

Regulationsmechanismen in  
Autoimmunkrankheiten:  
Analysen zur  
Supprimierbarkeit  
von T-Effektorzellen aus  
Patienten mit Multipler Sklerose

---

**Dissertation**

zur Erlangung des Grades  
„Doktor der Naturwissenschaften“

im Promotionsfach Chemie

am Fachbereich Chemie, Pharmazie und Geowissenschaften  
der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz

Janine Abel  
geboren am 14. September 1988 in Mainz

Mainz, Mai 2021

1. Gutachter:

2. Gutachter:

vorgelegt von: Janine Abel

Tag der mündlichen Prüfung: 29.11.2021

## Versicherung

für das Gesuch um Zulassung zur Promotion im Fachbereich 09 an der Johannes  
Gutenberg-Universität Mainz

Hiermit versichere ich \_\_\_\_\_ gemäß § 10 Abs. 3d  
Name, Vorname

der Promotionsordnung vom 24.07.2007:

- Ich habe die jetzt als Dissertation vorgelegte Arbeit selbst angefertigt und alle benutzten Hilfsmittel (Literatur, Apparaturen, Material) in der Arbeit angegeben.
- Ich hatte die jetzt als Dissertation vorgelegte Arbeit als Prüfungsarbeit für folgende Prüfungen eingereicht.

\_\_\_\_\_  
(Bezeichnung der Prüfung)

\_\_\_\_\_  
(Bezeichnung und Ort der Prüfungsstelle)

- Ich hatte weder die jetzt als Dissertation vorgelegte Arbeit noch Teile davon bei einer anderen Fakultät bzw. einem anderen Fachbereich als Dissertation eingereicht.

\_\_\_\_\_  
Datum

\_\_\_\_\_  
Unterschrift

*„Wer alles mit einem Lächeln beginnt, dem wird das Meiste gelingen.“*

-Dalai Lama-

## Zusammenfassung

Die Regulation von T-Zell-vermittelten Immunantworten ist ein essentieller Mechanismus, um die immunologische Homöostase aufrechtzuerhalten und unseren Körper vor der Entstehung von Autoimmunerkrankungen zu schützen. Die Multiple Sklerose (MS) ist eine Autoimmunerkrankung, bei der eine unerwünschte Immunreaktion, ausgelöst durch autoreaktive T-Zellen, nicht ausreichend reguliert wird. Ein Grund hierfür liegt in der verminderten Ansprechbarkeit von T-Effektorzellen (Teff) auf die suppressiven Eigenschaften von regulatorischen T-Zellen (Treg), ein Prozess, der als Treg-Resistenz bezeichnet wird. Diese Treg-Resistenz zeichnet sich durch eine beschleunigte IL-6-Produktion, erhöhte IL-6-Rezeptor-Expression (IL-6R) und Hyperaktivierung der PKB/c-Akt in Teff aus.

Innerhalb der vorliegenden Arbeit wurde zuerst der Einfluss einer Therapie mit Dimethylfumarat (DMF) auf die Immunregulation von Teff im peripheren Blut von MS-Patienten untersucht. Detaillierte *in-vitro*- und *in-vivo*-Analysen ergaben, dass DMF die Ansprechbarkeit von Teff auf die Treg-vermittelte Suppression wiederherstellt. Die verbesserte Treg-Sensitivität in Teff von therapierten MS-Patienten korrelierte mit einer Normalisierung der IL-6R-Expression und damit verbundenen Änderungen in der IL-6-Signaltransduktion. Anhand dieser Untersuchungen wurde ein neuer, immunregulierender Mechanismus der DMF-Therapie identifiziert. Der zweite Teil dieser Arbeit konzentrierte sich auf die Identifizierung von Proteinen, die mit der Ausbildung einer Treg-Resistenz in MS-Patienten assoziiert sind. Molekularbiologische Untersuchungen zeigten auf, dass die Proteinexpression der Phosphatase PTEN und des Transkriptions-Koaktivators PGC-1 $\alpha$  in Teff von MS-Patienten signifikant verringert ist. Der gezielte Knockdown von PTEN in T-Zellen von gesunden Spendern induzierte eine Treg-Resistenz, die mit einer beschleunigten IL-6-Produktion und Hyperaktivierung der PKB/c-Akt, vergleichbar zu Treg-resistenten Teff aus MS-Patienten, einherging. Neben IL-6 und PKB/c-Akt scheint PTEN somit essentiell für eine effiziente Immunregulation von T-Zellen zu sein. Weitere Untersuchungen müssen die Rolle von PGC-1 $\alpha$  bei der Entstehung einer Treg-Resistenz in MS-Patienten klären.

## Abstract

Efficient regulation of T cell-mediated immune responses is one fundamental mechanism to maintain immunological homeostasis, and therefore to protect our body from developing autoimmune diseases. In Multiple Sclerosis (MS) immunoregulatory mechanisms fail to control autoreactive T cells due to a reduced responsiveness of T effector cells (Teff) for the suppressive properties of regulatory T cells (Treg), a process termed Treg resistance. This Treg resistance is strongly associated with an accelerated IL-6 production, enhanced IL-6 receptor (IL-6R) expression and hyperactivation of PKB/c-akt.

The focus of the first study was to investigate whether the novel disease-modifying therapy of MS with dimethyl fumarate (DMF) influences immune regulation of Teff in the peripheral blood of patients. Detailed *in vitro* and *in vivo* analyses revealed that DMF restores responsiveness of Teff to the suppressive function of Treg presumably by downregulation of IL-6R expression and thus changing IL-6 signaling in T cells. On the basis of these investigations, a novel immunoregulatory mechanism of DMF therapy was identified.

The second study of this thesis focused on identifying proteins associated with the development of Treg resistance in MS patients. It was found that the expression of phosphatase PTEN and transcriptional coactivator PGC-1 $\alpha$  is significantly reduced in Teff of MS patients. Specific knockdown of PTEN in T cells from healthy donors resulted in an accelerated IL-6 production, hyperactivation of PKB/c-akt and impaired responsiveness towards Treg-mediated suppression, comparable to Treg-resistant Teff from MS patients. The experiments showed that, in addition to IL-6 and PKB/c-akt, PTEN is essential for an efficient immune regulation of T cells. Further experiments have to clarify the role of PGC-1 $\alpha$  in the development of Treg resistance.

# Inhaltsverzeichnis

|  |     |
|--|-----|
| Zusammenfassung .....  | I   |
| Abstract .....   | II  |
| Inhaltsverzeichnis .....   | III |
| Abkürzungsverzeichnis .....  | VI  |
| Tabellenverzeichnis .....  | IX  |
| Abbildungsverzeichnis .....  | X   |
| 1 Einleitung .....   | 12  |
| 2 Materialien .....  | 21  |
| 2.1 Laborgeräte .....  | 21  |
| 2.2 Verbrauchsmaterialien .....  | 22  |
| 2.3 Medien, Puffer und Zusätze .....   | 23  |
| 2.3.1 Allgemeine Zellkultur .....  | 23  |
| 2.3.2 Anreicherung und Depletion von Zellen .....  | 23  |
| 2.3.3 Durchflusszytometrie .....   | 24  |
| 2.3.4 Gelelektrophorese und Western Blot .....   | 24  |
| 2.3.5 Selbsthergestellte Puffer .....  | 25  |
| 2.4 Gebrauchsfertige Reagenzien und Kits .....   | 26  |
| 2.4.1 Anreicherung und Depletion von Zellen .....  | 26  |
| 2.4.2 Durchflusszytometrie .....   | 26  |
| 2.4.3 Molekularbiologische Analysen .....  | 27  |
| 2.5 Antikörper und weitere Proteine .....  | 27  |
| 2.5.1 Antikörper für Durchflusszytometrie .....  | 27  |
| 2.5.2 Antikörper und weitere Proteine für T-Zell-Stimulation .....   | 28  |
| 2.5.3 Antikörper für Western-Blot .....  | 29  |
| 3 Methoden .....   | 30  |
| 3.1 MS-Patienten und gesunde Spender .....   | 30  |
| 3.2 Zellkulturtechniken .....  | 34  |
| 3.2.1 Kulturmedien und Kulturbedingungen .....   | 34  |
| 3.2.2 Gewinnung humaner PBMC aus Buffy-Coats oder Vollblut<br>mittels Dichtegradientenzentrifugation ..... | 34  |
| 3.2.3 Bestimmung der Lebendzellzahl .....  | 35  |
| 3.2.4 Isolierung von T-Zellpopulationen aus PBMC .....   | 36  |
| 3.2.4.1 Isolierung von CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> regulatorischen T-Zellen .                       | 37  |
| 3.2.4.2 Positivanreicherung von CD4 <sup>+</sup> T-Zellen .....  | 38  |
| 3.2.4.3 Negativanreicherung von CD4 <sup>+</sup> T-Zellen .....  | 38  |
| 3.2.5 CD25-Depletion von PBMC und CD4 <sup>+</sup> T-Zellen .....  | 38  |

|       |   |    |
|-------|---|----|
| 3.2.6 | <i>In-vitro</i> -Suppressionsassay.....   | 39 |
| 3.3   | Durchflusszytometrische Analysen.....   | 40 |
| 3.3.1 | Grundlagen der Durchflusszytometrie.....  | 40 |
| 3.3.2 | Färbung von Oberflächenmolekülen.....   | 41 |
| 3.3.3 | Intrazelluläre Färbung der PKB/c-Akt.....   | 42 |
| 3.3.4 | Intrazelluläre Färbung von FoxP3 und Ki-67.....   | 42 |
| 3.3.5 | Intrazelluläre Färbung von IFN- $\gamma$ .....  | 42 |
| 3.3.6 | Bestimmung von Zytokinen mittels CBA-Assay.....   | 43 |
| 3.4   | Molekularbiologische Methoden.....  | 44 |
| 3.4.1 | PTEN-Knockdown in T-Zellen.....   | 44 |
| 3.4.2 | RNA-Isolierung und cDNA-Synthese.....   | 44 |
| 3.4.3 | Quantitative Real-Time PCR.....   | 45 |
| 3.4.4 | Proteinisolierung und Konzentrationsbestimmung.....   | 46 |
| 3.4.5 | SDS-PAGE.....   | 47 |
| 3.4.6 | Western Blot.....   | 47 |
| 3.4.7 | DNA-Microarray.....   | 48 |
| 3.5   | Tierexperimentelle Methoden.....  | 49 |
| 3.5.1 | Tierhaltung.....  | 49 |
| 3.5.2 | Induktion einer GvHD in Rag2 <sup>-/-</sup> $\gamma$ C <sup>-/-</sup> -Mäusen.....  | 49 |
| 3.5.3 | Aufarbeitung von Milzzellen.....  | 52 |
| 3.6   | Statistik.....  | 52 |
| 4     | Ergebnisse.....   | 53 |
| 4.1   | <i>In-vitro</i> -Untersuchungen zur Regulation peripherer T-Zellen in MS-Patienten vor und nach Dimethylfumarat-Therapie.....               | 54 |
| 4.1.1 | T-Zellen von MS-Patienten sind resistent gegen die Treg-vermittelte Suppression.....  | 54 |
| 4.1.2 | DMF verbessert die Ansprechbarkeit der T-Zellen für die Treg-vermittelte Immunregulation.....   | 58 |
| 4.1.3 | T-Zellen aus therapierten MS-Patienten weisen eine normalisierte IL-6R-Expression auf.....  | 61 |
| 4.2   | <i>In-vivo</i> -Untersuchungen zur Treg-Resistenz in MS-Patienten nach Dimethylfumarat-Therapie.....  | 62 |
| 4.2.1 | Der Transfer Treg-resistenter T-Zellen führt zur Ausbildung einer schwerwiegenden GvHD.....   | 62 |
| 4.2.2 | DMF verbessert die Immunregulation von T-Zellen aus dem Blut von therapierten MS-Patienten im Mausmodell der GvHD.....                      | 67 |
| 4.2.3 | Treg reduzieren den Anteil aktivierter und proliferierender CD4 <sup>+</sup> T-Zellen aus DMF-behandelten MS-Patienten <i>in vivo</i> ..... | 68 |
| 4.3   | Molekularbiologische Untersuchungen zur Rolle der Phosphatase PTEN in der Entstehung einer Treg-Resistenz.....                              | 72 |
| 4.3.1 | Beschleunigte Abnahme der PTEN-Expression in Teff von MS-Patienten.....   | 73 |



---

|       |  |     |
|-------|--|-----|
| 4.3.2 | Modulation der PTEN-Expression in CD4 <sup>+</sup> T-Zellen gesunder Spender .....                                     | 75  |
| 4.3.3 | PTEN-Knockdown blockiert die Supprimierbarkeit von CD4 <sup>+</sup> T-Zellen durch regulatorische T-Zellen.....        | 77  |
| 4.3.4 | IL-6 beeinflusst die PTEN-Proteinexpression in aktivierten T-Zellen .....  | 80  |
| 4.4   | Vergleichende Untersuchungen zur Expression von PGC-1 $\alpha$ in T-Zellen von MS-Patienten und gesunden Spendern..... | 84  |
| 4.4.1 | Verminderte Expression von PGC-1 $\alpha$ in T-Zellen von MS-Patienten.....  | 85  |
| 5     | Diskussion.....  | 87  |
| 5.1   | Dimethylfumarat verbessert die Immunregulation von T-Zellen in MS-Patienten .....                                      | 87  |
| 5.2   | Die Rolle von PTEN und PGC-1 $\alpha$ in der Entstehung einer Treg-Resistenz.....                                      | 92  |
| 6     | Literaturverzeichnis .....   | 98  |
| 7     | Danksagung.....  | 110 |
| 8     | Lebenslauf .....   | 112 |
| 9     | Anhang.....  | 115 |

## Abkürzungsverzeichnis

|                    |   |
|--------------------|---|
| <sup>3</sup> H-Tdr | Tritium-markiertes Thymin-2'-desoxyribosid (Thymidin)     |
| ACK                | Ammonium-Chlorid-Kalium                                   |
| APC                | Antigenpräsentierende Zelle                               |
| Bis-Tris           | Bis(2-hydroxyethyl)amino-tris(hydroxymethyl)methan        |
| BSA                | Bovines Serumalbumin                                      |
| CBA                | „Cytometric bead array“                                   |
| CCL20              | C-C-Chemokinligand 20                                     |
| CCR6               | C-C-Chemokinrezeptor Typ 6                                |
| CD                 | „Cluster of differentiation“                              |
| cDNA               | Komplementäre Desoxyribonukleinsäure                      |
| CIS                | „Clinically isolated syndrome“                            |
| CO <sub>2</sub>    | Kohlenstoffdioxid   |
| CSF                | Zerebrospinalflüssigkeit                                  |
| DC                 | Dendritische Zelle  |
| DMF                | Dimethylfumarat   |
| EAE                | Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis               |
| EBV                | Epstein-Barr-Virus  |
| EDTA               | Ethylendiamintetraacetat                                  |
| EEF1A              | Eukaryotischer Elongationsfaktor 1-alpha                  |
| FACS               | „Fluorescence-activated cell sorting“                     |
| FITC               | Fluorescein-Isothiocyanat                                 |
| FoxP3              | Forkhead-Box-Protein P3                                   |
| FSC                | „Forward Scatter“, Vorwärtsstreulicht                     |
| GFP                | „Green fluorescent protein“                               |
| gp120              | Glykoprotein 120  |
| gp130              | Glykoprotein 130  |
| GPT                | Glutamat-Pyruvat-Transaminase                             |
| GvHD               | „Graft-versus-host disease“, Spender-gegen-Wirt-Krankheit |
| HC                 | Gesunder Spender  |
| HLA                | Humanes Leukozytenantigen                                 |
| HRP                | „Horseradish peroxidase“                                  |

---

|                    |   |
|--------------------|---|
| HSA                | Humanes Serumalbumin  |
| IFN                | Interferon  |
| IgG                | Immunglobulin G   |
| IL                 | Interleukin   |
| IL-6R              | Interleukin-6-Rezeptor                                      |
| KHCO <sub>3</sub>  | Kaliumhydrogencarbonat                                      |
| JAK                | Januskinase   |
| MACS               | „Magnetic-activated cell sorting“                           |
| mAk                | Monoklonaler Antikörper                                     |
| MEM                | „Minimal essential medium“                                  |
| MFI                | „Mean fluorescence intensity“                               |
| miR                | „microRNA“ (nichtkodierende RNA)                            |
| MOPS               | 3-(N-Morpholino)propansulfonsäure                           |
| mRNA               | „Messenger RNA“   |
| MRT                | Magnetresonanztomographie                                   |
| MS                 | Multiple Sklerose   |
| NaCl               | Natriumchlorid  |
| NH <sub>4</sub> Cl | Ammoniumchlorid   |
| NK-Zellen          | Natürliche Killerzellen                                     |
| PAGE               | Polyacrylamidgelelektrophorese                              |
| PBMC               | „Peripheral blood mononuclear cells“                        |
| PBS                | „Phosphate-buffered saline“                                 |
| PCR                | Polymerase-Kettenreaktion                                   |
| PDK1               | „Phosphoinositide-dependent kinase-1“                       |
| PE                 | Phycoerythrin   |
| PerCP              | Peridinin-Chlorophyll-Protein-Komplex                       |
| PET                | Positronen-Emissions-Tomographie                            |
| PGC-1 $\alpha$     | „Proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha“ |
| PI3K               | Phosphoinositid-3-Kinase                                    |
| PIP <sub>2</sub>   | Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat                        |
| PIP <sub>3</sub>   | Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat                     |
| PKB                | Proteinkinase B   |
| PMA                | Phorbol-12-myristat-13-acetat                               |
| PMSF               | Phenylmethylsulfonylfluorid                                 |

---

|              |  |
|--------------|--|
| PPMS         | „primary progressive MS“, primär progrediente MS       |
| pS473        | Phosphoryliertes Serin 473                             |
| PTEN         | „Phosphatase and tensin homolog“                       |
| PVDF         | Polyvinylidenfluorid                                   |
| qRT-PCR      | Quantitative Real-Time PCR                             |
| Rag2         | „Recombination activating gene 2“                      |
| RNA          | Ribonukleinsäure                                       |
| RRMS         | „relapsing-remitting MS“, schubförmig remittierende MS |
| RT           | Raumtemperatur   |
| SD           | „Standard deviation“, Standardabweichung               |
| SDS          | „Sodium dodecyl sulfate“                               |
| SEM          | „Standard error of the mean“, Standardfehler           |
| siRNA        | „Small interfering RNA“                                |
| SPMS         | „secondary progressive MS“, sekundär progrediente MS   |
| SSC          | „Side Scatter“, Seitwärtsstreulicht                    |
| STAT         | „Signal transducers and activators of transcription“   |
| TARC         | Translational Animal Research Center                   |
| TBST         | „Tris-buffered saline“ mit Tween-20                    |
| Teff         | T-Effektorzelle  |
| TGF- $\beta$ | „Transforming growth factor-beta“                      |
| TH1          | Typ1-T-Helferzelle                                     |
| TNF          | Tumor-Nekrose-Faktor                                   |
| Treg         | Regulatorische T-Zelle                                 |
| Tris         | Tris(hydroxymethyl)-aminomethan                        |
| TZR          | T-Zell-Rezeptor  |
| ZNS          | Zentralnervensystem                                    |

## Tabellenverzeichnis

|  |    |
|--|----|
| Tabelle 1: Klinische Merkmale der MS-Patienten.....  | 30 |
| Tabelle 2: Bedingungen der qRT-PCR.....  | 46 |
| Tabelle 3: Krankheitsdauer aller MS-Patienten zum Zeitpunkt der Blutentnahme.<br>.....                               | 55 |
| Tabelle 4: Behandlungsdauer aller MS-Patienten unter DMF-Therapie zum Zeitpunkt der Blutentnahme.....                | 58 |
| Tabelle 5: Anteil humaner CD45 <sup>+</sup> Zellen in der Milz acht Tage nach dem Transfer humaner Immunzellen. .... | 69 |
| Tabelle 6: Effizienz des PTEN-Knockdowns in CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>-</sup> T-Zellen gesunder Spender. ....       | 76 |

## Abbildungsverzeichnis

|   |    |
|---|----|
| Abbildung 1: Die verschiedenen Verlaufsformen der Multiplen Sklerose.....   | 13 |
| Abbildung 2: Die Treg-Resistenz in T-Zellen von RRMS-Patienten. ....  | 19 |
| Abbildung 3: Gewinnung humaner PBMC mittels Dichtegradientenzentrifugation.<br>.....  | 35 |
| Abbildung 4: Aufbau einer Neubauer-Zählkammer. ....   | 36 |
| Abbildung 5: Schematische Darstellung der magnetischen Zellseparation. ....   | 37 |
| Abbildung 6: Schematische Darstellung eines Durchflusszytometers. ....  | 41 |
| Abbildung 7: Ablauf der quantitativen Real-Time PCR. ....   | 45 |
| Abbildung 8: Aktivierte Treg schützen vor der Entstehung einer GvHD. ....   | 50 |
| Abbildung 9: Schematische Darstellung zum Transfer humaner PBMC in<br>Rag2 <sup>-/-</sup> γc <sup>-/-</sup> -Mäuse.....                                       | 51 |
| Abbildung 10: Schematische Darstellung des <i>in-vitro</i> -Assays zur Untersuchung<br>der Supprimierbarkeit von T-Zellen.....                                | 56 |
| Abbildung 11: T-Zellen von unbehandelten MS-Patienten weisen eine Treg-<br>Resistenz auf. ....  | 57 |
| Abbildung 12: DMF verbessert die Ansprechbarkeit der T-Zellen von MS-<br>Patienten für eine Treg-vermittelte Suppression.....                                 | 59 |
| Abbildung 13: Analyse des Zytokinprofils in Kulturüberständen. ....   | 60 |
| Abbildung 14: DMF normalisiert die IL-6R-Expression auf T-Zellen von MS-<br>Patienten.....  | 61 |
| Abbildung 15: Schematische Darstellung des <i>in-vivo</i> -Versuchs.....  | 63 |
| Abbildung 16: T-Zellen aus dem Blut von MS-Patienten induzieren eine GvHD,<br>die durch aktivierte Treg nicht unterdrückt werden kann.....                    | 65 |
| Abbildung 17: Analyse der klinischen Symptome einer GvHD in humanisierten<br>Mäusen.....  | 66 |
| Abbildung 18: DMF verbessert wesentlich die Treg-Sensitivität von T-Zellen in<br>MS-Patienten.....  | 68 |
| Abbildung 19: Durchflusszytometrische Analyse humaner CD45 <sup>+</sup> Immunzellen<br>aus der Milz humanisierter Mäuse. ....                                 | 70 |
| Abbildung 20: Verringerter Anteil aktivierter und proliferierender CD4 <sup>+</sup> T-Zellen <i>in</i><br><i>vivo</i> durch Treg-vermittelte Suppression..... | 71 |
| Abbildung 21: Beschleunigte Abnahme der PTEN-Proteinexpression in MS T-<br>Zellen nach Aktivierung.....   | 74 |
| Abbildung 22: Experimenteller Aufbau der PTEN-Knockdown-Versuche.....   | 75 |
| Abbildung 23: Analyse des PTEN-Knockdowns auf Proteinebene.....   | 77 |
| Abbildung 24: Beschleunigte IL-6-Produktion und Aktivierung der PKB/c-Akt in T-<br>Zellen mit PTEN-Knockdown. ....  | 78 |
| Abbildung 25: PTEN-Knockdown vermindert die Supprimierbarkeit von T-Zellen.<br>.....  | 79 |

---

|   |    |
|---|----|
| Abbildung 26: IL-6 überkommt die Treg-vermittelte Suppression.....  | 81 |
| Abbildung 27: IL-6 vermindert die PTEN-Expression in T-Effektorzellen. ....                                     | 82 |
| Abbildung 28: Vergleichende Analysen zur PGC-1 $\alpha$ -Expression in CD4 <sup>+</sup> T-Zellen. ....          | 86 |
| Abbildung 29: Zusammenfassung zur immunregulierenden Wirkung von DMF auf T-Zellen von RRMS-Patienten. ....      | 91 |
| Abbildung 30: Zusammenfassung zur Rolle von PTEN und PGC-1 $\alpha$ in der Entstehung einer Treg-Resistenz..... | 97 |

# 1 Einleitung

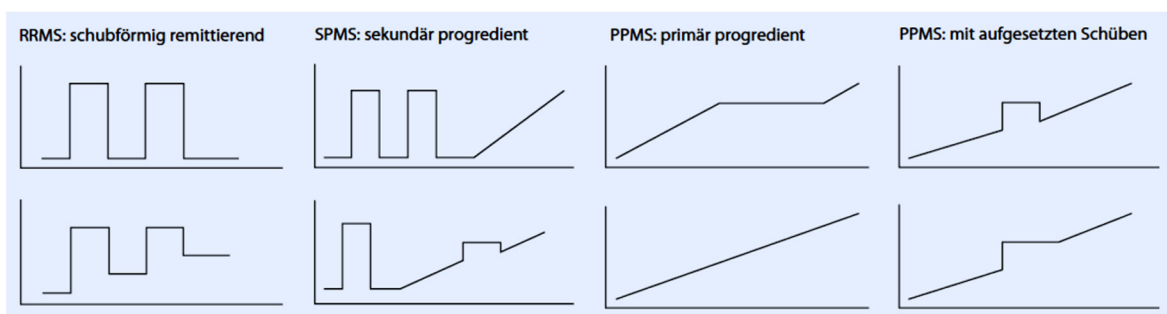
Das Immunsystem des Menschen dient als biologisches Abwehrsystem zur Bekämpfung und Eliminierung von Krankheitserregern und Schadstoffen, die unseren Körper infiltrieren. T-Zellen stellen hierbei eine wichtige Zellpopulation dar, die effiziente Immunantworten auslösen und vermitteln können. Wenn ein Krankheitserreger in unseren Körper eindringt, können antigenpräsentierende Zellen (APC) spezifische Antigene des Erregers an T-Zellen präsentieren, die dadurch aktiviert werden und in spezialisierte T-Effektorzellen (Teff) differenzieren. Diese Teff leiten im Anschluss eine spezifische, immunvermittelte Entzündungsreaktion gegen den eingedrungenen Erreger ein. Regulatorische T-Zellen (Treg) sind eine spezialisierte Subpopulation der T-Zellen. Sie nehmen aufgrund ihrer regulierenden Funktion eine essentielle Rolle bei der Aufrechterhaltung der Immuntoleranz ein (1). Aufgrund ihrer suppressiven Eigenschaften besteht eine ihrer Hauptaufgaben darin, T-Zell-vermittelte Immunantworten am Ende einer Immunreaktion zu stoppen und so einen immunologischen Gleichgewichtszustand wiederherzustellen. Des Weiteren spielen sie eine zentrale Rolle in der Unterdrückung von autoaggressiven, T-Zell-vermittelten Immunreaktionen. So limitieren sie das Risiko zur Entwicklung einer Autoimmunität, indem sie täglich zahlreiche unerwünschte Immunreaktionen von autoreaktiven T-Zellen auf körpereigene Strukturen supprimieren. Wenn sich jedoch T-Zellen der Immuntoleranz durch Treg entziehen, kann es zur Entstehung einer entzündlichen Autoimmunerkrankung kommen, bei der körpereigenes Gewebe angegriffen und beschädigt wird (2).

Die Multiple Sklerose (MS) ist eine chronisch-entzündliche, neurodegenerative Autoimmunerkrankung des Zentralnervensystems (ZNS), die durch den Angriff körpereigener, autoreaktiver Immunzellen auf die Myelinscheiden der Nervenfasern verursacht wird (3). Die Myelinscheide ist eine lipidreiche Schicht, die die Axone von Nervenzellen umhüllt. Aufgrund ihrer elektrisch-isolierenden Wirkung ermöglicht sie eine schnelle Weiterleitung von Nervenimpulsen entlang der Nervenfasern (4). Wird diese isolierende Hülle in Folge einer autoaggressiven Immunreaktion zerstört, können elektrische Impulse nicht mehr richtig weitergeleitet werden und es kommt zur Ausbildung von neurologischen Symptomen, die abhängig von der jeweiligen Lokalisation des aktiven Entzündungsherdes im ZNS



sind. So führen beispielsweise Entzündungen im Bereich des Sehnervs zu Sehstörungen. Entzündungsherde, die im Bereich des motorischen Systems liegen, gehen mit Lähmungserscheinungen in den Extremitäten einher (5). Schlussendlich betrifft die MS-Erkrankung alle Strukturen des ZNS, was zu einem sehr breiten Spektrum an klinischen Symptomen führt und demnach enorme Auswirkungen auf die Lebensführung und Lebensqualität des Patienten hat.

Sowohl die klinische Symptomatik als auch die Verlaufsformen dieser Krankheit können sehr unterschiedlich sein, weshalb die MS als die „Krankheit mit 1.000 Gesichtern“ bezeichnet wird (6). Der klinische Verlauf einer MS-Erkrankung lässt sich grob in vier verschiedene Verlaufsformen einteilen (Abbildung 1). Hierbei stellt die schubförmig remittierende Form der MS (engl.: relapsing-remitting multiple sclerosis, RRMS) mit 80-90 % der Patienten die häufigste Verlaufsform dar (7). Sie zeichnet sich durch Phasen der klinischen Verschlechterung, Remission und Stabilität aus. Die RRMS kann im weiteren Verlauf der Erkrankung in eine sekundär progrediente Verlaufsform (engl.: secondary progressive multiple sclerosis, SPMS) mit schleichender Krankheitsprogression, d.h. kontinuierlicher Zunahme der klinischen Behinderung, übergehen. Die primär progrediente MS (engl.: primary progressive multiple sclerosis, PPMS) ist mit ca. 10 % die seltenste Verlaufsform der MS. Im Gegensatz zur RRMS und SPMS ist die PPMS von Beginn an durch einen stetig fortschreitenden Krankheitsverlauf gekennzeichnet, der in einzelnen Fällen durch aufgesetzte Schübe unterbrochen wird.



**Abbildung 1: Die verschiedenen Verlaufsformen der Multiplen Sklerose (7).**

Die MS ist eine Autoimmunerkrankung, die vorwiegend junge Erwachsene, darunter hauptsächlich Frauen, befällt (8). Trotz einer Vielzahl an Forschungsarbeiten in den letzten Jahrzehnten ist die Ursache, die letztendlich zur Entgleisung des Immunsystems und Ausbildung dieser Erkrankung führt, noch nicht vollständig geklärt. Die bisherigen Ergebnisse deuten auf eine multifaktorielle Krankheitsentstehung hin. Man nimmt an, dass exogene Faktoren wie Umwelteinflüsse, Urbanisierung und verbesserte Hygienebedingungen, aber auch eine genetische Prädisposition, die Entstehung dieser Autoimmunerkrankung triggern (9, 10). In retrospektiven Analysen wurden bereits einige Umweltfaktoren im Kontext der MS untersucht. Es existieren Hypothesen, die beispielsweise einen Zusammenhang zwischen dem Auftreten eines Vitamin-D3-Mangels und einem erhöhten Risiko an MS zu erkranken, beschreiben (11, 12). Des Weiteren wird eine Korrelation zwischen der Prägung unseres Immunsystems im Kindesalter und einer dadurch reduzierten Anfälligkeit für MS vermutet. Demnach können Auseinandersetzungen mit unterschiedlichen Krankheitserregern in der Kindheit das Risiko für Autoimmunerkrankungen deutlich vermindern. Auch das Zusammenleben mit Geschwistern oder Spielen mit Altersgenossen im Kindesalter minimiert das Risiko für MS signifikant, da sich Kinder im jungen Alter vermehrt gegenseitig mit Infektionskrankheiten anstecken und so das Immunsystem geprägt wird (13). Ein weiterer Risikofaktor mit starker Assoziation zu MS stellt die Infektion mit dem Epstein-Barr-Virus (EBV) dar (14, 15). Epidemiologische Studien zeigten bereits, dass bei Kindern mit MS vermehrt auch eine Immunreaktion gegen EBV nachgewiesen werden kann (16). Wie jedoch die EBV-Infektion zur Pathogenese der MS beitragen könnte, wird aktuell noch diskutiert. Eine mögliche Erklärung besteht darin, dass die pathogenen EBV-Antigene eine strukturelle Ähnlichkeit zu Proteinbestandteilen des Myelins aufweisen und über strukturell ähnliche HLA-Moleküle von APC präsentiert werden. So könnte ein T-Zell-Rezeptor (TZR) eines MS-Patienten sowohl mit einem über HLA präsentierten Myelinpeptid als auch mit einem über HLA präsentierten EBV-Peptid kreuzreagieren (17).

Die Pathogenese der MS wird nicht nur durch einen ursächlichen Faktor bestimmt. Es ist vielmehr eine Kombination aus verschiedenen Einflüssen, die letztendlich eine Fehlsteuerung des Immunsystems induzieren und zu schwerwiegenden, neurologischen Störungen führen. Um die Pathogenese der MS und die beteiligten Zellpopulationen näher analysieren zu können, wurden in den letzten

Jahrzehnten sowohl zahlreiche Untersuchungen im MS-Patienten selbst als auch in etablierten Tiermodellen durchgeführt. Die experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis (EAE) ist hierbei das am häufigsten verwendete Tiermodell zur Untersuchung der MS *in vivo*. Die EAE ähnelt der MS in den wichtigsten pathologischen Merkmalen. Wie bei der MS kommt es auch bei der EAE zu einer chronischen, immunvermittelten Entzündung, die mit einer Demyelinisierung, d.h. einer Zerstörung der Myelinscheide, und einem Verlust an Nervenzellen (Neurodegeneration) einhergeht (18). Die Erkenntnisse aus den umfangreichen Untersuchungen im Tiermodell und im Patienten selbst lieferten wichtige Hinweise darauf, welche Immunzellen wesentlich an der Entstehung der MS beteiligt sind.

B-Zellen spielen sowohl als Vorläufer von Antikörper-produzierenden Plasmazellen als auch als APC für die Aktivierung von T-Zellen eine wichtige Rolle bei der Pathogenese der MS (19). Die autoreaktiven Antikörper, die von differenzierten Plasmazellen abgesondert werden, tragen möglicherweise zur Demyelinisierung im entzündeten ZNS bei (20, 21). Neben der Differenzierung in Antikörper-produzierende Plasmazellen können B-Zellen als APC die Aktivierung von inflammatorischen TH1- und TH17-Zellen einleiten und somit zur Entwicklung und zum Fortschreiten der ZNS-Autoimmunerkrankung beitragen (22, 23). Darüber hinaus produzieren B-Zellen erhebliche Mengen an IL-6, was für die Entwicklung pathogener TH17-Zellen entscheidend ist (24). Studien von Barr *et al.* zeigten, dass B-Zellen aus MS-Patienten eine deutlich erhöhte IL-6-Produktion im Vergleich zu gesunden Spendern aufweisen und daher einen entscheidenden Pathogenitätsfaktor darstellen (25). Basierend auf diesen Befunden hat sich in den letzten Jahrzehnten ein erhebliches Interesse an B-Zell-adressierenden Therapiestrategien zur Behandlung der MS entwickelt. In klinischen Studien von Hauser *et al.* mit dem B-Zell-depletierenden Antikörper Rituximab konnten bereits erste Erfolge bei Patienten mit RRMS erzielt werden (26).

T-Zellen stellen eine weitere Zellpopulation dar, die eine zentrale Rolle in der Pathogenese von MS spielt. Die MS ist als Autoimmunerkrankung durch das Vorhandensein autoreaktiver, Myelin-spezifischer T-Zellen gekennzeichnet. Diese werden vermutlich durch APC, die körpereigene, ZNS-spezifische Antigene präsentieren, in zervikalen Lymphknoten aktiviert und differenzieren in pathogene, autoaggressive CD4<sup>+</sup> TH1- und TH17-Zellen. Den TH17-Zellen wird hierbei eine

Schlüsselrolle in der Pathogenese der MS zugewiesen (27). Diese T-Zellen sezernieren die pro-inflammatorischen Zytokine IL-17 und IL-6 und werden durch IL-23 reguliert (28). In Studien zeigte sich bereits, dass das Vorhandensein von IL-17-produzierenden CD4<sup>+</sup> T-Zellen notwendig ist, um eine EAE in den Mäusen induzieren zu können (29). Ähnliche Beobachtungen wurden im MS-Patienten bestätigt: In aktiven Läsionen konnte eine erhöhte Anzahl IL-17-produzierender CD4<sup>+</sup> T-Zellen nachgewiesen werden (30).

Die differenzierten, autoreaktiven T-Zellen gelangen über die Blut-Hirn-Schranke ins ZNS und initiieren dort eine inflammatorische Immunreaktion gegen die Myelinscheide der Nervenfasern. Der Transport der pathogenen T-Zellen über die Blut-Hirn-Schranke in die Zerebrospinalflüssigkeit (engl.: cerebrospinal fluid, CSF) wird über Wechselwirkungen zwischen Chemokinen und ihren jeweiligen Chemokinrezeptoren ermöglicht. Chemokine sind chemotaktische Signalproteine, die bei Zellen eine Wanderungsbewegung einleiten (31). Im Kontext der MS ist der C-C-Chemokinrezeptor Typ 6 (CCR6) von großer Bedeutung. CCR6 wird auf der Oberfläche von TH17-Zellen exprimiert und interagiert mit dem C-C-Chemokinligand 20 (CCL20), welcher von Endothelzellen sezerniert wird (32). Sowohl im peripheren Blut als auch in der CSF von MS-Patienten liegen erhöhte Frequenzen an IL-17-produzierenden CCR6<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T-Zellen vor (33). Durch die Ausschüttung der inflammatorischen Zytokine IL-17 und IL-22 können TH17-Zellen zudem die Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke erhöhen. Das sezernierte IL-17 induziert eine oxidative Stressreaktion in Endothelzellen, was letztendlich zu einer Reduktion von Tight Junctions führt (34). Aufgrund des entzündlichen Milieus in der CSF und in den perivaskulären Räumen werden weitere inflammatorische Immunzellen, wie beispielsweise natürliche Killerzellen und andere Zellen des angeborenen Immunsystems, in das ZNS rekrutiert und verstärken dort die Beschädigung und Zerstörung von Nervenfasern (35). Die massive Schädigung des ZNS in MS-Patienten ist demnach auf eine komplexe Interaktion zwischen verschiedenen, inflammatorischen Zellpopulationen zurückzuführen.

Die MS ist eine Autoimmunerkrankung, bei der eine unerwünschte T-Zell-vermittelte Immunreaktion nicht ausreichend kontrolliert wird. In den letzten Jahren haben sich vermehrt Hinweise auf mögliche Defekte in Immuntoleranzmechanismen ergeben, die zur Pathogenese der Autoimmunerkrankung beitragen. Neue

Erkenntnisse deuten darauf hin, dass die Funktion von Treg in MS-Patienten beeinträchtigt ist. In Studien von Viglietta *et al.* wurde die Funktion von isolierten Treg aus dem peripheren Blut von RRMS-Patienten und gesunden Spendern vergleichend untersucht (36). Hierbei zeigte sich, dass zwar die Frequenz an peripheren CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> Treg in MS-Patienten und gesunden Spendern vergleichbar ist, jedoch Treg aus MS-Patienten eine deutliche Störung in der Suppression der Proliferation und Aktivierung von T-Zellen aufweisen. Diese Beobachtungen wurden in weiteren Studien von Fletcher *et al.* mit isolierten CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>low</sup>FoxP3<sup>+</sup>CD39<sup>+</sup> Treg aus MS-Patienten bestätigt (37). Aufgrund der postulierten Dysfunktion von Treg in MS-Patienten kann die Aktivierung und Proliferation von autoreaktiven, Myelin-spezifischen T-Zellen nicht effizient genug unterdrückt werden. Die funktionelle Störung der Treg kann somit wesentlich zur Pathogenese der MS beitragen (38).

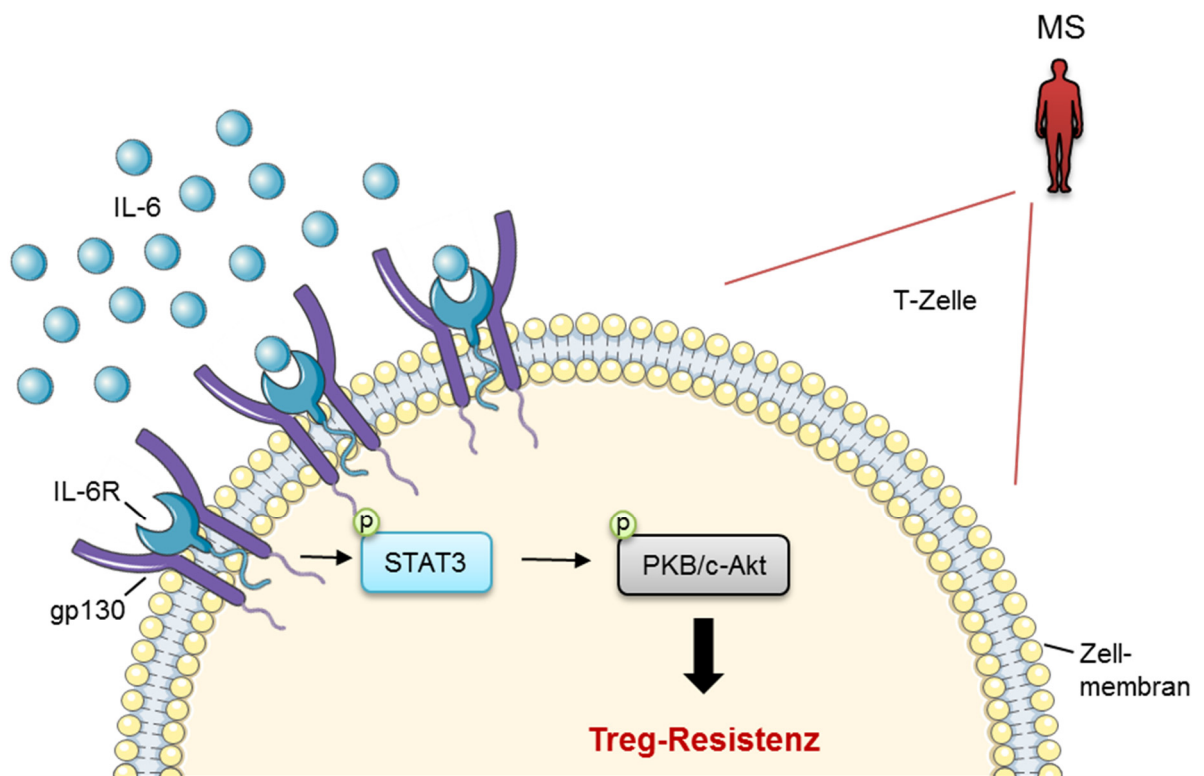
Die erfolgreiche Suppression der T-Zell-Aktivierung hängt nicht nur von einer effizienten Treg-Funktion ab, sondern auch von der Empfänglichkeit der T-Zellen für die Treg-vermittelten Suppressionsmechanismen. T-Zellen sind entscheidend für die Auslösung und Vermittlung von Immunantworten, beispielsweise als Schutz gegen einen Erreger im Kontext einer Infektionskrankheit, aber auch bei unerwünschten Reaktionen auf Selbstantigene im Zusammenhang mit Autoimmunerkrankungen. T-Zell-vermittelte Immunantworten werden im Allgemeinen durch Treg-basierte Regulationsmechanismen kontrolliert (39). Abhängig von der immunologischen Umgebung kommt es entweder zur Suppression oder Aktivierung der T-Zellen durch Treg. Unter physiologischen Bedingungen sind T-Zellen in der Lage, sich der Treg-vermittelten Kontrolle vorübergehend zu entziehen, um eine Schutzreaktion gegen einen infektiösen Erreger einzuleiten. In den letzten Jahren haben sich jedoch vermehrt Hinweise angesammelt, die aufzeigen, dass T-Zellen auch unter nicht-physiologischen Bedingungen die Treg-vermittelte Suppression überwinden und somit wesentlich zur Pathogenese von Autoimmunerkrankungen beitragen können (40). Dieser Mechanismus wird allgemein als Treg-Resistenz bezeichnet und wurde bereits in unterschiedlichen Autoimmunerkrankungen beobachtet (41, 42). In Studien von Trinschek *et al.* und Schneider *et al.* konnte 2013 erstmalig eine Treg-Resistenz in T-Zellen von RRMS-Patienten nachgewiesen werden (43, 44). Demnach sind isolierte CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T-Zellen

aus dem peripheren Blut von RRMS-Patienten durch eine reduzierte Sensitivität für die Treg-vermittelte Suppression gekennzeichnet.

Die Induktion einer Treg-Resistenz in T-Zellen ist auf den Einfluss verschiedener extrazellulärer und intrazellulärer Moleküle zurückzuführen (40). Charakteristisch für eine Vielzahl an Autoimmunerkrankungen ist eine Überproduktion an pro-inflammatorischen Zytokinen. IL-6 ist das prominenteste Zytokin, was eine Resistenz in T-Zellen gegen die Treg-vermittelte Suppression auslösen kann. Studien bestätigten bereits, dass erhöhte IL-6-Spiegel eine pathologische Rolle bei MS spielen (45). Isolierte T-Zellen aus dem peripheren Blut von RRMS-Patienten weisen eine beschleunigte IL-6-Produktion auf, die mit einer verminderten Supprimierbarkeit der T-Zellen korreliert (43). Zudem exprimieren Treg-resistente T-Zellen aus MS-Patienten eine erhöhte Menge des IL-6-Rezeptors (IL-6R). Die direkte Blockade des IL-6R durch einen anti-IL-6R-Antikörper führt zur Aufhebung der Treg-Resistenz in T-Zellen (43). Diese Erkenntnisse unterstreichen die Bedeutung von IL-6 und dessen Signalweg in der Induktion einer Treg-Resistenz. Isolierte T-Zellen aus dem ZNS von EAE-Mäusen produzieren ebenfalls hohe Mengen an IL-6 und sind zudem durch eine verminderte Empfindlichkeit für die Treg-vermittelte Suppression gekennzeichnet (46). Die Bindung von IL-6 an seinen Rezeptor führt zur Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors STAT3 (engl.: signal transducer and activator of transcription 3). In T-Zellen aus dem peripheren Blut von RRMS-Patienten konnten erhöhte Spiegel an phosphorylierten STAT3-Molekülen nachgewiesen werden, die mit dem Schweregrad der Erkrankung und einer verschlechterten Supprimierbarkeit von T-Zellen korrelierten (44, 47). Der gezielte Einsatz von STAT3-Inhibitoren stellte die Empfindlichkeit der T-Zellen für die Treg-vermittelte Suppression wieder her. Somit scheint die IL-6-vermittelte Phosphorylierung von STAT3 einen weiteren bedeutenden Faktor in der Induktion einer Treg-Resistenz darzustellen.

Die IL-6-STAT3-Signalübertragung leitet die Aktivierung einer zentralen Proteinkinase in den Zellen ein. Die Proteinkinase B (PKB/c-Akt) ist ein Schlüsselenzym in der Regulation wichtiger zellulärer Prozesse, wie z.B. Zellproliferation, Zellmetabolismus, Zellüberleben und Zytokinproduktion (48). Viele Autoimmunerkrankungen sind mit einer Hyperaktivierung der PKB/c-Akt assoziiert. Zudem wird der PKB/c-Akt eine entscheidende Rolle in der Induktion einer Treg-Resistenz zugeteilt. In einigen Studien konnte festgestellt werden, dass der gezielte

Knockout von Molekülen, die die PKB/c-Akt-Aktivierung negativ regulieren, zu einer deutlich verminderten Empfindlichkeit der T-Zellen für die Treg-vermittelte Suppression führt (49, 50). Auch in T-Zellen von RRMS-Patienten liegt eine Hyperaktivierung der PKB/c-Akt. Die verstärkte Aktivierung der PKB/c-Akt korreliert hierbei mit der Treg-Resistenz der T-Zellen. Dieser Zusammenhang wurde durch *in-vitro*-Untersuchungen mit spezifischen PKB/c-Akt-Inhibitoren belegt: Die Inkubation von T-Zellen aus MS-Patienten mit Akt-Inhibitor VIII kann die Treg-Resistenz aufheben und führt demnach zu einer Wiederherstellung der Empfänglichkeit für die Treg-vermittelte Suppression (43, 44). Die Faktoren, die nach dem bisherigen Stand der Forschung mit der Ausbildung einer Treg-Resistenz in T-Zellen von RRMS-Patienten in Verbindung gebracht werden können, sind in Abbildung 2 zusammengefasst.



**Abbildung 2: Die Treg-Resistenz in T-Zellen von RRMS-Patienten.**

T-Zellen aus dem peripheren Blut von RRMS-Patienten weisen eine beschleunigte IL-6-Produktion, erhöhte IL-6R-Expression und gesteigerte Phosphorylierung von STAT3 auf. Diese verstärkte IL-6-STAT3-Signalübertragung führt zu einer Hyperaktivierung von PKB/c-Akt. Das Zusammenspiel all dieser Faktoren resultiert in einer verminderten Empfindlichkeit der T-Zellen für die Treg-vermittelte Suppression, ein Phänomen, das als Treg-Resistenz bezeichnet wird.

Zusammenfassend lässt sich vermuten, dass die beschriebene Dysfunktion von Treg und die vorhandene Treg-Resistenz von T-Zellen aus dem peripheren Blut von RRMS-Patienten zwei entscheidende Mechanismen darstellen, die letztendlich zur Ausbildung der MS führen können. Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde die Thematik der Treg-Resistenz näher untersucht und weitere Schlüssel-moleküle identifiziert, die mit der Entstehung einer Treg-Resistenz in Verbindung gebracht werden können.



## 2 Materialien

### 2.1 Laborgeräte

| <i>Produktname</i>                             | <i>Hersteller/Lieferant</i>             |
|--|---|
| Brutschrank HERAcell 240i                      | Thermo Fisher Scientific,<br>Darmstadt  |
| ChemiDoc™ XRS+ Imaging System                  | Bio-Rad Laboratories, Feldkir-<br>chen  |
| Depletionsmagnet DYNAL™ Dynamag™-15            | Fisher Scientific, Schwerte             |
| Durchflusszytometer BD™ LSR II                 | BD Biosciences, Heidelberg              |
| Durchflusszytometer BD Accuri™ C6              | BD Biosciences, Heidelberg              |
| Flüssigszintillationszähler 1205 Betaplate®    | LKB, Brommar, Schweden                  |
| MACS® Zellseparator                            | Miltenyi Biotec, Bergisch Gla-<br>dbach |
| Mikroskop Axiovert 135                         | Carl Zeiss Microscopy, Jena             |
| Mikroskop SM-LUX für Zellzählungen             | Leica Microsystems, Wetzlar             |
| Mikroplattenphotometer Hidex Sense             | Hidex, Mainz                            |
| Nanodrop 2000c                                 | Thermo Fisher Scientific,<br>Darmstadt  |
| Nukleofektor™ 2b                               | Lonza, Verviers, Belgien                |
| NuPAGE® Bis-Tris-Gelelektrophorese Sys-<br>tem | Life Technologies, Darmstadt            |
| Rotor-Gene® Q, RT-PCR Cycler                   | Qiagen, Hilden                          |
| Sterile Werkbank HERAsafe®                     | Heraeus, Hanau                          |
| XCell II™ Western Blot System                  | Life Technologies, Darmstadt            |

|                            |  |
|----------------------------|--|
| Zentrifuge Biofuge Primo R | Thermo Fisher Scientific,<br>Darmstadt |
| Zentrifuge Multifuge 3L-R  | Heraeus, Hanau                         |

## 2.2 Verbrauchsmaterialien

---

| <i>Produktname</i>                           | <i>Hersteller/Lieferant</i>                  |
|--|--|
| 0,1 ml Reaktionsgefäß mit Deckel für qRT-PCR | Qiagen, Hilden                               |
| 1,5 ml Safe-Lock Reaktionsgefäß              | Eppendorf, Hamburg                           |
| 15 ml Röhrchen                               | Greiner Bio-One, Kremsmünster,<br>Österreich |
| 50 ml Röhrchen                               | Greiner Bio-One, Kremsmünster,<br>Österreich |
| 6/24/96-Well Platte, Flachboden              | Corning Life Science, New York,<br>USA       |
| 96-Well Platte, Rundboden                    | Greiner Bio-One, Kremsmünster,<br>Österreich |
| FACS-Röhrchen, Polystyrol                    | Fisher Scientific, Schwerte                  |
| Glasfaser-Filterpapier                       | PerkinElmer, Rodgau                          |
| MACS® LS Separationssäule                    | Miltenyi Biotec, Bergisch Glad-<br>bach      |
| NuPAGE® 4-12 % Bis-Tris Gel                  | Life Technologies, Darmstadt                 |
| Plastikbeutel für Filterpapier               | PerkinElmer, Rodgau                          |
| PVDF-Membran 0,45 µm                         | Life Technologies, Darmstadt                 |
| Zellsieb 70 µm                               | BD Biosciences, Heidelberg                   |

## 2.3 Medien, Puffer und Zusätze

---

### 2.3.1 Allgemeine Zellkultur

| <i>Produktname</i>        | <i>Hersteller/Lieferant</i>            |
|---------------------------|--|
| Biocoll Separationsmedium | Biochrom, Berlin                       |
| EDTA                      | Sigma-Aldrich, Taufkirchen             |
| Heparin, 25000 IE/5 ml    | LEO Pharma, Neu-Isenburg               |
| <sup>3</sup> H-Tdr        | PerkinElmer, Rodgau                    |
| PBS                       | Thermo Fisher Scientific,<br>Darmstadt |
| PBS/EDTA-Lösung           | selbst hergestellt, siehe 2.3.5        |
| PBS/Heparin-Lösung        | selbst hergestellt, siehe 2.3.5        |
| RPMI 1640                 | Thermo Fisher Scientific,<br>Darmstadt |
| Trypanblau                | Sigma-Aldrich, Taufkirchen             |
| X-VIVO 15                 | Lonza, Verviers, Belgien               |

### 2.3.2 Anreicherung und Depletion von Zellen

| <i>Produktname</i> | <i>Hersteller/Lieferant</i>              |
|--------------------|--|
| Depletionsmedium   | selbst hergestellt, siehe 2.3.5          |
| HSA, 20 %ig        | CSL Behring, Marburg                     |
| MACS-Puffer        | selbst hergestellt, siehe 2.3.5          |
| MEM                | Thermo Fisher Scientific, Darm-<br>stadt |

### 2.3.3 Durchflusszytometrie

| <i>Produktname</i>        | <i>Hersteller/Lieferant</i>         |
|---------------------------|-------------------------------------|
| ACK-Puffer                | selbst hergestellt, siehe 2.3.5     |
| Cytofix™-Puffer           | BD Biosciences, Heidelberg          |
| Cytofix/Cytoperm™ Puffer  | BD Biosciences, Heidelberg          |
| FACS-Puffer               | selbst hergestellt, siehe 2.3.5     |
| FoxP3 Staining Puffer     | Thermo Fisher Scientific, Darmstadt |
| Phosflow™ Perm Puffer III | BD Biosciences, Heidelberg          |
| Sandoglobulin®            | CSL Behring, Marburg                |

### 2.3.4 Gelelektrophorese und Western Blot

| <i>Produktname</i>                                | <i>Hersteller/Lieferant</i>         |
|---|-------------------------------------|
| Amersham ECL Prime Western Blot Detection Reagent | GE Healthcare, Freiburg             |
| BSA   | Sigma-Aldrich, Taufkirchen          |
| Cell Extraction Buffer                            | Thermo Fisher Scientific, Darmstadt |
| Methanol, zur Analyse EMSURE®                     | Merck, Darmstadt                    |
| NuPAGE® Antioxidant                               | Life Technologies, Darmstadt        |
| NuPAGE® LDS Sample Buffer                         | Life Technologies, Darmstadt        |
| NuPAGE® MOPS SDS Running Buffer                   | Life Technologies, Darmstadt        |
| NuPAGE® Sample Reducing Agent                     | Life Technologies, Darmstadt        |
| NuPAGE® Transfer Buffer                           | Life Technologies, Darmstadt        |
| PMSF  | Thermo Fisher Scientific, Darmstadt |

---

|  |                                     |
|--|-------------------------------------|
| Protease Inhibitor Cocktail            | Sigma-Aldrich, Taufkirchen          |
| Restore™ Western Blot Stripping Buffer | Thermo Fisher Scientific, Darmstadt |
| TBST-Puffer                            | selbst hergestellt, siehe 2.3.5     |

### 2.3.5 Selbsthergestellte Puffer

#### ACK-Puffer

|                           |                  |
|---------------------------|------------------|
| 0,15 M NH <sub>4</sub> Cl | Merck, Darmstadt |
| 1 mM KHCO <sub>3</sub>    | Merck, Darmstadt |
| 0,5 mM EDTA               |                  |

#### Depletionsmedium

MEM  
2 % HSA

#### FACS-Puffer

1x PBS  
0,5 % HSA  
1 mM EDTA  
10 µg/ml Sandoglobulin

#### MACS-Puffer

1x PBS  
0,5 % HSA  
3 mM EDTA

#### PBS/EDTA-Lösung

1x PBS  
1 mM EDTA

#### PBS/Heparin-Lösung

1x PBS  
0,2 % Heparin

#### TBST-Puffer

|                      |                            |
|----------------------|----------------------------|
| 20 mM Tris           | Merck, Darmstadt           |
| 150 mM NaCl          |                            |
| 0,1 % (w/v) Tween-20 | Sigma-Aldrich, Taufkirchen |

## 2.4 Gebrauchsfertige Reagenzien und Kits

---

### 2.4.1 Anreicherung und Depletion von Zellen

| <i>Produktname</i>                           | <i>Hersteller/Lieferant</i>         |
|--|-------------------------------------|
| Anti-human CD4-Microbeads                    | Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach  |
| CD4 <sup>+</sup> T Cell Isolation Kit, human | Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach  |
| Anti-human CD25-Microbeads                   | Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach  |
| Anti-human CD3-Dynabeads                     | Thermo Fisher Scientific, Darmstadt |
| Anti-human CD8-Dynabeads                     | Thermo Fisher Scientific, Darmstadt |
| Anti-human CD14-Dynabeads                    | Thermo Fisher Scientific, Darmstadt |
| Anti-human CD19-Dynabeads                    | Thermo Fisher Scientific, Darmstadt |
| Anti-human CD25-Dynabeads                    | Thermo Fisher Scientific, Darmstadt |

### 2.4.2 Durchflusszytometrie

| <i>Produktname</i>                             | <i>Hersteller/Lieferant</i>         |
|--|-------------------------------------|
| CBA Human Soluble Protein Master Buffer Kit    | BD Biosciences, Heidelberg          |
| CBA Human IFN- $\gamma$ Flex Set               | BD Biosciences, Heidelberg          |
| CBA Human TNF- $\alpha$ Flex Set               | BD Biosciences, Heidelberg          |
| CBA Human IL-6 Flex Set                        | BD Biosciences, Heidelberg          |
| FoxP3/Transcription Factor Staining Buffer Set | Thermo Fisher Scientific, Darmstadt |

### 2.4.3 Molekularbiologische Analysen

| <i>Produktname</i>                                | <i>Hersteller/Lieferant</i>         |
|---|-------------------------------------|
| AllStars Negative Control siRNA                   | Qiagen, Hilden                      |
| Human T cell Nucleofector Kit                     | Lonza, Verviers, Belgien            |
| AllStars Negative Control siRNA                   | Qiagen, Hilden                      |
| peqGold Micro RNA Kit                             | VWR, Darmstadt                      |
| iScript™ cDNA Synthesis Kit                       | Bio-Rad Laboratories, Feldkirchen   |
| PTEN QuantiTect Primer Assay<br>(Hs_PTEN_1_SG)    | Qiagen, Hilden                      |
| EEF1A QuantiTect Primer Assay<br>(Hs_EEF1A1_2_SG) | Qiagen, Hilden                      |
| IL-6 QuantiTect Primer Assay<br>(Hs_IL6_1_SG)     | Qiagen, Hilden                      |
| QuantiTect SYBR® Green PCR Kit                    | Qiagen, Hilden                      |
| Micro BCA™ Protein Assay Kit                      | Thermo Fisher Scientific, Darmstadt |

## 2.5 Antikörper und weitere Proteine

---

### 2.5.1 Antikörper für Durchflusszytometrie

| <i>Produktname</i>              | <i>Klon</i> | <i>Hersteller/Lieferant</i>        |
|---------------------------------|-------------|------------------------------------|
| Anti-human CD3 FITC,<br>PE, APC | UCHT1       | BD Biosciences, Heidelberg         |
| Anti-human CD4 PE-              | RPA-T4      | BD Biosciences, Heidelberg         |
| Anti-human CD4 PE-<br>Vio770    | M-T466      | Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach |

|                                     |        |                                    |
|-------------------------------------|--------|------------------------------------|
| Anti-human CD8 APC                  | RPA-T8 | BD Biosciences, Heidelberg         |
| Anti-human CD8<br>PerCP-Cy5.5       | SK1    | BD Biosciences, Heidelberg         |
| Anti-human CD14 FITC,<br>APC        | M5E2   | BD Biosciences, Heidelberg         |
| Anti-human CD19 FITC,<br>PE         | HIB19  | BD Biosciences, Heidelberg         |
| Anti-human CD25 Vio-<br>Bright-FITC | 4E3    | Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach |
| Anti-human CD45 APC                 | HI30   | BD Biosciences, Heidelberg         |
| Anti-human FoxP3 PE                 | 259D   | Biolegend, San Diego, USA          |
| Anti-human IL-6R APC                | REA291 | Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach |
| Anti-human IFN- $\gamma$ PE-<br>Cy7 | B27    | BD Biosciences, Heidelberg         |
| Anti-Akt (pS473) PE                 | M89-61 | BD Biosciences, Heidelberg         |
| Anti-Ki-67 APC                      | REA183 | Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach |

### 2.5.2 Antikörper und weitere Proteine für T-Zell-Stimulation

| <i>Produktname</i>             | <i>Klon</i>                  | <i>Hersteller/Lieferant</i>                  |
|--------------------------------|------------------------------|--|
| Anti-human CD3                 | OKT-3                        | Bio X Cell, West Lebanon, USA                |
| Anti-human CD28                | CD28.2                       | BD Biosciences, Heidelberg                   |
| B.63521_D11gp120mutC           | Produziert<br>in CHO<br>DG44 | Duke Human Vaccine Institute,<br>Durham, USA |
| Rekombinantes IL-6, hu-<br>man |                              | CellGenix, Freiburg                          |



### 2.5.3 Antikörper für Western-Blot

| <i>Produktname</i>                | <i>Klon</i> | <i>Hersteller/Lieferant</i>              |
|-----------------------------------|-------------|--|
| Mouse anti-phospho-PKB/Akt (S473) | 11E6        | Nanotools, Teningen                      |
| Rabbit anti-Akt (pan)             | C67E7       | Cell Signaling Technology, Frankfurt     |
| Rabbit anti- $\beta$ -Aktin       | 13E5        | Cell Signaling Technology, Frankfurt     |
| Rabbit anti-PGC-1 $\alpha$        | polyklonal  | Novus Biologicals, Centennial, USA       |
| Rabbit anti-PTEN,                 | 138G6       | Cell Signaling Technology, Frankfurt     |
| Anti-rabbit IgG (HRP)             | polyklonal  | Cell Signaling Technology, Frankfurt     |
| Anti-mouse IgG (HRP)              | polyklonal  | Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich |

## 3 Methoden

### 3.1 MS-Patienten und gesunde Spender

Im Rahmen dieser Promotionsarbeit wurde das Blut von insgesamt 52 unbehandelten Patienten mit einer schubförmig remittierenden MS (engl.: relapsing-remitting multiple sclerosis, RRMS) im Alter von 18-64 Jahren, 6 Patienten mit einem klinisch isolierten Syndrom (engl.: clinically isolated syndrome, CIS) sowie 25 RRMS-Patienten nach Tecfidera-Therapie (Alter 19-54 Jahre) analysiert (Tabelle 1). Alle Patienten wurden nach den ethischen Richtlinien der Deklaration von Helsinki und der zuständigen Ethikkommission (Landesärztekammer Rheinland-Pfalz Nr. 837.019.10 (7028), genehmigt am 4. März 2010) aufgeklärt. Vor der Studienteilnahme gaben allen Patienten eine schriftliche Einverständniserklärung ab. Die Blutentnahme erfolgte im Rahmen der Routinediagnostik. Unbehandelte MS-Patienten erhielten mindestens 6 Monate vor Blutentnahme keine Behandlung mit Kortison oder alternativen Kortikosteroiden. 3 Probanden waren zum Zeitpunkt der Blutentnahme therapienaiv (Erstdiagnose MS). PBMC von freiwilligen gesunden Spendern wurden bei den jeweiligen Analysen als Kontrolle mitgeführt. Alle PBMC wurden innerhalb von 12 Stunden nach Blutentnahme mittels Dichtegradientenzentrifugation isoliert.

**Tabelle 1: Klinische Merkmale der MS-Patienten.**

| Geschlecht | Alter | Verlauf | Dauer in Jahren | EDSS | Stadium   | Behandlung |
|------------|-------|---------|-----------------|------|-----------|------------|
| F          | 64    | RRMS    | 0.2             | 2.0  | Schub     | Ø          |
| F          | 56    | RRMS    | 6.8             | 2.0  | Remission | Ø          |
| F          | 52    | RRMS    | 1.3             | 1.5  | Remission | Ø          |
| F          | 41    | RRMS    | 0.6             | 3.0  | Remission | Ø          |
| F          | 28    | RRMS    | 4.6             | 3.0  | Schub     | Ø          |
| F          | 64    | RRMS    | 3.0             | 3.0  | Remission | Ø          |
| F          | 19    | RRMS    | 9.2             | 1.0  | Schub     | Ø          |
| F          | 42    | CIS     | 1.2             | 2.0  | Remission | Ø          |

---

|   |    |      |      |     |           |   |
|---|----|------|------|-----|-----------|---|
| F | 22 | RRMS | 5.0  | 1.0 | Schub     | Ø |
| F | 24 | RRMS | 0.3  | 1.0 | Remission | Ø |
| F | 49 | CIS  | 1.1  | 2.0 | Remission | Ø |
| F | 42 | CIS  | 1.3  | 2.0 | Remission | Ø |
| F | 34 | RRMS | 6.1  | 1.0 | Remission | Ø |
| F | 41 | RRMS | 0.5  | 1.0 | Remission | Ø |
| F | 51 | RRMS | 5.3  | 3.5 | Remission | Ø |
| F | 38 | RRMS | 13.2 | 1.0 | Schub     | Ø |
| F | 56 | RRMS | 15.2 | 3.0 | Schub     | Ø |
| F | 52 | RRMS | 2.5  | 1.0 | Remission | Ø |
| F | 49 | RRMS | 5.5  | 1.0 | Remission | Ø |
| F | 45 | RRMS | 12.5 | 2.0 | Remission | Ø |
| F | 20 | RRMS | 0.1  | 0.0 | Remission | Ø |
| F | 18 | RRMS | 2.2  | 2.0 | Schub     | Ø |
| F | 25 | RRMS | 0.0  | 2.0 | Schub     | Ø |
| F | 31 | RRMS | 8.4  | 7.5 | Remission | Ø |
| F | 28 | RRMS | 0.1  | 1.5 | Schub     | Ø |
| F | 21 | RRMS | 0.0  | 2.0 | Schub     | Ø |
| F | 55 | RRMS | 2.7  | 3.0 | Remission | Ø |
| F | 37 | RRMS | 0.8  | 0.0 | Remission | Ø |
| F | 36 | RRMS | 0.1  | 2.0 | Remission | Ø |
| F | 30 | RRMS | 4.6  | 1.0 | Remission | Ø |
| F | 52 | RRMS | 9.4  | 1.0 | Schub     | Ø |
| F | 34 | RRMS | 10.2 | 1.0 | Remission | Ø |
| F | 40 | CIS  | 2.1  | 2.0 | Schub     | Ø |
| F | 68 | RRMS | 23.7 | 2.0 | Remission | Ø |
| F | 29 | RRMS | 0.0  | 0.0 | Schub     | Ø |

---

---

|   |    |      |      |     |           |            |
|---|----|------|------|-----|-----------|------------|
| M | 58 | RRMS | 0.4  | 1.0 | Remission | Ø          |
| M | 23 | RRMS | 0.7  | 2.0 | Remission | Ø          |
| M | 41 | RRMS | 9.0  | 2.0 | Schub     | Ø          |
| M | 45 | RRMS | 24.1 | 3.0 | Remission | Ø          |
| M | 35 | RRMS | 18.2 | 1.0 | Remission | Ø          |
| M | 45 | RRMS | 15.3 | 1.0 | Remission | Ø          |
| M | 46 | RRMS | 5.4  | 1.0 | Schub     | Ø          |
| M | 50 | RRMS | 0.3  | 2.0 | Schub     | Ø          |
| M | 30 | RRMS | 0.2  | 0.0 | Remission | Ø          |
| M | 24 | RRMS | 1.3  | 0.0 | Remission | Ø          |
| M | 25 | RRMS | 0.2  | 1.0 | Schub     | Ø          |
| M | 30 | CIS  | 11.0 | 0.0 | RRMS      | Ø          |
| M | 39 | RRMS | 0.2  | 0.0 | Schub     | Ø          |
| M | 35 | CIS  | 0.1  | 1.0 | Schub     | Ø          |
| M | 27 | RRMS | 1.5  | 6.0 | Schub     | Ø          |
| M | 54 | RRMS | 2.0  | 2.0 | Schub     | Ø          |
| M | 36 | RRMS | 0.1  | 2.0 | Schub     | Ø          |
| M | 25 | RRMS | 0.2  | 1.0 | Schub     | Ø          |
| M | 56 | RRMS | 18.1 | 5.0 | Schub     | Ø          |
| M | 29 | RRMS | 11.1 | 0.5 | Schub     | Ø          |
| M | 27 | RRMS | 0.1  | 1.5 | Schub     | Ø          |
| M | 23 | RRMS | 0.3  | 1.0 | Schub     | Ø          |
| M | 43 | RRMS | 0.6  | 2.0 | Schub     | Ø          |
| F | 46 | RRMS | 22.9 | 5.0 | Remission | Tecfidera® |
| F | 46 | RRMS | 2.8  | 1.0 | Remission | Tecfidera® |
| F | 33 | RRMS | 3.7  | 4.5 | Remission | Tecfidera® |
| F | 43 | RRMS | 21.9 | 2.5 | Remission | Tecfidera® |

---

|   |    |      |      |     |           |            |
|---|----|------|------|-----|-----------|------------|
| F | 42 | RRMS | 3.1  | 0.0 | Remission | Tecfidera® |
| F | 51 | RRMS | 14.0 | 1.0 | Remission | Tecfidera® |
| F | 31 | RRMS | 4.4  | 4.0 | Remission | Tecfidera® |
| F | 54 | RRMS | 2.5  | 1.0 | Remission | Tecfidera® |
| F | 52 | RRMS | 20.1 | 2.0 | Remission | Tecfidera® |
| F | 26 | RRMS | 11.1 | 2.0 | Remission | Tecfidera® |
| F | 22 | RRMS | 3.7  | 0.0 | Remission | Tecfidera® |
| F | 30 | RRMS | 1.6  | 0.0 | Remission | Tecfidera® |
| F | 36 | RRMS | 3.3  | 1.0 | Remission | Tecfidera® |
| F | 20 | RRMS | 1.7  | 0.0 | Remission | Tecfidera® |
| F | 36 | RRMS | 11.4 | 3.0 | Remission | Tecfidera® |
| M | 29 | RRMS | 7.9  | 0.0 | Remission | Tecfidera® |
| M | 30 | RRMS | 0.7  | 1.0 | Schub     | Tecfidera® |
| M | 33 | RRMS | 5.7  | 0.0 | Remission | Tecfidera® |
| M | 23 | RRMS | 0.8  | 2.0 | Remission | Tecfidera® |
| M | 19 | RRMS | 1.6  | 0.0 | Remission | Tecfidera® |
| M | 26 | RRMS | 2.4  | 0.0 | Remission | Tecfidera® |
| M | 32 | RRMS | 8.3  | 1.0 | Schub     | Tecfidera® |
| M | 26 | RRMS | 3.1  | 3.0 | Remission | Tecfidera® |
| M | 38 | RRMS | 6.2  | 1.0 | Remission | Tecfidera® |
| M | 50 | RRMS | 18.4 | 6.0 | Remission | Tecfidera® |

Die Tabelle fasst die klinischen Merkmale aller MS-Patienten zusammen, die zwischen 2016 und 2019 im Rahmen dieser Promotionsarbeit untersucht wurden. Insgesamt wurden PBMC von 52 unbehandelte RRMS-Patienten (Alter 18-64 Jahre), 6 Patienten mit einem klinisch isolierten Syndrom (CIS) sowie 25 RRMS-Patienten nach Tecfidera-Therapie (Alter 19-54 Jahre) in dieser Studie verwendet. Unbehandelte MS-Patienten erhielten mindestens 6 Monate vor Blutentnahme keine Behandlung mit Kortison oder alternativen Kortikosteroiden. 3 Probanden waren zum Zeitpunkt der Blutentnahme therapienaiv (Erstdiagnose MS).

## 3.2 Zellkulturtechniken

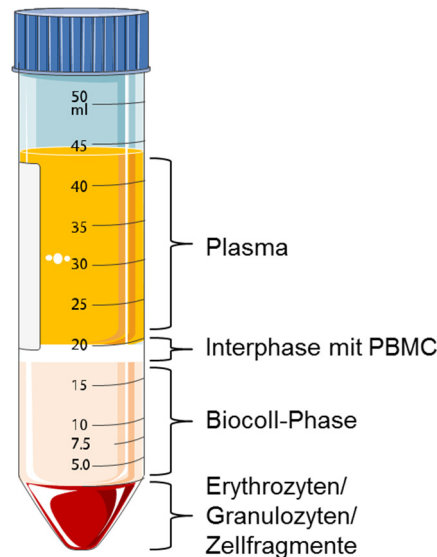
---

### 3.2.1 Kulturmedien und Kulturbedingungen

Alle Zellkulturarbeiten wurden an einer sterilen Werkbank durchgeführt. Die verwendeten Zellkulturmedien wurden steril von den entsprechenden Firmen bezogen. Selbsthergestellte Medien und Puffer wurden vor Gebrauch sterilfiltriert (0,2 µm). Die Kultivierung der Zellen erfolgte im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>-Gehalt in gesättigter Wasserdampf-atmosphäre. Als Standardmedium zur Kultivierung humaner PBMC und isolierter Zellpopulationen wurde X-VIVO 15 verwendet.

### 3.2.2 Gewinnung humaner PBMC aus Buffy-Coats oder Vollblut mittels Dichtegradientenzentrifugation

Periphere mononukleäre Zellen (engl.: peripheral blood mononuclear cells, PBMC) wurden mittels Dichtegradientenzentrifugation aus Buffy-Coats oder heparinisiertem Vollblut gewonnen. Sämtliche Buffy-Coats wurden von der Bluttransfusionszentrale der Universitätsmedizin Mainz bezogen. Zur Gewinnung der PBMC wurde in einem ersten Schritt der Buffy-Coat (ca. 80 ml) mit einer PBS/Heparin-Lösung auf ein Volumen von 120 ml aufgefüllt. Anschließend wurden in vier 50 ml Röhren je 15 ml des Separationsmediums Biocoll vorgelegt und vorsichtig mit je 30 ml der Zellsuspension überschichtet. Zur Gewinnung der PBMC aus heparinisiertem Vollblut wurde der gesamte Spritzeninhalt (ca. 20 ml) unverdünnt auf 15 ml Biocoll geschichtet. Biocoll ist eine isotonische Lösung mit einer mittleren Dichte von 1,077 g/ml. Es ermöglicht die Auftrennung der PBMC in plasmatische und zelluläre Bestandteile entsprechend ihrer spezifischen Dichte. Erythrozyten und Granulozyten besitzen eine höhere Dichte als das Separationsmedium, während mononukleäre Zellen wie Lymphozyten oder Monozyten eine geringere Dichte aufweisen. Im Anschluss erfolgte eine Zentrifugation für 30 min bei 800 x g (ohne Bremse) bei 21 °C. Hierbei wurde die Blutprobe in vier verschiedene Phasen aufgetrennt: eine obere Phase bestehend aus Blutplasma, eine Interphase mit PBMC, eine Biocoll-Phase und eine untere Phase mit Erythrozyten, Granulozyten und Zellfragmenten (Abbildung 3).



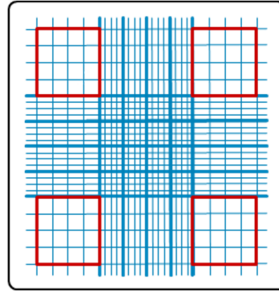
**Abbildung 3: Gewinnung humaner PBMC mittels Dichtegradientenzentrifugation.**

Die Dichtegradientenzentrifugation erlaubt die Trennung der PBMC von plasmatischen Bestandteilen, Erythrozyten und Granulozyten. Nach erfolgreicher Zentrifugation erhält man vier Phasen: Die PBMC sammeln sich entsprechend ihrer spezifischen Dichte in der Interphase zwischen Plasma und Biocoll an. Das Zellsediment bilden Erythrozyten, Granulozyten und Zellfragmente.

Die Interphase wurde vorsichtig mit einer Glaspipette entnommen und in ein neues 50 ml Röhrchen überführt. Die darin enthaltenen PBMC wurden anschließend dreimal mit einer PBS/EDTA-Lösung gewaschen (350 x g, 6 min, 4 °C). Nach der letzten Zentrifugation wurde der Überstand vollständig abgenommen und das Zellpellet vorsichtig in X-VIVO 15 resuspendiert.

### 3.2.3 Bestimmung der Lebendzellzahl

Zur Ermittlung der Lebendzellzahl wurde der Vitalfarbstoff Trypanblau verwendet. Abgestorbene und perforierte Zellen nehmen diesen Farbstoff auf und werden dadurch dunkelblau gefärbt. Lebende Zellen nehmen diese Substanz nicht auf. Die Zellzahl wurde nach Färbung mit einer 0,4 %igen Trypanblaulösung mithilfe einer Neubauer-Zählkammer ermittelt. Sie besteht aus vier großen Außenquadraten (rot gerahmt), die sich nochmals in 16 Einzelquadrate untergliedern (Abbildung 4).



**Abbildung 4: Aufbau einer Neubauer-Zählkammer.**

Die Neubauer-Zählkammer ist in vier große Außenquadrate (rot gerahmt) aufgeteilt, die sich nochmals in 16 Einzelquadrate untergliedern. Zur Bestimmung der Lebendzellzahl wurden die Zellen in zwei Außenquadranten gezählt, der Mittelwert gebildet und die Zellzahl mit der entsprechenden Formel berechnet.

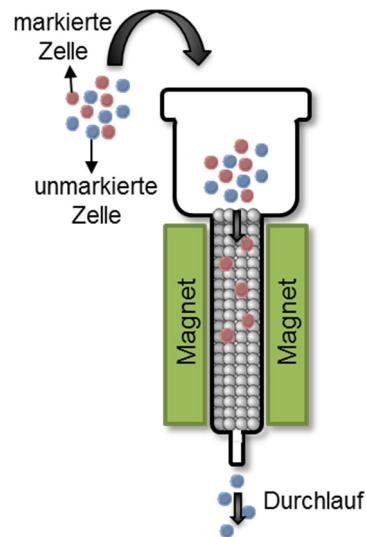
Für die Bestimmung der Lebendzellzahl wurden die Zellen innerhalb von zwei Außenquadranten gezählt. Tote Zellen konnten aufgrund einer Blaufärbung mit dem Vitalitätsfarbstoff Trypanblau ausgeschlossen werden. Die Zellzahlen beider Quadrate wurden addiert, der Mittelwert bestimmt und die Gesamtzellzahl mittels folgender Formel berechnet:

$$\text{Zellzahl} = \text{Mittelwert} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times \text{Volumen (ml)} \times 10^4 \text{ (Kammerkonstante)}$$

### 3.2.4 Isolierung von T-Zellpopulationen aus PBMC

Die in dieser Arbeit verwendeten T-Zellpopulationen wurden mittels magnetischer Zellseparation (engl.: magnetic activated cell sorting, MACS) aus frisch isolierten PBMC angereichert. Das Prinzip dieser Methode beruht auf dem Einsatz magnetischer Eisenoxidpartikel, die auf ihrer Oberfläche mit einem Antikörper modifiziert sind (Microbeads). Diese Microbeads können spezifisch an Oberflächenmoleküle binden, die von den jeweiligen Zelltypen exprimiert werden („Markierung“). Das Zellgemisch, bestehend aus Microbead-markierten und unmarkierten Zellen, wird über eine Separationssäule gegeben, die von einem starken Magnetfeld umgeben ist. Unmarkierte Zellen können diese Separationssäule ungehindert passieren (Durchlauf), während markierte Zellen durch das starke Magnetfeld in der Säule zurückgehalten werden (Abbildung 5). Die zurückgebliebenen Zellen können außerhalb des Magnetfeldes herausgespült werden (Eluat).





**Abbildung 5: Schematische Darstellung der magnetischen Zellseparation.**

Die Zellsuspension wird mit Antikörper-modifizierten paramagnetischen Eisenpartikeln (Microbeads) inkubiert. Die Microbeads binden spezifisch an Oberflächenmoleküle der Zielzelle („Markierung“). Das Zellgemisch wird anschließend über eine Separationssäule gegeben, die von einem starken Magnetfeld umgeben ist. Markierte Zellen (rot) werden in der Säule zurückgehalten, unmarkierte Zellen (blau) können die Säule ungehindert passieren.

### 3.2.4.1 Isolierung von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatorischen T-Zellen

Die Positivanreicherung regulatorischer T-Zellen (Treg) aus frisch isolierten PBMC erfolgte mittels CD25-Microbeads. Alle Schritte wurden mit gekühlten Puffern durchgeführt. Die PBMC wurden zunächst in einem definierten Volumen an MACS-Puffer (10 µl MACS-Puffer pro 10<sup>7</sup> PBMC) aufgenommen. Anschließend wurden die Zellen mit einer limitierten Menge an CD25-Microbeads (1 µl Microbeads pro 10<sup>7</sup> PBMC) für 20 min bei 4 °C unter leichtem Schwenken inkubiert. Nicht gebundene Microbeads wurden im Anschluss durch einmaliges Waschen mit 50 ml MACS-Puffer (350 x g, 6 min, 4 °C) entfernt. Nach dem Waschen wurden die Zellen mit MACS-Puffer auf eine Zelldichte von 2x10<sup>8</sup> PBMC/ml eingestellt und auf eine Separationssäule gegeben. Die Säule wurde mit insgesamt 20 ml MACS-Puffer gespült und die gebundenen Zellen im Anschluss zweimal mit 5 ml MACS-Puffer eluiert.

Zur Entfernung von kontaminierenden CD8<sup>+</sup> T-Zellen, CD14<sup>+</sup> Monozyten und CD19<sup>+</sup> B-Zellen wurden die angereicherten CD25<sup>+</sup> Zellen in 3 ml Depletionsmedium mit anti-CD8- (2 Beads/Zelle), anti-CD14- (1 Bead/Zelle) und anti-CD19-Dynabeads (2 Beads/Zelle) unter leichtem Schwenken für 20 min bei 4 °C inkubiert. Die anschließende Depletion der kontaminierenden Zellen erfolgte im

Depletionsmagneten. Hierfür wurde die Zellsuspension mit Depletionsmedium auf 8 ml aufgefüllt und in einen Depletionsmagneten gestellt. Die nicht gebundenen Zellen im Überstand wurden vorsichtig mit einer Glaspipette abgenommen und in ein frisches Röhrchen überführt. Der Vorgang wurde zweimal mit frischem Depletionsmedium wiederholt und die Reinheit der CD25<sup>+</sup> Zellen im Anschluss durchflusszytometrisch bestimmt. Die durchschnittliche Reinheit CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg lag bei >85 %.

#### **3.2.4.2 Positivanreicherung von CD4<sup>+</sup> T-Zellen**

Die Anreicherung CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus frisch isolierten PBMC erfolgte analog zu 3.2.4.1 mit 1-5 µl CD4-Microbeads pro 10<sup>7</sup> PBMC. Die durchschnittliche Reinheit der CD4<sup>+</sup> T-Zellen lag bei >95 %.

#### **3.2.4.3 Negativanreicherung von CD4<sup>+</sup> T-Zellen**

Das Prinzip der Negativanreicherung beruht darauf, alle Zellen außer den CD4<sup>+</sup> T-Zellen innerhalb der PBMC mittels Antikörper-modifizierter Microbeads zu markieren und mit Hilfe der Separationssäule von den T-Zellen abzutrennen. Hierfür wurde das CD4<sup>+</sup> T cell Isolation Kit verwendet. Die Anreicherung erfolgte nach Herstellerprotokoll. Frisch isolierte PBMC wurden in einem definierten Volumen MACS-Puffer (40 µl MACS-Puffer pro 10<sup>7</sup> PBMC) aufgenommen. Pro 10<sup>7</sup> PBMC wurden 10 µl eines Biotin-Antikörper-Cocktails zu den Zellen gegeben und anschließend für 5 min bei 4 °C inkubiert. Dieser Cocktail enthielt verschiedene biotinylierte Antikörper, welche alle Zellen außer den CD4<sup>+</sup> T-Zellen markierten. Nach der Inkubation erfolgte eine weitere Zugabe von MACS-Puffer (30 µl MACS-Puffer pro 10<sup>7</sup> PBMC) zusammen mit einem definierten Volumen eines Microbead-Cocktails (20 µl Microbeads pro 10<sup>7</sup> PBMC). Die Zellsuspension wurde durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren gut durchmischt und anschließend für 10 min bei 4 °C inkubiert. Im Anschluss wurde die Zellsuspension direkt (ohne Waschen) auf eine Separationssäule gegeben und der Durchlauf, welcher die unmarkierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen enthielt, aufgefangen.

#### **3.2.5 CD25-Depletion von PBMC und CD4<sup>+</sup> T-Zellen**

Für einen Großteil der Experimente wurden Treg-depletierte PBMC und CD4<sup>+</sup> T-Zellen benötigt. Die Depletion der intrinsischen Treg wurde mit CD25-Dynabeads

durchgeführt. PBMC oder frisch isolierte CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurden in 3 ml Depletionsmedium mit CD25-Dynabeads (0,5 Beads/Zelle) aufgenommen und unter leichtem Schwenken für 20 min bei 4 °C inkubiert. Im Anschluss wurde die Zellsuspension mit Depletionsmedium auf 8 ml aufgefüllt und in einen Depletionsmagneten gestellt. Die anschließende Depletion erfolgte analog zu 3.2.4.1.

### 3.2.6 *In-vitro*-Suppressionsassay

CD25-depletierte PBMC ( $10^5$  Zellen/Well in einer 96-Well Platte) von gesunden Spendern, unbehandelten MS-Patienten oder MS-Patienten nach DMF-Therapie wurden mit Treg eines unabhängigen gesunden Spenders kokultiviert und mit 0,1 µg/ml anti-CD3 mAk stimuliert. Die Stimulation der PBMC ohne Treg diente als Kontrolle. Nach drei Tagen wurde der Kultur für 16 h Tritium-markiertes Thymidin (<sup>3</sup>H-Tdr) zugesetzt (37 kBq/Well, entsprach einem Tropfen einer 1:10 verdünnten <sup>3</sup>H-Tdr-Lösung). <sup>3</sup>H-Tdr wird in die DNA der sich teilenden T-Zellen eingebaut und diente hierbei als ein Maß für die Proliferation. Der Einbau von <sup>3</sup>H-Tdr konnte anschließend im Flüssigszintillationszähler gemessen werden. Als Ergebnisse erhielt man Zahlenwerte mit der Einheit „counts per minute“ (cpm), die ein Maß für die Zellteilungsrate der proliferierenden T-Zellen darstellten. Alle Ansätze wurden in Triplikaten bestimmt.

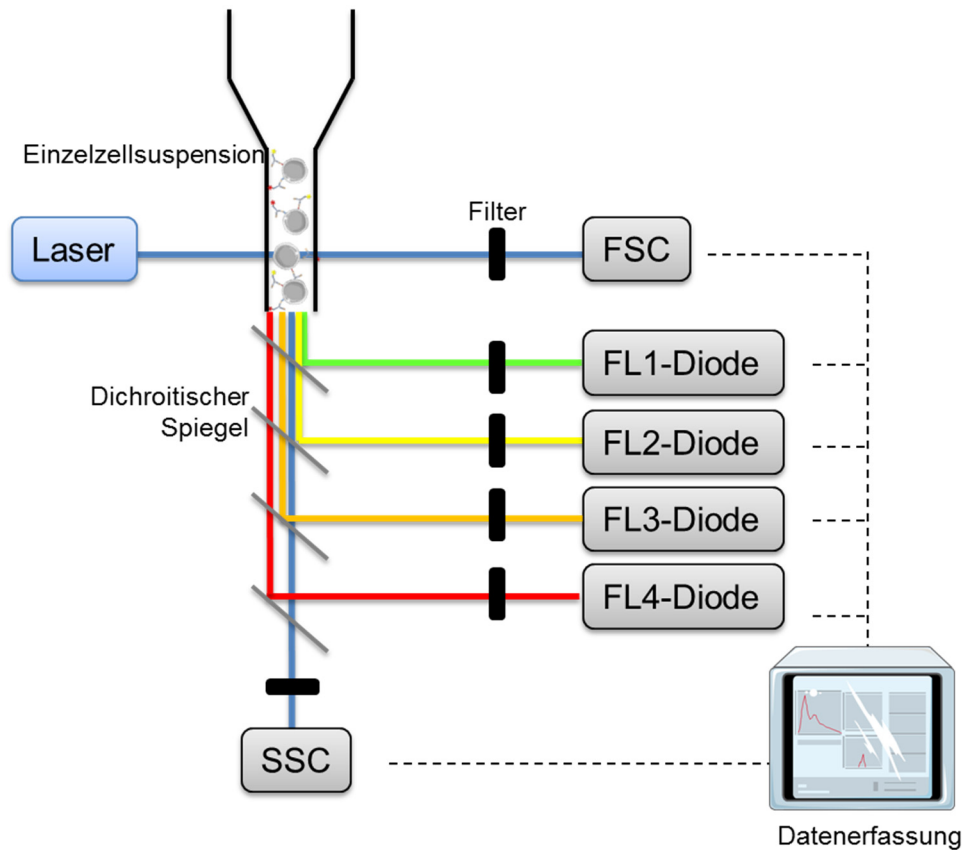
Für manche Versuche wurden frisch isolierte CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T-Zellen mit 0,1 µg/ml anti-CD3 mAk in An- oder Abwesenheit von Treg eines unabhängigen zweiten gesunden Spenders aktiviert. CD3-depletierte PBMC ( $5 \times 10^4$ /Well) wurden hierfür als Kostimulus eingesetzt.

## 3.3 Durchflusszytometrische Analysen

---

### 3.3.1 Grundlagen der Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist ein Verfahren zur phänotypischen Charakterisierung von Zellen in einem Flüssigkeitsstrom. Die Zellen werden hierfür mit Fluoreszenzfarbstoff-markierten Antikörpern, beispielsweise gegen spezifische Oberflächmoleküle, inkubiert und anschließend in einem Durchflusszytometer auf Einzelzellebene analysiert. Bei der Messung gelangen die Zellen zunächst über eine Kapillare als Einzelzellsuspension in das Zytometer (Abbildung 6). Dort passieren sie einzeln einen fokussierten monochromatischen Laserstrahl, wodurch zum einen Licht gestreut und zum anderen über die Antikörper-gekoppelten Fluoreszenzfarbstoffe Licht emittiert wird. Innerhalb des Streulichts wird zwischen Vorwärtsstreulicht (engl.: Forward Scatter, FSC) und Seitwärtsstreulicht (engl.: Side Scatter, SSC) unterschieden. FSC stellt ein Maß für die relative Größe der Zelle dar, wohingegen SSC von deren Granularität beeinflusst wird. Durch den monochromatischen Laserstrahl werden Elektronen des Fluoreszenzfarbstoffes auf ein höheres Energieniveau angeregt. Beim Rückfall in den Grundzustand wird Energie einer spezifischen Wellenlänge (in Form von Photonen) emittiert. Jeder einzelne Fluoreszenzfarbstoff besitzt hierbei sein eigenes charakteristisches Emissionsspektrum. Aufgrund dessen können in einer Messung verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe gleichzeitig eingesetzt werden. Die Intensität der Fluoreszenzemissionen wird durch verschiedene Photodioden (FL1-FL4) erfasst und quantifiziert. Die durchflusszytometrischen Messungen im Rahmen dieser Arbeit erfolgten am Accuri™ C6 bzw. am LSR II (BD Biosciences). Die einzelnen Messdaten wurden mittels FlowJo V7.6.4 und BD Accuri™ C6 Software ausgewertet.



**Abbildung 6: Schematische Darstellung eines Durchflusszytometers.**

In der Durchflusskammer des Zytometers werden die Zellen in einer Linie angeordnet (Einzelzell-Analyse). Die Zellen werden einzeln von einem Laser beleuchtet. Hierbei werden sowohl gestreutes Laserlicht (FSC und SSC) als auch Fluoreszenzemissionen der fluoreszenzmarkierten Antikörper erfasst. Die Menge an Streulicht und Intensität der Fluoreszenzemissionen werden von den entsprechenden Photodioden erfasst und quantifiziert.

### 3.3.2 Färbung von Oberflächenmolekülen

Für die spezifische Färbung von Oberflächenmolekülen mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern wurden durchschnittlich  $2 \times 10^5$  Zellen pro Färbung eingesetzt. Die Zellen wurden in einer 96-Well Platte mit Rundboden ausplattiert und einmal mit 200  $\mu$ l kaltem FACS-Puffer gewaschen (350 x g, 3 min, 4 °C). Anschließend erfolgte eine Inkubation mit 20  $\mu$ l eines Antikörper-Cocktails (Endkonzentration der jeweiligen Antikörper: 5  $\mu$ g/ml, verdünnt in FACS-Puffer) für 20 min bei 4 °C im Dunkeln. Überschüssige Antikörper wurden anschließend durch zweimaliges Waschen mit kaltem FACS-Puffer entfernt. Das Zellpellet wurde in 200  $\mu$ l FACS-Puffer resuspendiert und in FACS-Röhrchen überführt. Zur genauen Einstellung der Kompensation der Laserverstärkung wurden zusätzlich ungefärbte Zellen, Einzelfärbungen sowie isotypische Kontrollfärbungen mitgeführt.

### 3.3.3 Intrazelluläre Färbung der PKB/c-Akt

In einigen Experimenten wurde die Phosphorylierung der PKB/c-Akt durchflusszytometrisch untersucht. Die Färbung der PKB/c-Akt erfolgte nach dem Phosflow-Protokoll des Herstellers BD Biosciences.  $2-5 \times 10^5$  Zellen wurden in einer 96-Well Platte mit Rundboden ausplattiert und in 100  $\mu$ l vorgewärmten Cytofix-Puffer für 10 min bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mittels Zentrifugation bei 350 x g für 5 min pelletiert und der Überstand entfernt. Das Zellpellet wurde in 100  $\mu$ l Phosflow Perm Puffer III resuspendiert und für weitere 30 min auf Eis inkubiert, um die Zellmembran zu permeabilisieren. Nach der Inkubation wurden die Zellen zweimal mit FACS-Puffer gewaschen und in 20  $\mu$ l der verdünnten Phosflow-Antikörperlösung (Verdünnung 1:5) aufgenommen (Inkubation für 30 min bei RT). Überschüssige Antikörper wurden anschließend durch zweimaliges Waschen mit FACS-Puffer entfernt. Das Zellpellet wurde in 200  $\mu$ l FACS-Puffer resuspendiert und durchflusszytometrisch analysiert.

### 3.3.4 Intrazelluläre Färbung von FoxP3 und Ki-67

Die Färbung der nukleären Proteine FoxP3 und Ki-67 wurde nach dem One-Step-Protokoll des Herstellers eBioscience durchgeführt.  $0,5-1 \times 10^6$  Zellen wurden in 100  $\mu$ l FoxP3-Fixierungslösung für 30-60 min bei 4 °C inkubiert (lichtgeschützt). Anschließend folgten zwei Waschschrte mit je 200  $\mu$ l Permeabilisierungspuffer (350 x g, 5 min, 4 °C). Zur Färbung von FoxP3 und Ki-67 wurde das Zellpellet in 20  $\mu$ l der jeweiligen Antikörperlösung (verdünnt in Permeabilisierungspuffer) resuspendiert und für 30 min bei RT inkubiert. Überschüssige Antikörper konnten durch zweimaliges Waschen mit je 200  $\mu$ l Permeabilisierungspuffer entfernt werden. In einem finalen Schritt wurde das Zellpellet in 200  $\mu$ l FACS-Puffer aufgenommen und durchflusszytometrisch analysiert.

### 3.3.5 Intrazelluläre Färbung von IFN- $\gamma$

Die Analyse der intrazellulären Zytokinproduktion erfolgte mittels Cytofix/Cytoperm™ Fixation/Permeabilization Kit von BD Biosciences. Humane Immunzellen, isoliert aus den Milzen von humanisierten Mäusen, wurden auf eine 24-Well

Platte ausplattiert ( $1-2 \times 10^6$  Zellen pro Well) und mit  $1 \mu\text{g/ml}$  Ionomycin und  $10 \text{ ng/ml}$  PMA für 30 min im Brutschrank stimuliert. Anschließend folgte die Zugabe von  $7 \mu\text{l/ml}$  Monensin und eine weitere Inkubation für 5 h im Brutschrank. Monensin diente hierbei als Inhibitor des intrazellulären Proteintransports zum Golgi-Apparat. Dadurch reicherten sich die produzierten Zytokine in der Zelle an. Im Anschluss wurden die Zellen in eine 96-Well Platte mit Rundboden überführt und bei  $350 \times g$  und  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  für 6 min zentrifugiert. Die Zellpellets wurden in  $100 \mu\text{l}$  Cytofix-Puffer resuspendiert und für 20 min bei  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  inkubiert. Cytofix enthält Paraformaldehyd, womit die Zellen fixiert werden. Danach folgten zwei Waschschritte mit je  $200 \mu\text{l}$  Permwash-Puffer. Für die intrazelluläre Färbung der Zytokine wurden die Zellen anschließend in  $30 \mu\text{l}$  der entsprechenden Antikörperlösung (verdünnt in Permwash-Puffer) resuspendiert und für 15 min bei  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit Permwash-Puffer wurden die Zellen in FACS-Puffer aufgenommen und im Zytometer vermessen.

### 3.3.6 Bestimmung von Zytokinen mittels CBA-Assay

Zur Analyse der Zytokinproduktion wurden Überstände aus den entsprechenden *in-vitro*-Suppressionsassays (siehe 3.2.6) an Tag 3 der Ko-Kultur gesammelt. Die Zytokinkonzentration wurde mittels CBA-Verfahrens bestimmt und nach Anleitung des BD™ CBA Human Soluble Protein Master Buffer Kits durchgeführt. Das Verfahren erlaubt die Bestimmung einer Proteinkonzentration in Lösung mittels Durchflusszytometrie. Das Prinzip beruht auf einer Antigen-Antikörper-Reaktion. Die löslichen Proteine im Überstand werden zunächst von Antikörper-beschichteten Partikeln gebunden. Durch Zugabe eines fluoreszenzmarkierten Detektions-Antikörpers, der ebenfalls gegen das zu untersuchende Protein gerichtet ist, können die partikelgebundenen Proteine im Durchflusszytometer analysiert werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Zytokine IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  und IL-6 bestimmt. Die Proben wurden am LSR II gemessen und mit FCAP Array™ V1.0/3.0 ausgewertet.

## 3.4 Molekularbiologische Methoden

---

### 3.4.1 PTEN-Knockdown in T-Zellen

Für einen erfolgreichen Knockdown der PTEN-Proteinexpression wurde das PTEN Gene Solution siRNA Kit verwendet, welches folgende siRNA enthielt:

|           |                                    |
|-----------|------------------------------------|
| Hs_PTEN_6 | Zielsequenz: AAGGCGTATACAGGAACAATA |
| Hs_PTEN_9 | Zielsequenz: TCGACTTAGACTTGACCTATA |
| Hs_PTEN_8 | Zielsequenz: ATCGATAGCATTTCAGTATA  |
| Hs_PTEN_4 | Zielsequenz: TCGGCTTCTCCTGAAAGGGAA |

Negativ isolierte CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T-Zellen (siehe 3.2.4.3) wurden mit Hilfe des Human T cell Nucleofector Kits gemäß Herstellerprotokoll transfiziert. 5x10<sup>6</sup> T-Zellen wurden in 100 µl Nukleofektionslösung resuspendiert, die mit 1 µM PTEN-siRNA Mix oder Kontroll-siRNA supplementiert war. Für die anschließende Transfektion der Zellen wurde das Programm U-014 verwendet. Nach der Transfektion wurden die Zellen direkt in 5 ml vorgewärmtes (37 °C) X-VIVO 15 Medium gegeben und für 3-4 h im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> ruhen gelassen. Im Anschluss wurden die Zellen für 8 min bei 200 x g (RT) zentrifugiert, in einer Zelldichte von 2x10<sup>6</sup>/ml auf eine 24-Well Platte ausplattiert und über Nacht bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> im Brutschrank inkubiert. Die Analyse der Knockdown-Effizienz erfolgte zu den entsprechenden Zeitpunkten mittels qRT-PCR und Western Blot.

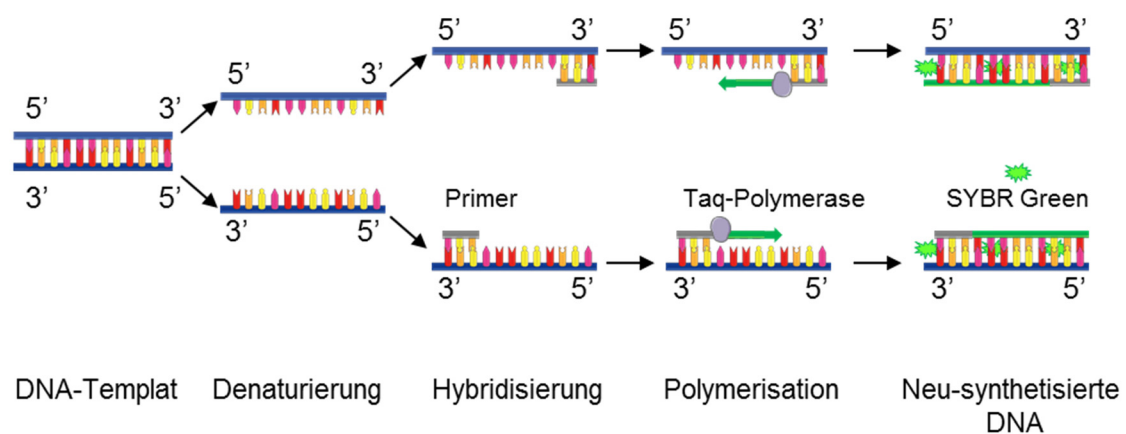
### 3.4.2 RNA-Isolierung und cDNA-Synthese

Die RNA-Isolierung wurde unter Verwendung des peqGOLD Micro RNA Kits gemäß den Anweisungen des Herstellers durchgeführt. 1-2x10<sup>6</sup> ruhende oder aktivierte CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurden für 6 min bei 350 x g und 4 °C zentrifugiert und das Zellpellet in 400 µl RNA Lyse-Puffer aufgenommen und gut resuspendiert. Für die Aufreinigung der RNA wurde diese zunächst an eine RNA-bindende Säule gebunden. Nach mehreren Waschschrritten und einem DNase I-Verdau wurde die RNA von der Säule eluiert und die Konzentration im Nanodrop bestimmt. Die cDNA konnte durch reverse Transkription mittels iScript™ cDNA-Synthesekit generiert werden. Als Ausgangsmaterial wurden jeweils 100 ng RNA eingesetzt.



### 3.4.3 Quantitative Real-Time PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion (engl.: polymerase chain reaction, PCR) ist eine wichtige Methode zur Vervielfältigung von Nukleinsäuren. Bei der quantitativen Real-Time PCR (qRT-PCR) kann zusätzlich die Amplifikation der DNA-Sequenz in Echtzeit beobachtet und mittels Fluoreszenzmessungen quantifiziert werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green verwendet. SYBR Green interkalierte in die doppelsträngige DNA und markierte dadurch die neu-synthetisierten DNA-Produkte (Abbildung 7). Im Verlauf einer PCR nahm somit die Fluoreszenz proportional mit der Menge der PCR-Produkte zu. Alle PCR-Reaktionen wurden in Triplikaten angesetzt. Die Expression der IL-6 und PTEN mRNA wurde mit dem entsprechenden QuantiTect® Primer Assay nach Herstellerprotokoll bestimmt. EF1- $\alpha$  wurde als Haushaltsgen verwendet.



**Abbildung 7: Ablauf der quantitativen Real-Time PCR.**

Das DNA-Templat wird durch Erhitzen in zwei Einzelstränge aufgeteilt (Denaturierung). Anschließend lagern sich die Primer an das 3'-Ende des Einzelstranges an (Hybridisierung). Die Taq-Polymerase beginnt am 3'-Ende des Primers mit der Synthese eines neuen DNA-Einzelstranges (Polymerisation). SYBR Green interkaliert in die neu-synthetisierten DNA-Doppelstränge, wodurch die DNA-Amplifikation quantifiziert werden kann.

Die Amplifikation fand im Real-Time PCR Cycler Rotor-Gene® Q unter den in Tabelle 2 aufgelisteten Bedingungen statt. Die relative Expression der IL-6 und PTEN mRNA wurde mit der  $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode berechnet.

**Tabelle 2: Bedingungen der qRT-PCR .**

| Schritt                                    | Dauer  | Temperatur |   |
|--|--------|------------|---|
| Initiale Aktivierung<br>der Taq-Polymerase | 5 min  | 95 °C      |   |
| Dann 40 Zyklen von:                        |        |            |   |
| Denaturierung                              | 5 sec  | 95 °C      | DNA wird in Einzelstränge aufgetrennt.  |
| Hybridisierung<br>+ Polymerisation         | 10 sec | 60 °C      | Primer binden an 3'-Ende der DNA-Einzelstränge.<br><br>Taq-Polymerase lagert freie Nukleotide komplementär an Einzelstränge an. |

#### 3.4.4 Proteinisolierung und Konzentrationsbestimmung

Aus den entsprechenden Experimenten wurden  $2-5 \times 10^6$  CD4<sup>+</sup> T-Zellen gesammelt und zweimal mit kaltem PBS gewaschen (350 x g, 6 min, 4 °C). Anschließend wurde das Zellpellet in 50-150 µl Proteinextraktionspuffer mit 1 mM PMSF und Protease-Inhibitor-Cocktail resuspendiert und für 30 min auf Eis lysiert. Während der Lyse wurden die Proben alle 10 min mit einem Vortexer gut durchmischt. Das Zellysate wurde im Anschluss für 10 min bei 3000 x g und 4 °C zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mit Hilfe des Micro BCA Protein Assay Kits gemäß Herstellerprotokoll. Die Proben wurden hierfür 1:100-1:200 in PBS verdünnt und photometrisch vermessen.

### 3.4.5 SDS-PAGE

Das Verfahren der SDS-PAGE (engl.: sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) erlaubt die analytische Auftrennung von Proteingemischen nach ihrer Molekülgröße. Die Proteine werden hierfür durch Zugabe von SDS und Mercaptoethanol denaturiert und über ein Polyacrylamid-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Proteintrennung unter Verwendung des NuPAGE® Bis-Tris-Elektrophorese-Systems durchgeführt. 15 µg Gesamtprotein wurden mit folgenden Komponenten für 10 min bei 70 °C erhitzt:

|                        |      |
|------------------------|------|
| Proteinprobe           | x µl |
| LDS Sample Buffer (4x) | 5 µl |
| Reducing Agent (10x)   | 2 µl |

➔ Mit deionisiertem H<sub>2</sub>O wurde auf ein Gesamtvolumen von 20 µl aufgefüllt.

Die behandelten Proben wurden anschließend auf ein Bis-Tris-Gradientengel (4-12 %) geladen und bei 200 V für 60 min elektrophoretisch aufgetrennt (MOPS SDS Laufpuffer).

### 3.4.6 Western Blot

Die aufgetrennten Proteine aus 3.4.5 wurden mit Hilfe des XCell II™ Blotting Systems auf eine PVDF-Membran übertragen (30 V, 60 min). Die fertige Membran wurde im Anschluss für mindestens 2 h in TBST-Puffer + 5 % BSA inkubiert. Danach folgte die Zugabe der entsprechenden primären Antikörper, verdünnt in TBST-Puffer + 5 % BSA nach Herstellerangaben und Inkubation über Nacht bei 4 °C unter leichtem Schwenken mit der Membran. Überschüssige Antikörper wurden am nächsten Tag durch mehrmaliges Waschen der Membran mit TBST-Puffer entfernt. Anschließend wurden die Membranen für 1 h mit dem jeweiligen HRP-gekoppelten Sekundärantikörper (verdünnt in TBST-Puffer) bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dem finalen Waschen wurde die Membran mit ECL™ Prime Western-Blot-Detektionsreagenz gemäß Herstellerprotokoll behandelt und die Chemilumineszenz mittels ChemiDoc™ Imaging Systems dokumentiert. Die Analyse und Quantifizierung der Western Blots erfolgte mit ImageJ.

### 3.4.7 DNA-Microarray

Der DNA-Array ist eine biochemische und bioinformatische Methode, die es ermöglicht, relative Änderungen in der Expression bestimmter Gene unter verschiedenen Bedingungen zu analysieren. Anhand der Ergebnisse können Aussagen über die Aktivität eines Gens getroffen werden. In Vorarbeiten von Dr. Trinschek und Dr. Satoh wurde die Genexpression in T-Zellen aus Treg-sensitiven, gesunden Spendern und Treg-resistenten MS-Patienten (n=3) in einem DNA-Array vergleichend untersucht. Hierfür wurden CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T-Zellen aus dem peripheren Blut der Patienten isoliert und für 16 h mit anti-CD3 mAk und anti-CD28 mAk polyklonal aktiviert. Unstimulierte T-Zellen dienten als Kontrolle. Die RNA wurde unter Verwendung von QIAshredder, RNeasy Mini Kit und RNase-Free DNase Set gemäß den Anweisungen des Herstellers extrahiert und gereinigt. Die Synthese der cDNA wurde mit Hilfe des Ambion WT Expression Kits durchgeführt. Im Anschluss wurde die cDNA fragmentiert, biotinyliert und auf den Gen-Chip Human Transcriptome Array 2.0 hybridisiert. Die Analyse des Gen-Chips erfolgte mit dem Affymetrix GeneChip® Scanner 3000. Hierbei wurden die Genexpressionen der ruhenden und aktivierten T-Zellen vergleichend untersucht, um Gene zu ermitteln, die nach Aktivierung in MS-Patienten unterschiedlich reguliert werden. Gene, die sich in ihrer Transkription um mehr als das Zweifache unterschieden, wurden anschließend mit der Ingenuity Pathway Analysis Software analysiert, um potentielle Upstream-Regulatoren identifizieren zu können. Zur Vorhersage der funktionellen und transkriptionellen Regulation in der Upstream-Analyse wurde der Activation Z-Score verwendet. Hierbei wurden Moleküle untersucht, die einen Z-Score >2 oder <1 in MS und gesunden Spendern aufzeigten. Die gewählten Moleküle werden in T-Zellen von MS-Patienten und gesunden Spendern unterschiedlich reguliert und sind zudem mit dem IL-6- und PKB-Signalweg assoziiert.

## 3.5 Tierexperimentelle Methoden

---

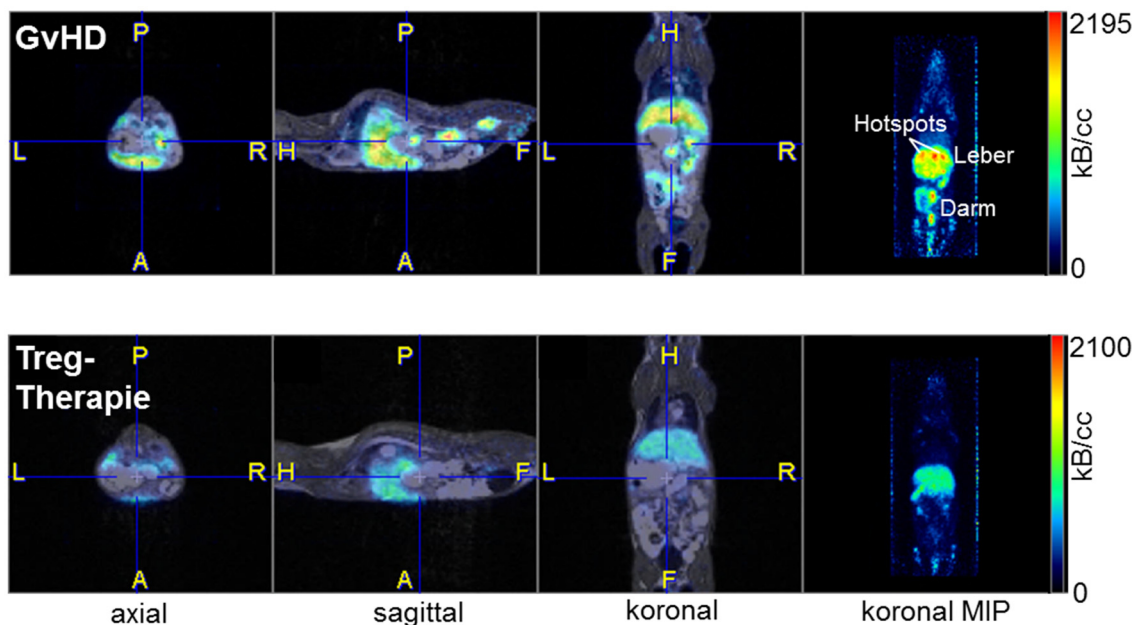
### 3.5.1 Tierhaltung

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden für alle Tierversuche neugeborene Tiere des immundefizienten Mausstammes Rag2<sup>-/-</sup>γc<sup>-/-</sup> verwendet (51). Diese Mäuse können aufgrund eines Knockouts des Rag2-Gens (engl.: recombination activating gene 2) weder T-Zellen noch B-Zellen ausbilden. Der zusätzliche Knockout im IL-2RG-Gen (engl.: interleukin-2 receptor subunit gamma, γc) verhindert die Entstehung von NK-Zellen (51). Die Haltung der Versuchstiere erfolgte in den Tierräumen des TARC (engl.: Translational Animal Research Center) an der Universitätsmedizin Mainz (Gebäude 905). Die Mäuse wurden in Green Line IVC-Käfigen mit eigener Ventilation unter keimarmen Bedingungen gehalten und regelmäßig mit autoklaviertem Wasser (+ Borgal) und sterilisierten Trockenpellets versorgt.

### 3.5.2 Induktion einer GvHD in Rag2<sup>-/-</sup>γc<sup>-/-</sup>-Mäusen

Periphere Immunzellen aus gesunden Spendern, unbehandelten MS-Patienten und Patienten nach DMF-Therapie wurden in einem etablierten xenogenen Mausmodell der GvHD (engl.: graft-versus-host disease) *in vivo* untersucht. In diesem Modell ist die GvHD eine T-Zell-vermittelte Entzündungsreaktion, die durch den Transfer humaner Immunzellen in immundefiziente Rag2<sup>-/-</sup>γc<sup>-/-</sup>-Mäuse ausgelöst werden kann. Hierbei werden die transferierten, humanen T-Zellen von antigenpräsentierenden Zellen aktiviert und differenzieren in IFN-γ- und IL-17-produzierende T-Effektorzellen, die in bestimmte Organe wie Leber, Haut und Darm einwandern und dort eine starke Entzündungsreaktion initiieren. Dadurch entstehen schwerwiegende Schädigungen der Leber (Hepatitis), des Darms (Kolitis) und der Haut (Dermatitis), was letztendlich zum Versterben der Mäuse führt. Die Ausbildung der GvHD kann durch den Transfer einer ausreichenden Menge aktivierter Treg erfolgreich unterdrückt werden (52). Die transferierten Treg supprimieren die Aktivierung der T-Zellen und reduzieren die Infiltration entzündlicher Immunzellen in die Leber, Haut und den Darm (Abbildung 8).

Die Treg-behandelten Mäuse weisen keine Anzeichen einer Hepatitis, Dermatitis sowie Kolitis auf (52).

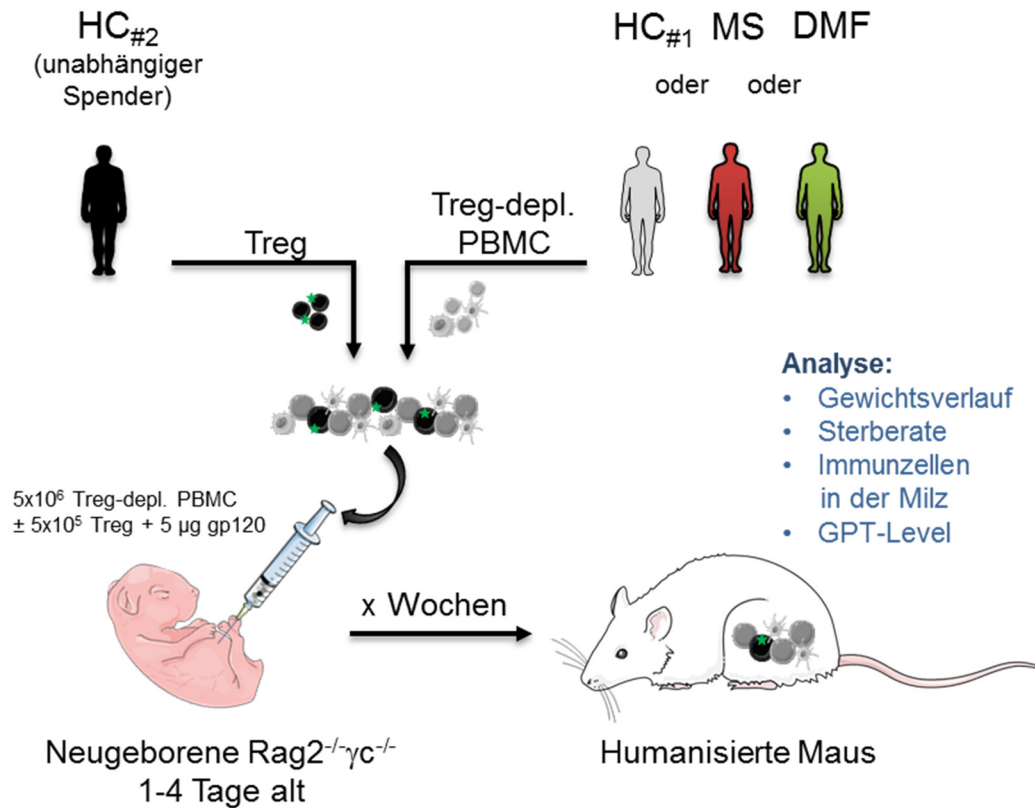


**Abbildung 8: Aktivierte Treg schützen vor der Entstehung einer GvHD.**

Humane Immunzellen eines gesunden Spenders  $\pm$  aktivierte Treg wurden in  $Rag2^{-/-}\gamma c^{-/-}$ -Mäuse injiziert. 19 Tage nach dem Transfer wurde den Mäusen ein radioaktiv markierter anti-CD3 mAk intravenös appliziert. Anti-CD3 mAk wurde von humanen  $CD3^{+}$  T-Zellen in den jeweiligen Organen gebunden. Die Verteilung des gebundenen Antikörpers wurde anschließend mittels PET-MRT untersucht. Dargestellt sind repräsentative PET/MRT-Aufnahmen einer GvHD-Maus (oben) und einer Treg-behandelten Maus (unten). In der GvHD-Maus konnte eine starke Akkumulation des mAk in der Leber und dem Darm nachgewiesen werden, was mit einer erhöhten Infiltration an  $CD3^{+}$  T-Zellen korrelierte. Durch Treg-Transfer konnte diese T-Zell-Infiltration deutlich reduziert werden. Die Ergebnisse hierzu wurden 2019 erfolgreich im „European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging“ veröffentlicht (53).

Alle tierexperimentellen Versuche wurden nach den genehmigten Vorschriften des Tierversuchsantrags G 15-1-072 durchgeführt. Für die Untersuchungen wurden  $5 \times 10^6$  Treg-depletierte PBMC eines gesunden Spenders, unbehandelten MS-Patienten oder Patienten nach DMF-Therapie in neugeborene  $Rag2^{-/-}\gamma c^{-/-}$ -Mäuse (1-4 Tage alt) intraperitoneal injiziert (Volumen: 50  $\mu$ l pro Maus). Einem Teil der Mäuse wurden zusätzlich  $5 \times 10^5$  isolierte Treg eines unabhängigen gesunden Spenders + 5  $\mu$ g/Maus gp120 appliziert (Abbildung 9). Gp120 bindet mit hoher Affinität an CD4, das auf der Oberfläche von Treg exprimiert wird. Durch die Bindung wird eine Signalkaskade induziert, die spezifisch die suppressive Funktion von Treg aktiviert (54).

Nach dem Transfer humaner PBMC wurden die Tiere in regelmäßigen Abständen (alle 1-2 Tage) gewogen und der Gesundheitszustand nach einem GvHD-Bewertungssystem beurteilt. Tiere, die schwere Anzeichen einer GvHD mit deutlichen Einschränkungen der Lebensqualität aufzeigten, wurden mittels CO<sub>2</sub>-Begasung oder zervikaler Dislokation abgetötet. Nach Beendigung des Versuches wurden Milz, Leber und Blut zur weiteren Analyse entnommen.



**Abbildung 9: Schematische Darstellung zum Transfer humaner PBMC in Rag2<sup>-/-</sup>γc<sup>-/-</sup>-Mäuse.**

### 3.5.3 Aufarbeitung von Milzzellen

Die isolierten Milzen wurden in einer 6-Well Platte mit X-VIVO 15 aufgenommen und mit Hilfe eines Nygonsiebes (Porengröße 70 µm) homogenisiert. Die Zellsuspension wurde in ein 15 ml Röhrchen überführt und für 6 min bei 350 x g und 4 °C zentrifugiert. Anschließend erfolgte eine Lyse der Erythrozyten. Hierfür wurde das Zellpellet mit 2 ml kaltem ACK-Puffer versetzt und vorsichtig für 2 min resuspendiert. Die Zellsuspension wurde im Anschluss mit kaltem RPMI 1640 auf 15 ml aufgefüllt und für 6 min bei 350 x g und 4 °C zentrifugiert. Dieser Lyseschritt wurde so lange wiederholt, bis die Zellprobe optisch frei von Erythrozyten war.

## 3.6 Statistik

---

Die Ergebnisse dieser Arbeit sind als arithmetisches Mittel oder Median  $\pm$  Standardabweichung (engl.: standard deviation, SD) oder Standardfehler (engl.: standard error of the mean, SEM) dargestellt. Mit Hilfe des ungepaarten Student's t-Test wurde die statistische Signifikanz der Ergebnisse bestimmt. Hierbei wurden p-Werte  $<0,05$  als statistisch signifikant angesehen. Für die entsprechenden Abbildungen gilt:

\*:  $p < 0,05$

\*\* :  $p < 0,01$

\*\*\*:  $p < 0,001$

\*\*\*\*:  $p < 0,0001$

n.s.: nicht signifikant



## 4 Ergebnisse

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit Untersuchungen zur Immunregulation von T-Effektorzellen (Teff) aus dem peripheren Blut von Patienten mit Multipler Sklerose (MS). Die MS ist eine neurodegenerative Autoimmunerkrankung, die durch autoaggressive, T-Zell-vermittelte Immunreaktionen gegen myelinisierte Axone im Zentralnervensystem verursacht wird. Die autoreaktiven T-Zellen weisen hierbei eine reduzierte Ansprechbarkeit für die suppressiven Fähigkeiten von regulatorischen T-Zellen (Treg) auf. Diese Eigenschaft von T-Zellen wird allgemein als Treg-Resistenz bezeichnet.

Ziel dieser Arbeit war es, a) den Einfluss einer neuartigen Therapie mit Dimethylfumarat (DMF) auf die Regulation von Teff aus MS-Patienten zu untersuchen und b) den Mechanismus der Treg-Resistenz in Teff aus MS-Patienten auf molekularbiologischer Ebene detaillierter zu charakterisieren. Die Ergebnisse werden in den nachfolgenden vier Abschnitten 4.1-4.4 vorgestellt. Die ersten beiden Abschnitte 4.1 und 4.2 beschäftigen sich mit der Immunregulation von Teff in MS-Patienten nach DMF-Therapie. Die Ergebnisse zu diesem Projekt wurden 2017 erfolgreich im „International Journal of Molecular Sciences“ publiziert (55). Die Abschnitte 4.3 und 4.4 fokussieren sich auf die Identifikation und Charakterisierung neuer Proteine, die mit einer Treg-Resistenz in T-Zellen von MS-Patienten assoziiert werden können (Biomarker). In Abschnitt 4.3 wird die Rolle der Phosphatase PTEN (engl.: phosphatase and tensin homolog) im Kontext einer Treg-Resistenz beschrieben. Die Erkenntnisse aus diesen Untersuchungen wurden 2018 als Patent eingereicht. Zudem befindet sich ein Manuskript zu dieser Thematik in der finalen Bearbeitung. Der letzte Abschnitt 4.4 baut auf den Vorarbeiten einer ehemaligen Kollegin auf und beinhaltet die vergleichende Analyse der PGC-1 $\alpha$ -Expression (engl.: proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha) in T-Zellen von gesunden Spendern und MS-Patienten.

Anhand dieser Ergebnisse erhoffen wir uns neue wichtige Erkenntnisse über Mechanismen zu erhalten, die zur Ausbildung einer Treg-Resistenz in T-Zellen von MS-Patienten führen können.

## **4.1 *In-vitro*-Untersuchungen zur Regulation peripherer T-Zellen in MS-Patienten vor und nach Dimethylfumarat-Therapie**

---

Das Medikament Tecfidera® (Dimethylfumarat, DMF) wurde 2013 von der FDA als eine neue Behandlungsmethode der schubförmig remittierenden MS zugelassen (56). Die Behandlung mit DMF zählt zu der sogenannten immunmodulierenden „First-Line“-Therapie, die bei Patienten mit einem milden oder moderaten Krankheitsverlauf eingesetzt wird. Ziel ist es, mit Hilfe der immunmodulierenden Medikamente das fehlgeleitete Immunsystem wieder ins Lot zu bringen und somit einen langfristigen Therapieerfolg zu gewährleisten.

Neben der bereits bekannten, immunmodulierenden Effekte von DMF auf verschiedene Zellen des Immunsystems, war nicht geklärt, ob DMF die Ansprechbarkeit von T-Zellen gegenüber einer Treg-vermittelten Suppression beeinflusst. Zur Beantwortung dieser Fragestellung wurde die Supprimierbarkeit von T-Effektorzellen (Teff) aus dem peripheren Blut von unbehandelten MS-Patienten und Patienten nach DMF-Therapie in *in-vitro*-Suppressionsassays vergleichend analysiert. Die Ergebnisse zu dieser Versuchsreihe sind nachfolgend zusammengefasst.

### **4.1.1 T-Zellen von MS-Patienten sind resistent gegen die Treg-vermittelte Suppression**

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde das Blut von 58 unbehandelten MS-Patienten unterschiedlichen Alters hinsichtlich der T-Zell-vermittelten Immunregulation untersucht. Ungefähr 60 % waren weibliche und 40 % männliche Probanden, was die erhöhte Inzidenz von MS bei Frauen widerspiegelt (8). Die Krankheitsdauer zum Zeitpunkt der Blutentnahme war sowohl bei Männern als auch bei Frauen unterschiedlich und reichte von weniger als einem Jahr (Erstdiagnose) bis zu 24 Jahren (Tabelle 3).

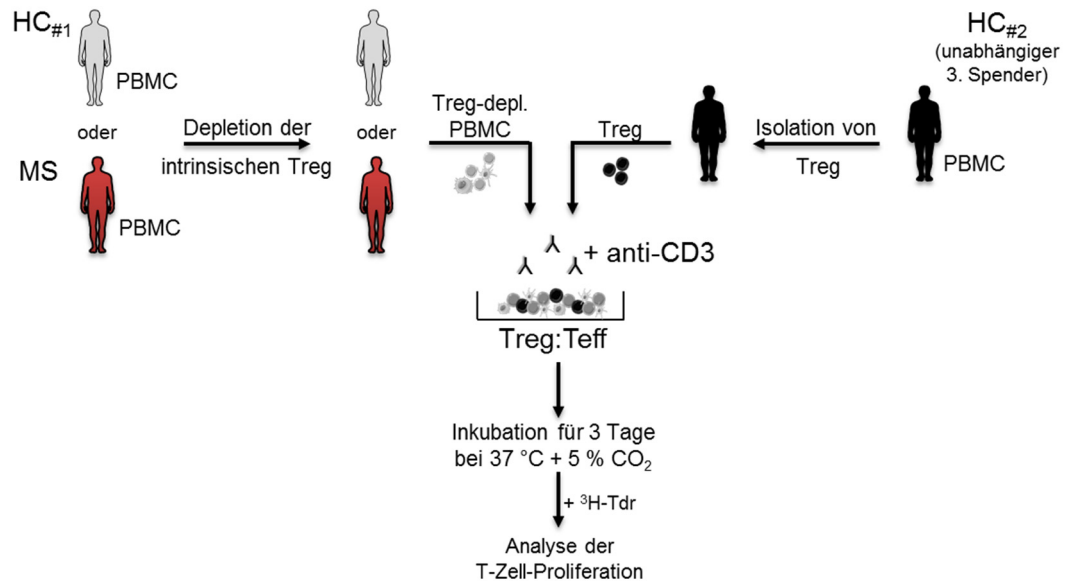
**Tabelle 3: Krankheitsdauer aller MS-Patienten zum Zeitpunkt der Blutentnahme.**

|        | < 1 Jahr | 1-10 Jahre | 10-20 Jahre | > 20 Jahre |
|--------|----------|------------|-------------|------------|
| Frauen | 11       | 19         | 4           | 1          |
| Männer | 12       | 5          | 5           | 1          |

*Zwischen 2016 und 2019 wurden insgesamt 58 therapienaive oder unbehandelte MS-Patienten untersucht.*

Als Ausgangsmaterial für die geplanten Suppressionsassays dienten periphere mononukleäre Zellen (engl.: peripheral blood mononuclear cells, PBMC). Unter PBMC versteht man die Gesamtheit aller einkernigen Zellen des Blutes, die einen runden Zellkern besitzen. Dazu zählen v.a. Lymphozyten und Monozyten. Mit einem Anteil von 40-60 % stellen CD3<sup>+</sup> T-Zellen (Gesamtheit aus CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen) eine große Immunzellpopulation innerhalb der PBMC dar.

Die PBMC wurden aus dem peripheren Blut von gesunden Spendern und unbehandelten MS-Patienten isoliert. Anschließend folgte die Depletion intrinsischer Treg-Populationen, um sicherzustellen, dass postulierte funktionelle Defekte in den Treg von MS-Patienten das Ergebnis der Assays nicht beeinflussten (36). In einem nächsten Schritt wurden die T-Zellen innerhalb der Treg-depletierten PBMC spezifisch mit anti-human CD3 mAk aktiviert und mit unterschiedlichen Verhältnissen an Treg aus dem Blut eines unabhängigen dritten Spenders kokultiviert (Abbildung 10). Aktivierte T-Zellen, die in Abwesenheit von Treg kultiviert wurden, dienten als Positivkontrolle für jedes Assay. Um die Qualität der isolierten Treg beurteilen zu können, wurden diese in einem zusätzlichen Kontrollansatz aktiviert und alleine kultiviert. Nach drei Tagen wurde der Kultur für 16 Stunden Tritium-markiertes Thymidin (<sup>3</sup>H-Tdr) zugesetzt. <sup>3</sup>H-Tdr wird in die DNA der sich teilenden T-Zellen eingebaut und diente hierbei als ein Maß für die Proliferation. Um die Ergebnisse beurteilen zu können, wurde innerhalb eines Assays stets die Supprimierbarkeit von T-Zellen aus gesunden Spendern und unbehandelten MS-Patienten vergleichend untersucht.

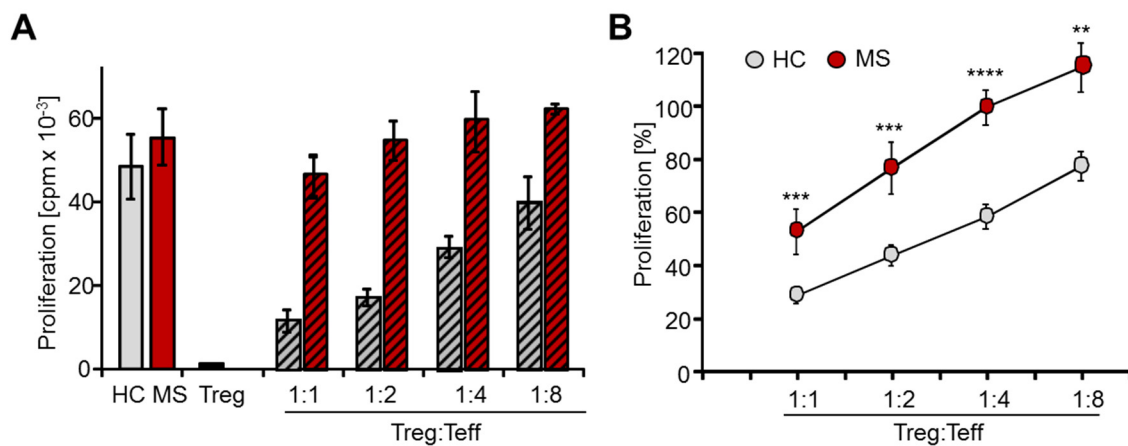


**Abbildung 10: Schematische Darstellung des in-vitro-Assays zur Untersuchung der Supprimierbarkeit von T-Zellen.**

In einem ersten Schritt wurden PBMC aus dem peripheren Blut von gesunden Spendern (HC#1, grau) und unbehandelten MS-Patienten (MS, rot) isoliert. Anschließend erfolgte die Depletion intrinsischer Treg. Die Treg-depletierten PBMC von HC#1 und MS wurden mit isolierten Treg eines unabhängigen dritten gesunden Spenders HC#2 kokultiviert und mit anti-human CD3 mAk polyklonal stimuliert. Die T-Zell-Proliferation wurde durch den Einbau von <sup>3</sup>H-Tdr an Tag 3 bestimmt.

Hinsichtlich der Supprimierbarkeit von T-Zellen aus dem peripheren Blut eines gesunden Spenders (HC) ergaben sich folgende Beobachtungen: Die Inkubation der T-Zellen mit anti-human CD3 mAk in Abwesenheit von Treg führte zu einer starken Proliferation, die durch den erhöhten Einbau von <sup>3</sup>H-Tdr aufgezeigt wurde (Abbildung 11A, grauer Balken). Anti-human CD3 mAk bindet hierbei an das CD3-Molekül des T-Zell-Rezeptors und induziert eine Konformationsänderung, wodurch die IL-2-Synthese und Proliferation der Zellen eingeleitet wird. Im Gegensatz dazu wiesen aktivierte Treg (Abbildung 11A, schwarzer Balken) keine Zellproliferation auf. Diese Eigenschaft wird als Anergie bezeichnet und ist neben der Suppressor-Funktion ein wesentliches Merkmal von Treg (57). In den Kokultivierungsansätzen zeigte sich eine deutliche Suppression der T-Zell-Proliferation (Abbildung 11A, grau-schwarze Balken). Treg unterdrückten die Aktivierung der CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen dosisabhängig. In der Folge wurde die Proliferation der T-Zellen reduziert, was durch den verringerten Einbau von <sup>3</sup>H-Tdr bestätigt wurde.

Die Untersuchungen zur Supprimierbarkeit von T-Zellen aus dem peripheren Blut von MS-Patienten zeigten zunächst, dass die alleinige Aktivierung der MS-PBMC in Abwesenheit von Treg eine starke Proliferation der T-Zellen induzierte, die vergleichbar mit der Proliferation der T-Zellen aus gesunden Spendern war (Abbildung 11A, roter Balken). In Anwesenheit von Treg konnte die Proliferation dieser T-Zellen jedoch nicht effizient unterdrückt werden (Abbildung 11A, rot-schwarze Balken). Die kumulierten Daten aus n=10 unabhängigen Experimenten bestätigten diese Beobachtung (Abbildung 11B).



**Abbildung 11: T-Zellen von unbehandelten MS-Patienten weisen eine Treg-Resistenz auf.** A) Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis eines in-vitro-Suppressionsassays mit Treg-depletierten PBMC eines gesunden Spenders (HC, grau) und eines unbehandelten MS-Patienten (MS, rot). Die Treg-depletierten PBMC von HC und MS wurden mit isolierten Treg eines unabhängigen dritten gesunden Spenders kokultiviert und mit anti-human CD3 mAk polyklonal stimuliert. Die Stimulation der Treg-depletierten PBMC in Abwesenheit von Treg diente als Positivkontrolle. In einem zusätzlichen Kontrollansatz wurden die isolierten Treg des unabhängigen dritten gesunden Spenders aktiviert und alleine kultiviert. B) Das Diagramm zeigt die relative Proliferation  $\pm$  SEM der T-Zellen von n=10 gesunden Spendern und MS-Patienten bei unterschiedlichen Treg:Teff-Verhältnissen (1:1 bis 1:8).

Wie bereits zuvor von anderen Arbeitsgruppen gezeigt (44), konnten auch wir anhand dieser Untersuchungen signifikante Unterschiede in der Supprimierbarkeit von T-Zellen aus gesunden Spendern und MS-Patienten feststellen. T-Zellen aus unbehandelten MS-Patienten zeichneten sich durch eine deutliche Unempfindlichkeit gegenüber der Treg-vermittelten Suppression aus (Treg-Resistenz), die in T-Zellen von gesunden Spendern nicht beobachtet werden konnte.

#### 4.1.2 DMF verbessert die Ansprechbarkeit der T-Zellen für die Treg-vermittelte Immunregulation

Um nun zu untersuchen, ob DMF die Immunregulation von T-Zellen beeinflussen kann, wurden Blutproben von insgesamt 25 MS-Patienten nach DMF-Therapie (Tecfidera®) gesammelt. Die Behandlungsdauer mit DMF war zum Zeitpunkt der Blutentnahme sowohl bei Männern als auch bei Frauen unterschiedlich und lag in einem Zeitraum von zwei Monaten bis hin zu über zwei Jahren (Tabelle 4).

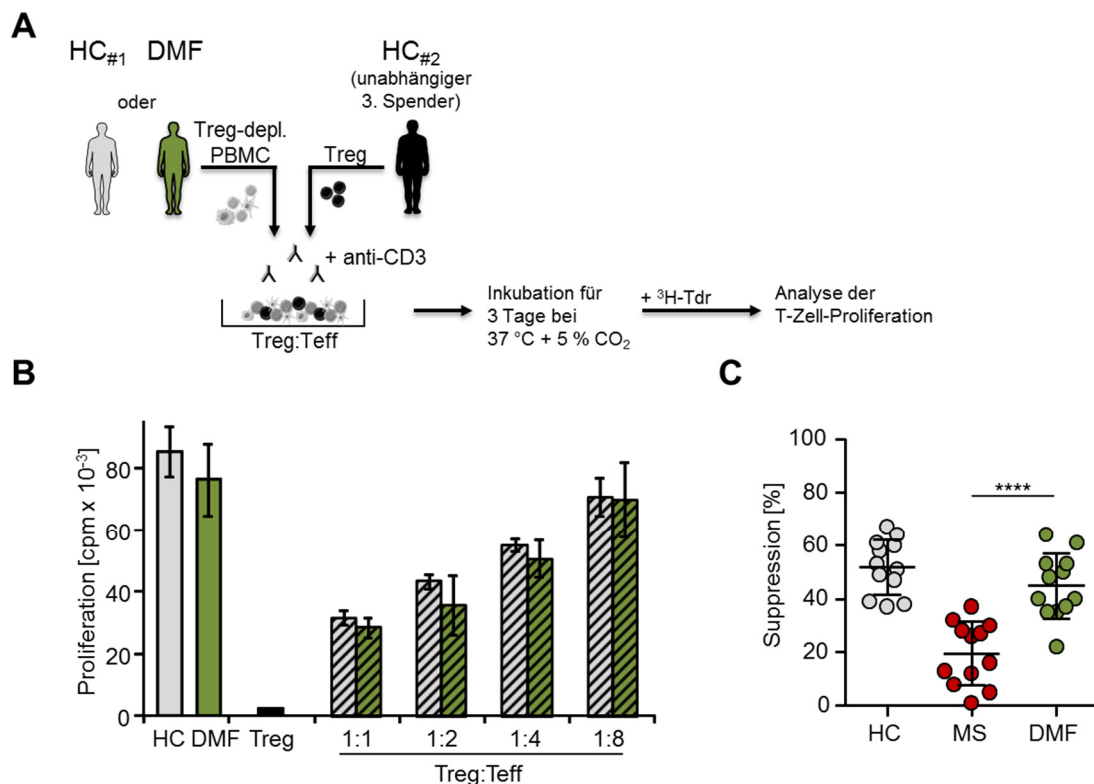
**Tabelle 4: Behandlungsdauer aller MS-Patienten unter DMF-Therapie zum Zeitpunkt der Blutentnahme (n=25).**

|                  | < 6 Monate | 6-12 Monate | 1-1½ Jahre | 1½-2 Jahre | > 2 Jahre |
|------------------|------------|-------------|------------|------------|-----------|
| Anzahl Patienten | 4          | 5           | 10         | 3          | 3         |

Die Analysen zur Supprimierbarkeit der T-Zellen aus dem peripheren Blut von MS-Patienten nach DMF-Therapie erfolgten analog zu 4.1.1: Treg-depletierte PBMC aus gesunden Spendern und therapierten MS-Patienten wurden mit anti-human CD3 mAK aktiviert und in unterschiedlichen Verhältnissen mit isolierten Treg eines unabhängigen dritten gesunden Spenders kokultiviert. T-Zellen, die in Abwesenheit von Treg aktiviert wurden, dienten als Positivkontrolle. Nach 3-tägiger Inkubation der Kulturansätze bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> wurden die Zellen mit <sup>3</sup>H-Tdr markiert und nach weiteren 16 Stunden die T-Zell-Proliferation ausgewertet (Abbildung 12A).

Die TZR-vermittelte Aktivierung von T-Zellen aus gesunden Spendern führte erfahrungsgemäß zu einer starken Proliferation, die durch Zugabe von Treg dosisabhängig supprimiert werden konnte (Abbildung 12B, graue Balken). Interessanterweise war in den Ansätzen mit T-Zellen aus DMF-behandelten MS-Patienten eine ähnliche Regulation zu beobachten (Abbildung 12B, grüne Balken). Die Proliferation der T-Zellen wurde effizient durch aktivierte Treg unterdrückt. Diese Ergebnisse deuteten auf eine vergleichbare Treg-Sensitivität von T-Zellen aus gesunden Spendern und MS-Patienten nach DMF-Therapie hin. Die kumulierten Daten aus insgesamt 12 unabhängigen Experimenten bekräftigten diese Erkenntnis (Abbildung 12C): Bei gesunden Spendern betrug die durchschnittliche T-Zell-Suppression  $52,1 \pm 2,9$  % (bei einem Treg:Teff-Verhältnis von 1:4). Im Gegensatz hierzu konnte in Versuchen mit T-Zellen aus unbehandelten

MS-Patienten eine signifikant reduzierte T-Zell-Suppression festgestellt werden, die im Durchschnitt bei  $19,6 \pm 3,4 \%$  (Treg:Teff 1:4) lag. Diese verminderte Supprimierbarkeit der T-Zellen in MS-Patienten konnte durch DMF-Therapie normalisiert werden. Demnach wiesen T-Zellen aus therapierten MS-Patienten mit einer durchschnittlichen T-Zell-Suppression von  $44,8 \pm 3,5 \%$  (Treg:Teff 1:4) eine deutlich verbesserte Supprimierbarkeit und gesteigerte Ansprechbarkeit auf die Treg-vermittelte Suppression auf.

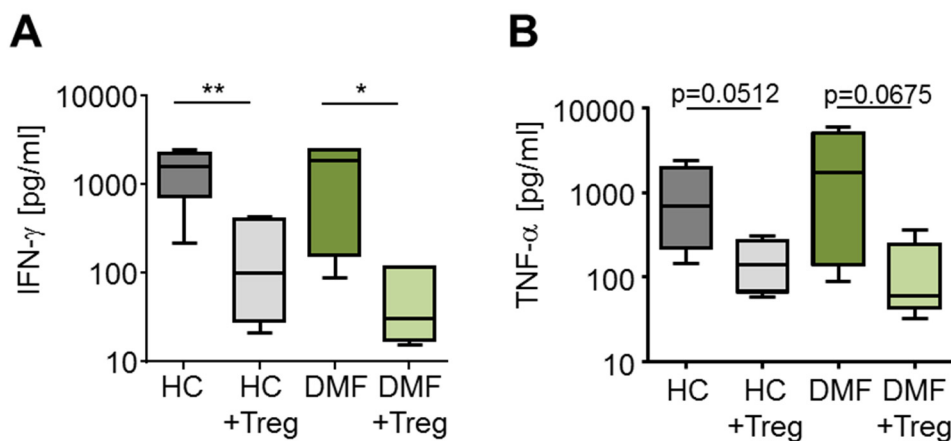


**Abbildung 12: DMF verbessert die Ansprechbarkeit der T-Zellen von MS-Patienten für eine Treg-vermittelte Suppression.**

A) Schematische Darstellung des in-vitro-Assays zur Untersuchung der Supprimierbarkeit von T-Zellen. Treg-depletierte PBMC aus gesunden Spendern (HC#1, grau) und MS-Patienten nach DMF-Therapie (DMF, grün) wurden mit isolierten Treg eines unabhängigen dritten gesunden Spenders HC#2 kokultiviert und mit anti-human CD3 mAk polykonal stimuliert. Die T-Zell-Proliferation wurde durch den Einbau von  $^3\text{H-Tdr}$  an Tag 3 bestimmt. B) Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis eines Suppressionsassays mit Treg-depletierten PBMC eines gesunden Spenders (HC, grau) und eines MS-Patienten unter DMF-Therapie (DMF, grün). Die Stimulation der PBMC in Abwesenheit von Treg diente als Kontrolle. In einem zusätzlichen Kontrollansatz wurden die isolierten Treg des unabhängigen dritten gesunden Spenders aktiviert und alleine kultiviert. C) Das Diagramm zeigt die Suppression  $\pm$  SD der T-Zellen aus  $n=12$  unabhängigen Experimenten mit gesunden Spendern, MS-Patienten und MS-Patienten nach DMF-Therapie bei einem Treg:Teff-Verhältnis von 1:4. Jeder Punkt entspricht einem individuellen Spender.

Treg supprimieren den gesamten Aktivierungsprozess von T-Zellen. Neben der Proliferation wird auch die Bildung inflammatorischer Zytokine inhibiert. Um den Einfluss der DMF-Therapie auf die Zytokinproduktion der T-Zellen zu bestimmen, wurde in einem weiteren Versuch die Produktion der inflammatorischen Zytokine IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  untersucht. Beide Zytokine werden nach Aktivierung sezerniert und sind mit dem Fortschreiten der MS-Erkrankung assoziiert (58). Für die geplanten Untersuchungen wurden Kulturüberstände aus den jeweiligen Ansätzen entnommen (72 Stunden nach Start des Suppressionsassays) und die Konzentration an IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  durchflusszytometrisch mittels Cytometric Bead Arrays (CBA) bestimmt. In stimulierten Teff von MS-Patienten nach DMF-Therapie und gesunden Spendern war eine ähnliche Produktion von IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  zu beobachten (Abbildung 13). In Anwesenheit von Treg (Treg:Teff-Verhältnis 1:1) wurde die Produktion an IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  erheblich unterdrückt, was die vergleichbare Treg-Sensitivität der T-Zellen aus gesunden Spendern und therapierten MS-Patienten widerspiegelt.

Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass DMF die erhöhte Aktivität der T-Zellen in MS-Patienten inhibiert und in der Folge deren Ansprechbarkeit für eine Treg-vermittelte Immunsuppression wiederherstellt.



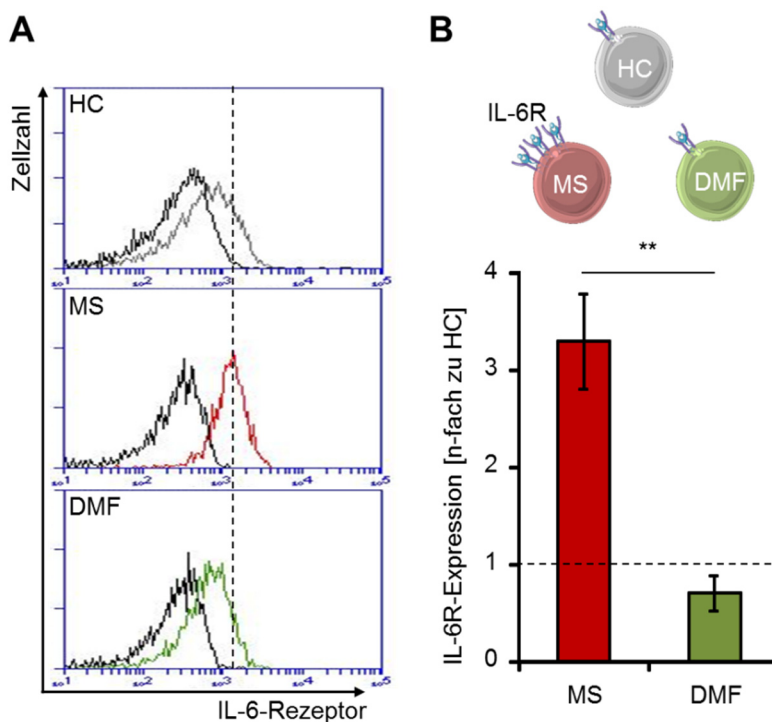
**Abbildung 13: Analyse des Zytokinprofils in Kulturüberständen.**

72 Stunden nach Start des Suppressionsassays wurden Überstände entnommen und die Konzentration der Zytokine IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  bestimmt. Dargestellt ist der Median aus  $n=6$  unabhängigen Experimenten.



#### 4.1.3 T-Zellen aus therapierten MS-Patienten weisen eine normalisierte IL-6R-Expression auf

Die Treg-Resistenz von T-Zellen ist mit Änderungen in der IL-6-Produktion und IL-6-Signalübertragung assoziiert. Sowohl eine erhöhte IL-6R-Expression als auch eine beschleunigte Kinetik der IL-6-Bildung führen zu einer reduzierten Ansprechbarkeit der T-Zellen für Treg-vermittelte Suppressionsmechanismen (43, 44). Da DMF die Treg-Sensitivität in T-Zellen von MS-Patienten wiederherstellen konnte, lag es nahe, den Einfluss von DMF auf die IL-6-Bildung zu analysieren. Hierfür wurde die IL-6R-Expression auf T-Zellen von gesunden Spendern, unbehandelten MS-Patienten und Patienten nach DMF-Behandlung durchflusszytometrisch untersucht. Dabei zeigte sich, dass T-Zellen von unbehandelten MS-Patienten durchschnittlich eine 3-fach erhöhte IL-6R-Expression im Vergleich zu T-Zellen von gesunden Spendern aufwiesen (Abbildung 14A, B). Diese signifikant erhöhte Expression war bei T-Zellen aus MS-Patienten nach DMF-Therapie nicht zu beobachten. Diese Beobachtung deutete darauf hin, dass DMF in die IL-6-Signaltransduktion eingreift und die Zytokinproduktion normalisiert.



**Abbildung 14: DMF normalisiert die IL-6R-Expression auf T-Zellen von MS-Patienten.**

A) Dargestellt sind repräsentative Ergebnisse zur durchflusszytometrischen Analyse des IL-6R auf T-Zellen in gesunden Spendern HC (grau), unbehandelten MS-Patienten (rot) und Patienten nach DMF-Therapie (grün). Schwarz: isotypische Kontrollfärbung, B) Kumulierte Daten zur IL-6R-Expression aus  $n=8$  Versuchen: Dargestellt ist die mittlere IL-6R-Expression  $\pm$  SD von MS und DMF relativ zur Expression in HC (gestrichelte Linie).

## 4.2 *In-vivo*-Untersuchungen zur Treg-Resistenz in MS-Patienten nach Dimethylfumarat-Therapie

---

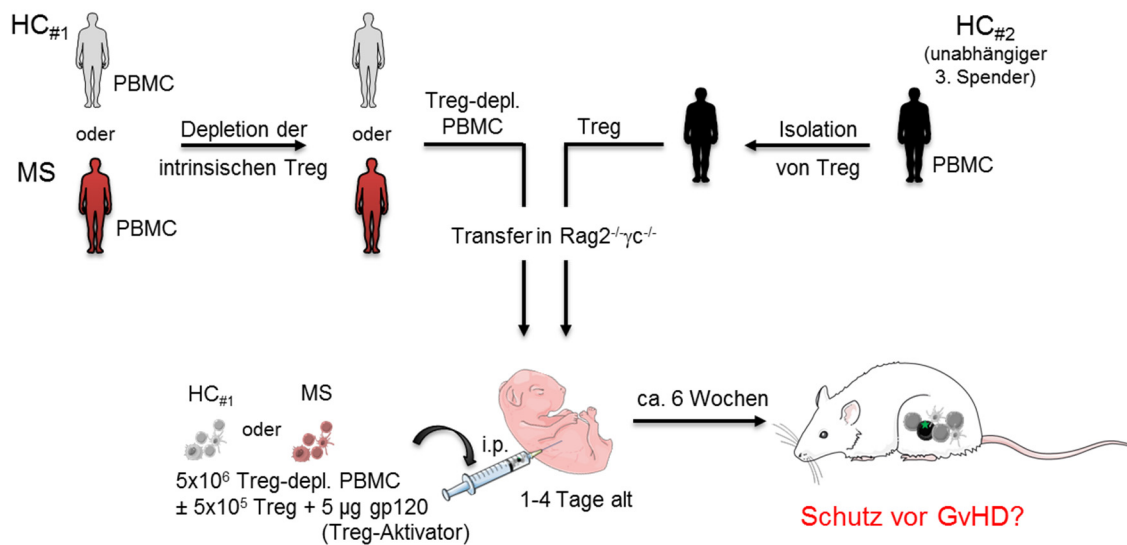
Die bisherigen Untersuchungen fokussierten sich auf Einflüsse der DMF-Therapie auf die Immunregulation von T-Zellen *in vitro*. Es zeigte sich, dass DMF die Sensitivität von T-Zellen der MS-Patienten für die Treg-vermittelte Suppression deutlich verbessert, was mit einer Reduktion der IL-6R-Expression und folglich einer Änderung der IL-6-Signalübertragung einherging.

Mit Hilfe des Suppressionsassays können allerdings nur einige wenige Parameter einer Treg-vermittelten Suppression analysiert werden. Aus diesem Grund wurden zusätzliche *in-vivo*-Untersuchungen in einem humanisierten Mausmodell der Transplantat-gegen-Wirt-Reaktion (engl.: Graft-versus-Host disease, GvHD) durchgeführt. In diesem Modell führt der Transfer von humanen Immunzellen in immundefiziente Mäuse zur Induktion einer GvHD, die gekennzeichnet ist durch Entzündungen der Leber (Hepatitis), des Darms (Colitis) und der Haut (Dermatitis). In der Folge verlieren die Tiere erheblich an Gewicht. Die GvHD ist eine T-Zell-vermittelte Entzündungsreaktion: CD4<sup>+</sup> T-Zellen werden aktiviert und differenzieren zu aggressiven T-Effektorzellen, die gegen das Gewebe der Maus reagieren und starke Gewebsschädigungen verursachen. Der zusätzliche Transfer von aktivierten Treg kann die Ausbildung der GvHD unterdrücken (52). Eine erfolgreiche Unterdrückung der GvHD hängt u.a. davon ab, wie effizient die Bildung von T-Effektorzellen supprimiert wird. Aus den *in-vitro*-Untersuchungen war bekannt, dass eine DMF-Therapie die gestörte Treg-Sensitivität von T-Zellen in MS-Patienten deutlich verbessern kann. Ob dieser Effekt effizient genug ist, um auch die Entstehung von T-Effektorzellen und die Ausbildung einer GvHD *in vivo* zu verhindern, sollte in dem Mausmodell analysiert werden.

### 4.2.1 Der Transfer Treg-resistenter T-Zellen führt zur Ausbildung einer schwerwiegenden GvHD

In ersten *in-vivo*-Experimenten wurde die Ausbildung einer GvHD nach dem Transfer peripherer Immunzellen (engl.: peripheral blood mononuclear cells, PBMC) aus unbehandelten MS-Patienten und gesunden Spendern vergleichend untersucht. Die benötigten PBMC wurden mittels Dichtegradientenzentrifugation aus Blutproben der Spender isoliert. Da Treg bei MS-Patienten funktionell gestört

sind (36), erfolgte in einem nächsten Schritt die Depletion intrinsischer Treg, um die T-Zell-Funktion in Abwesenheit von patientenspezifischen Treg analysieren zu können. Parallel hierzu wurden funktionell aktive Treg aus einem unabhängigen dritten gesunden Spender isoliert. Zur Einleitung des *in-vivo*-Versuchs wurden  $5 \times 10^6$  Treg-depletierte PBMC der jeweiligen Spender in immundefiziente  $Rag2^{-/-}\gamma c^{-/-}$ -Mäuse (1-4 Tage alt) intraperitoneal injiziert. Ein Teil der Mäuse erhielt zusätzlich  $5 \times 10^5$  Treg des unabhängigen dritten gesunden Spenders zusammen mit  $5 \mu g$  gp120 intraperitoneal appliziert (Abbildung 15). Gp120 bindet an das CD4-Molekül auf der Oberfläche von Treg und induziert hierdurch eine Signalkaskade, die spezifisch die suppressive Funktion von Treg aktiviert (54). Als Kontrollgruppe dienten unbehandelte Mäuse ohne Transfer humaner Immunzellen. Diese Gruppe war notwendig, um die Symptomatik der GvHD-Entwicklung beurteilen zu können. Nach Versuchsstart wurden die Tiere über einen Zeitraum von ca. 6 Wochen beobachtet und die Gewichtszunahme sowie Überlebensrate dokumentiert.

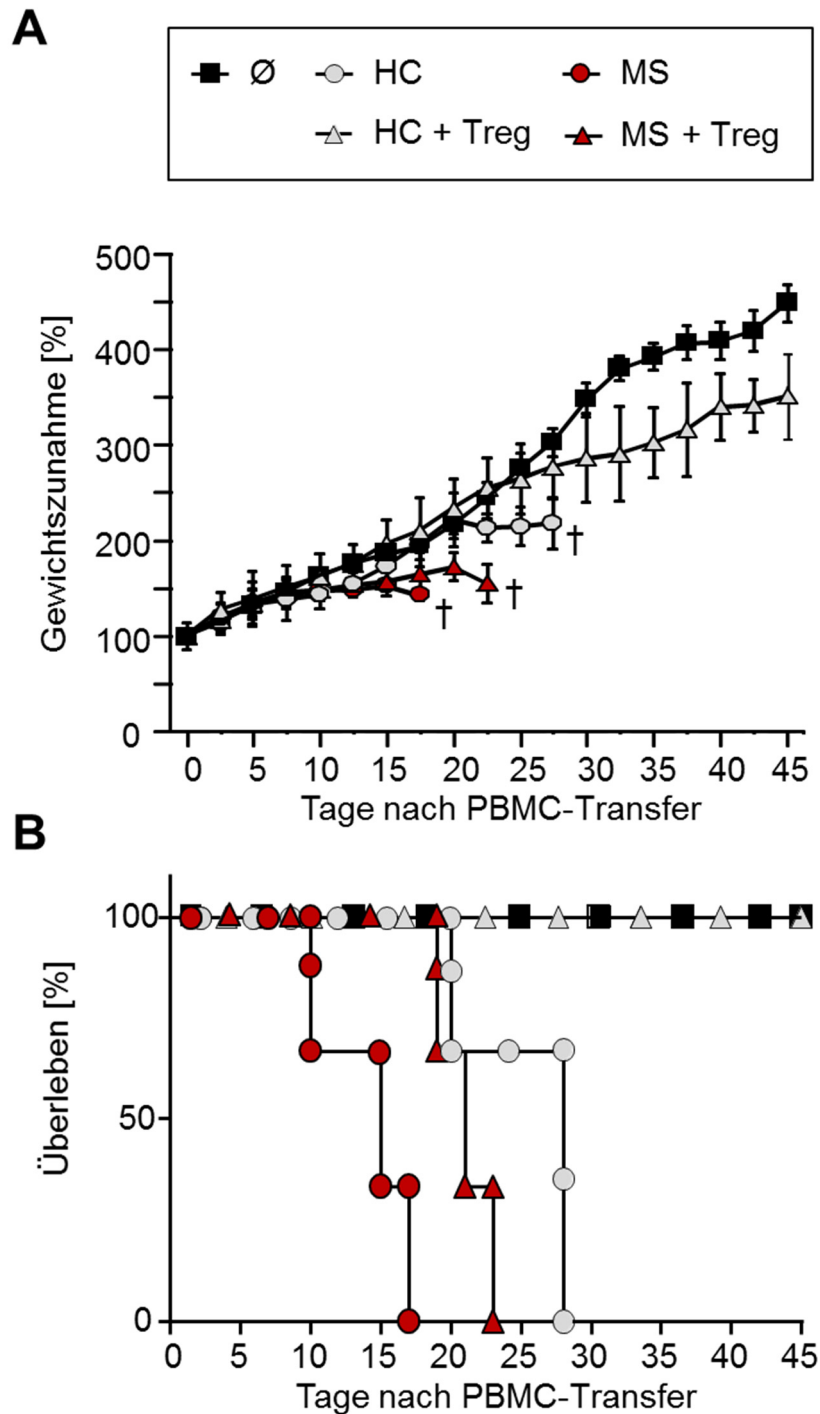


**Abbildung 15: Schematische Darstellung des *in-vivo*-Versuchs.**

Aus dem peripheren Blut eines gesunden Spenders (HC#1, grau) und MS-Patienten (MS, rot) wurden PBMC isoliert und anschließend die intrinsischen Treg depletiert. Parallel hierzu erfolgte die Isolation von Treg aus PBMC eines unabhängigen dritten gesunden Spenders (HC#2, schwarz). Anschließend wurden  $5 \times 10^6$  Treg-depletierte PBMC von HC#1 oder MS  $\pm 5 \times 10^5$  Treg +  $5 \mu g$  gp120 in neugeborene  $Rag2^{-/-}\gamma c^{-/-}$ -Mäuse intraperitoneal (i.p.) transferiert. Als Kontrollgruppe dienten unbehandelte Mäuse ohne Transfer humaner Immunzellen. Die Gewichtszunahme und Überlebensrate der Tiere wurde über einen Zeitraum von ca. 6 Wochen dokumentiert.

Der alleinige Transfer Treg-depletierter PBMC aus MS-Patienten bzw. gesunden Spender führte zur Ausbildung einer letal verlaufenden GvHD, die durch eine starke Gewichtsreduktion und frühes Versterben der Versuchstiere gekennzeichnet war (Abbildung 16A+B, graue und rote Kreise). Im Vergleich zu gesunden Spendern, waren T-Zellen aus den MS-Patienten aggressiver. Die GvHD-Symptome traten wesentlich früher auf und die Mäuse verstarben bereits zehn Tage nach PBMC-Transfer, wohingegen eine letale Entwicklung in der Vergleichsgruppe mit PBMC aus gesunden Spendern erst ab Tag 20 zu beobachten war (Abbildung 16B, graue und rote Kreise).

Eine zusätzliche Applikation aktivierter Treg (PBMC:Treg 10:1) konnte die GvHD-Entwicklung in Mäusen, die PBMC aus gesunden Spendern erhielten, fast vollständig unterdrücken. Diese Tiere zeigten zwar eine leichte Reduktion der Gewichtszunahme, dennoch überlebten sie alle die Behandlung (Abbildung 16A+B, graue Dreiecke). Im Vergleich hierzu bot der zusätzliche Transfer aktivierter Treg in Mäusen, die PBMC aus MS-Patienten erhielten, keinen Schutz vor einer GvHD-Entwicklung. Die Tiere wiesen eine starke Gewichtsabnahme auf, was letztendlich zum Versterben aller Versuchstiere führte (Abbildung 16A+B, rote Dreiecke).



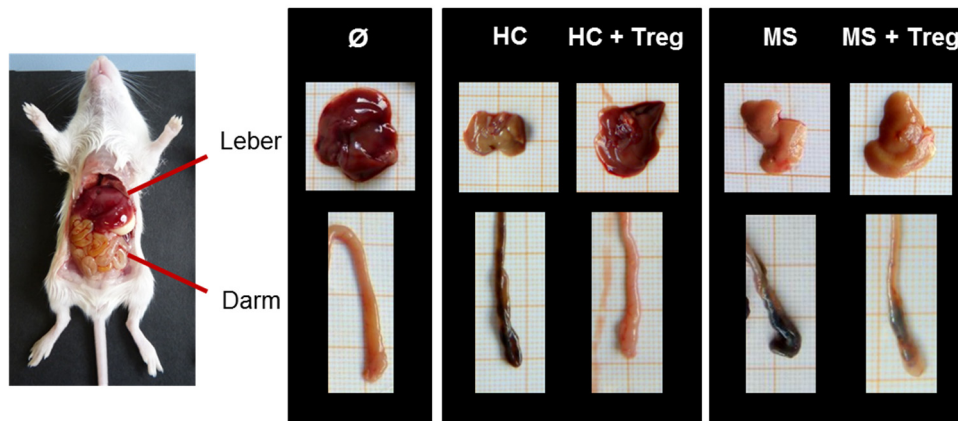
**Abbildung 16: T-Zellen aus dem Blut von MS-Patienten induzieren eine GvHD, die durch aktivierte Treg nicht unterdrückt werden kann.**

Treg-depletierte PBMC von unbehandelten MS-Patienten (MS) oder gesunden Spendern (HC) ± aktivierte Treg wurden in neugeborene  $Rag2^{-/-}\gamma c^{-/-}$ -Mäuse intraperitoneal transferiert und über einen Zeitraum von ca. 6 Wochen die Gewichtszunahme und Überlebensrate dokumentiert.

A) Dargestellt ist die durchschnittliche Gewichtszunahme ± SD von  $n=5$  Mäusen pro Gruppe über einen Zeitraum von 45 Tagen nach Transfer der Immunzellen. † symbolisiert das Versterben aller Versuchstiere innerhalb einer Gruppe. Als Kontrolle dienen unbehandelte Mäuse (Ø). C) Die Kaplan-Meier-Kurven zeigen das Überleben der Mäuse in den jeweiligen Gruppen bis Tag 45 nach PBMC-Transfer (Versuchsende).

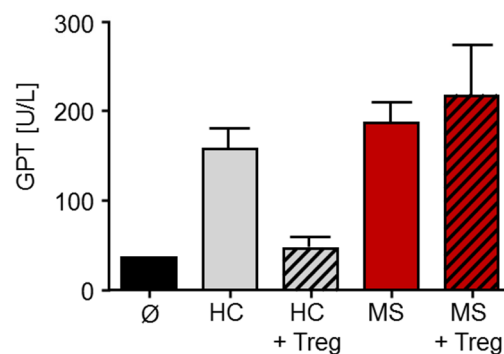
Neben der Gewichtszunahme und Überlebensrate wurden auch die klinischen Symptome der Versuchstiere analysiert. Nach dem Transfer Treg-depletierter PBMC aus gesunden Spendern und MS-Patienten entwickelten die Tiere eine GvHD, die sich durch schwere klinische Symptome in Leber (Anzeichen einer Fibrose, erhöhte GPT-Level) und Darm (blutiger Stuhl) auszeichnete (Abbildung 17A, B). Die Ausbildung dieser schwerwiegenden GvHD-Symptome wurde durch den Transfer aktivierter Treg in Mäusen, die zuvor PBMC eines gesunden Spenders erhielten, vollständig unterdrückt. Im Gegensatz hierzu konnten in Mäusen, denen PBMC aus MS-Patienten und aktivierte Treg appliziert wurden, schwere Entzündungen der Leber und des Darms nachgewiesen werden.

A



B

Leberfunktion



**Abbildung 17: Analyse der klinischen Symptome einer GvHD in humanisierten Mäusen.**

A) Die Abbildungen zeigen repräsentative Aufnahmen der Leber und des Darms einzelner Mäuse aus den jeweiligen Versuchsgruppen. Die isolierten Organe unbehandelter Mäuse dienten als Kontrolle um den Schweregrad der Leber- und Darmentzündung abschätzen zu können. B) Das Balkendiagramm fasst die durchschnittliche GPT-Konzentration  $\pm$  SD im Serum von  $n=5$  Mäusen pro Gruppe zusammen.

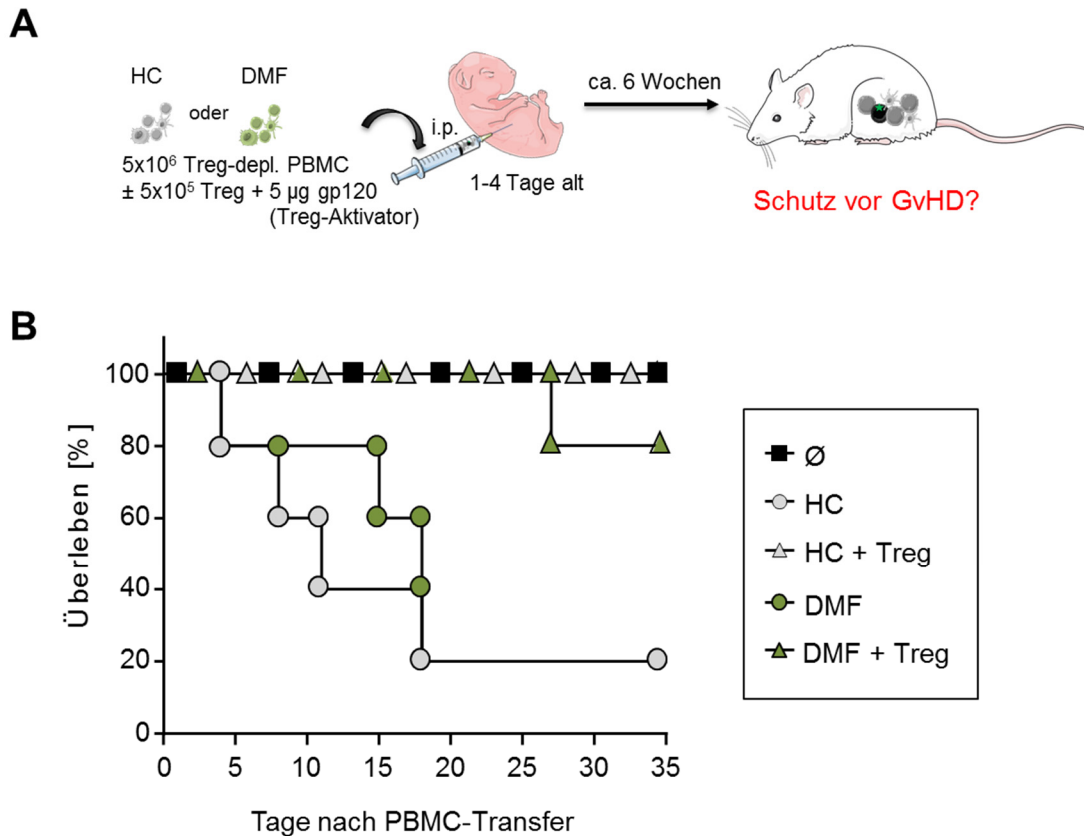
Diese Beobachtungen bestätigten die Ergebnisse aus den *in-vitro*-Untersuchungen: Aufgrund der bestehenden Treg-Resistenz in T-Zellen von MS-Patienten konnte die Aktivierung und Differenzierung der T-Zellen nicht erfolgreich durch Treg supprimiert werden. Die Tiere entwickelten eine GvHD mit schweren klinischen Symptomen.

#### **4.2.2 DMF verbessert die Immunregulation von T-Zellen aus dem Blut von therapierten MS-Patienten im Mausmodell der GvHD**

In vorherigen *in-vitro*-Untersuchungen konnte eine deutliche Verbesserung der Supprimierbarkeit von T-Zellen aus MS-Patienten nach DMF-Therapie beobachtet werden. Basierend auf diesen Ergebnissen sollte nun in den nächsten *in-vivo*-Experimenten analysiert werden, ob Treg die Entstehung von T-Effektorzellen und die Ausbildung einer GvHD in Mäusen nach dem Transfer Treg-depletierter PBMC aus DMF-therapierten MS-Patienten verhindern können. Der Versuchsablauf erfolgte analog zu 4.2.1:  $5 \times 10^6$  Treg-depletierte PBMC von gesunden Spendern (HC) bzw. MS-Patienten nach DMF-Therapie (DMF) wurden in neugeborene  $Rag2^{-/-}\gamma c^{-/-}$ -Mäuse intraperitoneal transferiert. Ein Teil der Mäuse erhielt zusätzlich  $5 \times 10^5$  Treg zusammen mit  $5 \mu\text{g}$  gp120 (Abbildung 18A).

Es konnte eine vergleichbare Kinetik der GvHD-Entwicklung nach dem Transfer von Immunzellen aus therapierten MS-Patienten bzw. gesunden Spendern beobachtet werden, die in beiden Versuchsgruppen letal verlief (Abbildung 18B, graue und grüne Kreise). Durch den zusätzlichen Transfer aktivierter Treg wurde die Induktion dieser letal verlaufenden GvHD in beiden Versuchsgruppen erfolgreich unterdrückt, was sich in einer deutlich erhöhten Überlebensrate äußerte (Abbildung 18B, graue und grüne Dreiecke).

Die DMF-Therapie modulierte offensichtlich die Funktion von T-Zellen der MS-Patienten und stellte die Ansprechbarkeit für eine Treg-vermittelte Suppression wieder her. Aufgrund der verbesserten Ansprechbarkeit konnte die Aktivierung und Differenzierung der T-Zellen erfolgreich durch Treg unterdrückt werden und somit die Ausbildung einer GvHD verhindert werden.



**Abbildung 18: DMF verbessert wesentlich die Treg-Sensitivität von T-Zellen in MS-Patienten.**

A) Schematische Darstellung des *in-vivo*-Versuchs.  $5 \times 10^6$  Treg-depletierte PBMC von DMF-therapierten MS-Patienten (DMF) bzw. gesunden Spendern (HC)  $\pm 5 \times 10^5$  Treg +  $5 \mu\text{g}$  gp120 wurden in neugeborene  $\text{Rag}2^{-/-}\gamma\text{C}^{-/-}$ -Mäuse transferiert. Als Kontrolle dienen unbehandelte Mäuse ( $\emptyset$ ). Die Gewichtszunahme und Überlebensrate der Tiere wurde über einen Zeitraum von ca. 6 Wochen dokumentiert. B) Dargestellt ist das Überleben der Tiere ( $n=5$  Mäuse pro Gruppe) über einen Zeitraum von 35 Tagen nach Transfer der Immunzellen.

#### 4.2.3 Treg reduzieren den Anteil aktivierter und proliferierender $\text{CD}4^+$ T-Zellen aus DMF-behandelten MS-Patienten *in vivo*

Die Einwanderung von humanen  $\text{CD}4^+$  T-Zellen in die Milz immundefizienter Mäuse stellt den ersten und essentiellen Schritt für die Ausbildung einer GvHD dar. Dort angekommen werden T-Zellen aktiviert und differenzieren in autoaggressive T-Effektorzellen. Der Nachweis humaner T-Zellen in der Milz ist ein früher Parameter der entstehenden GvHD und wurde vergleichend nach dem Transfer von Treg-depletierten PBMC aus gesunden Spendern, unbehandelten



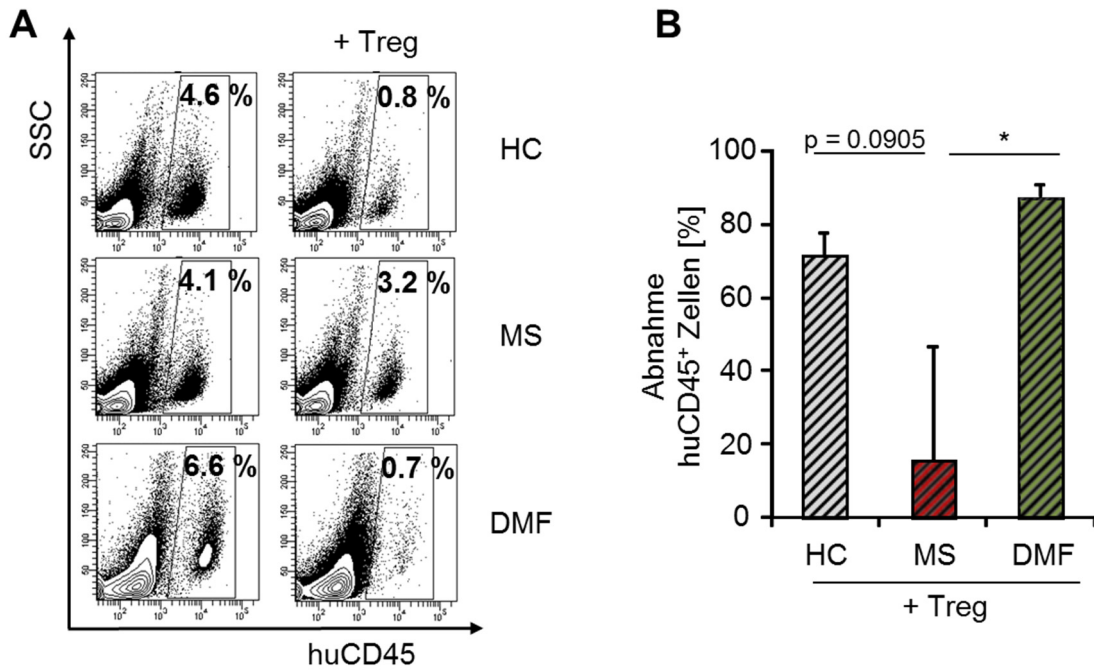
MS-Patienten und DMF-therapierten Patienten  $\pm$  Treg eines unabhängigen gesunden Spenders untersucht. Für diese Analysen wurden die Mäuse bereits acht Tage nach Übertragung der humanen Immunzellen abgetötet und der Anteil humaner T-Zellpopulationen in den Milzen durchflusszytometrisch bestimmt. Nach dem Transfer Treg-depletierter PBMC konnte bei allen Versuchsgruppen ein vergleichbarer Anteil humaner CD45<sup>+</sup> Immunzellen nachgewiesen werden (Tabelle 5).

**Tabelle 5: Anteil humaner CD45<sup>+</sup>Zellen in der Milz acht Tage nach dem Transfer humaner Immunzellen.**

|                                   | HC                 | HC+Treg         | MS                 | MS+Treg         | DMF                | DMF+Treg           |
|-----------------------------------|--------------------|-----------------|--------------------|-----------------|--------------------|--------------------|
| huCD45 <sup>+</sup><br>Zellen [%] | 5,77 $\pm$<br>3,89 | 1,77 $\pm$ 0,28 | 3,87 $\pm$<br>0,52 | 2,80 $\pm$ 0,86 | 7,41 $\pm$<br>3,06 | 0,79 $\pm$<br>0,15 |

*Treg-depletierte PBMC von gesunden Spendern, unbehandelten MS-Patienten und DMF-therapierten Patienten wurden  $\pm$  Treg eines unabhängigen gesunden Spenders in neugeborene Rag2<sup>-/-</sup> $\gamma$ c<sup>-/-</sup>-Mäuse transferiert. Acht Tage nach PBMC-Transfer wurden die Mäuse abgetötet, die Milzen aufgearbeitet und der Anteil humaner CD45<sup>+</sup> Zellen bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM von n=5 Mäusen pro Gruppe.*

Der einmalige Transfer aktivierter Treg reduzierte den Anteil humaner Zellen in den Milzen um bis zu 80 % in den Versuchsgruppen, denen zuvor PBMC gesunder Spender bzw. DMF-therapierter MS-Patienten transferiert wurden. Keine Reduktion konnte in Tieren nachgewiesen werden, denen PBMC aus unbehandelten MS-Patienten mit Treg injiziert wurden (Tabelle 5, Abbildung 19A, B). Dieses Ergebnis zeigte, dass aktivierte Treg auch in dem *in-vivo*-Modell die Proliferation und Differenzierung Treg-resistenter T-Zellen aus dem Blut von MS-Patienten nicht effizient inhibieren konnten.

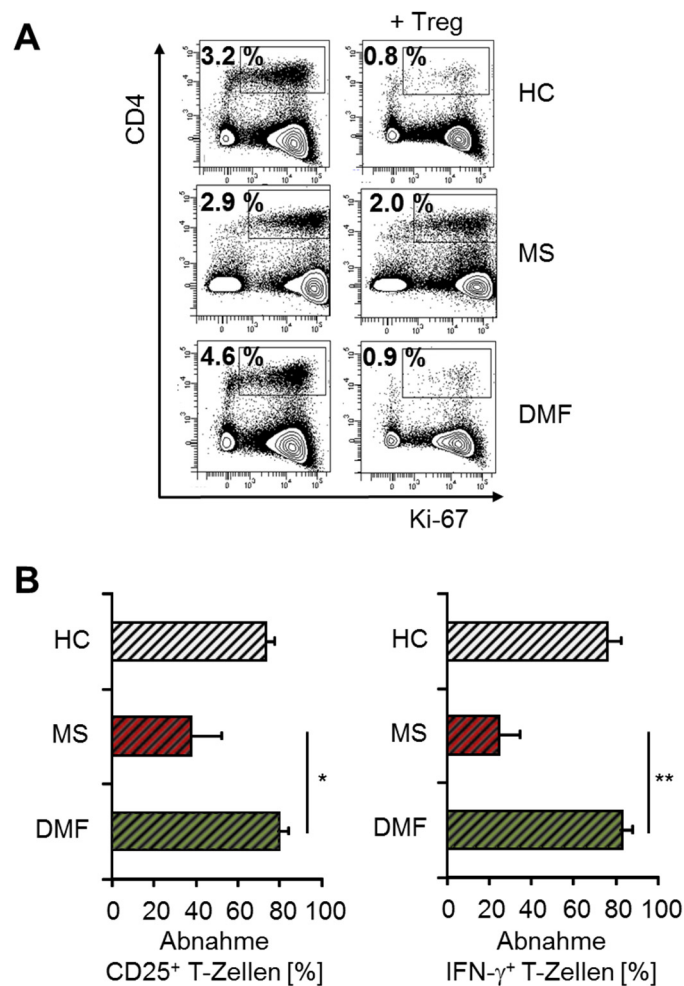


**Abbildung 19: Durchflusszytometrische Analyse humaner CD45<sup>+</sup> Immunzellen aus der Milz humanisierter Mäuse.**

A) Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis zur durchflusszytometrischen Analyse des Anteils CD45<sup>+</sup> Zellen in der Milz acht Tage nach Übertragung von PBMC ( $\pm$  Treg) aus gesunden Spendern (HC), therapienaiven MS-Patienten (MS) oder DMF-behandelte Patienten (DMF). B) Das Balkendiagramm fasst die durchschnittliche Abnahme humaner CD45<sup>+</sup> Zellen (in %)  $\pm$  SEM von  $n=5$  Mäusen pro Gruppe zusammen.

Durch die Bestimmung der Zellzahlen in der Milz konnte nur indirekt auf die Proliferation eingewanderter T-Zellen geschlossen werden. Deshalb wurde in zusätzlichen Analysen der Aktivierungsgrad und die Proliferation der T-Zellen *ex vivo* bestimmt. Hierfür wurde die Expression des Aktivierungsmarkers CD25, der  $\alpha$ -Untereinheit des Interleukin-2-Rezeptors und die Produktion des pro-inflammatorischen Zytokins IFN- $\gamma$  analysiert. Der Nachweis proliferierender T-Zellen wurde über die Expression des Ki-67 Proteins bestimmt. In den Mäusen, die zuvor mit Treg-sensitiven PBMC behandelt wurden, konnte nur eine geringe Expression von CD25, Ki-67 und IFN- $\gamma$ -produzierenden T-Zellen beobachtet werden (Abbildung 20A, B). Jedoch konnten Treg den Anteil an aktivierten und proliferierenden T-Zellen in Mäusen, die mit Treg-resistenten PBMC aus MS-Patienten behandelt wurden, nicht effizient reduzieren.

Dies deutete darauf hin, dass transferierte Treg die entzündliche T-Zell-Reaktion unterdrücken, indem sie frühzeitig den Aktivierungsprozess der CD4<sup>+</sup> T-Zellen inhibieren und deren Proliferation und Differenzierung supprimieren. Eine effiziente Unterdrückung der GvHD ist hierbei abhängig von der Sensitivität der T-Zellen für eine Treg-vermittelte Suppression. Funktionell aktive Treg können eine GvHD-Induktion durch Treg-sensitive T-Zellen erfolgreich unterdrücken, aber nicht die Aktivierung Treg-resistenter T-Zellen aus dem Blut unbehandelter MS-Patienten.



**Abbildung 20: Verringerter Anteil aktivierter und proliferierender CD4<sup>+</sup> T-Zellen in vivo durch Treg-vermittelte Suppression.**

Acht Tage nach Übertragung der humanen Immunzellen  $\pm$  Treg wurden die Mäuse abgetötet und die Expression von Ki-67, CD25 und IFN- $\gamma$  innerhalb CD4<sup>+</sup> T-Zellen ex vivo bestimmt. A) Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis zur durchflusszytometrischen Analyse der Ki-67-Expression. Hierfür wurden die Zellen zunächst fixiert, permeabilisiert und anschließend mit anti-Ki-67 mAk inkubiert. B) Die Balkendiagramme zeigen die durchschnittliche Abnahme an CD25<sup>+</sup> oder IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> T-Zellen durch Treg-Transfer  $\pm$  SEM. Abgebildet sind die kumulierten Daten aus n=5 Mäusen pro Gruppe.

### 4.3 Molekularbiologische Untersuchungen zur Rolle der Phosphatase PTEN in der Entstehung einer Treg-Resistenz

---

In den letzten Jahren fokussierten sich einige Forscher auf die Identifizierung molekularer Signalwege, die mit der Treg-Resistenz in T-Zellen assoziiert sind. Hierbei spielen zum einen extrazelluläre Faktoren wie IL-6 eine wesentliche Rolle. Erhöhte Konzentrationen an IL-6 sowie eine dysregulierte IL-6-Produktion sind deutlich an der Pathogenese verschiedener chronischer Autoimmunerkrankungen wie Multipler Sklerose, rheumatoider Arthritis, Morbus Crohn und Typ-1-Diabetes beteiligt (59-62). Studien von Trinschek *et al.* zeigten eine beschleunigte IL-6-Produktion in T-Zellen von RRMS-Patienten nach TZR-vermittelter Aktivierung. Diese gestörte IL-6-Produktion korrelierte mit einer erhöhten IL-6R-Expression und einer verminderten Ansprechbarkeit der T-Zellen auf die Treg-vermittelte Immunsuppression (43).

Die Stimulation des IL-6R, durch Bindung seines Liganden IL-6, induziert die Aktivierung verschiedenster intrazellulärer Signalübertragungsmechanismen, wie beispielsweise dem JAK-STAT-Signalweg (63, 64) oder dem PI3K-Akt-Signalweg (65, 66). Im Kontext der MS stellt der Aktivierungszustand der PKB/c-Akt einen kritischen Faktor für die Ausbildung einer Treg-Resistenz in T-Zellen dar (67). In Studien mit Treg-resistenten T-Zellen aus dem peripheren Blut von unbehandelten MS-Patienten wurde eine Hyperaktivierung der PKB/c-Akt nachgewiesen. Die Hemmung der PKB/c-Akt-Aktivierung durch spezifische Inhibitoren konnte die Empfindlichkeit der T-Zellen für die Treg-vermittelte Suppression wiederherstellen (43). Die Mechanismen, die letztendlich zu einer Hyperaktivierung der PKB/c-Akt in T-Zellen von MS-Patienten führen, sind nicht vollständig geklärt. Daher fokussierten wir uns in weiteren Versuchen auf die Analyse spezifischer Proteine, die die Aktivierung und Inaktivierung von PKB/c-Akt regulieren. Die Phosphatase PTEN (engl.: phosphatase and tensin homolog) ist ein wichtiger negativer Regulator der PKB/c-Akt-Aktivierung. PTEN dephosphoryliert Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat (PIP<sub>3</sub>) zu Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP<sub>2</sub>), wodurch weniger PIP<sub>3</sub> für die Akt-Aktivierung zur Verfügung steht und infolgedessen der Akt-Signalweg gehemmt wird (68, 69).

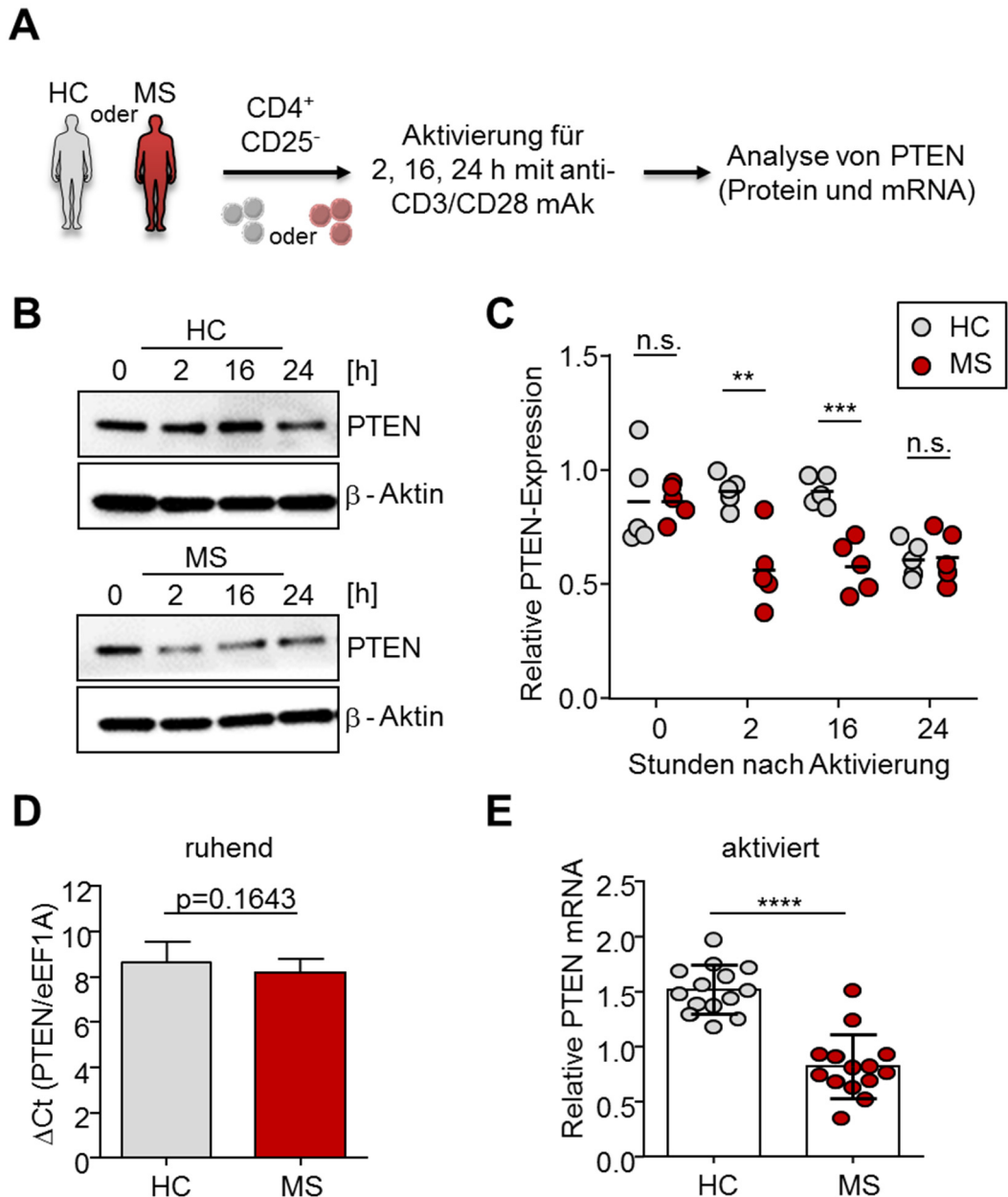
Ziel dieser Folgeversuche war es, die Funktion von PTEN im Kontext der Treg-Resistenz näher zu analysieren. Hierfür wurde die Expression von PTEN in T-

Zellen aus unbehandelten MS-Patienten und gesunden Spendern vergleichend untersucht. Es sollte überprüft werden, ob die beobachtete Hyperaktivierung der PKB/c-Akt auf eine gestörte PTEN-Expression in T-Zellen von MS-Patienten zurückzuführen ist und folglich mit einer Treg-Resistenz assoziiert werden kann.

#### **4.3.1 Beschleunigte Abnahme der PTEN-Expression in T<sub>H</sub>17 von MS-Patienten**

Zunächst wurde die PTEN-Proteinexpression in T-Zellen von unbehandelten MS-Patienten und gesunden Spendern vergleichend analysiert. Hierfür wurden CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T-Zellen aus dem peripheren Blut der Spender isoliert und für 2, 16 und 24 h mit anti-CD3 und anti-CD28 mAk polyklonal aktiviert. Ruhende T-Zellen dienten als Kontrolle. Die T-Zellen wurden zu den jeweiligen Zeitpunkten nach Aktivierung geerntet und die Proteine extrahiert. Die PTEN-Proteinexpression wurde anschließend mittels SDS-PAGE und Western Blot untersucht (Abbildung 21A).

Im ruhenden Zustand wiesen T-Zellen von MS-Patienten und gesunden Spendern eine ähnliche PTEN-Expression auf. Nach polyklonaler Aktivierung konnte eine beschleunigte Abnahme der PTEN-Proteinexpression in T-Zellen von MS-Patienten im Vergleich zu gesunden Spendern beobachtet werden. CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus gesunden Spendern zeigten erst 24 h nach Aktivierung eine deutliche Reduktion der PTEN-Expression, wohingegen in T-Zellen von MS-Patienten bereits 2 h nach Aktivierung eine signifikante Abnahme nachgewiesen werden konnte (Abbildung 21B, C). Parallel wurde das Expressionslevel der PTEN mRNA in CD4<sup>+</sup> T-Zellen vor und nach polyklonaler Aktivierung mittels PCR bestimmt. Der Elongationsfaktor 1A (engl.: eukaryotic translation elongation factor 1A, eEF1A) wurde hierbei als Haushaltsgen mitgeführt. Die Ergebnisse zeigten vergleichbare Expressionslevel der PTEN mRNA in ruhenden T-Zellen aus MS-Patienten und gesunden Spendern (Abbildung 21D). Zwei Stunden nach polyklonaler Aktivierung wiesen T-Zellen von gesunden Spendern eine deutliche Hochregulation der PTEN mRNA auf, die in T-Zellen unbehandelter MS-Patienten nicht beobachtet werden konnte (Abbildung 21E).



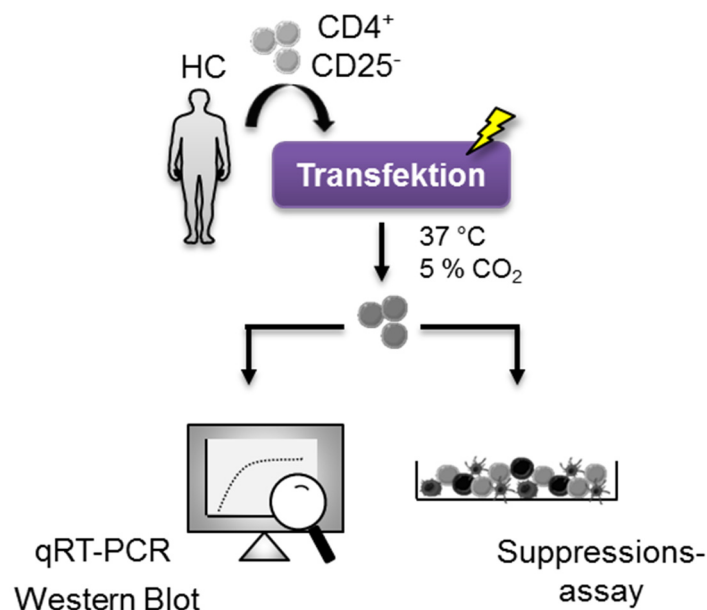
**Abbildung 21: Beschleunigte Abnahme der PTEN-Proteinexpression in MS T-Zellen nach Aktivierung.**

A) Schematische Darstellung zum Versuchsablauf. B) Der Western Blot zeigt die PTEN-Proteinexpression von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T-Zellen aus gesunden Spendern (HC) und MS-Patienten (MS) zu verschiedenen Zeitpunkten nach Aktivierung mit 0,5  $\mu$ g/ml anti-CD3 und 1  $\mu$ g/ml anti-CD28 mAk. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis von n=5 Experimenten. Als Ladekontrolle wurde  $\beta$ -Aktin mitgeführt. C) Densitometrische Analyse der PTEN-Proteinexpression in CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T-Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten nach polyklonaler Aktivierung. Die PTEN-Expression wurde auf die entsprechende  $\beta$ -Aktin-Kontrolle normalisiert. Jeder Punkt repräsentiert die PTEN-Expression eines einzelnen Spenders (n=5). D) Relative Expression der PTEN mRNA in ruhenden CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T-Zellen von HC und MS. Dargestellt ist die mittlere PTEN-Expression  $\Delta Ct$  (PTEN/eEF1A)  $\pm$  SD von jeweils n=14 Spendern. E) Relative PTEN mRNA zwei Stunden nach Aktivierung mit 0,5  $\mu$ g/ml anti-CD3 und 1  $\mu$ g/ml anti-CD28 mAk. Hierbei wurde die PTEN-Expression in aktivierten T-Zellen auf die PTEN-Expression in der entsprechenden unstimulierten Kontrolle normalisiert. Jeder Punkt repräsentiert einen einzelnen Spender (n=14).

### 4.3.2 Modulation der PTEN-Expression in CD4<sup>+</sup> T-Zellen gesunder Spender

Anhand der vorherigen Untersuchungen konnte ein verändertes PTEN-Expressionsmuster in T-Zellen von MS-Patienten nach TZR-vermittelter Aktivierung nachgewiesen werden. Um zu analysieren, welchen Einfluss eine Änderung der PTEN-Expression auf die Supprimierbarkeit von T-Zellen hat, wurden PTEN-Knockdown-Versuche mit T-Zellen aus dem peripheren Blut von gesunden Spendern durchgeführt. Eine Reduktion der PTEN-Expression könnte zu einer Hyperaktivierung der PKB/c-Akt und folglich zu einer verminderten Ansprechbarkeit für die Treg-vermittelte Suppression führen.

Zur Untersuchung dieser Hypothese wurden frisch isolierte CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T-Zellen mit einer PTEN-spezifischen siRNA transfiziert und für 24 bis 48 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> im Brutschrank inkubiert. Im Anschluss wurde die PTEN-Expression der transfizierten T-Zellen auf mRNA- und Proteinebene überprüft. Parallel zu den molekularbiologischen Untersuchungen wurde die Supprimierbarkeit der behandelten T-Zellen im *in-vitro*-Suppressionsassay bestimmt (Abbildung 22).



**Abbildung 22: Experimenteller Aufbau der PTEN-Knockdown-Versuche.**

Negativ angereicherte CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T-Zellen aus einem gesunden Spender (HC) wurden mit einer PTEN-spezifischen siRNA transfiziert und für 24 bis 48 Stunden im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Als Kontrolle dienten T-Zellen, die mit einer Kontroll-siRNA behandelt wurden. Die Effizienz des Knockdowns wurde mittels qRT-PCR und Western Blot bestimmt. Parallel hierzu wurde die Supprimierbarkeit der transfizierten T-Zellen in einem *in-vitro*-Suppressionsassay untersucht.

Als intrinsische Kontrolle der Transfektion wurde ein Teil der T-Zellen mit einem Plasmid behandelt, welches das „Green Fluorescent Protein“ (GFP) kodierte. 24 h nach Transfektion erfolgte die Analyse des PTEN-Knockdowns mittels qRT-PCR sowie die durchflusszytometrische Bestimmung der GFP-Expression. Insgesamt wurden neun unabhängige PTEN-Knockdown-Versuche durchgeführt. Die Knockdown-Effizienz reichte hierbei von 66-81 % (Tabelle 6).

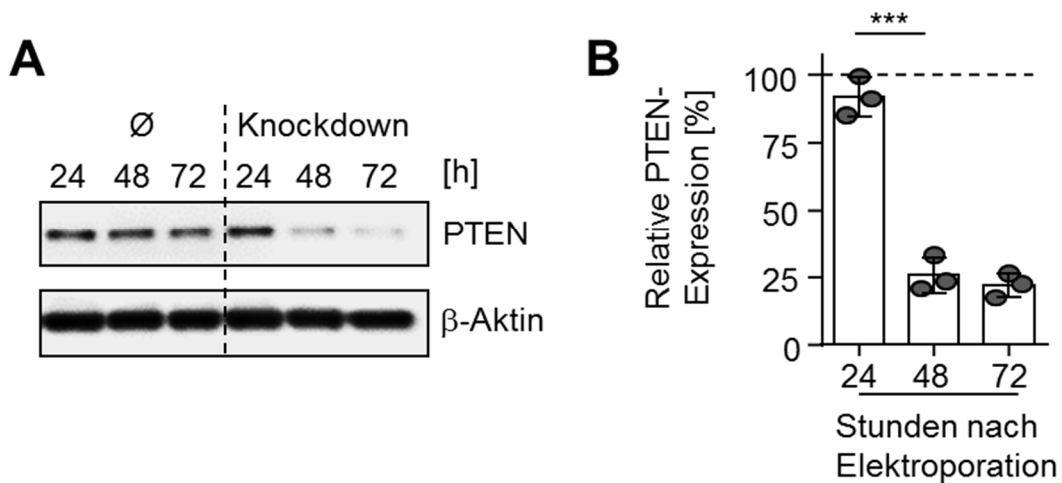
**Tabelle 6: Effizienz des PTEN-Knockdowns in CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T-Zellen gesunder Spender.**

| Versuch                               | #1 | #2 | #3 | #4 | #5 | #6 | #7 | #8 | #9 |
|---------------------------------------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
| PTEN-Knockdown [%]                    | 74 | 80 | 81 | 67 | 80 | 72 | 69 | 66 | 75 |
| Kontrolle GFP <sup>+</sup> Zellen [%] | 61 | 70 | 65 | 63 | 69 | 59 | 57 | 63 | 68 |

*Isolierte CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T-Zellen aus dem peripheren Blut gesunder Spender wurden mit einer PTEN-spezifischen siRNA elektroporiert. Zur Kontrolle der Transfektion wurde ein Teil der T-Zellen mit einem GFP-Plasmid behandelt. 24 Stunden nach Elektroporation wurde der PTEN-Knockdown mittels qRT-PCR bestimmt. Die Analyse der GFP-Expression in den Kontrollansätzen erfolgte mittels Durchflusszytometrie. Die Tabelle fasst die Knockdown-Effizienz von n=9 unabhängigen Versuchen zusammen.*

Die Analyse der PTEN-Proteinexpression erfolgte mittels SDS-PAGE und Western-Blot. Hierfür wurden mindestens 2x10<sup>6</sup> T-Zellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Transfektion gesammelt und die Proteine extrahiert. Anschließend wurden die Proteine unter denaturierten und reduzierenden Bedingungen in einer Gel-Elektrophorese aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran übertragen und die Proteinexpression mit Hilfe HRP-gekoppelter Antikörper bestimmt. 48 h nach Transfektion konnte in den T-Zellen ein Knockdown des PTEN-Proteins von durchschnittlich 74,1 ± 6,6 % nachgewiesen werden (Abbildung 23A, B).



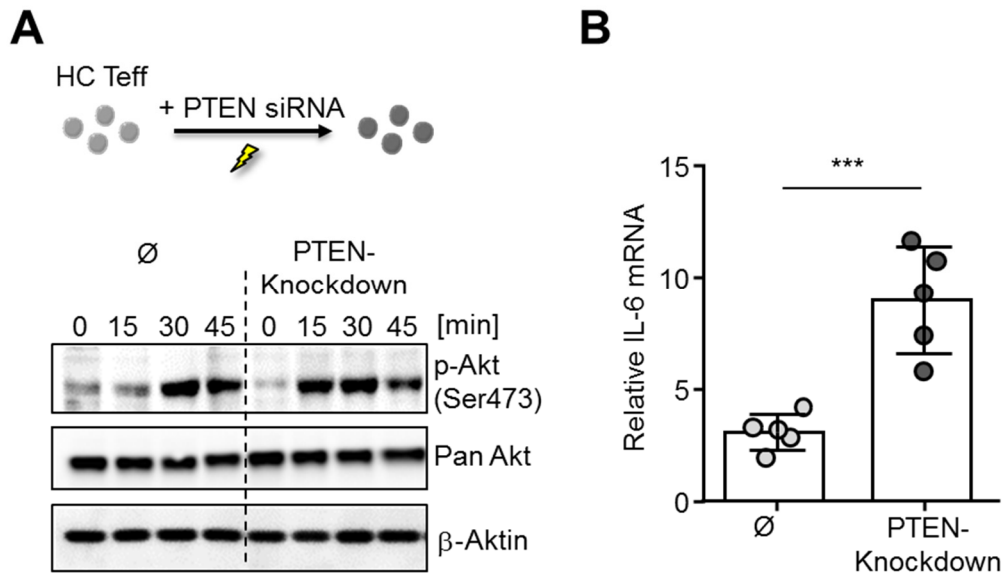


#### Abbildung 23: Analyse des PTEN-Knockdowns auf Proteinebene.

A) Der Western Blot zeigt die PTEN-Expression von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T-Zellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Transfektion mit Kontroll-siRNA (Ø) und PTEN-spezifischer siRNA. Als Ladekontrolle wurde β-Aktin mitgeführt. B) Densitometrische Analyse der PTEN-Expression 24, 48 und 72 h nach Transfektion. Die PTEN-Expression jeder Probe wurde zunächst auf die entsprechende β-Aktin-Kontrolle normalisiert und anschließend mit der PTEN-Expression in T-Zellen, die mit einer Kontroll-siRNA transfiziert wurden, in Relation gesetzt. Dargestellt sind die Ergebnisse aus n=3 unabhängigen Versuchen.

#### 4.3.3 PTEN-Knockdown blockiert die Supprimierbarkeit von CD4<sup>+</sup> T-Zellen durch regulatorische T-Zellen

Die Transfektion mit einer PTEN-spezifischen siRNA führte zu einer erfolgreichen Reduktion der PTEN-Expression auf mRNA- und Proteinebene. Da die Phosphatase PTEN einen wichtigen Gegenspieler der Akt-Aktivierung darstellt, untersuchten wir in nachfolgenden Experimenten zuerst den Phosphorylierungsgrad der PKB/c-Akt in T-Zellen mit PTEN-Knockdown. Nach TZR-vermittelter Stimulation konnte in diesen Zellen eine verstärkte Phosphorylierung der PKB/c-Akt (Ser473) nachgewiesen werden. Die basale Expression der Proteinkinase wurde durch die Modulation der PTEN-Expression nicht beeinflusst (Abbildung 24A). Vergleichende Analysen zur IL-6-Bildung zeigten zudem eine beschleunigte Produktion der IL-6 mRNA in T-Zellen mit PTEN-Knockdown (Abbildung 24B).



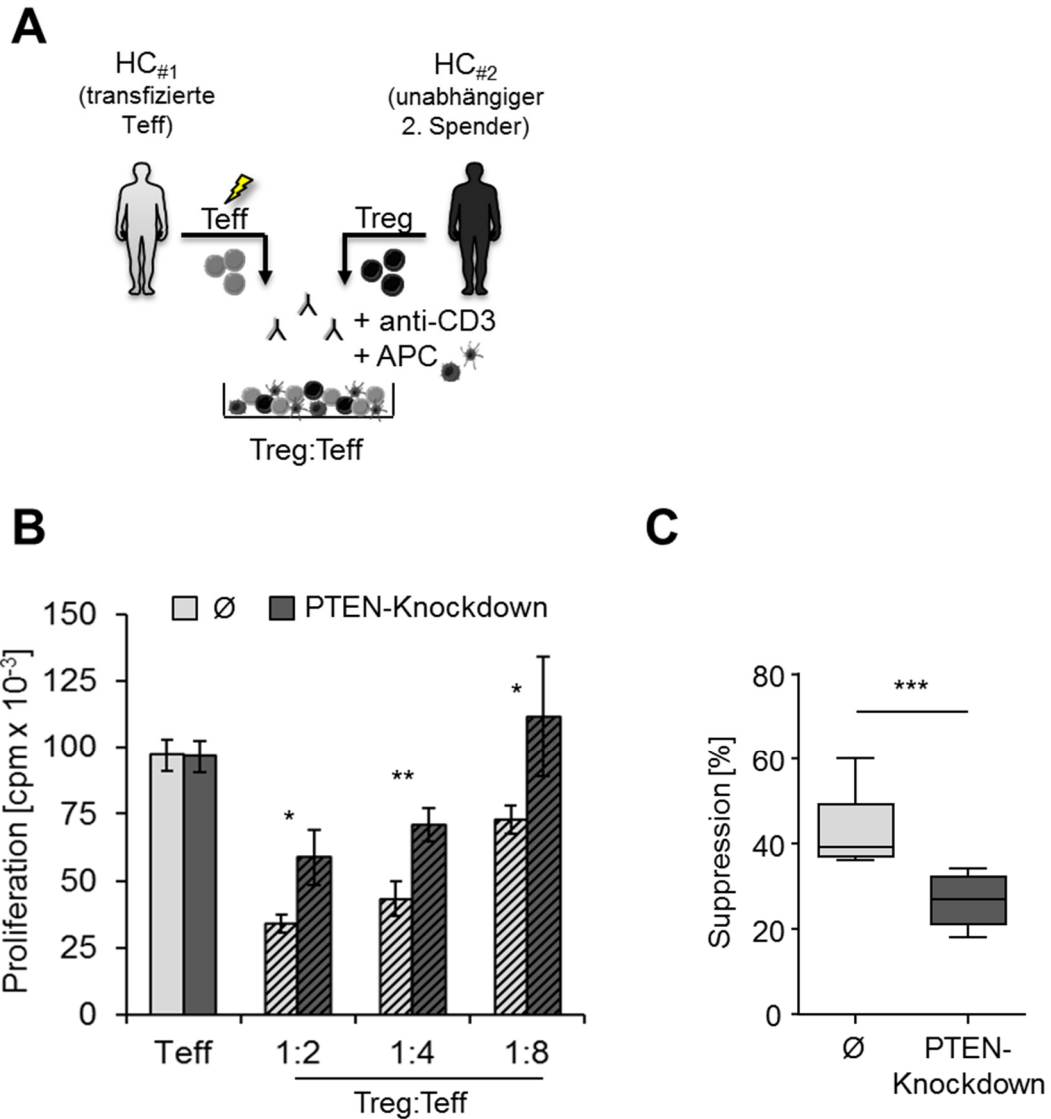
**Abbildung 24: Beschleunigte IL-6-Produktion und Aktivierung der PKB/c-Akt in T-Zellen mit PTEN-Knockdown.**

A) Transfizierte  $CD4^+CD25^-$  T-Zellen wurden für 0, 15, 30, 45 min mit anti-CD3 und anti-CD28 mAk aktiviert und anschließend die Phosphorylierung der PKB/c-Akt mittels Western Blot untersucht. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis von  $n=3$  unabhängigen Experimenten. Als Ladekontrolle wurde  $\beta$ -Aktin mitgeführt. B) Transfizierte T-Zellen wurden für 4 h mit anti-CD3 und anti-CD28 mAk stimuliert und die IL-6-mRNA-Expression mittels qRT-PCR bestimmt. Unstimulierte T-Zellen wurden als Kontrolle mitgeführt. Die IL-6-mRNA-Expression in aktivierten T-Zellen wurde auf die mRNA-Expression in der entsprechenden unstimulierten Kontrolle normiert, um die Änderung der IL-6-mRNA-Expression nach Aktivierung bestimmen zu können. Die Balkendiagramme stellen den Mittelwert  $\pm$  SD aus  $n=5$  unabhängigen Versuchen dar.

Inwieweit die verminderte PTEN-Expression jedoch die Regulierbarkeit der T-Zellen beeinflusste, sollte in weiterführenden Versuchen analysiert werden. Wie zuvor in 4.3.2 beschrieben, wurde die Supprimierbarkeit der T-Zellen nach erfolgreicher Transfektion *in vitro* bestimmt. Hierfür wurden die transfizierten T-Zellen mit frisch isolierten Treg eines unabhängigen zweiten gesunden Spenders kointiviert und mit anti-CD3 mAk sowie APC stimuliert (Abbildung 25A). Die Aktivierung der T-Zellen in Abwesenheit von Treg diente als Kontrolle.

Die Proliferation der T-Zellen nach TZR-vermittelter Aktivierung wurde durch die Reduktion der PTEN-Expression nicht beeinflusst. In Abwesenheit von Treg zeigten die T-Zellen der Kontroll- und Knockdownansätze vergleichbare Proliferationsraten. Interessanterweise konnte in Anwesenheit von Treg eine deutlich verringerte Supprimierbarkeit von T-Zellen mit PTEN-Knockdown festgestellt werden (Abbildung 25B). Die kumulierten Daten von insgesamt neun unabhängigen

gen Versuchen zeigten, bei einem Treg:Teff-Verhältnis von 1:4, eine durchschnittliche T-Zell-Suppression von  $43,3 \pm 3,2 \%$  in den Kontrollansätzen und  $26,3 \pm 2,1 \%$  in den Ansätzen mit PTEN-Knockdown (Abbildung 25C).



**Abbildung 25: PTEN-Knockdown vermindert die Supprimierbarkeit von T-Zellen.**

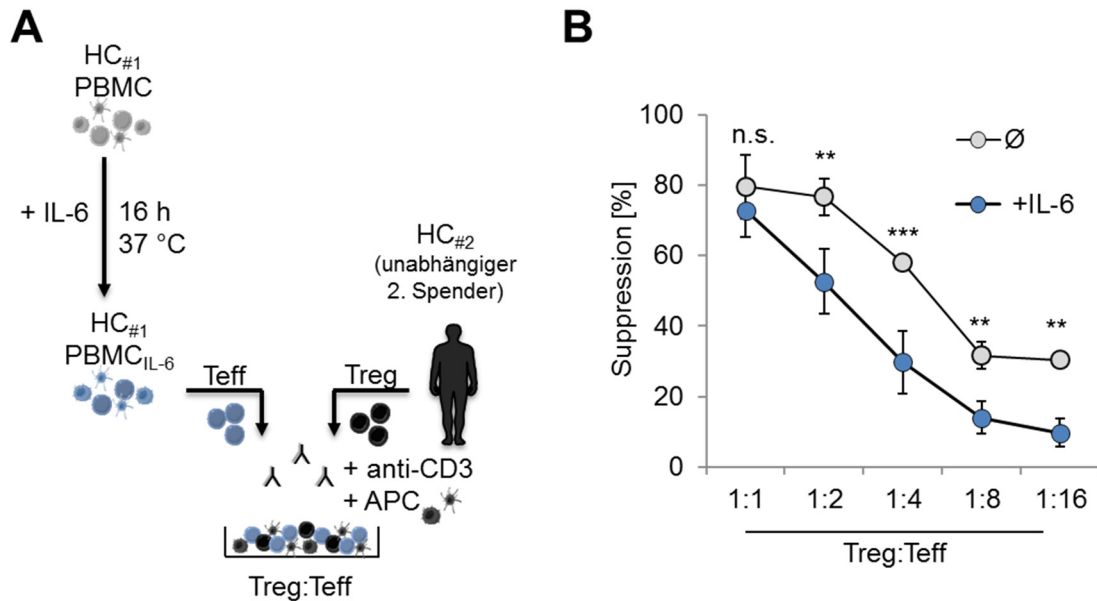
A) Schematische Darstellung des Suppressionsassays: Transfizierte Teff aus HC#1 wurden mit Treg eines unabhängigen zweiten Spenders HC#2 kokultiviert und mit anti-CD3 mAk + APC aktiviert. Die T-Zell-Proliferation wurde am dritten Tag durch den Einbau von <sup>3</sup>H-Tdr bestimmt. B) Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis eines Suppressionsassays mit T-Zellen, die zuvor mit einer PTEN-spezifischen siRNA behandelt wurden (dunkelgrau). Als Kontrolle dienten T-Zellen, die mit einer Kontroll-siRNA (Ø, hellgrau) transfiziert wurden. Die Stimulation der T-Zellen in Abwesenheit von Treg diente als Positivkontrolle. C) Das Box-Diagramm fasst die relative Suppression bei einem Treg:Teff-Verhältnis von 1:4 zusammen (n=9 unabhängige Versuche).

Durch die Reduktion der PTEN-Expression in T-Zellen gesunder Spender konnte sowohl eine Hyperaktivierung der PKB/c-Akt als auch eine gesteigerte Bildung des pro-inflammatorischen Zytokins IL-6 induziert werden. Dies resultierte in einer verminderten Regulierbarkeit der T-Zellen, die vergleichbar mit der beobachteten Treg-Resistenz in MS-Patienten war. Die Phosphatase PTEN scheint eine bedeutende Rolle bei der Entstehung einer Treg-Resistenz zu spielen. Die Ergebnisse lassen vermuten, dass die erhöhte Aktivität der PKB/c-Akt in MS-T-Zellen auf die dysregulierte Abnahme der PTEN-Expression zurückzuführen ist.

#### **4.3.4 IL-6 beeinflusst die PTEN-Proteinexpression in aktivierten T-Zellen**

Da das pro-inflammatorische Zytokin IL-6 entscheidend an der Entstehung einer Treg-Resistenz beteiligt ist (43, 44), erfolgten Untersuchungen zum Einfluss von IL-6 auf die Expression der Phosphatase PTEN. Mit Hilfe dieser Versuche hofften wir wichtige Erkenntnisse über die Ursache der beschleunigten Abnahme der PTEN-Expression in T-Zellen von MS-Patienten zu erhalten.

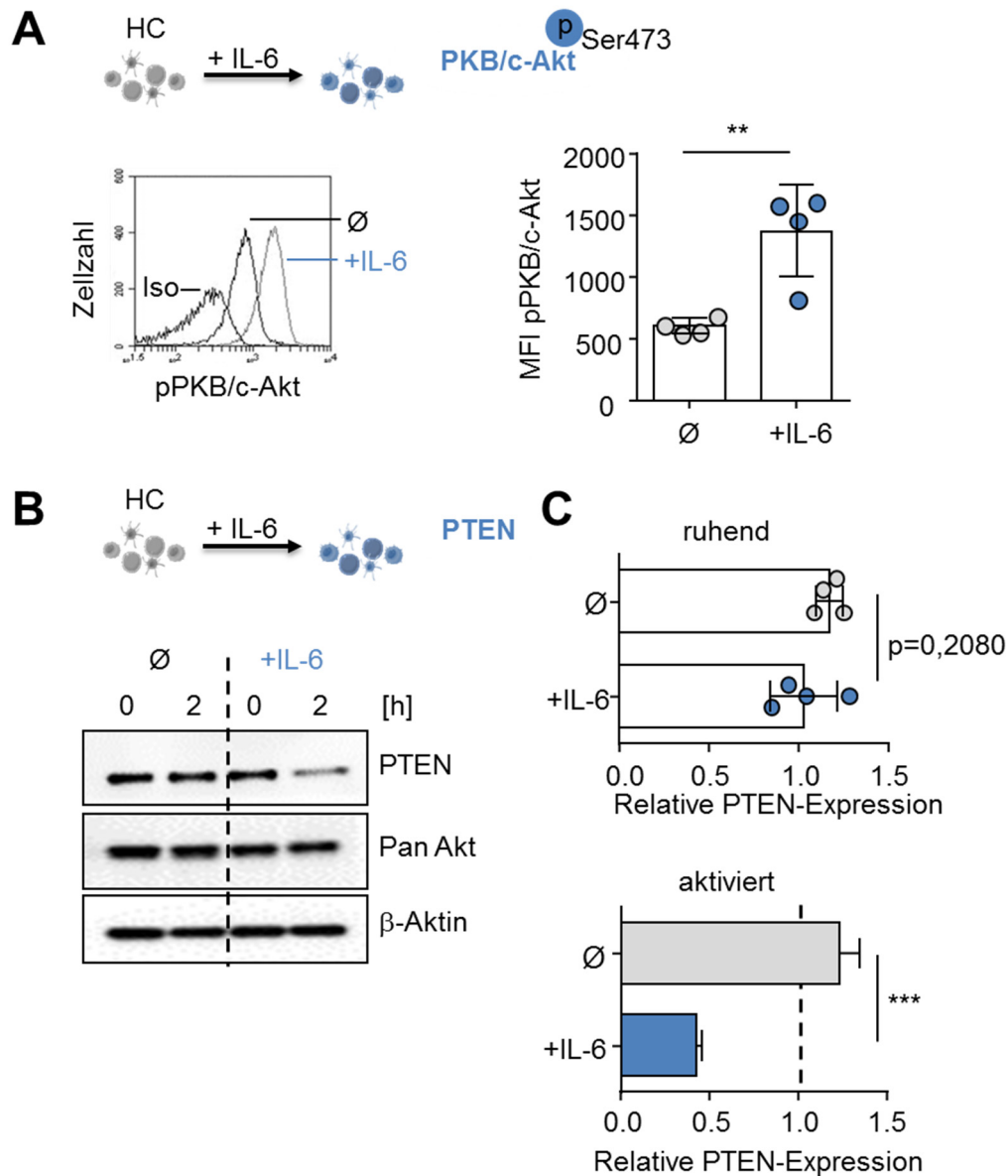
Periphere Immunzellen gesunder Spender wurden hierfür mit hohen Konzentrationen an IL-6 für mindestens 16 h bei 37 °C im Brutschrank inkubiert und anschließend CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T-Effektorzellen mittels magnetischer Zellseparation isoliert. Im Anschluss wurde die angereicherte T-Zellfraktion funktionell im *in-vitro*-Suppressionsassay getestet (Abbildung 26A). Wie bereits in früheren Studien der Arbeitsgruppe gezeigt wurde (43), führte die Vorinkubation mit IL-6 zu einer verminderten Ansprechbarkeit der T-Zellen für die Treg-vermittelte Suppression (Abbildung 26B). Die Proliferation unbehandelter T-Zellen konnte durch funktionell aktive Treg effizient unterdrückt werden, wohingegen IL-6-behandelte T-Zellen eine deutliche Treg-Resistenz aufwiesen.



**Abbildung 26: IL-6 überkommt die Treg-vermittelte Suppression.**

A) Schematische Darstellung des Suppressionsassays: PBMC aus HC#1 wurden für mindestens 16 h in reinem Medium (grau) oder Medium mit 500 ng/ml IL-6 (blau) bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> im Brutschrank inkubiert. Im Anschluss wurden CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T-Effektorzellen angereichert und im *in-vitro*-Suppressionsassay getestet. Hierfür wurden die isolierten T-Zellen mit Treg eines unabhängigen zweiten Spenders HC#2 kokultiviert und mit anti-CD3 mAk + APC aktiviert. Nach drei Tagen wurde die T-Zell-Proliferation durch den Einbau von <sup>3</sup>H-Tdr bestimmt. B) Dargestellt ist die durchschnittliche Suppression ± SD aus n=4 unabhängigen Suppressionsassays bei einem Treg:Teff-Verhältnis von 1:1-1:16. Zur Bestimmung der relativen Suppression wurde die Proliferation der Ko-Kultur auf die Proliferation von T-Zellen in Abwesenheit von Treg normiert. ∅: Kultur in reinem Medium, ohne IL-6.

Die Supprimierbarkeit der unterschiedlich behandelten T-Zellen korrelierte mit dem Phosphorylierungsgrad von PKB/c-Akt. IL-6-behandelte T-Zellen zeigten eine signifikant erhöhte Phosphorylierung der PKB/c-Akt (Ser473) im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abbildung 27A). Hierbei wurde die basale Expression der Proteinkinase durch Vorinkubation mit IL-6 nicht beeinflusst (Abbildung 27B). Weitere Untersuchungen ließen erkennen, dass sich eine Behandlung mit IL-6 auch auf die Expression der Phosphatase PTEN auswirkte. Im ruhenden Zustand wiesen T-Zellen beider Ansätze (Medium ± IL-6) zunächst eine vergleichbare PTEN-Expression auf. Nach TZR-vermittelter Aktivierung konnte jedoch in IL-6-behandelten T-Zellen eine deutliche Verminderung der PTEN-Expression nachgewiesen werden, die in unbehandelten T-Zellen nicht zu beobachten war (Abbildung 27B, C).



**Abbildung 27: IL-6 vermindert die PTEN-Expression in T-Effektorzellen.**

HC PBMC wurden für mindestens 16 h in reinem Medium (Ø, grau) oder Medium + 500 ng/ml IL-6 (blau) kultiviert. Anschließend wurden CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T-Zellen isoliert und die PKB-Phosphorylierung und PTEN-Expression analysiert. A) Links: Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis zur durchflusszytometrischen Analyse der PKB-Phosphorylierung (Ser473) mit der entsprechenden isotypischen Kontrollfärbung. Rechts: Das Diagramm fasst den durchschnittlichen MFI der PKB-Phosphorylierung ± SD aus n=4 unabhängigen Versuchen zusammen. Jeder Punkt entspricht einem individuellen Experiment. B) Der Western Blot zeigt die PTEN- und PKB-Expression vor und nach 2 h Aktivierung mit 0,5 µg/ml anti-CD3 mAk und 1 µg/ml anti-CD28 mAk. Als Ladekontrolle wurde β-Aktin mitgeführt. C) Densitometrische Analyse der PTEN-Expression in ruhenden T-Zellen und 2 h nach polyklonaler Aktivierung. Die PTEN-Expression jeder Probe wurde zunächst auf die entsprechende β-Aktin-Kontrolle normiert. Die PTEN-Expression der aktivierten T-Zellen wurde anschließend mit der PTEN-Expression von ruhenden T-Zellen in Relation gesetzt. Dargestellt ist die durchschnittliche relative PTEN-Expression ± SD aus n=4 unabhängigen Versuchen.

Anhand dieser Ergebnisse konnte ein direkter Einfluss von IL-6 auf die Expression der Phosphatase PTEN bestätigt werden. Die Behandlung mit IL-6 führte zu einer verstärkten Abnahme der PTEN-Expression nach TZR-vermittelter Aktivierung, was in einer Hyperaktivierung der PKB/c-Akt und folglich in einer verschlechterten Supprimierbarkeit der T-Zellen resultierte.

Zusammengenommen scheint die Regulation von PTEN eine bedeutende Funktion in der Entstehung einer Treg-Resistenz in T-Zellen von MS-Patienten zu haben. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass das veränderte Expressionsmuster von PTEN in MS-T-Zellen als wesentliche Ursache für die verstärkte Aktivierung der PKB/c-Akt angesehen werden kann. Neben IL-6 und der PKB/c-Akt wurde mit PTEN ein weiteres Protein identifiziert, dessen Expression essentiell für eine effiziente Immunregulation von T-Zellen ist.

#### **4.4 Vergleichende Untersuchungen zur Expression von PGC-1 $\alpha$ in T-Zellen von MS-Patienten und gesunden Spendern**

---

Die Mechanismen, die an der gestörten Immunregulation von T-Zellen in MS-Patienten beteiligt sind, sind noch nicht ausreichend geklärt. Aufgrund dessen wurden in früheren Studien der Arbeitsgruppe weiterführende Untersuchungen zu dieser Fragestellung durchgeführt. Ziel dieser Studien war die Identifizierung molekularer Signalwege in T-Zellen von MS-Patienten, die in direktem Zusammenhang mit ihrer Treg-Resistenz und den beobachteten Veränderungen der IL-6-Signaltransduktion sowie Aktivierung der PKB/c-Akt standen.

Mit Hilfe der DNA-Chip-Technologie (siehe 3.4.7) wurden die Genexpressionsprofile von ruhenden und aktivierten CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T-Zellen aus Treg-sensitiven, gesunden Spendern sowie Treg-resistenten MS-Patienten vergleichend untersucht. Die Zielsetzung bestand darin, Gene zu ermitteln, die nach TZR-vermittelter Aktivierung unterschiedlich reguliert wurden. Diese Gene wurden anschließend mit der Ingenuity Pathway Analysis Software analysiert, um potentielle Upstream-Regulatoren identifizieren zu können. Insgesamt wurden 16 Upstream-Regulatoren herausgesucht, deren Aktivitäten in MS-Patienten und gesunden Spendern als „unterschiedlich reguliert“ vorhergesagt wurden. Der Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha (PGC-1 $\alpha$ ) stellte hierbei einen vielversprechenden Kandidaten dar und ist zudem mit dem IL-6- und PKB-Signalweg assoziiert. Vorarbeiten von Dr. Bettina Trinschek zeigten bereits eine unterschiedliche Regulation der PGC-1 $\alpha$  mRNA nach TZR-vermittelter Aktivierung in T-Zellen gesunder Spender im Vergleich zu T-Zellen aus MS-Patienten. Diese Ergebnisse wurden als Patent eingereicht, 2019 erfolgte die Erteilung der Patentrechte (70).

Aufgrund der Ergebnisse zur mRNA-Expression sollte nun in abschließenden Experimenten die PGC-1 $\alpha$ -Expression auf Proteinebene in Treg-sensitiven und Treg-resistenten CD4<sup>+</sup> T-Zellen vergleichend analysiert werden.

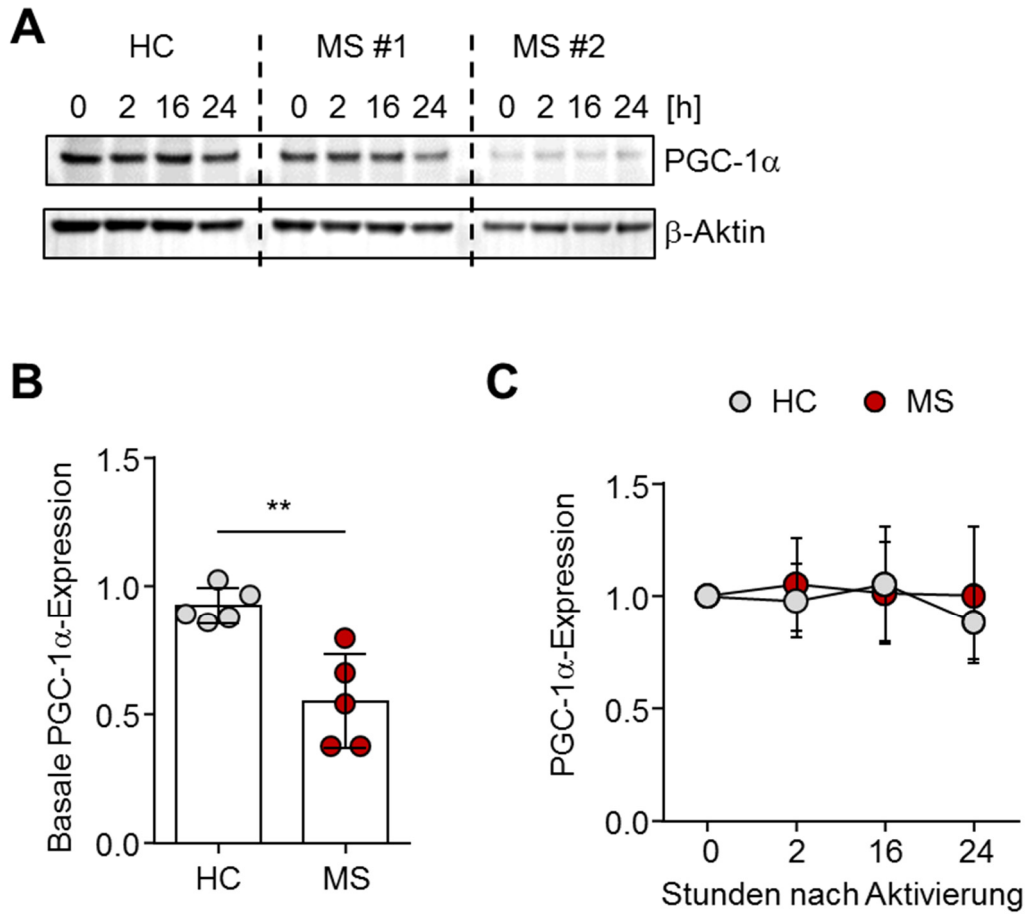


#### 4.4.1 Verminderte Expression von PGC-1 $\alpha$ in T-Zellen von MS-Patienten

PGC-1 $\alpha$  ist ein wichtiger transkriptioneller Koaktivator für die Regulation von Genen, die am Energiestoffwechsel der Zelle beteiligt sind (71). Zudem ist es der Hauptregulator der mitochondrialen Biogenese, einem essentiellen Prozess, durch den Zellen neue Mitochondrien bilden können (72, 73). In den letzten Jahren lieferten einige Studien erste Hinweise auf eine beeinträchtigte Mitochondrienfunktion als ursächlichen Faktor in der Pathogenese neurodegenerativer Erkrankungen wie Parkinson oder Alzheimer (74). Auch im Kontext der Multiplen Sklerose wurde bereits über einen Zusammenhang zwischen axonaler Degeneration und mitochondrialer Dysfunktion berichtet (75). Welche Rolle PGC-1 $\alpha$  jedoch für die Funktion und Regulation von T-Zellen spielt, ist unzureichend geklärt.

In ersten Experimenten führten wir vergleichende Untersuchungen zur PGC-1 $\alpha$ -Expression in T-Zellen gesunder Spender und MS-Patienten durch. Aus dem peripheren Blut von jeweils fünf unabhängigen Spendern wurden CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T-Zellen isoliert und mit anti-CD3/CD28 mAk für 2, 16, 24 Stunden aktiviert. Unstimulierte T-Zellen dienten als Kontrolle. Die T-Zellen wurden zu den jeweiligen Zeitpunkten geerntet und die Proteine extrahiert. Anschließend erfolgte die Analyse der PGC-1 $\alpha$ -Proteinexpression mittels Western Blot.

PGC-1 $\alpha$  konnte in allen untersuchten Proben erfolgreich auf Proteinebene nachgewiesen werden. Im ruhenden Zustand zeigten Treg-resistente T-Zellen aus MS-Patienten eine deutlich verminderte, basale PGC-1 $\alpha$ -Proteinexpression im Vergleich zu Treg-sensitiven T-Zellen aus gesunden Spendern (Abbildung 28A, B). Interessanterweise blieb die relative PGC-1 $\alpha$ -Expression nach TCR-vermittelter Aktivierung in allen Proben nahezu unverändert: Sowohl in Proteinproben aus MS-Patienten als auch aus gesunden Spendern konnte in einem Zeitraum von bis zu 24 Stunden nach Aktivierung keine signifikante Regulation der PGC-1 $\alpha$ -Expression beobachtet werden (Abbildung 28C). Weitere Untersuchungen sind notwendig, um die Bedeutung der PGC-1 $\alpha$ -Expression in T-Zellen von MS-Patienten hinsichtlich einer Treg-Resistenz klären zu können.



**Abbildung 28: Vergleichende Analysen zur PGC-1 $\alpha$ -Expression in CD4<sup>+</sup> T-Zellen.**

A) Der Western Blot zeigt die PGC-1 $\alpha$ -Proteinexpression in CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T-Zellen aus einem gesunden Spender (HC) und zwei MS-Patienten (MS#1 und MS#2) zu verschiedenen Zeitpunkten nach Aktivierung mit 0,5  $\mu$ g/ml anti-CD3 und 1  $\mu$ g/ml anti-CD28 mAk. Dargestellt sind repräsentative Ergebnisse aus n=5 Experimenten. Als Ladekontrolle wurde  $\beta$ -Aktin mitgeführt. B) Densitometrische Analyse der PGC-1 $\alpha$ -Proteinexpression in ruhenden CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T-Zellen. Die PGC-1 $\alpha$ -Expression wurde auf die entsprechende  $\beta$ -Aktin-Kontrolle normalisiert. Jeder Punkt repräsentiert die PGC-1 $\alpha$ -Expression eines einzelnen Spenders (n=5). C) Densitometrische Analyse der PGC-1 $\alpha$ -Proteinexpression in CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T-Zellen von HC und MS zu verschiedenen Zeitpunkten nach polyklonaler Aktivierung. Dargestellt ist die mittlere PGC-1 $\alpha$ -Expression  $\pm$  SD von jeweils n=5 Spendern.

## 5 Diskussion

### 5.1 Dimethylfumarat verbessert die Immunregulation von T-Zellen in MS-Patienten

---

Die vorliegende Arbeit beschäftigte sich mit Analysen zur Immunregulation von T-Zellen aus MS-Patienten nach einer Therapie mit Dimethylfumarat (DMF). Es galt zu untersuchen, ob eine DMF-Therapie die Ansprechbarkeit von T-Zellen aus MS-Patienten für die Treg-vermittelte Suppression beeinflussen kann. In Übereinstimmung mit früheren Veröffentlichungen der Arbeitsgruppe, konnte in dieser Arbeit bestätigt werden, dass T-Effektorzellen (Teff) aus unbehandelten MS-Patienten überwiegend unempfindlich für die suppressiven Regulationsmechanismen von Treg sind. Diese Treg-Resistenz ist mit Änderungen in der IL-6-Produktion und einer beeinträchtigten IL-6-Signalübertragung in Teff assoziiert (43, 44). DMF ist ein neu zugelassenes Medikament zur Behandlung der schubförmig remittierenden MS (engl.: relapsing-remitting multiple sclerosis, RRMS), dessen Wirkmechanismus bisher noch nicht vollständig geklärt wurde (76). Im Rahmen dieser Doktorarbeit konnte erstmalig gezeigt werden, dass DMF die Treg-Resistenz, einen wichtigen pathologischen Mechanismus bei MS-Patienten, beeinflusst, indem es die erhöhte IL-6R-Expression normalisiert und damit die Ansprechbarkeit von Teff für die Treg-vermittelte Suppression wiederherstellt.

Die Erkenntnisse aus Forschungsarbeiten der letzten Jahre deuten darauf hin, dass die gestörte Immunregulation von autoaggressiven T-Zellen eine entscheidende Rolle bei der Pathogenese von Autoimmunerkrankungen wie rheumatoider Arthritis, Typ-1-Diabetes und MS spielt (41, 42, 62). Diese Dysregulation von T-Zellen kann zum einen auf Defekte in der Funktion von Treg und zum anderen auf eine verminderte Ansprechbarkeit der Teff für die Treg-vermittelte Immunregulation zurückgeführt werden (36, 44, 77). Da viele immunmodulierende Medikamente heutzutage als „First-Line“-Therapie bei MS eingesetzt werden, ist es wichtig zu untersuchen, ob diese Medikamente die Funktion von Treg und die Immunregulation von Teff beeinflussen. In Studien von Haas *et al.* konnte bereits ein positiver Effekt von Glatirameracetat (Copaxone®) auf die beeinträchtigte Funktion von Treg in RRMS-Patienten festgestellt werden. Hierbei zeigte sich, dass Glatirameracetat die Funktion von Treg deutlich verbessert, indem es die

Expansion von naiven CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>CD31<sup>+</sup> T-Zellen induziert und dadurch die Frequenz an funktionell aktiven Treg in den Patienten erhöht (78). Andere Studien von Trinschek *et al.* berichten von einer verbesserten Supprimierbarkeit von Teff in RRMS-Patienten nach einer Behandlung mit IFN- $\beta$  (Rebif®). Neben der immunsuppressiven Wirkung von IFN- $\beta$  durch Erhöhung des IL-10-Serumspiegels in RRMS-Patienten, konnte in diesen Studien eine gesteigerte Ansprechbarkeit von Teff für die Treg-vermittelte Suppression in Patienten nach einer IFN- $\beta$ -Therapie nachgewiesen werden (79, 80). Die hier durchgeführten Untersuchungen zur Wirkungsweise von DMF lieferten vergleichbare Erkenntnisse: Auch eine Therapie von RRMS-Patienten mit dem immunmodulierenden Medikament DMF führt zur einer verbesserten Supprimierbarkeit von Teff durch Treg und somit zu einer Wiederherstellung der Treg-Sensitivität.

Eine Vielzahl von Autoimmunerkrankungen sind mit einer erhöhten Produktion an pro-inflammatorischen TH1-Zytokinen verbunden, die die Ausbildung einer Treg-Resistenz begünstigen (58, 81). Beispielsweise zeigen Studien von Valencia *et al.*, dass das pro-inflammatorische Zytokin TNF- $\alpha$  die suppressive Funktion von Treg in Patienten mit rheumatoider Arthritis inhibiert und zudem die Supprimierbarkeit von Teff reduziert (82). In anderen Studien von Goodman *et al.* konnte festgestellt werden, dass erhöhte IL-6-Konzentrationen in Psoriasis-Patienten die Ansprechbarkeit von Teff für die suppressive Funktion von Treg vermindern (83). MS-Patienten weisen während eines akuten Schubes deutlich erhöhte Level an IFN- $\gamma$  auf im Vergleich zu Patienten in Remission (84, 85). Spuler *et al.* beobachtete zudem eine starke Korrelation zwischen der Krankheitsaktivität im MRT und erhöhten Konzentrationen an TNF- $\alpha$  im Serum und Liquor der Patienten (86, 87). Durch Studien von Trinschek *et al.* erfolgte der Nachweis einer beschleunigten IL-6-Produktion und erhöhten IL-6R-Expression in Treg-resistenten T-Zellen von MS-Patienten (43).

Aufgrund dieser Korrelationen ist es wichtig zu untersuchen, ob immunmodulierende Medikamente auch die Produktion pro-inflammatorischer Zytokine beeinflussen können. Für die IFN- $\beta$ -Behandlung von RRMS-Patienten wurde bereits eine dominante immunsuppressive Wirkung auf die T-Zellaktivierung und die IFN- $\gamma$ -Produktion beschrieben (79, 80, 88). Klinische Studien zeigen, dass eine IFN- $\beta$ -Behandlung auch den IL-6-Serumspiegel bei RRMS-Patienten signifikant reduziert (89, 90). Des Weiteren wurde in *in-vitro*-Untersuchungen eine

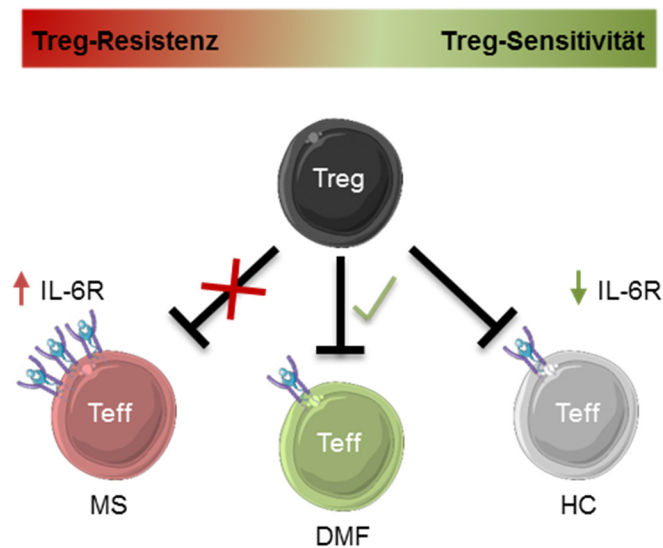
deutliche Reduktion der IL-6R-Expression auf T-Zellen von MS-Patienten nach IFN- $\beta$ -Therapie festgestellt (80). Die verringerte IL-6R-Expression und reduzierten Konzentrationen an IL-6 im Serum korrelieren hierbei mit einer verbesserten Ansprechbarkeit von Teff für die Treg-vermittelte Immunsuppression. Ähnliche Beobachtungen wurden in Versuchen mit T-Zellen aus dem peripheren Blut von DMF-therapierten MS-Patienten gemacht. Wie zuvor gezeigt, weisen diese T-Zellen ebenfalls eine reduzierte IL-6R-Expression und erhöhte Sensitivität für eine Suppression durch Treg auf. Demnach scheinen IFN- $\beta$  und DMF über Änderungen in der IL-6-Signalübertragung einer bestehenden Treg-Resistenz in T-Zellen von MS-Patienten entgegenzuwirken. Zudem konnten keine signifikanten Unterschiede in der IFN- $\gamma$ - und TNF-Synthese bei aktivierten Teff von DMF-behandelten Patienten und gesunden Spendern detektiert werden, was darauf hindeutet, dass die DMF-Therapie die postulierte Überproduktion an pro-inflammatorischen Zytokinen in MS-Patienten normalisiert. Diese Ergebnisse stimmen mit Beobachtungen anderer Forschungsgruppen überein: Nach Erkenntnissen von Jong *et al.* kann DMF selektiv die Produktion von anti-inflammatorischen TH2-Zytokinen, wie IL-4 und IL-5, in humanen Immunzellen stimulieren und so eine pro-inflammatorische Immunantwort unterdrücken (91, 92). 2011 berichtete Ghoreschi *et al.*, dass durch DMF-Behandlung vermehrt Typ2-polarisierende dendritische Zellen generiert werden, die das anti-inflammatorische Zytokin IL-10 produzieren und somit die Entwicklung pathogener TH1-Zellen reduzieren (93). In einer anderen Studie untersuchte Gross *et al.* den Einfluss von DMF auf die prozentuale Verteilung verschiedener T-Zellsubpopulationen in MS-Patienten. Hierfür wurden Patienten jeweils vor und sechs Monate nach Therapiestart vergleichend analysiert. Gross *et al.* konnte eine starke Abnahme der CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> Gedächtnis-T-Zellen beobachten, die mit einer deutlichen Reduktion der pro-inflammatorischen Zytokine IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  einherging (94).

Der adoptive Transfer von humanen Immunzellen in neugeborene, immundefiziente Mäuse führt zur Induktion einer Transplantat-gegen-Wirt-Reaktion (engl.: Graft-versus-Host disease, GvHD), die durch humane CD4<sup>+</sup> Teff vermittelt wird. Die Entstehung dieser Krankheit wird durch den Transfer einer ausreichenden Menge an aktivierten Treg verhindert (52, 54). Da die Ausbildung der GvHD auf einer antigenspezifischen, systemischen Immunantwort beruht, ist dieses Maus-

modell besonders gut geeignet, um grundlegende Parameter der Immunregulation und Modulation menschlicher T-Zell-Antworten *in vivo* zu untersuchen. Wie bereits gezeigt wurde, führt der Transfer von Immunzellen aus dem peripheren Blut von unbehandelten MS-Patienten zu einer beschleunigten Ausbildung der GvHD, die durch den zusätzlichen Transfer aktivierter Treg nicht unterdrückt werden kann. Um die Auswirkungen der DMF-Therapie auf die Regulation und Differenzierung von MS-T-Zellen zu klären, wurden periphere Immunzellen aus DMF-behandelten MS-Patienten in immundefiziente Mäuse transferiert und kurz nach GvHD-Beginn *ex vivo* analysiert. In Übereinstimmung mit den *in-vitro*-Daten unterdrückten aktivierte Treg signifikant die Proliferation und Differenzierung CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus DMF-behandelten MS-Patienten und verhinderten so die Entstehung einer tödlichen GvHD. Diese Ergebnisse verstärken nochmals den modulierenden Effekt einer DMF-Therapie auf die Regulation und die damit verbundene Supprimierbarkeit von T-Zellen.

Die MS ist eine multifaktorielle Autoimmunerkrankung, die durch komplexe Wechselwirkungen zwischen Immunzellen und Geweben verursacht wird. Für die Pathogenese und Symptomatik dieser Erkrankung gibt es nicht nur einen ursächlichen Faktor. Es ist vielmehr eine Kombination aus mehreren Faktoren bzw. Defekten, die letztendlich die Entwicklung dieser Erkrankung begünstigen (95). Wie zuvor beschrieben, sind für MS sowohl Defekte in der Funktion von Treg als auch eine gestörte Empfindlichkeit von Teff für die Treg-vermittelte Suppression bekannt (36, 44, 96). Der Erfolg einer Therapie hängt im Wesentlichen davon ab, wie effizient beide Defekte behandelt werden. Demnach ist es wichtig zu untersuchen, ob die gängigen Standardtherapien für MS beide Störungen adressieren und gegebenenfalls Kombinationstherapien nötig sind. Mit Hilfe der immunmodulierenden IFN- $\beta$ -Behandlung kann eine Verbesserung der Treg-Funktion und Supprimierbarkeit der T-Zellen erreicht werden (80, 97). In der vorliegenden Arbeit wurde überwiegend der Einfluss einer DMF-Behandlung auf die gestörte Supprimierbarkeit von Teff in MS-Patienten analysiert. Ob und inwieweit das immunmodulierende Medikament DMF auch die beeinträchtigte Funktion von Treg bei MS-Patienten beeinflusst, müssen weitere Studien zeigen.

Die Erkenntnisse aus den Untersuchungen zur Regulation peripherer T-Zellen in MS-Patienten nach DMF-Therapie lassen sich wie folgt zusammenfassen: Teff aus dem peripheren Blut von unbehandelten MS-Patienten sind durch eine erhöhte IL-6R-Expression und eine damit verbundene Resistenz gegen die Treg-vermittelte Immunregulation gekennzeichnet. Eine Behandlung mit dem immunmodulierenden „First-Line“-Medikament DMF führt zu einer Normalisierung der IL-6R-Expression sowie zu einer verbesserten Regulierbarkeit der T-Zellen durch Treg (Abbildung 29). Anhand dieser Analysen wurde ein neuer, immunregulierender Wirkmechanismus der DMF-Therapie in RRMS-Patienten identifiziert.



**Abbildung 29: Zusammenfassung zur immunregulierenden Wirkung von DMF auf T-Zellen von RRMS-Patienten.**

DMF verbessert die Sensitivität von Teff für die Treg-vermittelte Suppression durch Normalisierung der IL-6R-Expression und damit verbundenen Änderungen in der IL-6-Signalübertragung.

## 5.2 Die Rolle von PTEN und PGC-1 $\alpha$ in der Entstehung einer Treg-Resistenz

---

Die molekularen Mechanismen, die letztendlich zur Ausbildung einer Treg-Resistenz in T-Zellen von Patienten mit einer Autoimmunerkrankung führen, sind noch nicht vollständig geklärt. Bisher ist bekannt, dass die Sensitivität von T-Zellen für die suppressiven Eigenschaften von regulatorischen T-Zellen (Treg) vermutlich abhängig von dem Aktivierungsgrad der Proteinkinase B (PKB/c-Akt) ist (67). In Forschungsarbeiten von Wehrens *et al.* konnte bereits eine erhöhte Phosphorylierung der PKB/c-Akt in T-Zellen von Patienten mit juveniler idiopathischer Arthritis nachgewiesen werden (98). Diese Hyperaktivierung der PKB/c-Akt korreliert mit einer deutlich verminderten Ansprechbarkeit der T-Zellen für die Treg-vermittelte Suppression. Ähnliche Beobachtungen wurden auch im Kontext der MS gemacht: Treg-resistente T-Zellen aus dem peripheren Blut von MS-Patienten zeichnen sich ebenfalls durch einen hohen Phosphorylierungsgrad der PKB/c-Akt aus (43, 44). Somit stellt die Aktivierung und Regulation der PKB/c-Akt scheinbar einen zentralen Knotenpunkt bei der Entstehung einer Treg-Resistenz in T-Zellen von Patienten mit Autoimmunerkrankungen dar (40). Die Phosphatase PTEN (engl.: phosphatase and tensin homolog) ist ein wichtiger, negativer Regulator der PKB/c-Akt-Aktivierung (68). Im Rahmen dieser Doktorarbeit konnte eine reduzierte PTEN-Expression in aktivierten T-Zellen von MS-Patienten festgestellt werden, die als wesentliche Ursache für die Hyperaktivierung der PKB/c-Akt und die daraus resultierende Treg-Resistenz der T-Zellen angesehen werden kann. Neben PKB/c-Akt wurde mit PTEN ein weiteres Protein identifiziert, dessen Expression essentiell für eine effiziente Immunregulation von T-Zellen ist.

Die Phosphatase PTEN stellt als Gegenspieler der Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) ein wichtiges Schlüsselenzym in der Regulation der PKB/c-Akt-Aktivierung dar und kann so verschiedene zelluläre Prozesse, wie z.B. Zellproliferation und Zellmetabolismus, beeinflussen. PTEN katalysiert die Dephosphorylierung von Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat (PIP<sub>3</sub>) zu Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP<sub>2</sub>), wodurch weniger PIP<sub>3</sub> für die Akt-Aktivierung zur Verfügung steht und infolgedessen der Akt-Signalweg gehemmt wird (99). In einigen Studien konnte bereits ein Zusammenhang zwischen einer beeinträchtigten PTEN-



Expression/-Funktion und der Pathogenese verschiedener Erkrankungen beobachtet werden. Viele Tumorerkrankungen sind mit einer „loss-of-function“-Mutation im PTEN-Gen assoziiert. Hierbei führt der Funktionsverlust von PTEN zu einer Hyperaktivierung des PI3K/Akt-Signalwegs und folglich zu einer verstärkten Proliferation der Tumorzellen (100-102). Des Weiteren zeigen Untersuchungen in Mausmodellen mit T-Zell-spezifischem PTEN-Knockout, dass T-Zellen mit unkontrollierter Akt-Aktivität als Folge eines PTEN-Mangels wesentlich zur Entwicklung von Autoimmunerkrankungen und Lymphomen beitragen (103, 104). Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen ebenfalls eine Korrelation zwischen einer dysregulierten PTEN-Expression und dem Auftreten einer Autoimmunerkrankung. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T-Zellen aus dem peripheren Blut von unbehandelten MS-Patienten weisen, im Vergleich zu T-Zellen aus gesunden Spendern, eine signifikant beschleunigte Abnahme der PTEN-Expression nach polyklonaler Aktivierung auf. Diese veränderte Kinetik der PTEN-Expression wurde spezifisch in Treg-resistenten CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T-Zellen von MS-Patienten beobachtet.

Auch im Kontext einer Immunregulation von T-Zellen scheint PTEN eine entscheidende Rolle zu spielen. In Studien von Lee *et al.* führte die Überexpression von PTEN in Mäusen, die unter einer Arthritis leiden, zu einer deutlichen Verbesserung der klinischen Symptomatik, die mit einer Reduktion der inflammatorischen TH17-Zellen und Erhöhung der Treg-Frequenzen einherging (105). Suzuki *et al.* fand heraus, dass CD4<sup>+</sup> T-Zellen, isoliert aus Mäusen mit T-Zell-spezifischem PTEN-Knockout, überwiegend autoreaktiv sind, ein gesteigertes Proliferationsverhalten aufweisen und erhöhte Mengen an inflammatorischen TH1-Zytokinen sezernieren (104, 106). Zudem konnte in diesen Zellen eine verstärkte Aktivierung der PKB/c-Akt festgestellt werden. Die Untersuchungen im Rahmen dieser Doktorarbeit führten zu ähnlichen Erkenntnissen. Der gezielte PTEN-Knockdown in CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T-Zellen aus dem peripheren Blut von gesunden Spendern resultierte in einer Hyperaktivierung der PKB/c-Akt und einer beschleunigten Produktion des pro-inflammatorischen Zytokins IL-6. In weiteren *in-vitro*-Untersuchungen hinsichtlich der Supprimierbarkeit dieser T-Zellen, konnte eine verminderte Sensitivität für die Treg-vermittelte Suppression, ähnlich zur Treg-Resistenz in T-Zellen von MS-Patienten, festgestellt werden. Interessanterweise wurde das generelle Proliferationsverhalten der T-Zellen durch PTEN-Knock-

down nicht beeinflusst. Eine gezielte Modulation der PTEN-Expression kann somit die Funktion von T-Zellen und deren Regulation durch Treg beeinflussen (107).

Eine beeinträchtigte PTEN-Proteinexpression ist stark mit der Entstehung unterschiedlicher Krankheiten assoziiert. Daher ist es wichtig, die ursächlichen Faktoren zu untersuchen, die letztendlich zu einer gestörten PTEN-Expression führen können. Die Mechanismen zur Regulation der PTEN-Expression sind vielfältig und reichen von extrazellulären Faktoren, wie z.B. Zytokinen, bis hin zu nicht-kodierenden RNAs (108). MiR-21 ist ein wichtiger, negativer Regulator der PTEN-Proteinexpression. Verschiedene Studien bestätigten bereits erhöhte Level an miR-21 in der Zerebrospinalflüssigkeit, sowie in peripheren T-Zellpopulationen von MS-Patienten (109, 110). Auch extrazelluläre Faktoren, wie das Zytokin TGF- $\beta$ , sind im Serum von MS-Patienten signifikant erhöht und können die PTEN-Proteinexpression deutlich reduzieren (111-113). Ob und inwieweit erhöhte Konzentrationen an IL-6 die PTEN-Proteinexpression beeinflussen können, war bisher noch nicht ausreichend geklärt. Die Treg-Resistenz in T-Zellen von MS-Patienten zeichnet sich durch eine verstärkte IL-6-Produktion und Hyperaktivierung der PKB/c-Akt aus (43, 44). Die Untersuchungen dieser Arbeit zeigten, dass aktivierte CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus gesunden Spendern nach Inkubation mit hohen Konzentrationen an IL-6 eine signifikant reduzierte PTEN-Expression aufweisen. Die verminderte PTEN-Expression korrelierte mit einer Hyperaktivierung der PKB/c-Akt und einer deutlich ausgeprägten Unempfindlichkeit der T-Zellen für die Treg-vermittelte Suppression. Anhand dieser Versuche konnte erstmals ein Einfluss von IL-6 auf die Regulation der PTEN-Proteinexpression in T-Zellen beschrieben werden. Weitere Untersuchungen mit blockierenden anti-IL-6- und anti-IL-6R-Antikörpern sind notwendig, um den direkten Einfluss der IL-6-Signalübertragung auf die PTEN-Expression zu verifizieren.

Zusammengenommen scheint die Regulation und Expression von PTEN eine bedeutende Rolle in der Entstehung einer Treg-Resistenz in T-Zellen von MS-Patienten zu spielen. Angesichts dieser Erkenntnisse ist es interessant in zukünftigen Experimenten zu untersuchen, ob die immunmodulierende Therapie mit DMF, neben der Wiederherstellung einer Treg-Sensitivität, auch zu einer Normalisierung der dysregulierten PTEN-Expression in T-Zellen von MS-Patienten führen kann.

Die abschließende Versuchsreihe dieser Doktorarbeit befasste sich mit ersten Experimenten zur Charakterisierung des „Proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha“ (PGC-1 $\alpha$ ) in humanen CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T-Zellen aus unbehandelten MS-Patienten und gesunden Spendern. PGC-1 $\alpha$  wurde ursprünglich mit Hilfe der DNA-Chip-Technologie als ein Molekül identifiziert, welches in T-Zellen von MS-Patienten und gesunden Spendern unterschiedlich reguliert wird und zudem mit dem IL-6- und PKB-Signalweg assoziiert ist (70). Neben PTEN stellte PGC-1 $\alpha$  somit einen weiteren vielversprechenden Kandidaten dar, um den molekularen Mechanismus der Treg-Resistenz in T-Zellen näher charakterisieren zu können.

In den letzten Jahren mehrten sich die Hinweise darauf, dass eine mitochondriale Dysfunktion und die damit verbundene Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) zu neurodegenerativen Prozessen bei MS beitragen. Umfangreiche Studien mit humanen neuronalen Zelllinien zeigten bereits, dass das Gen-Silencing von PGC-1 $\alpha$  mit einem reduzierten mitochondrialen Membranpotenzial, einer deutlich gesteigerten ROS-Bildung sowie einer erhöhten Anfälligkeit für ROS-induzierten Zelltod einhergeht (75, 114). Auch im Patienten selbst konnte ein Zusammenhang zwischen Neurodegeneration und PGC-1 $\alpha$ -Expression festgestellt werden: Der Verlust an Neuronen im präfrontalen Kortex von MS-Patienten korreliert hierbei signifikant mit der Abnahme der neuronalen PGC-1 $\alpha$ -Expression (115). Die im Rahmen dieser Doktorarbeit durchgeführten Untersuchungen zur PGC-1 $\alpha$ -Expression in humanen T-Zellen von MS-Patienten konnten einen ähnlichen Zusammenhang bestätigen. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T-Zellen aus MS-Patienten weisen ein signifikant reduziertes Expressionslevel von PGC-1 $\alpha$  im Vergleich zu T-Zellen aus gesunden Spendern auf. Ob und inwieweit hierbei das verminderte Expressionslevel von PGC-1 $\alpha$  mit dem Schweregrad der MS-Erkrankung sowie der Krankheitsdauer korreliert, muss in weiteren Untersuchungen geklärt werden.

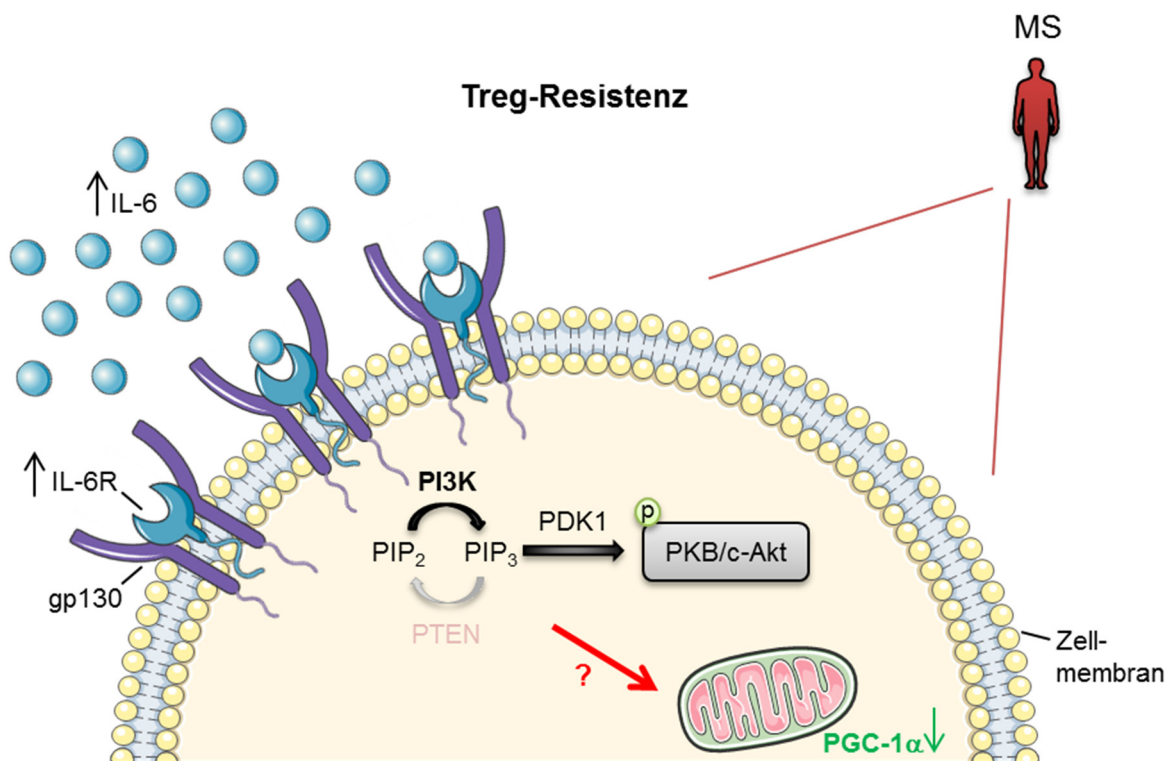
Die Funktion und Bedeutung von PGC-1 $\alpha$  als Hauptregulator der mitochondrialen Biogenese wurde ursprünglich in Fett- und Muskelgewebe beschrieben (116, 117). Über eine Charakterisierung des PGC-1 $\alpha$ -Proteins in immunologisch-relevanten Zelltypen, wie bspw. T-Lymphozyten, ist bisher nur wenig bekannt. 2016 berichteten Bengsch *et al.* und Scharping *et al.* erstmals über die Expression und Rolle von PGC-1 $\alpha$  in der Funktionalität von T-Effektorzellen. Die Ergebnisse beider Studien zeigten, dass der mitochondriale Phänotyp entscheidend für

die Differenzierung und Funktion der Immunzellen ist (118-120). Die Arbeiten von Scharping *et al.* beschäftigten sich mit Untersuchungen zur PGC-1 $\alpha$ -Expression und mitochondrialen Aktivität in tumorinfiltrierenden CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Aufgrund des nährstoffarmen Tumormilieus wird der mitochondriale Metabolismus der T-Zellen unterdrückt: Die PGC-1 $\alpha$ -Expression, sowie die damit verbundene mitochondriale Masse und Funktion, sind deutlich reduziert, wodurch die T-Zellen ihre Fähigkeit verlieren, Krebszellen effizient zu bekämpfen (119). Ähnliche Erkenntnisse konnten von Bengsch *et al.* in einem Mausmodell der chronischen Virusinfektion erlangt werden (120). Ein intakter mitochondrialer Metabolismus ist demnach essentiell für die Funktion und Regulation von T-Zellen. Eine dysregulierte PGC-1 $\alpha$ -Expression und die damit verbundene reduzierte metabolische Aktivität der Mitochondrien können zu einer gestörten T-Zell-Funktion führen (121).

In dieser Arbeit wurde mittels Western-Blot-Analysen erstmalig die Expression von PGC-1 $\alpha$  in essentiellen Zellen des humanen Immunsystems dargestellt und im Kontext der Multiplen Sklerose untersucht. Treg-resistente MS-T-Zellen exprimierten im ruhenden Zustand signifikant weniger PGC-1 $\alpha$  im Vergleich zu Treg-sensitiven T-Zellen aus gesunden Spendern. Interessanterweise wurde die relative PGC-1 $\alpha$ -Expression durch TZR-vermittelte Aktivierung der T-Zellen nicht beeinflusst. Welche Rolle PGC-1 $\alpha$  in der Regulation der T-Zellen bei MS-Patienten im Kontext einer Treg-Resistenz spielt, ist bisher noch unklar. Weitere detaillierte Analysen zum Phosphorylierungs- bzw. Aktivierungsgrad von PGC-1 $\alpha$ , sowie Experimente mit PGC-1 $\alpha$ -Inhibitoren/-Aktivatoren oder einer spezifischen PGC-1 $\alpha$  siRNA sind notwendig, um einen möglichen Zusammenhang zwischen der PGC-1 $\alpha$ -Expression und Ansprechbarkeit der T-Zellen auf die Treg-vermittelte Suppression näher untersuchen zu können.

Angesichts der vorliegenden Ergebnisse wird folgender Mechanismus zur Entstehung einer Treg-Resistenz in T-Zellen von MS-Patienten postuliert (Abbildung 30):

Treg-resistente T-Zellen weisen eine erhöhte IL-6R-Expression und verstärkte IL-6-Produktion auf, was zu einer Abnahme der Phosphatase PTEN führt. PTEN ist der Gegenspieler der Kinase PI3K. Aufgrund der verminderten PTEN-Expression überwiegt die Reaktion der PI3K. PI3K phosphoryliert das Membranlipid PIP<sub>2</sub> zu PIP<sub>3</sub> und leitet dadurch die Aktivierung der PKB/c-Akt ein. PKB/c-Akt bindet an PIP<sub>3</sub> und wird anschließend von PDK1 phosphoryliert und dadurch aktiviert. Da die Gegenregulation durch PTEN deutlich vermindert ist, kommt es zu einer Hyperaktivierung der PKB/c-Akt. Über einen noch unbekanntem Signalweg kommt es zur Reduktion der PGC-1α-Expression in Treg-resistenten T-Zellen von MS-Patienten.



**Abbildung 30: Zusammenfassung zur Rolle von PTEN und PGC-1α in der Entstehung einer Treg-Resistenz.**

Die Treg-Resistenz von T-Zellen ist mit Änderungen in der IL-6-Signalübertragung sowie Regulation und Aktivierung der PKB/c-Akt assoziiert. Treg-resistente T-Zellen weisen eine erhöhte IL-6R-Expression und beschleunigte IL-6-Produktion auf, was zu einer Abnahme der Phosphatase PTEN und folglich zu einer verstärkten Aktivierung der PKB/c-Akt führt. Über einen noch unbekanntem Signalweg kommt es zur Reduktion der PGC-1α-Expression in Treg-resistenten T-Zellen von MS-Patienten.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Sakaguchi S. Regulatory T cells: Key controllers of immunologic self-tolerance. *Cell*. 2000;101(5):455-8.
2. Shevach EM. Regulatory T cells in autoimmunity\*. *Annu Rev Immunol*. 2000;18:423-49.
3. Steinman L. Multiple sclerosis: a coordinated immunological attack against myelin in the central nervous system. *Cell*. 1996;85(3):299-302.
4. Fruttiger M, Montag D, Schachner M, and Martini R. Crucial role for the myelin-associated glycoprotein in the maintenance of axon-myelin integrity. *Eur J Neurosci*. 1995;7(3):511-5.
5. Huang WJ, Chen WW, and Zhang X. Multiple sclerosis: Pathology, diagnosis and treatments. *Exp Ther Med*. 2017;13(6):3163-6.
6. Fertl E. Erkrankung mit 1.000 Gesichtern. *psychopraxis neuropraxis*. 2014;17(6):15-20.
7. Wiendl H, and Kieseier BC. *Multiple Sklerose: Klinik, Diagnostik und Therapie*. Kohlhammer Verlag; 2010.
8. Dunn SE, Gunde E, and Lee H. Sex-Based Differences in Multiple Sclerosis (MS): Part II: Rising Incidence of Multiple Sclerosis in Women and the Vulnerability of Men to Progression of this Disease. *Current topics in behavioral neurosciences*. 2015;26:57-86.
9. Ascherio A. Environmental factors in multiple sclerosis. *Expert review of neurotherapeutics*. 2013;13(sup2):3-9.
10. Ebers GC. Environmental factors and multiple sclerosis. *The Lancet Neurology*. 2008;7(3):268-77.
11. Smolders J. Vitamin d and multiple sclerosis: correlation, causality, and controversy. *Autoimmune Dis*. 2010;2011:629538.
12. Ascherio A, and Munger KL. Environmental risk factors for multiple sclerosis. Part II: Noninfectious factors. *Ann Neurol*. 2007;61(6):504-13.
13. Ponsonby AL, van der Mei I, Dwyer T, Blizzard L, Taylor B, Kemp A, et al. Exposure to infant siblings during early life and risk of multiple sclerosis. *JAMA*. 2005;293(4):463-9.

14. Ascherio A, Munger KL, Lennette ET, Spiegelman D, Hernan MA, Olek MJ, et al. Epstein-Barr virus antibodies and risk of multiple sclerosis: a prospective study. *JAMA*. 2001;286(24):3083-8.
15. Ascherio A, and Munger KL. Environmental risk factors for multiple sclerosis. Part I: the role of infection. *Ann Neurol*. 2007;61(4):288-99.
16. Alotaibi S, Kennedy J, Tellier R, Stephens D, and Banwell B. Epstein-Barr virus in pediatric multiple sclerosis. *JAMA*. 2004;291(15):1875-9.
17. Lang HL, Jacobsen H, Ikemizu S, Andersson C, Harlos K, Madsen L, et al. A functional and structural basis for TCR cross-reactivity in multiple sclerosis. *Nat Immunol*. 2002;3(10):940-3.
18. Constantinescu CS, Farooqi N, O'Brien K, and Gran B. Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) as a model for multiple sclerosis (MS). *Br J Pharmacol*. 2011;164(4):1079-106.
19. Lehmann-Horn K, Kronsbein HC, and Weber MS. Targeting B cells in the treatment of multiple sclerosis: recent advances and remaining challenges. *Ther Adv Neurol Disord*. 2013;6(3):161-73.
20. Weber MS, Hemmer B, and Cepok S. The role of antibodies in multiple sclerosis. *Biochim Biophys Acta*. 2011;1812(2):239-45.
21. Litzemberger T, Fassler R, Bauer J, Lassmann H, Linington C, Wekerle H, et al. B lymphocytes producing demyelinating autoantibodies: development and function in gene-targeted transgenic mice. *The Journal of experimental medicine*. 1998;188(1):169-80.
22. Weber MS, and Hemmer B. Cooperation of B cells and T cells in the pathogenesis of multiple sclerosis. *Results Probl Cell Differ*. 2010;51:115-26.
23. Harp CT, Lovett-Racke AE, Racke MK, Frohman EM, and Monson NL. Impact of myelin-specific antigen presenting B cells on T cell activation in multiple sclerosis. *Clinical immunology (Orlando, Fla)*. 2008;128(3):382-91.
24. Korn T, Mitsdoerffer M, Croxford AL, Awasthi A, Dardalhon VA, Galileos G, et al. IL-6 controls Th17 immunity in vivo by inhibiting the conversion of conventional T cells into Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(47):18460-5.

25. Barr TA, Shen P, Brown S, Lampropoulou V, Roch T, Lawrie S, et al. B cell depletion therapy ameliorates autoimmune disease through ablation of IL-6-producing B cells. *The Journal of experimental medicine*. 2012;209(5):1001-10.
26. Hauser SL, Waubant E, Arnold DL, Vollmer T, Antel J, Fox RJ, et al. B-cell depletion with rituximab in relapsing-remitting multiple sclerosis. *N Engl J Med*. 2008;358(7):676-88.
27. McFarland HF, and Martin R. Multiple sclerosis: a complicated picture of autoimmunity. *Nat Immunol*. 2007;8(9):913-9.
28. Langrish CL, Chen Y, Blumenschein WM, Mattson J, Basham B, Sedgwick JD, et al. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *The Journal of experimental medicine*. 2005;201(2):233-40.
29. Komiyama Y, Nakae S, Matsuki T, Nambu A, Ishigame H, Kakuta S, et al. IL-17 plays an important role in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol*. 2006;177(1):566-73.
30. Tzartos JS, Friese MA, Craner MJ, Palace J, Newcombe J, Esiri MM, et al. Interleukin-17 production in central nervous system-infiltrating T cells and glial cells is associated with active disease in multiple sclerosis. *Am J Pathol*. 2008;172(1):146-55.
31. Moser B, and Willmann K. Chemokines: role in inflammation and immune surveillance. *Ann Rheum Dis*. 2004;63.
32. Reboldi A, Coisne C, Baumjohann D, Benvenuto F, Bottinelli D, Lira S, et al. C-C chemokine receptor 6-regulated entry of TH-17 cells into the CNS through the choroid plexus is required for the initiation of EAE. *Nat Immunol*. 2009;10(5):514-23.
33. Schirmer L, Rothhammer V, Hemmer B, and Korn T. Enriched CD161<sup>high</sup> CCR6<sup>+</sup> gammadelta T cells in the cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis. *JAMA Neurol*. 2013;70(3):345-51.
34. Huppert J, Closhen D, Croxford A, White R, Kulig P, Pietrowski E, et al. Cellular mechanisms of IL-17-induced blood-brain barrier disruption. *Faseb J*. 2010;24(4):1023-34.



35. Winkler-Pickett R, Young HA, Cherry JM, Diehl J, Wine J, Back T, et al. In vivo regulation of experimental autoimmune encephalomyelitis by NK cells: alteration of primary adaptive responses. *J Immunol.* 2008;180(7):4495-506.
36. Viglietta V, Baecher-Allan C, Weiner HL, and Hafler DA. Loss of functional suppression by CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells in patients with multiple sclerosis. *The Journal of experimental medicine.* 2004;199(7):971-9.
37. Fletcher JM, Loneragan R, Costelloe L, Kinsella K, Moran B, O'Farrelly C, et al. CD39<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> regulatory T Cells suppress pathogenic Th17 cells and are impaired in multiple sclerosis. *J Immunol.* 2009;183(11):7602-10.
38. Venken K, Hellings N, Broekmans T, Hensen K, Rummens JL, and Stinissen P. Natural naive CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>low</sup> regulatory T cell (Treg) development and function are disturbed in multiple sclerosis patients: recovery of memory Treg homeostasis during disease progression. *J Immunol.* 2008;180(9):6411-20.
39. Sakaguchi S, Wing K, and Miyara M. Regulatory T cells - a brief history and perspective. *Eur J Immunol.* 2007;37 Suppl 1:S116-23.
40. Mercadante ER, and Lorenz UM. Breaking Free of Control: How Conventional T Cells Overcome Regulatory T Cell Suppression. *Front Immunol.* 2016;7:193.
41. Haufe S, Haug M, Schepp C, Kuemmerle-Deschner J, Hansmann S, Rieber N, et al. Impaired suppression of synovial fluid CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T cells from patients with juvenile idiopathic arthritis by CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg cells. *Arthritis Rheum.* 2011;63(10):3153-62.
42. Xiao H, Wang S, Miao R, and Kan W. TRAIL is associated with impaired regulation of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T cells by regulatory T cells in patients with rheumatoid arthritis. *J Clin Immunol.* 2011;31(6):1112-9.
43. Trinschek B, Luessi F, Haas J, Wildemann B, Zipp F, Wiendl H, et al. Kinetics of IL-6 production defines T effector cell responsiveness to regulatory T cells in multiple sclerosis. *PLoS One.* 2013;8(10):e77634.

44. Schneider A, Long SA, Cerosaletti K, Ni CT, Samuels P, Kita M, et al. In active relapsing-remitting multiple sclerosis, effector T cell resistance to adaptive T(regs) involves IL-6-mediated signaling. *Sci Transl Med.* 2013;5(170):170ra15.
45. Yao X, Huang J, Zhong H, Shen N, Faggioni R, Fung M, et al. Targeting interleukin-6 in inflammatory autoimmune diseases and cancers. *Pharmacol Ther.* 2014;141(2):125-39.
46. Korn T, Reddy J, Gao W, Bettelli E, Awasthi A, Petersen TR, et al. Myelin-specific regulatory T cells accumulate in the CNS but fail to control autoimmune inflammation. *Nat Med.* 2007;13(4):423-31.
47. Goodman WA, Young AB, McCormick TS, Cooper KD, and Levine AD. Stat3 phosphorylation mediates resistance of primary human T cells to regulatory T cell suppression. *J Immunol.* 2011;186(6):3336-45.
48. Fruman DA. Phosphoinositide 3-kinase and its targets in B-cell and T-cell signaling. *Curr Opin Immunol.* 2004;16(3):314-20.
49. Wohlfert EA, Callahan MK, and Clark RB. Resistance to CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells and TGF-beta in Cbl-b<sup>-/-</sup> mice. *J Immunol.* 2004;173(2):1059-65.
50. King CG, Kobayashi T, Cejas PJ, Kim T, Yoon K, Kim GK, et al. TRAF6 is a T cell-intrinsic negative regulator required for the maintenance of immune homeostasis. *Nat Med.* 2006;12(9):1088-92.
51. Kirberg J, Berns A, and von Boehmer H. Peripheral T cell survival requires continual ligation of the T cell receptor to major histocompatibility complex-encoded molecules. *The Journal of experimental medicine.* 1997;186(8):1269-75.
52. Becker C, Taube C, Bopp T, Becker C, Michel K, Kubach J, et al. Protection from graft-versus-host disease by HIV-1 envelope protein gp120-mediated activation of human CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells. *Blood.* 2009;114(6):1263-9.
53. Pektor S, Schloder J, Klasen B, Bausbacher N, Wagner DC, Schreckenberger M, et al. Using immuno-PET imaging to monitor kinetics of T cell-mediated inflammation and treatment efficiency in a humanized mouse model for GvHD. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 2019.

54. Becker C, Kubach J, Wijdenes J, Knop J, and Jonuleit H. CD4-mediated functional activation of human CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells. *Eur J Immunol.* 2007;37(5):1217-23.
55. Schloder J, Berges C, Luessi F, and Jonuleit H. Dimethyl Fumarate Therapy Significantly Improves the Responsiveness of T Cells in Multiple Sclerosis Patients for Immunoregulation by Regulatory T Cells. *Int J Mol Sci.* 2017;18(2).
56. Gold R, Kappos L, Arnold DL, Bar-Or A, Giovannoni G, Selmaj K, et al. Placebo-controlled phase 3 study of oral BG-12 for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med.* 2012;367(12):1098-107.
57. Takahashi T, Tagami T, Yamazaki S, Uede T, Shimizu J, Sakaguchi N, et al. Immunologic self-tolerance maintained by CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4. *Journal of Experimental Medicine.* 2000;192(2):303-9.
58. Imitola J, Chitnis T, and Khoury SJ. Cytokines in multiple sclerosis: from bench to bedside. *Pharmacol Ther.* 2005;106(2):163-77.
59. Swaak AJ, van Rooyen A, Nieuwenhuis E, and Aarden LA. Interleukin-6 (IL-6) in synovial fluid and serum of patients with rheumatic diseases. *Scand J Rheumatol.* 1988;17(6):469-74.
60. Mudter J, and Neurath MF. Il-6 signaling in inflammatory bowel disease: pathophysiological role and clinical relevance. *Inflamm Bowel Dis.* 2007;13(8):1016-23.
61. Li Y, de Haar C, Chen M, Deuring J, Gerrits MM, Smits R, et al. Disease-related expression of the IL6/STAT3/SOCS3 signalling pathway in ulcerative colitis and ulcerative colitis-related carcinogenesis. *Gut.* 2010;59(2):227-35.
62. Lawson JM, Tremble J, Dayan C, Beyan H, Leslie RD, Peakman M, et al. Increased resistance to CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup> regulatory T cell-mediated suppression in patients with type 1 diabetes. *Clin Exp Immunol.* 2008;154(3):353-9.
63. Wang YX, van Boxel-Dezaire AHH, Cheon H, Yang JB, and Stark GR. STAT3 activation in response to IL-6 is prolonged by the binding of IL-6 receptor to EGF receptor. *P Natl Acad Sci USA.* 2013;110(42):16975-80.

64. Hodge DR, Hurt EM, and Farrar WL. The role of IL-6 and STAT3 in inflammation and cancer. *Eur J Cancer*. 2005;41(16):2502-12.
65. Hideshima T, Nakamura N, Chauhan D, and Anderson KC. Biologic sequelae of interleukin-6 induced PI3K/Akt signaling in multiple myeloma. *Oncogene*. 2001;20(42):5991-6000.
66. Wegiel B, Bjartell A, Culig Z, and Persson JL. Interleukin-6 activates PI3K/Akt pathway and regulates cyclin A1 to promote prostate cancer cell survival. *Int J Cancer*. 2008;122(7):1521-9.
67. Wohlfert EA, and Clark RB. 'Vive la Resistance!'--the PI3K-Akt pathway can determine target sensitivity to regulatory T cell suppression. *Trends Immunol*. 2007;28(4):154-60.
68. Stambolic V, Suzuki A, de la Pompa JL, Brothers GM, Mirtsos C, Sasaki T, et al. Negative regulation of PKB/Akt-dependent cell survival by the tumor suppressor PTEN. *Cell*. 1998;95(1):29-39.
69. Leslie NR, Kriplani N, Hermida MA, Alvarez-Garcia V, and Wise HM. The PTEN protein: cellular localization and post-translational regulation. *Biochem Soc Trans*. 2016;44(1):273-8.
70. Trinschek B, Satoh K, and Jonuleit H. In-vitro methods for the detection of autoimmune diseases or conditions. *Patent EP3130678*. 2019.
71. Canto C, and Auwerx J. PGC-1 alpha, SIRT1 and AMPK, an energy sensing network that controls energy expenditure. *Curr Opin Lipidol*. 2009;20(2):98-105.
72. LeBleu VS, O'Connell JT, Gonzalez Herrera KN, Wikman H, Pantel K, Haigis MC, et al. PGC-1alpha mediates mitochondrial biogenesis and oxidative phosphorylation in cancer cells to promote metastasis. *Nat Cell Biol*. 2014;16(10):992-1003, 1-15.
73. Fernandez-Marcos PJ, and Auwerx J. Regulation of PGC-1alpha, a nodal regulator of mitochondrial biogenesis. *Am J Clin Nutr*. 2011;93(4):884S-90.
74. Johri A, and Beal MF. Mitochondrial Dysfunction in Neurodegenerative Diseases. *J Pharmacol Exp Ther*. 2012;342(3):619-30.
75. Dutta R, McDonough J, Yin X, Peterson J, Chang A, Torres T, et al. Mitochondrial dysfunction as a cause of axonal degeneration in multiple sclerosis patients. *Ann Neurol*. 2006;59(3):478-89.

76. Fox RJ, Miller DH, Phillips JT, Hutchinson M, Havrdova E, Kita M, et al. Placebo-controlled phase 3 study of oral BG-12 or glatiramer in multiple sclerosis. *N Engl J Med.* 2012;367(12):1087-97.
77. Schneider A, Rieck M, Sanda S, Pihoker C, Greenbaum C, and Buckner JH. The effector T cells of diabetic subjects are resistant to regulation via CD4+ FOXP3+ regulatory T cells. *J Immunol.* 2008;181(10):7350-5.
78. Haas J, Korporal M, Balint B, Fritzsching B, Schwarz A, and Wildemann B. Glatiramer acetate improves regulatory T-cell function by expansion of naive CD4+CD25+FOXP3+CD31+ T-cells in patients with multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* 2009;216(1-2):113-7.
79. Rudick RA, Ransohoff RM, Lee JC, Pepler R, Yu M, Mathisen PM, et al. In vivo effects of interferon beta-1a on immunosuppressive cytokines in multiple sclerosis. *Neurology.* 1998;50(5):1294-300.
80. Trinschek B, Luessi F, Gross CC, Wiendl H, and Jonuleit H. Interferon-Beta Therapy of Multiple Sclerosis Patients Improves the Responsiveness of T Cells for Immune Suppression by Regulatory T Cells. *Int J Mol Sci.* 2015;16(7):16330-46.
81. Imam SA, Guyton MK, Haque A, Vandenbark A, Tyor WR, Ray SK, et al. Increased calpain correlates with Th1 cytokine profile in PBMCs from MS patients. *J Neuroimmunol.* 2007;190(1-2):139-45.
82. Valencia X, Stephens G, Goldbach-Mansky R, Wilson M, Shevach EM, and Lipsky PE. TNF downmodulates the function of human CD4+CD25hi T-regulatory cells. *Blood.* 2006;108(1):253-61.
83. Goodman WA, Levine AD, Massari JV, Sugiyama H, McCormick TS, and Cooper KD. IL-6 signaling in psoriasis prevents immune suppression by regulatory T cells. *J Immunol.* 2009;183(5):3170-6.
84. Becher B, Giacomini PS, Pelletier D, McCrea E, Prat A, and Antel JP. Interferon-gamma secretion by peripheral blood T-cell subsets in multiple sclerosis: correlation with disease phase and interferon-beta therapy. *Ann Neurol.* 1999;45(2):247-50.

85. Hollifield RD, Harbige LS, Pham-Dinh D, and Sharief MK. Evidence for cytokine dysregulation in multiple sclerosis: peripheral blood mononuclear cell production of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines during relapse and remission. *Autoimmunity*. 2003;36(3):133-41.
86. Spuler S, Yousry T, Scheller A, Voltz R, Holler E, Hartmann M, et al. Multiple sclerosis: prospective analysis of TNF-alpha and 55 kDa TNF receptor in CSF and serum in correlation with clinical and MRI activity. *J Neuroimmunol*. 1996;66(1-2):57-64.
87. Sharief MK, and Hentges R. Association between tumor necrosis factor-alpha and disease progression in patients with multiple sclerosis. *N Engl J Med*. 1991;325(7):467-72.
88. Noronha A, Toscas A, and Jensen MA. Interferon beta decreases T cell activation and interferon gamma production in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol*. 1993;46(1-2):145-53.
89. Bongioanni P, Lombardo F, Moscato G, Mosti S, and Meucci G. T-cell interleukin-6 receptor binding in interferon-beta-1b-treated multiple sclerosis patients. *Eur J Neurol*. 2000;7(6):647-53.
90. Christophi GP, Christophi JA, Gruber RC, Mihai C, Mejico LJ, Massa PT, et al. Quantitative differences in the immunomodulatory effects of Rebif and Avonex in IFN-beta 1a treated multiple sclerosis patients. *J Neurol Sci*. 2011;307(1-2):41-5.
91. de Jong R, Bezemer AC, Zomerdijk TP, van de Pouw-Kraan T, Ottenhoff TH, and Nibbering PH. Selective stimulation of T helper 2 cytokine responses by the anti-psoriasis agent monomethylfumarate. *Eur J Immunol*. 1996;26(9):2067-74.
92. Hosseini A, Masjedi A, Baradaran B, Hojjat-Farsangi M, Ghalamfarsa G, Anvari E, et al. Dimethyl fumarate: Regulatory effects on the immune system in the treatment of multiple sclerosis. *J Cell Physiol*. 2019;234(7):9943-55.
93. Ghoreschi K, Bruck J, Kellerer C, Deng C, Peng H, Rothfuss O, et al. Fumarates improve psoriasis and multiple sclerosis by inducing type II dendritic cells. *The Journal of experimental medicine*. 2011;208(11):2291-303.

94. Gross CC, Schulte-Mecklenbeck A, Klinsing S, Posevitz-Fejfar A, Wiendl H, and Klotz L. Dimethyl fumarate treatment alters circulating T helper cell subsets in multiple sclerosis. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm.* 2016;3(1):e183.
95. Ghasemi N, Razavi S, and Nikzad E. Multiple Sclerosis: Pathogenesis, Symptoms, Diagnoses and Cell-Based Therapy. *Cell J.* 2017;19(1):1-10.
96. Haas J, Fritzsche B, Trubswetter P, Korporal M, Milkova L, Fritz B, et al. Prevalence of newly generated naive regulatory T cells (Treg) is critical for Treg suppressive function and determines Treg dysfunction in multiple sclerosis. *J Immunol.* 2007;179(2):1322-30.
97. de Andres C, Aristimuno C, de Las Heras V, Martinez-Gines ML, Bartolome M, Arroyo R, et al. Interferon beta-1a therapy enhances CD4<sup>+</sup> regulatory T-cell function: an ex vivo and in vitro longitudinal study in relapsing-remitting multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* 2007;182(1-2):204-11.
98. Wehrens EJ, Mijnheer G, Durland CL, Klein M, Meerding J, van Loosdregt J, et al. Functional human regulatory T cells fail to control autoimmune inflammation due to PKB/c-akt hyperactivation in effector cells. *Blood.* 2011;118(13):3538-48.
99. Chen CY, Chen J, He L, and Stiles BL. PTEN: Tumor Suppressor and Metabolic Regulator. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2018;9:338.
100. Mester J, and Charis E. PTEN hamartoma tumor syndrome. *Handb Clin Neurol.* 2015;132:129-37.
101. Pulido R. PTEN: a yin-yang master regulator protein in health and disease. *Methods.* 2015;77-78:3-10.
102. Stahl JM, Cheung M, Sharma A, Trivedi NR, Shanmugam S, and Robertson GP. Loss of PTEN promotes tumor development in malignant melanoma. *Cancer Res.* 2003;63(11):2881-90.
103. Newton RH, and Turka LA. Regulation of T cell homeostasis and responses by pten. *Front Immunol.* 2012;3:151.
104. Buckler JL, Liu X, and Turka LA. Regulation of T-cell responses by PTEN. *Immunol Rev.* 2008;224:239-48.

105. Lee SH, Park JS, Byun JK, Jhun J, Jung K, Seo HB, et al. PTEN ameliorates autoimmune arthritis through down-regulating STAT3 activation with reciprocal balance of Th17 and Tregs. *Sci Rep.* 2016;6:34617.
106. Suzuki A, Yamaguchi MT, Ohteki T, Sasaki T, Kaisho T, Kimura Y, et al. T cell-specific loss of PTEN leads to defects in central and peripheral tolerance. *Immunity.* 2001;14(5):523-34.
107. Chen L, and Guo D. The functions of tumor suppressor PTEN in innate and adaptive immunity. *Cell Mol Immunol.* 2017;14(7):581-9.
108. Li W, Zhang T, Guo L, and Huang L. Regulation of PTEN expression by noncoding RNAs. *J Exp Clin Cancer Res.* 2018;37(1):223.
109. Munoz-San Martin M, Reverter G, Robles-Cedeno R, Buxo M, Ortega FJ, Gomez I, et al. Analysis of miRNA signatures in CSF identifies upregulation of miR-21 and miR-146a/b in patients with multiple sclerosis and active lesions. *J Neuroinflammation.* 2019;16(1):220.
110. Fenoglio C, Cantoni C, De Riz M, Ridolfi E, Cortini F, Serpente M, et al. Expression and genetic analysis of miRNAs involved in CD4<sup>+</sup> cell activation in patients with multiple sclerosis. *Neurosci Lett.* 2011;504(1):9-12.
111. Ebert MP, Fei G, Schandl L, Mawrin C, Dietzmann K, Herrera P, et al. Reduced PTEN expression in the pancreas overexpressing transforming growth factor-beta 1. *Br J Cancer.* 2002;86(2):257-62.
112. Nicoletti F, Di Marco R, Patti F, Reggio E, Nicoletti A, Zaccone P, et al. Blood levels of transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta1) are elevated in both relapsing remitting and chronic progressive multiple sclerosis (MS) patients and are further augmented by treatment with interferon-beta 1b (IFN-beta1b). *Clin Exp Immunol.* 1998;113(1):96-9.
113. Kato M, Putta S, Wang M, Yuan H, Lanting L, Nair I, et al. TGF-beta activates Akt kinase through a microRNA-dependent amplifying circuit targeting PTEN. *Nat Cell Biol.* 2009;11(7):881-9.
114. Cui L, Jeong H, Borovecki F, Parkhurst CN, Tanese N, and Krainc D. Transcriptional repression of PGC-1alpha by mutant huntingtin leads to mitochondrial dysfunction and neurodegeneration. *Cell.* 2006;127(1):59-69.



115. Witte ME, Nijland PG, Drexhage JA, Gerritsen W, Geerts D, van Het Hof B, et al. Reduced expression of PGC-1alpha partly underlies mitochondrial changes and correlates with neuronal loss in multiple sclerosis cortex. *Acta Neuropathol.* 2013;125(2):231-43.
116. Liang H, and Ward WF. PGC-1alpha: a key regulator of energy metabolism. *Adv Physiol Educ.* 2006;30(4):145-51.
117. Puigserver P, and Spiegelman BM. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1 alpha (PGC-1 alpha): transcriptional coactivator and metabolic regulator. *Endocr Rev.* 2003;24(1):78-90.
118. Balmer ML, and Hess C. Feeling Worn Out? PGC1alpha to the Rescue for Dysfunctional Mitochondria in T Cell Exhaustion. *Immunity.* 2016;45(2):233-5.
119. Scharping NE, Menk AV, Moreci RS, Whetstone RD, Dadey RE, Watkins SC, et al. The Tumor Microenvironment Represses T Cell Mitochondrial Biogenesis to Drive Intratumoral T Cell Metabolic Insufficiency and Dysfunction. *Immunity.* 2016;45(3):701-3.
120. Bengsch B, Johnson AL, Kurachi M, Odorizzi PM, Pauken KE, Attanasio J, et al. Bioenergetic Insufficiencies Due to Metabolic Alterations Regulated by the Inhibitory Receptor PD-1 Are an Early Driver of CD8<sup>+</sup> T Cell Exhaustion. *Immunity.* 2016;45(2):358-73.
121. Assmann N, and Finlay DK. Metabolic regulation of immune responses: therapeutic opportunities. *J Clin Invest.* 2016;126(6):2031-9.

## 7 Danksagung



## 8 Lebenslauf





## 9 Anhang

### Projektrelevante Publikationen

---

Teile dieser Doktorarbeit wurden bereits erfolgreich publiziert:

- *Dimethyl fumarate therapy significantly improves the responsiveness of T cells in multiple sclerosis patients for immunoregulation by regulatory T cells*

**Schlöder J\***, Berges C, Luessi F, Jonuleit H

International Journal of Molecular Sciences, 2017, 18(2), 271

\*Erstautorenschaft

- *Using immuno-PET imaging to monitor kinetics of T cell-mediated inflammation and treatment efficiency in a humanized mouse model for GvHD*

Pektor S\*, **Schlöder J\***, Klasen B, Bausbacher N, Wagner DC, Schreckenberger M, Grabbe S, Jonuleit H, Miederer M

European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging, 2019

\*geteilte Erstautorenschaft

- *Novel concept of CD4-mediated activation of regulatory T cells for the treatment of graft-versus-host disease*

**Schlöder J**, Berges C, Tuettenberg A, Jonuleit H

Frontiers in Immunology, 2017, 8:1495

In Vorbereitung:

- *In relapsing-remitting multiple sclerosis, reduced T cell responsiveness to Treg-mediated suppression is directly linked to an impaired expression of phosphatase PTEN.*

**Schlöder J**, Luessi F, Sobczak M, Jonuleit H