
Untersuchungen zur Regulation von T-Effektorzellen
im peripheren Blut von MS-Patienten und
humanisierten Mäusen mit einer induzierten
autoimmunen Enzephalitis

Dissertation

zur Erlangung des Grades

„Doktor der Naturwissenschaften“

am Fachbereich Biologie

der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Bettina Trinschek

Geboren am 29. Juni 1984 in Mainz

Mainz, November 2013

Dekan:

Erster Berichterstatter:

Zweiter Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 20.12.2013

Untersuchungen zur Regulation von T-Effektorzellen im peripheren Blut von MS-Patienten und humanisierten Mäusen mit einer induzierten autoimmunen Enzephalitis

Dissertation von Bettina Trinschek

Die Multiple Sklerose (MS) ist eine Autoimmunkrankheit des zentralen Nervensystems, bei der sich autoreaktive T-Effektorzellen der Kontrolle durch regulatorische T-Zellen (Treg) entziehen. Innerhalb dieser Arbeit wurde gezeigt, dass T-Effektorzellen von MS-Patienten insensitiv gegenüber der Suppression durch Treg sind. Hervorgerufen wird diese Treg-Resistenz durch Interleukin-6 (IL-6). Die Inhibition des IL-6-Signalweges stellt die Treg-vermittelte Suppression der T-Effektorzellen wieder her. Es zeigte sich, dass die Bildung von IL-6 und die Expression des IL-6-Rezeptors in MS-Patienten in einer positiven Rückkopplungsschleife von IL-6 selbst induziert werden.

Zur Analyse humaner Immunantworten *in vivo* und deren Modulation durch humanspezifische Therapeutika wurden humanisierte Mausmodelle etabliert. Der adoptive Transfer humaner Immunzellen in immundefiziente Mäuse erlaubte die Untersuchung von T-Lymphozyten, die aus dem Blut von MS-Patienten isoliert wurden. Es zeigte sich, dass Treg-resistente T-Effektorzellen aus den MS-Patienten in den Tieren eine letale Graft-versus-Host-Erkrankung auslösten, die nicht durch aktivierte Treg therapiert werden konnte. Erst eine Behandlung mit dem humanspezifischen anti-IL-6-Antikörper Tocilizumab *in vivo* konnte die Erkrankung der Tiere deutlich abmildern.

Im zweiten Modell wurden immundefiziente Mäuse mit humanen CD34⁺ Blutstammzellen immunologisch rekonstituiert. Diese Tiere entwickelten ein nahezu vollständig humanes Immunsystem. Die Immunisierung mit dem murinen Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein löste in den humanisierten Mäusen eine MS-ähnliche Autoimmunität aus. Die Neuroinflammation wurde durch humane T- und B-Zellen vermittelt, korrelierte mit erhöhter IL-17-Produktion und führte zu einer IL-6-abhängigen Treg-Resistenz der T-Effektorzellen. Somit eignen sich die etablierten Modelle, um zukünftig die Wirksamkeit neuer Therapeutika zur Behandlung der MS präklinisch zu testen.

Analysis of the regulation of T effector cells in peripheral blood of MS-patients and humanized mice with an induced autoimmune encephalitis.

Dissertation of Bettina Trinschek

Multiple sclerosis (MS) is an autoimmune disease of the central nervous system where autoaggressive T effector cells (Teff) are not efficiently controlled by regulatory T cells (Treg). Teff of MS-patients are unresponsive to Treg-mediated suppression caused by accelerated IL-6 synthesis. Blockade of IL-6 signaling restored Treg susceptibility of these Teff. In a positive feedback loop, IL-6 itself induced its accelerated synthesis and enhanced IL-6R expression.

To investigate human immune reactions and their modulation by human-specific therapeutics *in vivo* so called humanized mice were developed. Surprisingly, mice engrafted with PBMC of MS patients induced an accelerated development

of lethal graft versus host disease insensitive to regulatory capability of polyclonal activated intrinsic Treg. Only treatment with specific anti-human IL-6R antibodies ameliorated disease activity markedly.

In a second model immunodeficient mice were reconstituted with human CD34⁺ hematopoietic stem cells. These animals developed a nearly full human immune system. Immunization with murine Myelin-Oligodendrocyte-Glycoprotein provoked MS-like autoimmune disease. Neuroinflammation was mainly induced by human T and B cells and correlated with an enhanced IL-17 production. Furthermore, sick mice showed IL-6-mediated Treg unresponsiveness of T effector cells. These models might be a promising tool for preclinical testing of novel immunotherapeutic drugs to treat MS.

Danksagung

Eigene Publikationen:

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Eigene Publikationen:

Kinetics of IL-6 production defines T effector cell responsiveness to regulatory T cells

Trinschek B, Lüssi F, Haas J, Wildemann B, Zipp F, Wiendl H, Becker C, Jonuleit H
PLoS One, 2013, 8:77634-77644

Weitere Publikationen:

Subclinical CNS inflammation as response to a myelin antigen in humanized mice

Zayoud M, El Malki K, Frauenknecht K, Trinschek B, Kloos L, Karram K, Wanke F, Georgescu J, Hartwig UF, Sommer C, Jonuleit H, Waisman A, Kurschus FC
Journal of Neuroimmune Pharmacology, 2013, 8: 1037-1047

Costimulatory molecules on immunogenic versus tolerogenic human dendritic cells

Hubo M, Trinschek B, Kryczanowsky F, Tuettenberg A, Steinbrink K, Jonuleit H.
Frontiers of Immunology, 2013, 4:82

In Vorbereitung:

Preclinical test system: Multiple Sclerosis-like disease in humanized mice to study dysregulated T cell responses in vivo

Trinschek B, Sam J, Gross C. C, Lüssi F, Kurschus C. F, Haas J, Wildemann B, Kuhlmann T, Zipp F, Wiendl H, Jonuleit H
In Vorbereitung

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Zielsetzung	10
2. Material und Methoden	11
2.1 Patienten	11
2.2 Methoden.....	11
2.2.1 Methoden der Zellkultur	11
2.2.2 Isolierung humaner PBMC aus <i>Buffy Coats</i> oder <i>Vollblut</i>	11
2.2.3 Ermittlung der Lebendzellzahl.....	12
2.2.4 Generierung Treg-depletierter, CD4- und CD8-depletierter PBMC	13
2.2.5 Isolation humaner T-Zellpopulationen aus PBMC	13
2.2.6 Isolation CD4 ⁺ CD25 ⁺ regulatorischer T-Zellen (Treg).....	14
2.2.7 Auswertung der ³ H-Tdr-Assays	14
2.2.8 Standard Suppressionstest.....	15
2.2.9 Transwellexperimente.....	15
2.2.10 Zytokinbestimmung.....	16
2.2.11 RT-PCR und qRT-PCR.....	16
2.2.12 Färbungen von Oberflächenmolekülen.....	17
2.2.13 Färbungen des IL-6-Rezeptors	18
2.2.14 CFSE- und eFluor®670-Markierung von T-Zellen	18
2.2.15 Durchflusszytometrische Untersuchungen	19
2.2.16 Generierung humaner dendritischer Zellen aus PBMC	20
2.2.17 Ausreifung von unreifen dendritischen Zellen mittels Zytokin-cocktail.....	20
2.2.18 Immunhistochemische Färbung.....	21
2.3 Tierversuche.....	24
2.3.1 Tierhaltung	24
2.3.2 Verwendete Mausstämme	24
2.3.3 Transfer humaner PBMC von gesunden Spendern oder MS-Patienten in Rag2 ^{-/-} γc ^{-/-} -Mäuse.....	24
2.3.4 Gewinnung humaner Zellen aus murinen Organen und Blut.....	24
2.3.5 Erythrozytenlyse	25
2.3.6 Gatingstrategie bei der durchflusszytometrischen Analyse	25
2.3.7 Gewinnung humaner CD34 ⁺ Blutstammzellen aus Nabelschnurblut und anschließender Transfer in neugeborene NOD- <i>Scid</i> γc ^{-/-} -Mäuse	26
2.3.8 Induktion einer MS-ähnlichen Erkrankung	27

2.3.9 <i>Ex vivo</i> -Suppressionstest mit Milzzellen	28
2.3.10 <i>Ex vivo</i> -Stimulation der T-Zellen	28
2.3.11 Statistik	29
3. Ergebnisse	30
3.1 Etablierung eines Testsystems zur funktionellen Analyse von T-Effektorzellen aus MS-Patienten	31
3.2 T-Effektorzellen unbehandelter MS-Patienten sind insensitiv gegenüber Treg-vermittelter Suppression.....	32
3.3 Die Treg-Resistenz von T-Effektorzellen aus MS-Patienten ist unabhängig von antigenpräsentierenden Zellen	35
3.4 Vergleichende Untersuchung von Aktivierungsmarkern auf T-Effektorzellen.	36
3.5 Der Einfluss der T-Zelldifferenzierung auf die Dysfunktion der T-Effektorzellen	37
3.6 Ineffiziente Suppression von IL-6 in Kokulturen von Treg und T-Effektorzellen aus MS-Patienten	39
3.7 Erhöhte IL-6-Rezeptorexpression auf Immunzellen von MS-Patienten.....	41
3.8 Die Blockade des IL-6-Signalwegs stellt die Supprimierbarkeit von T-Effektorzellen wieder her	42
3.9 Erhöhte Aktivierung der Proteinkinase B in MS-T-Effektorzellen ist assoziiert mit Treg-Resistenz	43
3.10 Analyse IL-6-produzierender Immunzellen von MS-Patienten	45
3.11 IL-6 überkommt die Suppression der Treg in Kokultur mit T-Effektorzellen gesunder Spender.....	46
3.12 Beschleunigte Bildung von IL-6 in Immunzellen aus MS-Patienten	48
3.13 Der Einfluss von IL-6 auf die Regulation umliegender T-Effektorzellen	50
3.14 IL-6 induziert die Expression des IL-6-Rezeptors und beschleunigt die eigene Synthese.....	51
3.15 Untersuchungen zur Wirkungsdauer von IL-6	54
3.16 Untersuchungen zur Regulation von T-Effektorzellen in humanisierten Mäusen	56
3.17 Beschleunigte Ausbildung einer GvHD nach Transfer von Immunzellen aus MS-Patienten	58
3.18 Erhöhte Expansion von CD8 ⁺ T-Effektorzellen und hohe IL-6-Produktion nach adoptivem Transfer von MS-PBMC.....	59
3.19 Die Entstehung eines humanen Immunsystems in immundefizienten Mäusen nach dem Transfer humaner Blutstammzellen.....	61
3.20 Induktion und Charakterisierung einer MS-ähnlichen Erkrankung in humanisierten Mäusen	63
3.21 MS-ähnliche Symptome korrelieren mit erhöhten Frequenzen von T-Effektorgedächtniszellen und IL-6-vermittelter Treg-Resistenz.....	66

4. Diskussion.....	68
5. Zusammenfassung.....	79
6. Abkürzungsverzeichnis	80
7. Referenzen	82
8. Lebenslauf	98
9. Anhänge.....	99
9.1 Puffer und Medien	99
9.2 Publikationen.....	101

1. Einleitung

Die Aufgabe unseres Immunsystems besteht in der Abwehr von Bakterien, Viren, Parasiten und Pilzen, welche die äußeren Barrieren des Körpers überwunden haben. Humorale (z.B. das Komplementsystem) und zelluläre Bestandteile (z.B. dendritische Zellen, Makrophagen, Granulozyten und NK-Zellen) des angeborenen Immunsystems bilden eine erste Barriere für eindringende Pathogene [1]. Die Zellen des angeborenen Immunsystems exprimieren keimbahncodierte Rezeptoren¹, die evolutiv konservierte Strukturen von Krankheitserregern erkennen und zur Aktivierung führen [2-4]. Die Abwehrreaktionen des angeborenen Immunsystems sind schnell, führen aber nicht zu einem dauerhaften Schutz. Immunität können nur B- und T-Lymphozyten gewährleisten, die Zellen des adaptiven Immunsystems.

Dieser Zweig der Immunabwehr entstand vor ca. 500 Millionen Jahren und zeichnet sich unter anderem durch ein immunologisches Gedächtnis aus [5]. Gedächtniszellen bilden sich nach wiederholtem Kontakt mit dem gleichen Pathogen, sind antigenspezifisch und persistieren im Organismus. Kommt es zu einem erneuten Kontakt mit dem gleichen Antigen sind die Gedächtniszellen in der Lage, innerhalb kürzester Zeit eine Immunreaktion auszulösen. Im Gegensatz zu den Zellen der angeborenen Immunität exprimieren T- und B-Zellen Rezeptoren, die nicht als solche in der Keimbahn festgelegt sind [6]. Vielmehr kommt es durch die somatische Rekombination² zur Bildung von Rezeptoren mit zufällig generierten Antigenspezifitäten. Der Mechanismus umfasst die Umlagerung verschiedener Genabschnitte, welche die Proteinketten der Rezeptoren codieren [6,7]. Der Vorgang führt zu einer immensen Diversität an Rezeptorspezifitäten, birgt jedoch auch die Gefahr von Rezeptoren, die körpereigene Antigene erkennen.

Als Schutz vor solchen autoreaktiven Zellen entwickelten sich im Laufe der Evolution unterschiedliche Kontrollmechanismen, die unter den Begriffen der zentralen und peripheren Toleranz zusammengefasst sind [8-10]. Die zentralen Toleranzmechanismen sind direkt an die Entwicklung von T- und B-Zellen aus

¹ Diese Rezeptoren werden als Pattern-Recognition Receptors (PRR) bezeichnet und erkennen eine Vielzahl an Pathogenen anhand charakteristischer Muster, den PAMPs.

² Auch V-D-J Rekombination genannt: V, D und J sind jeweils die Abkürzungen für die Keimbahn-kodierten Gensegmente „variable“- , „diversity“- und „joining“

Vorläuferzellen des Knochenmarks gekoppelt [10-13]. Die T-Zellentwicklung im Thymus umfasst zunächst die Positivselektion durch die das Erkennen von Komplexen körpereigener MHC-Moleküle³ und Peptide durch rekombinierte T-Zellrezeptoren sichergestellt wird [10]. In einem zweiten Schritt, der Negativselektion, werden T-Zellen deren Rezeptoren eine zu hohe Affinität gegenüber den MHC-Peptid-Komplexen aufweisen (und somit potentiell autoreaktiv sind) deletiert [10]. Während dieser Selektionsprozesse werden ca. 95 % der T-Zellen eliminiert. Trotzdem entkommen potentiell autoaggressive T-Lymphozyten diesen Kontrollen und gelangen in die Peripherie, wo sie Autoimmunerkrankungen induzieren können. Zur Protektion entwickelten sich daher ergänzende Mechanismen der peripheren Toleranz [8].

Essentiell für die Aufrechterhaltung der peripheren Toleranz sind natürlich vorkommende CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ regulatorische T-Zellen (Treg) [14]. Diese kleine T-Zellsubpopulation (peripherer CD4⁺ T-Zellen) entsteht bereits im Thymus und weist eine konstitutive Expression der α -Kette des IL-2-Rezeptors und des Transkriptionsfaktors FoxP3⁴ auf [15,16]. In murinen Treg stellt FoxP3 einen spezifischen Marker dar, im Gegensatz dazu zeigen im Menschen auch konventionelle T-Helferzellen eine aktivierungsabhängige Hochregulation von CD25 und FoxP3, was die eindeutige Identifikation regulatorischer T-Zellen erschwert [17].

Die zentrale Bedeutung von Treg konnte durch ihre Depletion in gesunden Mäusen und der resultierenden Entstehung diverser Autoimmunerkrankungen belegt werden [18]. Tatsächlich korrelieren viele Autoimmunerkrankungen mit verringerten Treg-Zahlen oder einer Treg-Dysfunktion [19,20].

In vitro-Analysen zeigten, dass Treg selbst anerg sind und nur wenig Zytokine produzieren. Erst nach antigenspezifischer Aktivierung über den T-Zell-Rezeptor oder durch antigenunabhängige Aktivierung über CD4 [21] üben Treg ihre suppressorische Funktion aus und inhibieren die Aktivierung von T-Effektorzellen⁵ durch direkten Zellkontakt [22]. Arbeiten von *Bopp et al.*

3 MHC vom engl. *Major Histocompatibility Complex*: oder Haupthistokompatibilitätskomplex

4 FoxP3 ist ein Transkriptionsfaktor, der in Treg exprimiert wird und eine zentrale Rolle in der Entwicklung im Thymus spielt. Die genaue Funktion ist bislang noch nicht geklärt. Zudem wird FoxP3 auch in aktivierten T-Zellen exprimiert.

5 T-Effektorzellen sind T-Zellen, die bereits T-Zellrezeptor-vermittelten Antigenkontakt hatten. Sie weisen daher einen höheren Differenzierungsgrad auf als naive T-Zellen, die keinen Antigenkontakt erfahren haben.

identifizierten cAMP⁶ als einen Mediator dieser zellkontaktabhängigen Suppression. Nach Treg-Aktivierung bilden diese verstärkt zytosolisches cAMP, das durch den direkten Kontakt unter der Ausbildung von „gap-junctions“⁷ in T-Zellen transferiert wird. Dort führt es zur Blockade der IL-2-Produktion und folglich zur Inhibition der T-Zellaktivierung [23]. Dennoch ist bis dato der genaue Wirkmechanismus der Treg-vermittelten Suppression nicht vollständig verstanden. Neben natürlich vorkommenden Treg, können zusätzliche Treg-Subpopulationen in der Peripherie aus konventionellen T-Helferzellen entstehen. Hierbei spielt das umliegende Zytokinmilieu und der Kontakt mit tolerogenen antigenpräsentierenden Zellen eine entscheidende Rolle [24-27]. Zusammenfassend zeigt sich, dass nur in gesunden Individuen ein ausbalanciertes Gleichgewicht zwischen der Reaktion gegen körperfremde Erreger und der Toleranz gegenüber körpereigenen Strukturen besteht. Gelingt es autoreaktiven T-Effektorzellen dennoch den beschriebenen Toleranzmechanismen zu entkommen, führt dies zur Störung der Homöostase und zu Autoimmunerkrankungen.

Bei Autoimmunreaktionen sind die gleichen Zellen und Faktoren beteiligt wie bei normalen Immunreaktionen. Sie werden häufig von der Ausschüttung einer Vielzahl proinflammatorischer Zytokine begleitet, welche die Immunreaktion aufrechterhalten. Die genauen Mechanismen, die zur Entstehung einer Autoimmunität führen sind bislang unklar und variieren von Krankheit zu Krankheit. Beschrieben sind beispielsweise genetische Prädispositionen [28,29], vorangegangene Virusinfektionen [30] und der Einfluss von Umweltfaktoren [31].

6 cAMP: zyklisches Adenosin-Monophosphat ist ein sekundärer Botenstoff, der intrazellulär in Treg vorhanden ist und nach Aktivierung noch gesteigert wird.

7 gap-junctions: sind Zellmembrankanäle, die das Zytoplasma zweier benachbarter Zellen miteinander verbinden und so den Austausch von Molekülen ermöglichen.

Ein prototypisches proinflammatorisches Zytokin, dessen Dysregulation mit der Pathologie diverser Autoimmunerkrankungen assoziiert wird, ist Interleukin-6 (IL-6) [32-35]. Dieses Zytokin, das ursprünglich als B-Zelldifferenzierungsfaktor beschrieben wurde, ist in seiner Funktion vielfältig (Abb. 1.1) [36]. Nach

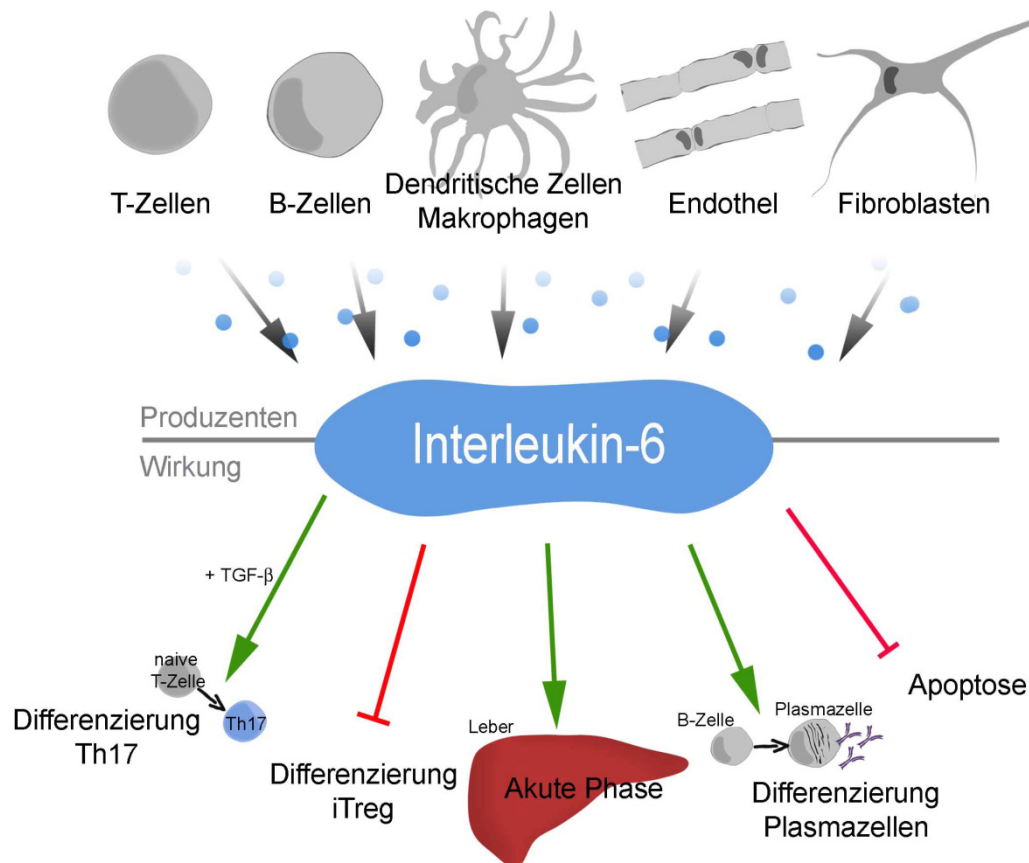


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung der pleiotropen Funktion von IL-6

IL-6 wird von Immunzellen, Endothelzellen und Fibroblasten produziert und ist unter anderem an der T- und B-Zelldifferenzierung, der Hämatopoese und der Akuten-Phase-Reaktion beteiligt.

Aktivierung des NF κ B-Signalweges durch IL-1, TNF- α oder LPS wird IL-6 sowohl von T- und B-Zellen, dendritischen Zellen, Monozyten und Makrophagen als auch von Endothelzellen und Fibroblasten produziert [37,38]. Als pleiotropes Zytokin reguliert IL-6 diverse physiologische Prozesse (Abb. 1.1) und leitet beispielsweise zusammen mit IL-1 und TNF- α ⁸ die Akute-Phase-Reaktion ein, ist essentiell an der Inflammation und Hämatopoese beteiligt, wirkt anti-apoptotisch und als Differenzierungs- und Wachstumsfaktor für B-Zellen [39]. Zudem moduliert IL-6 die T-Zelldifferenzierung und fungiert hier als zentraler Mediator der Balance zwischen Treg und Th17-Effektorzellen. IL-6

⁸ TNF- α : Tumor Nekrose Faktor-alpha

inhibiert die TGF- β -vermittelte Differenzierung naiver CD4⁺ T-Zellen zu induzierten Treg⁹ und fördert stattdessen zusammen mit TGF- β ¹⁰ und IL-23 die Differenzierung zu inflammatorischen Th17-Zellen [40-43].

Die klassische IL-6-Signalgebung über den membranständigen IL-6-Rezeptor (IL-6R) führt zur Aktivierung des JAK¹¹/STAT¹²- oder MAPK¹³-Signalweges [44,45]. Da der IL-6R nur von Immunzellen exprimiert wird, kann dieser Signalweg die vielfältigen Wirkungen von IL-6 auf Leber- und Endothelzellen nicht erklären.

Neben dieser konventionellen Aktivierung existiert ein weiterer IL-6-Signalweg, das sogenannte IL-6 „trans-signaling“ [46-48]. Durch Proteolyse des membranständigen IL-6R [49] oder durch Translation einer alternativ gespleißten IL-6R mRNA entsteht löslicher IL-6R (sIL-6R) [50]. Dieser komplexiert mit IL-6 und bindet an das ubiquitär exprimierte gp130. Es wird vermutet, dass diese alternative Signalgebung verantwortlich für die Aufrechterhaltung IL-17-sekretierender Th17-Zellen in entzündeten Geweben ist und so die Persistenz von Autoimmunerkrankungen unterstützt [51,52].

Eine chronisch-entzündliche Autoimmunerkrankung des zentralen Nervensystems ist die Multiple Sklerose (MS), die durch autoreaktive Myelin-spezifische T-Effektorzellen verursacht wird. Es wird postuliert, dass in MS-Patienten eine Fehlfunktion von Treg mit der Dysregulation autoreaktiver T-Effektorzellen assoziiert ist [53,54]. Diese T-Effektorzellen und auch Makrophagen verursachen den Abbau der Myelinscheiden von Nervenfasern (Demyelinisierung) in Bereichen der weißen Substanz [55,56]. Je nach Lokalisation der Entmarkungsherde (Plaques) variieren die Symptome dieser Erkrankung von Paresen und Taubheitsgefühlen in den äußeren Extremitäten über Koordinationsstörungen und Schwindelgefühlen bis hin zum Sehverlust und Störungen der Blasen-Sphinkter-Funktion [57,58]. Die ersten MS-Symptome treten vermehrt in einem Alter von 15-40 Jahren auf, somit zählt die MS zu der am häufigsten vorkommenden neurologischen Erkrankung junger

9 iTreg: sind in der Peripherie induzierte Treg, die unter dem Einfluss des Zytokinmilieus aus T-Zellen entstehen. Man unterscheidet zwischen IL-10-produzierenden Tr1-Zellen und TGF- β -produzierenden Th3-Zellen.

10 TGF- β : Tumor growth factor beta

11 Janus-Kinase

12 Signal Transducers and Activators of Transcription

13 Mitogen Activated Protein Kinase

Erwachsener [59]. Neben der großen Varianz in der Symptomatik dieser Erkrankung unterscheidet sich zudem der Krankheitsverlauf. Die häufigste Verlaufsform, die etwa 85 % der Patienten betrifft, ist die schubförmig remittierende MS (RRMS)¹⁴ [60,61]. Sie ist gekennzeichnet durch wiederkehrende, abgegrenzte Schübe, die sich teilweise oder vollständig zurückbilden können. Seltener kommt es zu einem primär progressiven Verlauf, der nicht schubförmig ist, sondern stetig und ohne die Rückbildung der Symptome auftritt [59].

Das korrespondierende Mausmodell der Multiplen Sklerose ist die experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis (EAE). Durch die Immunisierung mit ZNS-assoziierten Antigenen oder adoptiven Transfer autoreaktiver T-Effektorzellen treten in den Tieren Gewichtsverlust, Lähmungen und führen letztlich zum Tod, hervorgerufen durch die Demyelinierung und axonale Degeneration [62-64].

Dieses murine Krankheitsmodell lieferte entscheidende Hinweise, die zur Aufklärung fehlgeleiteter Immunreaktionen in MS-Patienten beitragen. So wurde beispielsweise die pathogene Rolle IL-17-produzierender Th17-Zellen in Zusammenhang mit der Induktion von Autoimmunerkrankungen gebracht [65]. Zudem zeigten Blockadeversuche, dass die $\alpha 4$ -Integrin Untereinheit essentiell an der T-Zellmigration ins ZNS beteiligt ist und so die Krankheitsprogression aufrecht hält [66,67].

Trotz dieser Meilensteine, die zum Verständnis von MS beitragen, sind die so generierten Daten nur kleine Ausschnitte der Erkrankung und nicht direkt auf die Situation im Menschen übertragbar [68,69]. Fundamentale Unterschiede sind z.B. die Verwendung von Inzuchtstämmen, welche die Heterogenität des Menschen nicht darstellen können und die signifikanten Unterschiede des Immunsystems zwischen Maus und Mensch. Während die EAE durch Myelin-spezifische CD4⁺ T-Effektorzellen induziert wird, ist in der MS weder eine Antigen-spezifität bekannt, noch kann eine Beteiligung von CD8⁺ T-Effektorzellen an der Krankheitsinduktion ausgeschlossen werden [70,71]. Zudem kann die präklinische Testung von Therapeutika zur Behandlung von MS nicht effizient in der Maus getestet werden, da die Medikamente meist

14 RRMS: Relapsing Remitting Multiple Sclerosis, schubförmig wiederkehrende Multiple Sklerose

epitopspezifisch sind und nicht an das murine Äquivalent binden. Diese Problematiken erhöhten zunehmend die Forderung nach geeigneteren Tiermodellen [68]. Es wurden neue Mausmodelle entwickelt, die es erlauben, menschliche Gewebe und Zellen auf die Tiere zu übertragen und humane Immunreaktionen *in vivo* zu untersuchen: sogenannte „humanisierte Mäuse“ [72].

In den 80er Jahren gelang erstmals der Durchbruch mit der Entdeckung der Scid-Mutation (severe combined immunodeficiency) in CB17-Mäusen [73], die aufgrund eines Gendefektes keine somatische Rekombination durchführen können und daher keine reifen T- und B-Zellen besitzen [74,75]. Transferiert man solchen Mäusen menschliche Blutstammzellen wachsen nur wenige humane Immunzellen im Knochenmark der Mäuse an, da die fremden humanen Zellen durch Zellen des angeborenen Immunsystems abgestoßen werden [76]. Man kreuzte Scid-Mäuse daher mit Mausstämmen, die bekannte Defekte im angeborenen Immunsystem aufwiesen (wie Non Obese Diabetic (NOD)-Mäuse). Die resultierenden Mausstämme waren besser für die Entwicklung humanisierten Mausmodelle geeignet, da die Abstoßungsreaktion verringert wurde [77,78]. Ein weiterer Meilenstein in der Humanisierung von Mäusen war die Generierung von IL-2-Rezeptor- γ -Ketten Knockout-Mäusen und deren Kombination mit NOD/Scid bzw. Rag2^{-/-} [79-81]. Das Fehlen der γ -Kette, ein Bestandteil aller Zytokine der IL-2-Rezeptorfamilie (IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 und IL-21), verhinderte zusätzlich die Entwicklung von NK-Zellen und erlaubte eine fast vollständige immunologische Rekonstitution der Mäuse durch Transfer humaner CD34⁺ Blutstammzellen [82-84].

Der Begriff „humanisierte Maus“ ist jedoch nicht geschützt und beinhaltet eine Vielzahl unterschiedlicher Modelle, von denen einige in der Tabelle 1.1 zusammengefasst sind.

Eine partielle immunologische Rekonstitution lässt sich auch durch den Transfer humaner mononukleärer Zellen des peripheren Blutes (PBMC) in immundefiziente Mäuse erreichen [85]. Der Verlauf dieser Humanisierung ist stark abhängig von der Art und Anzahl der transferierten Zellen, der Art des Mausstamms und des Alters der Tiere [84,86-88]. Werden neugeborenen NOD/Scid-Mäusen z.B. PBMC transferiert, so induzieren die humanen Immunzellen eine letale Abstoßungsreaktion („graft-versus-host disease“,

GvHD¹⁵⁾ [86], während in adulten NOD/Scid die GvHD bis zu einem Transfer von 30 Millionen PBMC über einen langen Zeitraum ausbleibt [89].

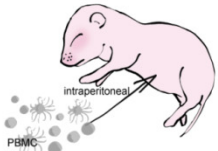

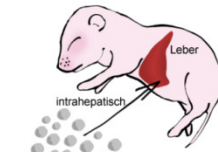
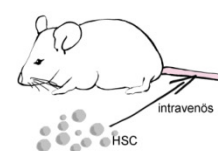
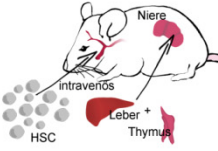
Modell	Methode	Vorteile	Nachteile	Literatur
	Intraperitoneale Transfer humaner PBMC in neugeborene Rag2 ^{-/-} γc ^{-/-} , NOD/Scid ^{-/-} , NOD/Scidγc ^{-/-} -Mäuse	<ul style="list-style-type: none"> Einfaches Modell Verwendung von Patientenproben Transfer geringer Zellzahlen Testung von Therapeutika 	<ul style="list-style-type: none"> Ausschließlich T-Zellanalysen Induktion einer letalen GvHD Keine naiven T-Zellen 	<p>Becker et al. [86] Shultz et al. [90]</p>
	Intraperitoneale Transfer humaner PBMC in adulte Rag2 ^{-/-} γc ^{-/-} , NOD/Scid ^{-/-} , NOD/Scidγc ^{-/-} -Mäuse	<ul style="list-style-type: none"> Einfaches Modell Verwendung von Patientenproben Möglichkeit höhere Zellzahlen zu transferieren Repetitive PBMC-Gabe möglich Testung von Therapeutika 	<ul style="list-style-type: none"> Ausschließlich T-Zellanalysen Induktion einer letalen GvHD Keine naiven T-Zellen 	<p>Martin et al. [88] Zayoud et al. [89] Whitfield-Larry et al. [92] Shultz et al. [90]</p>
	Nach subletaler Bestrahlung werden neugeborenen Rag2 ^{-/-} γc ^{-/-} , NOD/Scidγc ^{-/-} -Mäusen humane CD34 ⁺ HSC (aus fötaler Leber, Nabelschnurblut, Knochenmark oder mobilisierten Leukapheresen) intrahepatisch oder intravenös appliziert.	<ul style="list-style-type: none"> Eine Vielzahl an humanen Immunzellen entwickelt sich aus den HSC: T- und B-Zellen, APC, myeloide Zellen und NK-Zellen Entstehung eines naiven Immunsystems Größere Anzahl an T-Zellen verglichen zu adulten Mäusen 	<ul style="list-style-type: none"> Humane T-Zellen werden auf murine MHC-Moleküle selektioniert Geringe Anzahl myeloider Zellen und Erythrozyten 	<p>Shultz et al. [90] Ishikawa et al. [82] Macchiarini et al. [85]</p>
	Nach subletaler Bestrahlung werden adulten Rag2 ^{-/-} γc ^{-/-} , NOD/Scidγc ^{-/-} -Mäusen humane CD34 ⁺ HSC intravenös appliziert.	<ul style="list-style-type: none"> Die gleichen Vorteile wie bei neugeborenen Mäusen 	<ul style="list-style-type: none"> Zusätzlicher Nachteil: geringere Anzahl humaner Immunzellen (insbesondere CD3⁺ TC) entwickeln sich 	<p>Shultz et al. [90] Hiramatsu et al. [84] Macchiarini et al. [85]</p>
	Nach subletaler Bestrahlung werden adulten NOD/Scidγc ^{-/-} -Mäusen humane CD34 ⁺ HSC intravenös appliziert. Zusätzlich werden syngene fötale Thymus- und Leberfragmente unter die Nierenkapsel transplantiert.	<ul style="list-style-type: none"> T-Zellen sind restringiert auf humane HLA-Moleküle Höherer Humanisierungsgrad verglichen zu anderen Humanisierungsstrategien Einziges Modell, dass humanes mukosales Immunsystem entwickelt 	<ul style="list-style-type: none"> Komplexes chirurgisches Verfahren Fötale Gewebe werden benötigt 	<p>Shultz et al. [90] Wege et al. [94]</p>

Tabelle 1.1: Überblick über die Humanisierungsstrategien

Dargestellt sind unterschiedliche Strategien zur Humanisierung von immundefizienten Mäusen. Der Erfolg der Humanisierung ist abhängig vom Mausstamm, Alter der Mäuse, Quelle der Stammzellen und Applikationsroute der transferierten Zellen.

15 vom engl.: Graft versus Host Disease oder Transplantat-gegen-Wirt-Reaktion: entsteht durch xenogen oder allogenen übertragene T-Zellen, die gegen den Empfängerorganismus reagieren. Typische Symptome die durch den Gewebsschaden im Empfänger entstehen sind Kolitis, Hautirritationen und Hepatitis.

In diesem Modell ist es möglich die Regulation von humanen Immunzellen über einige Wochen *in vivo* zu untersuchen. Da PBMC aber nur sehr wenige Blutstammzellen enthalten, kommt es nicht zur Besiedelung des Knochenmarks und zu keiner Neubildung von Immunzellen. Die transferierten PBMC sterben mit der Zeit ab. Dieses adoptive Transfermodell wurde bereits erfolgreich bei der Untersuchung infektiöser Erkrankungen wie EBV, Dengue Fieber und Hepatitis C eingesetzt [90]. Es gibt jedoch nur wenige Berichte über die Induktion von Autoimmunerkrankungen, von denen die Mehrheit auf dem Transfer humaner PBMC basiert und daher auf T-Zellspezifische Fragestellungen beschränkt ist [90,91]. So konnte beispielsweise nach dem Transfer humaner PBMC von Typ-1 Diabetes-Patienten in *NOD/Scid γ c^{-/-}* Mäuse, die transgen waren für das humane MHC-Klasse I-Molekül HLA-A2, Langerhans Insel-spezifische humane T-Zellen aus der Bauchspeicheldrüse isoliert werden [92].

Die Entwicklung eines funktionstüchtigen humanen Immunsystems kann nur durch Transfer humaner CD34⁺ hämatopoetischer Stammzellen (HSC) erfolgen [82,91], die durch die Fähigkeit zur Selbsterneuerung und Differenzierung in alle Vorläuferzellen des blutbildenden Systems charakterisiert sind. Für eine humane Hämatopoese in immundefizienten Mäusen können unterschiedliche Herangehensweisen erfolgreich sein. Sowohl der intrahepatische Stammzelltransfer in neugeborene Mäuse als auch die intravenöse Applikation in adulte Mäuse kann zur Ausbildung eines humanen Immunsystems führen [93]. Ein alternativer Ansatz wurde von Garcia et al. beschrieben: bei der sogenannten „BLT-Maus“ (Bone marrow, liver, thymus) erfolgt der gleichzeitige Transfer humaner Blutstammzellen mit der Implantation syngener Thymi und pränataler Leber unter die Nierenkapsel der Mäuse [94]. Diese Tiere entwickeln ein robustes humanes Immunsystem einschließlich funktioneller B-Zellantworten. Derartige vollhumanisierte Mausmodelle bieten erstmals die Möglichkeit komplexe humane Immunreaktionen und deren Modulation *in vivo* zu untersuchen.

1.1 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit waren funktionelle Untersuchungen zur Regulation von T-Zellpopulation, isoliert aus dem peripheren Blut von MS-Patienten. Neben diesen *in vitro*-Analysen sollten erste humanisierte Mausmodelle aufgebaut werden, die eine Analyse von MS-assoziierten Immunantworten *in vivo* erlauben.

2. Material und Methoden

2.1 Patienten

In dieser Arbeit wurden ausschließlich Patientenproben verwendet, die zuvor durch die Landesärztekammer Rheinland-Pfalz genehmigt wurden. Alle Patienten wurden nach den ethischen Richtlinien der Deklaration von Helsinki aufgeklärt, gaben ihr schriftliches Einverständnis und die Blutentnahme erfolgte im Rahmen der Routinediagnostik. 31 Patienten mit einer RRMS (Alter 21-64 Jahre), 3 Patienten mit einem klinisch isolierten Syndrom (Alter 34-50 Jahre) und 8 RRMS Patienten unter Rebif-Therapie erfüllten die von McDonald formulierten diagnostischen Bedingungen der MS (Tabelle 3.1). Die unbehandelten MS-Patienten erhielten mindestens 6 Monate vor Blutentnahme die letzte Behandlung, wohingegen die IFN- β -behandelten MS-Patienten das Präparat Rebif mindestens 5 Monate einnahmen. PBMC von 92 gesunden Spendern wurden als Kontrolle verwendet.

2.2 Methoden

2.2.1 Methoden der Zellkultur

Die Arbeiten der Zellkultur wurden an einer sterilen Werkbank durchgeführt. Die Kulturen wurden mit sterilen Reagenzien angesetzt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte bei 37 °C und 5 % CO₂-Gehalt in gesättigter Wasserdampf-atmosphäre. Unter diesen Bedingungen bleibt der physiologische pH-Wert der CO₂/Bikarbonat-gepufferten Medien konstant. Humane Immunzellen und reisolierte Immunzellen aus humanisierten Mäusen wurden in X-VIVO-15 (Lonza) kultiviert. Alle im Rahmen dieser Arbeit verwendeten blockierenden, neutralisierenden und stimulierenden Antikörper, sowie rekombinanten Zytokine, die in der Zellkultur eingesetzt wurden, waren Azid-frei und steril.

2.2.2 Isolierung humaner PBMC aus *Buffy Coats* oder Vollblut

Die Gewinnung humaner Zellen erfolgte aus *Buffy Coats* von gesunden, freiwilligen Spendern aus der Transfusionszentrale der Universitätsmedizin Mainz, oder dem Vollblut von MS-Patienten. Bei der Isolierung von PBMC (*Peripheral BLOOD MONONUCLEAR CELLS*) handelt es sich um ein Verfahren der

Dichtegradienten-Zentrifugation mittels Lymphozytenseparationsmedium (Ficoll, PAA, Pasching), das die Auftrennung der PBMC in plasmatische und zelluläre Bestandteile ermöglicht. Grundlage ist die unterschiedliche Dichte der einzelnen Blutzellpopulationen. Ficoll ist eine isotonische Lösung mit der mittleren Dichte von 1,077 g/ml bei 20 °C. Während Erythrozyten und Granulozyten eine wesentlich höhere Dichte aufweisen, zeigen mononukleäre Zellen wie Monozyten und Leukozyten eine geringere Dichte als das Separationsmedium. Durch Überschichten der Ficolllösung (15 ml) mit 30 ml des Bluts und anschließender Zentrifugation (Raumtemperatur, 300xg, ohne Bremse) werden die Zellen bei gleichbleibender Zentrifugalkraft und konstanter Viskosität des Separationsmediums, ihrer Dichte nach aufgetrennt. Sowohl Dichte als auch Osmolarität dieser Lösung sind zur Isolierung von Leukozyten optimiert.

Die resultierenden 4 Phasen gliedern sich wie folgt auf:

1. oberste Phase = gelbes Blutplasma
2. Phase/Phasengrenze= mononukleäre Zellen hauptsächlich Leukozyten und Monozyten
3. Phase= klares Ficoll
4. unterste Phase = Erythrozyten und Granulozyten

Die 2. Phase, hauptsächlich bestehend aus Leukozyten und Monozyten, wurde vollständig in ein zweites 50 ml Falcon überführt, in das zuvor 10 ml kaltes PBS/EDTA vorgelegt wurden. Durch mehrmalige Waschschriffe mit 1xPBS/EDTA und anschließender Zentrifugation bei 300xg, 4 °C, 6 min. wurden die Zellen von restlichen Plasma-, Ficollresten und Thrombozyten gereinigt.

2.2.3 Ermittlung der Lebendzellzahl

Zur Bestimmung der Lebendzellzahl wurde Trypanblau, ein Vitalfarbstoff verwendet. Die Substanz wird nur von toten Zellen aufgenommen und färbt diese Zellen dunkelblau. Vitale Zellen nehmen diesen Farbstoff nicht auf. Die physiologische Trypanblau-Lösung wurde 1:10 verdünnt und die Zahl der lebenden Zellen mittels Neubauer-Zählkammer ermittelt. Hierzu wurde ein Großquadrat mit 16 Einzelquadraten ausgezählt und die vitalen Zellen wie folgt berechnet:

***Zellzahl pro Großquadrat x Verdünnungsfaktor x Volumen x 10⁴ (Kammerkonstante)=
Zellzahl***

2.2.4 Generierung Treg-depletierter, CD4- und CD8-depletierter PBMC

Um Einflüsse funktionell gestörter Treg aus MS-Patienten auszuschließen wurde diese T-Zellsubpopulation innerhalb der PBMC depletiert (PBMC^{depl}). Hierfür wurde das Protokoll von *Jonuleit et al.* verwendet [86,95]. CD4⁺ CD25^{high} Treg innerhalb der PBMC wurden mit limitierenden Mengen anti-CD25-Dynabeads depletiert und durchflusszytometrisch untersucht (Abb. 2.1 A). Die PBMC wurden hierfür in 5 ml MEM + 2 % HSA (Octapharma) aufgenommen und mit anti-CD25-Dynabeads (0,5 Beads/Zelle; Invitrogen) bei 4 °C inkubiert. Nach 20 min. Inkubation wurden weitere 3 ml des Mediums hinzugefügt und 15 min. inkubiert. Die Depletion der Zellpopulationen erfolgte im Depletionsmagneten (Invitrogen, Deutschland) nach Herstellerprotokoll. Diese Methode wurde auch verwendet um einzelne Population wie CD19⁺ B-Zellen (CD19-Dynabeads 2 Beads/Zelle), CD4⁺ oder CD8⁺ T-Effektorzellen (je 2 Beads/Zelle) innerhalb der PBMC zu depletieren (Abb. 2.1 B).

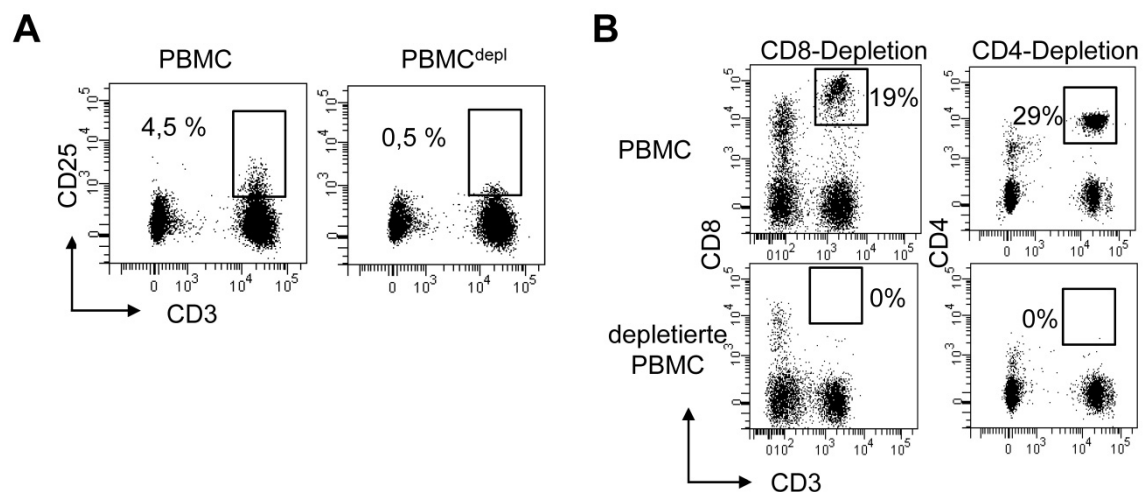


Abbildung 2.1: Durchflusszytometrische Kontrolle der Depletion

PBMC wurden vor und nach Treg-Depletion (A) oder CD4/CD8-Depletion (B) mit Fluorochrom-konjugierten mAk gegen CD4, CD8, CD25 und CD3 gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert.

2.2.5 Isolation humaner T-Zellpopulationen aus PBMC

Die in dieser Arbeit verwendeten T-Zellpopulationen wurden mittels Microbeads aus PBMC isoliert (Miltenyi Biotec). Dabei handelt es sich um ca. 50 nm große, uniforme, superparamagnetische Polyesterolkügelchen an deren Oberfläche Antikörper gebunden sind. Diese gebundenen Antikörper erkennen spezifisch die entsprechenden Antigene auf der Zelloberfläche der Zielzelle. Nach 20-

minütiger Inkubation der Microbeads mit der Zellsuspension (bei 4 °C auf dem Schüttler) wurde das Zellgemisch über eine mit Eisenpartikeln gefüllte MACS Zell-Separations-Säule gegeben, die von einem starken Magnetfeld umgeben ist. Beim Spülen können die unmarkierten Zellen die Separationssäule durch die Zwischenräume der Eisenkügelchen ungehindert passieren. Durch das starke Magnetfeld, bleiben Zellen die zuvor mit den spezifischen Microbeads markiert wurden in der Säule und können außerhalb des Magneten herausgespült werden. Neben der Positivanreicherung wurden CD3⁺ T-Zellen auch negativ angereichert. Hierfür wurden alle Zellen außer den T-Zellen innerhalb der PBMC mittels Microbeads markiert und mit Hilfe der Separationssäule von den T-Zellen separiert. Die Anreicherung der Zellen erfolgte nach Angaben des Herstellerprotokolls (Miltenyi Biotec, MACS Cell LS Separation Columns).

2.2.6 Isolation CD4⁺CD25⁺ regulatorischer T-Zellen (Treg)

Treg wurden wie in 2.2.5 beschreiben ebenfalls mittels CD25-Microbeads isoliert. Zur Entfernung von kontaminierenden CD8⁺ T-Zellen, CD14⁺ Monozyten und CD19⁺ B-Zellen wurden die angereicherten CD25⁺ Zellen mit anti-CD19- (2 Beads/Zelle) anti-CD8- (2 Beads/Zelle) und anti-CD14-Dynabeads (1 Bead/Zelle) rotierend bei 4 °C inkubiert. Die Depletion der Kontaminatoren erfolgte anschließend im Depletionsmagneten (Invitrogen, Deutschland) nach Herstellerprotokoll.

2.2.7 Auswertung der ³H-Tdr-Assays

Die Messung der Proliferation von T-Zellen erfolgte indirekt über den Einbau von ³H-Thymidin (³H-Tdr, MP Biomedicals Europe, Eschwege) in die proliferierenden T-Zellen. ³H-Tdr wurde der Kokultur an Tag drei tröpfchenweise mit einer 1 ml Spritze zugegeben (entspricht 37 kBq/Well) und für weitere 16 h im Brutschrank inkubiert. Somit liegt ³H-Tdr im Medium im Überschuss vor und wird bei der DNA-Neusynthese expandierender T-Zellen eingebaut.

Nach Ablauf der 16 h wurden die Zellen mit einem Zellerntegerät abgesaugt und auf einen Glasfaserfilter übertragen. Überschüssiges ³H-Tdr und Medium wurden entfernt und die Zellen auf dem Filter aufgefangen. Im Anschluss konnte der Filter bei 100 °C 30 min. getrocknet und mit 10 ml Szintillationsflüssigkeit in einem Plastikbeutel verschweißt werden.

^3H -Tdr gehört zu den β -Strahlern und weist nur eine geringe radioaktive Strahlung auf, die mit gewöhnlichen Zählrohren nicht direkt detektierbar ist. Aus diesem Grund wird das Filterpapier mit Szintillationsflüssigkeit (Rotizint® eco, Karl Roth GmbH) versehen. Der Szintillationscocktail ist ein Gemisch aus organischen Lösungsmitteln und einer flüssigen, fluoreszierenden, organischen Verbindung, die in der Lage ist die Zerfallsenergie über die Szintillatormoleküle aufzunehmen. Durch die Übertragung der Energie auf die Szintillatormoleküle werden die Elektronen dieser Moleküle in einen energiereicheren instabilen Zustand versetzt. Durch die Rückkehr der Elektronen in den Grundzustand wird Energie in Form von Photonen frei, die von den Photomultipliern des β -Szintillations-Counters detektiert werden können. Der Counter misst die Zahl der Lichtblitze pro Minute und lässt somit indirekt eine Aussage über die Radioaktivität zu. Man nennt dieses Verfahren Flüssigkeitsszintillations-Methode oder LSC-Methode (*Liquid Scintillation Counting*).

2.2.8 Standard Suppressionstest

Für den Standard Suppressionstest wurden entweder 10^5 Treg-depletierte PBMC gesunder Spender oder von MS-Patienten zusammen mit Treg eines gesunden unabhängigen Spenders kokultiviert (im Verhältnis von 1:1 bis 1:64) und mit $0,5 \mu\text{g/ml}$ anti-CD3 mAk (OKT3) stimuliert. Nach drei Tagen wurde der Kultur für 16 h ^3H -Tdr zugesetzt, um dann die Proliferation im β -Szintillationszähler zu bestimmen. Einige Suppressionstest wurden zusätzlich mit neutralisierenden mAk gegen den anti-IL-6R (30 ng/ml; Tocilizumab; Roacterna; Roche) oder IL-6 (100 ng/ml oder 1000 IU/ml; CellGenix oder R&D Systems) ergänzt. Zudem wurde der PKB/c-Akt-VIII Inhibitor ($0,1 \mu\text{M}$; Calbiochem) zu einzelnen Kulturen titriert. Für einige Experimente wurden statt der gesamten PBMC entweder B-Zelldepletierte PBMC, CD8- oder CD4-depletierte T-Zellen verwendet und wie oben erwähnt im Suppressionstest stimuliert.

2.2.9 Transwelleexperimente

Transwells (Millicell, $0,4 \mu\text{m}$; Millipore, Eschborn) verhindern den direkten Zellkontakt, erlauben aber die Diffusion löslicher Faktoren durch eine semipermeable Membran. In der unteren Kammer wurden 2×10^5 negativ isolierte T-Zellen von gesunden Spendern mit 2×10^5 Treg eines unabhängigen

gesunden Spenders mit 0,5 µg/ml anti-CD3 mAk sowie T-Zell-depletierten und 90 Gy bestrahlten PBMC stimuliert. In die obere Kammer der Transwells wurden entweder isolierte T-Zellen von gesunden Spendern oder MS-Patienten zusammen mit T-Zell-depletierten PBMC transferiert. Einige Versuche wurden in Anwesenheit von 30 ng/ml Tocilizumab durchgeführt. Nach drei Tagen wurde der Kultur für 16 h ³H-Tdr zugesetzt, um dann die Proliferation im β-Szintillationszähler zu bestimmen.

2.2.10 Zytokinbestimmung

Treg-depletierte PBMC gesunder Spender oder von MS-Patienten wurden in An- oder Abwesenheit von Treg (im Verhältnis 1:1) mit 0,5 µg/ml anti-CD3 mAk stimuliert. 72 h nach Stimulation wurde die Zytokinsekretion in Einzel- und Kokulturüberständen mit Hilfe des Cytometric Bead Array (CBA, BD Pharmingen) nach Vorgabe des Herstellerprotokolls durchgeführt und mit GraphPad Prism6 (Statcon) ausgewertet. Für die intrazelluläre Zytokinbestimmung wurden PBMC mit 1 µg/ml Ionomycin und 1 ng/ml PMA für 5 Stunden maximal stimuliert, 4 Stunden davon in Anwesenheit von Monensin (1,3 µM/ml). Nach der Stimulation wurden die Zellen gewaschen, permeabilisiert (perm/fix solution; BD Pharmingen) und mit den angegebenen Antikörpern (anti-IL-2-PE-Cy7, anti-IL-6-APC, anti-IL-17A-APC-Cy7, anti-IFN γ -FITC alle von BD Biosciences) gefärbt. Die Datenaufnahme erfolgte am LSR II.

2.2.11 RT-PCR und qRT-PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist eine Methode, um bestimmte Gensequenzen innerhalb eines DNA-Abschnittes zu vervielfältigen. Für die Amplifikation benötigt man zwei zur DNA komplementäre Primer, die den Startpunkt der Synthese bestimmen und den Abschnitt begrenzen. Mit Hilfe einer thermostabilen DNA-Polymerase und Desoxyribonukleosiden (dNTP) wird die Zielsequenz neusynthetisiert und amplifiziert. Hierfür wurde aus 2×10^6 Zellen die RNA unter Verwendung des Rneasy Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben extrahiert. Anschließend konnte die cDNA durch reverse Transkription mittels Sensiscript RT Kit (Qiagen) generiert werden. Folgende Primersequenzen (Biomers) für IL-6 wurden verwendet: vorwärts 5'-TTCAATGAGGAGACTTGCCTG-3', rückwärts 5'-ACAACAACAATCTGAGGTGCC-3'. Die Amplifikation fand im Thermocycler

unter den folgenden Bedingungen statt: 94 °C für 1 min. 30 sec. gefolgt von 28-30 Zyklen: 94 °C 30 sec., 54 °C 45 sec., 72 °C 45 sec. und 7 min. bei 72 °C. Die PCR Produkte wurden auf einem 2 % Agarosegel aufgetrennt. EF1- α wurde als Haushaltsgen verwendet. Für einige Versuche wurde eine quantitative Aussage über die Expression der IL-2 und IL-6 mRNA benötigt. Statt der bisher verwendeten PCR wurde auf eine quantitative Echtzeit-PCR (qRT-PCR) zurückgegriffen. Hierbei korreliert die gemessene Fluoreszenz in der exponentiellen Phase proportional zur Menge der gebildeten DNA. Die quantitative mRNA wurde im 7300 Real Time PCR System (Applied Biosystem) durchgeführt unter der Verwendung des QuantiFAST PCR Kit (Qiagen) und entsprechend den Herstellerangaben generiert. Die relative IL-2 und IL-6 mRNA (beide QuantiTect Primer, Qiagen) wurden auf EF1- α normalisiert.

2.2.12 Färbungen von Oberflächenmolekülen

Es wurden sowohl direkte als auch indirekte Färbungen von Oberflächenmolekülen durchgeführt. Bei den indirekten Färbungen folgte zunächst die Markierung des Oberflächenmoleküls mit einem unkonjugierten, monoklonalen Primärantikörper. In einem zweiten Inkubationsschritt wurde der bereits gebundene Primärantikörper mit einem Fluorochrom-gekoppelten Sekundärantikörper markiert. Bei den Antikörpern, die direkt an ein Fluorochrom gekoppelt sind, war nur eine einmalige Inkubationszeit von 20 min. bei 4 °C im Dunkeln nötig. Zur Vorbereitung der Zellsuspension wurden zunächst ca. 10^5 Zellen in einer 96-Well Platte bei 300xg, 4 °C, 6 min. zentrifugiert und das Zellpellet einmal mit 200 μ l FACS-Puffer gewaschen. Durch diesen Waschschrift konnten unspezifische Antikörperbindungsstellen durch das im FACS-Puffer enthaltene Sandoglobulin (polyklonale humane Antikörperlösung) abgedeckt werden. Nach 20-minütiger Inkubation mit 30 μ l der Antikörperlösung (Endkonzentration 5 μ g/ml) folgte ein erneuter Waschschrift des Zellsediments mit kaltem FACS-Puffer, um die Probe von überschüssigen, ungebundenen Antikörpern zu befreien. Folgende Antikörper wurden verwendet: anti-human CD3 (SK7), anti-human CD3 (UCHT1), anti-human CD4 (RPA-T4), anti-human CD8 (SK1), anti-human CD14 (M5E2), anti-human CD19 (HIB19), anti-human CD25 (M-A251), anti-human CD27 (M-T271), anti-human CD45 (HI30), anti-human CD45RA (HI100), anti-human CD45RO (UCHL1), anti-human CD40L (TRAP1), anti-human CD56 (B159),

anti-human CD69 (L78), anti-human CD127 (HIL-7R-M21), anti-human IL-2 (MQ1-17H12), anti-human IL-6 (MQ2-13A5), anti-human IL-17A (BL168), anti-human IFN- γ (B27), anti-(pS473) pPKB/c-Akt (M89-61), anti-murin CD45 (30-F11) alle von BD Pharmingen; FoxP3 (259D; BioLegend) und anti-human CD8 (BW 135/80, Miltenyi Biotec). Die Viabilität der Zellen wurde mittels 7-AAD (eBioscience) festgestellt. Für die durchflusszytometrische Untersuchung der Oberflächenmoleküle wurde die Probe in 200 μ l kaltem FACS-Puffer aufgenommen, in ein Rundboden-FACS-Röhrchen überführt und im Durchflusszytometer analysiert. Zur genauen Einstellung der Kompensation der Laserverstärkung wurden zusätzlich ungefärbte Zellen und Einzelfärbungen durchgeführt. Für einige Versuche wurden T-Zellpopulationen mit unterschiedlichen Antikörpercocktails angefärbt und mit Hilfe des Durchflusszytometers BD FACS Aria (BD Biosciences) einzelne Subpopulationen separiert.

2.2.13 Färbungen des IL-6-Rezeptors

Zytokinrezeptoren werden häufig auf der Zelloberfläche nur gering exprimiert. Daher wurde im Folgenden auf direkt markierte Antikörper verzichtet und stattdessen biotinyliertes IL-6 zum Nachweis des IL-6R verwendet. Die Verwendung dieser indirekten Färbemethode über einen FITC-markierten Streptavidin-Sekundärantikörper diente zur Signalverstärkung. Die Durchführung der IL-6-Rezeptorfärbung erfolgte nach Herstellerprotokoll (Fluorokine, R&D Systems).

2.2.14 CFSE- und eFluor®670-Markierung von T-Zellen

5,6-Carboxyfluorescein Diacetat Succinimidyl Ester (CFDA-SE) ist ein Vital-Fluoreszenzfarbstoff, der lebende Zellen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* anfärbt. CFDA-SE ist in seiner ursprünglichen Form nicht fluoreszent. Aufgrund der Acetatgruppe ist dieser Farbstoff in der Lage die Plasmamembran lebender Zellen zu überwinden. Im Zytoplasma wird die Acetatgruppe des CFDA-SE durch intrazelluläre Esterasen abgebaut, wodurch der Ester in den fluoreszierenden Farbstoff CFSE umgewandelt wird. So ist CFSE im Stande mit freien Aminogruppen Bindungen einzugehen, die über mehrere Wochen stabil bleiben. CFSE wird bei jeder Zellteilung mit dem Zytoplasma gleichmäßig auf beide Tochterzellen verteilt, wodurch die logarithmische Abnahme der

Fluoreszenzintensität als Indikator für proliferierende Zellen genutzt werden kann. Der Vitalfarbstoff eFluor®670 funktioniert äquivalent zu CFSE. Alle eingesetzten Medien und Puffer wurden auf 37 °C erwärmt. Zunächst wurden die Zellen in ein 50 ml Falcon überführt und mit 37 °C warmen 1xPBS bei RT, 300xg, 6 min. zentrifugiert. T-Zellen inkubierten in 5 ml einer 1 µM CFSE/ 1x PBS-Lösung für 30 min. bei 37 °C. Die Inkubation mit 1 µM eFluor®670 betrug nur 10 min. Anschließend wurde das Zentrifugenröhrchen mit 37 °C warmen X-VIVO-15 + 10 % HSA aufgefüllt und die Zellen zentrifugiert, in X-VIVO-15 aufgenommen und in den entsprechenden Versuchen eingesetzt. Die Proliferation wurde an Tag 3 anhand der eFluor®670- und CFSE-Verdünnung im Durchflusszytometer (LSR II, BD Biosciences) analysiert.

2.2.15 Durchflusszytometrische Untersuchungen

Die Durchflusszytometrie ermöglicht das Zählen und die Analyse von Zellen in einem Flüssigkeitsstrom und ist somit eine wichtige Methode der zellulären Immunologie. Das Prinzip der Durchflusszytometrie beruht darauf, dass die in einer Lösung befindlichen Zellen durch eine Kapillare gedrückt werden und in einem Flüssigkeitsstrom einzeln an einem Laser vorbeigeführt werden. Trifft der Laserstrahl auf eine Zelle so wird das Licht in verschiedene Richtungen abgelenkt, reflektiert und kann durch Photodetektoren nachgewiesen werden. Mit Hilfe dieses Verfahrens lassen sich relativ große Zellzahlen in verhältnismäßig kurzer Zeit analysieren. Die Menge des gestreuten Lichts steht in Zusammenhang mit der Größe und der Komplexität der Zelle. Das Vorwärtsstreulicht FSC (*Forward Scatter*) hängt von der Größe der Zelle ab und ist ein Maß für die Beugung des Lichts. Eine weitere Größe ist das Seitwärtsstreulicht SSC (*Sideward Scatter*), das ein Maß für die Granularität bzw. die Komplexität der Zellen ist. Zusätzlich kann man Zellpopulationen mit Hilfe von fluoreszenzmarkierten Antikörpern spezifisch anfärben. Die hierfür verwendeten Antikörper sind mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt, der im Durchflusszytometer durch einen Laserstrahl mit der entsprechenden Wellenlänge angeregt wird. Durch diese Lichtabsorption gelangen die Elektronen der Fluorochrome in energetisch höhere Energieniveaus. Die Fluoreszenz entsteht durch den Rückfall von Elektronen aus einem angeregten, instabilen Energieniveau in einen Zustand niedrigerer Energie. Die dabei emittierte Energie in Form von Photonen, kann von dem Photomultiplier

detektiert werden. Die Emissionswellenlänge ist für jedes Fluorochrom spezifisch.

2.2.16 Generierung humaner dendritischer Zellen aus PBMC

Die Generierung von DC aus PBMC erfolgte in einer 6-Well-Kulturplatte. Pro Well wurden ca. 20×10^6 PBMC mit 2 ml Adhärenzmedium (RPMI + 1,5 % autologes, hitzedeaktiviertes Plasma) eingesetzt. Während einer 30-minütigen bis 1,5-stündigen Inkubationszeit im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂-Sättigung adhärierte der monozytäre Anteil der PBMC an der Kulturplatte. Nach optischer Kontrolle der Plastikadhärenz, mit Hilfe des Lichtmikroskops, wurden die nichtadhärenten Zellen durch mehrfaches Spülen mit 37 °C warmen 1xPBS entfernt. Die gereinigten, verbliebenen Monozyten wurden in 3 ml Kulturmedium pro Well kultiviert. Das Kulturmedium (X-VIVO-15) war zusätzlich mit 800 U/ml GM-CSF und 100 U/ml IL-4 versetzt. Bei der Generierung von reifen DC wurde dem Kulturmedium zusätzlich 1,5 % autologes, hitzedeaktiviertes Plasma hinzugefügt. An Tag 2 und 4 nach Ansatz der Kultur wurde 1 ml des Mediums aus dem Well abgenommen und gegen 1 ml frisches, warmes Kulturmedium (GM-CSF 800 U/ml, IL-4 100 U/ml, bei Generierung reifer DC zusätzlich 1,5 % autologes hitzedeaktiviertes Plasma) ersetzt. Im Verlauf der Kultur wurde die Zellmorphologie jeden Tag mit dem Lichtmikroskop überprüft. An Tag 6 hatten alle Zellen überwiegend den Phänotyp unreifer dendritischer Zellen. Die Generierung muriner Bone Marrow derived DC (BMDC) erfolgte wie in der Publikation von *Inaba et al.* beschrieben [96].

2.2.17 Ausreifung von unreifen dendritischen Zellen mittels Zytokincocktail

Die terminale Differenzierung von unreifen zu reifen DC erfolgte mittels Zytokincocktail [97]. An Tag 6 der Kultur wurden die unreifen DC geerntet und bei einer Dichte von ca. $0,8 \times 10^6$ Zellen mit 3 ml X-VIVO-15 pro Well inklusive Zytokincocktail ausgereift. In dem Zytokincocktail waren folgende Ingredienzien enthalten: Granulozyten-Makrophagen-CSF (400 U/ml, Immunotools), IL-1 β (10 ng/ml, Strathmann Biotec AG), IL-4 (1000 U/ml, Immunotools), IL-6 (1000 U/ml, Cellgenix), TNF- α (10 ng/ml, Genzyme Corp.) und Prostaglandine-E2 (PGE2) (1 μ g/ml, Cayman Chemical Comp.). Nach Zugabe des Zytokincocktails und zwei Tagen Kultivierung im Brutschrank kam es zur Ausreifung der DC. Für

einige Versuche wurden zusätzlich zum Zytokincocktail auch 2 µg/ml Myelin-Oligodendrozyten Glykoprotein (MOG)-Protein hinzugegeben. Der Reifungsgrad der geernteten DC wurde mittels Durchflusszytometrie und Lichtmikroskop überprüft.

2.2.18 Immunhistochemische Färbung

Entscheidend für den Erfolg histologischer Färbungen des Hirns ist die Entfernung des Blutes aus dem Blutkreislauf. Hierfür werden der rechte Vorhof und der linke Ventrikel punktiert und zunächst mit Kochsalzlösung und anschließend mit 4 % Paraformaldehydlösung perfundiert. Ein wesentlicher Bestandteil aller histologischen Techniken ist die Konservierung des Gewebes. Die Fixierlösung (Formalin) dringt in das Gewebe ein, denaturiert die Proteine und verändert somit die Tertiärstruktur, was zur Konservierung des Gewebes führt. Zum einen verliert das Organ dabei seine Elastizität, was sich strukturfestigend auswirkt, zum anderen wird der Befall von Schimmelpilzen verhindert. Der Vorteil von Formaldehyd als Fixiermittel ist, dass es in erster Linie mit den alkalischen Aminosäuren reagiert und es hierbei zur Bildung quervernetzender Hydroxymethylenbrücken kommt. Dies bedeutet, dass die Permeabilität für Makromoleküle gering ist und die Struktur zytoplasmatischer Proteine nur gering verändert wird. Das fixierte Präparat wird im Anschluss in eine Paraffinmatrix eingebettet, mit Hilfe des Schlittenmikrotoms in 3-5 µm dicke Scheiben geschnitten und blasenfrei auf einem beschichteten Objektträger fixiert. Die meisten Färbemethoden sind indirekte Verfahren. Bei der indirekten Methode, ist der epitopspezifische Primärantikörper unkonjugiert. Anschließend wird ein zweiter enzymmarkierter Sekundärantikörper aufgetragen, der gegen den Primärantikörper gerichtet ist. Durch Zugabe von Substrat kommt es schließlich zur Bildung einer sichtbaren Färbung (z.B. DAB-Chromogen). Diese Methode ist um ein Vielfaches empfindlicher, als die direkte Methode. Vor der Färbung wurden die Paraffinschnitte entparaffiniert. Dazu wurden die Objektträger je 5 min. in eine absteigende Alkoholreihe getaucht (2x Xylol-> 2x 100 % EtOH-> 96 % EtOH-> 80 % EtOH->70 % EtOH) und im Anschluss je nach verwendetem Antikörper in EDTA oder Citratpuffer für 45 min. im Dampfgerar gekocht. Die Behandlung der Präparate im Dampfgerar machte die Proben zugänglich für den Antikörper. Für die anstehende Färbung wurde das Gewebe von einem DakoPen Fettstift eingegrenzt, um eine Barriere für

Flüssigkeiten zu schaffen. Nach Peroxidase-Block (5 min.) und 30-minütiger Inkubation des primären Antikörpers (100 μ l pro Probe, Konzentration entsprechend Herstellerprotokoll), folgte das Entfernen von überschüssigem Antikörper durch zwei 5-minütige Waschschrte in TRIS-Puffer. Nach Färbung

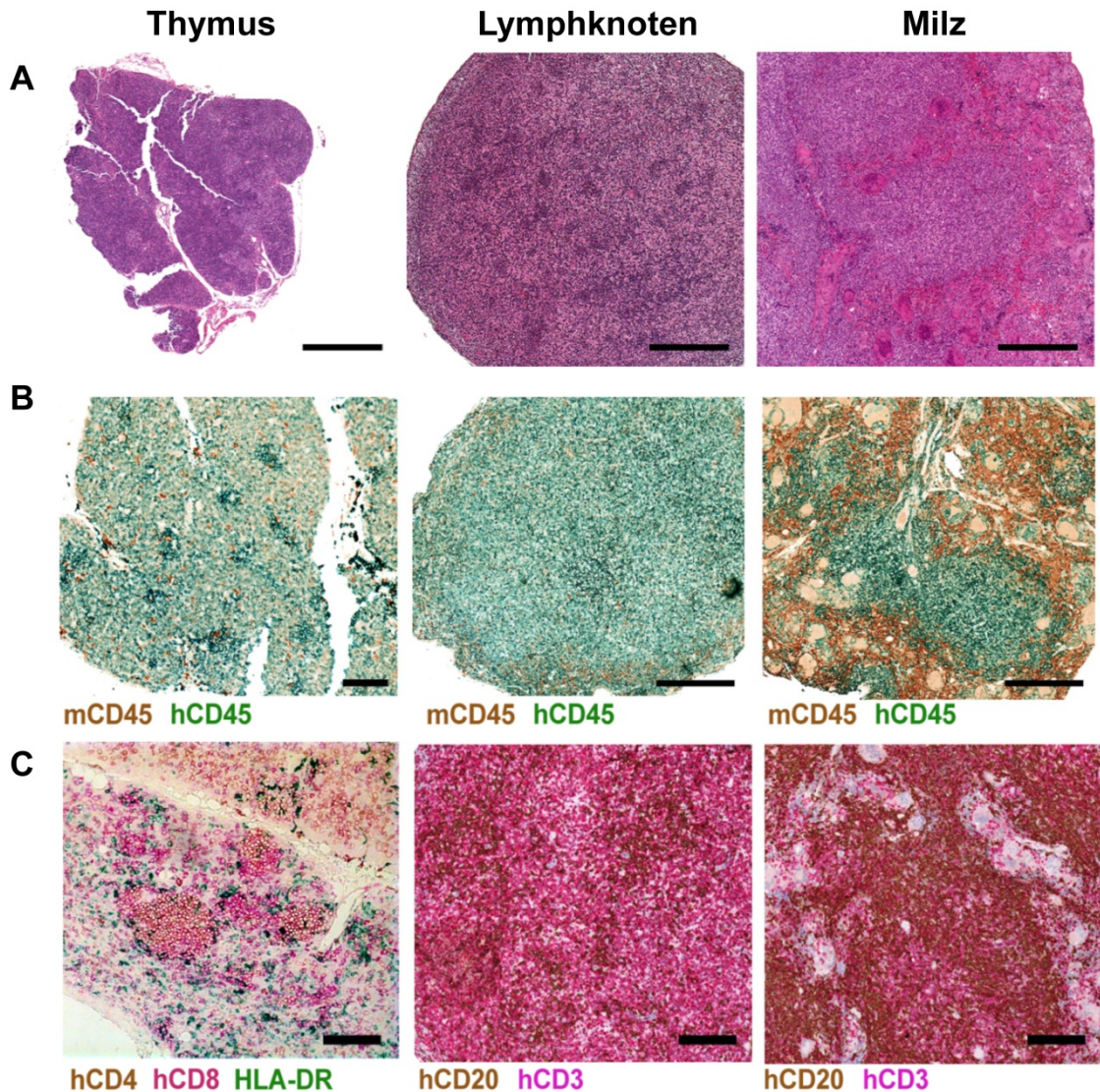


Abbildung 2.2: Histologische Analyse humanisierter Thymi, Lymphknoten und Milzen

23 Wochen nach Humanisierung wurden die Mäuse euthanisiert und die Organe in 4 % Formalinlösung fixiert. Immunhistologische Färbungen wurden durchgeführt wie in 2.2.18 beschrieben. A) Dargestellt sind Hämatoxylin-Eosin-Färbungen, Maßstab entspricht 100 μ m. B) Thymus, Lymphknoten und Milzschnitte wurden mit anti-human CD45 (grün) und anti-murin CD45 angefärbt. C) Thymusschnitte wurden gegen anti-human CD4 (braun), anti-human CD8 (pink) und anti-human HLA-DR (grün), Lymphknoten und Milzschnitte gegen anti-human CD20 (braun) und anti-human CD3 (pink) gefärbt. Maßstab entspricht 100 μ m. Diese histologischen Analysen wurden in Kooperation mit Johannes Sam erarbeitet.

der Primärantikörper wurden die Schnitte mit dem Polymer-Kit (Zytomed) oder anti-Ratte impress (Vector) für 30 min. inkubiert und zur Visualisierung nochmals mit DAB Chromogen (Vector) oder permanent red (Zytomed) oder Histogreen (Linaris) bedeckt. Nach 5-minütiger Inkubation und erneutem Waschen in TRIS-Puffer (1x 5 min.) konnten die Proben mit Hämalaun gegengefärbt und 10min. unter Leitungswasser gewässert werden. Für die Fixierung der gefärbten Präparate wurden die Objektträger 2x in 100 % EtOH und 2x in Xylol geschwenkt. Im Anschluss konnten die Proben eingedeckt werden. Folgende Antikörper wurden verwendet: anti-human CD8 (144B; Abcam), anti-human CD4 (4B12; Dako), anti-human CD3 (2GV6), anti-human CD20 (L26), anti-human CD45 (RP2/18) alle von Ventana, anti-human HLA-DR (YD1/63.4.10), anti-mouse MAC3 (M3-84), anti-mouse CD45 (30-F11; BD Pharmingen) und Myelin-Basisches Protein (polyclonal, Böhlinger Mannheim).

2.3 Tierversuche

2.3.1 Tierhaltung

Die Haltung aller verwendeten Tiere und die Durchführung sämtlicher Tierversuche wurden in keimarmen Räumen der zentralen Tierhaltung der Universitätsklinik Mainz durchgeführt. Alle tierexperimentellen Versuche wurden im Rahmen eines genehmigten Tierversuchsantrages durchgeführt.

2.3.2 Verwendete Mausstämme

Sowohl die verwendeten Rag2^{-/-}γc^{-/-}-Mäuse (freundlicher Weise von Dr. Jörg Kirberg zur Verfügung gestellt), als auch die NOD-Scid- und NOD-Scidγc^{-/-}-Mäuse hatten den genetischen H2^d-Hintergrund. Alle Tiere wurden mit autoklaviertem Wasser plus Borgal sowie sterilisierten Trockenpellets nach den Richtlinien der Tierversuchsvorschrift versorgt. Für die Versuche wurden sowohl neugeborene als auch adulte Tiere in einem Alter von 8-42 Wochen verwendet. Sämtliche Mäuse wurden von der Zentralen Versuchstiereinrichtung (ZVTE) der Johannes Gutenberg-Universität Mainz bezogen.

2.3.3 Transfer humaner PBMC von gesunden Spendern oder MS-Patienten in Rag2^{-/-}γc^{-/-}-Mäuse

Neugeborenen Rag2^{-/-}γc^{-/-}-Mäusen wurde 0-3 Tage nach der Geburt 5x10⁶ PBMC intraperitoneal appliziert. Vorab wurden die Treg innerhalb der PBMC mit anti-CD25-Dynabeads depletiert und mit der gleichen Anzahl Treg eines unabhängigen gesunden Spenders ersetzt. In einigen Versuchsansätzen wurden entweder einmalig 5 µg/Maus HIV-1 gp120 [86] oder 50 µg/Maus Tocilizumab verabreicht. Die Tiere wurden in regelmäßigen Abständen gewogen und der Gesundheitszustand beurteilt.

2.3.4 Gewinnung humaner Zellen aus murinen Organen und Blut

Die Blutentnahme erfolgte durch Punktion des retroorbitalen Plexus. Zur Organentnahme wurden die Mäuse mit Hilfe einer CO₂-Begasungsanlage abgetötet. Für die Präparation der Seitenlymphknoten wurden die Mäuse mit Ketamin/Rompun betäubt und 100 µl Patentblau in die Schwanzwurzel appliziert. Nach 30 min. wurden die Tiere abgetötet und die blau-gefärbten Lymphknoten herauspräpariert. Für die Präparation der Maus wurde das Tier

auf dem Rücken fixiert. Die Haut der Bauchseite wurde von der Körpermitte ausgehend durch einen medianen Schnitt nach vorn bis zum Unterkiefer und nach hinten bis zum Becken aufgeschnitten. Die Milz, die Leber, die Lymphknoten wurden in X-VIVO-15 aufgenommen und mit Hilfe eines Nylonsiebes (Porengröße 40 bzw. 70 μm , BD Bioscience) zu einer Einzelzellsuspension verarbeitet. Um Binde- und Fettgewebeanteile der mesenterialen Lymphknotenanlagen zu entfernen wurde das Gewebe zunächst 60 min. bei 37 °C in einem Liberasemedium angedaut und im Anschluss mit Hilfe eines Nylonsiebes zu einer Einzelzellsuspension zerkleinert. Nach Zentrifugation (300xg, 6 min. 4 °C) der Zelllösung konnte das Fett abgezogen werden.

2.3.5 Erythrozytenlyse

Bei der Aufarbeitung der entnommenen Organe, vor allem bei der Milz, mussten die Organe zunächst von den Erythrozyten befreit werden. Zur Entfernung der Erythrozyten aus der Zellsuspension wurde die Probe mit 2 ml ACK-Puffer versetzt und für max. 2 min. bei RT resuspendiert. Sofern nach der Zentrifugation (300xg, 4 °C, 6 min.) noch Erythrozyten in der Probe sichtbar waren, wurde der Lyseschritt so oft wiederholt, bis die Probe optisch frei von Blutzellen war. Der verwendete ACK-Puffer ist stark hypotonisch und hat zur Folge, dass durch das osmotische Gefälle große Mengen an Wasser in die Zellen eindringen und die Erythrozyten bei steigendem Innendruck aufplatzen. Erythrozyten sind im Vergleich zu anderen Zellen besonders empfindlich für Änderungen des osmotischen Gefälles und können somit aus der Probe entfernt werden, ohne die restlichen Zellen zu zerstören.

2.3.6 Gatingstrategie bei der durchflusszytometrischen Analyse

Der Erfolg einer Humanisierung und somit die Ansiedlung humaner Immunzellen in unterschiedlichen Organen und dem peripheren Blut wurde durchflusszytometrisch untersucht. Hierfür wurden Erythrozyten-lysierte Immunzellen mit direkt-markierten Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern markiert. Bei der anschließenden Analyse wurde zunächst im FSC/SSC-Plot die Lymphozytenregion markiert und durch Exklusion 7-Aminoactinomycin-D⁺ (7-AAD) toter Zellen und der Zuhilfenahme humanspezifischer Antikörper der Anteil humaner CD45⁺, CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD14⁺, CD19⁺, CD56⁺ Zellen

bestimmt. Die Auswertung erfolgte mit der DIVA-Software (BD Biosciences) oder FlowJo7.6.4 (FlowJo, Treestar)

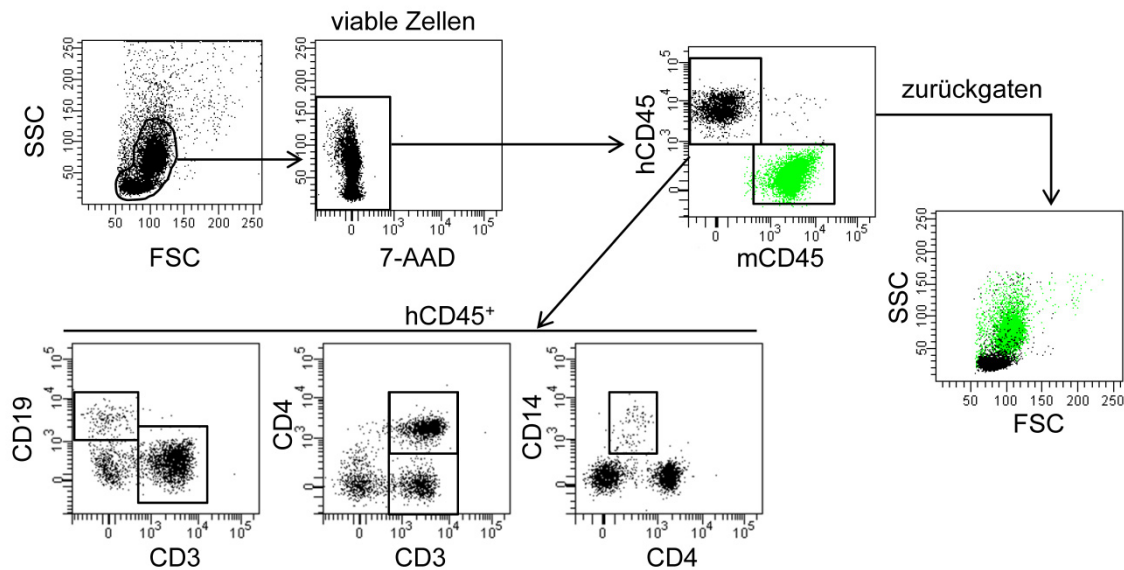


Abbildung 2.3: Darstellung der Gatingstrategie

Gatingstrategie zur Determination des Humanisierungsgrades. Im FSC/SSC-Plot wurde die Lymphozytenregion markiert und durch Exklusion 7-AAD⁺ toter Zellen und der Zuhilfenahme humanspezifischer Antikörper der Anteil humaner CD45⁺, CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD14⁺, CD19⁺, CD56⁺ Zellen 16 Wochen nach Stammzelltransfer bestimmt. Murine CD45⁺ Immunzellen sind in grün dargestellt.

2.3.7 Gewinnung humaner CD34⁺ Blutstammzellen aus Nabelschnurblut und anschließender Transfer in neugeborene NOD-*Scid γ c*^{-/-}-Mäuse

Die Nabelschnurproben stammten aus der Frauenklinik der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz und wurden nach schriftlicher Einverständniserklärung der Eltern gewonnen. Nach Durchführung eines Kaiserschnittes, wurde das in Venen der Nabelschnur und Plazenta verbleibende umbilikale Blut entnommen und mit PBS/EDTA/Heparin verdünnt. Die Isolation der PBMC erfolgte mittels Dichtegradienten-Zentrifugation und anschließender Anreicherung CD34⁺ Blutstammzellen (HSC) mit Hilfe von Microbeads (Miltenyi Biotec, nach Herstellerprotokoll). Der Anteil CD34⁺ HSC im Nabelschnurblut beträgt ca. 1 %. Die magnetische Anreicherung über CD34 ermöglichte jedoch die Isolation homogener HSC-Populationen mit hohen Reinheiten (Abb. 2.4 A).

1-4 Tage alte NOD/*Scid γ c*^{-/-}-Mäuse wurden subletal mit 400 cGy bestrahlt, mit Isofluran betäubt und anschließend 10⁵ CD34⁺ HSC in 50 μ l PBS intrahepatisch

appliziert. 7, 12 und 16 Wochen nach HSC-Transfer wurde der Anteil humaner Immunzellen im peripheren Blut bestimmt (Abb. 2.4. B).

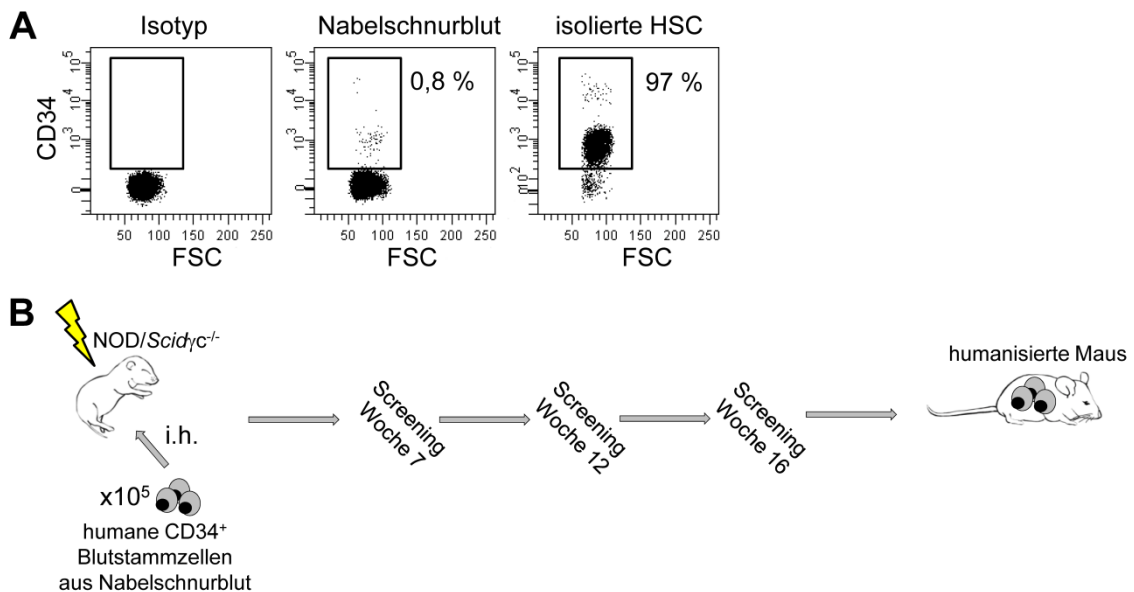


Abbildung 2.4: Strategie zur Humanisierung immundefizienter Mäuse

A) PBMC aus Nabelschnurblut oder magnetisch isolierte CD34⁺ HSC wurden mit anti-CD34 mAk gefärbt. Dargestellt ist der Anteil von CD34⁺ Zellen innerhalb der PBMC (Mitte) und der isolierten Fraktion (rechts). B) Schematische Darstellung der intrahepatischen Rekonstitution immundefizienter NOD/Scid γ c^{-/-}-Mäuse mit CD34⁺ Blutstammzellen. 7, 12 und 16 Wochen nach Transfer erfolgte die durchflusszytometrische Analyse des peripheren Blutes.

2.3.8 Induktion einer MS-ähnlichen Erkrankung

20 Wochen nach HSC-Transfer erfolgte die subkutane Immunisierung der humanisierten Mäuse mit rekombinantem murinem MOG-Protein (50 μ g/Maus), das in komplettem Freund'schen Adjuvant (CFA, Sigma) emulgiert war. Das MOG-Protein wurde freundlicher Weise von Dr. Florian C. Kurschus zur Verfügung gestellt oder von AnaSpec; sequence: accession # NP_034944 geordert. Zusätzlich bekamen die Mäuse 2x10⁴ reife MOG-beladene BMDC (2 μ g/ml) intravenös und an Tag 0 und 2 der Immunisierung sowie 400 ng Pertussistoxin (Sigma) intraperitoneal verabreicht. Es wurden entweder humane DC syngen zu den applizierten HSC, oder murine BMDC syngen zum Mausstamm verwendet. Zwei Wochen nach der Immunisierung wurden die Tiere derselben Behandlung unterzogen, jedoch wurde diesmal das MOG-Protein in unvollständiger Freund'scher Adjuvants (IFA, Sigma emulgiert, Abb. 2.4). In regelmäßigen Abständen wurden die Mäuse untersucht und die

klinischen Symptome wie folgt klassifiziert: 0, keine Symptome; 1, biegeschwacher Schwanz; 2, biegeschwacher Schwanz und schwache Hinterläufe; 3, gelähmte Hinterläufe. Die Tiere wurden umgehend getötet sobald sie einen klinischen Wert von 3 erreichten.

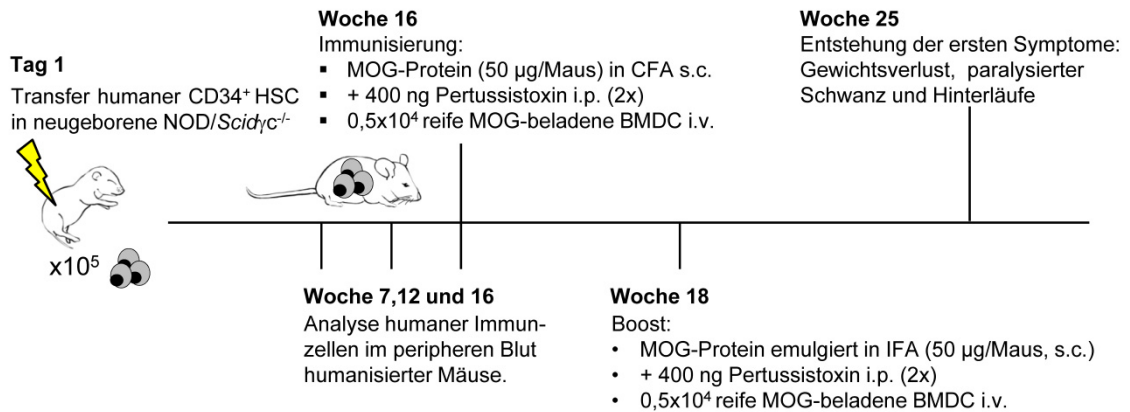


Abbildung 2.5: Induktion einer MS-ähnlichen Erkrankung in humanisierten Mäusen

Schematische Übersicht der Immunisierung mit MOG-Protein. 16 Wochen nach HSC-Transfer wurden NOD/Scid γ c^{-/-}-Mäuse mit emulgiertem MOG-Protein subkutan immunisiert, 400 ng Pertussistoxin intraperitoneal und MOG-beladene BMDC intravenös appliziert.

2.3.9 Ex vivo-Suppressionstest mit Milzzellen

Der Anteil humaner Zellen in der Milz aus immunisierten und unbehandelten humanisierten Mäusen wurde zunächst durchflusszytometrisch bestimmt. Anschließend erfolgte die Depletion der intrinsischen Treg mittels CD25-Dynabeads. 2×10^5 Treg-depletierte Milzzellen wurden mit isolierten Treg eines gesunden unabhängigen Spenders im angegeben Verhältnis kokultiviert und mit 0,5 μ g/ml anti-CD3 mAk stimuliert. Nach drei Tagen wurde der Kultur für 16 Stunden 3 H-Tdr zugesetzt, um dann die Proliferation im β -Szintillationszähler zu bestimmen.

2.3.10 Ex vivo-Stimulation der T-Zellen

Um die MOG-Spezifität der T-Zellen *ex vivo* zu untersuchen wurden die Milzzellen zusammen mit MOG-beladenen oder unbeladenen reifen DC kokultiviert (im Verhältnis 1:10). Nach drei Tagen wurde der Kultur für 16 h 3 H-Tdr zugesetzt, um dann die Proliferation im β -Szintillationszähler zu bestimmen.

2.3.11 Statistik

Die Ergebnisse sind als arithmetische Mittelwerte +/- Standardabweichung dargestellt. Die statistische Signifikanz wurde mit Hilfe eines ungepaarten Student's t-Test ermittelt. P-Werte kleiner als 0,05 wurden als signifikant dargestellt und in den entsprechenden Figuren angegeben (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$). Für einige Versuche wurde stattdessen der Mann-Whitney-Test verwendet. Auch hier wurden die P-Werte kleiner 0,05 als signifikant dargestellt und in den entsprechenden Figuren angegeben (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$).

3. Ergebnisse

Autoimmunerkrankungen werden durch Immunantworten gegen körpereigene Antigene hervorgerufen. Im gesunden Organismus wird die Aktivierung von autoreaktiven Immunzellen durch regulatorische T-Zellen (Treg) kontrolliert [14,98]. Bei der Multiplen Sklerose (MS) versagt diese Kontrolle jedoch, so dass autoreaktive Myelin-spezifische T-Effektorzellen aktiviert werden können und die Myelinscheiden der Nervenzellen angreifen und zerstören. Krankheitsverursachend wird bei der MS eine funktionelle Störung der Treg postuliert, die autoreaktive T-Effektorzellen nicht mehr effizient supprimieren können [54,99-101].

Im Fokus dieser Arbeit standen Untersuchungen zur Aktivierung und Regulation von T-Effektorzellen im peripheren Blut von MS-Patienten. Darüber hinaus wurden humanisierte Mausmodelle entwickelt, die eine Modulation humaner MS-spezifischer T-Zellantworten *in vivo* erlauben sollen.

3.1 Etablierung eines Testsystems zur funktionellen Analyse von T-Effektorzellen aus MS-Patienten

Bei der Entstehung einer Autoimmunkrankheit differenzieren naive, autoreaktive T-Zellen, die sich der natürlichen Regulation durch Treg entzogen haben, in autoaggressive T-Effektorzellen. Die immunologischen Mechanismen, die letztlich zu dieser Entwicklung führen, sind Gegenstand intensiver Forschung. Ursächlich kann eine Dysfunktion der Treg oder eine mangelnde Ansprechbarkeit der T-Effektorzellen für immunregulatorische Mechanismen sein.

Untersuchungen zur Regulierbarkeit von T-Effektorzellen aus MS-Patienten konnten nicht in Anwesenheit syngener Treg durchgeführt werden, da die Treg in MS-Patienten funktionelle Defekte aufweisen [53,54,101]. Deshalb wurden zur Suppression der T-Effektorzellen isolierte Treg unabhängiger, gesunder Spender verwendet. Hierfür musste zunächst sichergestellt werden, dass Treg die Aktivierung allogener und syngener T-Effektorzellen in gleichem Maß inhibieren können. Wie aus Abb. 3.1 ersichtlich wird, konnten polyklonal aktivierte Treg die Proliferation kokultivierter T-Effektorzellen aus syngenen und allogenen Spendern mit der gleichen Effizienz inhibieren, da der Effektormechanismus der Treg bei den gewählten Kulturbedingungen antigenunspezifisch und spenderunabhängig ist. Somit stellte dieses Testsystem eine geeignete Methode zur Analyse der Immunregulation von T-Effektorzellen aus MS-Patienten dar.

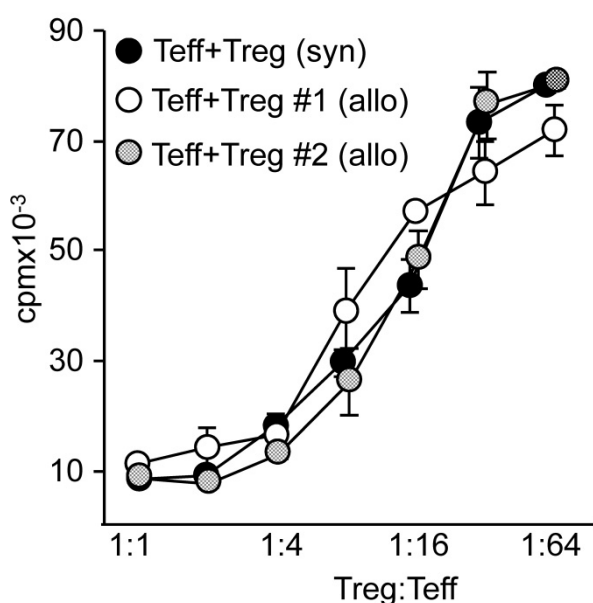


Abbildung 3.1: Die Suppressoraktivität von Treg ist antigenunspezifisch und spenderunabhängig

10⁵ Treg-depletierte periphere mononukleäre Zellen des Blutes (PBMC) wurden zusammen mit syngenen oder allogenen Treg gesunder Spender (im angegebenen Verhältnis) mit anti-CD3 mAk stimuliert. Nach drei Tagen wurde der Kultur für 16 Stunden ³H-Thymidin zugesetzt, um die Proliferation anschließend im β -Szintillationszähler zu bestimmen. Dargestellt ist der arithmetische Mittelwert mit Standardabweichung.

3.2 T-Effektorzellen unbehandelter MS-Patienten sind insensitiv gegenüber Treg-vermittelter Suppression

Zur Analyse der Supprimierbarkeit von MS-T-Effektorzellen wurden PBMC gesunder Spender (HC) und PBMC von MS-Patienten isoliert. Um Einflüsse funktionell gestörter Treg aus MS-Patienten auszuschließen, erfolgte zunächst die Depletion intrinsischer Treg (PBMC^{depl}, siehe Schema Abb. 3.2 A). Zur Suppression der T-Zellaktivierung wurden isolierte Treg unabhängiger, gesunder Spender verwendet und die Kokulturen aus PBMC^{depl} und Treg mit anti-CD3 mAk polyklonal stimuliert. Auf diese Weise erfolgte die Stimulation der T-Effektorzellen unabhängig von ihrer Antigenpezifität. Dieser Versuchsaufbau hatte zudem den Vorteil, dass die Analyse der T-Zellaktivierung in Anwesenheit syngener antigenpräsentierender Zellen (APC) durchgeführt werden konnte. Der Einfluss von kostimulatorischen Signalen der APC auf die T-Zellproliferation blieb in dem gewählten Assay erhalten.

Die Anwendung dieses Testsystems zeigte (Abb. 3.2 B links), dass die proliferative Kapazität von T-Effektorzellen aus gesunden Spendern und MS-Patienten vergleichbar war. Gemäß ihrem anergen Phänotyp proliferierten Treg unter diesen Bedingungen nicht und supprimierten in Kokultur die Zellteilung der T-Effektorzellen gesunder Spender. Wurden stattdessen PBMC^{depl} von MS-Patienten verwendet, waren die Treg nicht in der Lage die Proliferation der T-Effektorzellen effizient zu inhibieren (Abb. 3.2 C, links). Die Analyse von 34 individuellen MS-Patienten und 34 gesunden Spendern zeigte, dass die verminderte Supprimierbarkeit der T-Zellproliferation ein MS-spezifisches Phänomen darstellt (Abb. 3.2 C, rechts). Diese Dysfunktion der T-Effektorzellen war zudem unabhängig vom klinischen Verlauf der Erkrankung. Unter den 34 analysierten MS-Patienten befanden sich sowohl Patienten in einem aktiven Schub (n= 6) als auch Patienten mit stabilem Phänotyp (n= 28) in Remission (Tabelle 3.1).

Die T-Zellproliferation wurde mittels ³H-Thymidineinbau detektiert. Hierbei handelt es sich um eine sehr sensitive Methode, die aber keine Rückschlüsse auf die Zellteilung einzelner Subpopulationen zulässt. Zur Analyse der

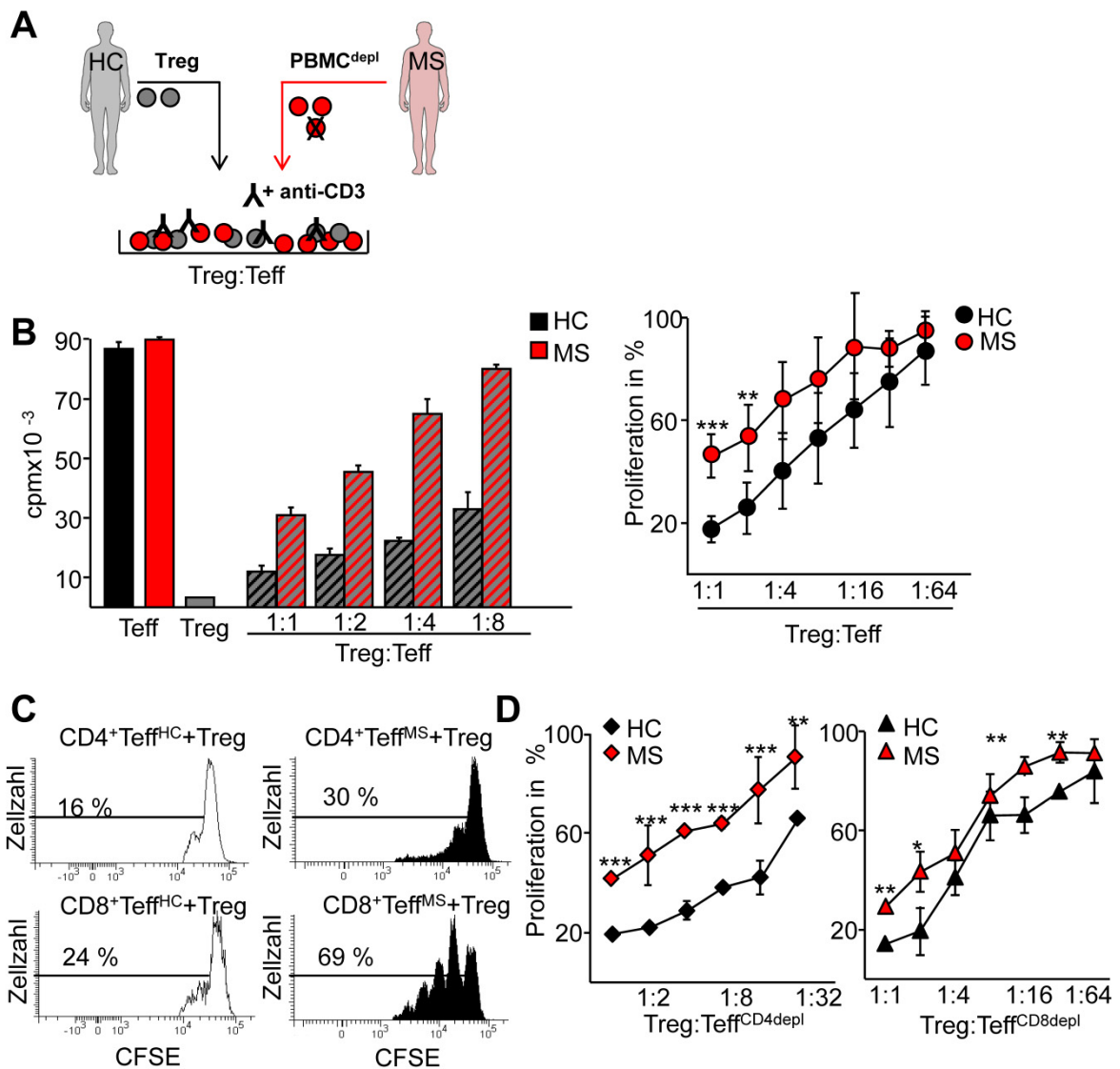


Abbildung 3.2: Differentielle Analyse der Treg-Sensitivität von CD4⁺ und CD8⁺ T-Effektorzellen aus MS-Patienten

A) Schematische Darstellung des Testsystems. Treg-depletierte PBMC (PBMC^{depl}) von MS-Patienten wurden mit Treg eines gesunden Spenders kokultiviert und polyklonal mit anti-CD3 mAk stimuliert. B) Links: 10⁵ Treg-depletierte PBMC gesunder Spender (schwarz) bzw. von MS-Patienten (rot) wurden mit Treg gesunder Spender kokultiviert und (im angegebenen Verhältnis) mit anti-CD3 mAk stimuliert. Nach drei Tagen wurde die Proliferation über den Einbau von ³H-Tdr bestimmt. Dargestellt ist der arithmetische Mittelwert mit Standardabweichung. Rechts: relative Proliferation von Treg-depletierter PBMC aus 34 individuellen MS-Patienten (rot) und 34 gesunden Spendern (schwarz). Die relative Proliferation der T-Effektorzellen wurde auf die Proliferation der T-Effektorzellen in Abwesenheit von Treg normiert. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von n=28, ** p<0,01; *** p<0,001. C) CFSE-markierte Treg-depletierte PBMC wurden mit Treg gesunder Spender im Verhältnis 1:1 kultiviert und mit anti-CD3 mAk stimuliert. Dargestellt ist die Proliferation (CFSE-Ausdünnung) von CD4⁺ und CD8⁺ T-Effektorzellen. D) CD4- bzw. CD8-depletierte PBMC von MS-Patienten (rot) und gesunden Spendern (schwarz) wurden zusammen mit Treg gesunder Spender (im angegebenen Verhältnis) und anti-CD3 mAk stimuliert. Nach drei Tagen wurden den Kulturen für 16 h ³H-Thymidin zur Bestimmung der Proliferation zugegeben. Dargestellt ist die relative Proliferation normiert auf die Proliferation von T-Effektorzellen in Abwesenheit von Treg. Mittelwerte \pm SEM von n=4, * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001.

Geschlecht	Alter	Verlauf	Dauer in Jahren	Behandlung	(EDSS)	Stadium
M	35	RRMS	15	∅	1.0	Remission
F	29	RRMS	3	∅	2.0	Remission
F	30	RRMS	4	∅	3.0	Schub
F	52	RRMS	1	∅	1.0	Remission
F	27	RRMS	1	∅	4.0	Remission
M	25	RRMS	4	∅	2.0	Remission
M	55	RRMS	34	∅	6.0	Remission
M	31	RRMS	1	∅	1.0	Remission
M	46	RRMS	1	∅	3.0	Remission
F	36	RRMS	2	∅	2.0	Remission
F	35	RRMS	3	∅	1.0	Remission
F	40	RRMS	1	∅	2.0	Remission
F	64	RRMS	21	∅	4.0	Remission
F	45	RRMS	1	∅	3.0	Remission
F	52	RRMS	1	∅	1.0	Remission
M	36	RRMS	15	∅	1.0	Remission
F	40	RRMS	1	∅	4.0	Remission
M	27	RRMS	1	∅	1.0	Schub
M	26	RRMS	2	∅	2.0	Schub
F	33	RRMS	8	∅	3.0	Remission
F	41	RRMS	19	∅	5.0	Remission
F	52	RRMS	1	∅	1.0	Remission
M	42	RRMS	5	∅	1.0	Remission
F	30	RRMS	11	∅	1.0	Remission
F	46	RRMS	13	∅	1.0	Remission
F	48	CIS	2	∅	0.0	Remission
F	26	RRMS	10	∅	0.0	Schub
F	21	RRMS	5	∅	1.0	Remission
F	29	RRMS	3	∅	0.0	Remission
F	29	RRMS	8	∅	0.0	Remission
M	30	RRMS	2	∅	1.0	Remission
F	56	RRMS	2	∅	1.0	Schub
M	50	CIS	1	∅	2.5	Schub
F	34	CIS	2	∅	1.0	Remission

Tabelle 3.1: Patientencharakteristika

31 Patienten mit einer RRMS (Alter 21-64 Jahre), 3 Patienten mit einem klinisch isolierten Syndrom (Alter 34-50 Jahre) und 8 RRMS Patienten unter Rebif-Therapie (nicht in der Tabelle dargestellt) erfüllten die von McDonald formulierten diagnostischen Bedingungen einer MS und wurden in dieser Studie verwendet. Die unbehandelten MS-Patienten erhielten mindestens 6 Monate vor Blutentnahme die letzte Behandlung. PBMC von 92 gesunden Spendern wurden als Kontrolle verwendet (nicht dargestellt in Tabelle). Alle Patienten wurden nach den ethischen Richtlinien der Deklaration von Helsinki aufgeklärt, gaben ihr schriftliches Einverständnis und die Blutentnahme erfolgte im Rahmen der Routinediagnostik.

Subpopulationen wurden PBMC^{depl} mit dem Farbstoff CFSE markiert und in An/Abwesenheit von Treg polyklonal stimuliert. CFSE bindet an zytosolische Moleküle und wird bei jeder Zellteilung zu gleichen Teilen auf die Tochterzellen übertragen. Die einzelnen Zellteilungen korrelieren direkt mit der Ausdünnung des Farbstoffes. Durchflusszytometrische Analysen zeigten, dass sowohl CD4⁺ als auch CD8⁺ T-Effektorzellen von MS-Patienten unempfindlich gegenüber Treg-vermittelter Suppression waren (Abb.3.2 D). Allerdings war diese Treg-Resistenz bei CD8⁺ T-Effektorzellen deutlicher ausgeprägt. Folglich verbesserte sich die Supprimierbarkeit von CD8-depletierten PBMC aus MS-Patienten in ³H-Tdr-Assays deutlich, im Gegensatz zur CD4-Depletion (Abb. 3.2 F).

3.3 Die Treg-Resistenz von T-Effektorzellen aus MS-Patienten ist unabhängig von antigenpräsentierenden Zellen

APC können eine entscheidende Rolle bei der Entstehung und Aufrechterhaltung von MS einnehmen [102,103]. So können sie beispielsweise die Resistenz gegenüber Treg-vermittelter Suppression fördern, indem sie durch Sezernierung proinflammatorischer Zytokine die Treg-Funktion mindern oder die Induktion von Treg beeinflussen [27,104,105]. Die bisherigen Experimente wurden mit Treg-depletierten PBMC als T-Effektorzellen durchgeführt. Die Ursache der beobachteten Treg-Resistenz könnte aus einer erhöhten kostimulatorischen Aktivität von APC der Patienten resultieren. Um den Einfluss der APC auf die beobachtete Treg-Resistenz zu untersuchen, wurden im Folgenden isolierte T-Effektorzellen aus MS-Patienten mit APC gesunder Spender in An/Abwesenheit von Treg stimuliert. Als APC in diesen Assays dienten T-Zelldepletierte PBMC. Die Analyse des potentiellen Einflusses von APC aus MS-Patienten hingegen erfolgte, indem T-Zelldepletierte PBMC aus den MS-Patienten als Kostimulatoren für T-Effektorzellen gesunder Spender eingesetzt wurden (Abb. 3.3). Das Ergebnis dieser Analyse zeigte deutlich, dass APC in dem gewählten Assay keinen wesentlichen Einfluss auf die Supprimierbarkeit der T-Effektorzellen hatten (Abb. 3.3). Trotz Anwesenheit von APC aus MS-Patienten konnten die T-Effektorzellen gesunder Spender erfolgreich supprimiert werden. Die Treg-Resistenz von T-Effektorzellen aus MS-Patienten blieb auch in Anwesenheit von APC gesunder Spender erhalten.

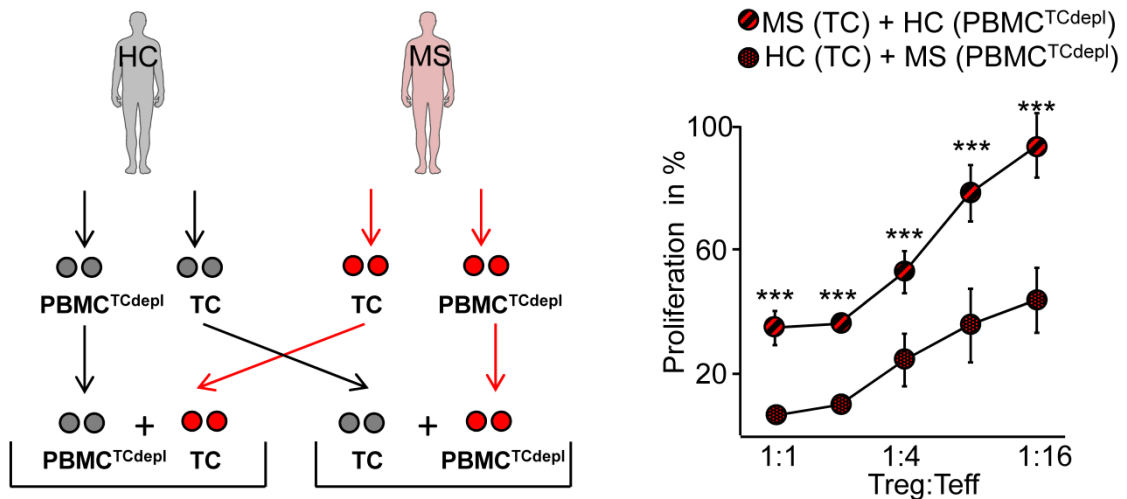


Abbildung 3.3: Die Treg-Resistenz von T-Effektorzellen aus MS-Patienten ist nicht auf dysregulierte APC zurückzuführen

Isolierte T-Effektorzellen aus MS-Patienten (rot) und von gesunden Spendern (schwarz) wurden mit T-Zelledeptierten PBMC des jeweils anderen Spenders in Anwesenheit von Treg mit anti-CD3 mAk stimuliert (links: schematische Darstellung). Rechts: Relative Proliferation als Mittelwerte aus vier unabhängigen Experimenten, normiert auf die Proliferation stimulierter T-Effektorzellen (TC) in Abwesenheit von Treg. T-Effektorzellen aus MS-Patienten rot/schwarz gestreift; T-Effektorzellen von gesunden Spendern grau/schwarz gepunktet. Mittelwerte \pm SEM von $n=4$, *** $p<0,001$.

3.4 Vergleichende Untersuchung von Aktivierungsmarkern auf T-Effektorzellen

Die bisherigen Ergebnisse wiesen auf eine verminderte Regulierbarkeit (Treg-Resistenz) von T-Effektorzellen aus MS-Patienten hin. Chronisch entzündliche Autoimmunerkrankungen führen häufig zu einer erhöhten T-Zellaktivierung. Der Grad der T-Zellaktivierung wiederum beeinflusst die Supprimierbarkeit der T-Effektorzellen [106]. Der Aktivierungsgrad von T-Effektorzellen kann durchflusszytometrisch bestimmt werden. Hierzu erfolgte die Analyse der Aktivierungsmarker CD25, CD69, CD127 und CD40-Ligand auf T-Effektorzellen im peripheren Blut gesunder Spender im Vergleich zu MS-Patienten. Während CD25 und CD69 bereits wenige Stunden nach T-Zellstimulation detektierbar sind, gelten CD40L und CD127 als späte Aktivierungsmarker. Wie Abb. 3.4 zeigt, konnten keine Unterschiede in der Expression der analysierten Marker auf T-Effektorzellen gesunder Spender im Vergleich zu MS-Patienten beobachtet werden.

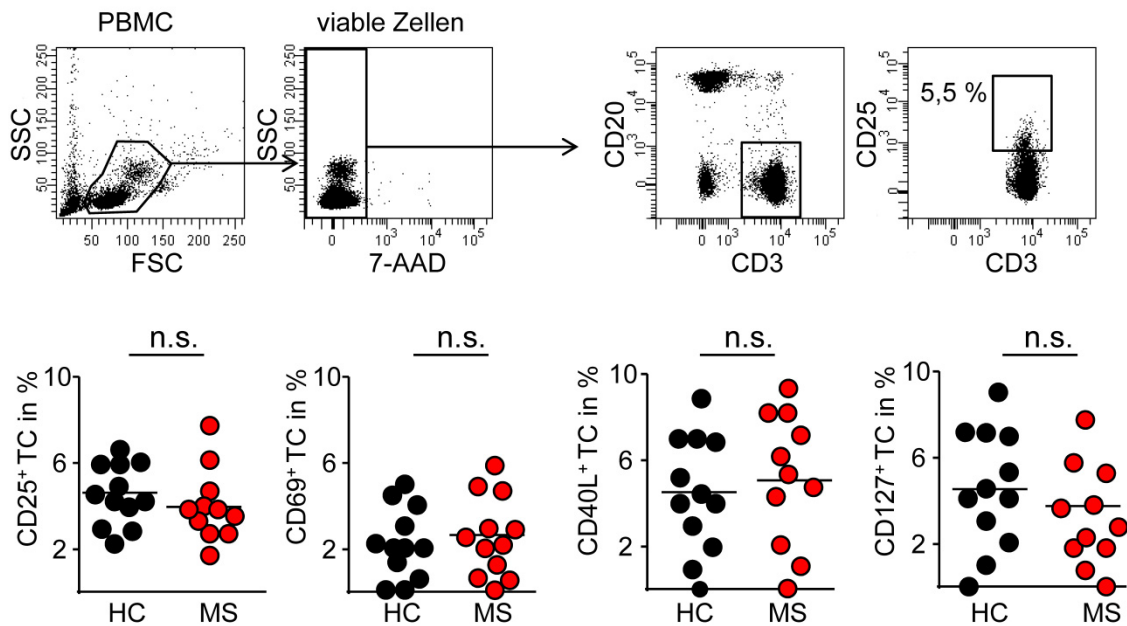


Abbildung 3.4: Durchflusszytometrische Analyse von Aktivierungsmarkern auf T-Effektorzellen gesunder Spender und MS-Patienten

Oben: Darstellung der Gatingstrategie. Frisch isolierte PBMC wurden mit Fluorochrom-konjugierten mAk gefärbt. Es wurde zunächst der Anteil lebender $CD3^+$ T-Effektorzellen bestimmt. Anschließend erfolgte die Analyse der Aktivierungsmarker auf dieser Population. Unten: Prozentualer Anteil $CD3^+$ T-Effektorzellen mit Expression für den entsprechenden Aktivierungsmarker. Dargestellt sind die Ergebnisse aus 12 individuellen MS-Patienten (rot) und 12 gesunden Spendern (schwarz), n.s. = nicht signifikant.

3.5 Der Einfluss der T-Zelldifferenzierung auf die Dysfunktion der T-Effektorzellen

Die funktionellen Eigenschaften von $CD4^+$ T-Helferzellen verändern sich im Verlauf ihrer Differenzierung. Das gilt auch für die Sensitivität gegenüber immunregulatorischen Prozessen. Periphere T-Helferzellen können anhand der Expression von CD27 und CD45RO einem definierten Differenzierungsgrad zugeteilt werden [107] (Abb. 3.5 A oben). Es wurde zunächst der relative Anteil naiver T-Helferzellen, zentraler T-Gedächtniszellen und T-Effektorgedächtniszellen im peripheren Blut von MS-Patienten und gesunden Spendern vergleichend untersucht. Der Differenzierungsgrad der T-Zelle nimmt in dieser Reihenfolge stetig zu: von der naiven T-Helferzelle, die noch keinen Antigenkontakt erfahren hat bis hin zur potenten T-Effektorzelle mit immunologischem Gedächtnis.

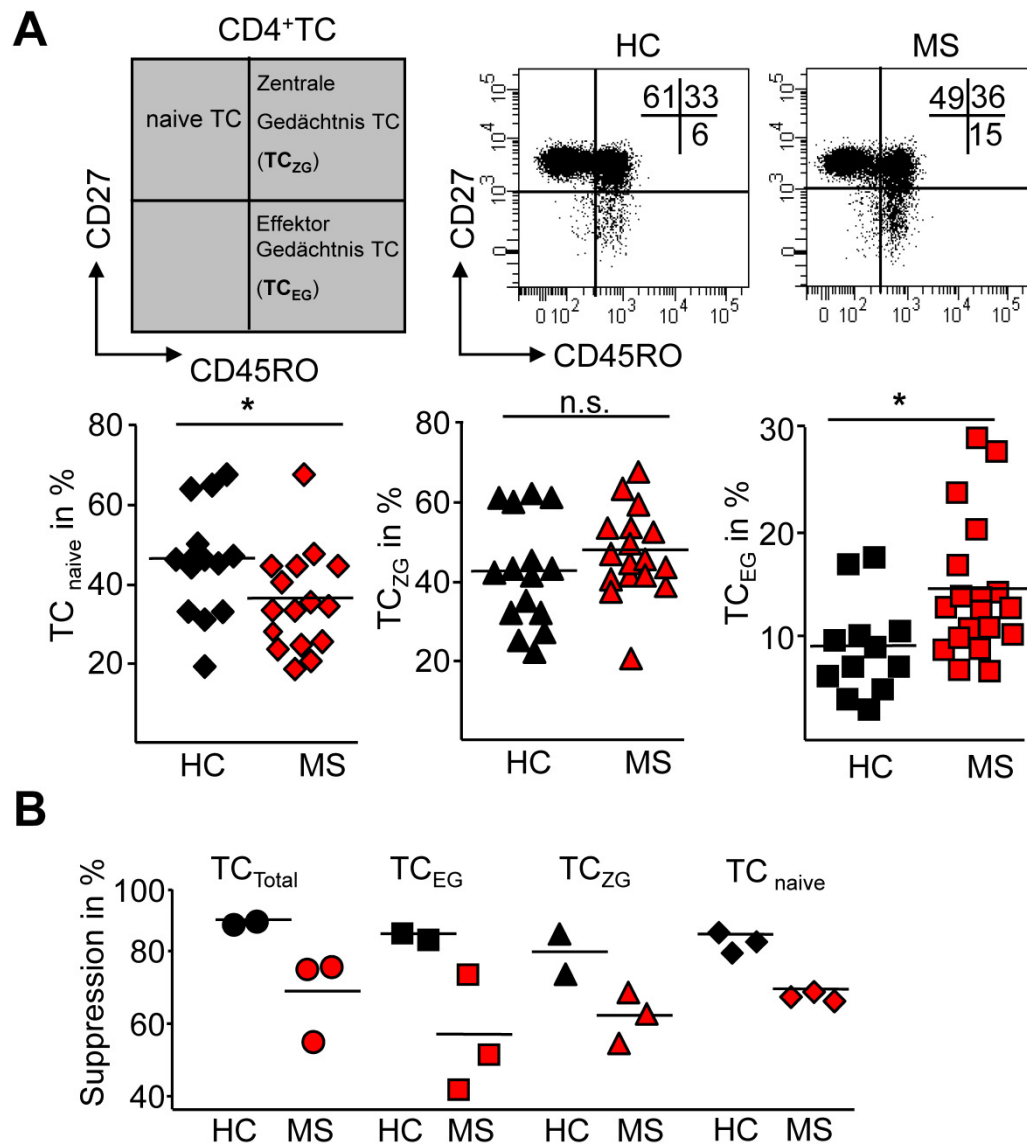


Abbildung 3.5: Erhöhte Frequenz von T-Effektorgedächtniszellen mit verminderter Supprimierbarkeit im Blut von MS-Patienten

A) Oben: durchflusszytometrische Darstellung naiver ($CD4^+CD45RO^-CD27^+$) T-Helferzellen, T-Effektorgedächtniszellen ($CD4^+CD45RO^+CD27^-$) und zentraler T-Gedächtniszellen ($CD4^+CD45RO^+CD27^+$) als Differenzierungsstadien $CD4^+$ T-Helferzellen eines gesunden Spenders und eines MS-Patienten. Unten: Prozentuale Verteilung der Differenzierungsstadien im Blut von 16 MS-Patienten (rot) und 16 gesunden Spendern (schwarz). Jeder Punkt stellt einen unabhängigen Spender dar, die Linie gibt den Mittelwert an, P-Werte: * $p < 0,05$. B) $CD4^+$ T-Helferzellen insgesamt (Kreis), isolierte naive T-Helferzellen (Raute), T-Effektorgedächtniszellen (Quadrat) und zentrale T-Gedächtniszellen (Dreieck) wurden mit T-Zell-depletierten PBMC und Treg gesunder Spender (Verhältnis 1:1:1) kultiviert und mit anti-CD3 mAk stimuliert. Die Proliferation der T-Effektorzellen wurde durch den Einbau von 3H -Tdr (Zugabe an Tag 3) bestimmt. Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten.

Im Blut der MS-Patienten konnte eine leichte Abnahme von naiven T-Helferzellen bei gleichzeitiger Zunahme der T-Effektorgedächtniszellen beobachtet werden (Abb. 3.5 A). Es stellte sich die Frage, ob die verminderte

Suppressierbarkeit der MS-T-Effektorzellen auf die erhöhte Anzahl von T-Effektorgedächtniszellen zurückzuführen war. Zur Klärung der Frage wurden naive T-Helferzellen, zentrale T-Gedächtniszellen und T-Effektorgedächtniszellen durchflusszytometrisch isoliert und deren Suppressierbarkeit getrennt untersucht. Alle T-Zellpopulationen aus gesunden Spendern konnten unabhängig von ihrem Differenzierungsgrad durch Treg inhibiert werden (Abb. 3.5 B). Im Gegensatz dazu zeigten alle T-Zellpopulationen aus MS-Patienten eine deutlich verringerte Suppressierbarkeit. Diese Treg-Resistenz nahm mit dem Differenzierungsgrad der T-Zellen von MS-Patienten zu.

3.6. Ineffiziente Suppression von IL-6 in Kokulturen von Treg und T-Effektorzellen aus MS-Patienten

Eine Vielzahl von Zytokinen wie IL-2, IFN- γ , IL-6, IL-10 etc. können die Treg-Aktivität beeinflussen. Eine veränderte Zytokinproduktion der Immunzellen im peripheren Blut von MS-Patienten könnte für die beobachtete Treg-Resistenz der T-Effektorzellen verantwortlich sein. Folgerichtig wurden die Zytokinprofile Treg-depletierter PBMC nach polyklonaler Stimulation mit anti-CD3 mAk in An- oder Abwesenheit von Treg bestimmt. Der direkte Vergleich zwischen stimulierten Immunzellen von MS-Patienten und gesunden Spendern zeigte ein vergleichbares Profil (Abb. 3.6 A). Lediglich eine leicht erhöhte IL-6-Produktion konnte in Überständen von aktivierten MS-PBMC nachgewiesen werden (Abb. 3.6 A).

Treg inhibieren neben der T-Zellproliferation auch die Zytokinproduktion [108], was in Abb. 3.6 B deutlich wird: nahezu alle proinflammatorischen Zytokine werden bei gesunden Spendern in Anwesenheit von Treg herunterreguliert. In Kokulturen von MS-Patienten erfolgte ebenfalls eine Inhibition der Zytokinsekretion mit Ausnahme von IL-6. Dieses Zytokin wurde in Anwesenheit von Treg nicht effizient inhibiert (Abb. 3.6 C).

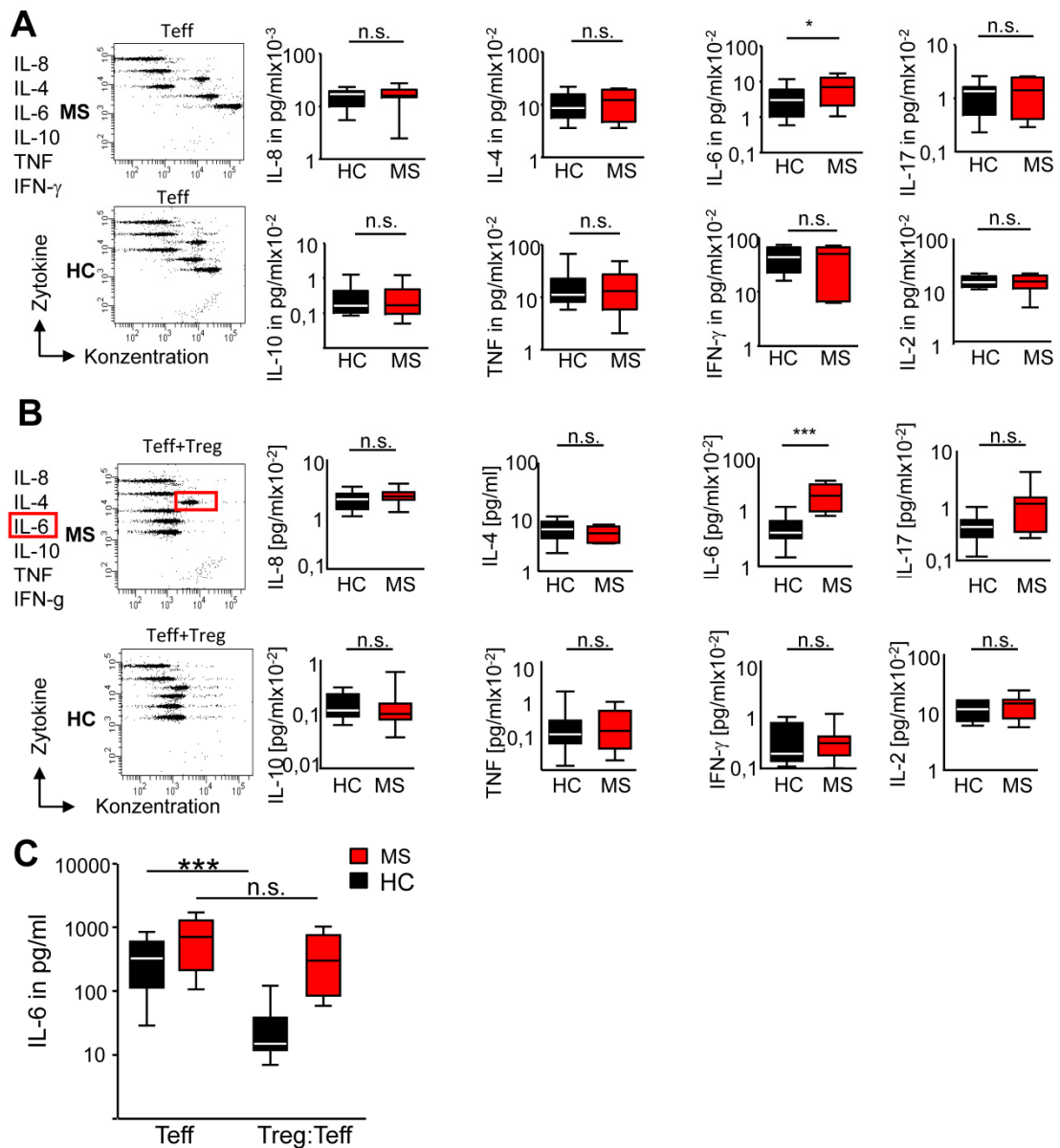


Abbildung 3.6: Zytokinprofile aktivierter Immunzellen gesunder Spender im Vergleich zu MS-Patienten

Treg-depletierte PBMC gesunder Spender (schwarz) und von MS-Patienten (rot) wurden in Ab- (A) oder Anwesenheit (B) von Treg aus unabhängigen Spendern mit anti-CD3 mAk stimuliert. An Tag drei nach Stimulation wurde die Zytokinfreisetzung im Überstand mittels CBA bestimmt. Links ist jeweils die Zytokinfreisetzung von zwei repräsentativen Spendern dargestellt, rechts: Boxplot-Darstellungen repräsentieren die zusammengefassten Ergebnisse aus 14 unabhängigen Experimenten inklusive Median und Interquartilsabstand. P-Werte relativ zur Zytokinfreisetzung der Immunzellen gesunder Spender, * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$. C) Boxplot-Darstellungen der IL-6-Produktion in An/Abwesenheit von Treg repräsentieren die zusammengefassten Ergebnisse aus 14 unabhängigen Experimenten inklusive Median und Interquartilsabstand. P-Werte relativ zur Zytokinfreisetzung der Immunzellen gesunder Spender in Abwesenheit von Treg, *** $p < 0,001$

3.7 Erhöhte IL-6-Rezeptorexpression auf Immunzellen von MS-Patienten

Die Wirkung von IL-6 setzt die Expression des entsprechenden Zytokinrezeptors auf der Zelloberfläche voraus. Aufgrund der geringen Expression dieser Rezeptoren wurde im Folgenden biotinyliertes IL-6 in Kombination mit FITC-markiertem Streptavidin zum Nachweis des IL-6-Rezeptors (IL-6R) verwendet. Diese sensitive Färbemethode führte zur Signalverstärkung und ermöglichte den durchflusszytometrischen Nachweis des IL-6R auf peripheren Immunzellen. Wie in Abb. 7 ersichtlich, konnte der IL-6R konstitutiv auf CD4⁺ und CD8⁺ T-Effektorzellen, CD19⁺ B-Zellen und CD14⁺ Monozyten von MS-Patienten (rot) nachgewiesen werden. Zudem war die Expression auf allen Populationen deutlich höher als im Blut gesunder Spender (schwarz). Dieses Ergebnis ließ vermuten, dass die Sekretion von IL-6 und die Expression des IL-6R in einem funktionellen Zusammenhang mit der reduzierten Supprimierbarkeit von MS-T-Effektorzellen stehen.

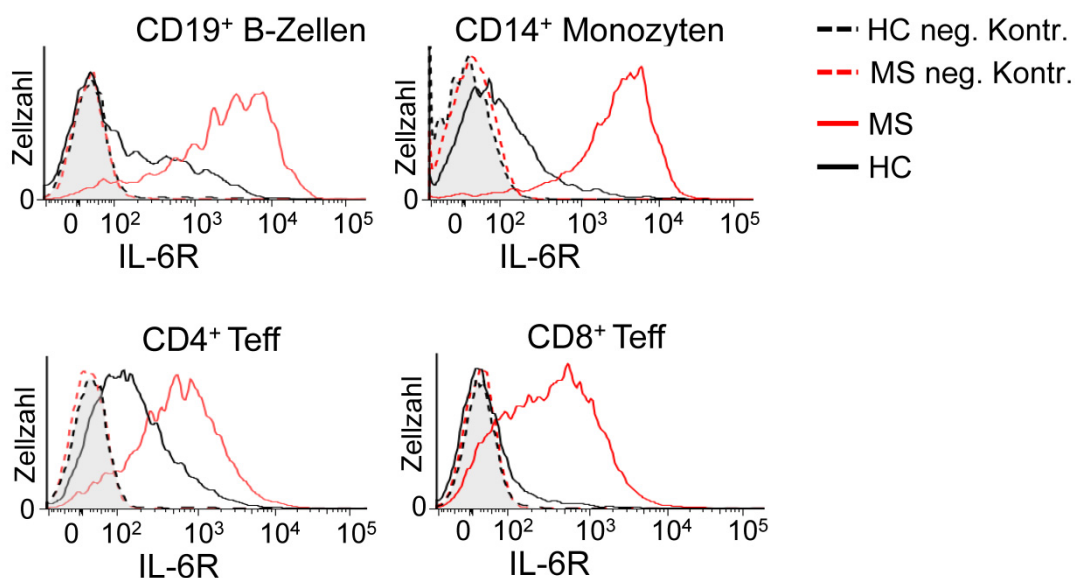


Abbildung 3.7 Durchflusszytometrische Analyse des IL-6-Rezeptors

Die IL-6R-Expression auf Immunzellen des peripheren Blutes von MS-Patienten (rot) und gesunden Spendern (schwarz) wurde mit biotinyliertem IL-6 und Streptavidin-FITC nachgewiesen. Zuvor wurden die PBMC mit Fluorochrom-konjugierten mAk gefärbt, um einzelne Populationen innerhalb der PBMC unterscheiden zu können. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis aus 5 unabhängigen Versuchen. Gepunktete Linien: Negativkontrolle, durchgehende Linien: IL-6R-Expression.

3.8 Die Blockade des IL-6-Signalwegs stellt die Supprimierbarkeit von T-Effektorzellen wieder her

Sollte IL-6 für die verringerte Ansprechbarkeit von T-Effektorzellen gegenüber Treg verantwortlich sein, müsste eine IL-6-Blockade die Supprimierbarkeit wiederherstellen. Daher erfolgte die Inhibition des IL-6R-Signalwegs durch blockierende anti-IL-6/IL-6R mAk. Da beide Methoden zu gleichen Ergebnissen führten, werden im Folgenden nur die Ergebnisse mit dem anti-IL-6R mAk Tocilizumab dargestellt. Die IL-6-Blockade beeinflusste selbst in hohen Konzentrationen nicht die proliferative Kapazität polyklonal stimulierter T-Effektorzellen (Abb. 3.8 A), d.h. IL-6 zeigte keine kostimulatorische Wirkung für die Zellteilung. Auch die Treg-vermittelte Suppression von T-Effektorzellen aus gesunden Spendern (schwarz) wurde durch IL-6-Blockade nicht verändert (Abb. 3.8 B, schwarz). Jedoch führte die Blockierung des IL-6R-Signalwegs in Kokulturen von MS-T-Effektorzellen und Treg zur Wiederherstellung der Treg-vermittelten Suppression. Diese Ergebnisse bestätigten die These, dass IL-6 einen wesentlichen Einfluss auf die Treg-Resistenz von T-Effektorzellen hat.

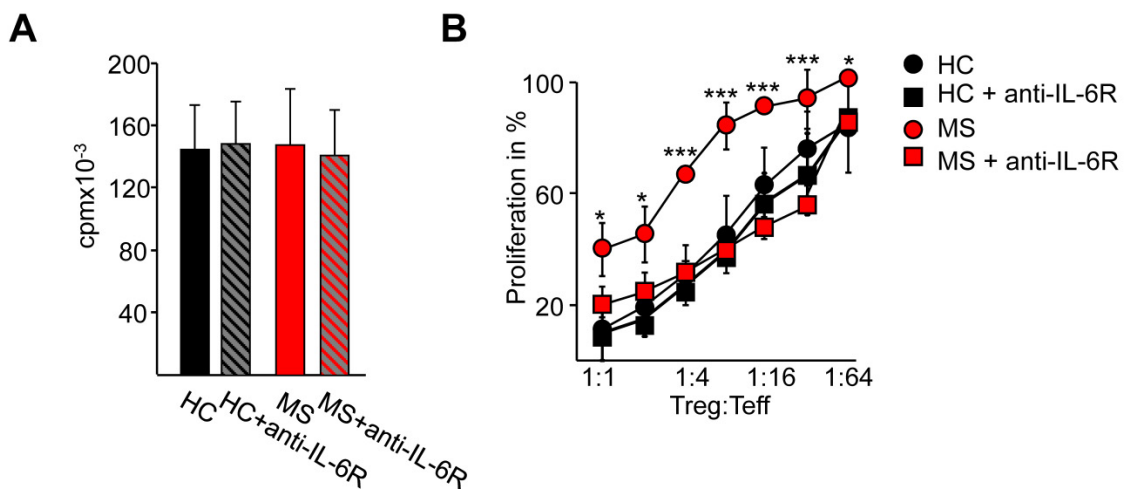


Abbildung 3.8: Wiederherstellung der Treg-vermittelten Suppression durch IL-6-Blockade

A) 10^5 Treg-depletierte PBMC gesunder Spender (schwarz) und von MS-Patienten (rot) wurden mit anti-CD3 mAk in An/Abwesenheit neutralisierender Antikörper gegen den IL-6R (10 μ g/ml, gestreifte Balken) stimuliert und die Proliferation der T-Effektorzellen an Tag drei über den Einbau von 3 H-Tdr bestimmt. Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte inklusive Standardabweichung (n=6). B) Proliferation in Anwesenheit von Treg. Dargestellt ist die relative Proliferation aus 12 unabhängigen Experimenten, T-Effektorzellen aus MS-Patienten (rot) und gesunden Spendern (schwarz) normiert auf die Proliferation der T-Effektorzellen in Abwesenheit von Treg, P-Werte: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

3.9 Erhöhte Aktivierung der Proteinkinase B in MS-T-Effektorzellen ist assoziiert mit Treg-Resistenz

Die Stimulation des IL-6-R führt zur Aktivierung unterschiedlicher Signaltransduktionswege. Während der STAT3¹⁶-Signalweg [44] am häufigsten mit der IL-6-Stimulation assoziiert wird, kommt es zusätzlich zur Aktivierung der MAP¹⁷-Kinase [45] und der PI3-Kinasen¹⁸ [109,110], einschließlich PKB¹⁹/c-Akt. Die Phosphorylierung der Serin/Threoninkinase PKB/c-Akt korreliert mit dem Grad der T-Zellaktivierung und kann nach Stimulation mit Zytokinen oder Chemokinen, aber auch nach Bindung kostimulatorischer Moleküle erfolgen [111-113]. Die Stimulation isolierter T-Effektorzellen mit IL-6 führte zur verstärkten Phosphorylierung von PKB/c-Akt (Abb. 3.9 A), wohingegen die IL-6-Blockade die Phosphorylierung verringerte. T-Effektorzellen von MS-Patienten wiesen einen deutlich erhöhten Phosphorylierungsgrad der PKB/c-Akt-Kinase im Vergleich zu T-Effektorzellen aus gesunden Spendern auf (Abb. 3.9 B). Die Zugabe eines PKB/c-Akt-Inhibitors zur Kultur verminderte die Phosphorylierung der Kinase (Abb. 3.9 C). Dieser Effekt war dosisabhängig, hatte aber keinen messbaren Einfluss auf die Proliferation der T-Effektorzellen (Abb. 3.9 D). Allerdings konnte deren Supprimierbarkeit durch Zugabe des Akt-Inhibitors zu Kokulturen von MS-PBMC^{depl} und Treg fast vollständig wiederhergestellt werden (Abb. 3.9 E, rot). Der Inhibitor zeigte keinen Einfluss auf die Proliferation in Kokulturen gesunder Spender (Abb. 3.9 E, schwarz). Diese Ergebnisse ließen eine IL-6-vermittelte PKB/c-Akt-Aktivierung als Ursache für die Treg-Resistenz von MS-T-Effektorzellen vermuten.

¹⁶ STAT3: Signal Transducer and Activator of Transcription 3

¹⁷ MAP: Mitogen-Activated Protein

¹⁸ PI3K: Phosphoinositid-3-Kinase

¹⁹ PKB: Proteinkinase B

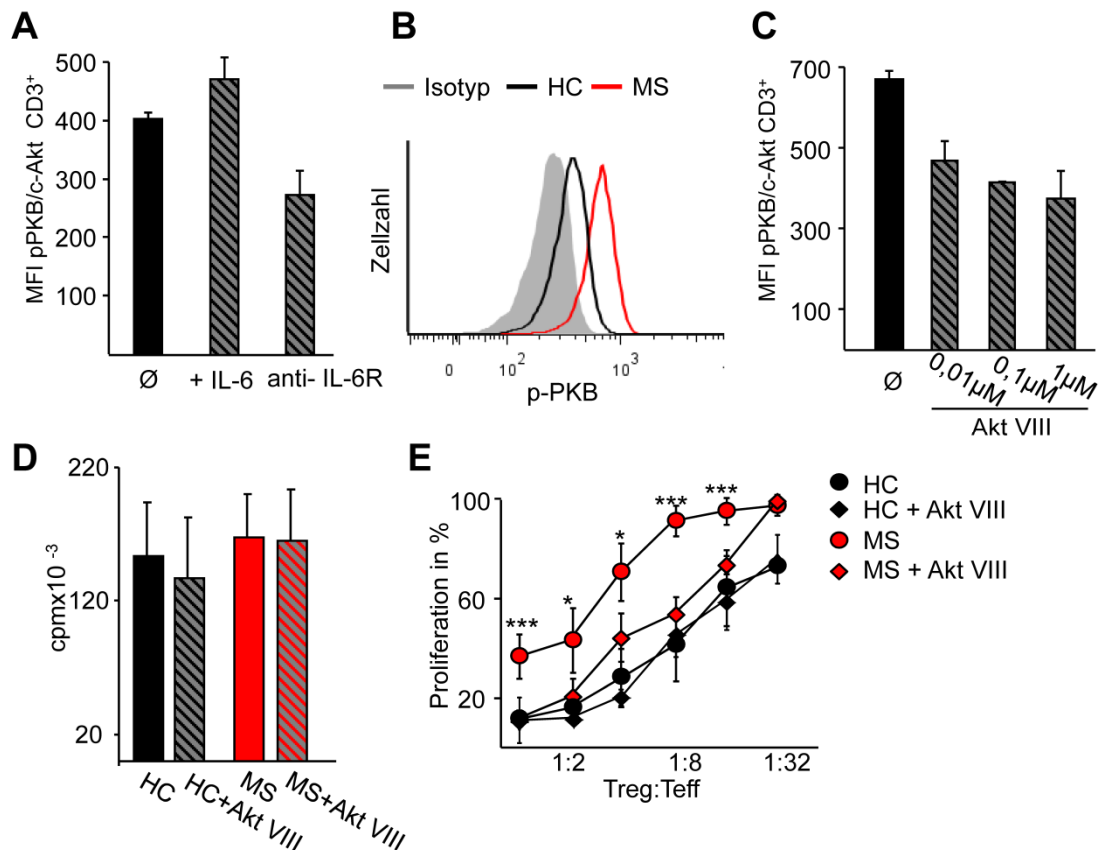


Abbildung 3.9: PKB/c-Akt-Phosphorylierung ist assoziiert mit Treg-Resistenz von T-Effektorzellen

A) Durchflusszytometrische Bestimmung der PKB/c-Akt Phosphorylierung. T-Effektorzellen gesunder Spender wurden mit anti-CD3 mAk in Ab- (schwarz) Anwesenheit von IL-6 (10 ng/ml, schwarz-grau gestreift) oder IL-6R mAk (10 µg/ml, schwarz-grau gestreift) stimuliert. Dargestellt ist die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) von pPKB/c-Akt in T-Effektorzellen, ein repräsentatives Ergebnis aus 5 unabhängigen Versuchen. B) PBMC gesunder Spender (schwarz) bzw. von MS-Patienten (rot) wurden mit Fluorochrom-konjugierten mAk gefärbt und die PKB/c-Akt Phosphorylierung in CD4⁺ T-Effektorzellen durchflusszytometrisch bestimmt. Graues Histogramm: Isotyp. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis von vier unabhängigen Versuchen. C) PBMC gesunder Spender (schwarz) wurden mit anti-CD3 mAk in Anwesenheit des Akt-VIII-Inhibitors (gestreift, 0,01; 0,1 und 1 µM) stimuliert und die MFI der PKB/c-Akt Phosphorylierung CD4⁺ T-Effektorzellen durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte der MFI-Werte inklusive Standardabweichung (n=6). D) PBMC gesunder Spender (schwarz) bzw. von MS-Patienten (rot) wurden mit anti-CD3 mAk in An/Abwesenheit des Akt-Inhibitors (gestreift, 0,1 µM) stimuliert und die Proliferation der T-Effektorzellen an Tag drei über den Einbau von ³H-Tdr bestimmt. Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte inklusive Standardabweichung (n=6). E) Proliferation in Anwesenheit von Treg und Akt-Inhibitor (gestreift, 0,1µM). Dargestellt ist die relative Proliferation aus 12 unabhängigen Experimenten von T-Effektorzellen aus MS-Patienten (rot) und gesunden Spendern (schwarz) normiert auf die Proliferation der T-Effektorzellen in Abwesenheit von Treg, P-Werte: * p<0,05, *** p<0,001.

3.10 Analyse IL-6-produzierender Immunzellen von MS-Patienten

Es stellte sich nun die Frage, welche Zellpopulation innerhalb der PBMC für die Sekretion von IL-6 verantwortlich ist. Barr et al. postulierten, dass IL-6-produzierende B-Zellen wesentlich für die Dysregulation von T-Effektorzellantworten sind [114]. Basierend auf dieser Publikation sollte die

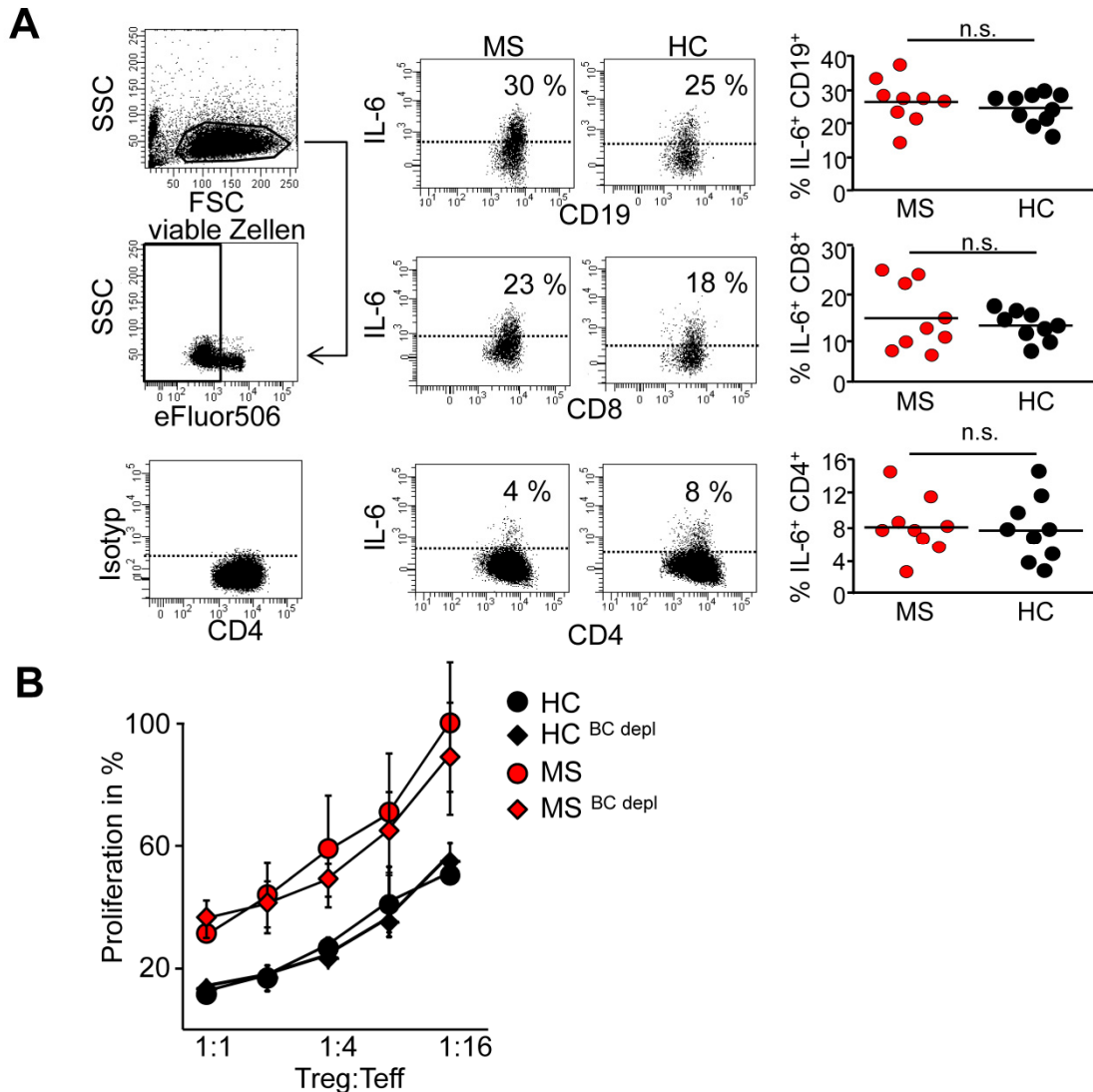


Abbildung 3.10: Bestimmung der IL-6-bildenden Zellpopulationen

A) PBMC gesunder Spender bzw. von MS-Patienten wurden maximal stimuliert und die IL-6-Produktion von $CD19^+$ B-Zellen, $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Effektorzellen durchflusszytometrisch analysiert. Rechts: Zusammenfassung der prozentualen IL-6-Produktion aus neun individuellen MS-Patienten (rot) und neun gesunden Spendern (schwarz). Die Unterschiede sind nicht signifikant. B) B-Zell-depletierte PBMC gesunder Spender (schwarz) bzw. von MS-Patienten (rot) wurden mit Treg gesunder Spender (im angegebenen Verhältnis) und anti-CD3 mAk stimuliert. Nach drei Tagen wurden den Kulturen für 16 h 3H -Tdr zur Bestimmung der Proliferation zugegeben. Dargestellt ist die relative Proliferation normiert auf die Proliferation von T-Effektorzellen in Abwesenheit von Treg. Die Unterschiede sind nicht signifikant.

intrazelluläre IL-6-Produktion unterschiedlicher Zellpopulationen im Detail untersucht werden. Nach maximaler Stimulation der Immunzellen erfolgte die durchflusszytometrische Bestimmung der IL-6-synthetisierenden Zellen. Sowohl CD4⁺, CD8⁺ T-Effektorzellen als auch CD19⁺ B-Zellen gesunder Spender bzw. von MS-Patienten produzierten quantitativ vergleichbare IL-6-Mengen (Abb. 3.10 A).

Somit konnte vorerst keine Aussage über die Ursprungsquelle von IL-6 getroffen werden. Barr et al. zeigten zudem eine Verringerung der Krankheitssymptomatik nach Depletion IL-6-produzierender B-Zellen in EAE-kranken Mäusen [114]. Da auch hier B-Zellen starke IL-6-Produzenten waren (Abb. 3.10 A), sollte ihr potentieller Einfluss auf die Treg-Resistenz von MS-T-Effektorzellen untersucht werden. Hierfür wurden B-Zellen der MS-PBMC depletiert und zusammen mit Treg gesunder Spender stimuliert. Das Ergebnis in Abb. 3.10 B zeigte, dass die B-Zelldepletion in dem gewählten Assay keinen Einfluss auf die Suppressierbarkeit der T-Effektorzellen hatte. Die Treg-Resistenz von T-Effektorzellen aus MS-Patienten blieb auch in Abwesenheit von B-Zellen bestehen.

3.11 IL-6 überkommt die Suppression der Treg in Kokultur mit T-Effektorzellen gesunder Spender

Da eine Beteiligung des Zytokins IL-6 an der Aufhebung Treg-vermittelter Suppression nahelag, erfolgten Untersuchungen zum Einfluss von IL-6 auf die Immunregulation von T-Zellantworten. Hierfür wurden Treg-depletierte PBMC gesunder Spender in An- oder Abwesenheit steigender Mengen IL-6 stimuliert. Es konnte kein Einfluss von IL-6 auf die Proliferation von T-Effektorzellen oder den anergen Zustand der Treg in Einzelkulturen nachgewiesen werden. (Abb. 3.11 A). Allerdings verhinderte IL-6 dosisabhängig die Inhibition der T-Effektorzellen in Kokultur mit Treg. An dieser Stelle konnte jedoch keine Aussage darüber getroffen werden, ob IL-6 die Sensitivität der T-Effektorzellen oder die Suppressorfunktion der Treg modulierte. Um diese Frage zu beantworten, wurden Treg und T-Effektorzellen vor der Kokultur mit unterschiedlichen Farbstoffen markiert. Die durchflusszytometrische Analyse nach Stimulation (Abb. 3.11 A, rechts) ließ erkennen, dass die Inhibition der T-

Effektorzellen in Anwesenheit von IL-6 aufgehoben wurde, ohne die Anergie der Treg zu brechen.

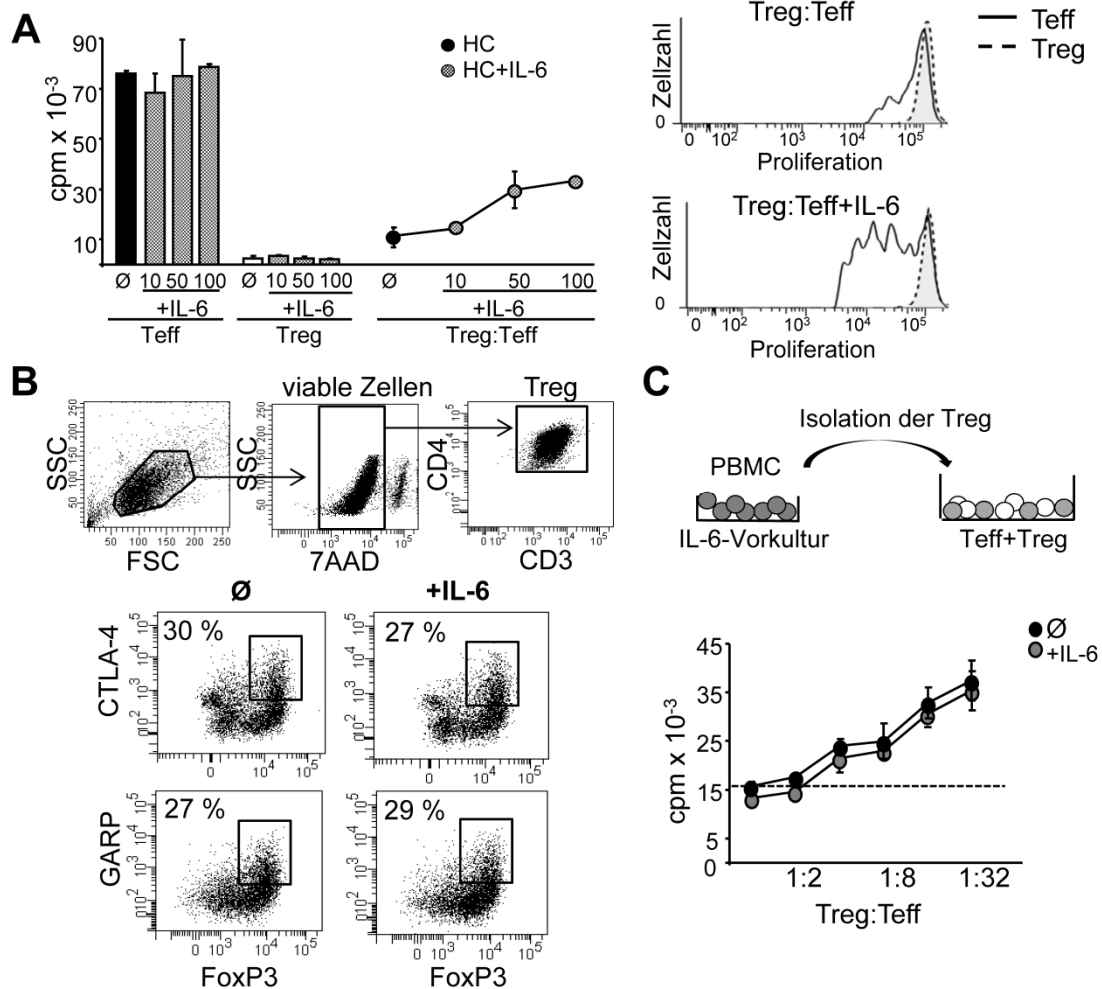


Abbildung 3.11: IL-6 bricht Treg-vermittelte Suppression

A) Links: Treg-depletierte PBMC und Treg in Einzelkultur bzw. in Kokulturen wurden mit anti-CD3 mAk und steigenden IL-6-Mengen stimuliert. Nach drei Tagen wurde die Proliferation über den Einbau von ³H-Tdr bestimmt. Dargestellt ist der arithmetische Mittelwert mit Standardabweichung eines repräsentativen Ergebnisses aus fünf unabhängigen Versuchen. Rechts: CFSE-gelabelte Treg und eFluor®670-gefärbte CD3⁺ T-Effektorzellen im Verhältnis 1:1 wurden mit anti-CD3 mAk und T-Zell-depletierten PBMC stimuliert. Die Proliferation wurde durchflusszytometrisch an Tag 3 bestimmt. B) 2x10⁵ Treg wurden in An/Abwesenheit von IL-6 mit anti-CD3 mAk und anti-CD28 mAk stimuliert. Nach 48 h wurde die prozentuale Expression von CTLA-4, GARP und FoxP3 auf Treg durchflusszytometrisch untersucht. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis aus neun unabhängigen Versuchen. C) PBMC wurden für 24 h in An/Abwesenheit von IL-6 vorkultiviert. Anschließend wurden Treg isoliert und mit Treg-depletierten PBMC unabhängiger Spender kokultiviert und mit anti-CD3 mAk stimuliert. Nach drei Tagen wurde der Kultur für 16 Stunden ³H-Thymidin zugegeben, um die Proliferation zu bestimmen. Dargestellt ist der arithmetische Mittelwert der Proliferation mit Standardabweichung eines repräsentativen von fünf unabhängigen Experimenten.

Im Zuge der funktionellen Aktivierung von Treg kommt es zur Expression der Oberflächenmoleküle GARP²⁰ [115] und CTLA-4²¹ [17,116,117], die bedeutend für die Suppressionsleistung der Treg sind. Deshalb wurde die Regulation beider Marker in An/Abwesenheit von IL-6 analysiert. Nach Stimulation exprimierten 30 % der Zellen GARP und 27 % exprimierten CTLA-4 auf der Oberfläche (Abb. 3.11 B). Die Zugabe von IL-6 hatte keinen Einfluss auf die Expression dieser Markermoleküle (Abb. 3.11 B, rechts). Um den Einfluss von IL-6 auf die Treg-Funktion direkt zu messen, wurden PBMC vor der Treg-Isolation mit IL-6 für 24 h vorkultiviert und anschließend im Standardsuppressorassay getestet. Die Vorinkubation mit IL-6 zeigte keine Wirkung auf die Suppressorfunktion der Treg, so dass von einer IL-6-vermittelten Modulation der T-Effektorzellen ausgegangen werden konnte (Abb. 3.11 C).

3.12 Beschleunigte Bildung von IL-6 in Immunzellen aus MS-Patienten

Die Analyse des Zytokinprofils ergab, dass aktivierte PBMC gesunder Spender und PBMC aus MS-Patienten vergleichbare IL-6-Mengen produzieren (Abb. 3.6 A und B). Die Quantität der IL-6-Produktion konnte deshalb nicht die Dysfunktion der T-Effektorzellen aus MS-Patienten erklären. Die Wirkung eines Zytokins ist aber nicht nur von der Menge, sondern auch vom Zeitpunkt seiner Verfügbarkeit abhängig. Deshalb wurde die Kinetik der IL-6-Synthese in aktivierten Immunzellen analysiert.

Während in Immunzellen gesunder Spender erstmals 24 Stunden nach Aktivierung IL-6 mRNA nachweisbar war, kam es in MS-PBMC bereits nach vier Stunden zu einer deutlichen IL-6 mRNA-Synthese (Abb. 3.12 A). Innerhalb der MS-PBMC synthetisierten besonders CD8⁺ T-Effektorzellen (Abb. 3.12 A) beschleunigt IL-6, was interessanterweise mit ihrer reduzierten Unempfindlichkeit gegenüber der Treg-vermittelten Suppression korrelierte (Abb. 3.2 B).

Es ist denkbar, dass IL-6 die Induktion weiterer Effektorzytokine wie IL-2 initiiert, was zum Funktionsverlust der Treg und folglich zur Treg-Resistenz der T-Effektorzellen führen kann [116,118]. Aus diesem Grund wurde vergleichend

²⁰ GARP: Glycoprotein-A Repetitions Predominant

²¹ CTLA-4: Cytotoxic T Lymphocyte Antigen-4

die Kinetik der IL-6- und IL-2-Synthese untersucht. Immunzellen gesunder Spender als auch von MS-Patienten exprimierten vergleichbare IL-2 mRNA-Mengen (Abb. 3.2 B).

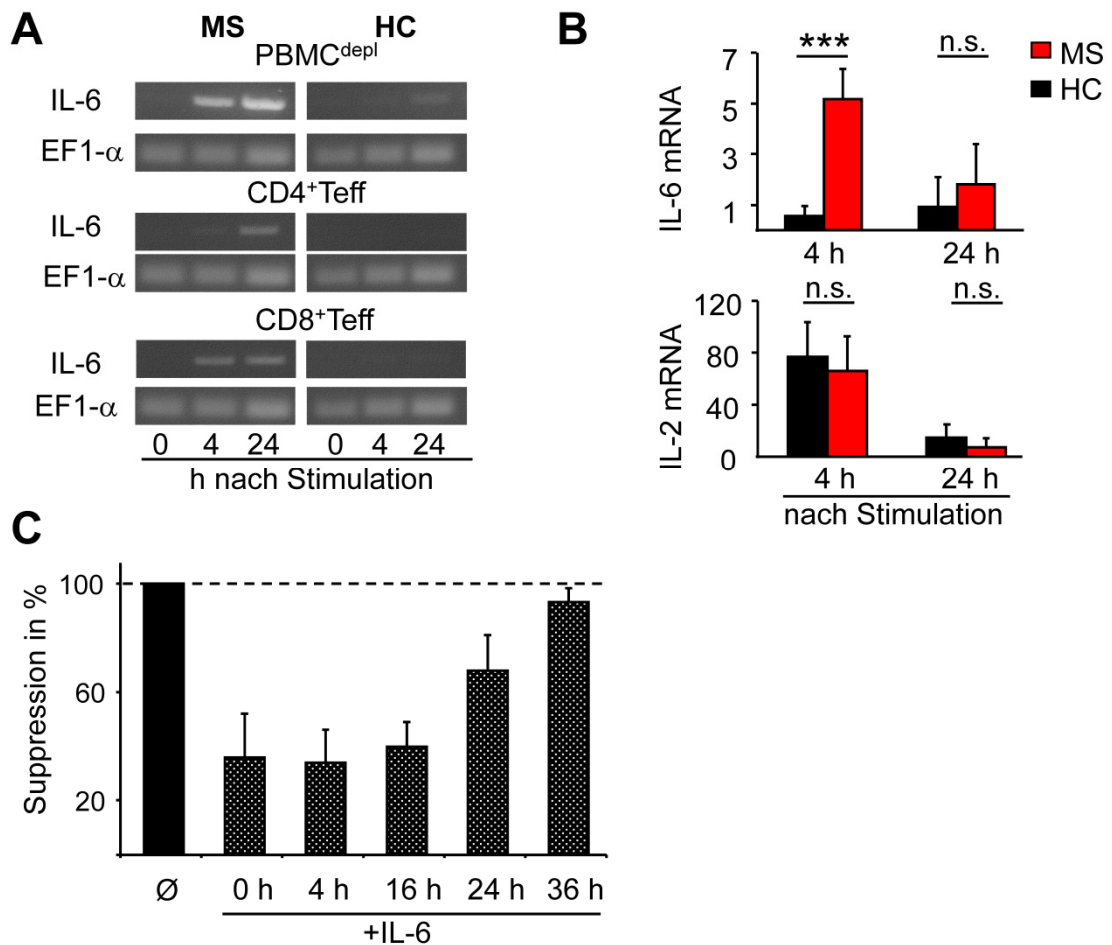


Abbildung 3.12: Kinetik der IL-6-Synthese stimulierter T-Effektorzellen von MS-Patienten und gesunden Spendern

A) Treg-depletierte PBMC, CD4⁺ und CD8⁺ T-Effektorzellen gesunder Spender bzw. von MS-Patienten wurden unbehandelt oder nach Stimulation mit anti-CD3 mAk bzw. anti-CD3 mAk und anti-CD28 mAk (0, 4, 24 Stunden) untersucht. Die Expression der IL-6 mRNA wurde mittels RT-PCR analysiert. EF1- α diente als Haushaltsgen. B) Analyse der quantitativen IL-6 und IL-2 mRNA-Expression erfolgte mittels qRT-PCR Treg-depletierter PBMC gesunder Spender bzw. von MS-Patienten. Die relativen Werte für IL-6 und IL-2 mRNA wurden auf die Expression des Haushaltsgen EF1- α normalisiert und unstimulierte PBMC als Bezugsgröße verwendet. Dargestellt sind die zusammengefassten Ergebnisse aus 10 unabhängigen Experimenten. C) Treg-depletierte PBMC wurden im Verhältnis 1:1 mit Treg kultiviert und mit anti-CD3 mAk stimuliert. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten wurde der Kokultur IL-6 (100 μ g/ml) hinzugefügt. Nach drei Tagen wurde die Proliferation durch den ³H-Thymidineinbau bestimmt. Dargestellt ist die relative Suppression Treg-depletierter PBMC aus 3 unabhängigen Versuchen. Die relative Proliferation der T-Effektorzellen wurde auf die Proliferation der T-Effektorzellen in Abwesenheit von IL-6 normiert.

Verglich man hingegen die relative IL-6-Synthese von MS-PBMC mit Immunzellen gesunder Spender, so war diese vier Stunden nach Stimulation 6-fach höher in den MS-PBMC. Die Ergebnisse aus Abb. 3.12 A und B lassen vermuten, dass eine beschleunigte IL-6-Produktion ursächlich für die Treg-Resistenz in MS-Patienten war. Zur Überprüfung dieser These wurde IL-6 zu unterschiedlichen Zeitpunkten in stimulierte Suppressorkulturen gesunder Spender gegeben und die Suppression analysiert. Die Anwesenheit von IL-6 zu Beginn dieser Kulturen führte zur Treg-Resistenz. Dies war auch der Fall, wenn IL-6 innerhalb der ersten 24 Stunden der Kultur zugefügt wurde. Eine Zugabe zu späteren Zeitpunkten reduzierte die Wirkung von IL-6 deutlich (Abb. 3.12 C).

3.13 Der Einfluss von IL-6 auf die Regulation umliegender T-Effektorzellen

Ob die beschleunigte IL-6-Produktion von MS-T-Effektorzellen für die beobachtete Treg-Resistenz verantwortlich war, sollte im Folgenden untersucht werden. Treg vermitteln nach antigenspezifischer Aktivierung über den T-Zell-Rezeptor ihre suppressorische Funktion zellkontaktabhängig [116,119]. Um einen zellkontaktunabhängigen Einfluss von IL-6, produziert durch aktivierte MS-T-Effektorzellen, auf die Treg-vermittelte Suppression untersuchen zu können, wurden Transwelleexperimente durchgeführt. Transwelleinsätze erlauben die Diffusion löslicher Faktoren durch eine semipermeable Membran, verhindern aber den direkten Zellkontakt.

In der unteren Kammer der Transwells wurden T-Effektorzellen und Treg gesunder Spender stimuliert und zudem entweder T-Effektorzellen gesunder Spender oder von MS-Patienten in die obere Kammer transferiert und stimuliert. Lösliche Faktoren produziert von aktivierten T-Effektorzellen gesunder Spender hatten keinen Einfluss auf die Treg-vermittelte Suppression in der unteren Kammer (Abb. 3.13, links). Wurden stattdessen T-Effektorzellen von MS-Patienten eingesetzt, war eine partielle Aufhebung der Suppression zu beobachten. Die Zugabe blockierender Antikörper gegen den IL-6R führte zur Wiederherstellung der Treg-vermittelten Suppression und zeigte die Abhängigkeit der Treg-Resistenz von einer beschleunigten IL-6-Synthese. Da es sich hierbei um einen zellkontaktunabhängigen Mechanismus handelte, der auf umliegende T-Effektorzellen wirkte, wurde dieser Mechanismus als

„übertragene Resistenz“ bezeichnet. Interessanterweise sprachen $CD8^+$ T-Effektorzellen besser auf die IL-6-vermittelte übertragene Treg-Resistenz an als $CD4^+$ T-Effektorzellen (Abb. 3.13, Mitte).

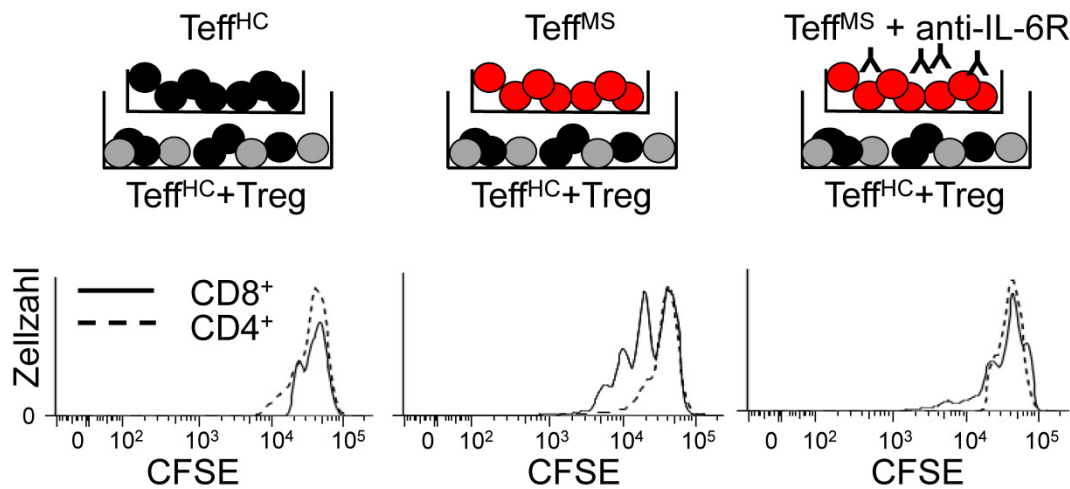


Abbildung 3.13: Übertragene Resistenz: IL-6 vermittelt Treg-Resistenz in umliegenden T-Effektorzellen

Oben: schematische Darstellung der Versuchsdurchführung. Unten: CFSE-gefärbte T-Effektorzellen und ungelabelte Treg in der unteren Kammer wurden mit anti-CD3 mAk und T-Zell-depletierten PBMC stimuliert. T-Effektorzellen gesunder Spender (schwarz) bzw. von MS-Patienten wurden in die obere Kammer transferiert und mit anti-CD3 mAk und T-Zelldepletierten, bestrahlten PBMC in An/Abwesenheit von anti-IL-6R stimuliert. Die Proliferation in der unteren Kammer wurde durchflusszytometrisch an Tag 3 analysiert. Dargestellt ist ein repräsentatives von fünf unabhängigen Experimenten.

3.14 IL-6 induziert die Expression des IL-6-Rezeptors und beschleunigt die eigene Synthese

In einem Mechanismus der als „infektiöse Toleranz“ bezeichnet wird, übertragen inhibitorische Zytokine wie TGF- β suppressorische Eigenschaften auf T-Effektorzellen, die keinen direkten Kontakt mit Treg haben [25,120]. Im Fall von IL-6 weisen die hier vorgestellten Ergebnisse auf einen gegenteiligen Mechanismus hin, der hier als „übertragene Resistenz“ bezeichnet wird.

Die zugrunde liegenden funktionellen und phänotypischen Veränderungen, die in Immunzellen gesunder Spender durch IL-6 hervorgerufen werden, sollten zunächst analysiert werden. Hierzu wurden PBMC gesunder Spender mit IL-6 kultiviert und anschließend die Expression des IL-6R bestimmt. Diese IL-6-Vorkultur war ausreichend, um eine deutliche Hochregulation des IL-6R auf $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Effektorzellen, $CD19^+$ B-Zellen sowie $CD14^+$ Monozyten zu induzieren (Abb. 3.14 A). Die zusätzliche Stimulation IL-6-behandelter Zellen

resultierte in einer beschleunigten IL-6 mRNA-Synthese (Abb. 3.14 B). Dieser Einfluss war allerdings nur transient, denn bereits 16 Stunden nach Stimulation zeigten IL-6-behandelte und Kontroll-PBMC eine vergleichbare IL-6-Transkription (Abb. 3.14 B).

Den Ergebnissen zu Folge bewirkte die Anwesenheit von IL-6 eine positive Rückkopplungsschleife, einschließlich beschleunigter IL-6-Synthese und Hochregulation der IL-6R-Expression. Um festzustellen, ob diese positive IL-6-Rückkopplungsschleife auch einen Effekt auf die Supprimierbarkeit der T-Effektorzellen hatte, wurden PBMC gesunder Spender mit IL-6 vorkultiviert und anschließend im standardisierten Suppressionsassay eingesetzt. Interessanterweise war die IL-6-Vorkultur ausreichend, um eine Treg-Resistenz in T-Effektorzellen hervorzurufen (Abb. 3.14 C, links). Die Zugabe blockierender IL-6R-Antikörper zu diesen Kokulturen stellte die Supprimierbarkeit der T-Effektorzellen wieder her. Es ist daher davon auszugehen, dass IL-6 nicht nur die Supprimierbarkeit der T-Effektorzellen verhindert, sondern diesen Zustand weiter verstärkt, indem es zur IL-6-induzierten IL-6-Neusynthese kommt.

Ob diese induzierte IL-6-Produktion ausreicht ist, um die Suppression umliegender T-Effektorzellen zu verhindern, sollte mit Hilfe von Transwellversuchen untersucht werden. IL-6-vorkultivierte PBMC wurden in die obere Kammer der Transwelleinsätze eingesetzt und die Proliferation stimulierter Kokulturen von T-Effektorzellen und Treg in der unteren Kammer untersucht. Der Transfer IL-6-behandelter Zellen in die obere Kammer reichte aus, eine zellkontaktunabhängige Aufhebung der Suppression in der unteren Kammer zu induzieren (Abb. 3.15, rechts). Erneut war dieser Effekt IL-6-abhängig, da die Zugabe von Tocilizumab zur Rekonstruktion der Suppression führte. IL-6 ist also in der Lage über eine positive Rückkopplungsschleife die Hochregulation des IL-6R auszulösen und die Produktion von IL-6 selbst zu induzieren. Zusammengenommen kommt es so zu einem Verlust der T-Zellkontrolle durch Treg.

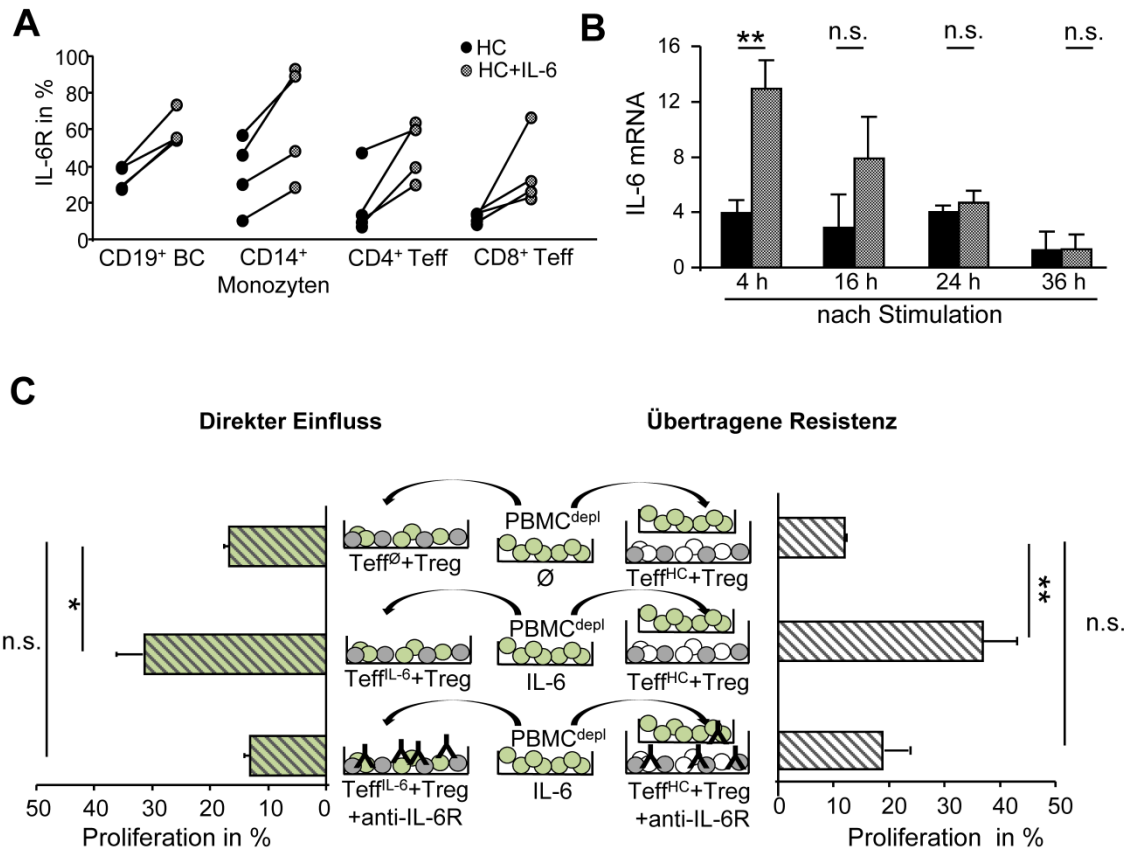


Abbildung 3.14: IL-6 induziert die Expression des IL-6R und seine beschleunigte Synthese

A) Treg-depletierte PBMC wurden in An/Abwesenheit von IL-6 24 h vorkultiviert. Anschließend wurde die IL-6R-Expression auf unterschiedlichen Zellpopulationen durchflusszytometrisch untersucht. Dargestellt sind die Ergebnisse aus vier unabhängigen Versuchen. B) Treg-depletierte PBMC wurden mit IL-6 (24 h) vorkultiviert und mit anti-CD3 mAk für 4, 16, 24 oder 48 h stimuliert. Dargestellt ist die relative IL-6R mRNA-Expression normiert auf das Haushaltsgen *EF1- α* von fünf unabhängigen Versuchen dargestellt. Unstimulierte PBMC wurden als Bezugsgröße verwendet: ** $p < 0,01$. C) Treg-depletierte PBMC wurden für 24 h mit IL-6 stimuliert anschließend mit Treg kokultiviert und mit anti-CD3 mAk stimuliert (links) bzw. in die obere Kammer der Transwells gegeben (rechts). Unbehandelte Treg-depletierte PBMC dienten als Kontrolle. Die Proliferation der Kokultur in der unteren Kammer wurde an Tag 3 mittels ^3H -Thymidineinbau analysiert. In zwei Versuchsansätzen wurden blockierende mAk gegen den IL-6R eingesetzt. Dargestellt ist die relative Proliferation, normiert auf die Proliferation unbehandelter T-Effektorzellen in Abwesenheit von Treg: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

3.15 Untersuchungen zur Wirkungsdauer von IL-6

Bislang konnte nicht hinreichend geklärt werden, weshalb IL-6 in einem gesunden Organismus die Immunität unterstützt, jedoch in Autoimmunpatienten zur Dysregulation beiträgt. Die bisherigen Beobachtungen lassen vermuten, dass durch den positiven Rückkopplungsmechanismus von IL-6 die MS-T-Effektorzellen langfristig insensitiv gegenüber der Treg-vermittelten Suppression bleiben. Zur Überprüfung der Hypothese wurden MS-PBMC 26 h in Medium vorkultiviert und anschließend mit Treg eines gesunden Spenders kokultiviert und polyklonal stimuliert. Aus dem Ergebnis in Abbildung 3.15 A geht hervor, dass T-Effektorzellen von MS-Patienten selbst nach 26-stündiger Vorkultur in Abwesenheit von IL-6 investiv gegenüber Treg blieben. Demgegenüber stehen T-Effektorzellen gesunder Spender, die durch Treg in ihrer Proliferation effektiv inhibiert wurden (Abb. 3.15 B1), während die Vorkultur mit IL-6 dies unterband (Abb. 3.15 B2). Kultivierte man allerdings IL-6-vorstimulierte T-Effektorzellen gesunder Spender für weitere 10 h in Abwesenheit von IL-6 und setzte diese Zellen im Suppressionstest ein, so waren sie wieder supprimierbar (Abb. 3.15 B3).

Diese Ergebnisse unterstützen die These, dass T-Effektorzellen von MS-Patienten langanhaltend auf die Immunmodulation durch IL-6 ansprechen, wohingegen T-Effektorzellen gesunder Spender nur vorübergehend beeinträchtigt sind.

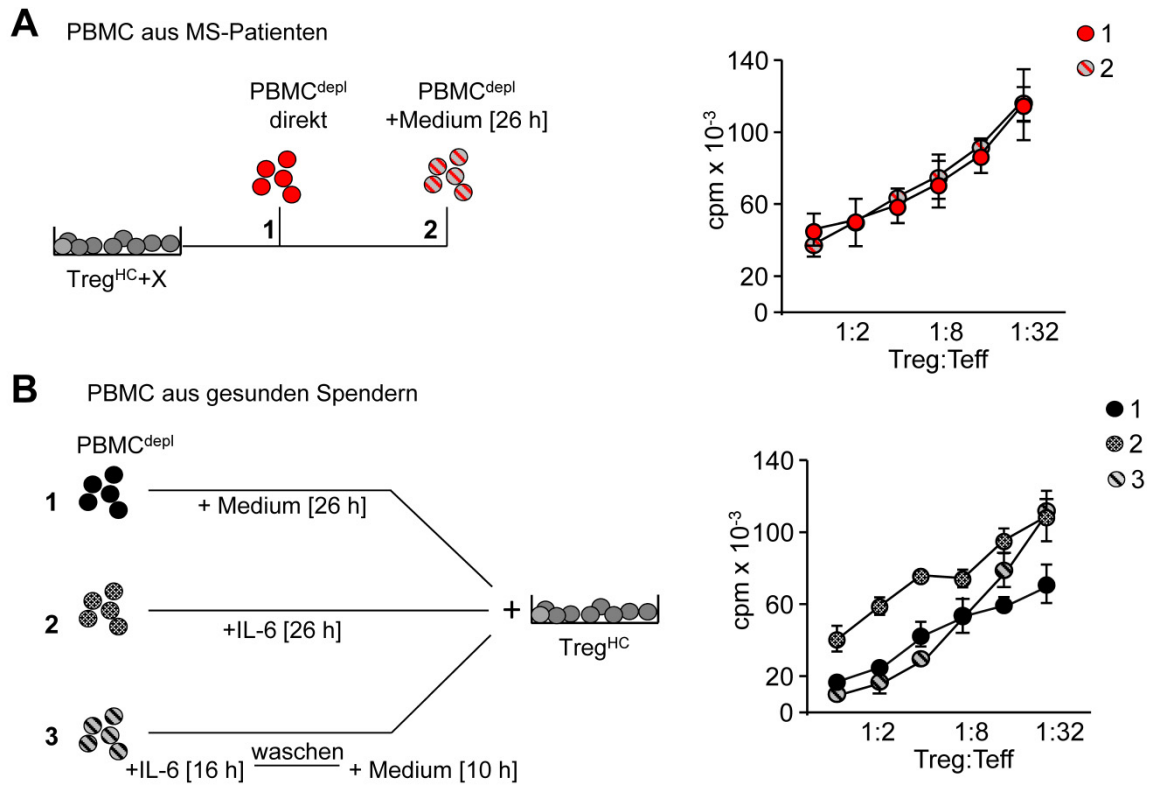


Abbildung 3.15: Langanhaltende Treg-Resistenz in T-Effektorzellen von MS-Patienten

A) Treg-depletierte PBMC von MS-Patienten wurden direkt oder nach 26-stündiger Vorkultur in Abwesenheit von IL-6 mit Treg und anti-CD3 mAk stimuliert. Nach drei Tagen wurde den Kulturen für 16 h $^3\text{H-Tdr}$ zugegeben, um die Proliferation zu bestimmen. Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte inklusive Standardabweichung eines repräsentativen von drei unabhängigen Experimenten. B) Treg-depletierte PBMC gesunder Spender wurden (1) 26 h vorkultiviert, (2) 26 h mit IL-6 stimuliert oder (3) 16 h mit IL-6 stimuliert und anschließend in Abwesenheit von IL-6 10 h weiterkultiviert. Anschließend wurden die Zellen in An/Abwesenheit von Treg mit anti-CD3 mAk stimuliert. Die Proliferation der T-Effektorzellen wurde durch den Einbau von $^3\text{H-Tdr}$ (Zugabe an Tag 3) bestimmt. Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte inklusive Standardabweichung eines repräsentativen von drei unabhängigen Experimenten.

3.16 Untersuchungen zur Regulation von T-Effektorzellen in humanisierten Mäusen

Untersuchungen zur Aktivierung und Regulation von humanen T-Effektorzellen können derzeit nur *in vitro* durchgeführt werden. Die Aussagekraft dieser Experimente für komplexe Wechselwirkungen *in vivo* ist begrenzt. *In vivo*-Untersuchungen werden in der Immunologie in der Regel in der Maus durchgeführt. Allerdings sind moderne Therapeutika zur gezielten Modulation von humanen Immunzellen häufig Epitop- und speziesspezifisch. Zudem unterscheiden sich die Mechanismen der Immunregulation von Maus und Mensch [68,121], sodass die Aussagekraft klassischer Tiermodelle begrenzt ist. Deshalb wird intensiv an neuen, sogenannten humanisierten Mausmodellen geforscht, die Analysen humaner Zellen oder Gewebe *in vivo* erlauben [85]. Verwendet werden hierfür immundefiziente Mäuse, die aufgrund gezielt ausgelöster Gendefekte wesentliche Komponenten des adaptiven Immunsystems nicht ausbilden können und nicht in der Lage sind die transferierten humanen Zellen oder Gewebe immunologisch abzustößen.

Vorarbeiten der eigenen Arbeitsgruppe auf diesem Gebiet zeigten, dass der adoptive Transfer humaner PBMC in immundefiziente Mäuse erfolgreich durchgeführt werden kann und dass diese Modelle es erlauben, die Immunregulation humaner T-Zellen *in vivo* zu untersuchen [86]. Allerdings können die übertragenen humanen T-Zellen in den Tieren eine Graft-versus-Host Disease (GvHD) auslösen, einschließlich aller klinischen Symptome wie Hepatitis, Kolitis, Entzündung der Haut, Pneumonie und Gewichtsverlust, Symptome die letztendlich zum Tod der Tiere führen. Interessanterweise verhindert die polyklonale Aktivierung humaner Treg durch den Treg-Aktivator gp120²² die Induktion der GvHD [86]. Durch diese *in vivo*-Aktivierung der Treg kommt es zur Suppression humaner T-Effektorzellen und zur Ausbildung einer dauerhaften Toleranz des murinen Gewebes.

Dieses Transfermodell stellte somit ideale Voraussetzungen zur *in vivo*-Analyse der T-Zellfunktionen und deren Modulation durch immunologische Therapeutika wie gp120 dar und sollte im Folgenden zur Untersuchung von MS-T-Effektorzellen eingesetzt werden.

²² gp120 ist ein Glykoprotein auf der Oberfläche des HI-Virus. Gp120 bindet an den CD4-Rezeptor von Treg und führt so zu ihrer Aktivierung.

Ursprünglich wurden für die Experimente immundefiziente Mäuse des Stammes NOD/Scid verwendet. Die Mäuse dieses Stammes bilden keine funktionstüchtigen T- und B-Zellen und sind folglich nicht in der Lage, die transferierten humanen Immunzellen abzustoßen. Die Verwendung dieses Stammes bedingt allerdings den Transfer großer PBMC-Zahlen (Abb. 3.16, links), die in der Regel nicht aus dem peripheren Blut von Patienten gewonnen werden können. Deshalb wurde für die Experimente in dieser Arbeit der Mausstamm gewechselt. In $Rag2^{-/-}\gamma c^{-/-}$ -Mäusen (Tiere ohne T-, B- und NK-Zellen [122]) reichte der Transfer von 5×10^6 humanen PBMC aus, um bereits eine letale GvHD zu induzieren (Abb. 3.16, rechts). Auch in diesem System verhinderte die gp120-vermittelte Aktivierung der Treg die Entstehung einer letalen GvHD.

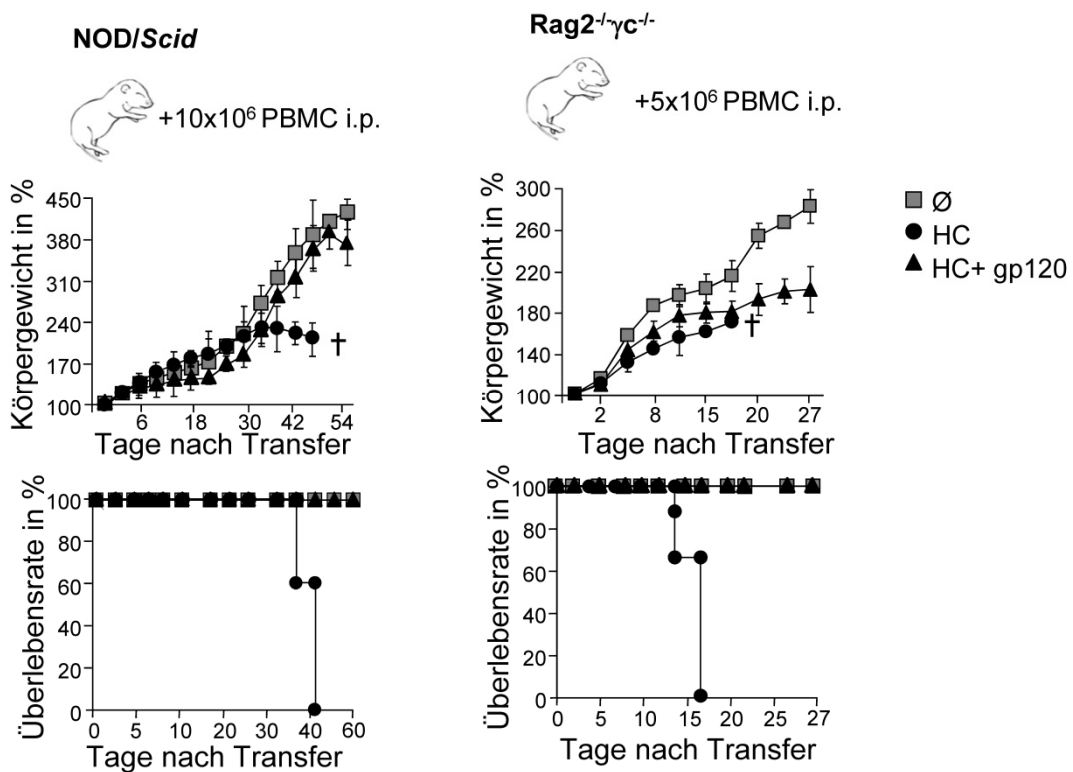


Abbildung 3.16: Induktion einer xenogenen GvHD in Abhängigkeit vom verwendeten Mausstamm

5 bzw. 10×10^6 PBMC wurden in neugeborene NOD/Scid (links) oder $Rag2^{-/-}\gamma c^{-/-}$ -Mäuse (rechts) in An/Abwesenheit von gp120 ($5 \mu\text{g}/\text{Maus}$) intraperitoneal appliziert. Unbehandelte Mäuse dienen als Kontrolle. Dargestellt sind die prozentuale Gewichtszunahme (oben) und das Überleben der Tiere (unten) über einen Zeitraum von bis zu 60 Tagen. Ein repräsentatives von vier unabhängigen Experimenten mit jeweils vier Mäusen pro Gruppe ist gezeigt.

3.17 Beschleunigte Ausbildung einer GvHD nach Transfer von Immunzellen aus MS-Patienten

Auch die *in vivo*-Untersuchungen zur Regulierbarkeit von T-Effektorzellen aus MS-Patienten konnten nicht in Anwesenheit syngener Treg durchgeführt werden, da die Treg in MS-Patienten funktionelle Defekte aufweisen [53,54,123]. Um den Einfluss potentiell gestörter MS-Treg auszuschließen, wurden vor dem adoptiven Transfer die Treg der Patienten depletiert (PBMC^{depl}) und diese mit der gleichen Anzahl funktioneller Treg eines unabhängigen gesunden Spenders ersetzt (Abb. 3.17 A). Die Funktionalität der verwendeten Treg wurde zusätzlich in *in vitro*-Assays überprüft (Daten nicht gezeigt).

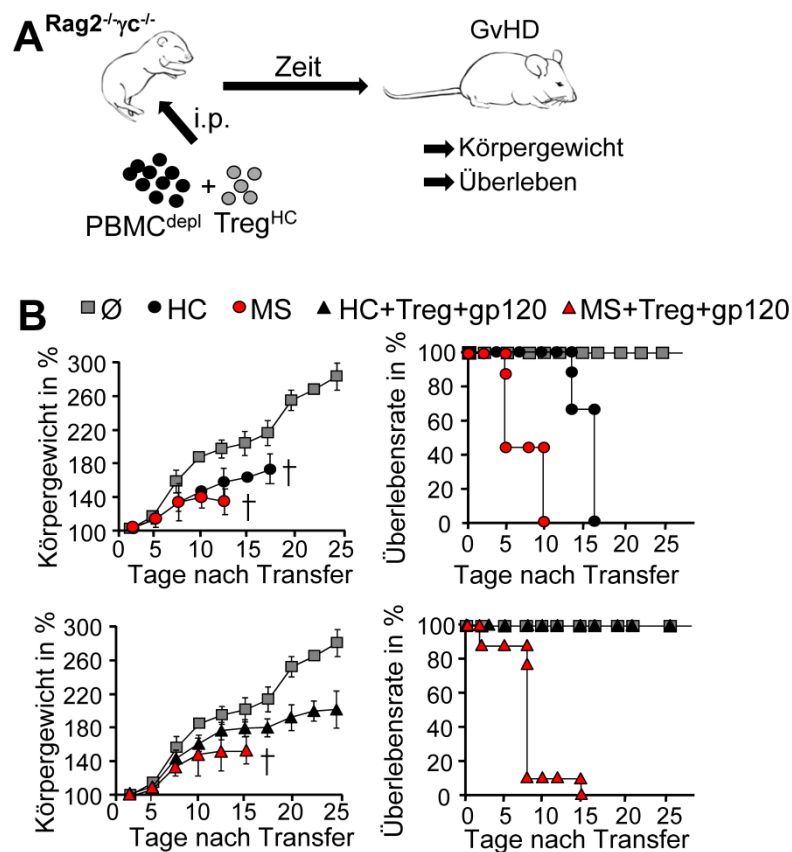


Abbildung 3.17: PBMC aus MS-Patienten induzieren eine beschleunigte GvHD, die nicht durch Aktivierung der Treg therapiert werden kann

A) Schematische Darstellung des adoptiven Transfers zur Induktion einer GvHD. B) PBMC^{depl} gesunder Spender bzw. von MS-Patienten wurden mit Treg unabhängiger gesunder Spender in An/Abwesenheit von gp120 in neugeborene $Rag2^{-/-}\gamma c^{-/-}$ -Mäuse injiziert. Die prozentuale Gewichtszunahme (links) und das Überleben der Tiere (Kaplan-Meyer-Plot, rechts) wurden über einen Zeitraum von 25 Tagen beobachtet. Unbehandelte Mäuse dienten als Kontrolle. Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte (drei Mäuse pro Versuchsgruppe) inklusive Standardabweichung. Ein repräsentatives Ergebnis von acht unabhängigen Versuchen ist gezeigt.

Sowohl der Transfer von PBMC gesunder Spender (schwarz) als auch von MS-Patienten (rot) führte zur Induktion einer GvHD, die mit einer verringerten Gewichtszunahme der Tiere korrelierte (Abb. 3.17 B). Krankheitsverlauf und Eintritt des Todes nach MS-PBMC-Transfer waren jedoch deutlich beschleunigt. Zudem verhinderte die Applikation von gp120 die letale GvHD in Mäusen denen HC-PBMC transferiert wurden, nicht aber die tödliche GvHD nach dem Transfer von PBMC aus MS-Patienten (Abb. 3.17 B).

3.18 Erhöhte Expansion von CD8⁺ T-Effektorzellen und hohe IL-6-Produktion nach adoptivem Transfer von MS-PBMC

Der Transfer von MS-PBMC in immundefiziente Mäuse resultierte in einer beschleunigten GvHD-Induktion und konnte durch Aktivierung der Treg nicht kontrolliert werden. Zur Analyse dieser Dysfunktion wurden die Milzen der behandelten Tiere entnommen und zunächst der Anteil humaner CD4⁺ und CD8⁺ T-Effektorzellen untersucht. Nach dem Transfer von PBMC gesunder Spender war das Verhältnis von CD4⁺ zu CD8⁺ T-Effektorzellen in der Milz etwa 2:1. Interessanterweise verschob sich dieses Verhältnis zugunsten der CD8⁺ T-Effektorzellen nach Applikation von MS-PBMC (CD4⁺:CD8⁺ etwa 1:3, Abb. 3.18 A). Durch die polyklonale Treg-Aktivierung wurde die Expansion xenoreaktiver T-Effektorzellen aus gesunden Spendern verhindert (Abb. 3.18 A, links) [86]. Im Gegensatz dazu konnten die T-Effektorzellen aus MS-PBMC nur unzureichend durch aktivierte Treg inhibiert werden (Abb. 3.18 A, rechts, rot). Dieses Ergebnis korrelierte mit den *in vitro*-Daten, die ebenfalls eine Insensitivität der MS-T-Effektorzellen gegenüber Treg offenlegten (Abb. 3.2 B).

Da die beobachtete Treg-Resistenz von MS-T-Effektorzellen *in vitro* durch IL-6 vermittelt wurde, sollte der Einfluss dieses Zytokins im GvHD-Modell untersucht werden. Der direkte Vergleich zeigte eine deutlich erhöhte IL-6-Produktion reisolierter MS-T-Effektorzellen verglichen mit T-Effektorzellen gesunder Spender (Abb. 3.18 B). So lag die Vermutung nahe, dass auch die beschleunigte GvHD nach Transfer von MS-PBMC durch IL-6 begünstigt wird. Die einmalige Gabe eines anti-IL-6R mAk zusammen mit den PBMC verbesserte die Überlebenschancen in beiden Gruppen. Dieses Ergebnis zeigte – im Gegensatz zu den vorausgegangenen *in vitro*-Analysen, dass die Aktivierung von T-Effektorzellen *in vivo* wesentlich durch IL-6 beeinflusst wird. Dies war sowohl für PBMC gesunder Spender als auch für PBMC aus MS-

Patienten zu beobachten (Abb.3.18 C). Im Gegensatz zu der polyklonalen Treg-Aktivierung durch gp120 konnte die anti-IL-6R mAk Gabe nach MS-PBMC-Transfer die Entstehung einer GvHD deutlich verzögern (Abb. 3.18 C). In einem Versuchszeitraum von 30 Tagen überlebten 70 % der Mäuse, ohne Anzeichen von GvHD-assoziierten Krankheitssymptomen.

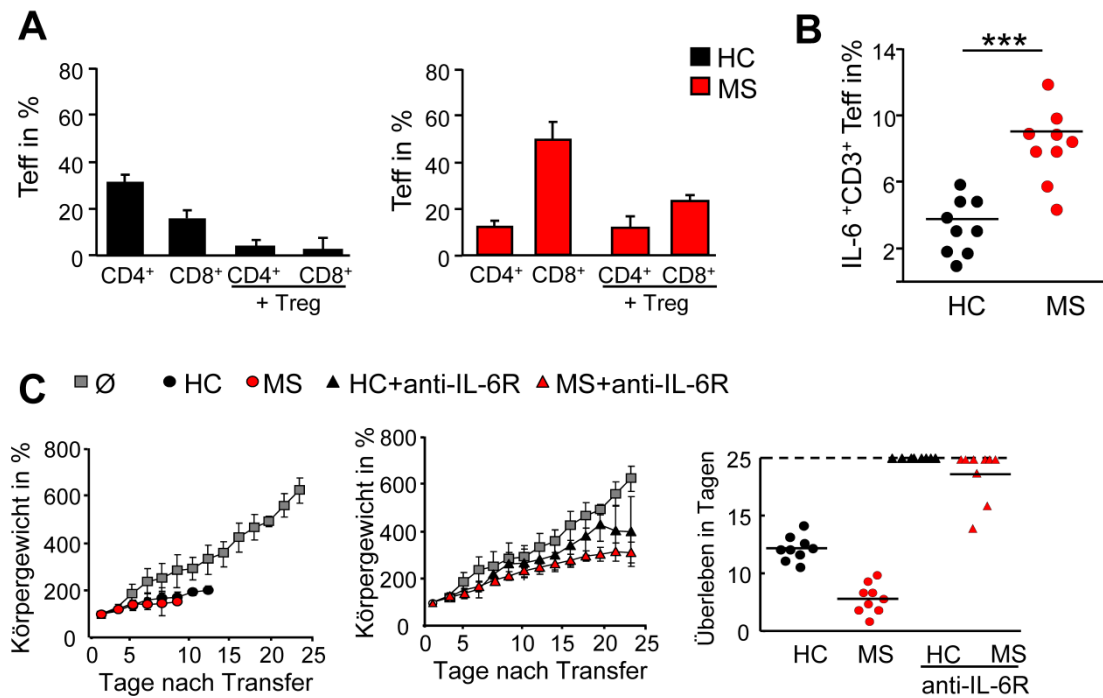


Abbildung 3.18: Blockade des IL-6-Rezeptors zur Therapie der GvHD

A) PBMC^{depl} gesunder Spender bzw. von MS-Patienten wurden zusammen mit Treg unabhängiger gesunder Spender in An/Abwesenheit von gp120 (5 µg/Maus) intraperitoneal in neugeborene Rag2^{-/-}γc^{-/-}-Mäuse injiziert. Sieben Tage nach Transfer wurden die Milz entnommen und der Anteil CD4⁺ und CD8⁺ T-Effektorzellen durchflusszytometrisch analysiert. B) Zudem wurde in diesen Milzzellen der prozentuale Anteil IL-6-produzierender T-Effektorzellen bestimmt. Jeder Punkt entspricht einer individuellen Maus, die Linie gibt den Mittelwert an, P-Werte relativ zu Mäusen mit HC-PBMC: *** p<0,001. C) PBMC^{depl} gesunder Spender bzw. von MS-Patienten wurden zusammen mit Treg unabhängiger gesunder Spender in An/Abwesenheit von anti-IL-6R mAk (10 µg/Maus) intraperitoneal in neugeborene Rag2^{-/-}γc^{-/-}-Mäuse injiziert. Die prozentuale Gewichtszunahme (links) und das Überleben der Tiere (rechts) wurden über einen Zeitraum von 25 Tagen bestimmt. Unbehandelte Mäuse dienten als Kontrolle. Links: dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte (vier Mäuse pro Gruppe) inklusive Standardabweichung. Ein repräsentatives Ergebnis von vier unabhängigen Versuchen. Rechts: Überlebensrate von jeweils neun Mäusen pro Gruppe aus drei unabhängigen Versuchen ist gezeigt.

3.19 Die Entstehung eines humanen Immunsystems in immundefizienten Mäusen nach dem Transfer humaner Blutstammzellen

Der adoptive Transfer humaner Immunzellen ermöglichte die *in vivo*-Analyse T-Zell-spezifischer Immunantworten. Allerdings können mit diesem Modell ausschließlich periphere Immunzellen *in vivo* analysiert werden. Neurologische Entzündungen und andere MS-assoziierte Krankheitssymptome konnten nicht untersucht werden. Aus diesem Grund wurde ein weiteres humanisiertes Mausmodell etabliert: die Humanisierung durch Applikation CD34⁺ Blutstammzellen in die Leber immundefizienter Mäuse.

Die Entwicklung eines humanen Immunsystems *in vivo* setzt die Verwendung humaner hämatopoetischer Stammzellen (HSC) voraus, die zur Differenzierung in alle Vorläuferzellen befähigt sind. Vor Injektion humaner HSC (isoliert aus Nabelschnurblut) wurden neugeborene immundefiziente *NOD/Scid γ c^{-/-}*-Mäuse einer subletalen Bestrahlung unterzogen. Dies eröffnete Nischen im Knochenmark und ermöglichte die Ansiedlung humaner Blutstammzellen. Bereits 16 Wochen nach Stammzelltransfer war eine Immigration humaner CD45⁺ Immunzellen im peripheren Blut, der Milz, dem Knochenmark, dem Thymus und dem Lymphknoten zu beobachten (Abb. 3.19 A). Durch den γ c-Gendefekt in den immundefizienten Mäusen wird die IL-7/IL-7-Rezeptor-Signalkaskade inhibiert [124]. Hierdurch ist die Entstehung von Lymphknoten stark beeinträchtigt. Es werden nur Lymphknotenanlagen ausgebildet (Abb. 3.19 B, links). Erst im Zuge der Humanisierung entwickelten diese Tiere einen sichtbaren Lymphknoten (Abb. 3.19 B, rechts). Durchflusszytometrische Analysen des Thymus humanisierter Mäuse zeigten charakteristische Entwicklungsstadien von Thymozyten, so dass von einer intakten T-Zelldifferenzierung ausgegangen werden konnte (Abb. 3.19 C). Zudem ergaben weitere Untersuchungen, dass in allen Organen sowohl T- und B-Zellen als auch NK-Zellen und Monozyten vorhanden waren (Abb. 3.19 C).

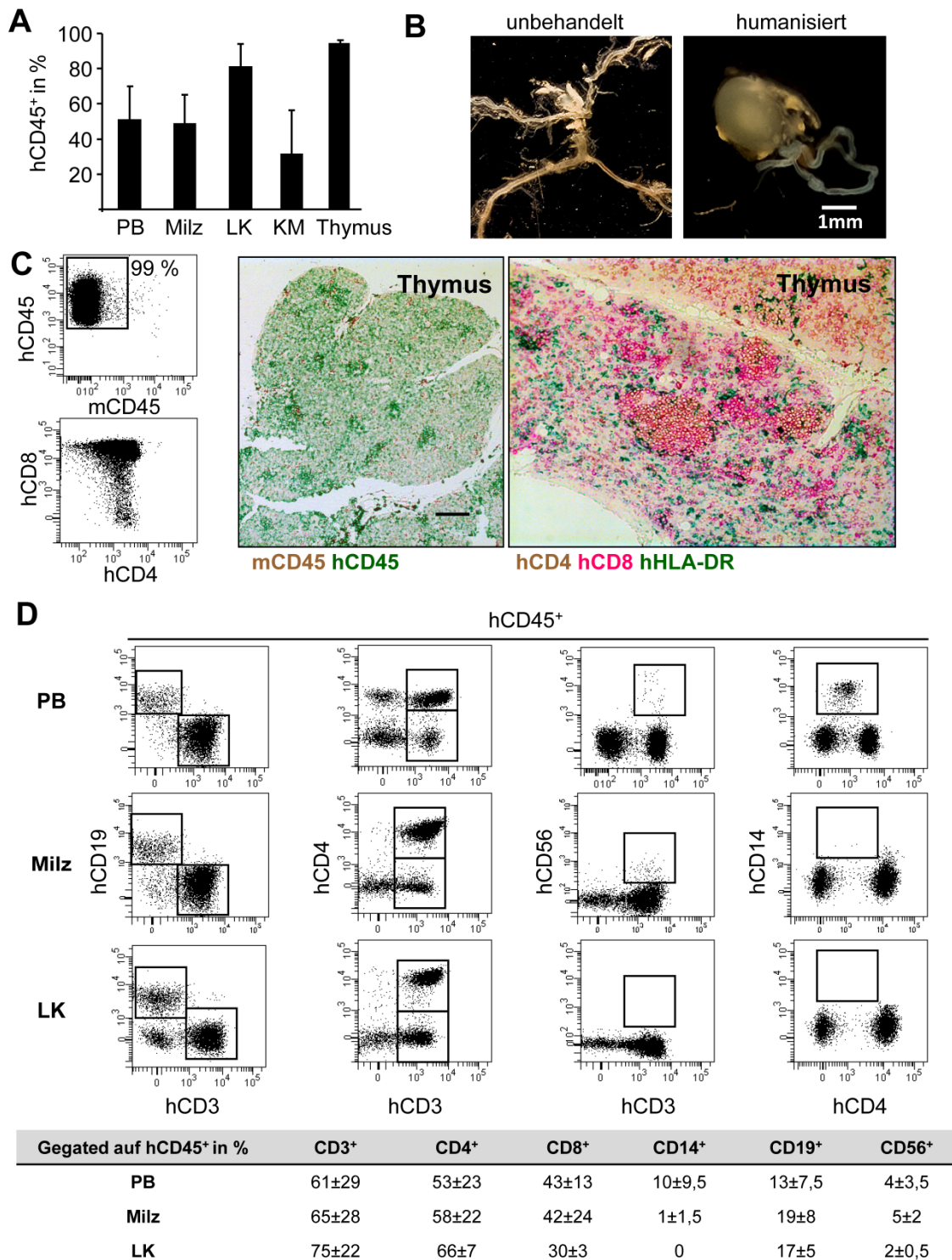


Abbildung 3.19: Durchflusszytometrische und histologische Charakterisierung der immunologischen Rekonstitution immundefizienter Mäuse

A) Dargestellt ist der prozentuale Anteil humaner CD45⁺ Zellen in unterschiedlichen Organen aus humanisierten Mäusen 16 Wochen nach Stammzelltransfer. Mittelwerte aus 25 individuellen Mäusen aus drei unterschiedlichen Humanisierungsversuchen. B) Unbehandelten und humanisierten NOD/Scid γ c^{-/-}-Mäusen (16 Wochen nach HSC Transfer) wurde Patentblau in die Schwanzwurzel injiziert, anschließend die Lymphknoten herauspräpariert und fotografisch dargestellt. Je eine repräsentative Maus von neun ist dargestellt. C) Links: Thymozyten

humanisierter Mäuse wurden mit Fluorochrom-konjugierten mAk gefärbt. Dargestellt ist der prozentuale Anteil $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Effektorzellen. Ein repräsentatives Ergebnis aus 15 unterschiedlichen Mäusen ist dargestellt. Rechts: immunhistochemischer Nachweis muriner $CD45^+$, humaner $CD45^+$, $CD4^+$ $CD8^+$ und $HLA-DR^+$ Zellen im Thymus humanisierter $NOD/Scid\gamma c^{-/-}$ -Mäuse 16 Wochen nach Stammzelltransfer. Ein repräsentatives Ergebnis von 15 unterschiedlichen Mäusen. D) Der Anteil humaner $CD45^+$, $CD3^+$, $CD4^+$, $CD8^+$, $CD14^+$, $CD19^+$, $CD56^+$ Zellen in unterschiedlichen Organen wurde 16 Wochen nach Stammzelltransfer bestimmt. Oben: Durchflusszytometrische Analyse humaner Immunzellen in unterschiedlichen Organen einer humanisierten Maus 16 Wochen nach Stammzelltransfer. Eine repräsentative von 25 unabhängigen Untersuchungen ist gezeigt. Unten: Tabellarische Zusammenfassung der prozentualen Verteilung humaner Immunzellen aus 25 humanisierten Mäusen.

3.20 Induktion und Charakterisierung einer MS-ähnlichen Erkrankung in humanisierten Mäusen

Die vorangegangenen Analysen zeigten, dass 16 Wochen nach Stammzelltransfer das Immunsystem in humanisierten Mäusen nahezu vollständig ausgebildet war. Zu diesem Zeitpunkt erfolgte die Induktion einer MS-ähnlichen Erkrankung durch subkutane Immunisierung mit murinem Myelin-Oligodendrozyten Glykoprotein ((MOG)-Protein)²³. Zur Herabsetzung der Integrität der Blut-Hirn-Schranke wurde zusätzlich Pertussistoxin intraperitoneal appliziert [125]. Aufgrund der unterrepräsentierten myeloiden Zelllinie in vollhumanisierten Mäusen [90] und zur Unterstützung der Initiierung MOG-spezifischer Immunantworten wurden zusätzlich reife MOG-beladende DC des gleichen Mausstammes injiziert (Abb. 3.20 A). Als Reaktion auf die Immunisierung entwickelten die Mäuse Symptome, die Ähnlichkeit mit denen einer experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE) hatten, dem murinen Krankheitsmodell der MS. Neben Gewichtsverlust verloren die Mäuse den Schwanztonus und wiesen Lähmungen der Hinterläufe auf (Abb.3.20 B). Bei MS und EAE verursachen infiltrierende Immunzellen eine autoimmune Neuroinflammation im zentralen Nervensystem [126]. Zunächst sollte daher geklärt werden, welche Zellpopulationen im chimären System der humanisierten Maus am Krankheitsverlauf beteiligt sind. Hierzu erfolgte eine histologische Analyse des Maushirns. Es zeigte sich, dass die periventrikuläre Infiltration im Maushirn hauptsächlich durch humane T- und B-Zellen hervorgerufen wurde (Abb. 3.20 C). Lediglich infiltrierte Makrophagen waren

²³ MOG-Protein wird von Oligodendrozyten exprimiert und ist somit Bestandteil der Zielstruktur im murinen Hirn.

murinen Ursprungs. Auch in Teilen des Rückenmarks, mit Anzeichen von Demyelinierung, konnten humane T- und B-Zellen nachgewiesen werden, wohingegen die Makrophagen ausschließlich aus der Maus selbst stammten (Daten nicht gezeigt).

Zum Nachweis antigenspezifischer T-Zellantworten gegen MOG-Protein wurden humane T-Effektorzellen aus der Milz isoliert und *ex vivo* mit MOG-beladenen bzw. unbeladenen BMDC stimuliert. Ausschließlich in MOG-immunisierten Mäusen war eine MOG-spezifische Proliferation der T-Effektorzellen nachweisbar (Abb. 3.20 D). Auch mit MOG-beladenen humanen DC, die aus dem syngenem Nabelschnurblut generiert wurden, konnte eine MOG-spezifische T-Zellproliferation gezeigt werden (Abb. 3.20 D, rechts).

Das proinflammatorische Zytokin IL-17 und dessen erhöhte Expression konnte vermehrt in Läsionen von MS-Patienten gefunden werden und scheint eine wichtige Rolle in diversen Autoimmunerkrankungen zu spielen [127], da sowohl die akuten Phasen von EAE-Mäusen als auch von MS-Patienten mit erhöhten IL-17-Werten assoziieren [128-130]. Die Analyse der Produktion dieses Zytokins erfolgte in MOG-behandelten Tieren. Die IL-17-Produktion von CD4⁺ T-Effektorzellen aus drei erkrankten Mäusen, die sich im Grad der Krankheitsausprägung unterschieden (Abb. 3.20 E) zeigte, dass der Anteil IL-17-produzierender CD4⁺ T-Effektorzellen mit dem Krankheitsgrad zunahm (Abb. 3.20 E). In unbehandelten und Kontrollprotein-immunisierten Mäusen wurde keine IL-17-Produktion festgestellt (Daten nicht gezeigt).

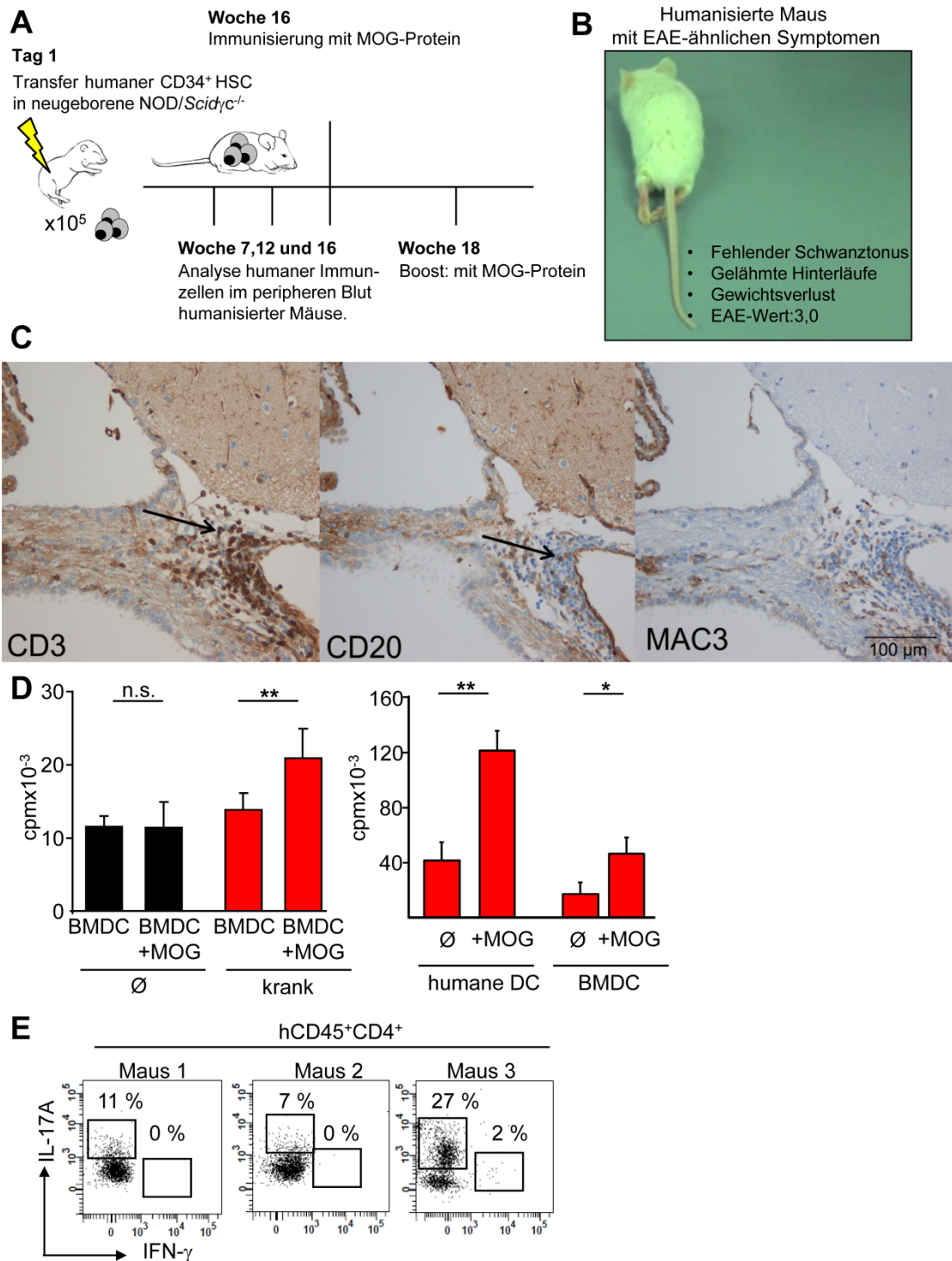


Abbildung 3.20: Induktion einer MS-ähnlichen Erkrankung in humanisierten Mäusen

A) Übersicht des *in vivo*-Modells zur Immunisierung humanisierter Mäuse mit murinem MOG-Protein. 16 Wochen nach HSC-Transfer wurden NOD/Scid γ ^{-/-}-Mäuse mit emulgierem MOG-Protein subkutan immunisiert, 400 ng Pertussistoxin intraperitoneal und MOG-beladene BMDC intravenös appliziert. B) Dargestellt ist das Bild einer erkrankten Maus mit EAE-ähnlichen Symptomen wie: Verlust des Schwanztonus und gelähmten Hinterläufen. C) Dargestellt ist die histologische Analyse des periventriculären Cerebrums erkrankter Mäuse mit humanem anti-CD3, anti-CD20 sowie murinem anti-MAC3 mAk. Die Anfertigung der dargestellten Gewebehistologie erfolgte in Kooperation mit Dr. Tanja Kuhlmann aus Münster. D) 2x10⁴ MOG-Protein-beladene bzw. unbeladene BMDC (links) oder humane DC (generiert aus Monozyten des HSC-Spenders) (rechts) wurden zur Stimulation von 2x10⁵ Milzzellen aus MOG-immunisierten Mäusen oder Kontrollmäusen verwendet. Zugabe von ³H-Tdr an Tag 3 für

weitere 16 Stunden zur Determination der Proliferation. Dargestellt ist der arithmetische Mittelwert inklusive Standardabweichung. Ein repräsentativer von vier unabhängigen Versuchen ist gezeigt. P-Wert relativ zu unbeladenen DC: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. E) Peripheres Blut von MOG-immunisierten Mäusen mit unterschiedlichem Krankheitsgrad wurde maximal stimuliert und die IL-17-Produktion durchflusszytometrisch analysiert. Erkrankungsgrad: Maus 1: 1,5; Maus 2: 2; Maus 3: 3,5.

3.21 MS-ähnliche Symptome korrelieren mit erhöhten Frequenzen von T-Effektorgedächtniszellen und IL-6-vermittelter Treg-Resistenz

In MS-Patienten konnte eine Verschiebung der Frequenz der T-Zellsubpopulationen von naiv in Richtung T-Effektorgedächtniszellen und eine IL-6-vermittelte Treg-Resistenz von T-Effektorzellen gezeigt werden (Abb. 3.2, 3.6, 3.8). Auch humanisierte Mäuse mit MS/EAE-Symptomatik wiesen eine Verschiebung des Verhältnisses von naiven $CD4^+$ T-Zellen zu T-Effektorgedächtniszellen auf (Abb. 3.21 A). Verglichen mit unbehandelten humanisierten Mäusen war die Frequenz der T-Effektorgedächtniszellen nach MOG-Immunsierung deutlich erhöht. Ob auch die T-Effektorzellen erkrankter Tiere resistent gegenüber Treg-vermittelter Suppression war, sollte im nächsten Schritt untersucht werden. Hierfür wurden Milzzellen aus immunisierten Mäusen und Kontrolltieren isoliert, mit Treg gesunder Spender kokultiviert und polyklonal stimuliert. Tatsächlich zeigten die T-Effektorzellen erkrankter Tiere eine Treg-Resistenz, wohingegen T-Effektorzellen aus Kontrollmäusen durch Treg effizient supprimiert werden konnten (Abb. 3.21 B).

Auch im humanisierten Krankheitsmodell wurde überprüft, ob die beobachtete Treg-Resistenz der T-Effektorzellen durch eine gestörte IL-6-Produktion hervorgerufen wurde. Zu diesem Zweck erfolgte die Analyse der IL-6-Sekretion Treg-depletierter Milzzellen nach polyklonaler Stimulation mit anti-CD3 mAk in An/Abwesenheit von Treg. Der direkte Vergleich zwischen stimulierten Milzzellen von erkrankten und gesunden Mäusen zeigte eine vergleichbare IL-6-Produktion (Abb. 3.21 C). Zudem kam es zur Inhibition der IL-6-Produktion in Kokulturen gesunder Kontrollmäuse (Abb. 3.21 C). Interessanterweise konnte die IL-6-Produktion nur dann nicht durch Treg inhibiert werden, wenn die humanisierten Mäuse eine MS-ähnliche Erkrankung hatten (Abb. 3.21 C). Die *in vivo*-Daten zeigten also Verhältnisse, die der Situation im MS-Patienten ähneln, so dass die Induktion einer MS-ähnlichen Krankheit in humanisierten Mäusen ein vielversprechendes Modell zur Analyse dieser Autoimmunkrankheit darstellt.

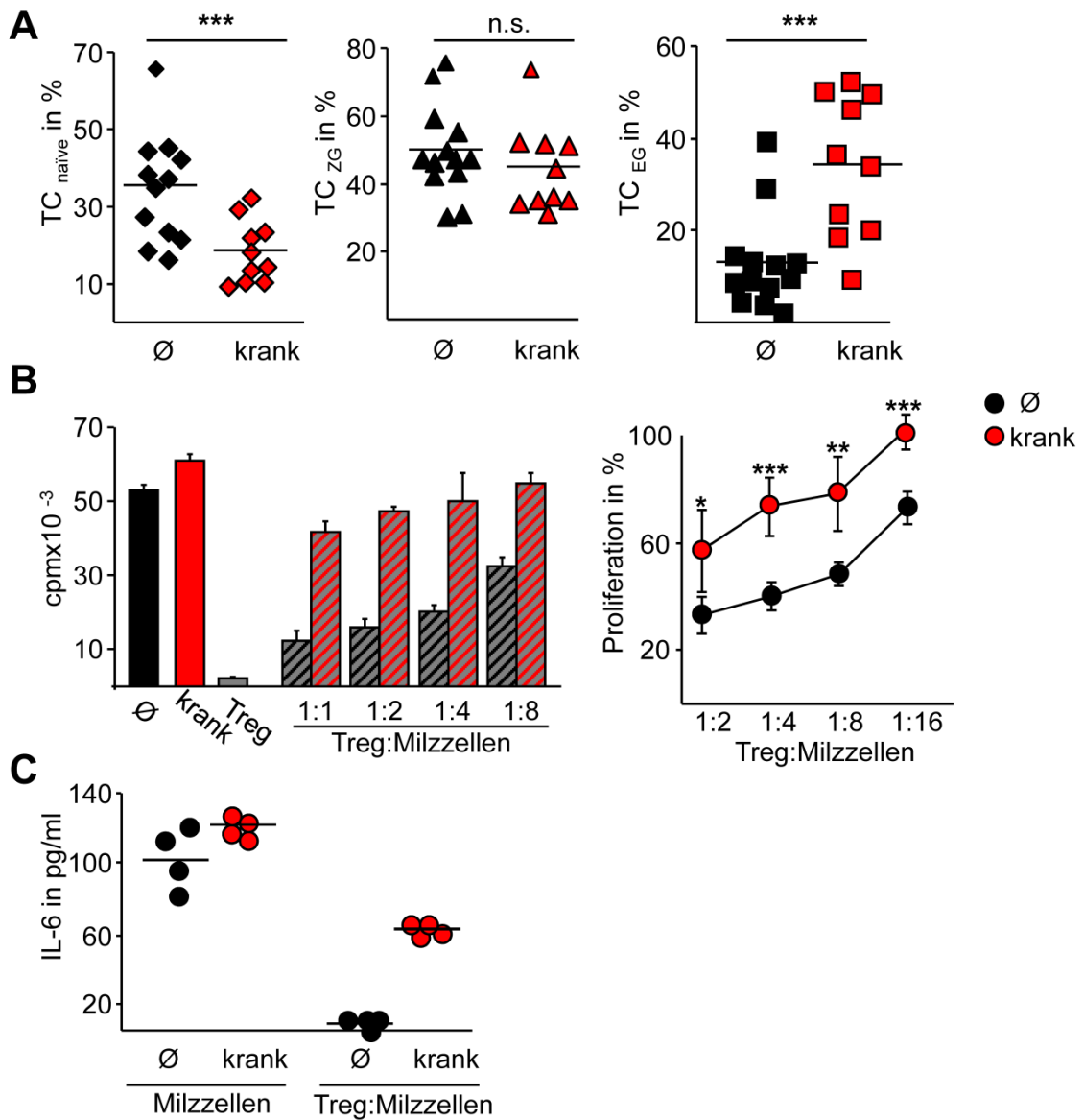


Abbildung 3.21: Funktionelle Analysen reisolierter humaner T-Effektorzellen aus MOG-immunisierten Mäusen

A) Dargestellt ist der Anteil naiver T-Zellen ($CD4^+CD45RO^-CD27^+$), T-Effektorgedächtniszellen ($CD4^+CD45RO^+CD27^-$) und zentraler T-Gedächtniszellen ($CD4^+CD45RO^+CD27^+$) im peripheren Blut MOG-immunisierter und unbehandelter humanisierter Mäuse. Jeder Punkt entspricht einer individuellen Maus, die Linie gibt den Mittelwert an, P-Werte sind relativ zu unbehandelten humanisierten Mäusen: *** $p < 0,001$. B) 10^5 Treg-depletierte reisolierte Milzzellen von unbehandelten (schwarz) oder MOG-immunisierten humanisierten Mäusen (rot) wurden zusammen mit Treg gesunder Spender (im angegebenen Verhältnis) mit anti-CD3 mAk stimuliert und die Proliferation mittels 3H -Tdr-Einbau bestimmt. Links: dargestellt ist der arithmetische Mittelwert mit Standardabweichung eines repräsentativen Experiments. Rechts: relative Proliferation der T-Effektorzellen wurde auf die Proliferation der T-Effektorzellen in Abwesenheit von Treg normiert. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von $n=5$, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. C) Treg-depletierte Milzzellen humanisierter Mäuse (schwarz) bzw. von MOG-immunisierten Mäusen (rot) wurden mit anti-CD3 mAk in An/Abwesenheit von Treg (Verhältnis 1:1) stimuliert und an Tag drei nach Stimulation erfolgte die Bestimmung der Zytokinfreisetzung im Überstand mittels CBA. Darstellung der IL-6-Produktion von jeweils vier individuellen Mäusen pro Gruppe inklusive Median.

4. Diskussion

Die Multiple Sklerose (MS) ist eine chronische Autoimmunerkrankung des zentralen Nervensystems, die überwiegend durch autoreaktive Myelin-spezifische T-Effektorzellen vermittelt wird [131]. In einem gesunden Körper werden autoreaktive T-Effektorzellen, die nicht durch die zentralen Toleranzmechanismen deletiert wurden, aktiv durch regulatorische T-Zellen (Treg) kontrolliert. Somit spielt diese T-Zellsubpopulation eine essentielle Rolle für die Aufrechterhaltung der Homöostase. Wie wichtig Treg sind, verdeutlichen die Veröffentlichungen von Sakaguchi et al., die zeigten das die Depletion von CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ Treg in Mäusen zur Entstehung einer letalen Autoimmunerkrankung führt [18]. In MS-Patienten konnte eine Fehlfunktion von Treg mit der Dysregulation autoreaktiver T-Effektorzellen assoziiert werden [53,54,100,101,123,132]. Isolierte Treg von MS-Patienten inhibieren die T-Zellproliferation nicht so effektiv, wie Treg von gesunden Spendern [54,101]. Dagegen sind die funktionellen Eigenschaften autoreaktiver T-Effektorzellen aus MS-Patienten und ihre Ansprechbarkeit für immunregulatorische Prozesse bisher nicht vollständig charakterisiert.

Der Fokus der vorliegenden Arbeit war die funktionelle Untersuchung von T-Zellpopulationen aus dem peripheren Blut von MS-Patienten und ihre Regulation durch aktivierte Treg. Einen ersten Hinweis, dass periphere T-Effektorzellen aus MS-Patienten insensitiver gegenüber Treg-vermittelter Suppression sind als T-Effektorzellen aus gesunden Spendern zeigten bereits die ersten Untersuchungen. Unter gleichen Stimulationsbedingungen waren T-Effektorzellen aus MS-Patienten durch aktivierte Treg unabhängiger Spender deutlich schlechter zu supprimieren als T-Effektorzellen gesunder Spender. Eine Voraktivierung [106] der MS-T-Effektorzellen konnte als Ursache dieser Beobachtung durch Analyse entsprechender T-Zellaktivierungsmarker ausgeschlossen werden. Die funktionelle Testung isolierter T-Zellsubpopulationen zeigte zudem, dass von der Dysregulation naive und differenzierte T-Zellen in MS-Patienten betroffen sind. Diese Beobachtung führte zu der Hypothese, dass ein löslicher Faktor die Treg-Resistenz in T-Effektorzellen auslösen könnte.

Autoimmunerkrankungen sind oft begleitet von einer erhöhten Produktion proinflammatorischer Zytokine [133]. Diese können die Interaktion von T-

Effektorzellen und Treg modulieren und die Funktion der Treg sogar komplett unterbinden [22,105,134,135]. Die vergleichende Analyse des Zytokinprofils aktivierter PBMC aus gesunden Spendern und MS-Patienten zeigte jedoch keine signifikanten Unterschiede. Die Bildung proinflammatorischer Zytokine durch aktivierte Immunzellen war in beiden Gruppen nahezu identisch. Erst Untersuchungen in Suppressorassays ergaben, dass in Kokulturen von MS-PBMC und Treg die Bildung von IL-6 nicht effizient inhibiert wurde. Interessanterweise resultierte die Inhibition des IL-6-Signalweges mit blockierenden anti-IL-6R mAk (Tocilizumab) oder neutralisierenden anti-IL-6 mAk in der Wiederherstellung der Treg-vermittelten Suppression von MS-T-Effektorzellen. Somit lag die Vermutung nahe, dass die Treg-Resistenz in T-Effektorzellen von MS-Patienten IL-6-vermittelt war.

In dem verwendeten Suppressionsassay kann IL-6 einen modulierenden Einfluss auf die Funktion von Treg [105] und T-Effektorzellen [136] ausüben. Pasare und Medzhitov beispielsweise publizierten, dass IL-6 zusammen mit anderen Faktoren den Funktionsverlust von Treg herbeiführen kann [105]. Ein solcher Einfluss von IL-6 auf Treg konnte in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden. Die Anwesenheit von IL-6 hatte keinerlei Auswirkungen auf die Expression Treg-assoziiierter Aktivierungsmarker, die mit ihrer Funktion korrelieren [115,117,137]. Des Weiteren zeigte die IL-6-Vorinkubation keine Wirkung auf die Suppressorfunktion der Treg, so dass von einer IL-6-vermittelten Modulation der MS-T-Effektorzellen ausgegangen werden konnte. Diese Beobachtungen sind im Einklang mit Daten aus transgenen Mäusen die IL-6 konstitutiv produzieren [138]. Diese IL-6-Überproduktion wirkte sich *in vivo* weder auf die Treg-Funktion noch auf ihre Entwicklung aus [138].

Die hier präsentierten Ergebnisse legen zudem offen, dass T-Effektorzellen von MS-Patienten im Vergleich zu gesunden Spendern, eine erhöhte Phosphorylierung von PKB/c-Akt aufweisen. Die Verwendung spezifischer PKB/c-Akt-Inhibitoren stellte die Supprimierbarkeit der MS-T-Effektorzellen wieder her. Daher kann postuliert werden, dass in MS-Patienten der PKB/c-Akt-Signalweg essentiell an einer IL-6-vermittelten Treg-Resistenz beteiligt ist. Diese Theorie wird durch Arbeiten von Wehrens et al unterstützt. Sie entdeckten, dass in aktiven Endzündungsherden von Patienten mit rheumatoider Arthritis die erhöhte Phosphorylierung von PKB/c-Akt zur Hyperaktivierung der T-Effektorzellen führte und letztendlich zu deren Treg-

Resistenz [106]. Für diese Autoimmunerkrankung konnte ein zunächst vermuteter Treg-Defekt ausgeschlossen werden (REF).

Die Signalweiterleitung über den IL-6R führt neben der Phosphorylierung des PIK3-Signalweges hauptsächlich zur Signalübertragung über die JAK/STAT- oder MAPK-Signalkaskade [44,45,109,110]. Der Vergleich der STAT3-Phosphorylierung von T-Effektorzellen aus gesunden Spendern und MS-Patienten wies jedoch keine Unterschiede auf (Daten nicht gezeigt) und steht im direkten Gegensatz zu den Daten von Schneider et al. [139]. Diese Diskrepanz kann dadurch erklärt werden, dass in der hier vorgestellten Arbeit die Phosphorylierung der Zellen direkt nach Isolation und ohne zusätzliche Stimulation untersucht wurde, während in der Arbeit von Schneider et al. die Phosphorylierung nach vorangegangener Stimulation mit IL-6, IL-27 oder IL-10 gemessen wurde [139].

In der vorliegenden Arbeit konnte belegt werden, dass eine IL-6-vermittelte PKB/c-Akt Phosphorylierung in MS-T-Effektorzellen zu deren Treg-Resistenz führt. Derartige Beobachtungen konnten von Schneider et al. untermauert werden. Sie veröffentlichten, dass CD4⁺ T-Effektorzellen aus MS-Patienten im aktiven Krankheitsschub insensitiver gegenüber Treg-vermittelter Suppression sind als CD4⁺ T-Effektorzellen gesunder Spender [139]. Diese Treg-Resistenz korrelierte mit erhöhten IL-6-Mengen im Kulturüberstand. Im Gegensatz dazu ergaben die Beobachtungen der vorliegenden Arbeit, dass nicht nur CD4⁺ T-Effektorzellen, sondern auch CD8⁺ T-Effektorzellen aus MS-Patienten verringert auf Treg-vermittelte Suppression ansprechen. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit histologischen Untersuchungen von MS-Läsionen, die auf eine pathologische Rolle der CD8⁺ T-Effektorzellen hinweisen [70,140,141]. Des Weiteren konnten hier keine erhöhten IL-6-Spiegel im Serum von MS-Patienten oder im Überstand aktivierter MS-Immunzellen gefunden werden [35,142]. Die vorgestellten Ergebnisse zeigen vielmehr, dass aktivierte PBMC beider Gruppen vergleichbare IL-6-Mengen produzieren. Die gegensätzlichen Resultate könnten sich darauf zurückführen lassen, dass sich die von Schneider et al. analysierten Patienten in einem aktiven Krankheitsschub befanden [139] und während der entzündlichen T-Zellaktivierung eine Vielzahl proinflammatorischer Zytokine verstärkt exprimiert werden [143,144]. In dieser Arbeit wurden stattdessen MS-Patienten mit stabilem Phänotyp ohne inflammatorischen Schub untersucht und diese sind hinsichtlich der

Zytokinprofile nur bedingt mit dem Patientenkollektiv von Schneider et al. zu vergleichen.

Da sich aktivierte PBMC aus gesunden Spendern und MS-Patienten nicht in der Quantität der IL-6-Produktion unterscheiden, stellte sich die Frage, wie IL-6 in MS-T-Effektorzellen zur Treg-Resistenz führen kann. Die folgenden Experimente zeigten, dass hierfür im Wesentlichen eine veränderte Kinetik der IL-6-Bildung verantwortlich ist. Die T-Effektorzellen von MS-Patienten synthetisierten bereits vier Stunden nach Aktivierung IL-6, während bei gleichen Stimulationsbedingungen in T-Effektorzellen von gesunden Spendern erst nach 24 Stunden IL-6 mRNA nachweisbar war. Darüber hinaus ergab die zeitversetzte Zugabe von IL-6 zu Suppressorkokulturen, dass die Anwesenheit des Zytokins nur während der frühen T-Zellaktivierungsphase einen Einfluss auf die Supprimierbarkeit der T-Effektorzellen hatte und untermauerte die These, dass eine beschleunigte IL-6-Induktion in MS-Patienten zur Treg-Resistenz führt. Diese Ergebnisse erklären bisher widersprüchliche Untersuchungen in MS-Patienten. So wurde zwar ein Einfluss von IL-6 an der Pathogenese von MS vermutet, allerdings konnte nie eine Korrelation zwischen IL-6-Werten im Serum und der Krankheitsaktivität von MS-Patienten gefunden werden [35,142,145]. Lediglich die Anwesenheit des Zytokins in akuten und chronischen Plaques wies auf einen pathologischen Einfluss von IL-6 hin [145,146].

Die Treg-Resistenz kann auch in T-Effektorzellen gesunder Spender durch die Vorkultur mit IL-6 induziert werden. IL-6 selbst induziert die Hochregulation des IL-6R, die erhöhte Phosphorylierung von PKB/c-Akt, die beschleunigte Induktion der IL-6-Synthese und letztendlich die Treg-Insensitivität (Abb. 4.1). Ein ähnlicher Regulationsprozess, wenn auch in einem anderen Kontext, wurde in Lungen- und Brustkrebspatienten nachgewiesen. Hier löst initial sekretiertes IL-6 die Hochregulation des Notch-3-Liganden Jagged-1 aus, was wiederum zur positiven Rückkopplung der Notch-3/Jagged-1-Achse und vermehrter IL-6-Produktion führt [147].

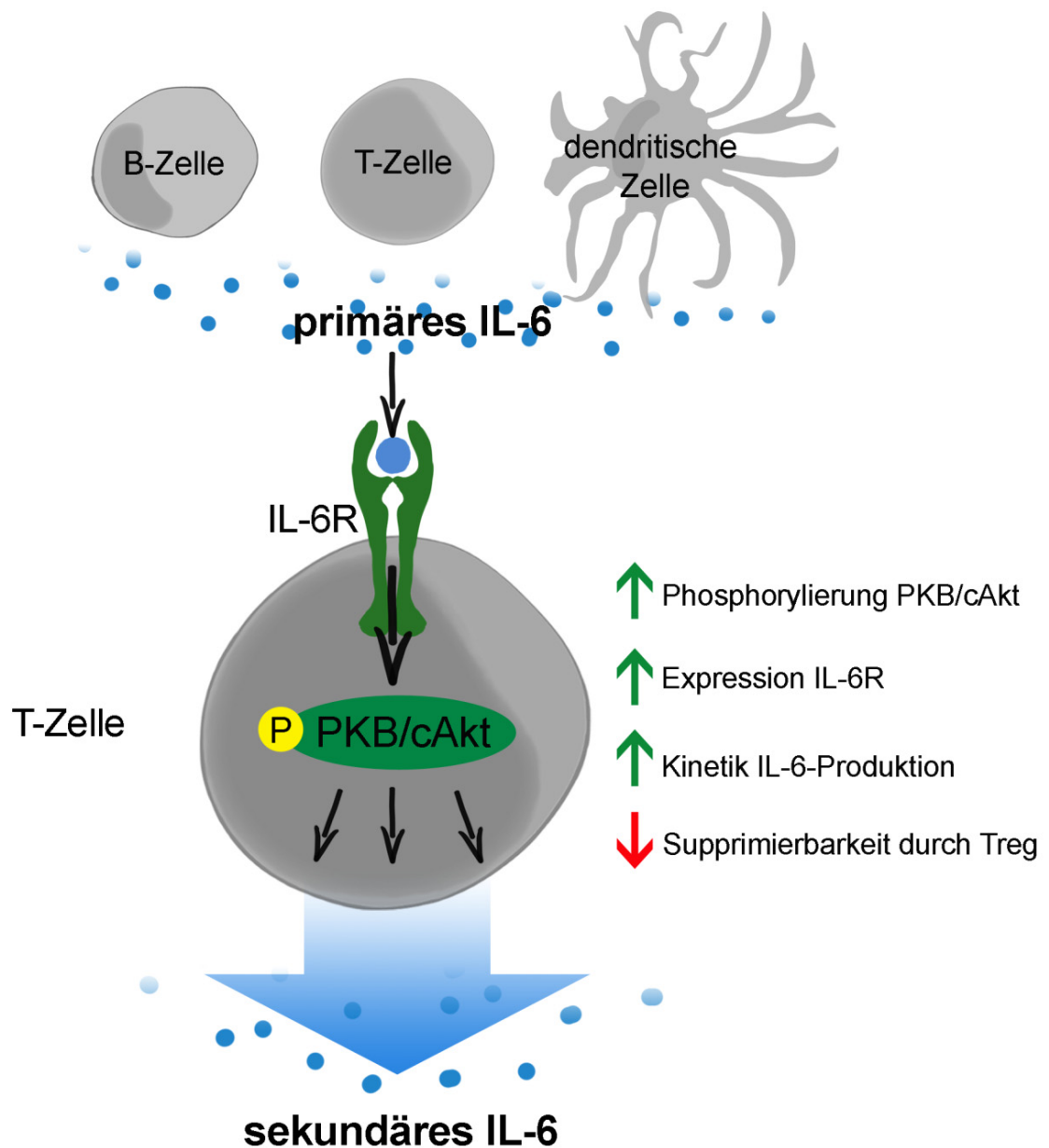


Abbildung 4.1: Postulierter Wirkmechanismus von IL-6 auf T-Effektorzellen

Die schematische Darstellung zeigt den potentiellen Wirkmechanismus von IL-6. Einmal sekretiert führt IL-6 zur Phosphorylierung von PKB/c-Akt, das direkt zur Insensitivität gegenüber der Treg-vermittelten Suppression beiträgt. Zudem kommt es zur Hochregulation des IL-6R und zur beschleunigten IL-6-Synthese.

Interessanterweise sind diese Auswirkungen von IL-6 auf T-Effektorzellen gesunder Spender nur transient nachweisbar, während MS-T-Effektorzellen langanhaltend auf die Wirkung von IL-6 anzusprechen scheinen. Die beschleunigte IL-6-Synthese und damit die anhaltende Wirkung in MS-Patienten könnte durch eine Störung in einem der zahlreichen Mechanismen zur Negativregulation von IL-6 begründet sein [45,148].

Ein weiterer interessanter Aspekt der IL-6-vermittelten Treg-Resistenz wird deutlich, sobald man die Mechanismen der immunregulatorischen Zytokine TGF- β und IL-10 mit in die Überlegungen einbezieht. Treg inhibieren die Aktivierung von T-Effektorzellen zellkontaktabhängig, induzieren aber gleichzeitig über TGF- β sekundäre Treg [25,120]. Dieser Mechanismus wird als infektiöse Toleranz bezeichnet und kann in ähnlicher Weise auch für IL-6 postuliert werden – nur mit gegenteiligem Resultat. Es konnte gezeigt werden, dass die bloße Anwesenheit von IL-6 die Induktion von neuem IL-6 bewirkt, das wiederum ausreicht, um weitere T-Effektorzellen resistent gegen eine Treg-vermittelte Suppression zu machen. In Anlehnung an die infektiöse Toleranz wird dieser Mechanismus hier als „übertragene Resistenz“ bezeichnet (Abb. 4.2).

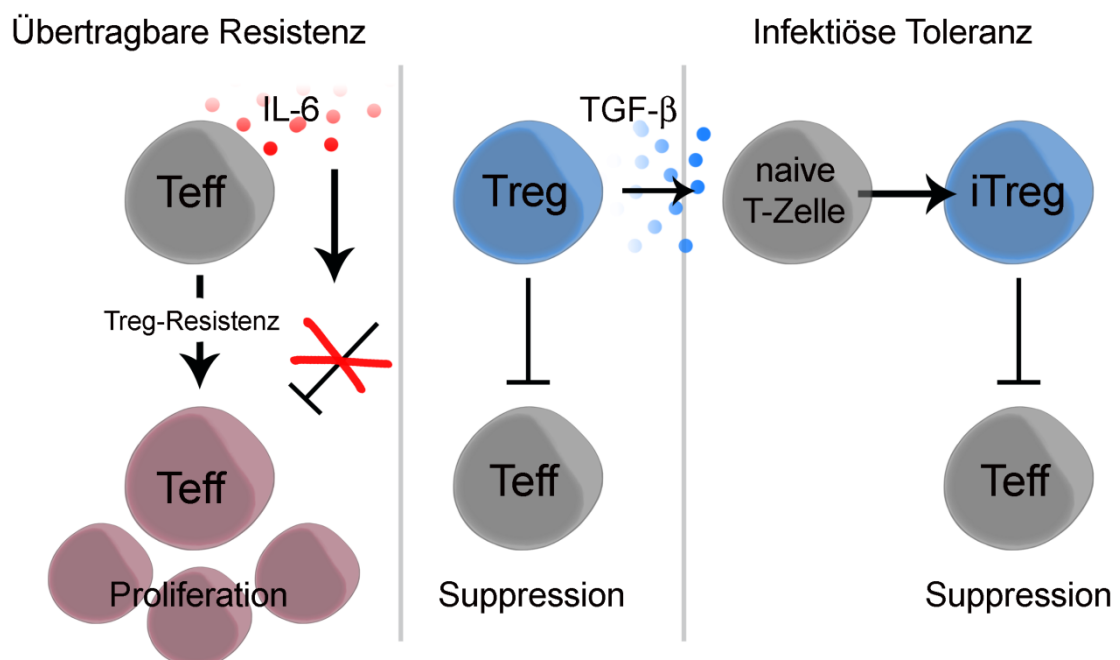


Abbildung 4.2: Infektiöse Toleranz versus übertragene Resistenz

Die schematische Darstellung zeigt den Einfluss immunmodulierender Zytokine auf die Supprimierbarkeit von T-Effektorzellen. Die Anwesenheit von TGF- β führt in naiven T-Zellen zur Differenzierung in Treg. Das proinflammatorische Zytokin IL-6 hingegen führt in T-Effektorzellen zur erhöhten PKB/c-Akt-Phosphorylierung und beschleunigten IL-6-Synthese, weitere T-Effektorzellen werden ebenfalls resistent gegenüber der Treg-vermittelten Suppression. Ein Mechanismus, der hier als „übertragene Resistenz“ bezeichnet wird.

Das Modell der übertragenen Resistenz erweitert die Entstehung einer Autoimmunerkrankung um die Tatsache, dass die Präsenz von IL-6 während der Aktivierung autoreaktiver T-Effektorzellen die Kontrolle durch Treg

behindert. Die gleichzeitige Induktion von sekundärem IL-6 durch umliegende Zellen führt zur Erhaltung der Dysregulation, so dass eine autoimmune T-Zellantwort entstehen kann. Unterstützt wird dieses Modell durch die Tatsache, dass in MS-Patienten eine relative Verschiebung von naiven zu T-Effektorgedächtniszellen nachweisbar ist. Ein ähnlicher Mechanismus wurde kürzlich für Patienten mit rheumatoider Arthritis von Murakami et al. vermutet [149]. Sie postulierten, dass die Entstehung gewebsspezifischer Autoimmunerkrankung aus der Anhäufung aktivierter antigenunspezifischer CD4⁺ T-Effektorzellen resultiert. Ihrer Ansicht nach sind vier Vorkommnisse ausschlaggebend für den chronischen Krankheitsverlauf:

1. die antigenunabhängige Aktivierung von CD4⁺ T-Zellen,
2. die Akkumulation von T-Gedächtniszellen,
3. die erhöhte Sensitivität gegenüber Zytokinen im Zielgewebe und
4. die Aktivierung des IL-6-Signalweges.

Diese Hypothese stimmt mit den Beobachtungen der vorliegenden Arbeit überein. Es konnte gezeigt werden, dass T-Effektorzellen aus MS-Patienten insensitiv gegenüber der Treg-vermittelten Suppression sind. Diese Unempfindlichkeit wird durch eine beschleunigte IL-6-Produktion hervorgerufen und korreliert mit einer erhöhten Anzahl an differenzierten CD4⁺ T-Effektorgedächtniszellen im peripheren Blut von MS-Patienten.

Es stellte sich somit die Frage nach der primären IL-6-Quelle. Keine Population innerhalb der PBMC von MS-Patienten konnte ausgemacht werden die, im Vergleich zu gesunden Spendern, vermehrt IL-6 produziert. Barr et al. zeigten, dass IL-6-produzierende B-Zellen essentiell an der Entstehung einer experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE) beteiligt sind und dass eine Depletion dieser Zellen *in vivo* zu einer Verbesserung der Krankheitssymptomatik führt [114]. Diese Daten scheinen zunächst im Gegensatz zu den hier dargestellten Ergebnissen zu stehen, da die B-Zelldepletion *in vitro* die Treg-vermittelte Suppression nicht beeinflusste. Dennoch ist es durchaus denkbar, dass *in vivo* B-Zellen oder DC eine primäre Quelle von IL-6 sind [114,150,151], die im Organismus durch eine kontinuierliche Produktion von IL-6 für eine Aufrechterhaltung der Treg-Resistenz von T-Effektorzellen sorgen.

Für eine Vielzahl von Autoimmunerkrankungen ist mit einer überschießenden IL-6-Produktion assoziiert. Betrachtet man die Wiederherstellung der Treg-vermittelten Suppression nach Inhibition des IL-6-Signalweges, liegt die Verwendung IL-6-blockierender Agenzien zur Therapie von Autoimmunerkrankungen nahe. Interessanterweise wird Tocilizumab²⁴ bereits erfolgreich in der Therapie von Patienten mit rheumatoider Arthritis in klinischen Studien eingesetzt [152,153]. Zudem erzielten Treg-orientierte Behandlungsstrategien in MS-Patienten zwar erhöhte Treg-Frequenzen aber eine nur geringe Wirksamkeit [154,155]. Da die frühe IL-6-Synthese trotz funktioneller Treg zur Treg-Resistenz in T-Effektorzellen führt, kann vermutet werden, dass eine Kombinationstherapie aus kurzzeitiger IL-6-Blockade und gleichzeitiger Treg-Aktivierung den Therapieerfolg deutlich verbessern könnte. Moderne Therapeutika zur Behandlung schwerer Autoimmunerkrankungen sind in der Regel biologische Arzneimittel, die hochspezifisch einzelne Zytokine und Signalwege blockieren. Diese Therapeutika können nicht effizient präklinisch in der Maus getestet werden, da sie meist epitopspezifisch sind nicht an den murinen Liganden binden. Als Beispiel sind hier die monoklonalen mAk gegen TNF- α (Humira) und den IL-6R (Tocilizumab) zu nennen. Humanisierte Mausmodelle könnten die Lücke zwischen Untersuchungen *in vitro* und klinischer Testung schließen.

Der adoptive Transfer humaner PBMC in immundefiziente Mäuse führt zur Induktion einer Graft-versus-Host Disease (GvHD) [86]. Diese GvHD ist eine T-Zell-vermittelte Immunreaktion, die durch humane T-Effektorzellen *in vivo* ausgelöst wird. Die polyklonale, CD4-vermittelte Aktivierung von Treg verhindert die GvHD [86]. Somit ist das Modell geeignet, um die Regulation von humanen T-Effektorzellen *in vivo* zu untersuchen. Der adoptive Transfer von peripheren Immunzellen aus MS-Patienten in immundefiziente Mäuse führte zur Infiltration humaner T-Effektorzellen in diverse Organe und letztlich zur Ausbildung einer letalen GvHD. Aufgrund der *in vitro* beobachteten Treg-Resistenz war es nicht erstaunlich, dass eine CD4-vermittelte Treg-Aktivierung die Induktion der GvHD nicht verhindern konnte. Nach dem Transfer von MS-Immunzellen konnte der Treg-Aktivator gp120 den Verlauf der GvHD lediglich

²⁴ Humanisierter, monoklonaler Antikörper gegen den IL-6R, der unter dem Namen Tocilizumab in der Therapie von rheumatoiden Arthritis und systemischen juvenilen idiopathischen Arthritispatienten klinisch getestet wird.

verzögern, aber nicht verhindern. Dass die Treg-Resistenz der MS-T-Effektorzellen auch in der humanisierten Maus von IL-6 abhängig ist, zeigte die Gabe eines blockierenden mAk gegen den IL-6R. Die einmalige Tocilizumab-Gabe stellte *in vivo* die Treg-vermittelte Suppression wieder her, schwächte den Verlauf der GvHD deutlich ab und sicherte letztlich das Überleben der Tiere.

Die Ergebnisse zeigen, dass humanisierte Mäuse genutzt werden können, um T-Zell-vermittelte Immunantworten von Patienten und deren Modulation durch relevante Therapeutika *in vivo* präklinisch zu untersuchen. Kürzlich gelang es uns in diesem Transfermodell die Reaktivität von T-Effektorzellen aus MS-Patienten nach IFN- β -Therapie zu untersuchen. Seit den 90er Jahren gilt die Therapie als Basisbehandlung bei MS. Langzeitstudien demonstrierten deren Wirksamkeit, doch der genaue Wirkmechanismus ist bislang ungeklärt [156-158]. In Suppressionsassays sprachen T-Effektorzellen aus IFN- β -behandelten MS-Patienten wesentlich besser auf die Treg-vermittelte Suppression an als T-Effektorzellen unbehandelter MS-Patienten (Abb. 4.3 A). Dies spiegelte sich auch *in vivo* wider: wurden immundefizienten Mäusen PBMC aus IFN- β -behandelten Patienten zusammen mit aktivierten Treg transferiert, war im Vergleich zu PBMC aus unbehandelten Patienten ein milderer Verlauf der GvHD zu beobachten und ein Viertel der Tiere überlebte die GvHD (Abb. 4.3). Diese Daten lassen vermuten, dass IFN- β die Treg-Sensitivität von T-Effektorzellen in MS-Patienten zumindest teilweise wiederherstellen kann.

Die Verwendung adulter Mäuse und der Transfer kleinerer PBMC-Zahlen verzögert die GvHD-Induktion oder verhindert sie gänzlich [88]. Zayoud et al. zeigten, dass nach Transfer humaner PBMC gesunder Spender und anschließender subkutaner Immunisierung mit ZNS-spezifischen Antigenen, MOG-spezifische humane T-Zellantworten in den Tieren induziert werden können [89].

Der adoptive Transfer von humanen Immunzellen in immundefiziente Mäuse erlaubt funktionelle Analysen von T-Lymphozyten aus Patienten *in vivo*. Allerdings können die Ursachen, die zur Entstehung einer MS führen, in diesem Transfermodell nicht bestimmt werden.

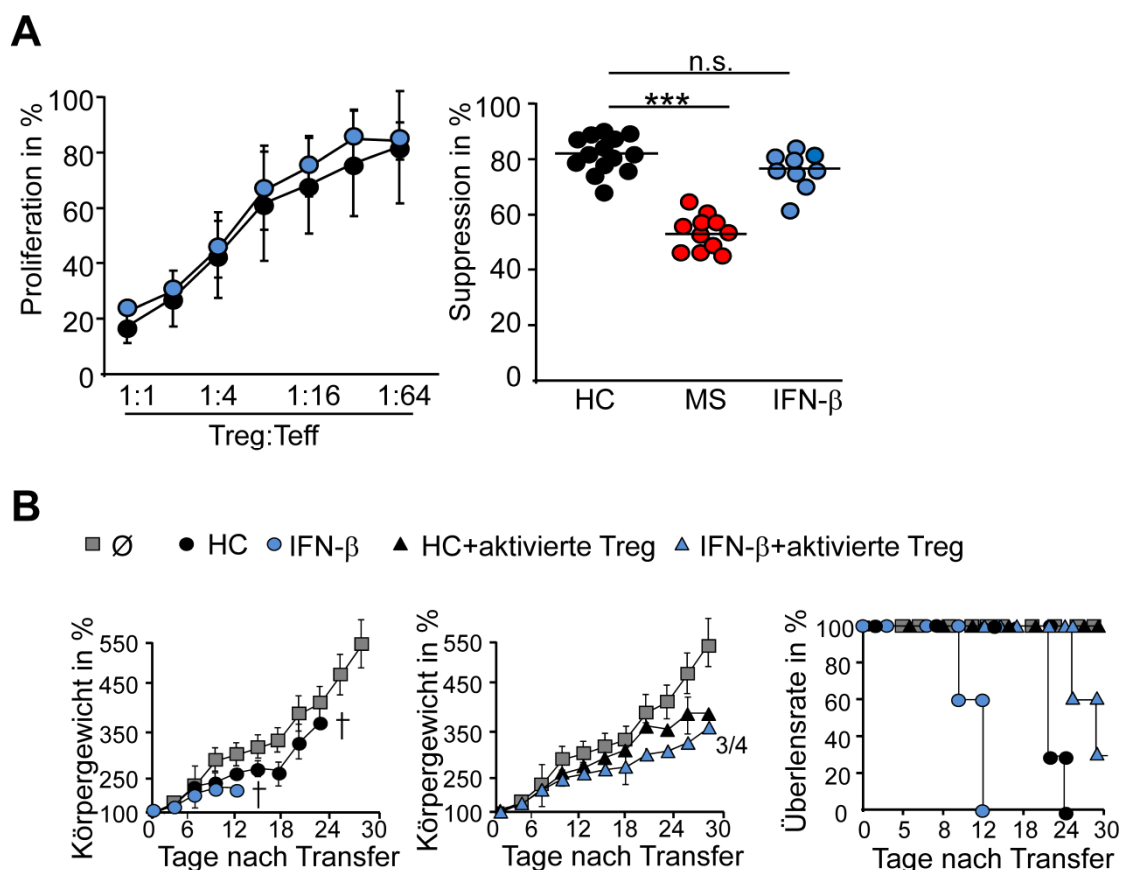


Abbildung 4.3: T-Effektorzellen von IFN- β -behandelten MS-Patienten sind sensitiver gegenüber der Treg-vermittelten Suppression als T-Effektorzellen von unbehandelten MS-Patienten

A) 10^5 Treg-depletierte PBMC gesunder Spender (schwarz), von IFN- β -behandelten (blau) oder unbehandelten MS-Patienten (rot) wurden zusammen mit Treg gesunder Spender (im angegebenen Verhältnis) mit anti-CD3 mAk stimuliert. Nach drei Tagen wurde die Proliferation über den Einbau von ^3H -Tdr bestimmt. Links: dargestellt ist relative Proliferation aus 11 unabhängigen IFN- β -behandelten MS-Patienten (blau) und 11 gesunden Spendern (schwarz). Die relative Proliferation der T-Effektorzellen wurde auf die Proliferation der T-Effektorzellen in Abwesenheit von Treg normiert. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM. Rechts: Zusammenfassung der relativen Proliferation von 11 unabhängigen Experimenten, Immunzellen aus 11 IFN- β -behandelten MS-Patienten (blau), aus 11 gesunden Spendern (schwarz) und aus 11 unbehandelten MS-Patienten (rot). B) Treg-depletierte PBMC gesunder Spender bzw. von IFN- β -behandelten MS-Patienten wurden zusammen mit Treg gesunder Spender in An/Abwesenheit von 5 μg /Maus gp120 intraperitoneal in neugeborene Rag2 $^{-/-}$ $\gamma\text{c}^{-/-}$ -Mäuse injiziert. Die prozentuale Gewichtszunahme (links) und das Überleben der Tiere (rechts) wurden in regelmäßigen Abständen über 30 Tage bestimmt. Unbehandelte Mäuse dienten als Kontrolle. Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte von vier Mäusen pro Versuchsgruppe inklusive Standardabweichung. Ein repräsentatives Ergebnis aus vier unabhängigen Versuchen ist gezeigt.

Die Erweiterung des adoptiven Transfermodells ist die „vollhumanisierte Maus“, in der nach der Injektion humaner CD34 $^+$ Blutstammzellen (HSC) ein nahezu vollständiges humanes Immunsystem entsteht [72,85,91,93]. In dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass die Immunisierung vollhumanisierter

Mäuse mit MOG-Protein zur Induktion einer MS-ähnlichen Erkrankung führt, die durch humane T-Effektorzellen ausgelöst wurde. Anders als Mausmodelle, die eine transgene Expression humaner MHC-Moleküle verwendeten [159,160], bietet das etablierte Modell erstmalig die Möglichkeit die Entstehung und Modulation humaner, pathogener T-Zellantworten *in vivo* zu analysieren.

Die Analyse der T-Zellreaktivität ergab, dass die reisolierten T-Effektorzellen aus kranken Mäusen ähnlich insensitiv gegenüber der Treg-vermittelten Suppression sind wie T-Effektorzellen aus MS-Patienten. Diese Treg-Resistenz ist auch in vollhumanisierten Mäusen mit einer MS-ähnlichen Erkrankung auf IL-6 zurückzuführen. Die Wirksamkeit einer IL-6R-Blockade im vollhumanisierten Krankheitsmodell muss in zukünftigen Versuchen erst noch untersucht werden.

Es wird postuliert, dass die Produktion MOG-spezifischer Antikörper eine wesentliche Rolle zur Pathogenese von MS beiträgt [161,162]. Untersuchungen des Serums zeigten allerdings, dass keine MOG-spezifischen Antikörper im peripheren Blut kranker Mäuse nachweisbar waren. Das Fehlen der Antikörperproduktion kann darin begründet sein, dass in vollhumanisierten Mäusen eine verminderte Affinitätsreifung der B-Zellen stattfindet [90]. Die Selektion humaner T-Zellen findet im murinen Thymus an murinen MHC-Molekülen statt. Die selektionierten T-Zellen können in der Peripherie die MHC-Moleküle auf humanen B-Zellen nur unzureichend binden und eine inadäquate T-B-Kooperation wäre die Folge [90]. Dieses Problem könnte durch Einkreuzung humaner MHC-Klasse II-Moleküle in immundefiziente Mäuse gelöst werden. Erste Veröffentlichungen zeigen bereits, dass Mäuse die transgen für humanes HLA-DR4 sind, eine verbesserte CD4⁺ T-Zellentwicklung haben und nach Immunisierung humanspezifisches IgG produzieren [163]. Zudem bietet dieses Modell die Möglichkeit durch Einkreuzen humaner potentieller MS-assoziiertes MHC-Moleküle [164-166] deren Einfluss auf die Krankheitsentstehung an einem humanen Immunsystem *in vivo* zu untersuchen.

Die hier vorgestellten humanisierten Mausmodelle eignen sich somit zur Testung der Wirksamkeit neuer Therapeutika und könnten daher zukünftige Untersuchungen zur Pathogenese und Medikation von MS bedeutend verbessern.

5. Zusammenfassung

Die Multiple Sklerose (MS) ist eine Autoimmunkrankheit des zentralen Nervensystems, bei der sich autoreaktive T-Effektorzellen der Kontrolle durch regulatorische T-Zellen (Treg) entziehen. Innerhalb dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die T-Effektorzellen von MS-Patienten insensitiv gegenüber der Suppression durch Treg sind. Hervorgerufen wird diese Treg-Resistenz durch Interleukin-6 (IL-6). Die Inhibition des IL-6-Signalweges stellt die Treg-vermittelte Suppression der T-Effektorzellen wieder her. Es zeigte sich, dass die Bildung von IL-6 und die Expression des IL-6-Rezeptors in MS-Patienten in einer positiven Rückkopplungsschleife von IL-6 selbst induziert wird.

Moderne Therapeutika zur Behandlung von Autoimmunerkrankungen sind häufig monoklonale Antikörper zur Blockade von inflammatorischen Zytokinen. Diese Therapeutika binden spezifisch an humane Liganden und können nicht in etablierten Mausmodellen getestet werden. Zur Analyse von humanen Immunantworten *in vivo* und deren Modulation durch humanspezifische Therapeutika wurden humanisierte Mausmodelle etabliert. Der adoptive Transfer humaner Immunzellen in immundefiziente Mäuse erlaubte die Untersuchung von T-Lymphozyten, die aus dem Blut von MS-Patienten isoliert wurden. Es zeigte sich, dass Treg-resistente T-Effektorzellen aus den MS-Patienten in den Tieren eine letale Graft-versus-Host-Erkrankung auslösten, die nicht durch aktivierte Treg therapiert werden konnte. Erst eine Behandlung mit dem humanspezifischen anti-IL-6-Antikörper Tocilizumab *in vivo* konnte die Erkrankung der Tiere deutlich abmildern.

Im zweiten Modell wurden immundefiziente Mäuse mit humanen CD34⁺ Blutstammzellen immunologisch rekonstituiert. Diese Tiere entwickelten ein nahezu vollständig humanes Immunsystem. Durch Immunisierung mit dem murinen Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein konnte in den humanisierten Mäusen eine MS-ähnliche Autoimmunität ausgelöst werden. Die Neuroinflammation wurde durch humane T- und B-Zellen vermittelt, korrelierte mit erhöhter IL-17-Produktion und führte zu einer IL-6-abhängigen Treg-Resistenz der T-Effektorzellen. Somit eignen sich die etablierten Modelle um zukünftig die Wirksamkeit neuer Therapeutika zur Behandlung der MS präklinisch zu testen.

6. Abkürzungsverzeichnis

Ag	Antigen
Ak	Antikörper
APC	antigenpräsentierende Zellen
BMDC	Bone Marrow derived Dendritic Cells
CD	Cluster of Differentiation (standardisierte Nomenklatur für Zelloberflächenstrukturen)
cDNA	complementary DNA
CFDASE	Carboxyfluoreszein Diacetat Succinimidyl Ester
DAB	Diaminobenzidin
DC	dendritische Zellen
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxynukleosid-5'-Triphosphat
EAE	experimentelle allergische Enzephalomyelitis
EDTA	Disodium Ethylene Diamin Tetraacetic Acid
EF-1 α	Elongationsfaktor-1alpha
FACS	fluoreszenz activated cell sorter
FCS	fötales Kälberserum
FITC	Fluoreszein 5-isothiozyanat
FoxP3	forkhead box protein 3
g	Erdbeschleunigung
^3H -Tdr	Tritium-markiertes Thymidin
HLA	human leukocyte antigen
hr	human rekombinant
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
iTreg	induzierte regulatorische T-Zelle

KM	Knochenmark
LK	Lymphknoten
LPS	Lipopolysaccharide
mAK	monoklonaler Antikörper
MACS	magnetic activated cell sorter
MEM	minimal essential medium
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
min.	Minute
mRNA	messenger RNA
MS	Multiple Sklerose
nTreg	natürlich vorkommende regulatorische T-Zelle
PB	peripheres Blut
PBMC	periphere mononukleare Blutzellen
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PE	Phycoerytrin
qRT-PCR	quantitative realtime PCR
RNA	Ribonukleinsäure
RT	reverse Transkription
Sec.	Sekunde
TGF- β	Transforming Growth Factor beta
Th	T-Helferzelle
TNF- α	Tumor Nekrose Faktor-alpha
Treg	regulatorische T-Zellen
U	Unit (internationale Einheit)

7. Referenzen

1. Beutler B (2004) Innate immunity: an overview. *Mol Immunol* 40: 845-859.
2. Travis J (2009) Origins. On the origin of the immune system. *Science* 324: 580-582.
3. Fujita T (2002) Evolution of the lectin-complement pathway and its role in innate immunity. *Nat Rev Immunol* 2: 346-353.
4. Medzhitov R, Janeway CA, Jr. (1998) Innate immune recognition and control of adaptive immune responses. *Semin Immunol* 10: 351-353.
5. Boehm T (2012) Evolution of vertebrate immunity. *Curr Biol* 22: R722-732.
6. Jung D, Alt FW (2004) Unraveling V(D)J recombination; insights into gene regulation. *Cell* 116: 299-311.
7. Arstila TP, Casrouge A, Baron V, Even J, Kanellopoulos J, et al. (1999) A direct estimate of the human alphabeta T cell receptor diversity. *Science* 286: 958-961.
8. Mueller DL (2010) Mechanisms maintaining peripheral tolerance. *Nat Immunol* 11: 21-27.
9. Thomas R (2010) The balancing act of autoimmunity: central and peripheral tolerance versus infection control. *Int Rev Immunol* 29: 211-233.
10. Kyewski B, Klein L (2006) A central role for central tolerance. *Annu Rev Immunol* 24: 571-606.
11. Kyewski B, Hunig T (1992) Taking the thymus to pieces. *Immunol Today* 13: 288-290.
12. von Boehmer H (1992) T cell development and selection in the thymus. *Bone Marrow Transplant* 9 Suppl 1: 46-48.
13. von Boehmer H (1991) Positive and negative selection of the alpha beta T-cell repertoire in vivo. *Curr Opin Immunol* 3: 210-215.
14. Sakaguchi S, Miyara M, Costantino CM, Hafler DA (2010) FOXP3+ regulatory T cells in the human immune system. *Nat Rev Immunol* 10: 490-500.
15. Shevach EM (2009) Mechanisms of foxp3+ T regulatory cell-mediated suppression. *Immunity* 30: 636-645.
16. Ohkura N, Kitagawa Y, Sakaguchi S (2013) Development and Maintenance of Regulatory T cells. *Immunity* 38: 414-423.

17. Allan SE, Crome SQ, Crellin NK, Passerini L, Steiner TS, et al. (2007) Activation-induced FOXP3 in human T effector cells does not suppress proliferation or cytokine production. *Int Immunol* 19: 345-354.
18. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M (2011) Pillars article: immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J. Immunol.* 1995. *J Immunol* 186: 3808-3821.
19. Long SA, Buckner JH (2011) CD4+FOXP3+ T regulatory cells in human autoimmunity: more than a numbers game. *J Immunol* 187: 2061-2066.
20. Miyara M, Gorochoy G, Ehrenstein M, Musset L, Sakaguchi S, et al. (2011) Human FoxP3+ regulatory T cells in systemic autoimmune diseases. *AutoimmunRev* 10: 744-755.
21. Becker C, Kubach J, Wijdenes J, Knop J, Jonuleit H (2007) CD4-mediated functional activation of human CD4+CD25+ regulatory T cells. *Eur J Immunol* 37: 1217-1223.
22. Jonuleit H, Schmitt E, Stassen M, Tuettenberg A, Knop J, et al. (2001) Identification and functional characterization of human CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties isolated from peripheral blood. *J Exp Med* 193: 1285-1294.
23. Bopp T, Becker C, Klein M, Klein-Hessling S, Palmetshofer A, et al. (2007) Cyclic adenosine monophosphate is a key component of regulatory T cell-mediated suppression. *J Exp Med* 204: 1303-1310.
24. Roncarolo MG, Gregori S, Battaglia M, Bacchetta R, Fleischhauer K, et al. (2006) Interleukin-10-secreting type 1 regulatory T cells in rodents and humans. *Immunol Rev* 212: 28-50.
25. Jonuleit H, Schmitt E, Kakirman H, Stassen M, Knop J, et al. (2002) Infectious tolerance: human CD25(+) regulatory T cells convey suppressor activity to conventional CD4(+) T helper cells. *J ExpMed* 196: 255-260.
26. Weiner HL, da Cunha AP, Quintana F, Wu H (2011) Oral tolerance. *Immunol Rev* 241: 241-259.
27. Jonuleit H, Schmitt E, Schuler G, Knop J, Enk AH (2000) Induction of interleukin 10-producing, nonproliferating CD4(+) T cells with regulatory

- properties by repetitive stimulation with allogeneic immature human dendritic cells. *J Exp Med* 192: 1213-1222.
28. Thorsby E, Ronningen KS (1992) Role of HLA genes in predisposition to develop insulin-dependent diabetes mellitus. *Ann Med* 24: 523-531.
 29. Denham JM, Hill ID (2013) Celiac disease and autoimmunity: review and controversies. *Curr Allergy Asthma Rep* 13: 347-353.
 30. Getts MT, Miller SD (2010) 99th Dahlem conference on infection, inflammation and chronic inflammatory disorders: triggering of autoimmune diseases by infections. *Clin Exp Immunol* 160: 15-21.
 31. Costenbader KH, Gay S, Alarcon-Riquelme ME, Iaccarino L, Doria A (2012) Genes, epigenetic regulation and environmental factors: which is the most relevant in developing autoimmune diseases? *Autoimmun Rev* 11: 604-609.
 32. Swaak AJ, van Rooyen A, Nieuwenhuis E, Aarden LA (1988) Interleukin-6 (IL-6) in synovial fluid and serum of patients with rheumatic diseases. *ScandJ Rheumatol* 17: 469-474.
 33. Galassetti PR, Iwanaga K, Pontello AM, Zaldivar FP, Flores RL, et al. (2006) Effect of prior hyperglycemia on IL-6 responses to exercise in children with type 1 diabetes. *AmJ Physiol EndocrinolMetab* 290: E833-E839.
 34. Mudter J, Neurath MF (2007) IL-6 signaling in inflammatory bowel disease: pathophysiological role and clinical relevance. *InflammBowelDis* 13: 1016-1023.
 35. Neurath MF, Finotto S (2011) IL-6 signaling in autoimmunity, chronic inflammation and inflammation-associated cancer. *Cytokine Growth Factor Rev* 22: 83-89.
 36. Hirano T (1998) Interleukin 6 and its receptor: ten years later. *IntRevImmunol* 16: 249-284.
 37. Gabay C, Kushner I (1999) Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *NEnglJ Med* 340: 448-454.
 38. Hirano T, Akira S, Taga T, Kishimoto T (1990) Biological and clinical aspects of interleukin 6. *Immunol Today* 11: 443-449.

39. Akira S, Hirano T, Taga T, Kishimoto T (1990) Biology of multifunctional cytokines: IL 6 and related molecules (IL 1 and TNF). *FASEB J* 4: 2860-2867.
40. Kimura A, Kishimoto T (2010) IL-6: regulator of Treg/Th17 balance. *Eur J Immunol* 40: 1830-1835.
41. Bettelli E, Carrier Y, Gao W, Korn T, Strom TB, et al. (2006) Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* 441: 235-238.
42. Mangan PR, Harrington LE, O'Quinn DB, Helms WS, Bullard DC, et al. (2006) Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage. *Nature* 441: 231-234.
43. Veldhoen M, Hocking RJ, Atkins CJ, Locksley RM, Stockinger B (2006) TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity* 24: 179-189.
44. Vanden Berghe W, Vermeulen L, De Wilde G, De Bosscher K, Boone E, et al. (2000) Signal transduction by tumor necrosis factor and gene regulation of the inflammatory cytokine interleukin-6. *BiochemPharmacol* 60: 1185-1195.
45. Heinrich PC, Behrmann I, Haan S, Hermanns HM, Muller-Newen G, et al. (2003) Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *BiochemJ* 374: 1-20.
46. Rose-John S (2012) IL-6 trans-signaling via the soluble IL-6 receptor: importance for the pro-inflammatory activities of IL-6. *Int J Biol Sci* 8: 1237-1247.
47. Rose-John S, Neurath MF (2004) IL-6 trans-signaling: the heat is on. *Immunity* 20: 2-4.
48. Rose-John S, Scheller J, Elson G, Jones SA (2006) Interleukin-6 biology is coordinated by membrane-bound and soluble receptors: role in inflammation and cancer. *J Leukoc Biol* 80: 227-236.
49. Mullberg J, Schooltink H, Stoyan T, Gunther M, Graeve L, et al. (1993) The soluble interleukin-6 receptor is generated by shedding. *Eur J Immunol* 23: 473-480.
50. Horiuchi S, Koyanagi Y, Zhou Y, Miyamoto H, Tanaka Y, et al. (1994) Soluble interleukin-6 receptors released from T cell or

- granulocyte/macrophage cell lines and human peripheral blood mononuclear cells are generated through an alternative splicing mechanism. *Eur J Immunol* 24: 1945-1948.
51. Jones GW, McLoughlin RM, Hammond VJ, Parker CR, Williams JD, et al. (2010) Loss of CD4+ T cell IL-6R expression during inflammation underlines a role for IL-6 trans signaling in the local maintenance of Th17 cells. *J Immunol* 184: 2130-2139.
 52. Atreya R, Mudter J, Finotto S, Mullberg J, Jostock T, et al. (2000) Blockade of interleukin 6 trans signaling suppresses T-cell resistance against apoptosis in chronic intestinal inflammation: evidence in crohn disease and experimental colitis in vivo. *Nat Med* 6: 583-588.
 53. Zozulya AL, Wiendl H (2008) The role of regulatory T cells in multiple sclerosis. *NatClinPractNeurol* 4: 384-398.
 54. Vigiotta V, Baecher-Allan C, Weiner HL, Hafler DA (2004) Loss of functional suppression by CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with multiple sclerosis. *J ExpMed* 199: 971-979.
 55. Baranzini SE, Elfstrom C, Chang SY, Butunoi C, Murray R, et al. (2000) Transcriptional analysis of multiple sclerosis brain lesions reveals a complex pattern of cytokine expression. *J Immunol* 165: 6576-6582.
 56. Tompkins SM, Miller SD (2002) An array of possibilities for multiple sclerosis. *Nat Med* 8: 451-453.
 57. Rae-Grant AD, Eckert NJ, Bartz S, Reed JF (1999) Sensory symptoms of multiple sclerosis: a hidden reservoir of morbidity. *Mult Scler* 5: 179-183.
 58. Polman CH, Reingold SC, Banwell B, Clanet M, Cohen JA, et al. (2011) Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the McDonald criteria. *AnnNeurol* 69: 292-302.
 59. Peterson JW, Bo L, Mork S, Chang A, Trapp BD (2001) Transected neurites, apoptotic neurons, and reduced inflammation in cortical multiple sclerosis lesions. *Ann Neurol* 50: 389-400.
 60. Hemmer B, Archelos JJ, Hartung HP (2002) New concepts in the immunopathogenesis of multiple sclerosis. *Nat Rev Neurosci* 3: 291-301.
 61. Kremenutzky M, Cottrell D, Rice G, Hader W, Baskerville J, et al. (1999) The natural history of multiple sclerosis: a geographically based study. 7.

- Progressive-relapsing and relapsing-progressive multiple sclerosis: a re-evaluation. *Brain* 122 (Pt 10): 1941-1950.
62. Pollinger B, Krishnamoorthy G, Berer K, Lassmann H, Bosl MR, et al. (2009) Spontaneous relapsing-remitting EAE in the SJL/J mouse: MOG-reactive transgenic T cells recruit endogenous MOG-specific B cells. *J Exp Med* 206: 1303-1316.
 63. Mendel I, Kerlero de Rosbo N, Ben-Nun A (1995) A myelin oligodendrocyte glycoprotein peptide induces typical chronic experimental autoimmune encephalomyelitis in H-2b mice: fine specificity and T cell receptor V beta expression of encephalitogenic T cells. *Eur J Immunol* 25: 1951-1959.
 64. Zamvil SS, Mitchell DJ, Moore AC, Kitamura K, Steinman L, et al. (1986) T-cell epitope of the autoantigen myelin basic protein that induces encephalomyelitis. *Nature* 324: 258-260.
 65. Croxford AL, Kurschus FC, Waisman A (2011) Mouse models for multiple sclerosis: historical facts and future implications. *Biochim Biophys Acta* 1812: 177-183.
 66. Baron JL, Madri JA, Ruddle NH, Hashim G, Janeway CA, Jr. (1993) Surface expression of alpha 4 integrin by CD4 T cells is required for their entry into brain parenchyma. *J Exp Med* 177: 57-68.
 67. Coisne C, Mao W, Engelhardt B (2009) Cutting edge: Natalizumab blocks adhesion but not initial contact of human T cells to the blood-brain barrier in vivo in an animal model of multiple sclerosis. *J Immunol* 182: 5909-5913.
 68. Wekerle H, Flugel A, Fugger L, Schett G, Serreze D (2012) Autoimmunity's next top models. *Nat Med* 18: 66-70.
 69. Roep BO, Buckner J, Sawcer S, Toes R, Zipp F (2012) The problems and promises of research into human immunology and autoimmune disease. *Nat Med* 18: 48-53.
 70. Wekerle H, Krishnamoorthy G (2012) Brain autoimmunity: the CD8 question(s). *Immunity* 37: 8-10.
 71. Friese MA, Fugger L (2005) Autoreactive CD8+ T cells in multiple sclerosis: a new target for therapy? *Brain* 128: 1747-1763.

72. Brehm MA, Shultz LD, Greiner DL (2010) Humanized mouse models to study human diseases. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 17: 120-125.
73. Bosma GC, Custer RP, Bosma MJ (1983) A severe combined immunodeficiency mutation in the mouse. *Nature* 301: 527-530.
74. Kirchgessner CU, Patil CK, Evans JW, Cuomo CA, Fried LM, et al. (1995) DNA-dependent kinase (p350) as a candidate gene for the murine SCID defect. *Science* 267: 1178-1183.
75. Miller RD, Hogg J, Ozaki JH, Gell D, Jackson SP, et al. (1995) Gene for the catalytic subunit of mouse DNA-dependent protein kinase maps to the scid locus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 10792-10795.
76. Greiner DL, Hesselton RA, Shultz LD (1998) SCID mouse models of human stem cell engraftment. *Stem Cells* 16: 166-177.
77. Shultz LD, Schweitzer PA, Christianson SW, Gott B, Schweitzer IB, et al. (1995) Multiple defects in innate and adaptive immunologic function in NOD/LtSz-scid mice. *J Immunol* 154: 180-191.
78. Lowry PA, Shultz LD, Greiner DL, Hesselton RM, Kittler EL, et al. (1996) Improved engraftment of human cord blood stem cells in NOD/LtSz-scid/scid mice after irradiation or multiple-day injections into unirradiated recipients. *Biol Blood Marrow Transplant* 2: 15-23.
79. DiSanto JP, Muller W, Guy-Grand D, Fischer A, Rajewsky K (1995) Lymphoid development in mice with a targeted deletion of the interleukin 2 receptor gamma chain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 377-381.
80. Sugamura K, Asao H, Kondo M, Tanaka N, Ishii N, et al. (1996) The interleukin-2 receptor gamma chain: its role in the multiple cytokine receptor complexes and T cell development in XSCID. *Annu Rev Immunol* 14: 179-205.
81. Kirberg J, Berns A, von Boehmer H (1997) Peripheral T cell survival requires continual ligation of the T cell receptor to major histocompatibility complex-encoded molecules. *J Exp Med* 186: 1269-1275.
82. Ishikawa F, Yasukawa M, Lyons B, Yoshida S, Miyamoto T, et al. (2005) Development of functional human blood and immune systems in

- NOD/SCID/IL2 receptor $\{\gamma\}$ chain(null) mice. *Blood* 106: 1565-1573.
83. Ito M, Hiramatsu H, Kobayashi K, Suzue K, Kawahata M, et al. (2002) NOD/SCID/ γ (c)(null) mouse: an excellent recipient mouse model for engraftment of human cells. *Blood* 100: 3175-3182.
84. Hiramatsu H, Nishikomori R, Heike T, Ito M, Kobayashi K, et al. (2003) Complete reconstitution of human lymphocytes from cord blood CD34+ cells using the NOD/SCID/ γ macnull mice model. *Blood* 102: 873-880.
85. Macchiarini F, Manz MG, Palucka AK, Shultz LD (2005) Humanized mice: are we there yet? *J Exp Med* 202: 1307-1311.
86. Becker C, Taube C, Bopp T, Becker C, Michel K, et al. (2009) Protection from graft-versus-host disease by HIV-1 envelope protein gp120-mediated activation of human CD4+CD25+ regulatory T cells. *Blood* 114: 1263-1269.
87. Pino S, Brehm MA, Covassin-Barberis L, King M, Gott B, et al. (2010) Development of novel major histocompatibility complex class I and class II-deficient NOD-SCID IL2R γ chain knockout mice for modeling human xenogeneic graft-versus-host disease. *Methods Mol Biol* 602: 105-117.
88. Martin H, Reuter S, Dehzad N, Heinz A, Bellinghausen I, et al. (2012) CD4-mediated regulatory T-cell activation inhibits the development of disease in a humanized mouse model of allergic airway disease. *J Allergy Clin Immunol* 129: 521-528, 528 e521-527.
89. Zayoud M, El Malki K, Frauenknecht K, Trinschek B, Kloos L, et al. (2013) Subclinical CNS inflammation as response to a myelin antigen in humanized mice. *J Neuroimmune Pharmacol* 8: 1037-1047.
90. Shultz LD, Brehm MA, Garcia-Martinez JV, Greiner DL (2012) Humanized mice for immune system investigation: progress, promise and challenges. *Nat Rev Immunol* 12: 786-798.
91. Shultz LD, Ishikawa F, Greiner DL (2007) Humanized mice in translational biomedical research. *Nat Rev Immunol* 7: 118-130.
92. Whitfield-Larry F, Young EF, Talmage G, Fudge E, Azam A, et al. (2011) HLA-A2-matched peripheral blood mononuclear cells from type 1 diabetic patients, but not nondiabetic donors, transfer insulinitis to NOD-

- scid/gammac(null)/HLA-A2 transgenic mice concurrent with the expansion of islet-specific CD8⁺ T cells. *Diabetes* 60: 1726-1733.
93. Pearson T, Greiner DL, Shultz LD (2008) Creation of "Humanized" Mice to Study Human Immunity. *Curr Protoc Immunol* CHAPTER: Unit-15 21.
94. Wege AK, Melkus MW, Denton PW, Estes JD, Garcia JV (2008) Functional and phenotypic characterization of the humanized BLT mouse model. *Curr Top Microbiol Immunol* 324: 149-165.
95. Jonuleit H, Schmitt E (2005) Regulatory T-cells in antitumor therapy: isolation and functional testing of CD4⁺CD25⁺ regulatory T-cells. *Methods Mol Med* 109: 285-296.
96. Inaba K, Inaba M, Romani N, Aya H, Deguchi M, et al. (1992) Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J Exp Med* 176: 1693-1702.
97. Jonuleit H, Kuhn U, Muller G, Steinbrink K, Paragnik L, et al. (1997) Pro-inflammatory cytokines and prostaglandins induce maturation of potent immunostimulatory dendritic cells under fetal calf serum-free conditions. *Eur J Immunol* 27: 3135-3142.
98. Josefowicz SZ, Lu LF, Rudensky AY (2012) Regulatory T cells: mechanisms of differentiation and function. *Annu Rev Immunol* 30: 531-564.
99. Baecher-Allan C, Viglietta V, Hafler DA (2004) Human CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *Semin Immunol* 16: 89-98.
100. Venken K, Hellings N, Hensen K, Rummens JL, Medaer R, et al. (2006) Secondary progressive in contrast to relapsing-remitting multiple sclerosis patients show a normal CD4⁺CD25⁺ regulatory T-cell function and FOXP3 expression. *J Neurosci Res* 83: 1432-1446.
101. Haas J, Hug A, Viehover A, Fritzsching B, Falk CS, et al. (2005) Reduced suppressive effect of CD4⁺CD25^{high} regulatory T cells on the T cell immune response against myelin oligodendrocyte glycoprotein in patients with multiple sclerosis. *Eur J Immunol* 35: 3343-3352.
102. Ganguly D, Haak S, Sisirak V, Reizis B (2013) The role of dendritic cells in autoimmunity. *Nat Rev Immunol* 13: 566-577.

103. Yogev N, Frommer F, Lukas D, Kautz-Neu K, Karram K, et al. (2012) Dendritic cells ameliorate autoimmunity in the CNS by controlling the homeostasis of PD-1 receptor(+) regulatory T cells. *Immunity* 37: 264-275.
104. Kabelitz D, Wesch D, Oberg HH (2006) Regulation of regulatory T cells: role of dendritic cells and toll-like receptors. *Crit Rev Immunol* 26: 291-306.
105. Pasare C, Medzhitov R (2003) Toll pathway-dependent blockade of CD4+CD25+ T cell-mediated suppression by dendritic cells. *Science* 299: 1033-1036.
106. Wehrens EJ, Mijnheer G, Duurland CL, Klein M, Meering J, et al. (2011) Functional human regulatory T cells fail to control autoimmune inflammation due to PKB/c-akt hyperactivation in effector cells. *Blood* 118: 3538-3548.
107. Sallusto F, Geginat J, Lanzavecchia A (2004) Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. *Annu Rev Immunol* 22: 745-763.
108. Sakaguchi S, Wing K, Onishi Y, Prieto-Martin P, Yamaguchi T (2009) Regulatory T cells: how do they suppress immune responses? *Int Immunol* 21: 1105-1111.
109. Chung TD, Yu JJ, Kong TA, Spiotto MT, Lin JM (2000) Interleukin-6 activates phosphatidylinositol-3 kinase, which inhibits apoptosis in human prostate cancer cell lines. *Prostate* 42: 1-7.
110. Hideshima T, Nakamura N, Chauhan D, Anderson KC (2001) Biologic sequelae of interleukin-6 induced PI3-K/Akt signaling in multiple myeloma. *Oncogene* 20: 5991-6000.
111. Wohlfert EA, Clark RB (2007) 'Vive la Resistance!'--the PI3K-Akt pathway can determine target sensitivity to regulatory T cell suppression. *Trends Immunol* 28: 154-160.
112. Cantrell D (2002) Protein kinase B (Akt) regulation and function in T lymphocytes. *Semin Immunol* 14: 19-26.
113. Ward SG, Cantrell DA (2001) Phosphoinositide 3-kinases in T lymphocyte activation. *Curr Opin Immunol* 13: 332-338.

114. Barr TA, Shen P, Brown S, Lampropoulou V, Roch T, et al. (2012) B cell depletion therapy ameliorates autoimmune disease through ablation of IL-6-producing B cells. *J ExpMed*.
115. Wang R, Kozhaya L, Mercer F, Khaitan A, Fujii H, et al. (2009) Expression of GARP selectively identifies activated human FOXP3+ regulatory T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 13439-13444.
116. Jonuleit H, Schmitt E, Stassen M, Tuettenberg A, Knop J, et al. (2001) Identification and functional characterization of human CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties isolated from peripheral blood. *J ExpMed* 193: 1285-1294.
117. Wing K, Onishi Y, Prieto-Martin P, Yamaguchi T, Miyara M, et al. (2008) CTLA-4 control over Foxp3+ regulatory T cell function. *Science* 322: 271-275.
118. Thornton AM, Shevach EM (1998) CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *J Exp Med* 188: 287-296.
119. Thornton AM, Shevach EM (2000) Suppressor effector function of CD4+CD25+ immunoregulatory T cells is antigen nonspecific. *J Immunol* 164: 183-190.
120. Cobbold S, Waldmann H (1998) Infectious tolerance. *Curr Opin Immunol* 10: 518-524.
121. Mestas J, Hughes CC (2004) Of mice and not men: differences between mouse and human immunology. *J Immunol* 172: 2731-2738.
122. Mazurier F, Fontanellas A, Salesse S, Taine L, Landriau S, et al. (1999) A novel immunodeficient mouse model--RAG2 x common cytokine receptor gamma chain double mutants--requiring exogenous cytokine administration for human hematopoietic stem cell engraftment. *J Interferon Cytokine Res* 19: 533-541.
123. Baecher-Allan C, Hafler DA (2004) Suppressor T cells in human diseases. *J ExpMed* 200: 273-276.
124. Cupedo T, Mebius RE (2005) Cellular interactions in lymph node development. *J Immunol* 174: 21-25.
125. Kugler S, Bocker K, Heusipp G, Greune L, Kim KS, et al. (2007) Pertussis toxin transiently affects barrier integrity, organelle organization and

- transmigration of monocytes in a human brain microvascular endothelial cell barrier model. *Cell Microbiol* 9: 619-632.
126. Chavarria A, Alcocer-Varela J (2004) Is damage in central nervous system due to inflammation? *Autoimmun Rev* 3: 251-260.
127. Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK (2007) T(H)-17 cells in the circle of immunity and autoimmunity. *Nat Immunol* 8: 345-350.
128. Matusevicius D, Kivisakk P, He B, Kostulas N, Ozenci V, et al. (1999) Interleukin-17 mRNA expression in blood and CSF mononuclear cells is augmented in multiple sclerosis. *Mult Scler* 5: 101-104.
129. Lock C, Hermans G, Pedotti R, Brendolan A, Schadt E, et al. (2002) Gene-microarray analysis of multiple sclerosis lesions yields new targets validated in autoimmune encephalomyelitis. *Nat Med* 8: 500-508.
130. Komiyama Y, Nakae S, Matsuki T, Nambu A, Ishigame H, et al. (2006) IL-17 plays an important role in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 177: 566-573.
131. Goverman J (2009) Autoimmune T cell responses in the central nervous system. *Nat Rev Immunol* 9: 393-407.
132. Costantino CM, Baecher-Allan C, Hafler DA (2008) Multiple sclerosis and regulatory T cells. *J Clin Immunol* 28: 697-706.
133. Moudgil KD, Choubey D (2011) Cytokines in autoimmunity: role in induction, regulation, and treatment. *J Interferon Cytokine Res* 31: 695-703.
134. O'Sullivan BJ, Thomas HE, Pai S, Santamaria P, Iwakura Y, et al. (2006) IL-1 beta breaks tolerance through expansion of CD25+ effector T cells. *J Immunol* 176: 7278-7287.
135. Valencia X, Stephens G, Goldbach-Mansky R, Wilson M, Shevach EM, et al. (2006) TNF downmodulates the function of human CD4+CD25hi T-regulatory cells. *Blood* 108: 253-261.
136. Korn T, Mitsdoerffer M, Croxford AL, Awasthi A, Dardalhon VA, et al. (2008) IL-6 controls Th17 immunity in vivo by inhibiting the conversion of conventional T cells into Foxp3+ regulatory T cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 18460-18465.

137. Tang Q, Boden EK, Henriksen KJ, Bour-Jordan H, Bi M, et al. (2004) Distinct roles of CTLA-4 and TGF-beta in CD4+CD25+ regulatory T cell function. *Eur J Immunol* 34: 2996-3005.
138. Fujimoto M, Nakano M, Terabe F, Kawahata H, Ohkawara T, et al. (2011) The influence of excessive IL-6 production in vivo on the development and function of Foxp3+ regulatory T cells. *J Immunol* 186: 32-40.
139. Schneider A, Long SA, Cersaletti K, Ni CT, Samuels P, et al. (2013) In active relapsing-remitting multiple sclerosis, effector T cell resistance to adaptive T(regs) involves IL-6-mediated signaling. *SciTranslMed* 5: 170ra115.
140. Babbe H, Roers A, Waisman A, Lassmann H, Goebels N, et al. (2000) Clonal expansions of CD8(+) T cells dominate the T cell infiltrate in active multiple sclerosis lesions as shown by micromanipulation and single cell polymerase chain reaction. *J Exp Med* 192: 393-404.
141. Crawford MP, Yan SX, Ortega SB, Mehta RS, Hewitt RE, et al. (2004) High prevalence of autoreactive, neuroantigen-specific CD8+ T cells in multiple sclerosis revealed by novel flow cytometric assay. *Blood* 103: 4222-4231.
142. Vladic A, Horvat G, Vukadin S, Sucic Z, Simaga S (2002) Cerebrospinal fluid and serum protein levels of tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) interleukin-6 (IL-6) and soluble interleukin-6 receptor (sIL-6R gp80) in multiple sclerosis patients. *Cytokine* 20: 86-89.
143. Matsushita T, Tateishi T, Isobe N, Yonekawa T, Yamasaki R, et al. (2013) Characteristic cerebrospinal fluid cytokine/chemokine profiles in neuromyelitis optica, relapsing remitting or primary progressive multiple sclerosis. *PLoS One* 8: e61835.
144. Chen YC, Yang X, Miao L, Liu ZG, Li W, et al. (2012) Serum level of interleukin-6 in Chinese patients with multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 249: 109-111.
145. Maimone D, Guazzi GC, Annunziata P (1997) IL-6 detection in multiple sclerosis brain. *J NeurolSci* 146: 59-65.
146. Patanella AK, Zinno M, Quaranta D, Nociti V, Frisullo G, et al. (2010) Correlations between peripheral blood mononuclear cell production of

- BDNF, TNF-alpha, IL-6, IL-10 and cognitive performances in multiple sclerosis patients. *J NeurosciRes* 88: 1106-1112.
147. Sansone P, Storci G, Tavorari S, Guarnieri T, Giovannini C, et al. (2007) IL-6 triggers malignant features in mammospheres from human ductal breast carcinoma and normal mammary gland. *J ClinInvest* 117: 3988-4002.
148. Croker BA, Krebs DL, Zhang JG, Wormald S, Willson TA, et al. (2003) SOCS3 negatively regulates IL-6 signaling in vivo. *Nat Immunol* 4: 540-545.
149. Murakami M, Okuyama Y, Ogura H, Asano S, Arima Y, et al. (2011) Local microbleeding facilitates IL-6- and IL-17-dependent arthritis in the absence of tissue antigen recognition by activated T cells. *J ExpMed* 208: 103-114.
150. Leech MD, Barr TA, Turner DG, Brown S, O'Connor RA, et al. (2013) Cutting edge: IL-6-dependent autoimmune disease: dendritic cells as a sufficient, but transient, source. *J Immunol* 190: 881-885.
151. Ifergan I, Kebir H, Bernard M, Wosik K, Dodelet-Devillers A, et al. (2008) The blood-brain barrier induces differentiation of migrating monocytes into Th17-polarizing dendritic cells. *Brain* 131: 785-799.
152. Nishimoto N, Hashimoto J, Miyasaka N, Yamamoto K, Kawai S, et al. (2007) Study of active controlled monotherapy used for rheumatoid arthritis, an IL-6 inhibitor (SAMURAI): evidence of clinical and radiographic benefit from an x ray reader-blinded randomised controlled trial of tocilizumab. *AnnRheumDis* 66: 1162-1167.
153. Ito H, Takazoe M, Fukuda Y, Hibi T, Kusugami K, et al. (2004) A pilot randomized trial of a human anti-interleukin-6 receptor monoclonal antibody in active Crohn's disease. *Gastroenterology* 126: 989-996.
154. Korporal M, Haas J, Balint B, Fritzsching B, Schwarz A, et al. (2008) Interferon beta-induced restoration of regulatory T-cell function in multiple sclerosis is prompted by an increase in newly generated naive regulatory T cells. *ArchNeurol* 65: 1434-1439.
155. de Andres C, Aristimuno C, de LH, V, Martinez-Gines ML, Bartolome M, et al. (2007) Interferon beta-1a therapy enhances CD4+ regulatory T-cell

- function: an ex vivo and in vitro longitudinal study in relapsing-remitting multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 182: 204-211.
156. Paty DW, Li DK (2001) Interferon beta-1b is effective in relapsing-remitting multiple sclerosis. II. MRI analysis results of a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. 1993 [classical article]. *Neurology* 57: S10-15.
157. Mikol DD, Barkhof F, Chang P, Coyle PK, Jeffery DR, et al. (2008) Comparison of subcutaneous interferon beta-1a with glatiramer acetate in patients with relapsing multiple sclerosis (the REbif vs Glatiramer Acetate in Relapsing MS Disease [REGARD] study): a multicentre, randomised, parallel, open-label trial. *Lancet Neurol* 7: 903-914.
158. McGraw CA, Lublin FD (2013) Interferon beta and glatiramer acetate therapy. *Neurotherapeutics* 10: 2-18.
159. Gregersen JW, Kranc KR, Ke X, Svendsen P, Madsen LS, et al. (2006) Functional epistasis on a common MHC haplotype associated with multiple sclerosis. *Nature* 443: 574-577.
160. Madsen LS, Andersson EC, Jansson L, krogsgaard M, Andersen CB, et al. (1999) A humanized model for multiple sclerosis using HLA-DR2 and a human T-cell receptor. *Nat Genet* 23: 343-347.
161. Reindl M, Linington C, Brehm U, Egg R, Dilitz E, et al. (1999) Antibodies against the myelin oligodendrocyte glycoprotein and the myelin basic protein in multiple sclerosis and other neurological diseases: a comparative study. *Brain* 122 (Pt 11): 2047-2056.
162. Gay D, Esiri M (1991) Blood-brain barrier damage in acute multiple sclerosis plaques. An immunocytological study. *Brain* 114 (Pt 1B): 557-572.
163. Danner R, Chaudhari SN, Rosenberger J, Surls J, Richie TL, et al. (2011) Expression of HLA class II molecules in humanized NOD.Rag1KO.IL2RgcKO mice is critical for development and function of human T and B cells. *PLoS One* 6: e19826.
164. Luckey D, Bastakoty D, Mangalam AK (2011) Role of HLA class II genes in susceptibility and resistance to multiple sclerosis: studies using HLA transgenic mice. *J Autoimmun* 37: 122-128.

165. Zivadinov R, Uxa L, Bratina A, Bosco A, Srinivasaraghavan B, et al. (2007) HLA-DRB1*1501, -DQB1*0301, -DQB1*0302, -DQB1*0602, and -DQB1*0603 alleles are associated with more severe disease outcome on MRI in patients with multiple sclerosis. *Int Rev Neurobiol* 79: 521-535.
166. Gregersen JW, Kranc KR, Ke X, Svendsen P, Madsen LS, et al. (2006) Functional epistasis on a common MHC haplotype associated with multiple sclerosis. *Nature* 443: 574-577.

8. Lebenslauf

9. Anhänge

9.1 Puffer und Medien

Alle Medien wurden mit destilliertem Wasser angesetzt, sterilfiltriert (0,2 µm) und bei 4 °C aufbewahrt.

MEM

1 Packung	(Ansatz für 5 Liter Medium)	
4,77 g/l		
2,2 g/l	RPMI 1640 Trockenpulver	(Gibco, Grand Island, USA)
3,6 ml/l	HEPES	(Biochrom AG, Berlin)
2,8 g/ml	Natriumhydrogencarbonat	(Merck, Darmstadt)
pH 7,2	β-Mercaptoethanol	(Serva, Heidelberg)

RPMI 1640

Ansatz für 5 Liter Medium

1 Packung	RPMI Trockenpulver	(Gibco, Grand Island, USA)
3,6 g/l	HEPES	(Biochrom)
10 ml/l	Penicillin-Streptomycin	(Biochrom)
10 ml/l	Sodium Pyrovat	(Biochrom)
2 g/l	Natriumhydrogencarbonat	(Merck)
10 l/l	Nicht-Essentielle Aminosäuren	(Biochrom)
3,5 ml/l	β-Mercaptoethanol	(Serva, Heidelberg)
100 µl/l	Indomethacin—	(Caesar&Lorenz, Hilden)

RPMI Complete

Ansatz für 5 Liter Medium

1 Packung	RPMI Trockenpulver	(Gibco, Grand Island, USA)
3,6 g/l	HEPES	(Biochrom)
10 ml/l	Penicillin-Streptomycin	(Biochrom)
10 ml/l	Sodium Pyrovat	(Biochrom)
2 g/l	Natriumhydrogencarbonat	(Merck)
10 ml/l	nicht-essentielle Aminosäuren	(Biochrom)
3,5 ml/l	β-Mercaptoethanol	(Serva)
100 µl/l	Indomethacin	(Caesar&Lorenz, Hilden)
50 ml/l	FCS	(PAA Laboratories GmbH)

Waschmedium zur Depletion

MEM		
2 %Humanes Serum Albumin (HSA)		(HSA; 20 % Octalbin, Octapharma GmbH, Langenfeld)

PBS 10x

10x Stammlösung, steril

80,4 g/l	NaCl	(Roth)
15,6 g/l	NaH ₂ PO ₄ x2H ₂ O	(Merck)

mit 10 M NaOH auf pH- Wert 6,6 einstellen,

PBS-EDTA

(steril) 1xPBS 1 mM	EDTA	(GERBU)
PBS-EDTA- Heparin		
1xPBS 1 mM 0,2 %	EDTA Liquemin N25000	(GERBU) (Roche, Basel, Schweiz)
MACS-Puffer		
1xPBS 0,5 % 3 mM	HSA EDTA	(Oktapharma) (GERBU)
FACS-Puffer		
1xPBS 0,5 % 1 mM 10 µg/ml	HSA EDTA Sandoglobin	(Oktapharma) (GERBU) (Biotest Pharma)
ACK-Puffer		
0,15 M 1 mM 0,5 mM (pH=7,2)	Ammoniumchlorid NH ₄ C Kaliumhydrogencarbonat KHCO ₃ EDTA	(Merck, Darmstadt) (Merck, Darmstadt) (GERBU Biotechnik)
TRIS-Puffer		
60,5 g 600 ml 2 M	Tris aqua dest. mit HCL auf pH 7 einstellen und mit 1000ml aqua dest auffüllen	(Karl Roth GmbH)
90 g	NaCl	(Karl Roth GmbH)
EDTA-Puffer		
0,375 g 100 ml pH 7,8	Titriplex aqua dest. mit NAOH	(Merck, Darmstadt) (Karl Roth GmbH)

9.2 Publikationen