dieses Antigens unter 4.5, weshalb an dieser Stelle wieder auf die Ausführungen dort verwiesen wird.

<u>Signifikante Mittelwerte Ausschüttung Interferon-γ Elispot New MOG ref.</u>		
Natalizumab 53,50	> **	Rebif 6,33
Natalizumab 53,50	> ***	Interferon β -1a gesamt 5,58
Natalizumab 53,50	> **	Interferon β gesamt 8,67
Natalizumab 53,50	> **	Nicht therapierte Patienten 9,89
Natalizumab 53,50	> *	Patienten gesamt 17,49
Natalizumab 53,50	> ***	Kontrollen gesamt 16,39

Neu im Vergleich zu den Signifikanzen unter 4.5 aufgetreten sind dagegen zwei Signifikanzen, die das Antigen Glas (ADV) betreffen. Hier zeigt sich sowohl bei den Patienten im Schub bei dem hier mit deutlichem Abstand zweithöchsten Mittelwert als auch bei der Gruppe Natalizumab mit dem sogar höchsten Mittelwert eine nach Kontakt mit diesem Antigen signifikant stärkere Ausschüttung von Interferon- γ gegenüber den nicht therapierten Patienten. Umgekehrt zeigen die nicht therapierten Patienten hier also eine signifikant erniedrigte Ausschüttung von Interferon- γ .

<u>Signifikante Mittelwerte Ausschüttung Interferon-γ Elispot Glas (ADV)</u>		
Patienten im Schub 76,17	> *	Nicht therapierte Patienten 15,52
Natalizumab 78,84	> *	Nicht therapierte Patienten 15,52

Zuletzt gibt es auch hier wieder eine Signifikanz bezüglich des Antigens pp65 (CMV). Hier zeigt sich wie schon unter 4.5 eine signifikant stärkere Ausschüttung von Interferon- γ bei der Gruppe Natalizumab gegenüber der Gruppe Interferon β -1b, deren Interferon- γ -Ausschüttung hier umgekehrt signifikant erniedrigt ist. Keine Signifikanz mehr zeigt sich hier allerdings im Gegensatz zu 4.5 zwischen den weibl. und männl. Patienten.

Signifikante Mittelwerte
Ausschüttung Interferon- γ
Elispot
pp65 (CMV)

Natalizumab	>	Interferon β-1b
113,67	*	22,67

Dieses Kapitel abschließend soll noch kurz auf die pharmakologischen Wirkungen der Medikamente eingegangen werden. Glatirameracetat z. B. sorgt dafür, dass die T_{H2}-Zelle ihre immunmodulatorischen Cytokine wie IL-3, IL-4 und IL-9 und ihre antiinflammatorischen Cytokine wie IL-4, IL-10 und IL-13 sezerniert und damit durch Verschiebung des Gleichgewichtes der pro- und antiinflammatorisch wirkenden Cytokine den proinflammatorischen Cytokinen wie IL-1 und Tumornekrosefaktor(TNF-) α indirekt entgegenwirkt (Karow & Lang-Roth, 2009, S. 1004) (Löffler & Petrides, 2003, S. 814-834). Höchstens indirekt könnte, wie hier gegenüber Natalizumab der Fall, die Interferon- γ -Sekretion bei mit Glatirameracetat therapierten Patienten signifikant erniedrigt sein. Natalizumab dagegen wirkt über das Eingehen einer spezifischen Bindung mit einem Integrin (Anti- α -4-Integrin-Antikörper) auf der Zelloberfläche der Leukozyten, wodurch dieses wiederum die Bindung mit auf dem Endothel gelegenen Adhäsionsmolekülen wie VCAMs nicht mehr eingehen kann und folglich keine Migration und Infiltration der Leukozyten in entzündetes Gewebe stattfinden kann (Ruß & Endres, 2009, S. 206) (Löffler & Petrides, 2003, S. 183-185). Aufgrund der fehlenden

Migration könnte die Anzahl von Leukozyten und als Folge davon natürlich auch die Anzahl der Interferon- γ sezernierenden Zellen im Blut erhöht sein. Leider war unter 4.1 nur ein mit Natalizumab behandelter Patient vorhanden, der allerdings mit der höchsten Lymphozytenanzahl überhaupt (2014) diese geschilderte Folge der Therapie bestätigt. Außerdem erkennt man bei der Gruppe Natalizumab ja sofort die multiplen signifikant erhöhten Interferon- γ sezernierenden Zellzahlen unter 4.5 und 4.6, was diese Folgerung ebenfalls bestätigt. Die Interferone, sowohl Rebif und Avonex (β -1a) als auch Betaferon (β -1b), zeigen "nach Bindung an Interferon-Rezeptoren ein komplexes Netzwerk von intra- und interzellulären Wirkungen" (Karow & Lang-Roth, 2009, S. 924) und sind daher hier nur sehr schwer in eventueller Einflussnahme zu beurteilen. Allerdings haben die Interferone neben ihrer antiviralen und immunmodulatorischen auch noch eine antiproliferative Wirkung (Karow & Lang-Roth, 2009, S. 924). Diese könnte hier beispielsweise für die oft signifikant erniedrigte Zellzahl an Interferon- γ sezernierenden Zellen bei den mit Interferonen therapierten Patienten verantwortlich sein. Aber auch bei der Beurteilung der Zellzahlen unter 4.1, 4.2 und 4.3 ist die antiproliferative Wirkung der Interferone bei der Einschätzung der Ergebnisse nicht zu vergessen.

5 DISKUSSION

In diesem Kapitel werden nicht nur zur Einschätzung der Ergebnisse dieser Arbeit, sondern auch zum besseren Verständnis vor allem der Rolle der regulatorischen T-Zellen mehrere Forschungsarbeiten vorgestellt und diskutiert.

5.1 Differente Zellzahlen der CD4+25+ Zellen und anderer Zellen

In MS-Läsionen finden sich laut Lucchinetti et al., 2000 neben regulatorischen T-Zellen auch CD4+ und CD8+ Zellen, Makrophagen und eher weniger B-Lymphozyten und Plasmazellen. Außerdem können laut Huang et al., 1999 bei MS-Patienten zirkulierende dendritische Zellen in hoher Zahl vorhanden sein, die proinflammatorische Cytokine sezernieren und sich laut de Andrés C et al., 2000 und Pashenkov et al., 2001 während eines Schubes im Liquor wiederfinden. (J. Navarro et al., 2006)

Es kommen also unterschiedlichste Zellen in den MS-Läsionen vor, weshalb bei den Untersuchungen der einzelnen Zellpopulationen besser mehr als weniger Zellpopulationen in Augenschein genommen werden sollten.

Lymphozytenzellzahl

Bezüglich der Lymphozytenzahl konnten keine beschriebenen Signifikanzen im Rahmen der hier benutzten Literatur gefunden werden. Lediglich die Auswirkung einer Therapie mit Natalizumab auf die Lymphozytenzellzahl, nämlich ein Anstieg der Lymphozytenzellzahl im peripheren Blut, wurde in der Literatur durch Stenner et al., 2008 beschrieben und konnte hier bestätigt werden. Viel wichtiger aber ist, dass in dieser Arbeit hier die MS-Patienten eine signifikante Erniedrigung der Lymphozytenzell-

zahlen gegenüber den gesunden Kontrollen aufweisen. Diese Tatsache schlägt sich natürlich auch auf alle ermittelten absoluten Zellzahlen anteilig der Lymphozyten nieder, was bei den jeweiligen Einschätzungen berücksichtigt bzw. bedacht werden sollte.

CD3+ Zellen

Auch bei den CD3+ Zellen konnten mit dieser hier verwendeten Literatur keine Angaben über signifikante Differenzen im Zusammenhang mit der MS gefunden werden. Wenn auch nicht beim Vergleich aller Patienten mit allen Kontrollen, so sind in dieser Arbeit dennoch einige Signifikanzen vor allem bezüglich der Gruppe Glatirameracetat aufgetreten.

CD4+ Zellen

Im Gegensatz zu Venken et al., 2006, wo keine Signifikanzen bezüglich der CD4+ Zellen anteilig der Lymphozyten beschrieben wurden, konnte in dieser Arbeit hier eine signifikante Erhöhung der CD4+ Zellen in Prozent der Lymphozyten bei allen MS-Patienten gegenüber allen Kontrollen gezeigt werden. Zudem wurden nach Unterteilung der Patienten und Kontrollen in weitere Gruppen noch multiple andere Signifikanzen gefunden.

CD4+CD25+ regulatorische T-Zellen

Etwa 5-10 % der zirkulierenden CD4+ T-Zellen sind regulatorische T-Zellen. Die regulatorischen T-Zellen inhibieren die Proliferation und Cytokinsekretion von aktivierten T-Zellen und sezernieren dabei laut Miyara & Sakaguchi, 2007 suppressive Cytokine wie IL-10 oder TGF- β . Es hat sich gezeigt, dass laut Kohm et al., 2002 ein Transfer von regulatorischen T-Zellen die Entstehung einer EAE hemmen kann,

wogegen eine Abwesenheit von regulatorischen T-Zellen die EAE verschlimmert. (Braith et al., 2008)

Die positive und negative Selektion im Thymus verhindert laut Kuchroo et al., 2002 und Sospedra & Martin, 2005 nicht vollständig, dass gegen Autoantigene gerichtete T-Effektor-Zellen den Thymus verlassen. Außerhalb des Thymus stehen diese T-Effektorzellen unter der Kontrolle der regulatorischen T-Zellen, die durch ihre Suppressionsfähigkeit diese zu unterdrücken bzw. zu hemmen in der Lage sind. Damit die regulatorischen T-Zellen dieser Aufgabe nachgehen bzw. als eigene Zelllinie überhaupt erst in die Blutbahn gelangen können, scheinen diese laut Jordan et al., 2001, Liston et al., 2004 und van Santen et al., 2004 eine größere Widerstandsfähigkeit gegenüber der negativen Selektion im Thymus als normale CD4⁺ T-Zellen zu besitzen und nicht nur das, sondern der Thymus scheint zusätzlich noch zu einer Induktion der Produktion von regulatorischen T-Zellen befähigt zu sein. Es scheint sich also eine Art Gleichgewicht zwischen den der negativen Selektion des Thymus entkommenen autoreaktiven T-Effektorzellen und den vom Thymus vermehrt durchgelassenen regulatorischen T-Zellen zu entwickeln, bei welchem es den regulatorischen T-Zellen möglich ist, die Autoreaktivität der T-Effektorzellen ausreichend zu inhibieren. Eine Störung dieses Gleichgewichts könnte zur Entwicklung einer Autoimmunerkrankung führen. (C. Cassan & R. S. Liblau, 2007)

Die regulatorischen T-Zellen sammeln sich am Entzündungsherd im ZNS an. Es gelingt ihnen allerdings trotzdem nicht, die T-Effektor-Zellen so zu inhibieren, dass die Entzündungsreaktion beendet wird bzw. gar nicht erst entsteht. Dabei scheint das Verhältnis zwischen den T-Effektor-Zellen und den regulatorischen T-Zellen von Bedeutung zu sein, da zum Zeitpunkt des Höhepunkts der Krankheitsaktivität die T-Effektor-Zellen vermehrt vorhanden sind, im Verlauf der Entzündungsreaktion die regu-

latorischen T-Zellen aber die Oberhand gewinnen und zum Zeitpunkt der Rückbildung der Entzündung die regulatorischen T-Zellen schließlich überwiegen. Nicht nur das Gleichgewicht in der Blutbahn, sondern vor allem das lokale Gleichgewicht spielt also eine Rolle. Dabei schütten die T-Effektor-Zellen lokal vermehrt Cytokine wie IL-6, IL-17, IFN- γ und TNF aus. IL-6 alleine schon ist fähig, die von den regulatorischen T-Zellen vermittelte Suppression der allerdings naiven T-Effektor-Zellen um 50 % zu senken. IL-6 und TNF zusammen sind in der Lage, die suppressive Wirkung der regulatorischen T-Zellen vollständig aufzuheben. Es zeigt sich also, dass hier nicht oder nicht nur die mangelnde Suppressionsfähigkeit der regulatorischen T-Zellen für die Entstehung eines entsprechenden Entzündungsherd verantwortlich ist, sondern auch die Fähigkeit der T-Effektor-Zellen, sich durch Sekretion von Cytokinen (v.a. IL-6 und TNF) gegen die Suppression durch die regulatorischen T-Zellen widerstandsfähig zu machen. Hieraus resultiert eventuell auch eine therapeutische Option, bei der es zu einer Neutralisation des IL-6 und TNF kommt, um die T-Effektor-Zellen für die suppressive Wirkung der regulatorischen T-Zellen empfänglich zu machen. Des Weiteren verhindert ein proinflammatorisches Milieu laut Liu et al., 2006 eine Umwandlung bzw. Differenzierung von regulatorischen T-Zellen aus CD4+25+Foxp3- T-Zellen. (Korn et al., 2007)

MBP- und PLP-reaktive T-Zellen sind laut Pette et al., 1990, Zhang et al., 1992, Pelfrey et al., 1994 und Markovic-Plese et al., 1995 sowohl bei MS-Patienten als auch bei gesunden Kontrollen vorhanden, sind also Teil des normalen T-Zell-Repertoires (-Bestands) im Blut. Bei Aktivierung können sich diese Zellen laut Allegretta et al., 1990, Chou et al., 1992, Zhang et al., 1994 und Vandevyver et al., 1995 aus dem Blut zurückziehen und im Liquor, also im ZNS, ansammeln, was nach Abwanderung in ein anderes Kompartiment (ZNS) zu deren erniedrigter Zellzahl im Blut führen kön-

nte. Der Transfer solch aktivierter MBP- und PLP-spezifischer T-Zellen hat laut Bernard et al., 1976, Ben Nun et al., 1981a, 1981b, Martin et al., 1992 und Martin & McFarland, 1995 in mehreren verschiedenen Tierarten eine EAE auslösen können. MOG ist das einzige Antigen, das sowohl eine T-Zell-vermittelte Entzündungsreaktion mithilfe des Zell-Zell-Kontakts als auch eine laut Linington et al., 1988 und Lassmann et al., 1988 antikörpervermittelte Demyelinisierung bei Tieren verursacht. Die Anti-MOG-Antikörper haben also die Fähigkeit zur Demyelinisierung. Bei Anti-MOG-T-Zell-Immunantworten gibt es zwischen MS-Patienten und gesunden Kontrollen laut Ewing & Bernard, 1998, keine signifikanten Unterschiede. (Hellings et al., 2001)

Die Fähigkeit der CD4+25+ regulatorischen T-Zellen zur Suppression der CD4+ T-Effektor-Zellen bzw. zur Inhibition deren Aktivität kommt laut Shevach, E.M., 2002, Sakaguchi, S., 2004 und Coombes et al., 2005 nicht nur gegen autoreaktive CD4+ T-Effektor-Zellen, sondern auch gegen CD4+ T-Effektor-Zellen, die gegen Nicht-Selbst-Antigene gerichtet sind, zum Einsatz. (Vukmanovic-Stejic et al., 2006)

Bezüglich der Antigene der bei der MS betroffenen Strukturen und der darauf gerichteten spezifischen Antikörper ist zu erwähnen, dass von Fredrikson et al., 1991 schon im Nabelschnurblut von Neugeborenen Antikörper gegen MBP, PLP, MOG und MAG (Myelin-associated glycoprotein) nachgewiesen wurden. Dabei hatten manche Neugeborene Antikörper gegen nur eines dieser Antigene im Blut, wogegen andere gleich mehrere dieser Antikörper im Blut hatten. Die Antikörper wiederum waren in unterschiedlichen Isoformen wie IgA, IgM und IgG vorhanden. Folglich muss also bereits im Mutterleib ein Antigenkontakt stattgefunden haben, denn nur IgG-Antikörper könnten, weil diese plazentagängig sind, auch von der Mutter stammen. Sind die IgG-Antikörper allerdings tatsächlich Antikörper des Neugeborenen,

so muss der Antigenkontakt bereits im Mutterleib stattgefunden haben und es kommt dann auf die Höhe der IgG-Konzentration und das gleichzeitige Vorhandensein von IgM-Antikörpern und deren Konzentration an, um ungefähr abschätzen zu können, wann der Antigenkontakt stattgefunden hat (Akute Immunantwort durch IgM und verzögerte Immunantwort von IgG bei erstmaligem Antigenkontakt; ab dem zweiten Antigenkontakt wird die Immunantwort hauptsächlich durch IgG vermittelt (Klinke & Silbernagl, 2001, S. 205)). (S. Fredrikson et al., 1991)

Sollte es aufgrund der Entwicklung des ZNS und einer noch nicht voll ausgebildeten bzw. funktionstüchtigen Blut-Hirn-Schranke während der Embryo- und Fetogenese im Mutterleib physiologischerweise zu einem vermehrten Antigenkontakt mit Myelinproteinen wie MBP, PLP und MOG, und zwar, aufgrund der Organogenese und der dabei vielleicht vermehrt zugrundegegangenen Zellen, auch der transmembranen und intrazellulär gelegenen Proteinsequenzen, kommen, so könnte dies doch mit ein Grund für das Vorhandensein solcher Immunglobuline im Nabelschnurblut von Neugeborenen und autoreaktiver Zellen bei gesunden Erwachsenen (Hellings et al., 2001) sein. Zumindest zeigt es, dass solche Zellen und Immunglobuline nicht nur pathologischerweise, sondern sogar, vielleicht aber nicht durchgehend nachweisbar, bei allen Menschen physiologischerweise vorhanden sein könnten und nur unter gewissen Umständen zum Ausbruch der MS-Erkrankung führen. Dies könnte dann natürlich auch für andere Autoimmunerkrankungen so gelten.

Vielleicht spielt das von Cassan & Liblau, 2007 und Korn et al., 2007 beschriebene Gleichgewicht zwischen T-Effektor-Zellen und regulatorischen T-Zellen aber nicht nur bei autoreaktiven T-Zellen eine Rolle, sondern gilt allgemein, also auch für gegen Nicht-Selbst-Antigene gerichtete T-Zellen, die nämlich ebenfalls von regulatorischen T-Zellen supprimiert werden (Vukmanovic-Stejić, 2006), um eine überschießende Im-

munantwort zu verhindern bzw. die Immunreaktion überhaupt wieder zu beenden. Es scheint also gewollt bzw. normal zu sein, dass sowohl autoreaktive als auch gegen Pathogene gerichtete T-Effektor-Zellen in der Blutbahn vorhanden sind, die beide durch naive und/oder die entsprechend spezifischen regulatorischen T-Zellen reguliert bzw. gesteuert und supprimiert werden. Insofern könnte es nicht pathologisch, sondern entsprechend physiologisch normal sein, dass auch autoreaktive T-Zellen im Blut vorkommen, die aber bei Gesunden durch die Regulation des Immunsystems in ihrer Funktionalität ausreichend gehemmt werden und nur bei einer Störung dieser Regulation zur Autoimmunerkrankung führen. Wenn aber in ihrer Funktionalität fehlerhafte regulatorische T-Zellen eine Autoimmunreaktion bedingen, also die überschießende Immunreaktion nicht verhindern können, so müssten sich doch bei Infektionen durch pathogene Keime bei Autoimmunpatienten auch überschießende Immunreaktionen zeigen, vorausgesetzt es ist nicht nur die gegen das spezifische Autoantigen gerichtete regulatorische T-Zellpopulation betroffen.

Die regulatorischen T-Zellen des peripheren Bluts werden aber nicht nur durch eine einzige Zelllinie gebildet, sondern entstehen auch aus sich schnell teilenden, hochdifferenzierten CD4⁺ Gedächtniszellen. Im höheren Alter ist der aus dem Thymus stammende Anteil der regulatorischen T-Zellen gegenüber dem aus CD4⁺ Gedächtniszellen gebildeten Anteil erniedrigt, was natürlich gut zu einem sich mit zunehmendem Alter zurückbildenden Thymus passt. Es hat sich außerdem gezeigt, dass die regulatorischen T-Zellen eine verminderte Expression des Bcl-2-Gens aufweisen, "dessen Produkt den apoptischen Zelltod verhindert" (Löffler & Petrides, 2003, S. 1145) und deshalb vermehrt für die Apoptose anfällig sind. Zudem ist ihre Fähigkeit zur Induktion der Telomerase gering, bei einem gleichzeitig starken Telomerverlust, was alles auf ein kurzes Leben der regulatorischen T-Zellen hindeutet. Die Bildung

von regulatorischen T-Zellen aus den CD4⁺ Gedächtniszellen scheint also den Ersatz der zugrundegegangenen und mit zunehmendem Alter im Thymus vermindert gebildeten regulatorischen T-Zellen und damit ein Gleichbleiben bzw. einen Erhalt des Pools der regulatorischen T-Zellen zu gewährleisten. Bei der in vivo Entstehung von regulatorischen T-Zellen aus CD4⁺25⁻Foxp3⁻ Zellen kommt TGF- β (Transforming Growth Factor) laut Cobbold et al., 2004, Chen et al., 2003 und Kretschmer et al., 2005 eine bedeutende Rolle zu. (Vukmanovic-Stejić et al., 2006)

Aber auch IFN- γ kommt bei der Umwandlung bzw. Differenzierung der CD4⁺25⁻ Zellen zu regulatorischen T-Zellen (CD4⁺25⁺ Zellen), welche durch die Expression von Foxp3 charakterisiert ist, eine wichtige Rolle zu. Nur IFN- γ und TGF- β , sonst aber keine weiteren Cytokine der T_{H1}-Zellen und/oder T_{H2}-Zellen, waren in der Lage, die Expression von Foxp3 in CD4⁺25⁻ T-Zellen und deren damit verbundene Weiterentwicklung zu regulatorischen T-Zellen zu induzieren. Durch die Abwesenheit von IFN- γ lässt sich entsprechend die Expression von Foxp3 deutlich vermindern. Bestätigt wird die wichtige Rolle von IFN- γ auch dadurch, dass ein das IFN- γ blockierender Antikörper die Expression von Foxp3 in CD4⁺25⁻ Zellen und deren Weiterentwicklung zu regulatorischen T-Zellen signifikant hemmt, wobei andere blockierende Antikörper gegen andere Cytokine wie z. B. auch TGF- β diesen Effekt nicht aufweisen. Die Abwesenheit von IFN- γ scheint aufgrund des fehlenden Stimulus zur Expression von Foxp3 mit einer verminderten Zellzahl und Funktionalität von CD4⁺25⁺ regulatorischen T-Zellen einherzugehen, was im Tiermodell dazu führt, dass die Empfänglichkeit für den Erwerb einer EAE (Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis) erhöht und deren Symptomatik bzw. deren Krankheitsschwere verschlimmert ist. Außerdem konnte bei einer in vitro Behandlung von CD4⁺25⁻ Zellen mit IFN- γ eine Weiterentwicklung dieser Zellen zu regulatorischen T-Zellen gezeigt werden. Unterschied-

liche Ergebnisse bezüglich der CD4+25+ regulatorischen T- Zellzahlen könnten damit erklärt werden, dass die CD4+25- T-Zellen bei verschiedenen Individuen durch differierende Mechanismen mit einer unterschiedlichen Anzahl an IFN- γ -Rezeptoren besetzt sind, was folglich zu einer verstärkten (regulatorische T-Zellen steigen) oder abgeschwächten (regulatorische T-Zellen steigen, wenn überhaupt, nur gering) Reaktion der Zellen auf IFN- γ führt. (Wang et al., 2006)

Hier könnte auch ein Fehler bei der Up- und Down-Regulation vorliegen, falls dieser Mechanismus hier vorhanden ist. Durch vermehrte Ausschüttung von IFN- γ und einen über längere Zeit erhöhten IFN- γ -Spiegel z. B. durch ein dauerhaft leicht aktiviertes Immunsystem würde es in der Folge zu einer signifikant erhöhten Foxp3-Expression und entsprechend genauso auch zu einer signifikant erhöhten CD4+25+ regulatorischen T-Zellzahl kommen. Wäre es den CD4+25- T-Zellen aufgrund des Überangebotes von IFN- γ nun möglich, den IFN- γ -Rezeptor herunterzuregulieren, wäre die Möglichkeit einer Normalisierung der Foxp3-Expression und entsprechend der CD4+25+ regulatorischen T-Zellzahlen gegeben. Bei einer fehlenden oder fehlerhaften Downregulation wäre diese Normalisierung nicht möglich. Denkbar wäre ebenfalls bei normalem IFN- γ -Spiegel eine fehlerhaft induzierte Up-Regulation der IFN- γ -Rezeptoren, was ebenfalls zu einer steigenden Foxp3-Expression und regulatorischen T-Zellzahl führen würde. Die dauerhaft erhöhten CD4+25+ regulatorischen T-Zellen könnten sich dann wiederum selbst in ihrer Funktionalität herunterregulieren und außerdem könnten gleichzeitig auch die T-Effektor-Zellen aufgrund des Überangebotes von regulatorischen T-Zellen und deren massiver auf sie einwirkenden Suppressionsfähigkeit durch eine vermehrte Sekretion von Cytokinen wie z. B. IL-6 und TNF, welche die regulatorische T-Zell-Suppressionsfähigkeit ihrerseits hemmen (Korn et al., 2007), der Suppression entgegenwirken. Diese so aufgehobene bzw. abgeschwächte Suppression könnte die Entwicklung einer Autoimmun-

erkrankung ermöglichen. Durch ständiges regulatorisches Reagieren bzw. Entgegenwirken, bis die Gegenregulation wieder überwiegt, könnten, wie ein bei schwerem Seegang auf und ab schwankendes Schiff, die Foxp3-Expression und auch die regulatorischen T-Zellzahlen einmal erhöht und dann wieder erniedrigt sein. Um dies in den Griff zu bekommen, ist eventuell auch an ein therapeutisches Eingreifen bzw. an eine therapeutische Veränderung der IFN- γ -Rezeptorenanzahl zu denken.

Anfängliche Untersuchungen von Putheti et al., 2003 deuteten auch darauf hin, dass die regulatorischen T-Zellen bei MS-Patienten erhöht sind (Huan et al., 2005). Allerdings zeigten sich bei Huan et al., 2005 keine signifikanten Unterschiede bzw. identische Zellzahlen bei den CD4+25+ regulatorischen T-Zellen.

Venken et al., 2006 konnte beim Vergleich der Patienten und Kontrollen, aber auch bei den behandelten und unbehandelten, den RR(Relapsing Remitting)-MS- und den SP(Secondary Progressive)-MS-Patienten keine signifikanten Unterschiede der Zellzahlen bezüglich der CD4+ Zellen anteilig der Lymphozyten, der CD4+25+ Zellen und der CD4+25^{high} Zellen finden. Außerdem konnte bestätigt werden, dass die CD4+25+ Zellen "anergic" sind, nach einer T-Zell-Rezeptor(TCR)-Stimulation mit Anti-CD3 also keine Proliferation zeigen. (Venken et al., 2006)

Auch U. Feger et al., 2007 hat keine signifikanten Differenzen bei der Zellzahl der regulatorischen T-Zellen im peripheren Blut zwischen MS-Patienten und gesunden Kontrollen und weiter auch bei CIS-, RR-MS-, SP-MS- und PP(Primary Progressive)-MS-Patienten aufzeigen können. Allerdings konnte eine signifikant prozentuale Erhöhung der regulatorischen T-Zellen im Liquor cerebrospinalis gegenüber dem Blut von MS-Patienten gezeigt werden. (U. Feger et al., 2007)

Aus dem Thymus stammende, kürzlich emigrierte CD4+ Foxp3- Zellen nehmen bei gesunden Kontrollen mit zunehmendem Alter ab. Bei < 30 J. sind diese Zellen 1/3 der CD4+ T-Zellen, zwischen 30 und 45 J. sind sie signifikant erniedrigt und bei > 45 J. sind sie schließlich am niedrigsten. Bei MS-Patienten dagegen sind die kürzlich emigrierten CD4+ Foxp3- Zellen bei < 30 J. signifikant erniedrigt, bis sie sich bei > 45 J. auf eine Differenz von < 1 % annähern. Aufgrund des sich mit zunehmendem Alter zurückbildenden Thymus ist es verständlich, dass es mit zunehmendem Alter auch zu einer Abnahme dieser kürzlich aus dem Thymus ausgewanderten Zellen kommt. Dies ist aber eben nur bei gesunden Kontrollen der Fall, bei MS-Patienten dagegen sind diese Zellen von < 30 J. bis > 45 J. auf konstant niedrigem Niveau. Wie auch schon von Vukmanovic-Stejjic et al., 2006 dargestellt, nehmen die Gedächtniszellen innerhalb der CD4+ T-Zellen mit dem Alter zu, was bei einem Rückgang der aus dem Thymus stammenden Zellen einer Kompensation gleicht, die dem Erhalt des Zell-pools dient. Die Zunahme der Gedächtniszellen mit dem Alter ist aber auch insofern nachvollziehbar, dass man, je länger man lebt, unweigerlich auch auf immer mehr Pathogene trifft bzw. sich der Schatz der spezifischen Gedächtniszellen bei zunehmenden Kontakten mit Pathogenen im Laufe des Lebens vermehrt. Insofern ist es normal, wenn es mit zunehmendem Alter zu einer Zunahme der Gedächtniszellzahl kommt, einer Art Akkumulation der Pathogeninformation. Bei den MS-Patienten allerdings sind die Gedächtniszellen gegenüber gesunden Kontrollen erhöht. (Haas et al., 2007)

Nicht auszuschließen ist dabei der Erklärungsversuch, dass sich mit zunehmendem Alter bei MS-Patienten auch der Schatz der Autoantigeninformationen in Form spezifischer Gedächtniszellen gegen Autoantigene vermehrt bzw. erhöht.

Die Anzahl der regulatorischen T-Zellen hat sich weder bei Patienten noch bei Kontrollen mit dem Alter verändert und es hat sich zwischen Patienten und gesunden

Kontrollen kein Unterschied bei der Zellzahl der regulatorischen T-Zellen ergeben (Haas et al., 2007).

Interessant ist hierbei die zu Beginn der MS-Erkrankung gesteigerte Krankheitsaktivität (Petereit, 2008, S. 4), die mit dem hier geschilderten signifikanten Unterschied < 30 J. zusammenhängen könnte.

Bei der Differenzierung der Patientengruppe in RR-MS-Patienten und SP-MS-Patienten konnte für die SP-MS-Patienten laut Venken et al., 2006 eine normale regulatorische T-Zell-Funktion gezeigt werden. Bestätigt wird dies auch insofern, dass es bei RR-MS-Patienten zu einer signifikant erhöhten Zellzahl der regulatorischen T-Zellen im Liquor cerebrospinalis gegenüber dem Blut kommt, bei SP-MS-Patienten jedoch nicht. Zudem konnte bei RR-MS-Patienten eine signifikante Erhöhung der laut Huehn, Siegmund & Lehmann et al., 2004, Bradley et al., 1994, Vajkoczy et al., 2001, Brocke et al., 1999 und DeGrendele et al., 1997 für die T-Zell-Migration wichtigen Oberflächenmoleküle Integrin α E (CD103) und Integrin α 4 (CD49d) auf regulatorischen T-Zellen gegenüber gesunden Kontrollen gefunden werden, was auf eine gesteigerte T-Zellwanderung in entzündetes Gewebe (ZNS) hindeutet. Außerdem werden das Integrin α 4 (CD49d) und der Hyaluronsäure-Rezeptor (CD44), der laut Huehn, Siegmund & Lehmann et al., 2004, Bradley et al., 1994, Vajkoczy et al., 2001, Brocke et al., 1999 und DeGrendele et al., 1997 ebenfalls an der T-Zell-Migration beteiligt ist, laut Soilu-Hänninen et al., 2005 während eines Schubes in der gesamten T-Zell-Population vermehrt exprimiert. (K. Venken et al., 2007)

Die meisten regulatorischen T-Zellen im peripheren Blut scheinen spezifische regulatorische T-Zellen mit einer Gedächtnisfunktion für ein bestimmtes Antigen zu sein. Es gibt aber auch naive regulatorische T-Zellen, die laut Valmori et al., 2005, Fritzsching et al., 2006, Seddiki et al., 2006 als eine Art Präkursor-Zellen den regulatorischen

Gedächtnis-T-Zellen vorausgehen. Die naiven regulatorischen T-Zellen zeigen eine hohe Foxp3-Expression und weisen eine gleichwertig starke Suppressionsfähigkeit wie die regulatorischen Gedächtnis-T-Zellen auf. Die naiven regulatorischen T-Zellen nehmen laut Seddiki et al., 2006 im Laufe des Lebens parallel mit der Rückbildung des Thymus ab, wogegen die regulatorischen Gedächtnis-T-Zellen laut Valmori et al., 2005 wesentlich älter werden oder sogar lebenslang vorhanden sind. Die naiven regulatorischen T-Zellen zeigen eine etwas geringere Expression des CD25 als die regulatorischen Gedächtnis-T-Zellen. Es haben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Zellzahlen der naiven regulatorischen T-Zellen und denen der regulatorischen Gedächtnis-T-Zellen aufgezeigt. MS-Patienten im Frühstadium zeigten sowohl bei den naiven regulatorischen T-Zellen als auch bei den regulatorischen Gedächtnis-T-Zellen signifikant erniedrigte Zellzahlen verglichen mit altersentsprechenden Kontrollen. Bei älteren MS-Patienten (chronische MS) sind die regulatorischen Gedächtnis-T-Zellen signifikant erhöht gegenüber denen in der Frühphase der Erkrankung, zeigten aber gegenüber den altersentsprechenden älteren Kontrollen keine Signifikanz mehr. Es scheint also eine positive Korrelation bei den naiven regulatorischen T-Zellen für das Alter der Patienten und bei den regulatorischen Gedächtnis-T-Zellen für die Krankheitsdauer zu geben. Im Frühstadium der MS sind die naiven regulatorischen T-Zellen und die regulatorischen Gedächtnis-T-Zellen sowohl bei den mit IFN- β als auch bei den mit Glatirameracetat therapierten Patienten signifikant erhöht gegenüber gleichaltrigen unbehandelten Patienten. (Venken et al., 2008)

In dieser Arbeit hier konnte dies insofern bestätigt werden, dass die Gruppe Avonex den zweithöchsten und die Gruppe Glatirameracetat den höchsten Mittelwert für die CD4+25+ regulatorischen T-Zellzahlen aufweisen und beide gegenüber allen Kontrollen signifikant erhöht sind.

Der PD1 (Programmed Death receptor 1) ist laut Raimondi et al., 2006 intrazellulär in regulatorischen T-Zellen vorhanden und wird nach Antigenstimulation auf der Zelloberfläche exprimiert (PD1+). Dabei machen die PD1- regulatorischen T-Zellen bei gesunden Kontrollen den Hauptanteil der im Blut zirkulierenden regulatorischen T-Zellen aus. Die PD1- regulatorischen T-Zellen sind im peripheren Blut von Patienten mit stabiler MS signifikant erhöht gegenüber denen von Patienten mit akuter MS und gegenüber denen der gesunden Kontrollen. Außerdem sind diese Zellen auch im Blut von mit Glatirameracetat therapierten Patienten signifikant erhöht gegenüber denen der nicht mit Glatirameracetat therapierten Patienten und gegenüber denen der Patienten mit akuter MS. Gegenüber denen der Patienten mit stabiler MS sind sie aber trotzdem noch signifikant erniedrigt. Die PD1- regulatorischen T-Zellen sind bei mit IFN- β therapierten Patienten auf dem Niveau der nicht mit Glatirameracetat therapierten Patienten und der Patienten mit akuter MS und waren gegenüber den MS-Patienten mit stabiler MS signifikant erniedrigt. Glatirameracetat scheint hier also die bessere Wirkung zu erzielen. (Saresella et al., 2008)

Auch die Bedeutung von Hitze-Schock-Proteinen (HSP) im Zusammenhang mit der MS ist noch nicht abschließend aufgeklärt, sie konnten nämlich laut Brosnan et al., 1996 und Bajramovic et al., 2000 in auffallend erhöhtem Maß in MS-Läsionen nachgewiesen werden. Außerdem konnte eine direkte Verbindung zwischen HSP 70 und MBP, aber auch zu PLP hergestellt werden. Schließlich wurde laut Panjwani et al., 1999 auch noch ein möglicher Zusammenhang einer Überexpression von HSP 73, einem Verwandten des HSP 70, mit der Antigenpräsentation durch MHC-II-Komplexe gefunden. (Cwiklinska et al., 2003)

Sowohl für MBP und PLP, laut Lehmann et al., 1992 und McRae et al., 1995, als auch für MOG gibt es nicht nur ein die Krankheit (EAE) auslösendes bzw. von T-Zellen als Angriffsziel ausgemachtes Epitop, sondern jeweils mehrere Epitope, die sich in der klinischen Ausprägung der EAE aber nicht unterscheiden. (J. Klehmet et al., 2004)

Eine durch MOG 92-106, aber nicht durch MBP 84-96 oder PLP 39-151, induzierte EAE zeigt eine starke B-Zell-Reaktivität, bei der die gebildeten Antikörper gegen multiple Antigenepitope auch von MBP und PLP gerichtet waren. Die Erkrankung bzw. deren Umfang und Aktivität ist also stark abhängig von dem krankheitsauslösenden Antigen (Epitop), so wie hier MOG 92-106, das in der Lage ist, eine umfassende breitangelegte Autoimmunreaktion mit multiplen Epitopen als Angriffspunkte auszulösen. (Bischof et al., 2004)

Im Liquor von MS-Patienten finden sich laut Benveniste, 1997, Sharief & Hentges, 1991 und Maimone et al., 1991 erhöhte Werte von proinflammatorischen Cytokinen verglichen mit gesunden Kontrollen und außerdem zeigten diese Cytokine eine Korrelation mit der Schwere der Erkrankung. Anti-TNF-Antikörper jedoch bewirkten laut The Lenercept Multiple Sclerosis Study Group, 1999 und Robinson et al., 2001 keine Besserung, sondern eine Exazerbation der Erkrankung. Folglich sollte eine Hemmung proinflammatorischer Cytokine wie des TNF- α in entzündetem ZNS von Patienten unterlassen werden. Nur reife Oligodendrozyten zeigen eine Expression (mRNA) von MBP und PLP. Sowohl TNF- α als auch IL-1 β hemmen dosisabhängig die mRNA-Expression von MOG, PLP und CNPase (2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase), wobei TNF- α eine stärkere inhibitorische Wirkung aufweist. MBP, das sowohl auf Myelin im ZNS als auch auf peripherem Myelin vorkommt und dem eine bedeutende Rolle bei der Formation bzw. der Zusammenlegung der

Myelinmembranschichten zukommt, zeigte sich in seiner Expression der mRNA bei derselben Behandlung mit TNF- α und IL-1 β jedoch unbeeindruckt. Die Proteinexpression bestätigt dies. Und auch die Genexpression von MOG, PLP und CNPase wird durch proinflammatorische Cytokine herunterreguliert, was mithilfe von Reaktiven-Sauerstoff-Spezies (ROS) als Signal- oder Effektormoleküle geschieht. Genauer sind wohl Wasserstoffperoxid und seine Derivate bedeutend an dieser Regulation beteiligt, da TNF- α und IL-1 β in Oligodendrozyten die Produktion von H₂O₂ stimulieren und dieses wiederum die Myelinenexpression von MOG, PLP und CNPase in Oligodendrozyten dosisabhängig hemmt. Antioxidantien scheinen hier nützliche Helfer zu sein, um diese Hemmung zu verhindern. Dabei kommt auch Glutathion (GSH) eine wichtige Rolle zu, das aus einem H₂O₂ mittels der GSH-Peroxidase unter Bildung von GSSG zwei H₂O Moleküle (Löffler & Petrides, 2003, S. 552) herstellt. (Jana & Pahan, 2007)

Bezüglich der Wirkungen von Therapeutika soll auch noch kurz auf einzelne Therapien eingegangen werden.

Glatirameracetat, auch als Copolymer-I bzw. Cop-I bezeichnet, ist ein Polymer, bestehend aus den vier Aminosäuren L-Glutaminsäure, L-Lysin, L-Alanin und L-Tyrosin. Glatirameracetat ist laut Hori et al., 2003, Khattri et al., 2003 und Fontenot et al., 2003 fähig, in CD4+25⁻ T-Zellen die Expression des Transkriptionsfaktors Foxp3 zu induzieren und fördert damit folglich auch die Bildung von CD4+25⁺Foxp3⁺ regulatorischen T-Zellen. Der genaue Wirkmechanismus ist dabei noch nicht geklärt. Initial soll die Wirkung laut Aharoni et al., 1998 sowohl über T_{H1}- als auch über T_{H2}-Cytokine vermittelt werden, wobei später laut Musette et al., 1996 und Brod et al., 1997 die T_{H2}-Cytokine überwiegen sollen. Die dabei durch Glatirameracetat entstandenen

regulatorischen T-Zellen sind in ihrer über den MHC-II-Komplex (Teitelbaum et al., 1996 und Fridkis-Hareli et al., 1999) spezifisch vermittelten inhibitorischen Wirkung auf T-Effektor-Zellen nicht nur auf ein Antigen beschränkt, sondern zeigen laut Neuhaus et al., 2001 eine weite Wirkspanne gegenüber mehreren Myelinantigenen (MBP, PLP, MOG). Wie zu erwarten war, zeigten die unbehandelten Patienten ein erniedrigtes Niveau von Foxp3 gegenüber dem Foxp3-Niveau bei mit Glatirameracetat behandelten Patienten. Dieses blieb allerdings unter dem Foxp3-Niveau der gesunden Kontrollen. Der Effekt der Bildung von regulatorischen T-Zellen aus CD4+25- T-Zellen über eine induzierte Expression von Foxp3 wird in Anwesenheit eines T-Zell-Stimulus (Anti-CD3) vor allem durch IFN- γ vermittelt, zu einem geringen Anteil aber auch durch TGF- β , allerdings nur in Kombination mit IFN- γ , nicht alleine. In Abwesenheit des T-Zell-Stimulus (Anti-CD3) gelingt die Vermittlung dieses Effekts nur noch IFN- γ . Entsprechend kann dieser Effekt durch einen gegen IFN- γ gerichteten Antikörper aufgehoben bzw. gehemmt werden, aber nicht durch Antikörper gegen andere durch Glatirameracetat beeinflusste Cytokine. Mit rekombinantem Interferon- γ (rIFN- γ) behandelte CD4+ T-Zellen zeigten außerdem eine vermehrte Expression von Foxp3. Die immense Bedeutung von IFN- γ wird auch dadurch nochmals unterstrichen, dass das Ausschalten des für die IFN- γ -Signaltransduktion wichtigen Moleküls STAT-1 (Signal Transducer and Activator of Transcription-1) bei Mäusen laut Nishibori et al., 2004 zur Entwicklung einer spontanen EAE führt. (Hong et al., 2005)

Die durch Glatirameracetat vermittelte Stimulation zur Bildung von CD4+25+ regulatorischen T-Zellen konnte in dieser Arbeit bestätigt werden, da die Gruppe Glatirameracetat bei den CD4+25+ Zellen sowohl in Prozent der Lymphozyten mit 4,24 % als auch in absoluten Zellzahlen mit durchschnittlich 78 Zellen die höchsten Werte überhaupt aufweist. Und auch die Foxp3-Zellzahl weist hier mit 6,66 % einen

relativ hohen Wert auf, der allerdings nicht höher ist als der Mittelwert der Patienten insgesamt. Im Gegensatz zu den Ergebnissen dieser Arbeit konnte Y. Jee et al., 2007 bei seinen Untersuchungen lediglich eine erhöhte Foxp3-Expression, jedoch keine Beeinflussung der regulatorischen T-Zellzahlen durch Glatirameracetat feststellen. Die Gruppe Glatirameracetat zeigt hier aber noch weitere Signifikanzen mit jeweils den höchsten und den niedrigsten Werten der jeweiligen Zellpopulation und ist damit wahrscheinlich die interessanteste Gruppe der Medikamentengruppen, zumindest zeigen sich bei ihr die Extreme. So zeigt die Gruppe Glatirameracetat bei den CD16/56+ Zellen (NK-Zellen) mit 23,49 % und bei den CD4+ Zellen und CD4+25+ Zellen anteilig der CD3+ Zellen mit 95,65 % und 9,25 % ihren jeweils höchsten Wert im Vergleich aller Mittelwerte dieser Zellpopulationen. Auf der anderen Seite haben bei der Gruppe Glatirameracetat die Zellfraktionen der CD3+ Zellen anteilig der Lymphozyten mit 46,41 % und die Zellfraktion der CDDR+ Zellen anteilig der CD4+25+ Zellen mit 17,62 % ihren jeweils niedrigsten Wert im Vergleich aller Mittelwerte dieser Zellpopulationen.

Die Therapie mit Natalizumab und die folgende Besetzung der $\alpha 4$ -Kette des $\alpha 4\beta 1$ - (very late activation antigen; VLA-4) und des $\alpha 4\beta 7$ -Integrins auf Leukozyten mit Antikörpern verhindert die Bindung der besetzten Integrine an VCAM-1 auf Endothelzellen und laut Ransohoff, 2007 und Stuve & Bennett, 2007 damit die Migration von T-Effektor-Zellen in entzündetes ZNS. Laut Niino et al., 2006 und Stuve et al., 2006 wird vor allem das Auswandern von CD4+ und CD8+ T-Zellen aus der Blutbahn ins ZNS verhindert. Diskutiert wird aber auch ein direkter Effekt von Natalizumab auf die T-Zelle, da für VLA-4 laut Mittelbrunn et al., 2004, Sato et al., 1995 und Niino et al., 2006 eine Co-Stimulation von Signalen und damit eine eventuelle Modulation der CD4+ T-Zell-Aktivität gezeigt werden konnte. Natalizumab bindet signifikant mehr an

CD8+ T-Zellen als an CD4+ T-Zellen. Außerdem ist die Bindung von Natalizumab an CD4+Foxp3+ regulatorische T-Zellen gegenüber der Bindung an CD4+Foxp3- Zellen signifikant vermindert. Passend dazu ist die Expression des α 4-Integrins (CD49d) auf den CD4+Foxp3+ Zellen deutlich erniedrigt gegenüber dessen Expression auf den CD4+Foxp3- Zellen. Beides trifft sowohl auf MS-Patienten als auch auf gesunde Kontrollen zu. Zu Beginn der Therapie mit Natalizumab konnte ein signifikanter Abfall der Expression von CD49d auf allen Immunzellpopulationen festgestellt werden, was aufgrund der plötzlich gesteigerten Bindung an das α 4-Integrin durch die Natalizumab-Therapie einer Downregulation gleichkommt. Dieser Abfall der Expression des CD49d fällt bei den CD4+Foxp3- Zellen signifikant stärker aus als bei den CD4+Foxp3+ Zellen. All dies könnte darauf hindeuten, dass bei der Therapie mit Natalizumab die Migration der regulatorischen T-Zellen über die Blut-Hirn-Schranke nicht so stark beeinflusst wird wie die der T-Effektor-Zellen, was bei dieser Therapie natürlich vorteilhaft wäre. Unabhängig von einer Therapie, also egal ob mit Natalizumab therapiert wird oder nicht, zeigt sich tatsächlich, dass sich die Zahl der emigrierten CD4+Foxp3+ regulatorischen T-Zellen nicht verändert. Vielleicht werden ja aber die CD4+Foxp3- (T-Effektor-) Zellen in ihrer Migration vermehrt gehemmt, da diese schließlich auch signifikant mehr CD49d auf ihrer Zelloberfläche exprimieren, die durch die Therapie auch vermehrt besetzt sind. Die Zellzahl der regulatorischen T-Zellen im peripheren Blut wurde durch die Therapie mit Natalizumab nicht beeinflusst, wogegen die absolute Lymphozytenzahl im peripheren Blut durch die Therapie laut Polman et al., 2006 und Rudick et al., 2006 erhöht wird. Die durch die Therapie vermutete direkte Beeinflussung der CD4+25+ regulatorischen T-Zellen, die eine normale Suppressionsfähigkeit zeigen, konnte insofern nicht bestätigt werden. (Stenner et al., 2008)

Eine im peripheren Blut durch die Therapie mit Natalizumab erhöhte absolute Lymphozytenzahl konnte in dieser Arbeit mit dem höchsten Wert überhaupt (2014) bestätigt werden. Und auch der nicht vorhandene Einfluss der Therapie mit Natalizumab auf die regulatorischen T-Zellen findet, soweit eine Beurteilung hier möglich ist, Bestätigung. Aufgrund der fehlenden bzw. verminderten Migration der Zellen ins ZNS kommt es wahrscheinlich auch nicht, wie wegen der signifikant erhöhten IFN- γ -Sekretion bei den mit Natalizumab therapierten Patienten unter 4.5 vermutet, zu einem erhöhten Risiko für ein Schubereignis. Trotzdem ist die IFN- γ -Sekretion bei mit Natalizumab therapierten Patienten außerhalb des ZNS signifikant verstärkt, so dass das Immunsystem dort auf entsprechende Reize mit unabsehbaren Folgen wesentlich stärker reagiert. Die Immunantwort wird also nicht unterdrückt, sondern nur aus dem ZNS heraus in das Blut und eventuell in die Peripherie verschoben.

Bei der Therapie mit Interferon β kommt es laut K. Venken et al., 2007 bei den therapierten Patienten zu einer signifikanten Erhöhung der Foxp3+ Zellzahlen. Dies konnte hier bestätigt werden, da die mit Avonex therapierten Patienten den mit 7,85 % (absolut 57) höchsten Mittelwert der Foxp3+ Zellen überhaupt aufweisen.

Eine prophylaktische Immunglobulin-Therapie (IV Ig) konnte eine ZNS-Infiltration durch T-Effektor-Zellen bei Mäusen verhindern und außerdem die Bildung von regulatorischen T-Zellen induzieren, da es bei mit Immunglobulinen behandelten Mäusen zu einer Verdoppelung der regulatorischen T-Zellen kam, wobei diese Expansion mit einem TCR-Stimulus kombiniert war (z. B. MOG). Der durch eine Immunglobulin-Therapie vermittelte Schutz geht auf die regulatorischen T-Zellen zurück, da es ohne regulatorische T-Zellen trotz Therapie zur Ausbildung einer EAE kommt. (Ephrem et al., 2008)

Im Zentrum der Akuttherapie der MS steht die Therapie mit Glukokortikoiden. Die Glukokortikoide induzieren laut Chen et al., 2006 die IL-2 abhängige Vermehrung der regulatorischen T-Zellen bei Patienten und deren suppressive Fähigkeit. Karagiannidis et al., 2004 konnte für Asthmapatienten zeigen, dass die Glukokortikoide die Anzahl und Funktion von regulatorischen T-Zellen steigern lassen. Die Wirkung der Glukokortikoide auf die regulatorischen T-Zellen könnte laut Lamas, Sanz & Martin-Parras et al., 1993 mit einer durch Glukokortikoide induzierten Hochregulation des IL-2-Rezeptors (CD25) und einer damit einhergehenden erhöhten Expression des CD25 auf der Zelloberfläche der regulatorischen T-Zellen erklärt werden. Nach einer in vitro Behandlung von PBMCs mit Dexamethason konnte ein Anstieg der CD25 mRNA nachgewiesen werden. Es zeigt sich ein signifikanter Anstieg der Prozenz der regulatorischen T-Zellen 48 Stunden nach der Gabe von IVMP (intravenöses Methylprednisolon), wogegen zu 6 Wochen nach dieser Gabe kein Unterschied mehr besteht. Dabei unterscheiden sich die mit Basistherapeutika therapierten und nicht therapierten Patienten nicht. Wie zu erwarten war, verhält sich Foxp3 hier parallel zu den regulatorischen T-Zellen. Es lässt sich außerdem ein parallel zu den regulatorischen T-Zellen signifikanter Anstieg der Sekretion von IL-10 bestimmen, der aber nicht zweifelsfrei den regulatorischen T-Zellen zuzuordnen war. Die Ausschüttung von IL-6, welches laut Pasare & Medzhitov, 2003 und Suttmüller et al., 2006 beispielsweise bei Infektionen nach Toll-like-Rezeptor(TLR)-Ligandenbindung eine Hemmung der Suppressionsfähigkeit von regulatorischen T-Zellen vermittelt und so einen Schub auslösen kann, zeigte jedoch keine signifikanten Unterschiede. (Braitch et al., 2008)

Bei gleich mehreren Autoren also konnten bei den Zellzahlen der regulatorischen T-Zellen keine signifikanten Unterschiede gefunden werden (Huan et al., 2005)

(Venken et al., 2006) (Haas et al., 2007) (Braithc et al., 2008). Lediglich Putheti et al., 2003 konnte bei seinen Untersuchungen eine erhöhte CD4+25+ Zellzahl aufzeigen. Im Schub dagegen konnten signifikant erhöhte Prozente von CD4+25+ Zellen bei Patienten gegenüber gesunden Kontrollen gefunden werden, wobei die regulatorischen T-Zellen der Patienten zu 100 % HLA-DR exprimierten (J. Navarro et al., 2006). Auch im Liquor cerebrospinalis wurden signifikant erhöhte Zellzahlen der regulatorischen T-Zellen gegenüber dem Blut von MS-Patienten gefunden (U. Feger et al., 2007). Werden die MS-Patienten nun in jüngere und ältere Patienten bzw. in Patienten der Frühphase und chronische Patienten (Venken et al., 2008) oder in Patienten mit stabiler MS und akuter MS mit dem zusätzlichen Marker PD1 (Saresella et al., 2008) eingeteilt, so lassen sich doch signifikante Unterschiede finden.

Ohne eine Unterteilung vorzunehmen konnte in dieser Arbeit bei allen Patienten gegenüber allen Kontrollen eine hoch signifikante Erhöhung der CD4+25+ regulatorischen T-Zellen in Prozent der Lymphozyten und eine signifikante Erhöhung in Prozent der CD3+ Zellen gezeigt werden und damit die bereits von Putheti et al., 2003 demonstrierte Erhöhung der regulatorischen T-Zellen und die bei Saresella et al., 2008 gezeigte signifikante Erhöhung der PD1- regulatorischen T-Zellen bei Patienten mit stabiler MS bestätigt werden. Obwohl sich hier in dieser Arbeit keine Signifikanzen bei den absoluten Zellzahlen der regulatorischen T-Zellen ergeben, so tun sich nach Unterteilung der Patienten und Kontrollen in verschiedene Gruppen doch weitere multiple Signifikanzen in Prozent auf, die in einer Häufigkeit und in einem erkennbaren Muster auftreten, dass von Zufall oder einer einmaligen nicht wiederholbaren Gegebenheit keine Rede sein kann. Ich bin überzeugt davon, vorausgesetzt man hält sich an die Methodik, dass sich dies jederzeit wiederholen bzw. bestätigen lässt.

CD8+ Zellen

Bei der MS-Entstehung wird aber auch eine virale Beteiligung diskutiert. Zunächst wurde von Medana et al., 2001 beschrieben, dass die MHC-I-Expression im ZNS von MS-Patienten höher ist als die des MHC-II und dass die CD8+ T-Zellen (cytotoxische T-Zellen) laut Babbe et al., 2000, Jacobsen et al., 2002 und Skulina et al., 2004 nach Antigenpräsentation in Entzündungsherden des ZNS proliferieren. Die Immunantwort der cytotoxischen T-Zell-Lymphozyten auf den JC-Virus (Polyomavirus), der bei 85 % der gesunden Kontrollen im ZNS eine latente Infektion hervorruft, war bei MS-Patienten stärker ausgeprägt als die Immunantwort auf MBP_{p110} und PLP_{p45}. Gleichzeitig war die Immunreaktion bei MS-Patienten stärker ausgeprägt als bei gesunden Kontrollen. Es scheint außerdem noch einen Zusammenhang zu einer durch eine Natalizumab-Therapie ausgelösten PML zu geben, da in PML-Läsionen hauptsächlich CD8+ T-Zellen, die sich an JC-Virus-infizierte Gliazellen anlagern (Wüthrich et al., in press), gefunden wurden. Eventuell kommt es nach einer durch die Therapie mit Natalizumab bedingten verminderten Migration von CD8+ T-Zellen ins ZNS zu einer Reaktivierung der JC-Infektion und in deren Folge schließlich zur gefürchteten PML. (R.A. Du Pasquier et al., 2006)

Dafür würde jedenfalls auch sprechen, dass Natalizumab laut Stenner et al., 2008 signifikant stärker an CD8+ Zellen bindet als an CD4+ Zellen.

Die CD8+ Zellen können die Blut-Hirn-Schranke laut Battistini et al., 2003 mithilfe exprimierter Adhäsionsmoleküle wie beispielsweise P-Selektin Ligand effektiv überqueren. (D.-A. Laplaud et al., 2006)

Entsprechend finden sich in MS-Läsionen laut Lucchinetti et al., 2000 auch CD8+ T-Zellen. (J. Navarro et al., 2006)

Die CD8+ T-Zellen infiltrieren laut Skulina et al., 2004, Babbe et al., 2000 und Jacobsen et al., 2002 bevorzugt die Läsionen der weißen Substanz und können sowohl im Liquor als auch im Blut verweilen. Über direkte Cytotoxizität oder lokale Ausschüttung von proinflammatorischen Cytokinen können laut Huseby et al., 2001 und Sun et al., 2001 MBP- oder MOG-spezifische CD8+ T-Zellen von immunisierten Tieren nach Transfer in Ratten eine Enzephalomyelitis induzieren. Im Blut von MS-Patienten und gesunden Kontrollen hat sich kein signifikanter Unterschied bei der Zellzahl von CD8+ T-Zellen, genauer von autoreaktiven CD8+ T-Zellen, finden lassen. (Laureline Berthelot et al., 2008)

Hier konnte dies nicht bestätigt werden, da die gesunden Kontrollen hier signifikant mehr absolute CD8+ T-Zellen haben als die Patienten, wobei dies vor allem durch die signifikant erhöhte Zellzahl der CD8+ Zellen der weibl. Kontrollen verursacht wird. Und auch in Prozent der CD3+ Zellen haben die gesunden Kontrollen einen signifikant erhöhten Prozentsatz an CD8+ T-Zellen. Außerdem bestehen zusätzlich nach Unterteilung der Patienten und Kontrollen in verschiedene Gruppen noch weitere multiple Signifikanzen die CD8+ T-Zellpopulation betreffend.

CD19+ Zellen

Laut Sospedra & Martin, 2005 sind nicht nur T-Zellen an der schädlichen Immunreaktion bei der MS beteiligt, sondern auch B-Zellen. (C. Cassan & R. S. Liblau, 2007)

Hier konnte bezüglich quantitativer Unterschiede der B-Lymphozyten zwischen MS-Patienten und gesunden Kontrollen, aber auch nach weiterführenden Vergleichen zwischen gebildeten Untergruppen, jedoch keine Signifikanz aufgedeckt werden.

CD16/56+ Zellen

Bezüglich der NK-Zellen (Natürliche Killer-Zellen) gibt es eine Parallelität zur Schubrate während der Schwangerschaft. Im dritten Trimenon der Schwangerschaft kommt es zu einem signifikanten Abfall der Schubrate, die allerdings nachgeburtlich dafür erhöht ist. Die CD16/56+ (NK-Zellen) Zellpopulation verläuft hier parallel, im dritten Trimenon gibt es einen Abfall dieser Zellpopulation, wogegen es nach der Geburt zu einem Anstieg kommt. Dieses Verhalten der NK-Zellen ist auch bei gesunden Schwangeren zu beobachten. Im Gegensatz zu den natürlichen Killerzellen zeigen die regulatorischen T-Zellen beim Vergleich Schwangerschaft zu nachgeburtlich keine Unterschiede. Interessant ist auch, dass die natürlichen Killerzellen eine regulatorische Fähigkeit besitzen, mit der sie laut Bielekova et al., 2006 dazu befähigt sind, die Überlebensfähigkeit aktivierter T-Zellen zu begrenzen bzw. einzuschränken. Außerdem geht klinischen Schüben laut Kastrukoff et al., 2003 und Infante-Duarte et al., 2005 eine verminderte cytotoxische NK-Zell-Aktivität voraus. NK-Zellen scheinen dabei eine inhibitorische Wirkung auf die Aktivierung von autoreaktiven T-Zellen zu haben, die dann entsprechend vor einem Schub nachlässt. Durch die Hochregulation des Zell-Zyklus-Inhibitors p21 hemmen die CD16/56+ Zellen laut Trivedi et al., 2005 auch noch die T-Zell-Proliferation. Um ihre Funktion auszuüben, muss der beladene MHC-Komplex von natürlichen Killerzellen nicht einmal erkannt werden, was im Gegensatz zu vielen anderen Zellen steht, die den beladenen MHC-Komplex zur Ausübung ihrer jeweiligen Funktion erkennen müssen. Laut Perini et al., 2000 und Saraste et al., 2007 verändert sich außerdem die Zellzahl an NK-Zellen durch eine IFN- β -Therapie. (L. Airas et al., 2007)

Eine entsprechend signifikante Veränderung der NK-Zellzahlen konnte hier weder für Rebif noch für Avonex gezeigt und diese Aussage damit nicht bestätigt werden.

Bei Abwesenheit von NK-Zellen (CD16/56+) kommt es zu einem ausgeprägten Anstieg an CD25+ T-Zellen. (Hellings et al., 2001)

Außerdem steuern die CD4+25+ regulatorischen T-Zellen laut Azuma et al., 2003, Sakaguchi, 2004, Ghiringhelli et al., 2005 und Lim et al., 2005 nicht nur die Aktivität der CD4+ T-Zellen, der CD8+ T-Zellen und der B-Lymphozyten, sondern auch die der NK-Zellen (Natürliche Killer-Zellen). (C. Cassan & R. S. Liblau, 2007)

Insofern ist es interessant, dass die Zellpopulation der natürlichen Killerzellen in dieser Arbeit vor allem im Zusammenhang mit der Gruppe Glatirameracetat einige Signifikanzen aufweist. So zeigt die Gruppe Glatirameracetat z. B. bei den CD16/56+ Zellen (NK-Zellen) mit 23,49 % den höchsten Mittelwert dieser Zellpopulation, was bei einer durch NK-Zellen vermittelten inhibitorischen Wirkung auf die Aktivierung von autoreaktiven T-Zellen (L. Airas et al., 2007) einen für die Therapie der MS ganz klar positiven bzw. vorteilhaften Effekt hat.

CD69+ Zellen

Die hier verwendete Literatur hat bezüglich der CD69+ Zellen (aktivierte T-Zellen) keine Aussagen getroffen. Es konnten allerdings auch keinerlei Signifikanzen bezüglich dieser Zellpopulationen gefunden werden.

CDDR+ Zellen

Und auch über eventuell differierende Zellzahlen der CDDR+ Zellen hat sich diese Literatur hier nicht ausgelassen. Jedoch konnten bei dieser Arbeit signifikante Unterschiede bezüglich der CDDR+ Zellen in Prozent der CD4+25+ regulatorischen T-Zel-

len bei der Gruppe Glatirameracetat und der Gruppe Avonex bzw. der Gruppe Interferon β -1a gesamt gegenüber den gesunden Kontrollen gefunden werden.

Unterschiedliche Zellzahlen bei Gesunden

Die signifikant höheren Prozente der CD4+ Zellen anteilig der Lymphozyten bei den weibl. Kontrollen gegenüber den männl. Kontrollen, die in dieser Arbeit hier gefunden wurden, sind natürlich sehr interessant und sollten unbedingt nochmals bestätigt werden. Dabei sollten die Zellpopulationen der gesunden Geschlechter genauer unter die Lupe genommen werden.

Interessant ist auf jeden Fall auch, dass bei einer tatsächlich vorhandenen Differenz der Zellzahlen zwischen weibl. und männl. Kontrollen, also zwischen den Geschlechtern bei Gesunden, dies mit dem Hormonstatus der jeweiligen Geschlechter zu tun haben muss. Dies lässt sich daraus folgern, dass die unterschiedliche Häufigkeit der Krankheit MS bei den Geschlechtern vom Alter abhängig ist, da vor der Pubertät bei mit MS erkrankten Kindern kein signifikanter Unterschied zwischen weibl. und männl. Kindern auszumachen ist, sondern diese differente Geschlechterverteilung der MS bzw. das erhöhte Risiko für das weibl. Geschlecht an einer MS zu erkranken erst nach der Pubertät bzw. dann bei Erwachsenen signifikant wird (Stark & Gärtner, 2011). Wenn also eine Zellzahldifferenz bei gesunden Erwachsenen vorliegt, so sollte diese höchst wahrscheinlich durch den differenten Hormonstatus und dadurch noch nicht bekannte Auswirkungen auf die Zellzahlverteilung, Zellzahlproduktion (Genese von Zellen) oder auch auf die Lebensdauer der einzelnen Zellen zwischen den Geschlechtern verursacht werden. Sollten sich diese geschlechterspezifischen Zellzahlen bzw. die Unterschiede der Zellzahlen einzelner Zellpopulationen bei den gesunden Geschlechtern bestätigen, so könnte dies eine mögliche

Begründung bzw. eine mögliche Ursache für eine unterschiedliche Häufigkeitsverteilung von Erkrankungen, also auch der MS, bzw. für ein höheres Risiko eines Geschlechts, eine bestimmte Erkrankung zu entwickeln, sein. Die unterschiedlichen Zellzahlen von Zellpopulationen könnten folglich das Auftreten einer Erkrankung begünstigen oder erschweren. Womit man auch schon bei einer möglichen therapeutischen Einflussnahme bzw. Veränderung der Zellzahlen einer oder mehrerer Zellpopulationen bei dem jeweiligen Geschlecht angelangt wäre, um bei bestimmten anderen vorhandenen Risikofaktoren, wie beispielsweise einem begünstigenden genetischen Status und/oder ein an MS erkranktes Familienmitglied und einem damit verbundenen erhöhten Risiko an einer MS zu erkranken, dem Entstehen dieser Erkrankung, hier der MS, entgegenwirken zu können. Eine solche therapeutische Maßnahme könnte dann für einen bestimmten Zeitraum bzw. bis zu einem gewissen Alter oder auch lebenslang wahrgenommen werden. Interessant zu wissen wäre dann natürlich auch, ob eine entsprechende Zellzahldifferenz unter Gesunden auch schon vor der Pubertät vorhanden ist. Mit den hier angestellten Folgerungen und aufgrund der nicht vorhandenen unterschiedlichen Häufigkeitsverteilung der MS bei den Geschlechtern im Kindesalter (Stark & Gärtner, 2011), müsste man dies verneinen. Ethisch und moralisch wäre ein solcher Nachweis, also Blutentnahmen bei gesunden Kindern zur Überprüfung dieser These, allerdings nicht zu verantworten. Die nächste interessante Frage bezüglich des unterschiedlichen Zellstatus zwischen den gesunden Geschlechtern ist die Frage nach einem solchen im höheren bis hohen Alter, da sich im Alter bekanntermaßen die Hormonproduktion wieder verändert bzw. verringert. Schließlich stellt sich diesbezüglich auch noch eine viel interessantere Frage. Gibt es beim gesunden Individuum im Laufe des Lebens unabhängig von Erkrankungen einen sich verändernden Zellstatus, also sich verändernde Zellpopulationen, und wenn ja, wenn also ein Zusammenhang zwischen sich verändernden Zellzahlen

einzelner Zellpopulationen und dem Altern vorhanden wäre, müsste man sich doch fragen, ob diese Veränderungen nicht nur mit dem Altern oder einem sich verändernden Hormonstatus einhergehen, sondern ob diese Veränderungen umgekehrt einen Anteil, wenn nicht sogar den Hauptanteil, an der Alterung des Individuums haben, also eigentliche Ursache für das Altern des Menschen sind. Dann jedenfalls könnte ein therapeutisches Eingreifen in den zum jeweiligen Alter aktuellen Zellstatus das therapeutische Ziel verfolgen, diesen aktuellen Zellstatus bzw. das aktuelle Zellniveau zu halten und damit die fortschreitende Alterung des Menschen, wenn nicht zu verhindern, zumindest zu verlangsamen. Insofern wäre es zumindest interessant, gesunde Individuen eines unterschiedlichen Erwachsenenalters und Geschlechts daraufhin zu untersuchen.

Bezüglich einer Beeinflussung der Ergebnisse der FACS-Analyse durch Zumischung von Leukozyten bzw. Monozyten nach einer eventuell zu großzügigen Gatesetzung auf die Lymphozytenzellfraktion, wie unter 4.1 bereits angedeutet, hat sich aus dieser Literatur heraus diesbezüglich keine Information ergeben.

5.2 Foxp3 in funktionsfähigen regulatorischen T-Zellen

Die Differenzierung von CD4+25⁻ Zellen zu CD4+25⁺ regulatorischen T-Zellen ist laut Fontenot et al., 2003, Walker et al., 2003, Sakaguchi, 2003, Khattri et al., 2003 und Hori et al., 2003 charakteristisch gekennzeichnet durch die Expression des Transkriptionsfaktors Foxp3. Wichtig ist dabei, dass es auch CD4+25⁺ T-Zellen ohne regulatorische Funktion gibt. Die CD4+25⁺ T-Zellen mit regulatorischer Funktion lassen sich nur über eine hochpositive Gatesetzung auf CD25, also CD4+25^{high}, oder eben durch die Expression des Foxp3 ausmachen. Eine bedeutende Rolle nehmen

bei dieser Umwandlung der Zellen hin zu regulatorischen T-Zellen IFN- γ und TGF- β ein. (Wang et al., 2006)

Der Transkriptionsfaktor Foxp3 scheint laut Fontenot et al., 2003, Hori et al., 2003, Khattri et al., 2003 und Ramsdell, 2003 ein Hauptsteuermechanismus für die Cytokin-Produktion bzw. Cytokin-Sekretion und den Zell-Zell-Kontakt zu sein, welche für den suppressiven Effekt der regulatorischen T-Zellen gegenüber der T-Effektor-Zell-Aktivität sorgen. Die Abwesenheit dieses Transkriptionsfaktors in Foxp3 $-/-$ Mäusen führt laut Fontenot et al., 2003 zu einer ausgeprägten Lymphozytenproliferation mit Autoimmunstatus. (Huan et al., 2005)

Werden die MS-Patienten in RR(Relapsing Remitting)- und in SP(Secondary Progressive)-MS-Patienten aufgeteilt, so zeigt sich bei den RR-MS-Patienten eine signifikant erniedrigte Foxp3 mRNA-Expression gegenüber gesunden Kontrollen und gegenüber SP-MS-Patienten. Bei SP-MS-Patienten ist die Foxp3 mRNA-Expression dagegen nicht erniedrigt, sondern befindet sich auf dem Niveau der gesunden Kontrollen. (Venken et al., 2006)

Betrachtet man die Foxp3 Expression pro regulatorischer T-Zelle, so zeigt sich bei RR-MS-Patienten auch pro Zelle eine signifikant erniedrigte Foxp3 Expression gegenüber gesunden Kontrollen. Auch bei SP-MS-Patienten gab es eine Verminderung, allerdings ohne Signifikanz. Außerdem konnte eine positive Korrelation der Foxp3 Expression und der Suppressionsfähigkeit der regulatorischen T-Zellen bzw. eine positive Korrelation zwischen der Anzahl der Foxp3 $+$ Zellen und der Suppression gezeigt werden, was die Wertigkeit des Markers Foxp3 für regulatorische T-Zellen (CD4+25 $^{\text{high}}$) dick unterstreicht. Zudem konnten laut Bassuny et al., 2003 Gen-

polymorphismen für Foxp3 in der japanischen Bevölkerung eine Verbindung zur Erkrankungsempfänglichkeit für Typ I Diabetes herstellen. (K. Venken et al., 2007)

Parallel zu einer signifikant erhöhten CD4+25+ regulatorischen T-Zellzahl im Liquor cerebrospinalis war bei MS-Patienten verglichen mit deren Blut auch die Foxp3 Expression im Liquor cerebrospinalis signifikant erhöht. (U. Feger et al., 2007)

K. Venken et al., 2007 konnte diese signifikant erhöhte CD4+25^{high} Zellzahl und Foxp3 Expression im Liquor cerebrospinalis auch für RR-MS-Patienten zeigen. Bei SP-MS-Patienten dagegen war dies nicht der Fall. Offenbar kommt es nur bei RR-MS-Patienten zu einer Akkumulation von regulatorischen T-Zellen im ZNS bzw. im Liquor cerebrospinalis. (K. Venken et al., 2007)

Foxp3 scheint laut Bettelli et al., 2005 außerdem andere für Entzündungsprozesse wichtige Transkriptionsfaktoren, wie beispielsweise NF-κB, zu hemmen. (Braith et al., 2008)

Bei der Behandlung von Mäusen mit Östrogen konnte sowohl eine erhöhte CD25+ T-Zellzahl als auch eine gesteigerte Foxp3 Expression gezeigt werden, wobei die Fähigkeit von Östrogen zum Schutz vor einer EAE mit seiner Fähigkeit die Foxp3 Expression zu steigern korreliert. Außerdem wird die Foxp3 Expression durch eine Östrogenbehandlung und eine Schwangerschaft im gleichen Maß gesteigert. (Offner & Polanczyk, 2006)

Der Einfluss der medikamentösen Therapien auf die Expression des Foxp3 steht natürlich in engem Zusammenhang mit der Zellzahl der CD4+25+ regulatorischen T-Zellen und wurde entsprechend schon unter 5.1 analysiert.

Mehrere Autoren berichten übereinstimmend über bei MS-Patienten signifikant erniedrigte Foxp3+ Zellzahlen und eine erniedrigte Foxp3-Produktion bzw. Expression (Viglietta et al., 2004) (Jürgen Haas et al., 2005) (Huan et al., 2005) (Venken et al., 2006). Dies konnte in dieser Arbeit hier nicht bestätigt werden. Vielmehr ist die Foxp3+ Zellzahl anteilig der CD3+4+ Zellen bei allen Patienten gegenüber allen Kontrollen hoch signifikant erhöht, was passend zur hoch signifikant erhöhten CD4+25+ regulatorischen T-Zellzahl anteilig der Lymphozyten und zur signifikant erhöhten CD4+25+ regulatorischen T-Zellzahl anteilig der CD3+ Zellen ein stimmiges Bild abbildet, zumal sich auch bei Foxp3 nach Aufteilung der Patienten und Kontrollen in verschiedene Gruppen weitere Signifikanzen ergeben, die wie schon die CD4+25+ regulatorischen T-Zellen eine Häufigkeit und ein Muster erkennen lassen, das sicherlich wiederholbar ist und ein stimmiges Gesamtbild abrundet. Schließlich zeigen sich nach der weiteren Aufteilung der Patienten und Kontrollen auch noch signifikante Unterschiede bei den absoluten CD3+4+ Zellzahlen.

Sehr interessant ist, dass auch bei den Foxp3+ Zellen ein sogar hoch signifikanter Unterschied zwischen den weibl. und männl. Kontrollen besteht, bei dem die männl. Kontrollen mehr Foxp3+ Zellen in Prozent der CD3+4+ aufweisen als die weibl. Kontrollen und damit fraglich auch mehr CD4+25+ T-Zellen mit regulatorischer Funktion (Wang et al., 2006) besitzen, was eine Bevorzugung des weibl. Geschlechts bei der MS natürlich begünstigen könnte.

5.3 Suppressionsfähigkeit der CD4+25+ regulatorischen T-Zellen

Bei MS-Patienten ist die Fähigkeit der CD4+25+ regulatorischen T-Zellen zur Suppression der Proliferation der CD4+25- T-Zellen (T-Effektor-Zellen) abgeschwächt. (U. Feger et al., 2007)

Die bekannte Fähigkeit der CD4+25+ regulatorischen T-Zellen zur Suppression der CD4+ T-Effektor-Zellen bzw. zur Inhibition deren Aktivität kommt laut Shevach, E.M., 2002, Sakaguchi, S., 2004 und Coombes et al., 2005 nicht nur gegenüber autoreaktiven CD4+ T-Effektor-Zellen, sondern auch gegenüber nicht gegen Selbst-Antigene gerichteten CD4+ T-Effektor-Zellen zum Einsatz. (Vukmanovic-Stejic et al., 2006)

Dabei wird die suppressive Wirkung der CD4+25+ regulatorischen T-Zellen laut Bach, 2003 durch Cytokine wie IL-10 und TGF- β , das Vitamin D3 und/oder durch direkten Zell-Zell-Kontakt vermittelt. (J. Navarro et al., 2006)

Bei der Vermittlung der Suppression durch CD4+25+ regulatorische T-Zellen spielt laut Hori et al., 2003 und Zhang et al., 2004 aber auch CTLA-4 auf regulatorischen T-Zellen und dessen Ligand CD80 bzw. CD86 auf T-Effektor-Zellen eine Rolle. CTLA-4 ist ein charakteristisches konstitutiv auf CD4+25+ regulatorischen T-Zellen vorhandenes Oberflächenmolekül, dient deshalb auch als Marker und kann die CD4+25+ regulatorischen T-Zellen laut Read et al., 2000 in ihrer Funktionalität beeinflussen. Bei mit Glatirameracetat behandelten Mäusen ist CTLA-4 um das drei- bis vierfache gegenüber mit PBS behandelten Mäusen erhöht. Aus der vermehrten Expression des CTLA-4 kann eine erhöhte Zahl an Zell-Zell-Kontakten und damit eventuell eine gesteigerte Suppressionsfähigkeit geschlossen werden. Nach dem Transfer von CD4+25+ regulatorischen T-Zellen aus mit Glatirameracetat behandelten Mäusen in

naive Mäuse, die am folgenden Tag mit MOG immunisiert wurden, zeigte sich eine signifikante Verminderung der Krankheitsschwere bzw. der Symptomatik der EAE gegenüber einem Transfer der regulatorischen T-Zellen aus mit PBS behandelten Mäusen. (Y. Jee et al., 2007)

Interferon- γ wird eine wichtige Funktion, wenn nicht sogar die Schlüsselfunktion bei der Differenzierung von CD4+25⁻ T-Zellen hin zu CD4+25⁺ regulatorischen T-Zellen und eine zentrale Rolle bei der Homöostase des Immunsystems insgesamt zugesprochen. Nachvollziehbar ist deshalb auch, dass es in der Abwesenheit von Interferon- γ nach Stimulation mit dem Antigen MOG zu einer verstärkten Proliferation, also zu einer abgeschwächten bzw. verminderten Hemmung durch die CD4+25⁺ regulatorischen T-Zellen kommt. (Wang et al., 2006)

Die suppressive Wirkung der CD4+25⁺ regulatorischen T-Zellen wird auch dadurch unterstrichen, dass laut Shevach, 2000 und Maloy & Powrie, 2001 ein Transfer der regulatorischen T-Zellen vor einer Autoimmunerkrankung schützen kann, wie auch Herman et al., 2004 und Peng et al., 2004 für die Entstehung eines insulinabhängigen Diabetes mellitus in NOD Mäusen und Kohm et al., 2002 für die Entwicklung einer EAE in SJL/J Mäusen zeigen konnten. Die CD4+25⁺ regulatorischen T-Zellen von MS-Patienten verursachen eine schwächere bzw. ineffektivere Suppression von CD4+25⁻ Responderzellen als diejenigen von gesunden Kontrollen. Dabei kamen unterschiedliche Konzentrationen von Antikörpern gegen CD3 und CD28 von 0,1 über 0,5 und 1 bis hin zu 2 $\mu\text{g/ml}$ zur TCR-Stimulation zum Einsatz, wobei bei allen Konzentrationen die abgeschwächte Suppression durch die CD4+25⁺ regulatorischen T-Zellen der MS-Patienten gezeigt werden konnte. Allerdings hat sich hierbei auch herausgestellt, dass bei den niedrigsten Antikörperkonzentrationen gegen CD3

und CD28 die größten Unterschiede zwischen MS-Patienten und gesunden Kontrollen aufgetreten sind. (Huan et al., 2005)

Im Gegensatz zu Huan et al., 2005, der unter anderem bei einer Antikörperkonzentration (gegen CD3 und CD28 zur Stimulation des T-Zell-Rezeptors (TCR)) von 2 µg/ml einen deutlichen Unterschied bei der Suppressionsfähigkeit der CD4+25+ regulatorischen T-Zellen zwischen MS-Patienten und gesunden Kontrollen aufzeigen konnte, wird in dieser Arbeit hier mit einer zur Stimulation verwendeten Antikörperkonzentration von ebenfalls 2 µg/ml zwar bei den CD4+25+ regulatorischen T-Zellen der MS-Patienten auch eine prozentual abgeschwächte Suppressionsfähigkeit nach 20000 und 40000 zugegebenen CD4+25+ regulatorischen T-Zellen gegenüber gesunden Kontrollen gezeigt, jedoch ohne dabei signifikant zu sein. Bezüglich der verwendeten Antikörperkonzentrationen hat sich nämlich ergeben, dass, wie Huan et al., 2005 bereits gezeigt hat, bei niedrigeren zur Stimulation verwendeten Antikörperkonzentrationen größere Unterschiede bei der Suppressionsfähigkeit durch die CD4+25+ regulatorischen T-Zellen zwischen MS-Patienten und gesunden Kontrollen zu erwarten sind und laut Venken et al., 2006 eine starke TCR-Stimulation (5 µg/ml) eine vollständige Aufhebung der Suppression zur Folge hat. Viglietta et al., 2004 konnte einen solchen Verlust der Suppressionsfähigkeit bereits bei einer Antikörperkonzentration von 2,5 µg/ml zeigen, was natürlich zu der Frage führt, ob eine Antikörperkonzentration von 2 µg/ml, die hier ja verwendet wurde, auch schon zu einem solchen und damit zu verfälschten Ergebnissen führen könnte. Laut Huan et al., 2005 scheint dies jedoch nicht der Fall zu sein, obwohl eine niedrigere Antikörperkonzentration besser wäre.

Bei RR-MS-Patienten, aber nicht bei SP-MS-Patienten, wurde eine signifikant abgeschwächte Suppression, verminderte Foxp3-mRNA-Expression und reduzierte IFN-γ

Produktion bzw. Sekretion gefunden. Dabei zeigte die Suppressionsfähigkeit von CD4+25+ regulatorischen T-Zellen bei MS-Patienten eine Korrelation mit der Erkrankungsdauer, aber nicht mit dem Alter der Patienten. Es hat sich gezeigt, dass die CD4+25+ regulatorische T-Zell-Funktion in der Frühphase der Erkrankung am stärksten beeinträchtigt ist. Mit zunehmender Dauer der Erkrankung nimmt die Suppressionsfähigkeit bzw. die Intensität der Suppression der CD4+25+ regulatorischen T-Zellen wieder zu, die Suppressionsfähigkeit erholt sich gewissermaßen. Die Suppressionsfähigkeit der CD4+25+ regulatorischen T-Zellen bei SP-MS-Patienten dagegen war normal, was insofern passend ist, da es bei ca. 50 % der MS-Patienten mit zunehmender Erkrankungsdauer einen Übergang von der RR-Verlaufsform zur SP-Verlaufsform gibt (Trostdorf & v. Stuckrad-Barre, 2009, S. 1). (Venken et al., 2006)

Dies bestätigt erneut die von Petereit, 2008 beschriebene initial hohe Krankheitsaktivität bei MS-Patienten und den deshalb unbedingt in die Wege zu leitenden frühen Therapiebeginn mit Basistherapeutika, auch wenn dies für manche Patienten nach Rückbildung der Symptomatik (Remission) oft unverständlich erscheint.

Passend dazu zeigen RR-MS-Patienten mit kurzer Krankheitsdauer (< 10 J.) sowohl bei den naiven CD4+25+ regulatorischen T-Zellen als auch bei den CD4+25+ regulatorischen Gedächtnis-T-Zellen eine signifikant abgeschwächte Suppression gegenüber altersentsprechenden gesunden Kontrollen. Bei einer Krankheitsdauer von > 10 J. zeigen die naiven CD4+25+ regulatorischen T-Zellen immer noch eine abgeschwächte Suppressionsfähigkeit, wogegen die Suppressionsfähigkeit der CD4+25+ regulatorischen Gedächtnis-T-Zellen auf einem Niveau mit denen der gesunden Kontrollen ist. Schließlich zeigen weder die naiven regulatorischen T-Zellen und die regulatorischen Gedächtnis-T-Zellen noch die regulatorischen T-Zellen der gesunden

Kontrollen eine Reaktion auf TCR-Stimuli, die Zellen sind also anergic. (Venken et al., 2008)

Die kürzlich aus dem Thymus ausgewanderten CD4+25+ regulatorischen T-Zellen zeigen bei MS-Patienten < 30 J. eine signifikant abgeschwächte Suppressionsfähigkeit gegenüber gesunden Kontrollen < 30 J. auf. Oder umgekehrt ist die Suppressionsfähigkeit der CD4+25+ regulatorischen T-Zellen bei gesunden Kontrollen < 30 J. wesentlich stärker. Mit zunehmendem Alter lässt diese Stärke der Suppressionsfähigkeit der CD4+25+ regulatorischen T-Zellen bei gesunden Kontrollen dann nach. Bei den MS-Patienten dagegen ist die Suppressionsfähigkeit der CD4+25+ regulatorischen T-Zellen in jedem Alter auf einem niedrigeren Niveau. Mit zunehmendem Alter nähert sich also die Suppressionsfähigkeit der CD4+25+ regulatorischen T-Zellen der gesunden Kontrollen denen der MS-Patienten an. Die nicht aus dem Thymus stammenden CD4+25+ regulatorischen T-Zellen zeigen dagegen zwischen MS-Patienten und gesunden Kontrollen keinerlei Unterschiede in ihrer Suppressionsfähigkeit. Der zumindest in jungen Jahren bestehende signifikante Unterschied der Suppressionsfähigkeit der CD4+25+ regulatorischen T-Zellen scheint sich also auf die aus dem Thymus stammenden bzw. dort gebildeten CD4+25+ regulatorischen Zellen zu beschränken. (Haas et al., 2007)

Auch dies deutet ganz klar auf eine wie von Petereit, 2008 geschilderte mit Basistherapie zu therapierende zu Beginn der Erkrankung hohe Krankheitsaktivität hin.

Eine prophylaktisch durchgeführte Therapie mit Immunglobulinen (IV Ig) konnte die Suppressionsfähigkeit von CD4+25+ regulatorischen T-Zellen bei Mäusen sowohl in vivo als auch in vitro deutlich verstärken. (Ephrem et al., 2008)

Unter 5.1 wurde bereits beschrieben, dass sich das Verhältnis der T-Effektor-Zellen zu den regulatorischen T-Zellen im Zielorgan während des Entzündungsprozesses verändert bzw. den Verlauf der lokalen Entzündung durch die Veränderung dieses Verhältnisses wahrscheinlich weiter bestimmt. Auf dem Höhepunkt der Entzündung sind in den Entzündungsherden weniger CD4+25+ regulatorische T-Zellen vorhanden als zum Zeitpunkt der Rückbildung der Entzündung, wo die fünffache Anzahl an regulatorischen T-Zellen vorhanden ist. Es kommt also zu einer Akkumulation von CD4+25+ regulatorischen T-Zellen im Zielgewebe und es gelingt dennoch zunächst nicht, die Entzündung zu unterbinden bzw. zu stoppen. Dies scheint erst mit einer steigenden CD4+25+ regulatorischen T-Zellzahl im Zielgewebe zu gelingen. (Korn et al., 2007)

Das passt zu der hier in dieser Arbeit gefundenen Stimulation bzw. Aktivierung des Immunsystems bei MS-Patienten, nicht aber bei gesunden Kontrollen, nach einer Zugabe von nur 2000 CD4+25+ regulatorischen T-Zellen, also einer niedrigen Anzahl an regulatorischen T-Zellen. Erst nach der Zugabe von höheren CD4+25+ regulatorischen T-Zellzahlen bzw. erst bei einem durch eine gestiegene CD4+25+ regulatorische Zellzahl verbesserten Verhältnis zwischen PBMCs (bzw. T-Effektor-Zellen) und den regulatorischen T-Zellen setzt die suppressive Wirkung der regulatorischen T-Zellen bei den MS-Patienten ein. Bei nur 2000 zugegebenen CD4+25+ regulatorischen T-Zellen, um es nochmal zu betonen, ist bei den MS-Patienten also nicht etwa eine abgeschwächte Hemmung der Proliferation gegenüber gesunden Kontrollen zu finden, sondern sogar eine Stimulation der Proliferation. Bei gesunden Kontrollen dagegen ist eine aufgrund der nur 2000 zugegebenen CD4+25+ regulatorischen T-Zellen erwartungsgemäß relativ geringe Hemmung der Proliferation vorhanden. Bei MS-Patienten könnte dies für einen lokalen Entzündungsherd bedeuten, dass die Entzündung bei einer zunächst niedrigen vorhandenen Zahl an CD4+25+

regulatorischen T-Zellen zu einer Verstärkung der Entzündung führt, bis schließlich die CD4+25+ regulatorischen T-Zellen die Oberhand gewinnen (Korn et al., 2007) und die Entzündung nun beenden bzw. die T-Effektor-Zellen hemmen können. Bei gesunden Kontrollen dagegen kommt es bei einer niedrigen Anzahl an CD4+25+ regulatorischen T-Zellen in einem lokalen Entzündungsherd nicht zu einer Stimulation bzw. einer Verschlimmerung der Entzündung, sondern schon jetzt zu einer geringen Hemmung, die aber noch nicht ausreicht, um die Entzündung zu beenden. Auch hier kommt es erst bei einer Zunahme der CD4+25+ regulatorischen T-Zellen bzw. mit dem Erreichen der Oberhand gegenüber den T-Effektor-Zellen (Korn et al., 2007) zum Abklingen der Entzündung.

Mehrere Autoren verwendeten für ihre Suppression- bzw. Proliferation-Assays zur Inhibition höhere CD4+25+ regulatorische T-Zellzahlen als es in dieser Arbeit hier mit der mit 2000 CD4+25+ regulatorischen T-Zellen niedrigsten Zellzahl der Fall ist, wobei öfters auch nach unterschiedlichen Verhältnissen an Zellzahlen (z. B. Responder/Suppressor Ratios 1:1, 1:0,5, 1:0,25, 1:0,125) vorgegangen wurde und konnten dabei bei MS-Patienten eine signifikant verminderte bzw. abgeschwächte Suppression demonstrieren (Jürgen Haas et al., 2005) (Huan et al., 2005) (Vukmanovic-Stejic et al., 2006) (Wang et al., 2006) (U. Feger et al., 2007) (Haas et al., 2007) (Saresella et al., 2008). Dabei wurden, soweit es zu überblicken war, ausschließlich CD4+25- (T-Effektor-Zellen) T-Zellen als Responderzellen eingesetzt (Jürgen Haas et al., 2005) (Huan et al., 2005) (Vukmanovic-Stejic et al., 2006) (Wang et al., 2006) (Venken et al., 2006) (U. Feger et al., 2007) (Haas et al., 2007) (Saresella et al., 2008). Und andererseits konnte die Höhe der hier in dieser Arbeit verwendeten Zellzahl von Responderzellen auch nicht überboten werden. Viglietta et al., 2004 z. B. verwendete 2500 CD4+25- Zellen als Responderzellen und die nied-

rigsten regulatorischen Suppressor-Zellzahlen in der hier verwendeten Literatur von 2500 (1:1) bis hin zu lediglich 312,5 (1:0,125) regulatorischen T-Zellen. Außer bei Viglietta et al., 2004 hat sonst niemand die niedrige CD4+25+ regulatorische T-Zellzahl von 2000, wie sie bei dieser Arbeit hier zum Einsatz kam, verwendet bzw. sogar unterschritten, allerdings bei einer bei Viglietta et al., 2004 gleichzeitig ebenfalls sehr niedrigen CD4+25- T-Effektor-Zellzahl (2500). Im Gegensatz dazu wurden in dieser Arbeit hier 2×10^5 PBMCs (Peripheral Blood Mononuclear Cells) und eben nicht CD4+25- T-Zellen als Responderzellen verwendet, was bei einer Zugabe von 2000 CD4+25+ regulatorischen T-Zellen einer Ratio Responder/Suppressor von 1:0,01 entspricht. Ein solches Zusammenspiel bzw. eine solche Ratio war in der hier verwendeten Literatur nicht zu finden, zumal wie gesagt auch noch die Responderzellen in dieser Arbeit hier nicht die CD4+25- T-(Effektor-)Zellen sind, sondern die PBMCs (inklusive der CD4+25- T-Zellen), wie es in der verwendeten Literatur nicht vorkam. Gerade dies spiegelt aber vielleicht ein realistischeres Bild der Funktionalität von CD4+25+ regulatorischen T-Zellen in vivo wieder, da bei der Wirkungsvermittlung der CD4+25+ regulatorischen T-Zellen in vivo die anderen im Blut vorhandenen Zellpopulationen von einer Beeinflussung bzw. einer eventuell synergistischen oder abschwächenden Wirkung auf die CD4+25+ regulatorischen T-Zellen und/oder auf die CD4+25- T-Effektor-Zellen indirekt über Cytokine oder direkt über Zell-Zell-Kontakt natürlich auch nicht ausgeklammert sind. Und schließlich ist aus den Ergebnissen dieser Arbeit heraus ja das Verhältnis (Ratio) nur von den Lymphozyten (Responder), also ohne Berücksichtigung der anderen im Blut vorkommenden Zellen (Verhältnis z.B. zu Leukozyten), zu den CD4+25+ regulatorischen T-Zellen (Suppressor) schon 1:0,039 bei den MS-Patienten und 1:0,028 bei den gesunden Kontrollen. Insofern liegen die hier verwendeten Ratios mit 1:0,2 über 1:0,1 und 1:0,05 und 1:0,04 bis hin zu 1:0,01 zusammen mit der Verwendung der PBMCs näher an den Gegebenheiten

des Blutes in vivo. An einem lokalen Entzündungsherd können dann natürlich wieder andere Ratios vorherrschen. Insofern sollte man zwischen der Ratio im Blut und der Ratio im lokalen Entzündungsherd unterscheiden. Außerdem gibt es im lokalen Gewebe während eines Entzündungsprozesses bis zu dessen Abklingen laut Korn et al., 2007 gerade eine Verschiebung dieser Ratio. Insgesamt ist somit erklärbar, dass in dieser Arbeit hier ein signifikanter Unterschied zwischen MS-Patienten und gesunden Kontrollen bei verwendeten 2×10^5 PBMCs pro well und 2000 CD4+25+ regulatorischen T-Zellen aufgefallen ist, der die Aussage zulässt, dass es bei der Anwesenheit einer relativ niedrigen Zellzahl an CD4+25+ regulatorischen T-Zellen bei den MS-Patienten nicht nur zu einer verglichen mit den gesunden Kontrollen abgeschwächten Hemmung der Proliferation kommt, sondern sogar zu einer Stimulation der Proliferation und auf die Situation in vivo bezogen zu einer Stimulation des Immunsystems. Die Proliferation der Zellen der gesunden Kontrollen wird bei nur 2000 zugegebenen CD4+25+ regulatorischen T-Zellen dagegen erwartungsgemäß nur leicht gehemmt. Und auch bei den absoluten proliferierten Zellzahlen zeigen die Patienten eine deutliche Erhöhung nach Zugabe von 0, vor allem dann von 2000 und auch noch von 4000 CD4+25+ regulatorischen T-Zellen, wobei diese Erhöhungen bei den Patienten aber keine Signifikanz zeigen. Trotzdem zeigen die PBMCs der Patienten auch ohne zugegebene CD4+25+ regulatorische T-Zellen eine doch deutlich stärkere Proliferation. Letztendlich muss man daraus folgern, dass die PBMCs der Patienten sich deutlich leichter bzw. besser stimulieren lassen, sie reagieren auf einen Stimulus also viel empfindlicher als die PBMCs der gesunden Kontrollen. So kann wohl eine nur niedrige Anzahl von 2000 CD4+25+ regulatorischen T-Zellen diese für einen bzw. fraglich für jeden Stimulus empfindlichen PBMCs nicht inhibitorisch, sondern nur noch zusätzlich stimulatorisch beeinflussen. Auch dieses Resultat passt jedenfalls zu den Ergebnissen aus 4.1 bzw. 5.1, den bei den Patienten hoch signifi-

kant erhöhten CD4+25+ regulatorischen T-Zellen anteilig der Lymphozyten, und aus 4.2 bzw. 5.2, den bei den Patienten hoch signifikant erhöhten Foxp3+ Zellen in Prozent der CD3+4+ Zellen, insofern, dass ein leicht erhöhter CD4+25+ regulatorischer Zellstatus bei den MS-Patienten als zusätzlicher Reiz bzw. Stimulus für das Immunsystem dient und dieses folglich einen leicht aktivierten Status hat. Ein solch leicht aktiviertes Immunsystem könnte das Entstehen eines Schubes begünstigen oder eventuell sogar das Auslösen eines Schubes überhaupt erst ermöglichen. Eine therapeutische Option könnte daher eine medikamentöse Erniedrigung der erhöhten CD4+25+ regulatorischen T-Zellen auf Normalniveau bzw. auf das Niveau der gesunden Kontrollen sein.

Auch beim Proliferation-Assay ergeben sich bei Aufteilung der Patienten und Kontrollen in verschiedene Gruppen weitere Signifikanzen. Dabei ergibt sich bei 2000 zugegebenen CD4+25+ regulatorischen T-Zellen ein indirekter und vor allem bei 40000 zugegebenen CD4+25+ regulatorischen T-Zellen sowohl absolut als auch in Prozent ein direkter signifikanter Unterschied zwischen den Geschlechtern. Dabei zeigen dann vor allem die CD4+25+ regulatorischen T-Zellen der männl. Patienten eine abgeschwächte Suppressionsfähigkeit.

5.4 Stimulation der PBMCs durch Antigene

Die zum Entzündungsherd ins ZNS eingewanderten CD4+ T-Effektor-Zellen sezernieren große Mengen an IFN- γ und IL-17, wogegen die peripheren CD4+ T-Effektor-Zellen deutlich weniger dieser Cytokine ausschütten. Vorübergehend haben allerdings auch die CD4+25+ regulatorischen T-Zellen IFN- γ produziert. (Korn et al., 2007)

Interferon- γ (IFN- γ), als wichtiges Cytokin der T_{H1} -Zellen, wird in Bezug auf die Aktivierung von T-Zellen, die ihre Wirkung im ZNS vermitteln, und im Rahmen von ZNS-Entzündungen eine immense Bedeutung zugesprochen. Beispielsweise konnten Horwitz et al., 1997 und Olsson, T., 1995 zeigen, dass IFN- γ den MHC-II-Komplex hochzuregulieren vermag und damit die Migration von T-Zellen ins ZNS fördert. Das klinische Krankheitsbild der EAE wird laut I.A. Ferber et al., 1996, Willenborg et al., 1996 und Krakowski & Owens, 1996 durch eine Blockade des IFN- γ unerwarteterweise nicht gebessert, sondern im Gegenteil deutlich verschlimmert. Willenborg et al., 1999 hat eine durch IFN- γ vermittelte Herunterregulation bzw. Verbesserung der EAE unter Inanspruchnahme einer Induktion der NO-Synthase in peripheren Makrophagen und in Mikroglia und Astrozyten im Entzündungsherd beschrieben. Die genaue Bedeutung bzw. der exakte Mechanismus einer Fehlfunktion bei der Wirkungsvermittlung des IFN- γ im Zusammenhang mit einer erhöhten Empfänglichkeit bzw. Anfälligkeit für die EAE konnte jedoch bisher noch nicht ausreichend erklärt werden. (Wang et al., 2006)

CD4+25+ regulatorische T-Zellen von gesunden Kontrollen und von SP-MS-Patienten konnten die IFN- γ -Sekretion durch die CD4+25- T-Zellen hemmen. Die CD4+25+ regulatorischen T-Zellen der RR-MS-Patienten konnten diesbezüglich keine Hemmung vermitteln und zeigen somit ihre gestörte Funktionalität auf. (Venken et al., 2006)

Bei Menschen mit der HLA-Klasse II, genauer mit HLA-DR2, ist die Empfänglichkeit für die MS laut Haines et al., 1998 erhöht. Bezüglich der HLA-Klasse I wird laut Harbo et al., 2004 und Fogdell-Hahn et al., 2000 HLA-A3 am meisten mit der MS in Verbindung gebracht. Andere die MS betreffende HLA-Klasse I-Komplexe sind HLA-A2, -B7, -B27 und -B44. Nach HLA-Klasse I-Stimulation mit Myelinpeptidstrukturen

waren weder die Monozyten, die B-Zellen, die CD4+ T-Zellen und die naiven CD8+ T-Zellen noch die von CD8+ T-Zellen befreiten PBMCs, sondern nur die CD8+ Gedächtnis-T-Zellen in der Lage, IFN- γ zu sezernieren. Auch die Stimulation mit APCs (Antigenpräsentierende Zellen) führte bei den CD8+ Gedächtnis T-Zellen, nicht aber bei den naiven CD8+ T-Zellen, zur IFN- γ -Sekretion. Interessant ist auch, dass laut Serafini et al., 2007 im ZNS von MS-Patienten eine Anhäufung von aktivierten CD8+ T-Zellen bei EBV-infizierten B-Zellen zu finden war. Sowohl bei MS-Patienten als auch bei gesunden Kontrollen wurde eine vergleichbare Zahl an IFN- γ sezernierenden Zellen nach Myelin-Antigen-Stimulation im Elispot gefunden. Allerdings war diese IFN- γ -Sekretion sowohl bei MS-Patienten als auch bei gesunden Kontrollen signifikant erniedrigt gegenüber derjenigen nach Stimulation mit viralen Peptiden. Interessanterweise wurden die stärksten IFN- γ -Sekretionen nicht bei Antigenen mit der stärksten HLA-Bindungsfähigkeit (Affinität) gefunden, sondern bei Antigenen bzw. Peptiden mit einem eher niedrigen Bindungs-Index. Übrigens ist das nach Stimulation der CD8+ T-Zellen meist gebildete und sezernierte Cytokin IFN- γ . (Laureline Berthelot et al., 2008)

Bereits 1991 konnte Sun et al. über eine MOG-induzierte Sekretion von IFN- γ berichten. (Hellings et al., 2001)

Die Anzahl der IFN- γ -Spots war nach Stimulation mit MBP und MOG zwischen MS-Patienten und gesunden Kontrollen jeweils vergleichbar, also nicht unterschiedlich. Ebenfalls keinen Unterschied hat der Vergleich zwischen DR2+ gegen DR2- und behandelte gegen unbehandelte Patienten ergeben. Für MBP konnte eine Stimulation der IFN- γ -Sekretion (T_{H1}), aber keine Stimulation für IL-4 (T_{H2}), gezeigt werden. Übrigens sezernieren NK-Zellen auch IFN- γ . (Hellings et al., 2001)

Im Gegensatz dazu konnte in dieser Arbeit hier im 1. Teil der Elispot-Analyse ein signifikanter Unterschied zwischen Patienten bzw. weibl. Patienten und Kontrollen bzw. weibl. Kontrollen nach Stimulation mit dem Antigen MOG ref. gezeigt werden. Allerdings hat sich im 2. Teil und bei der Analyse aller Daten zusammen zwischen allen Patienten und allen gesunden Kontrollen keine weitere Signifikanz ergeben.

Bei der MS wird u. a. eine Verschiebung der Immunantwort zugunsten T_{H1} proinflammatorischer Cytokine wie IL-2, IL-12, IFN- γ und TNF- α angenommen. Dabei scheint IFN- γ eine besonders wichtige Rolle zuzukommen, da laut Beck et al., 1988 und Lu et al., 1993 klinischen Schüben eine erhöhte IFN- γ -Produktion vorausgeht, eine Behandlung von MS-Patienten mit rekombinantem IFN- γ (rIFN- γ) laut Panitch et al., 1987 eine Exazerbation auslöst und der Entzündungsprozess im ZNS laut Woodroffe & Cuzner, 1993 durch eine gesteigerte Expression von IFN- γ charakterisiert ist. T_{H2} Cytokine können laut Bettelli et al., 1998, Cua et al., 1999 und Racke et al., 1994 eine Herunterregulation von T_{H1} Cytokinen vermitteln. Beim Elispot zeigen weibl. Patienten eine starke Sekretion von IFN- γ nach Stimulation mit PLP 40-60. Dabei war diese signifikant stärker gegenüber männl. Patienten und weibl. bzw. männl. Kontrollen. Bei den Männern dagegen zeigte sich eine signifikante Erhöhung der Sekretion von IFN- γ bei den männl. Kontrollen und nicht bei den männl. Patienten gegenüber den weibl. Patienten. Allerdings konnte die Sekretion von IFN- γ auf PLP insofern nicht bestätigt werden, dass es nach Stimulation mit PLP nicht auch zu einer Sekretion von IL-10 und TNF- α gekommen ist. Innerhalb der MS-Patienten zeigen Frauen eine vermehrte IFN- γ -Sekretion und Männer eine vermehrte Sekretion von IL-5. Keine erhöhte IFN- γ -Sekretion hat sich dagegen bei den weibl. Kontrollen im Vergleich zu den männl. Kontrollen gezeigt. Schließlich sei noch erwähnt, dass HLA-DR

nicht für die Unterschiede zwischen den Geschlechtern bei der Produktion bzw. Sekretion von IFN- γ verantwortlich gemacht werden kann. (Moldovan et al., 2008)

Wie oben bereits erwähnt gibt es hier in dieser Arbeit auch einen höchst signifikanten Unterschied im 1. Teil der Elispot-Analyse zwischen den weibl. Patienten und den weibl. Kontrollen, bei welchem die weibl. Kontrollen nach Stimulation mit MOG ref. eine wesentlich stärkere Sekretion von IFN- γ zeigen. Insofern konnte eventuell, auf das männl. Geschlecht bezogen, die bei den männl. Kontrollen stärkere Sekretion von IFN- γ (Moldovan et al., 2008) bestätigt werden. Die signifikant erhöhte Sekretion von IFN- γ bei den weibl. Patienten nach Stimulation mit PLP 40-60 (Moldovan et al., 2008) konnte dagegen für MOG ref. hier so nicht bestätigt werden. Eine Geschlechterdifferenz im 2. Teil der Elispot-Analyse gibt es hier nach Stimulation mit pp65 (CMV), nach welcher die männl. Patienten signifikant mehr IFN- γ sezernieren als die weibl. Patienten. Und auch nach Stimulation mit MOG PBS zeigen nur die männl. nicht therapierten Patienten eine signifikant vermehrte Sekretion von IFN- γ gegenüber allen Kontrollen. Allerdings zeigen nach Stimulation mit MOG ref. sowohl die weibl. nicht therapierten Patienten als auch die männl. nicht therapierten Patienten gegenüber allen Kontrollen eine signifikant stärkere Sekretion des IFN- γ , so dass dies auch für die nicht therapierten Patienten insgesamt gilt. Zum HLA-DR ist zu sagen, dass hier bei der quantitativen Bestimmung des CDDR zwischen allen Patienten und allen Kontrollen und auch zwischen den Geschlechtern keine signifikanten Unterschiede zu finden waren. Lediglich beim Vergleich der Gruppe Glatirameracetat, Avonex und Interferon β -1a gesamt mit allen Kontrollen haben sich signifikante Unterschiede gezeigt. Insofern könnte man daraus schließen, dass eine Therapie mit Glatirameracetat oder Avonex die Expression des CDDR auf der Zelloberfläche beeinflusst. Dabei kommt es bei der Gruppe Glatirameracetat zu einer signifi-

fikanten Erniedrigung und bei der Gruppe Avonex zu einer signifikanten Erhöhung der Expression des CDDR gegenüber allen Kontrollen.

Interessanterweise für die Präferenz der MS für das weibliche Geschlecht konnte Östrogen die IFN- γ -Sekretion spezifisch bei Makrophagen, jedoch nicht bei T-Zellen, fast vollständig reduzieren und scheint außerdem Einfluss auf die dendritischen Zellen zu haben. (Offner & Polanczyk, 2006)

Gegen Ende der Schwangerschaft sind die IFN- γ sezernierenden Zellen im Blut von MS-Patientinnen signifikant reduziert gegenüber nachgeburtlichen Untersuchungen. Bei gesunden Schwangeren war dies nicht der Fall. Bei den gesunden Schwangeren allerdings zeigte sich IL-4 während der Schwangerschaft signifikant erhöht gegenüber nachgeburtlich. Insgesamt war bei schwangeren MS-Patientinnen das Verhältnis von $T_{H2}:T_{H1}$ sezernierter Cytokine gegen Ende der Schwangerschaft erhöht gegenüber nachgeburtlich. Bei gesunden Schwangeren verhält es sich aber ähnlich. (L. Airas et al., 2007)

Bei prophylaktisch mit Immunglobulinen (IV Ig) behandelten Mäusen kommt es zu einer signifikanten Reduktion der IFN- γ -Sekretion. (Ephrem et al., 2008)

Bei mit Glatirameracetat behandelten Mäusen sind die IFN- γ und IL-2 sezernierenden Zellen in ihrer Zellzahl signifikant vermindert. Außerdem hat sich herausgestellt, dass nicht etwa die CD4⁺ T-Zellen, sondern die CD8⁺ T-Zellen die Hauptzelllinie bilden, die IFN- γ produziert bzw. sezerniert. (Y. Jee et al., 2007)

Da in dieser Arbeit hier 4×10^5 PBMCs pro well für den Elispot verwendet wurden, kann keine Aussage darüber gemacht werden, welche Zellfraktion der PBMCs letztlich für die IFN- γ -Sekretion verantwortlich ist. Sowohl im 2. Teil der Elispot-Analyse als auch bei der Beurteilung aller im Elispot erhobenen Daten zeigt sich, dass die

Gruppe Natalizumab durch eine besonders starke Sekretion von IFN- γ auffällt und sich bei mehreren Antigenen, vor allem aber nach Stimulation durch die unterschiedlichen Variationen von MOG, multiple Signifikanzen ergeben, wobei Natalizumab stets signifikant erhöht gegenüber allen anderen Gruppen ist. Dies wird hier so erklärt, dass es durch die Therapie von Natalizumab und der damit verbundenen fehlenden bzw. reduzierten Migration von T-Zellen vom Blut ins ZNS zu einer Zunahme der Lymphozytenzellzahl im Blut kommt (Stenner et al., 2008), was auch in dieser Arbeit hier zu erkennen war, und folglich auch die IFN- γ sezernierenden Zellen im Blut vermehrt vorhanden sind. Bestätigt wird dies außerdem dadurch, dass laut Stenner et al., 2008 Natalizumab stärker an die CD8+ Zellen bindet, die laut Y. Jee et al., 2007 wiederum die Zelllinie mit der stärkeren IFN- γ -Sekretion bildet, verglichen mit CD4+ Zellen, so dass diese starke IFN- γ -Sekretion wahrscheinlich vor allem durch die CD8+ Zellen vermittelt wird. Dabei zeigten sich als Gegenpol zu der erhöhten Sekretion von IFN- γ bei der Gruppe Natalizumab vor allem die Interferone und hier vor allem Betaferon (Interferon β -1b), aber auch Glatirameracetat. Insofern kann bestätigt werden, dass neben den Interferonen auch Glatirameracetat eine Reduktion der IFN- γ sezernierenden Zellen vermitteln kann. Dabei waren die Unterschiede zwischen der Gruppe Natalizumab und den anderen Medikamentengruppen mit hoch und höchst signifikant so deutlich, dass durchaus von Pol und Gegenpol, wobei sich am Gegenpol mehrere Medikamentengruppen aufhalten, gesprochen werden darf.

Zuletzt sei noch erwähnt, dass die Antigenspezifität, also der überhaupt erst zur Sekretion von IFN- γ führende spezifische Stimulus, über den MHC II- bzw. HLA II-Komplex vermittelt wird (Janeway/Travers & Walport/Shlomchik, 2002, S. 25-31). Nun gibt es laut C. Cassan & R. S. Liblau, 2006 Zellen wie die Astrozyten und Mikroglia, die sowohl MHC I als auch MHC II exprimieren. Andererseits hat Baecher-Allan et al.,

2006 gezeigt, dass es z. B. bei der Zellpopulation der CD4+25+ regulatorischen T-Zellen funktionell unterschiedliche Zellen mit und ohne MHC II-Komplex gibt, die zudem die Expression des MHC II steuern können, also können beispielsweise Zellen ohne MHC II-Komplex auf der Zelloberfläche diesen dann auf die Zelloberfläche setzen. Dies zeigt, dass die MHC-Komplexe nicht starr bzw. konstant nur exprimiert werden, sondern dass sie in ihrer Expression flexibel sind. Die Reaktivität der Zellen beim Elispot und in vivo auf ein Antigen hängt dann natürlich auch davon ab, ob die Zellen den MHC II- bzw. HLA II-Komplex gerade exprimieren oder nicht und können somit auch den Status des Immunsystems beeinflussen. Dabei darf man sich meiner Meinung nach auch nicht scheuen so weit zu denken, dass die Zelle hier durch entsprechende Reize vielleicht sogar dazu befähigt ist, einen, bezogen auf die Spezifität der MHC- bzw. HLA-Komplexe, Spezifitätswechsel vorzunehmen. Dabei könnte dieselbe Zelle zuerst einen MHC-Komplex gegen ein spezifisches Antigen exprimieren und nach einem solchen Spezifitätswechsel (Spezifitäts-Switch) ein dann ganz anderes spezifisches Antigen exprimieren. Im Extremfall könnte zuerst ein Nicht-Auto-Antigen und später dann ein Auto-Antigen von derselben Zelle exprimiert werden. Vielleicht könnten so sogar Zellen zur Unterstützung einer Immunantwort gegen ein Antigen, egal ob pathogener oder autogener Natur, rekrutiert werden.

6 ZUSAMMENFASSUNG

In dieser Arbeit wurden zunächst anhand der FACS-Analyse verschiedene Zellpopulationen quantitativ bestimmt. Dabei galt ein besonderes Augenmerk den CD4+25+ regulatorischen T-Zellen. Sowohl beim Vergleich aller MS-Patienten mit allen gesunden Kontrollen als auch beim Vergleich weiterer nach Aufteilung der Patienten und der Kontrollen gebildeter Gruppen kam es nicht nur bei den CD4+25+ regulatorischen T-Zellen, sondern auch bei anderen Zellpopulationen zu multiplen signifikanten Unterschieden. Dabei haben sich innerhalb einzelner Zellpopulationen auch Muster aufzeigen lassen, so dass aufgrund der Deutlichkeit des sich ergebenden signifikanten Musters sogar an die Entwicklung eines eventuell sogar geschlechtsspezifischen Labortests zur Diagnostik der MS bzw. von Autoimmunerkrankungen allgemein gedacht werden kann, sofern sich diese Unterschiede nicht nur bei MS-Patienten, sondern auch bei Patienten mit der Diagnose anderer Autoimmunerkrankheiten finden lassen. Aufgeteilt wurden die Patienten und Kontrollen u. a. nach dem Geschlecht und die Patienten zudem nach einerseits einer Therapie überhaupt und andererseits noch genauer nach einzelnen Therapien. Hierbei kam es bei der Betrachtung der Geschlechter zu diversen Unterschieden. Dabei konnten nicht nur signifikante Unterschiede zwischen weibl. Patienten und männl. Patienten, sondern, was noch viel interessanter erscheint, auch signifikante Unterschiede zwischen gesunden weibl. Kontrollen und gesunden männl. Kontrollen aufgezeigt werden. Wenn dieser signifikante Unterschied der Zellzahlen von einzelnen Zellpopulationen, hier der CD4+ Zellen in Prozent der Lymphozyten, zwischen den gesunden Geschlechtern bestätigt wird, so könnte dies die Ursache für eine bei manchen Krankheiten, hier der MS, bestehende Präferenz für ein Geschlecht sein oder zumindest zu

einer solchen beitragen. Und auch bei den therapierten bzw. nicht therapierten Patienten und bei den einzelnen Medikamentengruppen haben sich schließlich signifikante Unterschiede gezeigt. Hierbei ist vor allem die Gruppe Glatirameracetat aufgefallen. Ebenfalls sehr umfangreiche signifikante Unterschiede haben sich entsprechend auch bei der Bestimmung der Foxp3+ Zellen in Prozent der CD3+4+ Zellen finden lassen. Zwischen allen Patienten und allen Kontrollen beispielsweise war die Zahl der Foxp3+ Zellen in Prozent der CD3+4+ Zellen bei den Patienten hoch signifikant erhöht gegenüber den Kontrollen, was sehr gut zu den bei den Patienten ebenfalls hoch signifikant erhöhten CD4+25+ regulatorischen T-Zellen passt. Aber auch bei den anderen gebildeten Gruppen gibt es hier noch weitere interessante Signifikanzen, u. a. auch wieder zwischen gesunden weibl. Kontrollen und gesunden männl. Kontrollen, wobei die weibl. Kontrollen hoch signifikant weniger Foxp3+ Zellen in Prozent der CD3+4+ Zellen aufweisen als die männl. Patienten, was zu einer Bevorzugung des weibl. Geschlechts bei der MS beitragen könnte. Beim Proliferation-Assay sind bei einer zugegebenen Anzahl von 2000 und 40000 CD4+25+ regulatorischen T-Zellen ebenfalls interessante signifikante Ergebnisse aufgefallen, die wiederum passend waren zu den Ergebnissen der FACS-Analyse und der Bestimmung der Foxp3+ Zellen in Prozent der CD3+4+ Zellen. Vor allem bei 2000 zugegebenen CD4+25+ regulatorischen T-Zellen hat sich bei verwendeten PBMCs als Responderzellen und der hier verwendeten Ratio zwischen Responder- und Suppressorzellen eine Stimulation statt einer erwarteten Inhibition bei den MS-Patienten gezeigt. Dieses Zellverhältnis beschreibt vielleicht besser die Gegebenheiten im Blut, könnte aber bezogen auf den Ablauf eines Entzündungsprozesses auch zu der Situation im lokalen Gewebe herangezogen werden und zu einer dort eventuell bei MS-Patienten initialen Verstärkung einer Entzündungsreaktion beitragen. Dabei könnte eine im Blut nur leicht erhöhte CD4+25+ regulatorische T-Zellzahl, wie sie sich hier

bei den Patienten ja zeigt, nicht wie bei den gesunden Kontrollen zu einer Hemmung der Proliferation bzw. des Immunsystems, sondern stattdessen zu einer Stimulation der Proliferation bzw. des Immunsystems führen. Diese Stimulation der Proliferation bzw. dieses auf die Situation in vivo bezogene leicht aktivierte Immunsystem könnte die Entstehung eines Schubes begünstigen bzw. diesen überhaupt erst ermöglichen. Außerdem zeigen sich auch beim Proliferation-Assay vor allem nach Zugabe von 40000 CD4+25+ regulatorischen T-Zellen signifikante Unterschiede zwischen den Geschlechtern, wobei die Suppressionsfähigkeit der CD4+25+ regulatorischen T-Zellen vor allem bei den männl. Patienten abgeschwächt war. Zuletzt haben sich auch noch beim Elispot mehrere interessante signifikante Resultate gezeigt. Hierbei gibt es einen höchst signifikanten Unterschied nach Stimulation mit MOG ref. bei dem weibl. Geschlecht und außerdem zeigt sich beim Elispot vor allem bei der Gruppe Natalizumab eine hohe Zahl an IFN- γ sezernierenden Zellen mit vielen signifikanten Unterschieden, was sich über den genauen Wirkmechanismus der Therapie (Stenner et al., 2008) erklären lässt und vor allem den CD8+ T-Zellen (Y. Jee et al., 2007) zugeschrieben werden kann.

Generell wurde bei der Betrachtung der einzelnen Medikamentengruppen bzw. derer Mittelwerte eine Annäherung bzw. ein Erreichen des Mittelwertes aller Kontrollen als Therapieerfolg und ein Entfernen von diesem bzw. eine Annäherung oder ein Erreichen des Mittelwertes aller Patienten als ein Versagen der Therapie gewertet. Dies lässt sich nach Aufteilung der Kontrollen und Patienten in weitere Gruppen auch beim Vergleich der Mittelwerte zu Untergruppen, z. B. der therapierten und nicht therapierten Patienten oder auch zwischen den Geschlechtern, weiterführen. So könnte nicht nur anhand des klinischen Bildes bzw. des Auftretens von Schüben oder kernspintomographischer Aufnahmen, sondern auch schon alleine anhand eines solchen gewonnenen Mittelwertes ein individuelles Ansprechen des Medikamentes

bei dem Patienten überprüft und eventuell beim Versagen der Therapie auf ein anderes Medikament umgestellt werden, bevor ein klinisches Ereignis eintritt bzw. neue kernspintomographische Läsionen erkennbar werden.

Im Rahmen der Diskussion dieser Arbeit lässt sich außerdem vermuten, dass das Vorhandensein von autoreaktiven T-Zellen eine normale Gegebenheit ist, diese also auch bei gesunden Individuen vorkommen (Hellings et al., 2001) und die Suppression der T-Effektor-Zellen durch die regulatorischen T-Zellen nicht nur gegen autoreaktive T-Zellen, sondern auch gegen nicht autoreaktive T-Zellen gerichtet ist (Vukmanovic-Stejic et al., 2006). Diese Suppressionsfähigkeit scheint also zum Umfang der physiologischen Fähigkeiten des Immunsystems zu gehören, um eine Immunreaktion wieder einzudämmen bzw. zu beenden und eine überschießende Immunreaktion zu verhindern. Eine fehlerhafte Up- und Downregulation der IFN- γ -Rezeptoren könnte dabei zu einer fehlerhaften Funktionalität der CD4+25+ regulatorischen T-Zellen führen, nachdem Wang et al., 2006 bereits eine bei Individuen differierende IFN- γ -Rezeptorenzellzahl vermutet hat.

Außerdem wird spekuliert, dass nach entsprechendem Reiz nicht autoreaktive T-Zellen durch Expression eines gegen Autoantigensequenzen gerichteten MHC-II-Komplexes auf ihrer Zelloberfläche zu autoreaktiven T-Zellen rekrutiert werden könnten.

Schließlich wird bezüglich unterschiedlicher Zellzahlen zwischen den geschlechtern auch noch über einen Zusammenhang mit dem Hormonstatus und sogar über einen Zusammenhang mit der Alterung des Menschen spekuliert.

Insgesamt ergibt sich nicht nur aus der Betrachtung der Ergebnisse der einzelnen Untersuchungen heraus, sondern auch im Überblick über alle hier in dieser Arbeit erarbeiteten Ergebnisse und nach Analyse der hier verwendeten Literatur ein stimmiges Gesamtbild.

7 LITERATURVERZEICHNIS

Airas, L., Saraste, M., Rinta, S., Elovaara, I., Huang, Y.-H., Wiendl, H. and The Finnish Multiple Sclerosis and Pregnancy Study Group (2007). *Immunoregulatory factors in multiple sclerosis patients during and after pregnancy: relevance of natural killer cells* British Society for Immunology Clinical and Experimental Immunology, 151: 235-243

Baecher-Allan, C., Wolf, E., and Hafler, D. A., (2006). *MHC Class II Expression Identifies Functionally Distinct Human Regulatory T Cells* The American Association of Immunologists, Inc. The Journal of Immunology, 176: 4622-4631

Berthelot, L., Laplaud, D.-A., Pettré, S., Ballet, C., Michel, L., Hillion, S., Braudeau, C., Connan, F., Lefrère, F., Wiertlewski, S., Guillet, J.-G., Brouard, S., Choppin, J. and Soullou, J.-P., (2008). *Blood CD8⁺ T cell responses against myelin determinants in multiple sclerosis and healthy individuals* Weinheim : WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA Eur. J. Immunol., 38: 1889-1899

Bischof, F., Bins, A., Dürr, M., Zevering, Y., Melms, A., and Kruisbeek, A. M., (2004). *A Structurally Available Encephalitogenic Epitope of Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein Specifically Induces a Diversified Pathogenic Autoimmune Response* The American Association of Immunologists, Inc. The Journal of Immunology, 173: 600-606

Bischoff, A., (2007). *ÄRZTLICHE PRAXIS : Nr. 17 24. April 2007* München : Reed Business Information GmbH Verlag

Braith, M., Harikrishnan, S., Robins, R. A., Nichols, C., Fahey, A. J., Showe, L., Constantinescu, C. S., (2008). *Glucocorticoids increase CD4⁺CD25^{high} cell percentage and Foxp3 expression in patients with multiple sclerosis* Blackwell Munksgaard Acta Neurologica Scandinavia, 1-7

Cassan, C., and Liblau, R. S., (2007). *Immune tolerance and control of CNS autoimmunity : from animal models to MS patients* International Society for Neurochemistry Journal of Neurochemistry, 100, 883-892

Cwiklinska, H., Mycko, M. P., Luvsannorov, O., Walkowiak, B., Brosnan, C. F., Raine, C. S. and Selmaj, K. W., (2003). *Heat shock protein 70 associations with myelin basic protein and proteolipid protein in multiple sclerosis brains* The Japanese Society for Immunology International Immunology, Vol. 15, No. 2, pp. 241-249

(ddp), (2010). *STUTTGARTER NACHRICHTEN : Mittwoch, 1. September 2010* Stuttgart

De Graaf, K. L., Barth, S., Herrmann, M. M., Storch, M. K., Otto, C., Olsson, T., Melms, A., Jung, G., Wiesmüller, K.-H., and Weissert, R., (2004). *MHC Class II Isotype- and Allele-Specific Attenuation of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis* The American Association of Immunologists, Inc. The Journal of Immunology, 173: 2792-2802

Du Pasquier, R. A., Stein, M. C., Lima, M. A., Dang, X., Jean-Jacques, J., Zheng, Y., Letvin, N. L., Koralnik, I. J., (2006). *JC virus induces a vigorous CD8⁺ cytotoxic T cell response in multiple sclerosis patients* ELSEVIER Journal of Neuroimmunology, 176: 181-186

Ephrem, A., Chamat, S., Miquel, C., Fisson, S., Mouthon, L., Caligiuri, G., Delignat, S., Elluru, S., Bayry, J., Lacroix-Desmazes, S., Cohen, J. L., Salomon, B. L., Kazatchkine, M. D., Kaveri, S. V., and Misra, N., (2008). *Expansion of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells by intravenous immunoglobulin: a critical factor in controlling experimental autoimmune encephalomyelitis* The American Society of Hematology Blood 111: 715-722

Feger, U., Luther, C., Poeschel, S., Melms, A., Tolosa, E., and Wiendl, H., (2007). *Increased frequency of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in the cerebrospinal fluid but not in the blood of multiple sclerosis patients* British Society for Immunology Clinical and Experimental Immunology, 147: 412-418

Fredrikson, S., Sun, J., Xiao, B.-G. & Link, H., (1991). *Cord blood contains cells secreting antibodies to nervous system components* Clin. exp. Immunol., 84: 353-358

Gehlen, W., Delank, H-W., (2010). *Neurologie : 12., vollständig überarbeitete Auflage* Stuttgart · New York : Georg Thieme Verlag

Grehl, H., Reinhardt, F., (2005). *Checkliste Neurologie : 3., überarbeitete und erweiterte Auflage* Stuttgart · New York : Georg Thieme Verlag

Haas, J., Fritzsching, B., Trübswetter, P., Korporal, M., Milkova, L., Fritz, B., Vobis, D., Krammer, P. H., Suri-Payer, E., and Wildemann, B., (2007). *Prevalence of Newly Generated Naive Regulatory T Cells (T_{reg}) Is Critical for T_{reg} Suppressive Function and Determines T_{reg} Dysfunction in Multiple Sclerosis* The American Association of Immunologists, Inc. The Journal of Immunology, 179: 1322-1330

Haas, J., Hug, A., Viehöver, A., Fritzsching, B., Falk, C. S., Filser, A., Vetter, T., Milkova, L., Korporal, M., Fritz, B., Storch-Hagenlocher, B., Krammer, P. H., Suri-Payer, E., and Wildemann, B., (2005). *Reduced suppressive effect of CD4⁺CD25^{high} regulatory T cells on the T cell immune response against myelin oligodendrocyte glycoprotein in patients with multiple sclerosis* Weinheim : WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA Eur. J. Immunol., 35: 3343-3352

Hellings, N., Barée, M., Verhoeven, C., D'hooghe, M. B., Medaer, R., Bernard, C. C.A., Raus, J., and Stinissen, P., (2001). *T-Cell Reactivity to Multiple Myelin Antigens in Multiple Sclerosis Patients and Healthy Controls* Wiley-Liss, Inc. Journal of Neuroscience Research, 63: 290-302

Hong, J., Li, N., Zhang, X., Zheng, B., and Zhang, J. Z., (2005). *Induction of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells by copolymer-I through activation of transcription factor Foxp3* The National Academy of Sciences of the USA PNAS, vol. 102, no. 18, 6449-6454

Huan, J., Culbertson, N., Spencer, L., Bartholomew, R., Burrows, G. G., Chou, Y. K., Bourdette, D., Ziegler, S. F., Offner, H., and Vandenbark, A. A., (2005). *Decreased FOXP3 Levels in Multiple Sclerosis Patients* Wiley-Liss, Inc. Journal of Neuroscience Research, 81: 45-52

Jana, M. and Pahan, K., (2005). *Redox regulation of cytokine-mediated inhibition of myelin gene expression in human primary oligodendrocytes* NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH-PA Author Manuscript Free Radic Biol Med., 39(6): 823-831

Janeway jr., C. A., Travers, P., Walport, M., Shlomchik, M., (2002). *Immunologie : 5. Auflage* Heidelberg · Berlin : Spektrum Akademischer Verlag GmbH

Jee, Y., Piao, W.H., Liu, R., Bai, X.F., Rhodes, S., Rodebaugh, R., Campagnolo, D.I., Shi, F.D., Vollmer, T.L., (2007). *CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells contribute to the therapeutic effects of glatiramer acetate in experimental autoimmune encephalomyelitis* ELSEVIER Clinical Immunology, 125: 34-42

Karow, T., Lang-Roth, R., (2009). *Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie 2010 : Vorlesungsorientierte Darstellung und klinischer Leitfaden 18. Auflage* Pulheim : Thomas Karow

Klehmet, J., Shive, C., Guardia-Wolff, R., Petersen, I., Spack, E. G., Boehm, B. O., Weissert, R., and Forsthuber, T. G., (2004). *T cell epitope spreading to myelin oligodendrocyte glycoprotein in HLA-DR4 transgenic mice during experimental autoimmune encephalomyelitis* ELSEVIER Clinical Immunology, 111: 53-60

Klinke, R., Silbernagl, S., (2003). *Lehrbuch der Physiologie : 4., korrigierte Auflage* Stuttgart · New York : Georg Thieme Verlag

Korn, T., Reddy, J., Gao, W., Bettelli, E., Awashti, A., Petersen, T. R., Bäckström, B. T., Sobel, R. A., Wucherpfennig, K. W., Strom, T. B., Oukka, M., and Kuchroo, V. K., (2007). *Myelin-specific regulatory T cells accumulate in the CNS but fail to control autoimmune inflammation* Nature Publishing Group NATURE MEDICINE, 1-9

Laplaud, D.-A., Berthelot, L., Miqueu, P., Bourcier, K., Moynard, J., Oudinet, Y., Guillet, M., Ruiz, C., Oden, N., Brouard, S., Guttman, C. R.G., Weiner, H. L., Khoury, S. J., Souilhou, J.-P., (2006). *Serial blood T cell repertoire alterations in multiple sclerosis patients; correlation with clinical and MRI parameters* Journal of Neuroimmunology, 177: 151-160

Löffler, G., Petrides, P. E., (2003). *Biochemie & Pathobiochemie : 7., völlig neu bearbeitete Auflage* Berlin Heidelberg New York : Springer-Verlag

Moldovan, MD, PhD, I. R., Cotleur, MS, A. C., Zamor, BS, N., Butler, MS, R. S., and Pelfrey, PhD, C. M., (2008). *Multiple sclerosis patients show sexual dimorphism in cytokine responses to myelin antigens* NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH-PA Author Manuscript J. Neuroimmunol., 193(1-2): 161-169

Navarro, J., Aristimuño, C., Sánchez-Ramón, S., Vigil, D., Martínez-Ginés, Ma. L., Fernández-Cruz, E., de Andrés, C., (2006). *Circulating dendritic cells subsets and regulatory T-cells at multiple sclerosis relapse: Differential short-term changes on corticosteroids therapy* Journal of Neuroimmunology, 176: 153-161

Offner, H., and Polanczyk, M., (2006). *A Potential Role for Estrogen in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis and Multiple Sclerosis* New York Academy of Sciences, 1089: 343-372

Petereit, H.-F., (2008). *Multiple Sklerose - Frühtherapie hemmt die Krankheitsprogression : Zertifizierte Fortbildung CME Spezial Nr. 29* München : Urban & Vogel GmbH

Ruß, A., Endres, S., (2009). *Arzneimittel pocket plus 2010 : 6. Auflage* Grünwald : Börm Bruckmeier Verlag GmbH

Saresella, M., Marventano, I., Longhi, R., Lissoni, F., Trabattoni, D., Mendozzi, L., Caputo, D., and Clerici, M., (2008). *CD4+CD25+FoxP3+PD1- regulatory T cells in acute and stable relapsing-remitting multiple sclerosis and their modulation by therapy* The FASEB Journal, 22: 3500-3508

Stark, W., Gärtner, J., (2011). *Multiple Sklerose Die Besonderheiten bei Kindern pädiatrie hautnah 2011; 23 (1): 31-6*

Stenner, M.-P., Waschbisch, A., Buck, D., Doerck, S., Einsele, H., Toyka, K. V., Wiendl, H., (2008). *Effects of Natalizumab Treatment on Foxp3+ T Regulatory Cells* PLoS ONE Vol. 3, Issue 10, e3319, 1-9

Trostdorf, F., v. Stuckrad-Barre, S., (2009). *Multiple Sklerose pocketcard Set* Börm Bruckmeier Verlag GmbH

Venken, K., Hellings, N., Broekmans, T., Hensen, K., Rummens, J.-L., and Stinissen, P., (2008). *Natural Naive CD4⁺CD25⁺CD127^{low} Regulatory T Cell (Treg) Development and Function Are Disturbed in Multiple Sclerosis Patients: Recovery of Memory Treg Homeostasis during Disease Progression* The American Association of Immunologists, Inc. The Journal of Immunology, 180: 6411-6420

Venken, K., Hellings, N., Henson, K., Rummens, J.-L., Medaer, R., D'hooghe, M. B., Dubois, B., Raus, J., and Stinissen, P., (2006). *Secondary Progressive in Contrast to Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis Patients Show a Normal CD4⁺CD25⁺ Regulatory T-Cell Function and FOXP3 Expression* Wiley-Liss, Inc. Journal of Neuroscience Research, 83: 1432-1446

Venken, K., Hellings, N., Thewissen, M., Somers, V., Hensen, K., Rummens, J.-L., Medaer, R., Hupperts, R., and Stinissen, P., (2007). *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* Blackwell Publishing Ltd. Immunology, 123: 79-89

Viglietta, V., Baecher-Allan, C., Weiner, H. L., and Hafler, D. A., (2004). *Loss of Functional Suppression by CD4⁺CD25⁺ Regulatory T Cells in Patients with Multiple Sclerosis* The Rockefeller University Press J. Exp. Med., 199: 971-979

Vukmanovic-Stejic, M., Zhang, Y., Cook, J. E., Fletcher, J. M., McQuaid, A., Masters, J. E., Rustin, M. H.A., Taams, L. S., Beverley, P. C.L., Macallan, D. C., and Akbar, A. N., (2006). *Human CD4⁺CD25^{hi}Foxp3⁺ regulatory T cells are derived by rapid turnover of memory populations in vivo* The Journal of Clinical Investigation, 116: 2423-2433

Wang, Z., Hong, J., Sun, W., Xu, G., Li, N., Chen, X., Liu, A., Xu, L., Sun, B., and Zhang J. Z., (2006). *Role of IFN- γ in induction of Foxp3 and conversion of CD4⁺CD25⁺ T cells to CD4⁺ Tregs* The Journal of Clinical Investigation, 116: 2434-2441

Weiß, C., (2010). *Basiswissen Medizinische Statistik : 5. Auflage* Heidelberg : Springer Medizin Verlag

Weißert Dr. Dr., R., (2002). *Experimentelle neuroimmunogenetische Untersuchungen zur Autoaggression und Therapie der Multiplen Sklerose : als kumulative Habilitationsschrift für das Fachgebiet Allgemeine Neurologie der Medizinischen Fakultät der Eberhard-Kars-Universität zu Tübingen*

Weissert., R., Kuhle, J., de Graaf, K. L., Wienhold, W., Herrmann, M. M., Mller, C., Forsthuber, T. G., Wiesmüller, K.-H., and Melms, A., (2002). *High Immunogenicity of Intracellular Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein Epitopes* The American Association of Immunologists, Inc. The Journal of Immunology, 169: 548-556

Weissert, R., Wallstrm, E., Storch, M. K., Stefferl, A., Lorentzen, J., Lassmann, H., Linington, C., and Olsson, T., (1998). *MHC Haplotype-dependent Regulation of MOG-induced EAE in Rats* The American Society for Clinical Investigation, Inc. J. Clin. Invest., 102: 1265-1273

Wucherpfennig, K. W., and Strominger, J. L., (1995). *Molecular mimicry in T cell-mediated autoimmunity : viral peptides activate human T cell clones specific for myelin basic protein* Cell, 80: 695-705

(2003). *FEIERN & LOBEN : DIE GEMEINDELIEDER* Holzgerlingen, Kassel : Hänssler Verlag GmbH, Oncken Verlag

(2010). *ÄRZTE ZEITUNG : AUSGABE 30 MITTWOCH, 17. FEBRUAR 2010* Neu-Isenburg : Springer Medizin, Ärzte Zeitung Verlags-GmbH

(2010). *ÄRZTE ZEITUNG : AUSGABE 62 DIENSTAG, 6. APRIL 2010* Neu-Isenburg : Springer Medizin, Ärzte Zeitung Verlags-GmbH

(2011). *ÄRZTE ZEITUNG : AUSGABE 148 MITTWOCH, 24. AUGUST 2011* Neu-Isenburg : Springer Medizin, Ärzte Zeitung Verlags-GmbH

Anhang

Rohdaten zu 4.1

<u>Gesamt</u>		<u>Lymphos</u>	<u>Davon:</u>	<u>CD3+</u>	<u>CD4+</u>		
<u>12.04.2006</u>	<u>Therapien</u>	<u>100%</u>		<u>%</u>	<u>Absolut</u>	<u>%</u>	
						<u>Absolut</u>	
Pat. 1 (w)		2250		64,19	1444	48,64	1094
Pat. 2 (w)	Rebif	1449		66,95	970	39,27	569
Pat. 3 (m)	fragl. im Schub	1047		51,37	538	29,22	306
Pat. 4 (m)		1435		58,86	845	40,48	581
<u>19.04.2006</u>							
Pat. 1 (w)		2005		70,37	1411	53,75	1078
Pat. 2 (w)	Imurek wegen M. Crohn	922		72,66	670	51,85	478
Pat. 3 (m)		1361		70,53	960	51,42	700
<u>04.05.2006</u>							
Pat. 1 (w)		1337		63,59	850	43,74	585
Pat. 2 (m)	Avonex	1284		56,06	720	36,25	465
Kontr. 3 (w)		2160		60,92	1316	43,85	947
Kontr. 4 (w)		1329		68,69	913	43,67	580
<u>18.05.2006</u>							
Pat. 1 (w)	Glatirameracetat	706		36,98	261	39,97	282
Pat. 2 (m)		1945		77,21	1501	49,65	966
Pat. 3 (w)	Glatirameracetat	3084		52,03	1605	45,61	1407
Pat. 4 (w)		1785		63,36	1131	49,81	889
<u>16.08.2006</u>							
Kontr. 1 (w)		647		38,28	248	37,06	240
Pat2Doppelt		463		50,21	232	43,63	202
<u>08.09.2006</u>							
Pat. 1 (m)	Glatirameracetat	1536		50,21	771	45,80	704
Pat. 2 (w)	Avonex	904		49,64	449	42,77	387
<u>13.09.2006</u>							
Pat. 1 (w)		1899		68,41	1299	48,83	928
Pat. 2 (m)	Natalizumab	2014		65,62	1322	37,22	750
<u>29.09.2006</u>							
Pat. 1 (m)	fragl. im Schub	1636		60,05	982	47,35	775
Pat. 2 (w)		1775		54,10	960	44,21	785
Pat. 3 (w)	Avonex	1102		62,80	692	32,17	354
Pat. 4 (w)	Rebif	1440		65,12	937	52,54	756
Pat. 5 (m)		1127		55,40	624	48,48	546
<u>06.10.2006</u>							
Pat. 1 (w)		1864		57,08	1064	43,32	807
Pat. 2 (w)	Avonex	960		62,56	600	54,97	528
Pat. 3 (w)	Avonex	1949		54,48	1062	51,74	1008
Pat. 4 (w)	Avonex	1794		64,52	1157	50,44	905
<u>20.08.2007</u>							
Kontr. 1 (w)		2641		44,03	1163	40,72	1076
Kontr. 2 (w)		2722		56,78	1546	45,90	1249
Kontr. 3 (w)		1821		53,95	982	40,31	734
Kontr. 4 (w)		2241		60,82	1363	49,40	1107
Kontr. 5 (m)		1509		48,61	734	33,62	507
<u>22.08.2007</u>							
Kontr. 1 (w)		1599		58,16	930	38,85	621
Kontr. 2 (m)		1729		57,86	1000	38,38	663
Kontr. 3 (m)		1945		43,73	851	33,04	643
Kontr. 4 (w)		2239		59,27	1327	43,77	980
Kontr. 5 (m)		1806		38,09	688	30,64	554
<u>24.08.2007</u>							
Pat. 1 (w)		1291		38,74	500	33,84	437
Pat. 2 (m)		1454		39,80	579	35,05	510
Pat. 3 (w)	Avonex	1725		51,78	893	44,81	773
Pat. 4 (w)		1366		54,71	748	42,08	575
Kontr. 5 (w)		1326		46,77	620	28,47	378
Kontr. 6 (w)		2921		62,54	1827	45,93	1341

CD4+25+		CD8+		CD19+		CD16/56+	
%	Absolut	%	Absolut	%	Absolut	%	Absolut
3,63	82	15,24	343	11,78	265	9,96	224
1,91	28	23,81	345	15,72	228	8,43	122
3,38	35	21,30	223	18,67	195	12,39	130
3,47	50	15,61	224	10,10	145	17,85	256
4,84	97	20,02	401	6,38	128	12,28	246
6,37	59	17,57	162	13,37	123	1,46	13
5,19	71	21,72	296	8,42	115	10,77	147
3,00	40	22,10	295	9,89	132	12,09	162
4,39	56	26,91	346	9,34	120	19,11	245
4,79	103	28,53	616	3,57	77	26,93	582
3,79	50	26,93	358	6,57	87	13,24	176
3,82	27	22,55	159	4,02	28	32,24	228
5,28	103	31,97	622	9,79	190	7,44	145
4,44	137	17,45	538	21,34	658	11,11	343
4,68	84	17,84	319	9,72	174	15,59	278
2,93	19	16,35	106	10,71	69	19,82	128
2,72	13	26,45	122	5,86	27	12,91	60
4,46	69	23,71	364	6,03	93	27,13	417
5,13	46	18,08	163	9,45	85	22,87	207
4,12	78	26,62	506	8,46	161	12,11	230
3,04	61	32,31	651	11,15	225	11,11	224
3,45	56	19,99	327	7,90	129	20,54	336
2,52	45	15,88	282	6,96	124	29,94	531
1,84	20	28,76	317	9,02	99	13,59	150
2,26	33	19,38	279	5,56	80	18,81	271
3,57	40	18,28	206	7,97	90	13,10	148
2,00	37	25,77	480	10,62	198	23,75	443
4,05	39	19,24	185	8,56	82	8,13	78
4,47	87	10,54	205	19,23	375	7,06	138
5,23	94	19,59	351	10,22	183	11,36	204
2,21	58	23,02	608	4,51	119	16,80	444
2,02	55	21,35	581	11,41	311	8,25	225
1,91	35	20,70	377	11,61	211	11,40	208
2,06	46	17,91	401	7,55	169	8,02	180
2,13	32	19,43	293	10,73	162	13,41	202
2,92	47	24,10	385	6,80	109	9,41	150
2,12	37	25,46	440	12,24	212	7,45	129
1,95	38	22,34	435	11,38	221	19,67	383
3,07	69	20,88	467	8,61	193	8,91	199
3,09	56	15,96	288	9,48	171	18,40	332
3,46	45	11,96	154	4,41	57	12,55	162
2,53	37	16,18	235	13,04	190	20,54	299
4,38	76	10,40	179	10,59	183	6,00	104
5,35	73	15,39	210	3,80	52	10,82	148
2,99	40	21,17	281	10,43	138	15,33	203
4,14	121	21,57	630	8,74	255	6,71	196

In % der CD3	CD3+ 100%	<u>Davon:</u>	CD4+ %	Absolut	CD4+25+ %	Absolut	CD8+ %	Absolut
	1444		75,76	1094	5,68	82	23,75	343
	970		58,66	569	2,89	28	35,57	345
	538		56,88	306	6,51	35	41,45	223
	845		68,76	581	5,92	50	26,51	224
	1411		76,40	1078	6,87	97	28,42	401
	670		71,34	478	8,81	59	24,18	162
	960		72,92	700	7,40	71	30,83	296
	850		68,78	585	4,72	40	34,75	295
	720		64,66	465	7,83	56	48,00	346
	1316		71,98	947	7,86	103	46,83	616
	913		63,58	580	5,52	50	39,21	358
	261		108,08	282	10,33	27	60,98	159
	1501		64,31	966	6,84	103	41,41	622
	1605		87,66	1407	8,53	137	33,54	538
	1131		78,61	889	7,39	84	28,16	319
	248		96,81	240	7,65	19	42,71	106
	232		86,90	202	5,42	13	52,68	122
	771		91,22	704	8,88	69	47,22	364
	449		86,16	387	10,34	46	36,42	163
	1299		71,38	928	6,02	78	38,91	506
	1322		56,72	750	4,63	61	49,24	651
	982		78,85	775	5,74	56	33,29	327
	960		81,72	785	4,66	45	29,35	282
	692		51,23	354	2,93	20	45,80	317
	937		80,68	756	3,47	33	29,76	279
	624		87,51	546	6,44	40	33,00	206
	1064		75,89	807	3,50	37	45,15	480
	600		87,87	528	6,47	39	30,75	185
	1062		94,97	1008	8,21	87	19,35	205
	1157		78,18	905	8,11	94	30,36	351
	1163		92,48	1076	5,02	58	52,28	608
	1546		80,84	1249	3,56	55	37,60	581
	982		74,72	734	3,54	35	38,37	377
	1363		81,22	1107	3,39	46	29,45	401
	734		69,16	507	4,38	32	39,97	293
	930		66,80	621	5,02	47	41,44	385
	1000		66,33	663	3,66	37	44,00	440
	851		75,55	643	4,46	38	51,09	435
	1327		73,85	980	5,18	69	35,23	467
	688		80,44	554	8,11	56	41,90	288
	500		87,35	437	8,93	45	30,87	154
	579		88,06	510	6,36	37	40,65	235
	893		86,54	773	8,46	76	20,08	179
	748		76,92	575	9,78	73	28,13	210
	620		60,87	378	6,39	40	45,26	281
	1827		73,44	1341	6,62	121	34,49	630

In % der	CD4+CD25+	CD4+25+	<u>Davon:</u>	CD69+	Absolut	DR+	Absolut
		100%		%		%	
		40		6,04	2	17,48	7
		56		2,70	2	34,03	19
		103		2,43	3	31,61	33
		50		1,64	1	34,27	17
		27		0,72	0	13,14	4
		103		1,56	2	20,76	21
		137		1,07	1	23,94	33
		84		0,52	0	26,47	22
		19		0,00	0	24,05	5
		13		0,00	0	31,25	4
		69		1,72	1	15,79	11
		46		0,00	0	11,89	6
		78		0,57	0	20,68	16
		61		0,78	0	19,44	12
		56		2,06	1	19,58	11
		45		0,86	0	28,23	13
		20		0,66	0	42,68	9
		33		1,36	0	27,45	9
		40		0,00	0	25,93	10
		37		2,07	1	32,76	12
		39		0,00	0	37,37	15
		87		1,55	1	43,37	38
		94		2,20	2	58,93	55
		58		3,61	2	21,21	12
		55		1,83	1	26,22	14
		35		1,07	0	35,04	12
		46		0,68	0	17,56	8
		32		2,63	1	35,71	11
		47		1,77	1	27,07	13
		37		1,52	1	24,38	9
		38		2,04	1	27,85	11
		69		0,00	0	25,00	17
		56		0,99	1	25,14	14
		45		1,10	0	33,08	15
		37		5,98	2	38,21	14
		76		0,68	1	27,41	21
		73		1,86	1	20,33	15
		40		1,64	1	20,51	8
		121		3,23	4	19,77	24

Berechnungen zu den Daten der Abb. 3

Die Leukozytenzellzahl wurde durch Bestimmung des Blutbildes mithilfe des Blutanalysegerätes ADVIA 120 erhalten.

<u>Kontrolle 4 (w)</u>	%	Absolut	In % der CD3+	%	Absolut
Leukos	100,00	5570	CD3+	100,00	913
Lymphos	23,86	1329	CD4+	63,58	580
			CD8+	39,21	358
In % der Lymphos			CD4+25+	5,52	50
CD3+	68,69	913	In % der CD4+25+		
CD19+	6,57	87	CD4+25+	100,00	50
CD16/56+	13,24	176	CD69+	1,64	1
CD4+	43,67	580	DR+	34,27	17
CD8+	26,93	358			
CD4+25+	3,79	50			

Statistik zu Signifikanzen bei 4.1

Alle Patienten gegen alle Kontrollen Lymphozyten Absolut

Table Analyzed Data 1
Column A
vs
Column B

Unpaired t test

P value	0,0356
P value summary	*
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=2.170 df=43

How big is the difference?

Mean ± SEM of column A	1548 ± 88.45 N=30
Mean ± SEM of column B	1909 ± 155.5 N=15
Difference between means	-360.8 ± 166.3
95% confidence interval	-696.3 to -25.30
R squared	0,09870

F test to compare variances

F,DFn, Dfd	1.546, 14, 29
P value	0,3127
P value summary	ns
Are variances significantly different?	No

Alle Patienten gegen alle Kontrollen CD4+ Prozent der Lymphos

Table Analyzed Data 4
 Column A
 vs
 Column B

Unpaired t test
 P value 0,0226
 P value summary *
 Are means signif. different? (P < 0.05) Yes
 One- or two-tailed P value? Two-tailed
 t, df t=2.365 df=43

How big is the difference?
 Mean \pm SEM of column A 44.51 \pm 1.246 N=30
 Mean \pm SEM of column B 39.57 \pm 1.575 N=15
 Difference between means 4.935 \pm 2.087
 95% confidence interval 0.7245 to 9.146
 R squared 0,1151

F test to compare variances
 F,DFn, Dfd 1.252, 29, 14
 P value 0,6729
 P value summary ns
 Are variances significantly different? No

Alle Patienten gegen alle Kontrollen CD4+25+ Prozent der Lymphos

Table Analyzed Data 6
 Column A
 vs
 Column B

Unpaired t test
 P value 0,0031
 P value summary **
 Are means signif. different? (P < 0.05) Yes
 One- or two-tailed P value? Two-tailed
 t, df t=3.138 df=43

How big is the difference?
 Mean \pm SEM of column A 3.875 \pm 0.2114 N=30
 Mean \pm SEM of column B 2.808 \pm 0.2277 N=15
 Difference between means 1.067 \pm 0.3402
 95% confidence interval 0.3809 to 1.754
 R squared 0,1863

F test to compare variances
 F,DFn, Dfd 1.723, 29, 14
 P value 0,2832
 P value summary ns
 Are variances significantly different? No

Alle Patienten gegen alle Kontrollen CD8+ Absolut

Table Analyzed Data 9
Column A
vs
Column B

Unpaired t test

P value	0,0209
P value summary	*
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=2.397 df=43

How big is the difference?

Mean ± SEM of column A	312.2 ± 24.63 N=30
Mean ± SEM of column B	417.7 ± 38.13 N=15
Difference between means	-105.5 ± 44.01
95% confidence interval	-194.3 to -16.69
R squared	0,1179

F test to compare variances

F,DFn, Dfd	1.198, 14, 29
P value	0,6555
P value summary	ns
Are variances significantly different?	No

Alle Patienten gegen alle Kontrollen CD4+25+ Prozent der CD3+

Table Analyzed Data 15
Column A
vs
Column B

Unpaired t test

P value	0,0293
P value summary	*
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=2.255 df=43

How big is the difference?

Mean ± SEM of column A	6.755 ± 0.3837 N=30
Mean ± SEM of column B	5.357 ± 0.4202 N=15
Difference between means	1.398 ± 0.6198
95% confidence interval	0.1471 to 2.648
R squared	0,1058

F test to compare variances

F,DFn, Dfd	1.667, 29, 14
P value	0,3139
P value summary	ns
Are variances significantly different?	No

Alle Patienten gegen alle Kontrollen CD8+ Prozent der CD3+

Table Analyzed Data 16
Column A
vs
Column B

Unpaired t test

P value	0,0212
P value summary	*
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=2.392 df=43

How big is the difference?

Mean ± SEM of column A	34.86 ± 1.732 N=30
Mean ± SEM of column B	41.32 ± 1.580 N=15
Difference between means	-6.459 ± 2.700
95% confidence interval	-11.91 to -1.011
R squared	0,1175

F test to compare variances

F,DFn, Dfd	2.403, 29, 14
P value	0,0861
P value summary	ns
Are variances significantly different?	No

Weibl. Patienten gegen weibl. Kontrollen CD8+ Absolut

Table Analyzed Data 30
Column A
vs
Column B

Unpaired t test

P value	0,0090
P value summary	**
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=2.802 df=29

How big is the difference?

Mean ± SEM of column A	293.7 ± 26.79 N=20
Mean ± SEM of column B	437.3 ± 49.35 N=11
Difference between means	-143.6 ± 51.26
95% confidence interval	-248.4 to -38.80
R squared	0,2131

F test to compare variances

F,DFn, Dfd	1.866, 10, 19
P value	0,2323
P value summary	ns
Are variances significantly different?	No

Weibl. Patienten gegen weibl. Kontrollen CD8+ Prozent der CD3+

Table Analyzed Data 37
Column A
vs
Column B

Unpaired t test

P value	0,0277
P value summary	*
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=2.318 df=29

How big is the difference?

Mean ± SEM of column A	32.71 ± 2.161 N=20
Mean ± SEM of column B	40.26 ± 1.924 N=11
Difference between means	-7.547 ± 3.256
95% confidence interval	-14.21 to -0.8887
R squared	0,1563

F test to compare variances

F,DFn, Dfd	2.293, 19, 10
P value	0,1796
P value summary	ns
Are variances significantly different?	No

Männl. Patienten gegen männl. Kontrollen CD4+25+ Prozent der Lymphos

Table Analyzed Data 48
Column A
vs
Column B

Unpaired t test

P value	0,0083
P value summary	**
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=3.156 df=12

How big is the difference?

Mean ± SEM of column A	3.876 ± 0.2887 N=10
Mean ± SEM of column B	2.323 ± 0.2591 N=4
Difference between means	1.554 ± 0.4922
95% confidence interval	0.4810 to 2.626
R squared	0,4536

F test to compare variances

F,DFn, Dfd	3.102, 9, 3
P value	0,3815
P value summary	ns
Are variances significantly different?	No

Alle Frauen (P+K) gegen alle Männer (P+K) CD4+ Prozent der Lymphos

Table Analyzed Data 67

Column A

vs

Column B

Unpaired t test

P value	0,0420
P value summary	*
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=2.096 df=43

How big is the difference?

Mean ± SEM of column A	44.27 ± 1.134 N=31
Mean ± SEM of column B	39.76 ± 1.995 N=14
Difference between means	4.510 ± 2.152
95% confidence interval	0.1687 to 8.852
R squared	0,09272

F test to compare variances

F,DFn, Dfd	1.398, 13, 30
P value	0,4343
P value summary	ns
Are variances significantly different?	No

Weibl. Patienten gegen alle Kontrollen CD4+ Prozent der Lymphos

Table Analyzed Data 88

Column A

vs

Column B

Unpaired t test

P value	0,0068
P value summary	**
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=2.885 df=33

How big is the difference?

Mean ± SEM of column A	45.72 ± 1.416 N=20
Mean ± SEM of column B	39.57 ± 1.575 N=15
Difference between means	6.144 ± 2.130
95% confidence interval	1.809 to 10.48
R squared	0,2014

F test to compare variances

F,DFn, Dfd	1.077, 19, 14
P value	0,9033
P value summary	ns
Are variances significantly different?	No

Weibl. Patienten gegen alle Kontrollen CD4+25+ Prozent der Lymphos

Table Analyzed Data 90
Column A
vs
Column B

Unpaired t test

P value	0,0094
P value summary	**
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=2.760 df=33

How big is the difference?

Mean ± SEM of column A	3.875 ± 0.2873 N=20
Mean ± SEM of column B	2.808 ± 0.2277 N=15
Difference between means	1.067 ± 0.3865
95% confidence interval	0.2801 to 1.854
R squared	0,1876

F test to compare variances

F,DFn, Dfd	2.123, 19, 14
P value	0,1556
P value summary	ns
Are variances significantly different?	No

Weibl. Patienten gegen alle Kontrollen CD8+ Absolut

Table Analyzed Data 93
Column A
vs
Column B

Unpaired t test

P value	0,0097
P value summary	**
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=2.745 df=33

How big is the difference?

Mean ± SEM of column A	293.7 ± 26.79 N=20
Mean ± SEM of column B	417.7 ± 38.13 N=15
Difference between means	-124.1 ± 45.21
95% confidence interval	-216.1 to -32.05
R squared	0,1859

F test to compare variances

F,DFn, Dfd	1.519, 14, 19
P value	0,3912
P value summary	ns
Are variances significantly different?	No

Weibl. Patienten gegen alle Kontrollen CD8+ Prozent der CD3+

Table Analyzed Data 100

Column A

vs

Column B

Unpaired t test

P value	0,0049
P value summary	**
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=3.020 df=33

How big is the difference?

Mean ± SEM of column A	32.71 ± 2.161 N=20
Mean ± SEM of column B	41.32 ± 1.580 N=15
Difference between means	-8.608 ± 2.851
95% confidence interval	-14.41 to -2.805
R squared	0,2165

F test to compare variances

F,DFn, Dfd	2.493, 19, 14
P value	0,0865
P value summary	ns
Are variances significantly different?	No

Männl. Patienten gegen alle Kontrollen CD4+25+ Prozent der Lymphos

Table Analyzed Data 111

Column A

vs

Column B

Unpaired t test

P value	0,0076
P value summary	**
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=2.926 df=23

How big is the difference?

Mean ± SEM of column A	3.876 ± 0.2887 N=10
Mean ± SEM of column B	2.808 ± 0.2277 N=15
Difference between means	1.068 ± 0.3650
95% confidence interval	0.3127 to 1.823
R squared	0,2712

F test to compare variances

F,DFn, Dfd	1.071, 9, 14
P value	0,8759
P value summary	ns
Are variances significantly different?	No

Männl. Patienten gegen alle Kontrollen CD4+25+ Prozent der CD3+

Table Analyzed Data 120
Column A
vs
Column B

Unpaired t test

P value	0,0411
P value summary	*
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=2.164 df=23

How big is the difference?

Mean ± SEM of column A	6.655 ± 0.3735 N=10
Mean ± SEM of column B	5.357 ± 0.4202 N=15
Difference between means	1.298 ± 0.5998
95% confidence interval	0.05676 to 2.539
R squared	0,1691

F test to compare variances

F,DFn, Dfd	1.899, 14, 9
P value	0,3354
P value summary	ns
Are variances significantly different?	No

Weibl. Kontrollen gegen männl. Kontrollen CD4+ Prozent der Lymphos

Table Analyzed Data 4
Column A
vs
Column B

Unpaired t test

P value	0,0239
P value summary	*
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=2.557 df=13

How big is the difference?

Mean ± SEM of column A	41.63 ± 1.693 N=11
Mean ± SEM of column B	33.92 ± 1.621 N=4
Difference between means	7.710 ± 3.015
95% confidence interval	1.198 to 14.22
R squared	0,3347

F test to compare variances

F,DFn, Dfd	3.000, 10, 3
P value	0,3968
P value summary	ns
Are variances significantly different?	No

Weibl. Kontrollen gegen alle Patienten Lymphozyten Absolut

Table Analyzed Data 1
Column A
vs
Column B

Unpaired t test

P value	0,0355
P value summary	*
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=2.179 df=39

How big is the difference?

Mean ± SEM of column A	1968 ± 209.7 N=11
Mean ± SEM of column B	1548 ± 88.45 N=30
Difference between means	419.6 ± 192.6
95% confidence interval	29.96 to 809.3
R squared	0,1085

F test to compare variances

F,DFn, Dfd	2.061, 10, 29
P value	0,1258
P value summary	ns
Are variances significantly different?	No

Weibl. Kontrollen gegen alle Patienten CD4+25+ Prozent der Lymphozyten

Table Analyzed Data 6
Column A
vs
Column B

Unpaired t test

P value	0,0278
P value summary	*
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=2.286 df=39

How big is the difference?

Mean ± SEM of column A	2.985 ± 0.2828 N=11
Mean ± SEM of column B	3.875 ± 0.2114 N=30
Difference between means	-0.8908 ± 0.3897
95% confidence interval	-1.679 to -0.1024
R squared	0,1181

F test to compare variances

F,DFn, Dfd	1.524, 29, 10
P value	0,4920
P value summary	ns
Are variances significantly different?	No

Weibl. Kontrollen gegen alle Patienten CD8+ Absolut

Table Analyzed Data 9

Column A

vs

Column B

Unpaired t test

P value	0,0174
P value summary	*
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=2.484 df=39

How big is the difference?

Mean ± SEM of column A	437.3 ± 49.35 N=11
Mean ± SEM of column B	312.2 ± 24.63 N=30
Difference between means	125.0 ± 50.34
95% confidence interval	23.19 to 226.9
R squared	0,1366

F test to compare variances

F,DFn, Dfd	1.472, 10, 29
P value	0,3999
P value summary	ns
Are variances significantly different?	No

Männl. Kontrollen gegen alle Patienten CD3+ Prozent der Lymphozyten

Table Analyzed Data 23

Column A

vs

Column B

Unpaired t test

P value	0,0324
P value summary	*
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=2.236 df=32

How big is the difference?

Mean ± SEM of column A	47.07 ± 4.189 N=4
Mean ± SEM of column B	58.64 ± 1.798 N=30
Difference between means	-11.57 ± 5.173
95% confidence interval	-22.11 to -1.026
R squared	0,1351

F test to compare variances

F,DFn, Dfd	1.381, 29, 3
P value	0,9084
P value summary	ns
Are variances significantly different?	No

Männl. Kontrollen gegen alle Patienten CD4+ Prozent der Lymphozyten

Table Analyzed Data 25
Column A
vs
Column B

Unpaired t test

P value	0,0049
P value summary	**
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=3.026 df=32

How big is the difference?

Mean ± SEM of column A	33.92 ± 1.621 N=4
Mean ± SEM of column B	44.51 ± 1.246 N=30
Difference between means	-10.59 ± 3.499
95% confidence interval	-17.72 to -3.458
R squared	0,2225

F test to compare variances

F,DFn, Dfd	4.436, 29, 3
P value	0,2441
P value summary	ns
Are variances significantly different?	No

Männl. Kontrollen gegen alle Patienten CD4+25+ Prozent der Lymphozyten

Table Analyzed Data 27
Column A
vs
Column B

Unpaired t test

P value	0,0133
P value summary	*
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=2.620 df=32

How big is the difference?

Mean ± SEM of column A	2.323 ± 0.2591 N=4
Mean ± SEM of column B	3.875 ± 0.2114 N=30
Difference between means	-1.553 ± 0.5927
95% confidence interval	-2.761 to -0.3450
R squared	0,1766

F test to compare variances

F,DFn, Dfd	4.990, 29, 3
P value	0,2095
P value summary	ns
Are variances significantly different?	No

Therapierte Patienten gegen alle Kontrollen CD4+25+ Prozent der Lymphos

Table Analyzed Data 174

Column A

vs

Column B

Unpaired t test

P value	0,0163
P value summary	*
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=2.568 df=26

How big is the difference?

Mean ± SEM of column A	3.802 ± 0.3224 N=13
Mean ± SEM of column B	2.808 ± 0.2277 N=15
Difference between means	0.9935 ± 0.3869
95% confidence interval	0.1980 to 1.789
R squared	0,2023

F test to compare variances

F,DFn, Dfd	1.738, 12, 14
P value	0,3225
P value summary	ns
Are variances significantly different?	No

Nicht therapierte Patienten gegen alle Kontrollen CD4+ Prozent der Lymphos

Table Analyzed Data 36

Column A

vs

Column B

Unpaired t test

P value	0,0176
P value summary	*
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=2.528 df=27

How big is the difference?

Mean ± SEM of column A	45.24 ± 1.589 N=14
Mean ± SEM of column B	39.57 ± 1.575 N=15
Difference between means	5.662 ± 2.239
95% confidence interval	1.067 to 10.26
R squared	0,1914

F test to compare variances

F,DFn, Dfd	1.053, 14, 13
P value	0,9309
P value summary	ns
Are variances significantly different?	No

Nicht therapierte Patienten gegen alle Kontrollen CD4+25+ Prozent der Lymphos

Table Analyzed Data 38

Column A

vs

Column B

Unpaired t test

P value	0,0101
P value summary	*
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=2.764 df=27

How big is the difference?

Mean ± SEM of column A	3.831 ± 0.2956 N=14
Mean ± SEM of column B	2.808 ± 0.2277 N=15
Difference between means	1.023 ± 0.3702
95% confidence interval	0.2638 to 1.783
R squared	0,2206

F test to compare variances

F,DFn, Dfd	1.573, 13, 14
P value	0,4110
P value summary	ns
Are variances significantly different?	No

Nicht therapierte Patienten gegen alle Kontrollen CD8+ Prozent der CD3+

Table Analyzed Data 48

Column A

vs

Column B

Unpaired t test

P value	0,0011
P value summary	**
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=3.643 df=27

How big is the difference?

Mean ± SEM of column A	32.85 ± 1.711 N=14
Mean ± SEM of column B	41.32 ± 1.580 N=15
Difference between means	-8.473 ± 2.325
95% confidence interval	-13.24 to -3.701
R squared	0,3296

F test to compare variances

F,DFn, Dfd	1.094, 13, 14
P value	0,8654
P value summary	ns
Are variances significantly different?	No

Weibl. therapierte Patienten gegen männl. therapierte Patienten CD8+ Prozent der Lymphos

Table Analyzed Data 281

Column A

vs

Column B

Unpaired t test

P value	0,0324
P value summary	*
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=2.447 df=11

How big is the difference?

Mean ± SEM of column A	18.98 ± 1.765 N=10
Mean ± SEM of column B	27.64 ± 2.510 N=3
Difference between means	-8.663 ± 3.540
95% confidence interval	-16.45 to -0.8718
R squared	0,3525

F test to compare variances

F,DFn, Dfd	1.649, 9, 2
P value	0,8679
P value summary	ns
Are variances significantly different?	No

Männl. therapierte Patienten gegen männl. nicht therapierte Patienten CD8+ Prozent der CD3+

Table Analyzed Data 247

Column A

vs

Column B

Unpaired t test

P value	0,0121
P value summary	*
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=3.547 df=6

How big is the difference?

Mean ± SEM of column A	34.48 ± 2.873 N=5
Mean ± SEM of column B	48.15 ± 0.5881 N=3
Difference between means	-13.67 ± 3.855
95% confidence interval	-23.11 to -4.240
R squared	0,6771

F test to compare variances

F,DFn, Dfd	39.78, 4, 2
P value	0,0493
P value summary	*
Are variances significantly different?	Yes

Weibl. therapierte Patienten gegen alle Kontrollen CD4+ Prozent der Lymphos

Table Analyzed Data 67

Column A

vs

Column B

Unpaired t test

P value	0,0382
P value summary	*
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=2.199 df=23

How big is the difference?

Mean ± SEM of column A	45.43 ± 2.255 N=10
Mean ± SEM of column B	39.57 ± 1.575 N=15
Difference between means	5.855 ± 2.663
95% confidence interval	0.3454 to 11.36
R squared	0,1737

F test to compare variances

F,DFn, Dfd	1.366, 9, 14
P value	0,5796
P value summary	ns
Are variances significantly different?	No

Weibl. therapierte Patienten gegen alle Kontrollen CD4+25+ Prozent der Lymphos

Table Analyzed Data 69

Column A

vs

Column B

Unpaired t test

P value	0,0390
P value summary	*
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=2.189 df=23

How big is the difference?

Mean ± SEM of column A	3.753 ± 0.4060 N=10
Mean ± SEM of column B	2.808 ± 0.2277 N=15
Difference between means	0.9450 ± 0.4317
95% confidence interval	0.05171 to 1.838
R squared	0,1724

F test to compare variances

F,DFn, Dfd	2.119, 9, 14
P value	0,2008
P value summary	ns
Are variances significantly different?	No

Weibl. therapierte Patienten gegen alle Kontrollen CD8+ Absolut

Table Analyzed Data 72
Column A
vs
Column B

Unpaired t test

P value	0,0162
P value summary	*
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=2.594 df=23

How big is the difference?

Mean ± SEM of column A	272.1 ± 37.97 N=10
Mean ± SEM of column B	417.7 ± 38.13 N=15
Difference between means	-145.6 ± 56.15
95% confidence interval	-261.8 to -29.47
R squared	0,2263

F test to compare variances

F,DFn, Dfd	1.512, 14, 9
P value	0,5395
P value summary	ns
Are variances significantly different?	No

Weibl. nicht therapierte Patienten gegen alle Kontrollen CD4+ Prozent der Lymphos

Table Analyzed Data 52
Column A
vs
Column B

Unpaired t test

P value	0,0316
P value summary	*
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=2.296 df=22

How big is the difference?

Mean ± SEM of column A	45.36 ± 1.917 N=9
Mean ± SEM of column B	39.57 ± 1.575 N=15
Difference between means	5.784 ± 2.520
95% confidence interval	0.5582 to 11.01
R squared	0,1932

F test to compare variances

F,DFn, Dfd	1.125, 14, 8
P value	0,9003
P value summary	ns
Are variances significantly different?	No

Weibl. nicht therapierte Patienten gegen alle Kontrollen CD4+25+ Prozent der Lymphos

Table Analyzed Data 54
Column A
vs
Column B

Unpaired t test

P value	0,0346
P value summary	*
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=2.253 df=22

How big is the difference?

Mean ± SEM of column A	3.733 ± 0.3724 N=9
Mean ± SEM of column B	2.808 ± 0.2277 N=15
Difference between means	0.9253 ± 0.4107
95% confidence interval	0.07355 to 1.777
R squared	0,1875

F test to compare variances

F,DFn, Dfd	1.604, 8, 14
P value	0,4195
P value summary	ns
Are variances significantly different?	No

Weibl. nicht therapierte Patienten gegen alle Kontrollen CD8+ Prozent der CD3+

Table Analyzed Data 64
Column A
vs
Column B

Unpaired t test

P value	0,0019
P value summary	**
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=3.534 df=22

How big is the difference?

Mean ± SEM of column A	31.94 ± 2.196 N=9
Mean ± SEM of column B	41.32 ± 1.580 N=15
Difference between means	-9.379 ± 2.654
95% confidence interval	-14.88 to -3.875
R squared	0,3621

F test to compare variances

F,DFn, Dfd	1.158, 8, 14
P value	0,7731
P value summary	ns
Are variances significantly different?	No

Männl. therapierte Patienten gegen alle Kontrollen CD8+ Prozent der Lymphos

Table Analyzed Data 92

Column A

vs

Column B

Unpaired t test

P value	0,0216
P value summary	*
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=2.546 df=16

How big is the difference?

Mean ± SEM of column A	27.64 ± 2.510 N=3
Mean ± SEM of column B	21.71 ± 0.9238 N=15
Difference between means	5.930 ± 2.329
95% confidence interval	0.9920 to 10.87
R squared	0,2883

F test to compare variances

F,DFn, Dfd	1.476, 2, 14
P value	0,5241
P value summary	ns
Are variances significantly different?	No

Männl. therapierte Patienten gegen alle Kontrollen CD4+25+ Prozent der Lymphos

Table Analyzed Data 90

Column A

vs

Column B

Unpaired t test

P value	0,0525
P value summary	ns
Are means signif. different? (P < 0.05)	No
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=2.095 df=16

How big is the difference?

Mean ± SEM of column A	3.963 ± 0.4621 N=3
Mean ± SEM of column B	2.808 ± 0.2277 N=15
Difference between means	1.155 ± 0.5516
95% confidence interval	-0.01406 to 2.325
R squared	0,2152

F test to compare variances

F,DFn, Dfd	1.214, 14, 2
P value	1,0820
P value summary	ns
Are variances significantly different?	No

Männl. nicht therapierte Patienten gegen alle Kontrollen CD4+25+ Prozent der Lymphos

Table Analyzed Data 48

Column A

vs

Column B

Unpaired t test

P value	0,0262
P value summary	*
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=2.422 df=18

How big is the difference?

Mean ± SEM of column A	4.008 ± 0.5330 N=5
Mean ± SEM of column B	2.808 ± 0.2277 N=15
Difference between means	1.200 ± 0.4955
95% confidence interval	0.1590 to 2.241
R squared	0,2458

F test to compare variances

F,DFn, Dfd	1.826, 4, 14
P value	0,3599
P value summary	ns
Are variances significantly different?	No

Männl. nicht therapierte Patienten gegen alle Kontrollen CD8+ Prozent der CD3+

Table Analyzed Data 58

Column A

vs

Column B

Unpaired t test

P value	0,0462
P value summary	*
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=2.141 df=18

How big is the difference?

Mean ± SEM of column A	34.48 ± 2.873 N=5
Mean ± SEM of column B	41.32 ± 1.580 N=15
Difference between means	-6.842 ± 3.196
95% confidence interval	-13.56 to -0.1271
R squared	0,2029

F test to compare variances

F,DFn, Dfd	1.102, 4, 14
P value	0,7876
P value summary	ns
Are variances significantly different?	No

Glatirameracetat gegen Rebif CD3+ Prozent der Lymphos

Table Analyzed Data 297

Column A

vs

Column B

Unpaired t test

P value	0,0499
P value summary	*
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=3.186 df=3

How big is the difference?

Mean ± SEM of column A	46.41 ± 4.743 N=3
Mean ± SEM of column B	66.04 ± 0.9150 N=2
Difference between means	-19.63 ± 6.160
95% confidence interval	-39.23 to -0.02582
R squared	0,7719

F test to compare variances

F,DFn, Dfd	40.30, 2, 1
P value	0,2214
P value summary	ns
Are variances significantly different?	No

Glatirameracetat gegen Rebif CD4+25+ Prozent der Lymphos

Table Analyzed Data 301

Column A

vs

Column B

Unpaired t test

P value	0,0056
P value summary	**
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=7.161 df=3

How big is the difference?

Mean ± SEM of column A	4.240 ± 0.2101 N=3
Mean ± SEM of column B	2.085 ± 0.1750 N=2
Difference between means	2.155 ± 0.3009
95% confidence interval	1.197 to 3.113
R squared	0,9447

F test to compare variances

F,DFn, Dfd	2.162, 2, 1
P value	0,8668
P value summary	ns
Are variances significantly different?	No

Glatirameracetat gegen Rebif CD4+25+ Prozent der CD3+

Table Analyzed Data 310

Column A

vs

Column B

Unpaired t test

P value	0,0038
P value summary	**
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=8.160 df=3

How big is the difference?

Mean ± SEM of column A	9.247 ± 0.5510 N=3
Mean ± SEM of column B	3.180 ± 0.2900 N=2
Difference between means	6.067 ± 0.7435
95% confidence interval	3.701 to 8.432
R squared	0,9569

F test to compare variances

F,DFn, Dfd	5.415, 2, 1
P value	0,5815
P value summary	ns
Are variances significantly different?	No

Glatirameracetat gegen Avonex CD3+ Prozent der Lymphos

Table Analyzed Data 2

Column A

vs

Column B

Unpaired t test

P value	0,0411
P value summary	*
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=2.432 df=8

How big is the difference?

Mean ± SEM of column A	46.41 ± 4.743 N=3
Mean ± SEM of column B	57.41 ± 2.229 N=7
Difference between means	-11.00 ± 4.522
95% confidence interval	-21.43 to -0.5710
R squared	0,4251

F test to compare variances

F,DFn, Dfd	1.941, 2, 6
P value	0,4477
P value summary	ns
Are variances significantly different?	No

Glatirameracetat gegen Avonex CD16/56+ Absolut

Table Analyzed Data 13

Column A

vs

Column B

Unpaired t test

P value	0,0086
P value summary	**
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=3.455 df=8

How big is the difference?

Mean ± SEM of column A	329.3 ± 54.99 N=3
Mean ± SEM of column B	160.9 ± 22.79 N=7
Difference between means	168.5 ± 48.76
95% confidence interval	56.03 to 280.9
R squared	0,5987

F test to compare variances

F,DFn, Dfd	2.495, 2, 6
P value	0,3254
P value summary	ns
Are variances significantly different?	No

Glatirameracetat gegen Interferon β-1a gesamt CD3+ Prozent der Lymphos

Table Analyzed Data 23

Column A

vs

Column B

Unpaired t test

P value	0,0171
P value summary	*
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=2.853 df=10

How big is the difference?

Mean ± SEM of column A	46.41 ± 4.743 N=3
Mean ± SEM of column B	59.32 ± 2.128 N=9
Difference between means	-12.92 ± 4.527
95% confidence interval	-23.00 to -2.831
R squared	0,4488

F test to compare variances

F,DFn, Dfd	1.655, 2, 8
P value	0,5006
P value summary	ns
Are variances significantly different?	No

Glatirameracetat gegen Interferon β -1a gesamt CD16/56+ Absolut

Table Analyzed Data 34

Column A

vs

Column B

Unpaired t test

P value	0,0079
P value summary	**
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=3.307 df=10

How big is the difference?

Mean \pm SEM of column A	329.3 \pm 54.99 N=3
Mean \pm SEM of column B	168.8 \pm 22.01 N=9
Difference between means	160.6 \pm 48.55
95% confidence interval	52.39 to 268.7
R squared	0,5224

F test to compare variances

F,DFn, Dfd	2.080, 2, 8
P value	0,3747
P value summary	ns
Are variances significantly different?	No

Glatirameracetat gegen nicht therapierte Patienten CD4+ Prozent der CD3+

Table Analyzed Data 14

Column A

vs

Column B

Unpaired t test

P value	0,0020
P value summary	**
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=3.736 df=15

How big is the difference?

Mean \pm SEM of column A	76.74 \pm 1.977 N=14
Mean \pm SEM of column B	95.65 \pm 6.298 N=3
Difference between means	-18.91 \pm 5.062
95% confidence interval	-29.70 to -8.125
R squared	0,4820

F test to compare variances

F,DFn, Dfd	2.173, 2, 13
P value	0,3067
P value summary	ns
Are variances significantly different?	No

Glatirameracetat gegen nicht therapierte Patienten CD4+25+ Prozent der CD3+

Table Analyzed Data 15

Column A

vs

Column B

Unpaired t test

P value	0,0141
P value summary	*
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=2.779 df=15

How big is the difference?

Mean ± SEM of column A	6.465 ± 0.4405 N=14
Mean ± SEM of column B	9.247 ± 0.5510 N=3
Difference between means	-2.782 ± 1.001
95% confidence interval	-4.915 to -0.6484
R squared	0,3398

F test to compare variances

F,DFn, Dfd	2.983, 13, 2
P value	0,5577
P value summary	ns
Are variances significantly different?	No

Glatirameracetat gegen nicht therapierte Patienten CD8+ Prozent der CD3+

Table Analyzed Data 16

Column A

vs

Column B

Unpaired t test

P value	0,0109
P value summary	*
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=2.906 df=15

How big is the difference?

Mean ± SEM of column A	32.85 ± 1.711 N=14
Mean ± SEM of column B	47.25 ± 7.921 N=3
Difference between means	-14.40 ± 4.954
95% confidence interval	-24.95 to -3.841
R squared	0,3603

F test to compare variances

F,DFn, Dfd	4.592, 2, 13
P value	0,0620
P value summary	ns
Are variances significantly different?	No

Glatirameracetat gegen alle Patienten CD3+ Prozent der Lymphos

Table Analyzed Data 2
Column A
vs
Column B

Unpaired t test

P value	0,0466
P value summary	*
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=2.072 df=31

How big is the difference?

Mean ± SEM of column A	46.41 ± 4.743 N=3
Mean ± SEM of column B	58.64 ± 1.798 N=30
Difference between means	-12.23 ± 5.903
95% confidence interval	-24.27 to -0.1909
R squared	0,1217

F test to compare variances

F,DFn, Dfd	1.437, 29, 2
P value	0,9866
P value summary	ns
Are variances significantly different?	No

Glatirameracetat gegen alle Patienten CD4+ Prozent der CD3+

Table Analyzed Data 14
Column A
vs
Column B

Unpaired t test

P value	0,0206
P value summary	*
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=2.441 df=31

How big is the difference?

Mean ± SEM of column A	95.65 ± 6.298 N=3
Mean ± SEM of column B	77.14 ± 2.307 N=30
Difference between means	18.52 ± 7.587
95% confidence interval	3.040 to 34.00
R squared	0,1612

F test to compare variances

F,DFn, Dfd	1.342, 29, 2
P value	1,0332
P value summary	ns
Are variances significantly different?	No

Glatirameracetat gegen alle Patienten CD8+ Prozent der CD3+

Table Analyzed Data 16
Column A
vs
Column B

Unpaired t test

P value	0,0455
P value summary	*
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=2.083 df=31

How big is the difference?

Mean ± SEM of column A	47.25 ± 7.921 N=3
Mean ± SEM of column B	34.86 ± 1.732 N=30
Difference between means	12.38 ± 5.944
95% confidence interval	0.2591 to 24.51
R squared	0,1228

F test to compare variances

F,DFn, Dfd	2.091, 2, 29
P value	0,2836
P value summary	ns
Are variances significantly different?	No

Glatirameracetat gegen alle Kontrollen CD4+25+ Prozent der Lymphos

Table Analyzed Data 101
Column A
vs
Column B

Unpaired t test

P value	0,0154
P value summary	*
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=2.712 df=16

How big is the difference?

Mean ± SEM of column A	4.240 ± 0.2101 N=3
Mean ± SEM of column B	2.808 ± 0.2277 N=15
Difference between means	1.432 ± 0.5281
95% confidence interval	0.3125 to 2.551
R squared	0,3149

F test to compare variances

F,DFn, Dfd	5.875, 14, 2
P value	0,3096
P value summary	ns
Are variances significantly different?	No

Glatirameracetat gegen alle Kontrollen CD16/56+ Prozent der Lymphos

Table Analyzed Data 107
Column A
vs
Column B

Unpaired t test

P value	0,0331
P value summary	*
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=2.332 df=16

How big is the difference?

Mean ± SEM of column A	23.49 ± 6.365 N=3
Mean ± SEM of column B	13.58 ± 1.510 N=15
Difference between means	9.910 ± 4.249
95% confidence interval	0.9020 to 18.92
R squared	0,2537

F test to compare variances

F,DFn, Dfd	3.552, 2, 14
P value	0,1131
P value summary	ns
Are variances significantly different?	No

Glatirameracetat gegen alle Kontrollen CD4+ Prozent der CD3+

Table Analyzed Data 109
Column A
vs
Column B

Unpaired t test

P value	0,0057
P value summary	**
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=3.193 df=16

How big is the difference?

Mean ± SEM of column A	95.65 ± 6.298 N=3
Mean ± SEM of column B	75.20 ± 2.585 N=15
Difference between means	20.45 ± 6.405
95% confidence interval	6.871 to 34.03
R squared	0,3892

F test to compare variances

F,DFn, Dfd	1.187, 2, 14
P value	0,6678
P value summary	ns
Are variances significantly different?	No

Glatirameracetat gegen alle Kontrollen CD4+25+ Prozent der CD3+

Table Analyzed Data 110
Column A
vs
Column B

Unpaired t test

P value	0,0012
P value summary	**
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=3.943 df=16

How big is the difference?

Mean ± SEM of column A	9.247 ± 0.5510 N=3
Mean ± SEM of column B	5.357 ± 0.4202 N=15
Difference between means	3.889 ± 0.9863
95% confidence interval	1.798 to 5.980
R squared	0,4929

F test to compare variances

F,DFn, Dfd	2.908, 14, 2
P value	0,5702
P value summary	ns
Are variances significantly different?	No

Glatirameracetat gegen alle Kontrollen CDDR+ Prozent der CD4+25+

Table Analyzed Data 115
Column A
vs
Column B

Unpaired t test

P value	0,0268
P value summary	*
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=2.439 df=16

How big is the difference?

Mean ± SEM of column A	17.62 ± 3.250 N=3
Mean ± SEM of column B	26.36 ± 1.464 N=15
Difference between means	-8.736 ± 3.582
95% confidence interval	-16.33 to -1.142
R squared	0,2710

F test to compare variances

F,DFn, Dfd	1.014, 14, 2
P value	1,2049
P value summary	ns
Are variances significantly different?	No

Rebif gegen Avonex CD4+25+ Prozent der Lymphos

Table Analyzed Data 48
Column A
vs
Column B

Unpaired t test

P value	0,0394
P value summary	*
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=2.527 df=7

How big is the difference?

Mean ± SEM of column A	2.085 ± 0.1750 N=2
Mean ± SEM of column B	4.213 ± 0.4270 N=7
Difference between means	-2.128 ± 0.8420
95% confidence interval	-4.119 to -0.1366
R squared	0,4771

F test to compare variances

F,DFn, Dfd	20.84, 6, 1
P value	0,3323
P value summary	ns
Are variances significantly different?	No

Rebif gegen Avonex CD4+25+ Prozent der CD3+

Table Analyzed Data 57
Column A
vs
Column B

Unpaired t test

P value	0,0407
P value summary	*
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=2.504 df=7

How big is the difference?

Mean ± SEM of column A	3.180 ± 0.2900 N=2
Mean ± SEM of column B	7.479 ± 0.8717 N=7
Difference between means	-4.299 ± 1.717
95% confidence interval	-8.358 to -0.2390
R squared	0,4725

F test to compare variances

F,DFn, Dfd	31.62, 6, 1
P value	0,2706
P value summary	ns
Are variances significantly different?	No

Rebif gegen nicht therapierte Patienten CD4+25+ Prozent der Lymphos

Table Analyzed Data 27
Column A
vs
Column B

Unpaired t test

P value	0,0483
P value summary	*
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=2.163 df=14

How big is the difference?

Mean ± SEM of column A	3.831 ± 0.2956 N=14
Mean ± SEM of column B	2.085 ± 0.1750 N=2
Difference between means	1.746 ± 0.8073
95% confidence interval	0.01472 to 3.478
R squared	0,2505

F test to compare variances

F,DFn, Dfd	19.98, 13, 1
P value	0,3471
P value summary	ns
Are variances significantly different?	No

Rebif gegen nicht therapierte Patienten CD4+25+ Prozent der CD3+

Table Analyzed Data 36
Column A
vs
Column B

Unpaired t test

P value	0,0163
P value summary	*
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=2.730 df=14

How big is the difference?

Mean ± SEM of column A	6.465 ± 0.4405 N=14
Mean ± SEM of column B	3.180 ± 0.2900 N=2
Difference between means	3.285 ± 1.203
95% confidence interval	0.7035 to 5.866
R squared	0,3473

F test to compare variances

F,DFn, Dfd	16.15, 13, 1
P value	0,3852
P value summary	ns
Are variances significantly different?	No

Rebif gegen alle Patienten CD4+25+ Prozent der Lymphos

Table Analyzed Data 27
Column A
vs
Column B

Unpaired t test

P value	0,0396
P value summary	*
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=2.152 df=30

How big is the difference?

Mean ± SEM of column A	2.085 ± 0.1750 N=2
Mean ± SEM of column B	3.875 ± 0.2114 N=30
Difference between means	-1.790 ± 0.8320
95% confidence interval	-3.489 to -0.09147
R squared	0,1337

F test to compare variances

F,DFn, Dfd	21.88, 29, 1
P value	0,3355
P value summary	ns
Are variances significantly different?	No

Rebif gegen alle Patienten CD4+25+ Prozent der CD3+

Table Analyzed Data 36
Column A
vs
Column B

Unpaired t test

P value	0,0245
P value summary	*
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=2.368 df=30

How big is the difference?

Mean ± SEM of column A	3.180 ± 0.2900 N=2
Mean ± SEM of column B	6.755 ± 0.3837 N=30
Difference between means	-3.575 ± 1.510
95% confidence interval	-6.658 to -0.4917
R squared	0,1574

F test to compare variances

F,DFn, Dfd	26.26, 29, 1
P value	0,3067
P value summary	ns
Are variances significantly different?	No

Avonex gegen alle Kontrollen CD4+25+ Prozent der Lymphos

Table Analyzed Data 138

Column A

vs

Column B

Unpaired t test

P value	0,0046
P value summary	**
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=3.187 df=20

How big is the difference?

Mean ± SEM of column A	4.213 ± 0.4270 N=7
Mean ± SEM of column B	2.808 ± 0.2277 N=15
Difference between means	1.405 ± 0.4408
95% confidence interval	0.4853 to 2.324
R squared	0,3368

F test to compare variances

F,DFn, Dfd	1.641, 6, 14
P value	0,4166
P value summary	ns
Are variances significantly different?	No

Avonex gegen alle Kontrollen CD8+ Absolut

Table Analyzed Data 141

Column A

vs

Column B

Unpaired t test

P value	0,0114
P value summary	*
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=2.787 df=20

How big is the difference?

Mean ± SEM of column A	249.4 ± 31.91 N=7
Mean ± SEM of column B	417.7 ± 38.13 N=15
Difference between means	-168.3 ± 60.38
95% confidence interval	-294.3 to -42.34
R squared	0,2798

F test to compare variances

F,DFn, Dfd	3.060, 14, 6
P value	0,1763
P value summary	ns
Are variances significantly different?	No

Avonex gegen alle Kontrollen CD4+25+ Prozent der CD3+

Table Analyzed Data 147
Column A
vs
Column B

Unpaired t test

P value	0,0215
P value summary	*
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=2.495 df=20

How big is the difference?

Mean ± SEM of column A	7.479 ± 0.8717 N=7
Mean ± SEM of column B	5.357 ± 0.4202 N=15
Difference between means	2.121 ± 0.8502
95% confidence interval	0.3477 to 3.895
R squared	0,2374

F test to compare variances

F,DFn, Dfd	2.008, 6, 14
P value	0,2651
P value summary	ns
Are variances significantly different?	No

Avonex gegen alle Kontrollen CD8+ Prozent der CD3+

Table Analyzed Data 148
Column A
vs
Column B

Unpaired t test

P value	0,0342
P value summary	*
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=2.273 df=20

How big is the difference?

Mean ± SEM of column A	32.97 ± 4.270 N=7
Mean ± SEM of column B	41.32 ± 1.580 N=15
Difference between means	-8.356 ± 3.676
95% confidence interval	-16.03 to -0.6872
R squared	0,2053

F test to compare variances

F,DFn, Dfd	3.408, 6, 14
P value	0,0550
P value summary	ns
Are variances significantly different?	No

Avonex gegen alle Kontrollen CDDR+ Prozent der CD4+25+

Table Analyzed Data 152
Column A
vs
Column B

Unpaired t test

P value	0,0271
P value summary	*
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=2.386 df=20

How big is the difference?

Mean ± SEM of column A	36.53 ± 5.528 N=7
Mean ± SEM of column B	26.36 ± 1.464 N=15
Difference between means	10.17 ± 4.261
95% confidence interval	1.277 to 19.06
R squared	0,2215

F test to compare variances

F,DFn, Dfd	6.658, 6, 14
P value	0,0034
P value summary	**
Are variances significantly different?	Yes

Interferon β-1a gesamt gegen alle Kontrollen Lymphozyten Absolut

Table Analyzed Data 1
Column A
vs
Column B

Unpaired t test

P value	0,0332
P value summary	*
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=2.273 df=22

How big is the difference?

Mean ± SEM of column A	1401 ± 124.1 N=9
Mean ± SEM of column B	1909 ± 155.5 N=15
Difference between means	-508.2 ± 223.6
95% confidence interval	-972.0 to -44.43
R squared	0,1901

F test to compare variances

F,DFn, Dfd	2.620, 14, 8
P value	0,1739
P value summary	ns
Are variances significantly different?	No

Interferon β -1a gesamt gegen alle Kontrollen CD8+ Absolut

Table Analyzed Data 9
Column A
vs
Column B

Unpaired t test

P value	0,0087
P value summary	**
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=2.877 df=22

How big is the difference?

Mean \pm SEM of column A	263.3 \pm 26.62 N=9
Mean \pm SEM of column B	417.7 \pm 38.13 N=15
Difference between means	-154.4 \pm 53.66
95% confidence interval	-265.7 to -43.11
R squared	0,2734

F test to compare variances

F,DFn, Dfd	3.418, 14, 8
P value	0,0861
P value summary	ns
Are variances significantly different?	No

Interferon β -1a gesamt gegen alle Kontrollen CD8+ Prozent der CD3+

Table Analyzed Data 16
Column A
vs
Column B

Unpaired t test

P value	0,0167
P value summary	*
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=2.592 df=22

How big is the difference?

Mean \pm SEM of column A	32.90 \pm 3.297 N=9
Mean \pm SEM of column B	41.32 \pm 1.580 N=15
Difference between means	-8.423 \pm 3.250
95% confidence interval	-15.16 to -1.682
R squared	0,2339

F test to compare variances

F,DFn, Dfd	2.613, 8, 14
P value	0,1112
P value summary	ns
Are variances significantly different?	No

Interferon β -1a gesamt gegen alle Kontrollen CDDR+ Prozent der CD4+25+

Table Analyzed Data 20
Column A
vs
Column B

Unpaired t test

P value	0,0372
P value summary	*
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=2.225 df=21

How big is the difference?

Mean \pm SEM of column A	35.39 \pm 4.920 N=8
Mean \pm SEM of column B	26.36 \pm 1.464 N=15
Difference between means	9.032 \pm 4.059
95% confidence interval	0.5882 to 17.48
R squared	0,1908

F test to compare variances

F,DFn, Dfd	6.027, 7, 14
P value	0,0044
P value summary	**
Are variances significantly different?	Yes

Rohdaten zu 4.2

Gesamt

Patienten (17)

		<u>Therapien</u>	<u>CD3+4+</u>		<u>Foxp3-positive Zellen</u>	
			<u>%</u>	<u>Absolut</u>	<u>in % der CD3+4+</u>	<u>Absolut</u>
08.09.2006	Patient 1(m)	Glatirameracetat	100	704	6,66	47
	Patient 2(w)	Avonex	100	387	5,70	22
13.09.2006	Patient 1(w)		100	928	6,50	60
	Patient 2(m)	Natalizumab	100	750	6,80	51
29.09.2006	Patient 1(m)	fragl. im Schub	100	775	5,60	43
	Patient 2(w)		100	785	6,86	54
	Patient 3(w)	Avonex	100	354	5,69	20
	Patient 4(w)	Rebif	100	756	5,71	43
	Patient 5(m)		100	546	6,83	37
06.10.2006	Patient 1(w)		100	807	7,20	58
	Patient 2(w)	Avonex	100	528	7,82	41
	Patient 3(w)	Avonex	100	1008	10,05	101
	Patient 4(w)	Avonex	100	905	14,17	128
24.08.2007	Patient 1(w)		100	437	5,07	22
	Patient 2(m)		100	510	4,03	21
	Patient 3(w)	Avonex	100	773	3,67	28
	Patient 4(w)		100	575	6,01	35

Kontrollen (12)

		<u>CD3+4+</u>		<u>Foxp3-positive Zellen</u>		
		<u>%</u>	<u>Absolut</u>	<u>in % der CD3+4+</u>	<u>Absolut</u>	
20.08.2007	Kontr. 1 (w)		100	1076	3,77	41
	Kontr. 2 (w)		100	1249	3,75	47
	Kontr. 3 (w)		100	734	4,79	35
	Kontr. 4 (w)		100	1107	2,38	26
	Kontr. 5 (m)		100	507	5,25	27
22.08.2007	Kontr. 1 (w)		100	621	2,96	18
	Kontr. 2 (m)		100	663	4,46	30
	Kontr. 3 (m)		100	643	5,43	35
	Kontr. 4 (w)		100	980	3,54	35
	Kontr. 5 (m)		100	554	5,63	31
24.08.2007	Kontr. 5 (w)		100	378	3,39	13
	Kontr. 6 (w)		100	1341	4,25	57

Statistik zu Signifikanzen bei 4.2

Alle Patienten gegen alle Kontrollen Foxp3+ Prozent der CD3+4+

Table Analyzed Data 2
Column A
vs
Column B

Unpaired t test

P value	0,0016
P value summary	**
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=3.512 df=27

How big is the difference?

Mean ± SEM of column A	6.728 ± 0.5824 N=17
Mean ± SEM of column B	4.133 ± 0.2933 N=12
Difference between means	2.594 ± 0.7386
95% confidence interval	1.079 to 4.110
R squared	0,3136

F test to compare variances

F,DFn, Dfd	5.586, 16, 11
P value	0,0063
P value summary	**
Are variances significantly different?	Yes

Weibl. Patienten gegen weibl. Kontrollen Foxp3+ Prozent der CD3+4+

Table Analyzed Data 5
Column A
vs
Column B

Unpaired t test

P value	0,0030
P value summary	**
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=3.434 df=18

How big is the difference?

Mean ± SEM of column A	7.038 ± 0.7908 N=12
Mean ± SEM of column B	3.604 ± 0.2617 N=8
Difference between means	3.434 ± 0.9999
95% confidence interval	1.333 to 5.534
R squared	0,3958

F test to compare variances

F,DFn, Dfd	13.69, 11, 7
P value	0,0021
P value summary	**
Are variances significantly different?	Yes

Weibl. Patienten gegen alle Kontrollen Foxp3+ Prozent der CD3+4+

Table Analyzed Data 14
Column A
vs
Column B

Unpaired t test

P value	0,0023
P value summary	**
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=3.443 df=22

How big is the difference?

Mean ± SEM of column A	7.038 ± 0.7908 N=12
Mean ± SEM of column B	4.133 ± 0.2933 N=12
Difference between means	2.904 ± 0.8434
95% confidence interval	1.155 to 4.653
R squared	0,3502

F test to compare variances

F,DFn, Dfd	7.270, 11, 11
P value	0,0027
P value summary	**
Are variances significantly different?	Yes

Männl. Patienten gegen alle Kontrollen Foxp3+ Prozent der CD3+4+

Table Analyzed Data 17
Column A
vs
Column B

Unpaired t test

P value	0,0054
P value summary	**
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=3.251 df=15

How big is the difference?

Mean ± SEM of column A	5.984 ± 0.5387 N=5
Mean ± SEM of column B	4.133 ± 0.2933 N=12
Difference between means	1.851 ± 0.5693
95% confidence interval	0.6375 to 3.064
R squared	0,4133

F test to compare variances

F,DFn, Dfd	1.406, 4, 11
P value	0,5905
P value summary	ns
Are variances significantly different?	No

Weibl. Kontrollen gegen männl. Kontrollen Foxp3+ Prozent der CD3+4+

Table Analyzed Data 2
Column A
vs
Column B

Unpaired t test

P value	0,0034
P value summary	**
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=3.816 df=10

How big is the difference?

Mean ± SEM of column A	3.604 ± 0.2617 N=8
Mean ± SEM of column B	5.193 ± 0.2562 N=4
Difference between means	-1.589 ± 0.4164
95% confidence interval	-2.516 to -0.6611
R squared	0,5928

F test to compare variances

F,DFn, Dfd	2.087, 7, 3
P value	0,5862
P value summary	ns
Are variances significantly different?	No

Weibl. Kontrollen gegen alle Patienten CD3+4+ Absolut

Table Analyzed Data 2
Column A
vs
Column B

Unpaired t test

P value	0,0218
P value summary	*
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=2.460 df=23

How big is the difference?

Mean ± SEM of column A	935.8 ± 116.8 N=8
Mean ± SEM of column B	678.1 ± 47.27 N=17
Difference between means	257.6 ± 104.7
95% confidence interval	40.97 to 474.3
R squared	0,2083

F test to compare variances

F,DFn, Dfd	2.873, 7, 16
P value	0,0762
P value summary	ns
Are variances significantly different?	No

Weibl. Kontrollen gegen alle Patienten Foxp3+ Prozent der CD3+4+

Table Analyzed Data 1
Column A
vs
Column B

Unpaired t test

P value	0,0016
P value summary	**
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=3.565 df=23

How big is the difference?

Mean ± SEM of column A	3.604 ± 0.2617 N=8
Mean ± SEM of column B	6.728 ± 0.5824 N=17
Difference between means	-3.124 ± 0.8764
95% confidence interval	-4.937 to -1.311
R squared	0,3559

F test to compare variances

F,DFn, Dfd	10.52, 16, 7
P value	0,0041
P value summary	**
Are variances significantly different?	Yes

Therapierte Patienten gegen alle Kontrollen Foxp3+ Prozent der CD3+4+

Table Analyzed Data 26
Column A
vs
Column B

Unpaired t test

P value	0,0030
P value summary	**
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=3.406 df=19

How big is the difference?

Mean ± SEM of column A	7.363 ± 1.031 N=9
Mean ± SEM of column B	4.133 ± 0.2933 N=12
Difference between means	3.230 ± 0.9483
95% confidence interval	1.245 to 5.215
R squared	0,3791

F test to compare variances

F,DFn, Dfd	9.265, 8, 11
P value	0,0013
P value summary	**
Are variances significantly different?	Yes

Nicht therapierte Patienten gegen alle Kontrollen Foxp3+ Prozent der CD3+4+

Table Analyzed Data 29
Column A
vs
Column B

Unpaired t test

P value	0,0013
P value summary	**
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=3.836 df=17

How big is the difference?

Mean ± SEM of column A	6.071 ± 0.4317 N=7
Mean ± SEM of column B	4.133 ± 0.2933 N=12
Difference between means	1.938 ± 0.5052
95% confidence interval	0.8721 to 3.004
R squared	0,4640

F test to compare variances

F,DFn, Dfd	1.264, 6, 11
P value	0,6955
P value summary	ns
Are variances significantly different?	No

Männl. therapierte Patienten gegen männl. nicht therapierte Patienten CD3+4+ Absolut

Table Analyzed Data 40
Column A
vs
Column B

Unpaired t test

P value	0,0209
P value summary	*
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=6.814 df=2

How big is the difference?

Mean ± SEM of column A	727.0 ± 23.00 N=2
Mean ± SEM of column B	528.0 ± 18.00 N=2
Difference between means	199.0 ± 29.21
95% confidence interval	73.33 to 324.7
R squared	0,9587

F test to compare variances

F,DFn, Dfd	1.633, 1, 1
P value	0,8455
P value summary	ns
Are variances significantly different?	No

Weibl. therapierte Patienten gegen alle Kontrollen Foxp3+ Prozent der CD3+4+

Table Analyzed Data 44
Column A
vs
Column B

Unpaired t test

P value	0,0056
P value summary	**
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=3.174 df=17

How big is the difference?

Mean ± SEM of column A	7.544 ± 1.340 N=7
Mean ± SEM of column B	4.133 ± 0.2933 N=12
Difference between means	3.411 ± 1.075
95% confidence interval	1.143 to 5.679
R squared	0,3720

F test to compare variances

F,DFn, Dfd	12.19, 6, 11
P value	0,0005
P value summary	***
Are variances significantly different?	Yes

Weibl. nicht therapierte Patienten gegen alle Kontrollen Foxp3+ Prozent der CD3+4+

Table Analyzed Data 47
Column A
vs
Column B

Unpaired t test

P value	0,0007
P value summary	***
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=4.251 df=15

How big is the difference?

Mean ± SEM of column A	6.328 ± 0.3713 N=5
Mean ± SEM of column B	4.133 ± 0.2933 N=12
Difference between means	2.195 ± 0.5163
95% confidence interval	1.094 to 3.295
R squared	0,5464

F test to compare variances

F,DFn, Dfd	1.498, 11, 4
P value	0,7447
P value summary	ns
Are variances significantly different?	No

Männl. therapierte Patienten gegen alle Kontrollen Foxp3+ Prozent der CD3+4+

Table Analyzed Data 50

Column A

vs

Column B

Unpaired t test

P value	0,0044
P value summary	**
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=3.494 df=12

How big is the difference?

Mean ± SEM of column A	6.730 ± 0.07000 N=2
Mean ± SEM of column B	4.133 ± 0.2933 N=12
Difference between means	2.597 ± 0.7432
95% confidence interval	0.9771 to 4.216
R squared	0,5042

F test to compare variances

F,DFn, Dfd	105.3, 11, 1
P value	0,1517
P value summary	ns
Are variances significantly different?	No

Avonex gegen alle Kontrollen Foxp3+ Prozent der CD3+4+

Table Analyzed Data 59

Column A

vs

Column B

Unpaired t test

P value	0,0049
P value summary	**
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=3.266 df=16

How big is the difference?

Mean ± SEM of column A	7.850 ± 1.544 N=6
Mean ± SEM of column B	4.133 ± 0.2933 N=12
Difference between means	3.717 ± 1.138
95% confidence interval	1.304 to 6.129
R squared	0,4000

F test to compare variances

F,DFn, Dfd	13.86, 5, 11
P value	0,0004
P value summary	***
Are variances significantly different?	Yes

Interferon β -1a gesamt gegen alle Kontrollen Foxp3+ Prozent der CD3+4+

Table Analyzed Data 62
Column A
vs
Column B

Unpaired t test

P value	0,0056
P value summary	**
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=3.174 df=17

How big is the difference?

Mean \pm SEM of column A	7.544 \pm 1.340 N=7
Mean \pm SEM of column B	4.133 \pm 0.2933 N=12
Difference between means	3.411 \pm 1.075
95% confidence interval	1.143 to 5.679
R squared	0,3720

F test to compare variances

F,DFn, Dfd	12.19, 6, 11
P value	0,0005
P value summary	***
Are variances significantly different?	Yes

Rohdaten zu 4.3

Proliferation-Assay nach Sorting von CD 4+/25+ Zellen in ansteigender Zellzahl

Patienten

	<u>Gesamt (15)</u>					
			%	Absolut		
	0	0	100	119983,77		
	2000		118,62	146894,08		
	4000		88,12	103383,96		
	10000		45,68	58514,06		
	20000		21,90	22730,79		
	40000		10,12	11262,51		
	0	0	2000	2000	4000	4000
	%	Absolut	%	Absolut	%	Absolut
1 (w)	100	104674	117,37	122857	112,59	117851
2 (w)	100	75321	103,79	78176	112,80	84963
3 (m)	100	93087	157,76	146855	106,90	99507
4 (w)	100	196778	112,16	220706	74,52	146647
5 (m)	100	228468	113,63	259602	112,98	258113
6 (w)	100	207885,50			69,72	144943
7 (m)	100	166262			73,27	121826
8 (m)	100	157611,50			59,36	93559
9 (w)	100	135480,67			72,97	98857,67
10 (m)	100	81586			126,04	102835
11 (m)	100	135620,50			95,68	129755
12 (m)	100	47519			146,30	69521
13 (w)	100	71801			18,81	13505
14 (w)	100	47972			37,31	17897,50
15 (w)	100	49690,33	107,00	53168,50	102,59	50979,25
	10000	10000	20000	20000	40000	40000
	%	Absolut	%	Absolut	%	Absolut
1 (w)	52,77	55241	31,68	33164	1,27	1331
2 (w)	47,81	36013	42,19	31780	6,25	4709
3 (m)	66,60	61994	53,19	49513	44,91	41806
4 (w)	57,01	112179	7,51	14769	1,14	2250
5 (m)	108,15	247089	16,10	36784	0,39	888
6 (w)	47,47	98680,50	6,64	13798,50	0,81	1677,50
7 (m)	2,58	4295	3,38	5618	1,86	3085
8 (m)	15,18	23922,50	9,40	14813	39,28	61908
9 (w)	30,09	40771,33	30,07	40736,33	2,84	3845
10 (m)	34,48	28134	36,26	29583		
11 (m)	64,55	87538	28,27	38343	16,07	21800
12 (m)	23,86	11340	6,19	2943	12,27	5829
13 (w)	19,25	13819	3,39	2436	6,23	4471
14 (w)	39,46	18929,50	16,91	8112	3,47	1665
15 (w)	76,00	37765	37,37	18569	4,85	2410,67

Proliferation-Assay nach Sorting von CD 4+/25+ Zellen in ansteigender Zellzahl

Kontrollen

		<u>Gesamt (9)</u>					
		0	2000	4000	2000	4000	
		%	Absolut	%	Absolut	%	Absolut
			0	2000	2000	4000	4000
			%	%	Absolut	%	Absolut
160806	1 (m)	100	206426	95,03	196160	116,59	240665
	2 (w)	100	333531	99,27	331082	77,51	258510
100807	3 (w)	100	30102,33	56,70	17068,33	36,31	10929
	4 (m)	100	15468	49,40	7641	46,33	7166
140807	5 (w)	100	14375,67	100,62	14465	131,14	18852,67
	6 (w)	100	18689	93,78	17527	139,62	26092,67
	7 (m)	100	12350,67	80,15	9898,67	94,90	11721
030908	8 (w)	100	39737,33	108,52	43122	109,09	43349
	9 (w)	100	40702,33	115,91	47176,33	82,31	33501,67
		10000	10000	20000	20000	40000	40000
		%	Absolut	%	Absolut	%	Absolut
160806	1 (m)	133,02	274590	74,22	153206	1,30	2679
	2 (w)	67,78	226064	29,53	98498	0,85	2820
100807	3 (w)	11,88	3575,67	0,36	108	0,78	234,33
	4 (m)	12,52	1937,33	3,65	564	9,66	1494,67
140807	5 (w)	27,02	3884,67	0,81	117	0,43	61,33
	6 (w)	18,10	3383,33	0,35	65	0,31	58
	7 (m)	37,12	4584	7,40	914	8,86	1094,67
030908	8 (w)	64,14	25487,33	9,24	3670,33	11,31	4496
	9 (w)	53,49	21773,67	16,13	6567	18,96	7717,67

Erläuterung zu den Therapien der Patienten von 4.3

Therapien der Patienten

		<u>Patienten</u>	<u>Therapien</u>
1 (w)	09.08.2006	Patient1(w)	Glatirameracetat (Copaxone)
2 (w)		Patient2(w)	Glatirameracetat (Copaxone)
3 (m)		Patient3(m)	
4 (w)	16.08.2006	Patient1(w)	Rebif (Interferon β -1a)
5 (m)		Patient2(m)	Zwischen 2 Therapien, unklarer Status
6 (w)	20.09.2006	Patient1(w)	
7 (m)		Patient2(m)	
8 (m)		Patient3(m)	
9 (w)		Patient4(w)	
10 (m)	27.09.2006	Patient1(m)	
11 (m)		Patient2(m)	
12 (m)	05.10.2006	Patient1(m)	
13 (w)		Patient2(w)	
14 (w)		Patient3(w)	Betaferon (Interferon β -1b)
15 (w)	03.09.2008	Patient1(w)	

Patient 2(m) vom 16.08.2006 geht dabei wegen des unklaren Status nicht in die Beurteilung der männl. therapierten bzw. männl. nicht therapierten Patienten und der einzelnen Therapien mit ein.

Statistik zu Signifikanzen bei 4.3

Alle Patienten gegen alle Kontrollen 2000 CD4+25+ Prozent

Table Analyzed Data 2

Column A

vs

Column B

Unpaired t test

P value	0,0211
P value summary	*
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=2.621 df=13

How big is the difference?

Mean \pm SEM of column A	118.6 \pm 8.073 N=6
Mean \pm SEM of column B	88.82 \pm 7.541 N=9
Difference between means	29.80 \pm 11.37
95% confidence interval	5.241 to 54.36
R squared	0,3457

F test to compare variances

F,DFn, Dfd	1.309, 8, 5
P value	0,7993
P value summary	ns
Are variances significantly different?	No

Alle Frauen (P+K) gegen alle Männer (P+K) 40000 CD4+25+ Prozent

Table Analyzed Data 43
Column A
vs
Column B

Unpaired t test

P value	0,0318
P value summary	*
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=2.299 df=21

How big is the difference?

Mean ± SEM of column A	4.250 ± 1.409 N=14
Mean ± SEM of column B	14.96 ± 5.443 N=9
Difference between means	-10.71 ± 4.656
95% confidence interval	-20.39 to -1.021
R squared	0,2011

F test to compare variances

F,DFn, Dfd	9.595, 8, 13
P value	0,0005
P value summary	***
Are variances significantly different?	Yes

Alle Frauen (P+K) gegen alle Männer (P+K) 40000 CD4+25+ Absolut

Table Analyzed Data 44
Column A
vs
Column B

Unpaired t test

P value	0,0393
P value summary	*
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=2.199 df=21

How big is the difference?

Mean ± SEM of column A	2696 ± 579.9 N=14
Mean ± SEM of column B	15620 ± 7373 N=9
Difference between means	-12920 ± 5879
95% confidence interval	-25150 to -696.8
R squared	0,1871

F test to compare variances

F,DFn, Dfd	103.9, 8, 13
P value	P<0.0001
P value summary	***
Are variances significantly different?	Yes

Männl. Patienten gegen alle Kontrollen 2000 CD4+25+ Prozent

Table Analyzed Data 57
Column A
vs
Column B

Unpaired t test

P value	0,0324
P value summary	*
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=2.527 df=9

How big is the difference?

Mean ± SEM of column A	135.7 ± 22.07 N=2
Mean ± SEM of column B	88.82 ± 7.541 N=9
Difference between means	46.87 ± 18.55
95% confidence interval	4.913 to 88.84
R squared	0,4150

F test to compare variances

F,DFn, Dfd	1.903, 1, 8
P value	0,4102
P value summary	ns
Are variances significantly different?	No

Männl. Patienten gegen alle Kontrollen 40000 CD4+25+ Absolut

Table Analyzed Data 66
Column A
vs
Column B

Unpaired t test

P value	0,0271
P value summary	*
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=2.489 df=13

How big is the difference?

Mean ± SEM of column A	22550 ± 10080 N=6
Mean ± SEM of column B	2295 ± 841.6 N=9
Difference between means	20260 ± 8138
95% confidence interval	2680 to 37830
R squared	0,3228

F test to compare variances

F,DFn, Dfd	95.64, 5, 8
P value	P<0.0001
P value summary	***
Are variances significantly different?	Yes

Weibl. Patienten gegen männl. Patienten 40000 CD4+25+ Prozent

Table Analyzed Data 76
Column A
vs
Column B

Unpaired t test

P value	0,0349
P value summary	*
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=2.377 df=12

How big is the difference?

Mean ± SEM of column A	3.358 ± 0.7893 N=8
Mean ± SEM of column B	19.13 ± 7.695 N=6
Difference between means	-15.77 ± 6.635
95% confidence interval	-30.23 to -1.314
R squared	0,3201

F test to compare variances

F,DFn, Dfd	71.28, 5, 7
P value	P<0.0001
P value summary	***
Are variances significantly different?	Yes

Weibl. Patienten gegen männl. Patienten 40000 CD4+25+ Absolut

Table Analyzed Data 77
Column A
vs
Column B

Unpaired t test

P value	0,0409
P value summary	*
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=2.291 df=12

How big is the difference?

Mean ± SEM of column A	2795 ± 476.0 N=8
Mean ± SEM of column B	22550 ± 10080 N=6
Difference between means	-19760 ± 8625
95% confidence interval	-38550 to -963.4
R squared	0,3042

F test to compare variances

F,DFn, Dfd	336.3, 5, 7
P value	P<0.0001
P value summary	***
Are variances significantly different?	Yes

Männl. Kontrollen gegen alle Patienten 2000 CD4+25+ Prozent

Table Analyzed Data 24
Column A
vs
Column B

Unpaired t test

P value	0,0208
P value summary	*
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=2.970 df=7

How big is the difference?

Mean ± SEM of column A	74.86 ± 13.44 N=3
Mean ± SEM of column B	118.6 ± 8.073 N=6
Difference between means	-43.76 ± 14.73
95% confidence interval	-78.60 to -8.919
R squared	0,5576

F test to compare variances

F,DFn, Dfd	1.385, 2, 5
P value	0,6644
P value summary	ns
Are variances significantly different?	No

Nicht therapierte Patienten gegen alle Kontrollen 2000 CD4+25+ Prozent

Table Analyzed Data 101
Column A
vs
Column B

Unpaired t test

P value	0,0487
P value summary	*
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=2.279 df=9

How big is the difference?

Mean ± SEM of column A	132.4 ± 25.38 N=2
Mean ± SEM of column B	88.82 ± 7.541 N=9
Difference between means	43.56 ± 19.12
95% confidence interval	0.3156 to 86.80
R squared	0,3658

F test to compare variances

F,DFn, Dfd	2.517, 1, 8
P value	0,3025
P value summary	ns
Are variances significantly different?	No

Männl. nicht therapierte Patienten gegen alle Kontrollen 40000 CD4+25+ Prozent

Table Analyzed Data 19

Column A

vs

Column B

Unpaired t test

P value	0,0250
P value summary	*
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=2.559 df=12

How big is the difference?

Mean ± SEM of column A	22.88 ± 8.231 N=5
Mean ± SEM of column B	5.829 ± 2.226 N=9
Difference between means	17.05 ± 6.662
95% confidence interval	2.533 to 31.57
R squared	0,3531

F test to compare variances

F,DFn, Dfd	7.597, 4, 8
P value	0,0157
P value summary	*
Are variances significantly different?	Yes

Männl. nicht therapierte Patienten gegen alle Kontrollen 40000 CD4+25+ Absolut

Table Analyzed Data 20

Column A

vs

Column B

Unpaired t test

P value	0,0104
P value summary	*
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=3.033 df=12

How big is the difference?

Mean ± SEM of column A	26890 ± 11150 N=5
Mean ± SEM of column B	2295 ± 841.6 N=9
Difference between means	24590 ± 8108
95% confidence interval	6922 to 42260
R squared	0,4339

F test to compare variances

F,DFn, Dfd	97.46, 4, 8
P value	P<0.0001
P value summary	***
Are variances significantly different?	Yes

Rohdaten zu 4.4

Patienten (4)

		0 Ag	MOG PBS	MOG Acetat	MOG ref.	CEF	Hexon (ADV)	Glas (ADV)
221106	Patient 1(w)	0,33	12,00		98,00	60,67		
	Patient 2(w)	5,33	21,67		27,67	219,67		
140307	Patient 1(w)	1,33	37,33	109,00	87,00	13,67	108,67	34,00
	Patient 2(w)	0,67	0,33	0,33	31,67	229,00	2,67	5,00

Kontrollen (5)

		0 Ag	MOG PBS	MOG Acetat	MOG ref.	CEF	Hexon (ADV)	Glas (ADV)
070307	Kontrolle1(w)	13,67	28,33	48,00	311,67	75,67	86,00	85,33
	Kontrolle2(w)	7,00	7,67	28,00	277,67	47,33	29,33	19,33
	Kontrolle3(w)	2,33	12,00	15,00	188,67	15,00	14,00	12,33
140307	Kontrolle1(w)	0,33	133,33	181,00	213,67	321,00	33,00	22,67
	Kontrolle2(w)	0,33	11,67	8,33	325,67	48,00	22,33	26,33

		PP65 (CMV)	EBNA-1 (EBV)	PHA
221106	Patient 1(w)			405,00
	Patient 2(w)			384,33
140307	Patient 1(w)	58,33	94,33	189,00
	Patient 2(w)	313,00	3,67	197,33

		PP65 (CMV)	EBNA-1 (EBV)	PHA
070307	Kontrolle1(w)	67,67	4,67	281,67
	Kontrolle2(w)	56,67	12,00	261,33
	Kontrolle3(w)	16,00	8,33	419,67
140307	Kontrolle1(w)	297,00	31,67	59,00
	Kontrolle2(w)	160,67	11,67	342,33

Der Vollständigkeit halber sei erwähnt, dass Patient 2(w) vom 22.11.06 zum Zeitpunkt der Blutentnahme eine Therapie mit Glatirameracetat erhalten und sich gleichzeitig im Schub befunden hat.

Statistik zu Signifikanzen bei 4.4

Alle Patienten gegen alle Kontrollen Elispot MOG ref.

Dies entspricht gleichzeitig:

Weibl. Patienten gegen weibl. Kontrollen Elispot MOG ref.

Table Analyzed Data 4

Column A

vs

Column B

Unpaired t test

P value

0,0006

P value summary

Are means signif. different? (P < 0.05)

Yes

One- or two-tailed P value?

Two-tailed

t, df

t=5.871 df=7

How big is the difference?

Mean \pm SEM of column A

61.09 \pm 18.29 N=4

Mean \pm SEM of column B

263.5 \pm 26.90 N=5

Difference between means

-202.4 \pm 34.47

95% confidence interval

-283.9 to -120.9

R squared

0,8312

F test to compare variances

F,DFn, Dfd

2.702, 4, 3

P value

0,4403

P value summary

ns

Are variances significantly different?

No

Rohdaten zu 4.5

Patienten (20)

		0 Ag	MOG PBS	MOG Acetat	MOG ref.	New MOG ref.	CEF	Hexon (ADV)
210307	Patient 1(m)	3,00	111,00	81,33	339,00		43,00	114,00
	Patient 3(w)	6,00	7,67	8,00	154,00		19,67	19,00
230307	Patient 1(m)	0,67	186,33	154,67	104,33		3,67	28,00
	Patient 2(w)	1,00	9,00	4,67	2,00		1,67	53,67
40407	Patient 2(m)	0,00	3,67	4,00	1,33	5,67	39,00	6,00
130407	Patient 1(m)	1,00	13,33	14,00	4,00	13,33	194,00	16,00
200407	Patient 2(m)	2,67	36,00	36,00	6,00	10,67	28,33	86,00
210307	Patient 2(w)	2,00	7,67	4,67	95,67		7,00	9,67
230307	Patient 3(w)	1,33	5,67	9,00	1,00		18,00	5,00
300307	Patient 1(w)	3,67	7,33	6,67	4,33		193,00	16,00
40407	Patient 1(m)	6,33	97,00	150,33	26,33	56,67	41,00	150,33
	Patient 3(w)	1,67	86,33	147,33	29,67	50,33	30,67	20,67
180407	Patient 1(w)	3,67	40,00	44,67	7,33	34,00	29,33	129,67
	Patient 2(m)	4,00	1,67	3,67	3,67	3,00	79,67	23,33
200407	Patient 1(w)	12,67	22,67	11,00	10,00	26,67	55,33	113,33
250407	Patient 1(w)	3,33	6,00	4,00	2,67	3,33	84,00	25,67
	Patient 2(w)	1,00	40,00	36,00	5,67	14,33	35,00	141,33
270407	Patient 1(m)	2,67	6,00	20,67	12,00	3,00	17,67	48,67
180507	Patient 1(m)	5,33	31,00	55,67	10,67	1,67	252,33	25,00
200407	Patient 3(w)	7,33	11,33	12,33	5,67	4,67	165,00	45,33

		Glas (ADV)	PP65 (CMV)	EBNA-1 (EBV)	PHA
210307	Patient 1(m)	38,33	87,67	21,33	264,00
	Patient 3(w)	2,00	10,67	9,33	343,33
230307	Patient 1(m)	5,67	212,33	1,33	336,67
	Patient 2(w)	2,00	35,67	2,67	361,67
40407	Patient 2(m)	4,33	206,67	0,33	385,00
130407	Patient 1(m)	11,00	167,33	14,00	135,67
200407	Patient 2(m)	37,33	18,67	7,67	421,33
210307	Patient 2(w)	3,00	6,33	6,67	327,67
230307	Patient 3(w)	0,67	29,67	0,00	329,00
300307	Patient 1(w)	16,67	151,67	23,33	380,00
40407	Patient 1(m)	143,67	145,67	9,00	259,00
	Patient 3(w)	14,00	81,67	0,33	398,00
180407	Patient 1(w)	134,67	24,33	11,33	421,00
	Patient 2(m)	31,67	10,67	1,00	414,33
200407	Patient 1(w)	79,67	27,67	27,67	397,67
250407	Patient 1(w)	28,67	8,00		364,00
	Patient 2(w)	30,67	62,67		415,33
270407	Patient 1(m)	62,33	12,33		398,67
180507	Patient 1(m)	6,00	318,00		308,67
200407	Patient 3(w)	17,67	8,00	24,00	418,00

Kontrollen (18)

		0 Ag	MOG PBS	MOG Acetat	MOG ref.	New MOG ref.	CEF	Hexon (ADV)
280307	Kontr. 1(w)	0,67	34,33	44,33	19,00	1,67	161,33	
	Kontr. 2(w)	4,33	16,33	27,67	20,33	5,00	99,67	
300307	Kontr. 1(w)	1,00	11,00	8,67	5,67		45,33	41,33
210307	Kontr. 1(m)	1,00	12,00	11,33	90,00		7,33	24,00
	Kontr. 2(m)	1,33	3,00	1,33	13,67		0,00	5,33
230307	Kontr. 1(m)	2,00	20,67	20,00	5,00		51,33	10,67
	Kontr. 2(m)	1,33	81,00	99,67	2,33		12,33	107,33
130407	Kontr. 1(w)	5,00	70,00	47,67	23,33	10,67	8,00	131,00
180407	Kontr. 1(w)	3,67	9,33	22,67	6,33	5,67	10,67	28,67
	Kontr. 2(m)	2,33	56,00	71,67	23,67	29,67	73,33	52,33
200407	Kontr. 1(m)	2,33	25,33	39,33	6,33	11,00	17,33	37,33
	Kontr. 2(w)	1,67	14,67	15,67	3,33	18,33	21,33	122,33
250407	Kontr. 1(m)	2,00	22,67	26,33	8,67	17,33	16,33	76,00
	Kontr. 2(w)	1,33	28,00	17,00	2,67	25,33	2,33	2,67
270407	Kontr. 1(w)	5,00	24,67	32,00	4,33	28,00	87,33	99,67
	Kontr. 2(w)	1,00	3,00	5,33	8,67	26,00	9,00	97,67
180507	Kontr. 1(w)	11,33	7,67	9,00	6,67	6,67	79,67	30,33
	Kontr. 2(w)	2,67	7,00	13,33	7,67	1,67	2,00	112,67

		Glas (ADV)	PP65 (CMV)	EBNA-1 (EBV)	PHA
280307	Kontr. 1(w)				406,00
	Kontr. 2(w)				349,33
300307	Kontr. 1(w)	24,00	171,00	33,00	321,00
210307	Kontr. 1(m)	9,00	10,33	1,67	325,67
	Kontr. 2(m)	0,33	2,67	0,33	289,67
230307	Kontr. 1(m)	2,67	14,67	0,67	346,00
	Kontr. 2(m)	11,67	48,67	1,67	353,67
130407	Kontr. 1(w)	123,67	57,33	4,33	391,33
180407	Kontr. 1(w)	41,00	419,00	15,00	198,67
	Kontr. 2(m)	76,33	194,33	29,33	365,67
200407	Kontr. 1(m)	20,33	82,33	4,67	410,67
	Kontr. 2(w)	80,33	13,67	2,67	202,33
250407	Kontr. 1(m)	62,33	26,00		399,00
	Kontr. 2(w)	13,33	23,00		375,67
270407	Kontr. 1(w)	85,67	286,33		310,33
	Kontr. 2(w)	60,00	7,67		414,00
180507	Kontr. 1(w)	12,00	89,33		281,00
	Kontr. 2(w)	51,33	5,67		308,33

Erläuterung zu den Therapien der Patienten von 4.5

<u>Therapien der Patienten</u>		<u>Patienten</u>	<u>Therapien</u>
<u>Nicht therapierte Patienten:</u>	210307	Patient 1(m)	
		Patient 3(w)	
	230307	Patient 1(m)	
		Patient 2(w)	
	040407	Patient 2(m)	
	130407	Patient 1(m)	
<u>Therapierte Patienten:</u>	200407	Patient 2(m)	
	210307	Patient 2(w)	Glatirameracetat (Copaxone)
	230307	Patient 3(w)	Betaferon (Interferon β -1b)
	300307	Patient 1(w)	Glatirameracetat (Copaxone)
	040407	Patient 1(m)	Natalizumab (Tysabri)
		Patient 3(w)	Natalizumab (Tysabri)
	180407	Patient 2(m)	Betaferon (Interferon β -1b)
	200407	Patient 1(w)	Betaferon (Interferon β -1b)
	250407	Patient 1(w)	Avonex (Interferon β -1a)
		Patient 2(w)	Rebif (Interferon β -1a)
	270407	Patient 1(m)	Rebif (Interferon β -1a)
	180507	Patient 1(m)	Rebif (Interferon β -1a)
	<u>Schubpatienten:</u>	180407	Patient 1(w)
200407		Patient 3(w)	Rebif, Cortison

Statistik zu Signifikanzen bei 4.5

Weibl. Patienten gegen männl. Patienten Elispot pp65 (CMV)

Table Analyzed Data 75

Column A

vs

Column B

Unpaired t test

P value

0,0197

P value summary

*

Are means signif. different? (P < 0.05)

Yes

One- or two-tailed P value?

Two-tailed

t, df

t=2.561 df=18

How big is the difference?

Mean \pm SEM of column A

40.58 \pm 13.24 N=11

Mean \pm SEM of column B

131.0 \pm 35.73 N=9

Difference between means

-90.46 \pm 35.32

95% confidence interval

-164.7 to -16.24

R squared

0,2670

F test to compare variances

F,DFn, Dfd

5.958, 8, 10

P value

0,0110

P value summary

*

Are variances significantly different?

Yes

Nicht therapierte Patienten gegen alle Kontrollen Elispot MOG ref.

Table Analyzed Data 103
Column A
vs
Column B

Unpaired t test

P value	0,0226
P value summary	*
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=2.444 df=23

How big is the difference?

Mean ± SEM of column A	87.24 ± 47.89 N=7
Mean ± SEM of column B	14.32 ± 4.752 N=18
Difference between means	72.92 ± 29.84
95% confidence interval	11.18 to 134.7
R squared	0,2061

F test to compare variances

F,DFn, Dfd	39.49, 6, 17
P value	P<0.0001
P value summary	***
Are variances significantly different?	Yes

Weibl. nicht therapierte Patienten gegen alle Kontrollen Elispot MOG ref.

Table Analyzed Data 68
Column A
vs
Column B

Unpaired t test

P value	0,0157
P value summary	*
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=2.668 df=18

How big is the difference?

Mean ± SEM of column A	78.00 ± 76.00 N=2
Mean ± SEM of column B	14.32 ± 4.752 N=18
Difference between means	63.69 ± 23.87
95% confidence interval	13.53 to 113.8
R squared	0,2834

F test to compare variances

F,DFn, Dfd	28.42, 1, 17
P value	0,0001
P value summary	***
Are variances significantly different?	Yes

Männl. nicht therapierte Patienten gegen alle Kontrollen Elispot MOG PBS

Table Analyzed Data 76
Column A
vs
Column B

Unpaired t test

P value	0,0337
P value summary	*
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=2.272 df=21

How big is the difference?

Mean ± SEM of column A	24.82 ± 5.310 N=18
Mean ± SEM of column B	70.07 ± 34.63 N=5
Difference between means	-45.25 ± 19.92
95% confidence interval	-86.68 to -3.817
R squared	0,1973

F test to compare variances

F,DFn, Dfd	11.81, 4, 17
P value	0,0002
P value summary	***
Are variances significantly different?	Yes

Männl. nicht therapierte Patienten gegen alle Kontrollen Elispot MOG ref.

Table Analyzed Data 78
Column A
vs
Column B

Unpaired t test

P value	0,0320
P value summary	*
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=2.297 df=21

How big is the difference?

Mean ± SEM of column A	14.32 ± 4.752 N=18
Mean ± SEM of column B	90.93 ± 65.01 N=5
Difference between means	-76.62 ± 33.36
95% confidence interval	-146.0 to -7.237
R squared	0,2008

F test to compare variances

F,DFn, Dfd	51.98, 4, 17
P value	P<0.0001
P value summary	***
Are variances significantly different?	Yes

Patienten im Schub gegen Natalizumab Elispot MOG PBS

Table Analyzed Data 97
Column A
vs
Column B

Unpaired t test

P value	0,0497
P value summary	*
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=4.315 df=2

How big is the difference?

Mean ± SEM of column A	25.67 ± 14.34 N=2
Mean ± SEM of column B	91.67 ± 5.335 N=2
Difference between means	-66.00 ± 15.30
95% confidence interval	-131.8 to -0.1832
R squared	0,9030

F test to compare variances

F,DFn, Dfd	7.220, 1, 1
P value	0,4536
P value summary	ns
Are variances significantly different?	No

Patienten im Schub gegen Natalizumab Elispot MOG Acetat

Table Analyzed Data 98
Column A
vs
Column B

Unpaired t test

P value	0,0177
P value summary	*
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=7.410 df=2

How big is the difference?

Mean ± SEM of column A	28.50 ± 16.17 N=2
Mean ± SEM of column B	148.8 ± 1.500 N=2
Difference between means	-120.3 ± 16.24
95% confidence interval	-190.2 to -50.45
R squared	0,9649

F test to compare variances

F,DFn, Dfd	116.2, 1, 1
P value	0,1178
P value summary	ns
Are variances significantly different?	No

Patienten im Schub gegen Natalizumab Elispot MOG ref.

Table Analyzed Data 99
Column A
vs
Column B

Unpaired t test

P value	0,0074
P value summary	**
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=11.53 df=2

How big is the difference?

Mean ± SEM of column A	6.500 ± 0.8300 N=2
Mean ± SEM of column B	28.00 ± 1.670 N=2
Difference between means	-21.50 ± 1.865
95% confidence interval	-29.52 to -13.48
R squared	0,9852

F test to compare variances

F,DFn, Dfd	4.048, 1, 1
P value	0,5873
P value summary	ns
Are variances significantly different?	No

Glatirameracetat gegen Natalizumab Elispot MOG PBS

(4.5 und 4.6)

Table Analyzed Data 68
Column A
vs
Column B

Unpaired t test

P value	0,0040
P value summary	**
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=15.77 df=2

How big is the difference?

Mean ± SEM of column A	7.500 ± 0.1700 N=2
Mean ± SEM of column B	91.67 ± 5.335 N=2
Difference between means	-84.17 ± 5.338
95% confidence interval	-107.1 to -61.20
R squared	0,9920

F test to compare variances

F,DFn, Dfd	984.9, 1, 1
P value	0,0406
P value summary	*
Are variances significantly different?	Yes

Glatirameracetat gegen Natalizumab Elispot MOG Acetat
(4.5 und 4.6)

Table Analyzed Data 69
Column A
vs
Column B

Unpaired t test

P value 0,0002
P value summary ***
Are means signif. different? (P < 0.05) Yes
One- or two-tailed P value? Two-tailed
t, df t=79.41 df=2

How big is the difference?

Mean ± SEM of column A 5.670 ± 1.000 N=2
Mean ± SEM of column B 148.8 ± 1.500 N=2
Difference between means -143.2 ± 1.803
95% confidence interval -150.9 to -135.4
R squared 0,9997

F test to compare variances

F,DFn, Dfd 2.250, 1, 1
P value 0,7487
P value summary ns
Are variances significantly different? No

Natalizumab gegen Rebif Elispot MOG PBS
(4.5 und 4.6)

Table Analyzed Data 61
Column A
vs
Column B

Unpaired t test

P value 0,0171
P value summary *
Are means signif. different? (P < 0.05) Yes
One- or two-tailed P value? Two-tailed
t, df t=4.811 df=3

How big is the difference?

Mean ± SEM of column A 25.67 ± 10.17 N=3
Mean ± SEM of column B 91.67 ± 5.335 N=2
Difference between means -66.00 ± 13.72
95% confidence interval -109.7 to -22.34
R squared 0,8852

F test to compare variances

F,DFn, Dfd 5.452, 2, 1
P value 0,5797
P value summary ns
Are variances significantly different? No

Natalizumab gegen Rebif Elispot MOG Acetat

(4.5 und 4.6)

Table Analyzed Data 62
Column A
vs
Column B

Unpaired t test

P value	0,0034
P value summary	**
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=8.486 df=3

How big is the difference?

Mean ± SEM of column A	37.45 ± 10.13 N=3
Mean ± SEM of column B	148.8 ± 1.500 N=2
Difference between means	-111.4 ± 13.12
95% confidence interval	-153.1 to -69.62
R squared	0,9600

F test to compare variances

F,DFn, Dfd	68.40, 2, 1
P value	0,1704
P value summary	ns
Are variances significantly different?	No

Natalizumab gegen Rebif Elispot MOG ref.

(4.5 und 4.6)

Table Analyzed Data 63
Column A
vs
Column B

Unpaired t test

P value	0,0069
P value summary	**
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=6.670 df=3

How big is the difference?

Mean ± SEM of column A	9.447 ± 1.927 N=3
Mean ± SEM of column B	28.00 ± 1.670 N=2
Difference between means	-18.55 ± 2.782
95% confidence interval	-27.40 to -9.702
R squared	0,9368

F test to compare variances

F,DFn, Dfd	1.997, 2, 1
P value	0,8949
P value summary	ns
Are variances significantly different?	No

Natalizumab gegen Rebif Elispot New MOG ref.

(4.5 und 4.6)

Table Analyzed Data 64
Column A
vs
Column B

Unpaired t test

P value	0,0037
P value summary	**
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=8.277 df=3

How big is the difference?

Mean ± SEM of column A	6.333 ± 4.017 N=3
Mean ± SEM of column B	53.50 ± 3.170 N=2
Difference between means	-47.17 ± 5.698
95% confidence interval	-65.30 to -29.03
R squared	0,9580

F test to compare variances

F,DFn, Dfd	2.408, 2, 1
P value	0,8293
P value summary	ns
Are variances significantly different?	No

Natalizumab gegen Interferon β-1a gesamt Elispot MOG PBS

(4.5 und 4.6)

Table Analyzed Data 107
Column A
vs
Column B

Unpaired t test

P value	0,0062
P value summary	**
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=5.265 df=4

How big is the difference?

Mean ± SEM of column A	91.67 ± 5.335 N=2
Mean ± SEM of column B	20.75 ± 8.712 N=4
Difference between means	70.92 ± 13.47
95% confidence interval	33.52 to 108.3
R squared	0,8739

F test to compare variances

F,DFn, Dfd	5.333, 3, 1
P value	0,6115
P value summary	ns
Are variances significantly different?	No

Natalizumab gegen Interferon β -1a gesamt Elispot MOG Acetat
(4.5 und 4.6)

Table Analyzed Data 108
Column A
vs
Column B

Unpaired t test

P value 0,0019
P value summary **
Are means signif. different? (P < 0.05) Yes
One- or two-tailed P value? Two-tailed
t, df t=7.239 df=4

How big is the difference?

Mean \pm SEM of column A 148.8 \pm 1.500 N=2
Mean \pm SEM of column B 29.09 \pm 11.01 N=4
Difference between means 119.7 \pm 16.54
95% confidence interval 73.83 to 165.7
R squared 0,9291

F test to compare variances

F,DFn, Dfd 107.8, 3, 1
P value 0,1413
P value summary ns
Are variances significantly different? No

Natalizumab gegen Interferon β -1a gesamt Elispot MOG ref.
(4.5 und 4.6)

Table Analyzed Data 109
Column A
vs
Column B

Unpaired t test

P value 0,0041
P value summary **
Are means signif. different? (P < 0.05) Yes
One- or two-tailed P value? Two-tailed
t, df t=5.924 df=4

How big is the difference?

Mean \pm SEM of column A 28.00 \pm 1.670 N=2
Mean \pm SEM of column B 7.753 \pm 2.174 N=4
Difference between means 20.25 \pm 3.418
95% confidence interval 10.76 to 29.74
R squared 0,8977

F test to compare variances

F,DFn, Dfd 3.390, 3, 1
P value 0,7504
P value summary ns
Are variances significantly different? No

Natalizumab gegen Interferon β -1a gesamt Elispot New MOG ref.
(4.5 und 4.6)

Table Analyzed Data 110
Column A
vs
Column B

Unpaired t test

P value 0,0006
P value summary ***
Are means signif. different? (P < 0.05) Yes
One- or two-tailed P value? Two-tailed
t, df t=9.951 df=4

How big is the difference?

Mean \pm SEM of column A 53.50 \pm 3.170 N=2
Mean \pm SEM of column B 5.583 \pm 2.938 N=4
Difference between means 47.92 \pm 4.815
95% confidence interval 34.55 to 61.28
R squared 0,9612

F test to compare variances

F,DFn, Dfd 1.718, 3, 1
P value 0,9980
P value summary ns
Are variances significantly different? No

Natalizumab gegen Interferon β -1b Elispot MOG PBS
(4.5 und 4.6)

Table Analyzed Data 117
Column A
vs
Column B

Unpaired t test

P value 0,0030
P value summary **
Are means signif. different? (P < 0.05) Yes
One- or two-tailed P value? Two-tailed
t, df t=8.863 df=3

How big is the difference?

Mean \pm SEM of column A 91.67 \pm 5.335 N=2
Mean \pm SEM of column B 10.00 \pm 6.438 N=3
Difference between means 81.66 \pm 9.213
95% confidence interval 52.34 to 111.0
R squared 0,9632

F test to compare variances

F,DFn, Dfd 2.184, 2, 1
P value 0,8632
P value summary ns
Are variances significantly different? No

Natalizumab gegen Interferon β -1b Elispot MOG Acetat
(4.5 und 4.6)

Table Analyzed Data 1
Column A
vs
Column B

Unpaired t test

P value	P<0.0001
P value summary	***
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=46.40 df=3

How big is the difference?

Mean \pm SEM of column A	148.8 \pm 1.500 N=2
Mean \pm SEM of column B	7.890 \pm 2.188 N=3
Difference between means	140.9 \pm 3.037
95% confidence interval	131.3 to 150.6
R squared	0,9986

F test to compare variances

F,DFn, Dfd	3.190, 2, 1
P value	0,7362
P value summary	ns
Are variances significantly different?	No

Natalizumab gegen Interferon β -1b Elispot MOG ref.
(4.5 und 4.6)

Table Analyzed Data 2
Column A
vs
Column B

Unpaired t test

P value	0,0080
P value summary	**
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=6.309 df=3

How big is the difference?

Mean \pm SEM of column A	28.00 \pm 1.670 N=2
Mean \pm SEM of column B	4.890 \pm 2.669 N=3
Difference between means	23.11 \pm 3.663
95% confidence interval	11.45 to 34.77
R squared	0,9299

F test to compare variances

F,DFn, Dfd	3.831, 2, 1
P value	0,6796
P value summary	ns
Are variances significantly different?	No

Natalizumab gegen Interferon β -1b Elispot pp65 (CMV)
(4.5 und 4.6)

Table Analyzed	Data 7	
Column A		
vs		
Column B		
Unpaired t test		
P value		0,0361
P value summary		*
Are means signif. different? (P < 0.05)		Yes
One- or two-tailed P value?		Two-tailed
t, df		t=3.627 df=3
How big is the difference?		
Mean \pm SEM of column A		113.7 \pm 32.00 N=2
Mean \pm SEM of column B		22.67 \pm 6.028 N=3
Difference between means		91.00 \pm 25.09
95% confidence interval		11.17 to 170.8
R squared		0,8143
F test to compare variances		
F,DFn, Dfd		18.79, 1, 2
P value		0,0986
P value summary		ns
Are variances significantly different?		No

Natalizumab gegen Interferon β gesamt Elispot MOG PBS
(4.5 und 4.6)

Table Analyzed	Data 11	
Column A		
vs		
Column B		
Unpaired t test		
P value		0,0003
P value summary		***
Are means signif. different? (P < 0.05)		Yes
One- or two-tailed P value?		Two-tailed
t, df		t=6.626 df=7
How big is the difference?		
Mean \pm SEM of column A		91.67 \pm 5.335 N=2
Mean \pm SEM of column B		16.14 \pm 5.685 N=7
Difference between means		75.52 \pm 11.40
95% confidence interval		48.57 to 102.5
R squared		0,8625
F test to compare variances		
F,DFn, Dfd		3.974, 6, 1
P value		0,7324
P value summary		ns
Are variances significantly different?		No

Natalizumab gegen Interferon β gesamt Elispot MOG Acetat
(4.5 und 4.6)

Table Analyzed Data 12
Column A
vs
Column B

Unpaired t test

P value	P<0.0001
P value summary	***
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=8.946 df=7

How big is the difference?

Mean \pm SEM of column A	148.8 \pm 1.500 N=2
Mean \pm SEM of column B	20.00 \pm 7.325 N=7
Difference between means	128.8 \pm 14.40
95% confidence interval	94.77 to 162.9
R squared	0,9196

F test to compare variances

F,DFn, Dfd	83.46, 6, 1
P value	0,1672
P value summary	ns
Are variances significantly different?	No

Natalizumab gegen Interferon β gesamt Elispot MOG ref.
(4.5 und 4.6)

Table Analyzed Data 13
Column A
vs
Column B

Unpaired t test

P value	0,0003
P value summary	***
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=6.494 df=7

How big is the difference?

Mean \pm SEM of column A	28.00 \pm 1.670 N=2
Mean \pm SEM of column B	6.526 \pm 1.644 N=7
Difference between means	21.47 \pm 3.307
95% confidence interval	13.65 to 29.30
R squared	0,8576

F test to compare variances

F,DFn, Dfd	3.391, 6, 1
P value	0,7866
P value summary	ns
Are variances significantly different?	No

Natalizumab gegen Interferon β gesamt Elispot New MOG ref.
(4.5 und 4.6)

Table Analyzed Data 14
Column A
vs
Column B

Unpaired t test

P value 0,0010
P value summary **
Are means signif. different? (P < 0.05) Yes
One- or two-tailed P value? Two-tailed
t, df t=5.910 df=6

How big is the difference?

Mean \pm SEM of column A 53.50 \pm 3.170 N=2
Mean \pm SEM of column B 8.667 \pm 4.074 N=6
Difference between means 44.83 \pm 7.586
95% confidence interval 26.27 to 63.40
R squared 0,8534

F test to compare variances

F,DFn, Dfd 4.954, 5, 1
P value 0,6559
P value summary ns
Are variances significantly different? No

Natalizumab gegen therapierte Patienten Elispot MOG PBS
(4.5 und 4.6)

Table Analyzed Data 12
Column A
vs
Column B

Unpaired t test

P value 0,0265
P value summary *
Are means signif. different? (P < 0.05) Yes
One- or two-tailed P value? Two-tailed
t, df t=2.560 df=11

How big is the difference?

Mean \pm SEM of column A 91.67 \pm 5.335 N=2
Mean \pm SEM of column B 28.30 \pm 10.16 N=11
Difference between means 63.36 \pm 24.75
95% confidence interval 8.891 to 117.8
R squared 0,3734

F test to compare variances

F,DFn, Dfd 19.93, 10, 1
P value 0,3455
P value summary ns
Are variances significantly different? No

Natalizumab gegen therapierte Patienten Elispot MOG Acetat
(4.5 und 4.6)

Table Analyzed Data 13
Column A
vs
Column B

Unpaired t test	
P value	0,0229
P value summary	*
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=2.642 df=11
How big is the difference?	
Mean ± SEM of column A	148.8 ± 1.500 N=2
Mean ± SEM of column B	40.82 ± 16.81 N=11
Difference between means	108.0 ± 40.87
95% confidence interval	18.05 to 198.0
R squared	0,3883
F test to compare variances	
F,DFn, Dfd	691.0, 10, 1
P value	0,0592
P value summary	ns
Are variances significantly different?	No

Natalizumab gegen nicht therapierte Patienten Elispot MOG Acetat

Table Analyzed Data 24
Column A
vs
Column B

Unpaired t test	
P value	0,0395
P value summary	*
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=2.525 df=7
How big is the difference?	
Mean ± SEM of column A	148.8 ± 1.500 N=2
Mean ± SEM of column B	43.24 ± 21.29 N=7
Difference between means	105.6 ± 41.83
95% confidence interval	6.674 to 204.5
R squared	0,4766
F test to compare variances	
F,DFn, Dfd	705.3, 6, 1
P value	0,0576
P value summary	ns
Are variances significantly different?	No

Natalizumab gegen nicht therapierte Patienten Elispot New MOG ref.

Table Analyzed Data 26
Column A
vs
Column B

Unpaired t test

P value	0,0014
P value summary	**
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=11.66 df=3

How big is the difference?

Mean ± SEM of column A	53.50 ± 3.170 N=2
Mean ± SEM of column B	9.890 ± 2.245 N=3
Difference between means	43.61 ± 3.740
95% confidence interval	31.71 to 55.51
R squared	0,9784

F test to compare variances

F,DFn, Dfd	1.329, 1, 2
P value	0,7364
P value summary	ns
Are variances significantly different?	No

Natalizumab gegen alle Patienten Elispot MOG Acetat

Table Analyzed Data 86
Column A
vs
Column B

Unpaired t test

P value	0,0090
P value summary	**
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=2.894 df=20

How big is the difference?

Mean ± SEM of column A	148.8 ± 1.500 N=2
Mean ± SEM of column B	40.43 ± 11.59 N=20
Difference between means	108.4 ± 37.45
95% confidence interval	30.27 to 186.5
R squared	0,2952

F test to compare variances

F,DFn, Dfd	596.6, 19, 1
P value	0,0645
P value summary	ns
Are variances significantly different?	No

Natalizumab gegen alle Patienten Elispot New MOG ref.

Table Analyzed Data 88
Column A
vs
Column B

Unpaired t test

P value	0,0210
P value summary	*
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=2.626 df=13

How big is the difference?

Mean ± SEM of column A	53.50 ± 3.170 N=2
Mean ± SEM of column B	17.49 ± 5.200 N=13
Difference between means	36.01 ± 13.72
95% confidence interval	6.386 to 65.64
R squared	0,3465

F test to compare variances

F,DFn, Dfd	17.49, 12, 1
P value	0,3699
P value summary	ns
Are variances significantly different?	No

Natalizumab gegen alle Kontrollen Elispot MOG PBS

Table Analyzed Data 73
Column A
vs
Column B

Unpaired t test

P value	0,0007
P value summary	***
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=4.083 df=18

How big is the difference?

Mean ± SEM of column A	24.82 ± 5.310 N=18
Mean ± SEM of column B	91.67 ± 5.335 N=2
Difference between means	-66.85 ± 16.37
95% confidence interval	-101.2 to -32.45
R squared	0,4809

F test to compare variances

F,DFn, Dfd	8.914, 17, 1
P value	0,5165
P value summary	ns
Are variances significantly different?	No

Natalizumab gegen alle Kontrollen Elispot MOG Acetat

Table Analyzed Data 74
Column A
vs
Column B

Unpaired t test

P value	P<0.0001
P value summary	***
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=6.633 df=18

How big is the difference?

Mean ± SEM of column A	148.8 ± 1.500 N=2
Mean ± SEM of column B	28.50 ± 5.902 N=18
Difference between means	120.3 ± 18.14
95% confidence interval	82.22 to 158.4
R squared	0,7097

F test to compare variances

F,DFn, Dfd	139.3, 17, 1
P value	0,1331
P value summary	ns
Are variances significantly different?	No

Natalizumab gegen alle Kontrollen Elispot New MOG ref.

Table Analyzed Data 76
Column A
vs
Column B

Unpaired t test

P value	0,0002
P value summary	***
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=5.169 df=13

How big is the difference?

Mean ± SEM of column A	53.50 ± 3.170 N=2
Mean ± SEM of column B	14.39 ± 2.853 N=13
Difference between means	39.11 ± 7.567
95% confidence interval	22.77 to 55.46
R squared	0,6727

F test to compare variances

F,DFn, Dfd	5.266, 12, 1
P value	0,6585
P value summary	ns
Are variances significantly different?	No

Rebif gegen Interferon β -1b Elispot MOG Acetat

(4.5 und 4.6)

Table Analyzed Data 82
Column A
vs
Column B

Unpaired t test

P value	0,0463
P value summary	*
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=2.852 df=4

How big is the difference?

Mean \pm SEM of column A	37.45 \pm 10.13 N=3
Mean \pm SEM of column B	7.890 \pm 2.188 N=3
Difference between means	29.56 \pm 10.36
95% confidence interval	0.7890 to 58.32
R squared	0,6704

F test to compare variances

F,DFn, Dfd	21.44, 2, 2
P value	0,0891
P value summary	ns
Are variances significantly different?	No

Rohdaten zu 4.6

Patienten (24)

		0 Ag	MOG PBS	MOG Acetat	MOG ref.	New MOG ref.	CEF	Hexon (ADV)
211106	Patient 1(w)	0,33	12,00		98,00		60,67	
	Patient 2(w)	5,33	21,67		27,67		219,67	
140307	Patient 1(w)	1,33	37,33	109,00	87,00		13,67	108,67
	Patient 2(w)	0,67	0,33	0,33	31,67		229,00	2,67
210307	Patient 1(m)	3,00	111,00	81,33	339,00		43,00	114,00
	Patient 3(w)	6,00	7,67	8,00	154,00		19,67	19,00
230307	Patient 1(m)	0,67	186,33	154,67	104,33		3,67	28,00
	Patient 2(w)	1,00	9,00	4,67	2,00		1,67	53,67
40407	Patient 2(m)	0,00	3,67	4,00	1,33	5,67	39,00	6,00
130407	Patient 1(m)	1,00	13,33	14,00	4,00	13,33	194,00	16,00
200407	Patient 2(m)	2,67	36,00	36,00	6,00	10,67	28,33	86,00
210307	Patient 2(w)	2,00	7,67	4,67	95,67		7,00	9,67
230307	Patient 3(w)	1,33	5,67	9,00	1,00		18,00	5,00
300307	Patient 1(w)	3,67	7,33	6,67	4,33		193,00	16,00
40407	Patient 1(m)	6,33	97,00	150,33	26,33	56,67	41,00	150,33
	Patient 3(w)	1,67	86,33	147,33	29,67	50,33	30,67	20,67
180407	Patient 1(w)	3,67	40,00	44,67	7,33	34,00	29,33	129,67
	Patient 2(m)	4,00	1,67	3,67	3,67	3,00	79,67	23,33
200407	Patient 1(w)	12,67	22,67	11,00	10,00	26,67	55,33	113,33
250407	Patient 1(w)	3,33	6,00	4,00	2,67	3,33	84,00	25,67
	Patient 2(w)	1,00	40,00	36,00	5,67	14,33	35,00	141,33
270407	Patient 1(m)	2,67	6,00	20,67	12,00	3,00	17,67	48,67
180507	Patient 1(m)	5,33	31,00	55,67	10,67	1,67	252,33	25,00
200407	Patient 3(w)	7,33	11,33	12,33	5,67	4,67	165,00	45,33

		Glas (ADV)	PP65 (CMV)	EBNA-1 (EBV)	PHA
211106	Patient 1(w)				405,00
	Patient 2(w)				384,33
140307	Patient 1(w)	34,00	58,33	94,33	189,00
	Patient 2(w)	5,00	313,00	3,67	197,33
210307	Patient 1(m)	38,33	87,67	21,33	264,00
	Patient 3(w)	2,00	10,67	9,33	343,33
230307	Patient 1(m)	5,67	212,33	1,33	336,67
	Patient 2(w)	2,00	35,67	2,67	361,67
40407	Patient 2(m)	4,33	206,67	0,33	385,00
130407	Patient 1(m)	11,00	167,33	14,00	135,67
200407	Patient 2(m)	37,33	18,67	7,67	421,33
210307	Patient 2(w)	3,00	6,33	6,67	327,67
230307	Patient 3(w)	0,67	29,67	0,00	329,00
300307	Patient 1(w)	16,67	151,67	23,33	380,00
40407	Patient 1(m)	143,67	145,67	9,00	259,00
	Patient 3(w)	14,00	81,67	0,33	398,00
180407	Patient 1(w)	134,67	24,33	11,33	421,00
	Patient 2(m)	31,67	10,67	1,00	414,33
200407	Patient 1(w)	79,67	27,67	27,67	397,67
250407	Patient 1(w)	28,67	8,00		364,00
	Patient 2(w)	30,67	62,67		415,33
270407	Patient 1(m)	62,33	12,33		398,67
180507	Patient 1(m)	6,00	318,00		308,67
200407	Patient 3(w)	17,67	8,00	24,00	418,00

Kontrollen (20)

		0 Ag	MOG PBS	MOG Acetat	MOG ref.	New MOG ref.	CEF	Hexon (ADV)
70307	Kontr. 1(w)	13,67	28,33	48,00	311,67		75,67	86,00
	Kontr. 2(w)	7,00	7,67	28,00	277,67		47,33	29,33
	Kontr. 3(w)	2,33	12,00	15,00	188,67		15,00	14,00
140307	Kontr. 1(w)	0,33	133,33	181,00	213,67		321,00	33,00
	Kontr. 2(w)	0,33	11,67	8,33	325,67		48,00	22,33
210307	Kontr. 1(m)	1,00	12,00	11,33	90,00		7,33	24,00
	Kontr. 2(m)	1,33	3,00	1,33	13,67		0,00	5,33
230307	Kontr. 1(m)	2,00	20,67	20,00	5,00		51,33	10,67
	Kontr. 2(m)	1,33	81,00	99,67	2,33		12,33	107,33
130407	Kontr. 1(w)	5,00	70,00	47,67	23,33	10,67	8,00	131,00
180407	Kontr. 1(w)	3,67	9,33	22,67	6,33	5,67	10,67	28,67
	Kontr. 2(m)	2,33	56,00	71,67	23,67	29,67	73,33	52,33
200407	Kontr. 1(m)	2,33	25,33	39,33	6,33	11,00	17,33	37,33
	Kontr. 2(w)	1,67	14,67	15,67	3,33	18,33	21,33	122,33
250407	Kontr. 1(m)	2,00	22,67	26,33	8,67	17,33	16,33	76,00
	Kontr. 2(w)	1,33	28,00	17,00	2,67	25,33	2,33	2,67
270407	Kontr. 1(w)	5,00	24,67	32,00	4,33	28,00	87,33	99,67
	Kontr. 2(w)	1,00	3,00	5,33	8,67	26,00	9,00	97,67
180507	Kontr. 1(w)	11,33	7,67	9,00	6,67	6,67	79,67	30,33
	Kontr. 2(w)	2,67	7,00	13,33	7,67	1,67	2,00	112,67

		Glas (ADV)	PP65 (CMV)	EBNA-1 (EBV)	PHA
70307	Kontr. 1(w)	85,33	67,67	4,67	281,67
	Kontr. 2(w)	19,33	56,67	12,00	261,33
	Kontr. 3(w)	12,33	16,00	8,33	419,67
140307	Kontr. 1(w)	22,67	297,00	31,67	59,00
	Kontr. 2(w)	26,33	160,67	11,67	342,33
210307	Kontr. 1(m)	9,00	10,33	1,67	325,67
	Kontr. 2(m)	0,33	2,67	0,33	289,67
230307	Kontr. 1(m)	2,67	14,67	0,67	346,00
	Kontr. 2(m)	11,67	48,67	1,67	353,67
130407	Kontr. 1(w)	123,67	57,33	4,33	391,33
180407	Kontr. 1(w)	41,00	419,00	15,00	198,67
	Kontr. 2(m)	76,33	194,33	29,33	365,67
200407	Kontr. 1(m)	20,33	82,33	4,67	410,67
	Kontr. 2(w)	80,33	13,67	2,67	202,33
250407	Kontr. 1(m)	62,33	26,00		399,00
	Kontr. 2(w)	13,33	23,00		375,67
270407	Kontr. 1(w)	85,67	286,33		310,33
	Kontr. 2(w)	60,00	7,67		414,00
180507	Kontr. 1(w)	12,00	89,33		281,00
	Kontr. 2(w)	51,33	5,67		308,33

Erläuterung zu den Therapien der Patienten von 4.6

<u>Therapien der Patienten</u>		<u>Patienten</u>	<u>Therapien</u>
<u>Nicht therapierte Patienten:</u>	211106	Patient 1(w)	
	140307	Patient 1(w)	
		Patient 2(w)	
	210307	Patient 1(m)	
		Patient 3(w)	
	230307	Patient 1(m)	
		Patient 2(w)	
	040407	Patient 2(m)	
	130407	Patient 1(m)	
	200407	Patient 2(m)	
<u>Therapierte Patienten:</u>	210307	Patient 2(w)	Glatirameracetat (Copaxone)
	230307	Patient 3(w)	Betaferon (Interferon β -1b)
	300307	Patient 1(w)	Glatirameracetat (Copaxone)
	040407	Patient 1(m)	Natalizumab (Tysabri)
		Patient 3(w)	Natalizumab (Tysabri)
	180407	Patient 2(m)	Betaferon (Interferon β -1b)
	200407	Patient 1(w)	Betaferon (Interferon β -1b)
	250407	Patient 1(w)	Avonex (Interferon β -1a)
		Patient 2(w)	Rebif (Interferon β -1a)
	270407	Patient 1(m)	Rebif (Interferon β -1a)
180507	Patient 1(m)	Rebif (Interferon β -1a)	
<u>Schubpatienten:</u>	211106	Patient 2(w)	Glatirameracetat (Copaxone)
	180407	Patient 1(w)	Rebif (Interferon β -1a)
	200407	Patient 3(w)	Rebif, Cortison

Statistik zu Signifikanzen bei 4.6

Patienten im Schub gegen Natalizumab Elispot MOG PBS

Table Analyzed Data 86

Column A

vs

Column B

Unpaired t test

P value	0,0100
P value summary	*
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=5.840 df=3

How big is the difference?

Mean ± SEM of column A	24.33 ± 8.383 N=3
Mean ± SEM of column B	91.67 ± 5.335 N=2
Difference between means	-67.33 ± 11.53
95% confidence interval	-104.0 to -30.64
R squared	0,9191

F test to compare variances

F,DFn, Dfd	3.703, 2, 1
P value	0,6898
P value summary	ns
Are variances significantly different?	No

Patienten im Schub gegen Natalizumab Elispot MOG Acetat

Table Analyzed Data 87

Column A

vs

Column B

Unpaired t test

P value	0,0177
P value summary	*
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=7.410 df=2

How big is the difference?

Mean ± SEM of column A	28.50 ± 16.17 N=2
Mean ± SEM of column B	148.8 ± 1.500 N=2
Difference between means	-120.3 ± 16.24
95% confidence interval	-190.2 to -50.45
R squared	0,9649

F test to compare variances

F,DFn, Dfd	116.2, 1, 1
P value	0,1178
P value summary	ns
Are variances significantly different?	No

Patienten im Schub gegen nicht therapierte Patienten Elispot Glas (ADV)

Table Analyzed Data 51
Column A
vs
Column B

Unpaired t test

P value	0,0357
P value summary	*
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=2.467 df=9

How big is the difference?

Mean ± SEM of column A	15.52 ± 5.344 N=9
Mean ± SEM of column B	76.17 ± 58.50 N=2
Difference between means	-60.65 ± 24.58
95% confidence interval	-116.3 to -5.043
R squared	0,4034

F test to compare variances

F,DFn, Dfd	26.63, 1, 8
P value	0,0017
P value summary	**
Are variances significantly different?	Yes

Natalizumab gegen nicht therapierte Patienten Elispot MOG Acetat

Table Analyzed Data 13
Column A
vs
Column B

Unpaired t test

P value	0,0342
P value summary	*
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=2.493 df=9

How big is the difference?

Mean ± SEM of column A	148.8 ± 1.500 N=2
Mean ± SEM of column B	45.78 ± 18.69 N=9
Difference between means	103.1 ± 41.33
95% confidence interval	9.564 to 196.5
R squared	0,4086

F test to compare variances

F,DFn, Dfd	698.7, 8, 1
P value	0,0585
P value summary	ns
Are variances significantly different?	No

Natalizumab gegen nicht therapierte Patienten Elispot New MOG ref.

Table Analyzed Data 15
Column A
vs
Column B

Unpaired t test

P value	0,0014
P value summary	**
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=11.66 df=3

How big is the difference?

Mean ± SEM of column A	53.50 ± 3.170 N=2
Mean ± SEM of column B	9.890 ± 2.245 N=3
Difference between means	43.61 ± 3.740
95% confidence interval	31.71 to 55.51
R squared	0,9784

F test to compare variances

F,DFn, Dfd	1.329, 1, 2
P value	0,7364
P value summary	ns
Are variances significantly different?	No

Natalizumab gegen nicht therapierte Patienten Elispot Glas (ADV)

Table Analyzed Data 19
Column A
vs
Column B

Unpaired t test

P value	0,0415
P value summary	*
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=2.375 df=9

How big is the difference?

Mean ± SEM of column A	78.84 ± 64.84 N=2
Mean ± SEM of column B	15.52 ± 5.344 N=9
Difference between means	63.32 ± 26.65
95% confidence interval	3.024 to 123.6
R squared	0,3854

F test to compare variances

F,DFn, Dfd	32.71, 1, 8
P value	0,0009
P value summary	***
Are variances significantly different?	Yes

Natalizumab gegen alle Patienten Elispot MOG Acetat

Table Analyzed Data 3
Column A
vs
Column B

Unpaired t test

P value	0,0095
P value summary	**
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=2.842 df=22

How big is the difference?

Mean ± SEM of column A	148.8 ± 1.500 N=2
Mean ± SEM of column B	41.73 ± 11.13 N=22
Difference between means	107.1 ± 37.69
95% confidence interval	28.94 to 185.3
R squared	0,2685

F test to compare variances

F,DFn, Dfd	606.1, 21, 1
P value	0,0640
P value summary	ns
Are variances significantly different?	No

Natalizumab gegen alle Patienten Elispot New MOG ref.

Table Analyzed Data 5
Column A
vs
Column B

Unpaired t test

P value	0,0210
P value summary	*
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=2.626 df=13

How big is the difference?

Mean ± SEM of column A	53.50 ± 3.170 N=2
Mean ± SEM of column B	17.49 ± 5.200 N=13
Difference between means	36.01 ± 13.72
95% confidence interval	6.386 to 65.64
R squared	0,3465

F test to compare variances

F,DFn, Dfd	17.49, 12, 1
P value	0,3699
P value summary	ns
Are variances significantly different?	No

Natalizumab gegen alle Kontrollen Elispot MOG PBS

Table Analyzed Data 66
Column A
vs
Column B

Unpaired t test

P value	0,0154
P value summary	*
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=2.649 df=20

How big is the difference?

Mean ± SEM of column A	28.90 ± 7.319 N=20
Mean ± SEM of column B	91.67 ± 5.335 N=2
Difference between means	-62.76 ± 23.69
95% confidence interval	-112.2 to -13.34
R squared	0,2597

F test to compare variances

F,DFn, Dfd	18.82, 19, 1
P value	0,3597
P value summary	ns
Are variances significantly different?	No

Natalizumab gegen alle Kontrollen Elispot MOG Acetat

Table Analyzed Data 67
Column A
vs
Column B

Unpaired t test

P value	0,0013
P value summary	**
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=3.745 df=20

How big is the difference?

Mean ± SEM of column A	148.8 ± 1.500 N=2
Mean ± SEM of column B	35.63 ± 9.350 N=20
Difference between means	113.2 ± 30.23
95% confidence interval	50.14 to 176.3
R squared	0,4122

F test to compare variances

F,DFn, Dfd	388.6, 19, 1
P value	0,0799
P value summary	ns
Are variances significantly different?	No

Natalizumab gegen alle Kontrollen Elispot New MOG ref.

Table Analyzed Data 69
Column A
vs
Column B

Unpaired t test

P value	0,0004
P value summary	***
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=5.073 df=11

How big is the difference?

Mean ± SEM of column A	53.50 ± 3.170 N=2
Mean ± SEM of column B	16.39 ± 2.979 N=11
Difference between means	37.11 ± 7.315
95% confidence interval	21.01 to 53.21
R squared	0,7005

F test to compare variances

F,DFn, Dfd	4.856, 10, 1
P value	0,6807
P value summary	ns
Are variances significantly different?	No

Danksagung

Zuerst gilt mein Dank meinen lieben Eltern, denen diese Arbeit auch in großer Dankbarkeit gewidmet ist. Sie haben mich stets unerstützt und sind mir mit immer gutem Rat zur Seite gestanden. Besonders danke ich dann meinem Doktorvater Prof. Dr. Dr. Robert Weißert und Dr. Kathy de Graaf, die für eine angenehme und arbeitsförderliche Atmosphäre in der Arbeitsgruppe gesorgt und mich in die Labortätigkeit eingearbeitet haben. Dankbar bin ich auch Dr. med. vet. Michael Schumm, der mich bei meinen Laborarbeiten in der Kinderklinik immer unterstützt hat und stets Zeit für mich hatte. Auch danke ich dem Ärztlichen Direktor Prof. Dr. Arthur Melms. Mein Dank gilt außerdem allen MS-Patienten und gesunden Kontrollen, die mir ihr Blut für meine Arbeit zur Verfügung gestellt haben. Zudem danke ich grundsätzlich allen, die mich in dieser Zeit auf meinem Weg bis zum Abschluss dieser Arbeit begleitet haben. Als gläubiger Christ gilt ein großer Dank auch dem lebendigen Gott, der mich stets in seiner Hand gehalten hat und hält, der seine Treue täglich neu beweist und sein Wort hält.

Nun danket alle Gott mit Herzen, Mund und Händen,
der große Dinge tut, an uns und allen Enden,
der uns von Mutterleib und Kindesbeinen an
unzählig viel zugut bis hierher hat getan.

Martin Rinckart (um 1630) 1636

(Feiern und Loben, 2003, S. 51)