

Aus der
Neurologischen Universitätsklinik Tübingen
Abteilung Neurologie mit Schwerpunkt neurovaskuläre
Erkrankungen und Neuroonkologie

N-Glykosylierung von T Helfer Zell-Populationen bei
Patienten mit Multipler Sklerose

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

Haas, Ruth-Maria

2017

Dekan:	Professor Dr. I. B. Autenrieth
1. Berichterstatter:	Privatdozent Dr. F. Bischof
2. Berichterstatter:	Privatdozent Dr. K. Ghoreschi
Tag der Disputation:	12.07.2017

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	7
1 Einleitung.....	8
1.1 Multiple Sklerose.....	8
1.1.1 Epidemiologie	8
1.1.2 Klinik und Diagnosestellung.....	9
1.1.3 Ätiologie und Pathogenese.....	10
1.2 Therapie.....	12
1.2.1 Natalizumab.....	12
1.3 Das Immunsystem.....	13
1.3.1 Erworbenes Immunsystem	14
1.3.2 T Zellen.....	14
1.3.3 Differenzierung der T Lymphozyten.....	15
1.3.4 Th1 Zellen.....	16
1.3.5 Th2 Zellen.....	17
1.3.6 Th17 Zellen.....	17
1.3.7 Regulatorische T Zellen.....	17
1.4 Oberflächenglykosylierung	19
1.4.1 PHA-L.....	19
1.4.2 MAL	20
1.4.3 SNL.....	21
1.4.4 UEA	22
2 Fragestellung	22
3 Material und Methoden	23
3.1 Verwendetes Material.....	23
3.1.1 Laborgeräte	23

3.1.2	Antikörper	23
3.1.3	Lektine	24
3.1.4	Chemikalien	24
3.1.5	Einwegmaterial	25
3.1.6	Lösungen und ihre Zusammensetzung.....	26
3.2	Methoden	26
3.2.1	Blutspender und Patienten	27
3.2.2	Isolierung von Lymphozyten aus humanem Blut	27
3.2.3	Bestimmung der Gesamtzellzahl mit Hilfe der Neubauer Zählkammer.....	28
3.2.4	Fluoreszenzmarkierung von Zellen mit Antikörpern.....	28
3.2.5	Antikörperkonzentrationen.....	29
3.2.6	Interleukin und Interferonfluoreszenzmarkierung.....	30
3.2.7	Inkubation der Zellen mit Kifunensin.....	30
3.2.8	Zellseparation	30
3.2.9	Stimulation von Zellen mit anti CD3 und anti CD28	33
3.2.10	CFSE Färbung	33
3.2.11	In vitro Stimulationsassay.....	34
3.2.12	FACS Gerät und FACS Messung.....	35
3.2.13	Auswertung der Daten.....	36
4	Ergebnisse.....	37
4.1	Oberflächenglykosylierung auf Effektor T Zellen und regulatorischen T Zellen	37
4.1.1	α 2,3-Sialylierung auf regulatorischen T Zellen und Effektor T Zellen	37
4.1.2	α 2,6 Sialylierung von regulatorischen T Zellen und Effektor T Zellen	38

4.1.3	α 1,2 Glykosylierung von regulatorischen T Zellen und Effektor T Zellen	39
4.1.4	β 1,6 N-Glykosylierung von regulatorischen T Zellen und Effektor T Zellen	40
4.2	β 1,6 N-Glykosylierung auf CD4 Zellpopulationen	41
4.3	Erhöhte β 1,6 N-Glykosylierung auf aktivierten T-Zellen	44
4.4	Behandlung mit Natalizumab führt zur erhöhten β 1,6 N-Glykosylierung auf Effektor T Zellen bei Patienten mit schubförmiger Multipler Sklerose	45
4.5	β 1,6 N-Glykosylierung auf T Helferzellsubpopulationen.....	47
4.6	Behandlung mit Natalizumab führt zur erniedrigten β 1,6 N-Glykosylierung auf TH1 und Th17 Zellen bei Patienten mit schubförmiger Multipler Sklerose.....	49
4.7	Erhöhte β 1,6 N-Glykosylierung von Effektor T Zellen nach Aktivierung	51
4.8	Erniedrigte β 1,6 N-Oberflächenglykosylierung bei Inhibition der alpha-1,2-Mannosidase.....	52
4.9	Verstärkte suppressive Wirkung der regulatorischen T Zellen mit gehemmter alpha-1,2-Mannosidase auf die Proliferation von Effektor T Zellen.....	53
4.10	Oberflächenglykosylierung auf Effektor T Zellen und regulatorischen T Zellen bei MS Patienten unter Natalizumabtherapie im Vergleich zu Gesunden	55
4.10.1	Die α 2,3 Sialylierung auf Effektor T Zellen und regulatorischen T Zellen ist bei MS Patienten unter Natalizumabtherapie nicht verändert.....	55
4.10.2	Die α 2,6 Sialylierung auf regulatorischen T Zellen und Effektor T Zellen ist bei MS Patienten unter Natalizumab Therapie und gesunden Kontrollpersonen identisch.....	56

4.10.3	Behandlung mit Natalizumab führt zur erhöhten α 1,2-Glykosylierung auf Effektor T Zellen und regulatorischen T Zellen bei Patienten mit schubförmiger Multipler Sklerose.....	57
5	Diskussion	60
6	Zusammenfassung	67
7	Literaturverzeichnis.....	69
8	Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift.....	76

Abkürzungsverzeichnis

AK	Antikörper
APC	Allophycocyanin
APC	Antigen presenting cells
CD	Cluster of Differentiation
CD4+FoxP3- Zellen	Effektor T Zellen
CD4+FoxP3+ Zellen	Regulatorische T Zellen
CD4hi	Nicht aktivierte CD4 high exprimierende Zellen
CD4lo	Aktivierte CD4 low exprimierende Zellen
CFSE	Carboxyfluoresceinsuccinimidylester
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FITC	Fluoreszeinisothiozyanat
Foxp3	Forkhead winged helix transcription factor 3
FSC	Forward scatter, Vorwärtsstreuung
IFN- γ	Interferon- γ
IgG	Immunglobulin Gamma
IL	Interleukin
IMDM	Iscove's Modified Dulbecco's Medium
KIF	Kifunensin
LSM	Lymphocyte Separation Medium
MACS	Magnetic activated cell sorting
MAL	Maackia amurensis leucoagglutinating lectin
MFI	Mean fluorescence intensity
MHC	Major histocompatibility complex
min	Minuten
Mio.	Millionen
MS	Multiple Sklerose
MS	Multiple Sklerose
MS	Multiple Sklerose
PBS	Phosphat buffered saline
PE	Phycoerythrin
PHA-L	Phaseolus vulgaris leucoagglutinating
PML	progressive multifokale Leukenzephalopathie
PML	progressive multifokale Leukenzephalopathie
rpm	Revolutions per minute
SEM	standard error of the mean, Standardfehler
SNL	Elderberry Bark Lectin
SSC	Sideward scatter, Seitwärtsstreuung
TCR	T-Zell-Rezeptor
Th1	T-Helferzelle Typ 1
Th17	T-Helferzellen Typ 17
Th2	T-Helferzellen Typ 2
UEA	Ulex europaeus
ZNS	Zentrales Nervensystem

1 Einleitung

1.1 Multiple Sklerose

Multiple Sklerose (MS) ist eine chronisch entzündliche Erkrankung des Zentralen Nervensystems (ZNS). Dabei greifen die körpereigenen Immunzellen die Myelinscheide und die Neurone an. Allein in Deutschland geht man von 67 000 bis 138 000 Betroffenen aus. Die MS ist damit eine der häufigsten Ursachen für eine dauerhafte körperliche Behinderung im jungen Erwachsenenalter. Dabei kommt der Erkrankung eine besondere sozioökonomische Bedeutung zu. Die Krankheitskosten belaufen sich in Deutschland auf ca. 40 000 Euro pro Patient und Jahr und beinhalten neben der medizinischen Versorgung und Pflege vor allem auch indirekte Kosten durch Arbeitsausfall und Frühberentung [1]. Nach 13 Jahren Krankheit werden ungefähr 40 % der MS Patienten vorzeitig berentet [2].

Nach wie vor ist die Ätiologie der MS nicht geklärt. In der aktuellen Forschung geht man davon aus, dass neben einer multifaktoriellen genetischen Disposition vor allem auch die Exposition gegenüber exogenen Triggerfaktoren wie z. B. die Sonnenexposition eine Rolle spielt.

1.1.1 Epidemiologie

Die MS, auch Enzephalomyelitis disseminata genannt, ist mit einer Prävalenz von 30-60 pro 100 000 Einwohner eine der häufigsten neurologischen Erkrankungen in Mitteleuropa, wobei die Erkrankungshäufigkeit der kaukasischen Bevölkerung mit wachsender Entfernung vom Äquator zunimmt [3]. Selten betroffen sind die schwarze Bevölkerung der USA, Afrikaner, Inder, Asiaten, Indianer und Inuit [4]. Frauen erkranken etwa doppelt so häufig an der schubweise progredienten Verlaufsform wie Männer. Bei der chronisch progredienten MS sind beide Geschlechter etwa gleich häufig betroffen. Der Altersgipfel bei Erstmanifestation liegt zwischen dem 20. und 40. Lebensjahr. [3, 5].

1.1.2 Klinik und Diagnosestellung

Das klinische Bild der MS ist sehr heterogen. So können in einem Schub zentrale Paresen und Sensibilitätsstörungen vor allem der distalen Extremitäten aber auch einer Körper- oder Gesichtshälfte, häufig begleitet von Ataxie auftreten. Oft sind auch Hirnnerven, vor allem der Nervus Opticus in Form einer Opticusneuritis beteiligt. Ein Schub ist dabei definiert als eine neu aufgetretene klinische Störung, die mindestens 24 Stunden dauert. Das Zeitintervall zwischen den einzelnen Schüben sollte mindestens 30 Tage umfassen. Außerdem sollte der Schub nicht mit einer Änderung der Körpertemperatur (Uthoff Phänomen) einhergehen oder im Rahmen einer Infektion auftreten.

Es werden vier verschiedene klinische Verlaufsformen unterschieden: Das klinisch isolierte Syndrom, die schubförmige („relapsing-remitting“, RRMS), die sekundär progrediente (SPMS) und die primär progrediente (PPMS) Verlaufsform [6]. Die Diagnosestellung erfolgt anhand der Klinik und der modifizierten McDonald Kriterien, die einen MRT Nachweis von zeitlich und räumlich disseminierten Läsionen erfordern, die durch keine andere Erkrankung erklärt werden können. Räumliche Dissemination bedeutet hierbei: mehr als eine T2 hyperintense MRT Läsion in mindestens zwei der folgenden Regionen: periventrikulär, juxtacortical, infratentoriell oder spinal. Zeitliche Dissemination bedeutet: eine neu aufgetretene T2 und / oder Gadolinum anreichernde Läsion im MRT, oder das gleichzeitige Auftreten einer asymptomatischen Gadolinum anreichernden und einer nicht anreichernden Läsion [7]. Eine untergeordnete Rolle kommt heute der Liquordiagnostik zu. Unter einem positiven Liquorbefund versteht man den Nachweis lokaler IgG-Produktion im ZNS in Form von oligoklonalen Banden, einer lymphozytären Pleozytose oder einer Eiweißvermehrung. Dabei liegt die Sensitivität dieser Methode bei 98 %, wohingegen die Spezifität sehr niedrig ist [5].

1.1.3 Ätiologie und Pathogenese

MS wird als eine immunvermittelte chronisch entzündliche Erkrankung des Zentralnervensystems betrachtet. Dabei kommt es durch Demyelinisierung und axonale Schädigung zu verschiedenen histopathologischen Mustern [8]. Diese Plaques sind um größere Venen angeordnet und enthalten vor allem autoreaktive T Lymphozyten, B Zellen und Makrophagen [5]. Die genaue Ätiologie der MS ist bis heute nicht geklärt [9]. Ein Erklärungsmodell resultiert aus der Beobachtung, dass es in ganz frühen Läsionen zur Apoptose von Oligodendrozyten kommt ohne räumlichen Bezug zu Gefäßen und zur zellvermittelten Immunität. Es folgt die Aktivierung von Mikroglia, axonale Degeneration und Gliose [10]. Dieser Erklärungsversuch, der einen neurodegenerativen Prozess als Ausgangspunkt der Entzündung postuliert, wurde durch eine neuere Studie hinterfragt. Diese zeigte, dass der Oligodendrozytentod alleine keine gegen Myelin gerichtete Autoimmunität initiieren kann [11]. Diskutiert werden noch weitere Ursachen für die Autoimmunvorgänge. Ein möglicher Ansatz, ist dabei die Vitamin D Hypothese: Diese stützt sich auf die Beobachtung, dass Länder mit hoher Sonneneinstrahlung eine relativ niedrige MS Prävalenz haben. Vitamin D, wirkt in seiner aktiven Form, als Calcitriol intrazellulär und induziert dort unter anderem die Biosynthese verschiedener Proteine. Die Synthese dieser aktiven Form findet im menschlichen Körper und dort unter anderem maßgeblich in der Haut unter dem Einfluss von UV-Strahlung statt [12].

Es stellte sich heraus, dass niedrige Serumkonzentrationen des Vitamin D Metaboliten 25-Hydroxycholecalciferol, der in der Haut aus der Vorstufe des Cholecalciferols durch Hydroxylierung unter UV Einfluss entsteht, mit einer höheren Inzidenz von MS assoziiert sind. Auch konnte gezeigt werden, dass Vitamin D krankheitsmodulierende Effekte auf die MS hat. Dies geschieht indirekt über die Immunzellen. So exprimieren sowohl Monozyten, als auch Antigen präsentierende Zellen (APC) und aktivierte Lymphozyten einen Vitamin D Rezeptor [13, 14]. Die Aktivierung dieses Rezeptors führt zu veränderter Aktivität, Proliferation und Differenzierung dieser Immunzellen [15, 16]. Es konnte in vitro gezeigt werden, dass der Vitamin D Metabolit

1,25(OH)₂D die Produktion und Transkription der Zytokine IL-2, IL-6, IFN γ und GM-CSF (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor) durch Th1 Zellen hemmt, ebenso wie ihre Differenzierung und Proliferation [17-20]. Außerdem entwickeln mehr CD4 T Lymphozyten ein Th2 Zytokinprofil, was zu einer vermehrten IL-4, IL-5 und IL-13 Produktion führt. Diese Zytokine wiederum inhibieren die Th1 Zellproliferation [21] und damit die ZNS Inflammation. Des Weiteren steigert Vitamin D die suppressive Funktion von regulatorischen T Zellen [22].

Daneben prädisponieren bestimmte genetische Faktoren zur MS. Dabei ist die Assoziation mit HLA DR2 am besten gesichert [5]. Daneben konnten Allele des Interleukin-2 Rezeptor Gens und Interleukin-7 Rezeptor Gens als erbliche Risikofaktoren identifiziert werden [23].

Studien mit monozygoten Zwillingen zeigten eine Konkordanzrate von 30 % [24]. Allerdings wurden keine Hinweise auf genetische, epigenetische oder transkriptionelle Unterschiede gefunden, die die Diskordanz der Erkrankung erklären könnten [25]. Diese Diskordanz ließe sich durch den Einfluss von Umweltfaktoren erklären. Einen weiteren Hinweis auf deren Bedeutung geben Migrantenstudien. Diese zeigen, dass Migranten das Risiko an MS zu erkranken von dem Land annehmen, in das sie migrieren, wenn sie innerhalb der ersten zwei Lebensdekaden einwandern. Auch haben Kinder von Migranten das MS Risiko ihrer neuen Heimat [26].

Ein weiterer diskutierter Umweltfaktor sind EBV Infektionen. Es gibt mehrere Studien, die indirekte Hinweise geben, dass eine EBV Infektion eine Rolle in der Pathogenese der MS spielen könnte [27-29]. Dabei zeigte sich unter anderem, dass bei einigen MS Patienten, die Serumantikörper gegen EBV vor Manifestation der MS ansteigen [29]. Ein Teil der MS Patienten hat höhere EBV Antikörper (early antigen) Titer als Gesunde, was auf eine aktive virale Replikation hindeutet. Dieser Antikörpertiter ändert sich nicht mit dem Krankheitsverlauf und es bestehen keine Unterschiede zwischen stabiler Erkrankung und Exazerbation. Auch ist der Krankheitsverlauf zwischen seropositiven und seronegativen MS Patienten gleich [30].

Allen Ansatzpunkten gemeinsam ist, dass sie nach einer Ursache für die Fehlregulation des Immunsystems suchen, da es pathogenetisch zu einer Autoimmunreaktion kommt, die durch autoreaktive Zellen und/oder durch Autoantikörper vermittelt ist. [31].

1.2 Therapie

Da die Ätiologie der MS nicht geklärt ist, gibt es keine kausale Therapie. Der akute Schub wird mit hochdosierten Glukokortikoiden behandelt. Kommt es danach nicht zu einer befriedigenden Rückbildung der Symptome, ist eine Plasmapherese möglich [5, 6].

Zur Verhinderung weiterer Krankheitsschübe und Krankheitsprogression erfolgt eine krankheitsmodifizierende Therapie, bei der zunächst mit einer Basistherapie mit Betainterferon oder Glatiramerazetat behandelt wird. Falls die Krankheitsaktivität darunter nicht zufriedenstellend unterdrückt ist, kann eine Eskalationstherapie mit Natalizumab und Fingolimod als erste Wahl und Mitoxantron als zweite Wahl angewandt werden [6].

1.2.1 Natalizumab

Natalizumab (Tysabri®) ist ein monoklonaler, humaner Antikörper. Er ist ein $\alpha_4\beta_7$ -Integrin-Inhibitor und hemmt selektiv dieses Adhäsionsmolekül auf der Oberfläche von Leukozyten. Dadurch wird die Wanderung der Leukozyten aus den Blutgefäßen in das entzündete ZNS gehemmt [32, 33]. Allerdings hemmt es auch die Einwanderung von Immunzellen bei ZNS Infektionen. So steigt unter Therapie zum Beispiel das Risiko für eine progressive multifokale Leukenzephalopathie (PML) [34, 35]. Die PML ist eine opportunistische Virusinfektion, die durch das JC Virus hervorgerufen wird. Natalizumab ist deshalb kontraindiziert bei aktueller oder in der Vorgeschichte aufgetretener PML, aber auch bei Vorliegen anderer opportunistischer Infektionen, sowie bei HIV-Infektion und bei aktiven Malignomen [6].

Risikofaktoren für das Auftreten einer PML unter Natalizumab sind eine Behandlungsdauer von über 2 Jahren, eine vorangegangene immunsuppressive Therapie sowie ein positiver JCV-Antikörper-Status [36].

Natalizumab wird alle 4 Wochen intravenös als Infusion mit 300 mg verabreicht. Nach wiederholter Gabe werden dabei maximale Serumkonzentrationen von ca. $110 \pm 52 \mu\text{g/ml}$ erreicht. Der durchschnittliche Talspiegel im Steady-State liegt bei $23\text{--}29 \mu\text{g/ml}$, die mittlere Plasmahalbwertszeit bei 16 ± 4 Tagen [6].

Bisher ist nur wenig bekannt über die Wirkung von Natalizumab auf die Immunzellen selbst. Es konnte gezeigt werden, dass unter Natalizumabtherapie die Expression von ungebundenem $\alpha 4$ Integrin (CD49d) auf peripheren T Zellen zurückgeht [37]. Dieser Rückgang geht mit einem Verlust ihrer Migrationsfunktion einher [38]. Auf regulatorischen T Zellen geht die CD49d Expression weniger stark zurück. Trotzdem verhindert Natalizumab auch deren Migrationsfähigkeit, ohne ihre Suppressionsfunktion zu beeinträchtigen [39].

1.3 Das Immunsystem

Das Immunsystem hat die Aufgabe, das Individuum vor Infektionen zu schützen. Es besteht aus der angeborenen, natürlichen Immunität und der erworbenen, adaptiven Immunität. Die angeborene Immunität ist unspezifisch. Sie besteht aus anatomischen und physikalischen Barrieren, wie Epithelien, aus mononukleären Phagozyten (Monozyten, Makrophagen und dendritische Zellen), natürlichen Killerzellen und dem Komplementsystem. Die erworbene Immunität ist im Gegensatz dazu Antigen-spezifisch. Sie ist in der Lage sich an Krankheitserreger anzupassen und bei einem Zweitkontakt mit dem gleichen Pathogen schneller, präziser und stärker zu reagieren. Das adaptive Immunsystem unterteilt sich in eine humorale und eine zelluläre Immunreaktion. Dabei sind die B Zellen durch Bildung und Sekretion von Antikörpern für die humorale Immunreaktion verantwortlich und die T Zellen für die zelluläre [40].

Im Folgenden wird die erworbene adaptive Immunität näher betrachtet, da ihr eine besondere Rolle in der Pathogenese der MS zugeschrieben wird.

1.3.1 Erworbenes Immunsystem

Das erworbene Immunsystem zeichnet sich durch seine hohe Spezifität aus. Diese ist aufgrund einer großen Diversität der Antigenrezeptoren möglich. Antigenrezeptoren der B Zellen und Immunglobuline sind in der Lage, gelöste Antigene zu erkennen. T Zellrezeptoren erkennen Antigene, die auf spezifischen Molekülen, MHC Klasse I und II Molekülen präsentiert werden. Die Effektorzellen des adaptiven Immunsystems sind in hohem Maße funktionell spezialisiert [40].

B und T Lymphozyten haben eine gemeinsame lymphatische Vorläuferzelle, die sich aus einer hämatopoetischen Stammzelle aus dem Knochenmark differenziert. Die weitere Reifung zur T Zelle findet im Thymus statt, die zur B Zelle im Knochenmark [40]. Krankheitserreger, die in den Organismus eindringen, werden von antigenpräsentierenden Zellen aufgenommen und in die sekundär lymphatischen Organe (z. B.: Milz, Lymphknoten, solitäre Lymphfollikel) transportiert. Dort kommt es zur Aktivierung der T und B Lymphozyten [40].

1.3.2 T Zellen

T Zellen gehen aus lymphatischen Vorläuferzellen hervor. Diese entstehen im Knochenmark und gelangen durch Zirkulation in den Thymus. Dort durchlaufen sie einen Reifungsprozess. Dabei kommt es zunächst zu einer Proliferation der Pro-T Zelle, anschließend zur Expression von CD3, CD4 und CD8 Korezeptoren und über Rearrangierung der Gene der Antigenrezeptoren zu einer großen Vielfalt von T Zellen mit individuellen Antigen-spezifitäten. In einem anschließenden Entwicklungsschritt, der negativen Selektion, werden alle Lymphozyten, die keine von HLA-Molekülen präsentierten Antigene erkennen und die eine zu starke Affinität zu den HLA-Molekülen zeigen, eliminiert. Es folgt die positive Selektion, bei der nur Zellen mit einem TCR, der eine niedrige Affinität zu HLA-Antigenen zeigt, überleben. Diese differenzieren sich dann in

CD4+ T Zellen oder in CD8+ T Zellen. Dabei sind CD4 und CD8 Moleküle Korezeptoren des T Zell-Rezeptors, die seine Interaktion mit dem MHC Antigen-Komplex stabilisieren [40].

Die Zellen, deren TCR eine niedrige Affinität zu einem Peptid/MHC Komplex haben, können der zentralen Toleranz entkommen, so dass auch beim Gesunden T Zellen, die gegen körpereigenes Gewebe gerichtet sind, in der Zirkulation erscheinen. Die Aktivität dieser Zellen wird beim Gesunden durch periphere Toleranzmechanismen kontrolliert. Allerdings kann die Aktivität selbst-spezifischer T Zellen durch immunogene Stimuli, wie z. B. eine Infektion oder Vakzinierung zunehmen. Diese T Zellen können dann auf Autoantigene reagieren, die sie zuvor ignoriert haben [41].

Als erste Ziele der T Zellen im ZNS MS erkrankter Personen konnten Myelin Basisches Protein (MBP) und Myelin Proteolipid Protein (PLP) identifiziert werden. Sie befinden sich im Myelin des ZNS [42]. Myeline sind auch für spezifische CD4+ Zellen in den meisten Modellen der Experimentellen Autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE), dem Tiermodell der MS, die primären Autoantigene. ZNS-spezifische CD4+ T Zellen spielen bei der EAE eine zentrale Rolle, was experimentell durch die Übertragbarkeit der Erkrankung durch adoptiven Transfer ZNS-spezifischer CD4+ T Zellen belegt ist [23].

In der folgenden Arbeit wurden deshalb vor allem die CD4+ Subpopulationen näher betrachtet.

1.3.3 Differenzierung der T Lymphozyten

Nach Verlassen des Thymus werden zwei Arten von T Zellen unterschieden: CD8+ zytotoxische T Zellen, die einen T Zell Rezeptor (TCR) tragen, der spezifisch antigene Peptide erkennt, die von MHC Klasse I Molekülen auf der Oberfläche aller kernhaltigen Zellen exprimiert werden und CD4+ Helfer T Zellen die einen TCR tragen, der antigene Peptide im Komplex mit MHC Klasse II Molekülen auf der Oberfläche von spezialisierten Antigen-präsentierenden Zellen erkennt.

Krankheitserreger, die in den Organismus eindringen, werden von Antigen-präsentierenden Zellen wie dendritische Zellen aufgenommen und enzymatisch verdaut. Peptidfragmente des Erregers werden auf MHC Klasse II Molekülen präsentiert und zusammen mit den Oberflächenmolekülen CD80 und CD86 exprimiert. T Helfer Zellen, die spezifisch die entsprechende Peptid/MHC-Kombination erkennen, werden dadurch aktiviert, proliferieren und differenzieren sich in verschiedene Untertypen aus. Die Zytokinproduktion der antigenpräsentierenden Zellen (Makrophagen, dendritische Zellen, B Zellen) bestimmt dabei die weitere Ausdifferenzierung der naiven CD4+ T Zellen [40].

Unter dem Einfluss von IFN γ und IL-12 entwickeln sich Th1 Zellen, welche die zelluläre Immunantwort fördern. Unter dem Einfluss von IL-4 bilden sich Th2 Zellen, welche die humorale Immunantwort begünstigen [40].

Nach Ablauf der Immunantwort werden die T Effektorzellen wieder eliminiert. Einige wenige persistieren als T Gedächtniszellen.

Die naiven CD8+ T Zellen differenzieren sich zu zytotoxischen Effektorzellen nach Kontakt mit antigenpräsentierenden MHC Klasse I Molekülen.

1.3.4 Th1 Zellen

Th1 Zellen sind charakterisiert durch die Sekretion des proinflammatorischen Zytokins Interferon- γ . Ferner sezernieren sie IL-2 und TNF α [43]. Sie spielen eine wichtige Rolle in der zellulären Reaktion des Immunsystems auf intrazelluläre Pathogene.

Durch den Transfer von ZNS-spezifischen Th1 Zellen lässt sich im Tiermodell eine Autoimmunreaktion im ZNS auslösen [44-46]. Weitere Untersuchungen beim Menschen zeigten, dass eine gesteigerte klinische Aktivität der MS mit erhöhten Konzentrationen der mit Th1 Zellen assoziierten Mediatoren in MS-Plaques und Liquor einhergeht [47]. Außerdem verstärkt sich das Krankheitsbild der MS bei Gabe von IFN γ [48].

1.3.5 Th2 Zellen

Den Th2 Zellen kommt eine untergeordnete Rolle bei der MS zu. Sie stimulieren über die Sekretion von IL-4, IL-5 und IL-13 die humorale Abwehr indem sie B Zellen aktivieren und ihre Differenzierung zu Plasmazellen fördern. Außerdem stimulieren die Zytokine der Th2 Zellen weitere Th2 Zellen, während sie die Th1 Zellen hemmen. Umgekehrt regulieren Th1 Zellen über ihre Zytokine die Th2 Zellproliferation und Aktivität herunter und aktivieren weitere Th1 Zellen [49-51].

1.3.6 Th17 Zellen

Th17 Zellen sind charakterisiert durch die Produktion von IL-17A, IL-17F und IL-22 [52]. Ihre Differenzierung wird gesteuert durch IL-1, IL-6 und TGF- β und weiter stabilisiert durch IL-23 [53]. Th17 Zellen können durch ihre proinflammatorischen Zytokine die Produktion weiterer, ebenfalls proinflammatorisch wirkender Mediatoren stimulieren. Th17 Zellen spielen eine zentrale Rolle in adaptiven Immunantworten und insbesondere auch in gegen das ZNS gerichteten Entzündungen. So zeigt sich eine Akkumulation von IL-17 in aktiven MS Läsionen im Vergleich zu inaktiven Läsionen und dem ZNS Gesunder [54, 55]. Der Transfer von Th17 Zellen löst im Mausmodell eine weitaus stärkere EAE aus als der Transfer von Th1 Zellen [56].

Es wird vermutet, dass Th17 Zellen und deren Mediatoren die Durchlässigkeit der Bluthirnschranke für ZNS-reaktive Immunzellen (z.B. Th1, CD8+ und B Zellen) erhöhen und so die Einwanderung dieser proinflammatorischen Zellen ins ZNS ermöglichen [57].

1.3.7 Regulatorische T Zellen

Regulatorische T Zellen begrenzen die Aktivität von Immunzellen und verhindern ihre Überreaktion [58, 59]. Dabei sezernieren sie das Zytokin TGF- β , welches hemmend auf die Proliferation und Aktivität der T Zellen wirkt und IL-10, welches Makrophagen zur Bildung von zusätzlichem TGF- β anregt [40].

In der Literatur finden sich verschiedene Definitionen der regulatorischen T Zellen. Eine gängige Möglichkeit zur Identifizierung ist der Nachweis einer Co-Expression des Interleukin-2 Rezeptors, welcher mit antiCD25-Antikörpern markiert werden kann. Dieser Rezeptor ist allerdings ebenfalls hochreguliert bei aktivierten CD4+ Effektor T Zellen. Die für den IL-2 Rezeptor kodierenden DNA Abschnitte konnten als ein MS assoziiertes Gen identifiziert werden [23].

Ein genauere Marker für regulatorische T Zellen ist FoxP3 (Forkhead box protein 3), ein Transkriptionsfaktor, dessen Aktivierung für die regulatorischen Fähigkeiten entscheidend ist [60-62]. Ein Verlust von FoxP3 führte in der Zellkultur zu einer Abnahme ihrer Fähigkeit zur Suppression. Da FoxP3 ein Transkriptionsfaktor ist, müssen die Zellen vor der Markierung zur Analyse permeabilisiert und damit abgetötet werden, weshalb diese Art der Identifikation bei Untersuchungen zur Zellfunktion ungeeignet ist.

Allerdings konnten auch non-Treg Zellen identifiziert werden, die Foxp3 auf einem niedrigen Niveau exprimieren. Die Differenzierung zwischen den beiden Populationen hängt vom jeweiligen Methylierungsstatus des FoxP3 Gens ab. Eine inkomplette Methylierung findet sich dabei in den non-Treg FoxP3^{low} und eine komplette in den FoxP3⁺ Treg Zellen [63]. Humane FoxP3⁺ Treg Zellen sind keine homogene Population. Nicht alle Zellen, die FoxP3 exprimieren, können Effektor T Zellen supprimieren.

CD4⁺FoxP3⁺ regulatorische T Zellen schützen vor spontan auftretender EAE bei Mäusen, indem sie die Aktivierung von myelinspezifischen T Zellen in der Peripherie unterdrücken [64]. Bei Blutanalysen von MS Patienten, zeigte sich eine fehlerhafte Funktion der regulatorischen T Zellen, nicht aber eine Änderung ihrer Häufigkeit [65-67]. Möglicherweise unterdrücken die regulatorischen T Zellen der MS Patienten die Aktivierung autoreaktiver T Zellen ineffektiver, als die von Gesunden [68, 69].

Regulatorische T Zellen regulieren neben den T Zellen auch die T Zell abhängige B Zell Antwort [70, 71]. Desweiteren supprimieren sie die Proliferation und Zytokinproduktion (IFN- γ , IL-4, IL-13 und IL-10) von

natürlichen Killer T Zellen [72] sowie die Zytotoxizität von NK-Zellen [73] und die proinflammatorische Aktivität von Monozyten, Makrophagen [74] und dendritischen Zellen [75].

1.4 Oberflächenglykosylierung

Lipide und Proteine der Zellmembran sind oft mit Kohlenhydratresten verknüpft, die in ihrer Gesamtheit die Oberflächenglykosylierung der Zelle bilden. Ort der Glykosylierung ist das Endoplasmatische Retikulum, der Golgi-Apparat und das Zytosol. Je nach Verknüpfung werden N- und O-glykosidische Modifikationen unterschieden [76]. Lektine sind Proteine, die spezifisch an bestimmte Kohlenhydratstrukturen binden [77] und so eine Identifizierung der glykosylierten Proteine auf Immunzellen ermöglichen.

Die Oberflächenglykosylierung moduliert viele Aspekte der Lymphozytenfunktion. So sind N-Acetylneuraminsäurereste auf der Oberfläche von T Zellen an der Regulation der T Zell Apoptose [78] und der Interaktion zwischen T Zelle und Antigen-präsentierender Zelle (APC) beteiligt [79, 80].

Die terminalen N-Acetylneuraminsäurerest als Komponenten der T Zell Glykoproteine sind vor allem Sia α (2,3)Gal/GalNAc und Sia α (2,6)Gal/GalNAc verknüpft [81].

1.4.1 PHA-L

Phaseolus vulgaris leukoagglutinin ist ein pflanzliches Lektin und wird aus der Phaseolus vulgaris, der Gartenbohne gewonnen. Es bindet spezifisch an β 1,6GlcNAc-verzweigte N-Glykane und dient so dem Nachweis der N-Oberflächenglykosylierung. Diese ist das Endprodukt eines Prozesses der N-Glykosylierung und entsteht unter anderem durch die Golgi-Apparatenzyme Mgat1 und /oder Mgat5 sowie der α -1,2 Mannosidase [82]. Beeinflusst wird dieser Prozess durch verschiedene Umweltbedingungen, genetische

Variationen des IL-7 und IL-2 Rezeptors, der Mgat1, des CTLA-4 und durch Vitamin D, das als Substrat im Enzymprozess fungiert [83].

Der N-Glykosylierungsgrad beeinflusst seinerseits die Funktion von Proteinen und den Aktivitätsgrad von Zellen. Er spielt eine Schlüsselrolle bei der Immunreaktion [84] und ist mitverantwortlich für T zellvermittelte Prozesse, wie Aktivierung, Differenzierung und Homing [85]. Zum Beispiel ist der TCR in der Regel stark N-glykosyliert. Wenn er aber aufgrund eines Gendefektes nicht N-glykosyliert ist, zeigt sich bei Mäusen eine Hyperreagibilität ihres Immunsystems. Ein Fehlen der Mgat5 führt zu verstärktem TCR-Signaling und einem Auftreten von Autoimmunerkrankungen in vivo [86]. Auf der anderen Seite ist bei organtransplantierten Patienten die α -1,2-Mannosidase stark exprimiert und bei der Induktion und dem Aufrechterhalten der Toleranz gegenüber Alloantigenen in vivo beteiligt [87].

Zudem gibt es Hinweise, dass die N-Glykosylierung das Risiko zur Entwicklung einer MS beeinflusst. Eine Herabregulierung von Mgat1 steigert das MS Risiko, während die Aktivität von Mgat1 und Vitamin-D3 das MS Risiko reduzieren [83].

Die Anzahl an N-Glykanen ist genetisch codiert, dagegen ist die Verzweigung abhängig von der Aktivität der Golgi- α -mannosidase, den N-Acetylglukosamintransferasen (Mgat1, 2, 4 und 5) und dem Hexosamin Stoffwechselweg [88, 89].

1.4.2 MAL

Maackia amurensis leukagglutinin (MAL) wird aus der Maackia amurensis, dem Asiatischen Gelholz gewonnen. Es bindet an α 2,3 N-Acetylneuraminsäure verknüpfte Galaktosereste (Neu5Ac/Gc α 2,3Gal β 1,4Glc(NAc)) [90]. Das Lektin benötigt drei intakte Zucker und interagiert weder wenn die β -1,4 Verknüpfung durch eine β -1,3 Verknüpfung ersetzt wurde, noch wenn der zu reduzierende Zucker bereits reduziert wurde [91]. Die α 2,3 Verknüpfung wird durch vier Sialyltransferasen mit unterschiedlicher Spezifität für N-Glykosylierung, O-Glykosylierung und Lipid-Glykosylierung produziert [92].

Erkenntnisse über die funktionelle Bedeutung von Sia α 2,3Gal/GalNAc in T Zellen erhielt man durch Studien mit ST3Gal-I defizienten Mäusen. Dabei zeigte sich, dass das Enzym und sein α 2,3 Produkt durch Modulation der O-Glycanbiosynthese die Aktivität von CD8+ T Zellen kontrollieren [78, 93]. Sia α 2,3Gal/GalNAc Reste auf Proteinen, welche noch identifiziert werden müssen, hemmen die Expression von CD69 und CD25, sowie die Produktion von IL-2 und IFN- γ durch CD4+ T Zellen älterer Mäuse [94].

Die MAL Bindung auf CD4 Zellen nimmt mit steigendem Zellalter zu [95].

1.4.3 SNL

Elderberry lectin wird aus der Sambucus nigra Pflanze, dem Schwarzen Holunder gewonnen. Es bindet spezifisch an α 2,3 und an α 2,6 N-Acetylneuraminsäure verknüpfte Galactose (Neu5Ac α 2-3Gal(NAc)-R.).

Die Sia α 2,6 Gal/GalNAc Verknüpfung, welche weniger stark ausgeprägt ist als die α 2,3 Verknüpfung in T Lymphozyten, geht auf das Enzym ST6Gal zurück [96]. Man geht davon aus, dass ST6Gal in den T Lymphozyten die Apoptose verhindert durch die Sialysierung der Galaktosereste auf CD43 und CD45, welche an der Bindung an Galectin-1 beteiligt sind [97].

Außerdem konnte im Mausmodell gezeigt werden, dass die SNL-Bindung unter Entzündungsbedingungen wie der EAE und der Rheumatoiden Arthritis stark zunimmt [98, 99]. Um die Bedeutung von Sialoadhesinen zu ermitteln wurden Versuche mit Sialoadhesin-defizienten Mäusen durchgeführt. Diese Mäuse sind lebensfähig und gesund, allerdings erkrankten sie weniger schwer an T-zellvermittelten Autoimmunerkrankungen [100]. Dies lässt vermuten, dass Sialoadhesine eine proinflammatorische Bedeutung haben.

Die SNL Bindung auf der Zelloberfläche von CD4+ Zellen sinkt mit steigendem Alter. Dieser Rückgang ist unabhängig vom Übergang naiver T Zellen zu Gedächtnis T Zellen [95].

1.4.4 UEA

Ulex europeus agglutinin wird aus der Ulex europaeus, dem Stechginster gewonnen. Es bindet stark an α 1,2 verknüpfte Fruktosereste. [101] (Fruktose Fuca1-2Gal-R.)

2 Fragestellung

In dieser Arbeit wurden die folgende Fragen untersucht:

1. Wie verhält sich die N-Oberflächenglykosylierung auf CD4+FoxP3- Effektor T Zellen und CD4+FoxP3+ regulatorischen T Zellen?
2. Unterscheiden sich MS Patienten unter Natalizumab Therapie und gesunde Kontrollen hinsichtlich der N-Oberflächenglykosylierung auf peripheren Immunzellen?
3. Wie unterscheidet sich die N-Oberflächenglykosylierung auf Th1, Th2 und Th17 Zellen?
4. Ändert sich die N-Oberflächenglykosylierung von T Helfer Zellen durch Aktivierung?
5. Lässt sich die N-Oberflächenglykosylierung von regulatorischen T Zellen durch Hemmung der α -1,2-Mannosidase reduzieren?
6. Hat die Hemmung der N-Oberflächenglykosylierung von CD4+FoxP3+ regulatorischen T Zellen Auswirkungen auf die Funktion der Zellen?

3 Material und Methoden

Es folgt zunächst eine Auflistung der bei den Versuchen verwendeten Geräte und Materialien in Tabellenform sowie die Zusammensetzung der in den Versuchen verwendeten Lösungen.

3.1 Verwendetes Material

3.1.1 Laborgeräte

Tabelle 3.1: Verwendete Laborgeräte

Auflichtmikroskop Wilovert A	A Hund, Wetzlar
Kühlzentrifuge Heraeus Megafuge 1.0 R	Kendro Laboratory Products GmbH, Hanaus
Kühl-/Gefrierkombination glassline	Liebherr-Holding GmbH, Biberach an der Riss
S1-Biogard-Hood, Modell B60-112	The Baker Co. Inc., Sanford, Maine
CO ₂ Water-Jacketed Incubator	Nuaire US Autoflow
Neubauer-Zählkammer, improved, Bright Line, 0,100mm Tiefe	Glaswarenfabrik Karl Hecht KG „Assistent“, Sondheim/Rhön
Vortex Genie 2™	Bender & Hobein AG, Zürich, Schweiz
FACS CyAn™ ADP	Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland
Eppendorf-Pipetten (verschiedene Volumina und Ausführungen)	Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, Wesseling-Berzdorf
Sterilisator, A16/50, BJ 1922, Inh. 14,6ltr	WEBECO, Selmsdorf, Deutschland
Elektrische Eppendorf-Pipette „Easypet“	Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, Wesseling-Berzdorf
Gilson-Pipetten, Pipetman (verschiedene Volumina)	Gilson, Inc., Middleton, USA
MACS Multi Stand	Miltenyi Biotec Inc, Auburn (USA)
Analysewaage	Satorius, Göttingen

3.1.2 Antikörper

Tabelle 3.2: Verwendete Antikörper

AK	Klon	Fluoreszenz	Konzentration	Hersteller
CD25	BC96	FITC	12,5 µg/ml	Biologend
CD8	RPA-T8	APC	20 µl/Test	BD-Biosciences
lfn Gamma	4SB3	PE	0,2 mg/ml	eBioscience
II17A	BL168	PE	12,5 µg/ml	Biologend
II4	8D4-8	PE	0,2 mg/ml	eBioscience
CD8a	HIT8a	PE	5 µl/Test	eBioscience
Streptavidin	-	Pacific-Blue	1 mg/ml	Invitrogen

CD69	FN50	FITC	25 µg/ml	Biolegend
CD4	RPA-T4	APC	5 ul/Test	eBioscience
AntiFoxP3	PCH101	PE	5 ul/Test	eBioscience
Normal Rat-Serum	-	-	-	eBioscience
CD25	4E3 (gegen Epitop B)	PE	Keine Angabe des Herstellers, durch Hersteller vorgeschlagene Verdünnung bei gleichzeitiger CD25-Microbead-Markierung 1:6 für bis zu 10 ⁷ Zellen	Miltenyi Biotec
Anti-Human CD3	OKT3	Purified	1 mg/ml	eBioscience
Anti-Human CD28	CD28.2	Purified	1 mg/ml	eBioscience

3.1.3 Lektine

Tabelle 2.3: Verwendete Lektine

Lektin	Klon	Fluoreszenz	Konzentration	Hersteller
SNL (Elderberry Bark Lectin)	B-1305	Biotinylated	2 mg/ml	Vector
MAL (Maackia Amurensis Lectin II)	B-1265	Biotinylated	1 mg/ml	Vector
PHA-L (Phaseolus vulgaris Leucoagglutinin)	B-1115	Biotinylated	2 mg/ml	Vector
Anti-UEA-I	BAL-22012	Biotinylated	1 mg/ml	Vector

3.1.4 Chemikalien

Tabelle 3.4: Verwendete Chemikalien

Chemikalie / Lösung	Firma
PBS: Dulbecco's PBS (1x) without Ca & Mg, steril	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Austria
LSM 1077 Lymphocyte Separation Medium	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Austria
NaN ₃ 10%	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Bovine Serum Albumine (BSA) pH 7,0	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Austria
NH ₄ Cl	SIGMA Chemical Co., St. Louis, USA
KHCO ₃	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
EDTA	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

Formaldehyd	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium) 12440 (1x) & L-Glutamine, 25mM HEPES GIBCO®	Invitrogen, Auckland, NZ
6-Mercaptoethanol, 50mM GIBCO®	Invitrogen, Auckland, NZ
Inaktiviertes FCS	
Penicillin/Streptomycin (10.000 U/ml Penicillin & 10.000 µg/ml Streptomycin) GIBCO®	Invitrogen, Auckland, NZ
DMSO (Dimethylsulfoxide) C ₂ H ₆ OS, Research Grade	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Monensin sodium salt (2mM)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
PMA (Phorbol-12-myristate-13-acetate) 1mg/ml (Purity 99,07%), Calbiochem®	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Ionomycin, Calcium Salt (2mM), Streptomyces conglobatus, Calbiochem®	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Kifunensine K1140 1MG (10mM); ≥ 98% (NMR),	SIGMA Chemical Co., St. Louis, USA
FoxP3 Fixation/Permeabilization: Permeabilisation Buffer (10x)	eBioscience, San Diego, CA
FoxP3 Fixation/Permeabilization: Concentrate	eBioscience, San Diego, CA
FoxP3 Fixation/Permeabilization: Diluent	eBioscience, San Diego, CA
BD PermWash™ (10x)	BD Biosciences, San Diego, USA
Cytofix/Cytoperm™ Fixation and Permeabilization Solution (1x)	BD Biosciences, San Diego, USA
TrypanBlue Solution (0,4%)	SIGMA Chemical Co., St. Louis, USA
CuSO ₄	SIGMA Chemical Co., St. Louis, USA
Carboxyfluorescein-succinimidylester	Molecular Probes®, Invitrogen, Auckland, NZ

3.1.5 Einwegmaterial

Tabelle 3.5: Verwendetes Einwegmaterial

15 ml Tube CELLSTAR®	Greiner bio-one, Frickenhausen
50 ml Tube CELLSTAR®	Greiner bio-one, Frickenhausen
96-well Zellkulturplatten U-Bottom, mit Deckel, CELLSTAR®	Greiner bio-one, Frickenhausen
96-well Zellkulturplatten Flat-Bottom, mit Deckel, Falcon®	Becton Dickison Labware, Franklin Lakes (USA)
Zellsieb, steril 70µm	BD Biosciences, Durham (USA)
Eppendorf-Cups	Greiner bio-one, Frickenhausen
Parafilm	Pechiney, Plastic Packaging Menasha (USA)
Pipettenspitzen, verschiedene Größen	Sarstedt, Nümbrecht
FACS-Tubes (PP-Tubes 1,3ml 8,55/44MM)	Greiner bio-one, Frickenhausen
Serologische Pipette Falcon® verschiedene Volumina	Becton Dickison Labware, Franklin Lakes (USA)

Serologische Pipette costar® verschiedene Volumina	Corning Incorporated, Corning (USA)
Petrischalen, steril, 60*15mm	Greiner bio-one, Frickenhausen
Spritze, 2ml, BD PlastipakTM	Becton Dickison, Madrid (Spain)
Latex-Handschuhe, verschiedene Größen	Ansell, Tamworth (UK)
EDTA KE/9ml Monovette®	Sarstedt, Nümbrecht
Safety-Multifly®-Set	Sarstedt, Nümbrecht
MACS-Separation-Collums (LS, MS, LD)	Miltenyi Biotec Inc, Auburn (USA)
BD Microlance 3 Needles	BD Bioscences, Durham (USA)
Pasteurpipetten, Einweg, 3ml	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
MACS Separation Column LS, steril	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch-Gladbach, Deutschland
CD4+CD25+Regulatory T-Cell Isolation Kit human: Biotin-Antibody-Cocktail (Anti-CD8, -CD14, -CD16, -CD19, -CD36, -CD36, -CD56, -CD123, -TCR γ/δ , -CD235a(glycophorinA) Anti-Biotin Microbeads Anti-CD25 Microbeads	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch-Gladbach, Deutschland

3.1.6 Lösungen und ihre Zusammensetzung

Tabelle 3.6: Verwendete Lösungen und ihre Zusammensetzung

Fixierlösung	280 μ l Formaldehyd 10 ml PBS
eBioscience - Fixation/Permeabilization-Solution[102]	1 x Concentrate 3 x Diluent
eBioscience - Permeabilization Buffer [102]	1 x Permeabilization Buffer 9 x Aqua Dest.
FACS-Puffer	500 ml PBS 5 g BSA 1 ml NaN ₃
ACK-Lysis-Puffer	45 g NH ₄ Cl 5 g KHCO ₃ 185 mg EDTA mit destilliertes Wasser auf 400 ml auffüllen mit 1 M NaOH auf pH 7,3 einstellen mit destilliertem Wasser auf 500 ml auffüllen
IMDM-10	90 ml IMDM-12440 10 ml Fetal-calf-serum 0,1 ml 6-Mercaptoethanol 1 ml Streptomycin/Penicillin

3.2 Methoden

Alle Zentrifugationsschritte, im Folgenden auch als „Waschschritte“ bezeichnet,

wurden bei 4°C fünf Minuten mit 1400 rpm durchgeführt. Gewaschen wurde, wenn nicht anders beschrieben mit 180 µl FACS-Puffer.

3.2.1 Blutspender und Patienten

Zur Isolierung mononukleärer Zellen wurde das Vollblut gesunder Probanden sowie von MS Patienten der Neurologischen Ambulanz der Universitätsklinik Tübingen verwendet. Alle Versuchspersonen wurden über den Versuch aufgeklärt und haben in diesen eingewilligt. Die Blutabnahme erfolgte 4 Wochen nach Natalizumabgabe.

3.2.2 Isolierung von Lymphozyten aus humanem Blut

Den Probanden wurde 9 ml Blut mittels einer Butterflynadel in ein EDTA Röhrchen entnommen. Die Auftrennung der Zellen erfolgte mit Hilfe der Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation nach dem Protokoll von PAA [103]. Das Blut wurde dabei mit PBS-Puffer auf 30 ml verdünnt und auf 15 ml Lymphozyten Separationsmedium (LSM) geschichtet. Danach wurde das 50 ml Falconröhrchen bei 22°C für 35 min mit 2200 rpm zentrifugiert. Um ein Vermischen der aufgetrennten Phasen zu vermeiden wurde auf die Zentrifugationsbremse verzichtet. Das Ficoll hat eine Dichte $D = 1,077 \text{ g/ml}$. Diese ist damit größer als die der Lymphozyten, Monozyten und Thrombozyten aber geringer als die von Erythrozyten. Nach der Zentrifugation befindet sich am Boden des Falconröhrchens ein Pellet aus Erythrozyten, darauf das Ficoll-Hypaque auf dem dann die Interphase aus mononukleärer Zellen (Monozyten und Lymphozyten) ruht. Diese Interphase wurde abpipettiert. Darüber befindet sich Plasma mit Thrombozyten. Die isolierten Zellen wurden nun zweimal gewaschen und mit Erythrozytenlysepuffer behandelt, um letzte Erythrozyten zu eliminieren. Dazu wurden die Zellen in 10 ml ACK Lysis-Puffer resuspendiert und für 5 min bei Zimmertemperatur inkubiert.

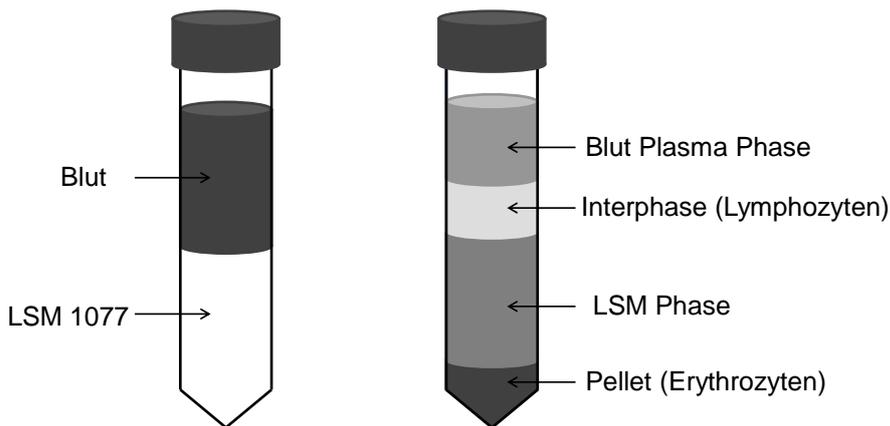


Abbildung 1: Blut vor und nach der Zentrifugation. Abbildung modifiziert [103]

3.2.3 Bestimmung der Gesamtzellzahl mit Hilfe der Neubauer Zählkammer

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden die isolierten Zellen in 10 ml PBS-Puffer resuspendiert. 20 µl der Zellsuspension wurden mit 20 µl Trypanblau angefärbt. Die so entstandene 1:1 Verdünnung wurde durch Ansetzen der Pipettenspitze an die Kante der Zählkammer von den Kapillarkräften zwischen Deckglas und Kammer gesaugt. Eine Neubauer Zählkammer besteht aus vier Quadranten, jeder mit einem Volumen von 0,1 µl. Die Zellen pro Quadrant wurden jeweils gezählt. Anschließend wurde der Mittelwert gebildet und dieser mit 2×10^4 multipliziert. So erhielt man die Anzahl der Zellen pro ml in der 10 ml Suspension. In ein Well wurden je 500 000 Zellen gesetzt.

3.2.4 Fluoreszenzmarkierung von Zellen mit Antikörpern

Extrazelluläre Fluoreszenzmarkierung: Die Zellen wurden in 50 µl Ivig® (1:500 verdünnt mit FACS-Puffer) für 10 min inkubiert. Dies wurde anschließend abzentrifugiert und in 50 µl Antikörper-FACS-Puffer-Mischung resuspendiert. Ivig® vermindert als Fc-Block die unspezifische Bindung von Antikörpern.

Antikörper für die extrazelluläre Fluoreszenzmarkierung sind zum einen direkt gelabelt: CD4 APC, CD25 FITC, zum anderen Lektine MAL, SNL, UEA und PHA-L. Bei den Lektinen ist ein weiterer Färbeschritt nötig. Sie sind biotinyliert,

sodass Streptavidin-gekoppeltes Pacific Blue als Fluoreszenzmarkierung binden kann.

Alle Antikörper mussten für jeweils eine halbe Stunde bei 4°C im Dunkeln inkubieren. Anschließend wurden sie zweimal gewaschen. Nach Färbung mit biotinylierten Lektinen erfolgte noch die Färbung mit Streptavidin-Pacific-Blue ebenfalls mit einer Inkubation von 30 min. und anschließendem Waschen.

Intrazelluläre Fluoreszenzmarkierung: Hier ist zunächst eine Permeabilisierung der Zellen notwendig [102]. Die extrazelluläre Fluoreszenzmarkierung muss vor diesem Schritt erfolgt sein.

Zur Permeabilisierung der Zellen wurden diese in der Fixation/Permeabilization-Solution für eine Stunde bei 4°C im Dunkeln inkubiert, anschließend zweimal mit Permeabilization Buffer gewaschen. Zur Blockierung der Fc-Rezeptoren wurden die Zellen mit 2 % KIOVIG Immunglobulinen, für 5 min inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit den Antikörpern gegen FoxP3 oder Ifn- γ , IL-4, IL-17 für 30 min bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Zum Schluss wurde die Zellsuspension zweimal mit dem Permeabilization Buffer gewaschen.

3.2.5 Antikörperkonzentrationen

Die für eine Fluoreszenzmarkierung notwendige Antikörperkonzentration wurde mit Hilfe von Verdünnungsreihen ermittelt. Dabei wurden die Lymphozyten mit unterschiedlichen Konzentrationen des jeweiligen Antikörpers gefärbt.

Tabelle 3.7: Verdünnungen einzelner Antikörper bei 50 μ l Gesamtvolumen

Antikörper:	Konzentration:
Ivig	1:500
CD4 APC	1:400
CD8 PE	1:100
CD25 FITC	1:10
CD25 PE	1:10
CD69	1:100
IL-17	1:100
IL-4	1:100
IFN- γ	1:100
FoxP3 PE	1:200

MAL	1:100
SNL	1:300
UEA	1:450
PHA-L	1:200
Streptavidin	1:100

3.2.6 Interleukin und Interferonfluoreszenzmarkierung

Für die IL-4, IL-17 und IFN- γ Fluoreszenzmarkierung mussten die Zellen zunächst stimuliert werden, da die Zellen erst durch die unspezifische Stimulation zur Zytokinproduktion angeregt werden. Dabei wurden 500 000 Zellen zusammen mit 190 μ l Medium, 0,4 μ l PMA [0,1 μ g/l], 0,2 μ l Ionomycin [0,2 mM] sowie 0,2 μ l Monensin [0,2 mM] in einem Well inkubiert, bei 37°C für 4 Stunden bei Dunkelheit.

Die Konzentrationen sowie die Inkubationsdauer wurden in Vorversuchen durch Verdünnungsreihen ermittelt.

3.2.7 Inkubation der Zellen mit Kifunensin

Um die α -1,2-Mannosidase zu hemmen, mussten die Zellen für 48 Stunden mit 198 μ l Nährmedium und 2 μ l Kifunensin [1mM] bei 37 °C inkubiert werden.

Die α -1,2-Mannosidase ist ein Schlüsselenzym im Prozess der N-Oberflächenglykosylierung. Anschließend wurden die Lymphozyten zweimal gewaschen und wie unter 3.2.4 beschrieben markiert.

3.2.8 Zellseparation

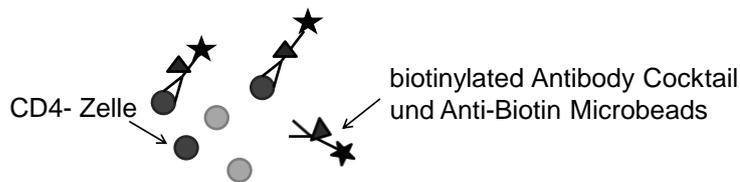
Zur Isolierung von definierten Zellpopulationen, den CD4+CD25- Effektor T Zellen und den CD4+CD25+ regulatorischen T Zellen aus einem Zellgemisch wurde die Methode der magnetischen Zellseparation angewendet [104].

Das Prinzip der magnetischen Zellseparation beruht dabei auf der magnetischen Markierung einzelner Zelltypen mit Microbeads und der anschließenden Auftrennung, durch eine Magnetsäule. Die Trennsäule hält die markierten Zellen fest während die unmarkierten Zellen ungehindert durchlaufen können. Sie enthält eine Matrix aus Stahlwolle.

Zuerst wurden die CD4+ T Zellen mittels einer Negativ-Separation isoliert und anschließend durch eine Positiv-Separation weiter in CD25+ und CD25- Zellen unterteilt.

Dabei wurden die mononukleären Zellen zunächst wie unter 3.2.2 beschrieben isoliert. Die nun folgenden Angaben beziehen sich auf eine Zellzahl von 10^7 Zellen. Ausgezählt wurden die Zellen mittels der Neubauer Zählkammer. In ein 15 ml Falcon Röhrchen wurden 10^7 Zellen in PBS-Puffer resuspendiert. Anschließend wurden sie bei 5 min, 1400 rpm und 5 °C abzentrifugiert. Der Überstand wurde aspiriert und verworfen. Das Pellet wurde in 90 µl PBS resuspendiert und für 10 min mit 10 µl CD4+ T Cell Biotin-Antibody Cocktail bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden 20 µl Anti-Biotin Micro-Beads zugefügt und für weitere 15 min im Kühlschrank inkubiert. Dabei wurden alle CD4- Zellen mit Microbeads markiert. Danach wurde die Zellsuspension gewaschen. Dazu wurde sie in 1-2 ml PBS suspendiert und anschließend 5 min bei 1400 rpm und 5°C zentrifugiert. Der Überstand wurde aspiriert. Das Pellet wurde in 500 µl PBS-Puffer aufgenommen und anschließend auf eine Säule gegeben, durch die davor 2 ml PBS-Puffer gelaufen sind. Die Zellsuspension lief nun durch die Stahlwollematrix der Säule, die sich in einem starken Magnetfeld befand. Dabei wurden die CD4- Zellen in der Säule festgehalten, während die CD4+ Zellen die Säule ungehindert passierten. Sie wurden in einem 15 ml Falconröhrchen gesammelt. (Negativ Separation)

1. Magnetische Markierung der CD4⁻ Zellen:



2. Magnetische Separation:

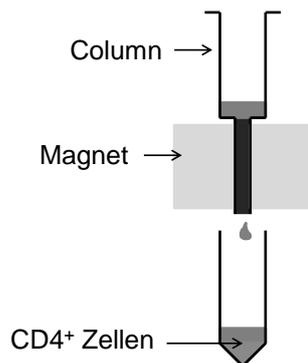
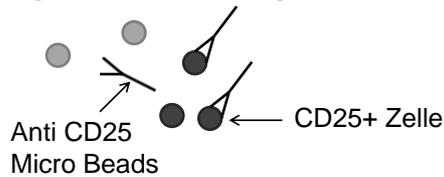


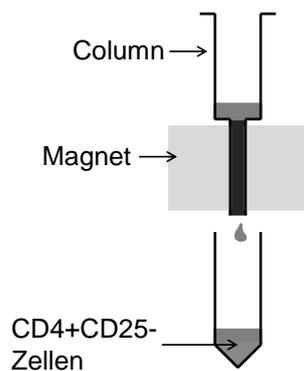
Abbildung 2: Prinzip der Negativ Separation mit MACS Beads, Quelle: Miltenyi Biotec [105] modifiziert

Die ungelabelten CD4⁺Zellen in PBS wurden 5min zentrifugiert bei 1400 rpm und 5 °C. Der Überstand wurde aspiriert, das Pellet in 90 µl PBS resuspendiert und mit 10 µl CD25 Micro Beads bei 5 °C im Dunkeln für 15 min inkubiert. Danach wurde die Reaktion mit 1-2 ml PBS-Puffer abgestoppt und die Suspension abzentrifugiert. Die Zellen wurden auf eine Säule gegeben, die die magnetisierten CD25⁺Zellen festhielt, während die CD4⁺CD25⁻ Zellen ungehindert passieren konnten und unten im Falcon Röhrchen aufgefangen wurden. Dieser Vorgang wurde einmal wiederholt um die Reinheit zu vergrößern, und die Säule danach zweimal gewaschen, damit möglichst alle CD25⁻ Zellen im Falconröhrchen landen. Anschließend wurde die Säule aus dem Magneten genommen und mit PBS-Puffer aufgefüllt. Mit einem Kolben wurde der Puffer durch die Säue gedrückt und die CD4⁺CD25⁺Zellen ausgeschwemmt und in einem Falconröhrchen aufgefangen. (Positiv Separation)

1. Magnetische Markierung der CD25+ Zellen:



2. Magnetische Separation:



3. Auswaschen der Zellen:

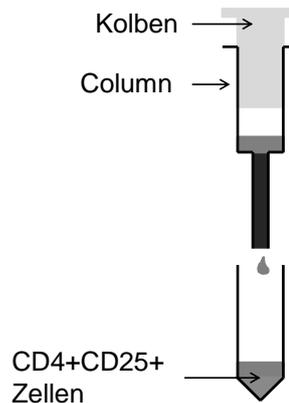


Abbildung 3: Prinzip der Positiv Separation, Quelle: Miltenyi Biotec [105], modifiziert

3.2.9 Stimulation von Zellen mit anti CD3 und anti CD28

Zur Stimulation der Zellen wurden diese zusammen mit 1 μ l anti-CD3 und 1 μ l anti-CD28 in 198 μ l Nährmedium aufgenommen und für 3 Tage bei 37°C im Dunkeln inkubiert.

Die Konzentrationen von anti-CD3 und anti-CD28 wurden jeweils durch Verdünnungsreihen ermittelt.

3.2.10 CFSE Färbung

Die CFSE Färbung eignet sich zur Darstellung der Proliferation von Zellen in Kultur. Dabei werden die Zellen vor Beginn der Inkubation mit CFSE markiert.

CFSE wurde dafür zunächst auf 500 μ M mit DMSO verdünnt. Bis zu 10^7 Zellen wurden in 100 μ l PBS aufgenommen und mit 1 μ l CFSE 500 μ M für 3 min bei 37°C inkubiert, danach wurde die Inkubation mit 1 ml PBS gestoppt.

Anschließend wurden die Zellen für 5 min bei 1400 rpm, 4°C abzentrifugiert und zweimal gewaschen. Zum Schluss wurden sie in 200 µl Medium aufgenommen.

CFSE ist membrangängig und bindet in der Zelle an freie Amine zytoplasmatischer Proteine ohne die Zellfunktion zu beeinträchtigen. Jede Zelle gibt ihr CFSE im gleichen Verhältnis an ihre Tochterzellen weiter, so dass jede Generation eine eigene im Vergleich zur Mutterzelle abgeschwächte Fluoreszenzintensität zeigt und dadurch indirekt auf die Anzahl Teilungen geschlossen werden kann.

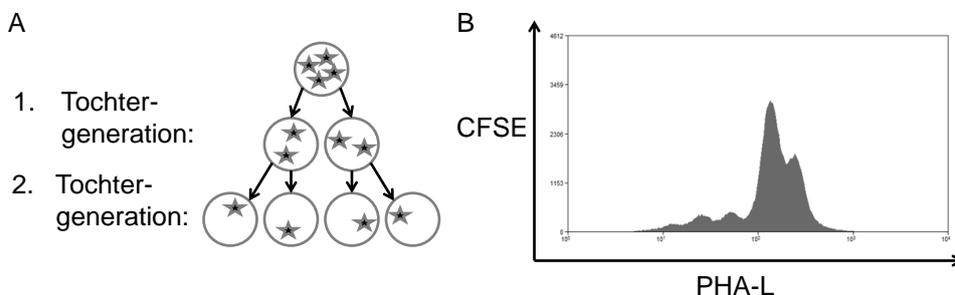


Abbildung 4: Prinzip der CFSE Färbung

B: CFSE markierter CD4+FoxP3- Zellen nach 3 Tagen Kultur und Stimulation mit CD3 und CD28

Um das FACS-Gerät richtig einzustellen, wurden vor Beginn der Inkubation unstimulierte und damit ungeteilte Zellen CFSE markiert und gemessen. Dabei wurde das Gerät so geeicht, dass der Peak im FITC-Kanal rechts außen zu liegen kommt. Der Peak stammt von der Anfangspopulation, die das stärkste CFSE Signal zeigt.

3.2.11 In vitro Stimulationsassay

Zunächst wurden die CD4+CD25- Effektor T Zellen isoliert, mit CFSE markiert und zusammen mit den isolierten CD4+CD25+ regulatorischen T Zellen in Kultur gegeben. Stimuliert wurde mit anti-CD3 und anti-CD28 für 72 Stunden

bei 37°C im Dunkeln, siehe 3.2.9. Das Verhältnis regulatorischer T Zellen zu Effektor T Zellen betrug 1:3.

Bei den regulatorischen T Zellen wurde die alpha-1,2-Mannosidase bereits im Vorfeld durch eine Inkubation mit Kifunensin für 48 Stunden bei 37°C gehemmt. Im Kontrollansatz wurde diese nur mit PBS inkubiert.

3.2.12 FACS Gerät und FACS Messung

Bei der Durchflußzytometrie (FACS = Fluorescence activated cell sorting) werden Zellen, die sich in Suspension befinden, in einem kapillaren Strom einzeln von einem Laser bestrahlt und das von den Zellen emittierte Licht mittels verschiedener Photomultiplier gemessen. Dabei wird das durch die Zellen durchtretende Licht (FSC), das im rechten Winkel reflektierte Licht (SSC) und das in charakteristischen Frequenzen emittierte Licht von Fluorochromen, die sich in oder auf den Zellen befinden (FL-1, FL-2, etc.) gemessen. Mit Hilfe von fluoreszenz-markierten Antikörpern können so Oberflächenmoleküle und intrazelluläre Proteine von einzelnen Zellen einer Zellpopulation quantitativ erfasst werden. Dargestellt werden die Fluoreszenzen in zweidimensionalen Punktdiagrammen, den Dotplots und in eindimensionalen Histogrammen.

Zuerst wurde eine Leerprobe aus ungefärbten Zellen pro Messreihe durchflußzytometrisch analysiert und in einem Dotplot aus FSC und SSC dargestellt um die Messbereiche der Laser festzulegen. Die zu untersuchende Zellpopulation wurde eingegated. Wird nun die nächste Probe, desselben Probanden mit gefärbten Zellen gefacst, dann werden in den einzelnen Dotplots die Fluoreszenzen der Antikörper sichtbar. Dabei werden die Zellzahl, die Zellgröße und die Intensität der gebundenen Antikörper dargestellt.

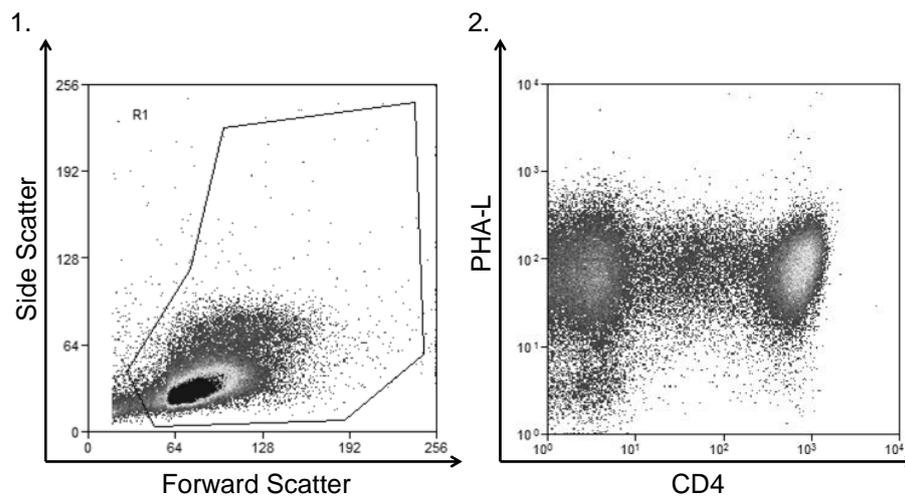


Abbildung 5: 1. FACS Darstellung der Lymphozyten in Gate R1 2. Darstellung der PHA-L Bindung und der CD4 Expression der Zellen von Gate R1

3.2.13 Auswertung der Daten

Die Daten wurden mit Hilfe der Software Summit (Dakocytomation) ausgewertet. SPSS und Excel dienen zur weiteren statistischen Auswertung.

Die Daten wurden stets zunächst auf Normalverteilung mit dem Shapiro-Wilk Test geprüft. Waren die Daten normalverteilt, konnten sie mit dem Student-T Test bei unabhängigen Stichproben verglichen werden. Bei fehlender Normalverteilung wurde auf andere Tests zurückgegriffen. Diese sind dann jeweils extra erwähnt.

4 Ergebnisse

4.1 Oberflächenglykosylierung auf Effektor T Zellen und regulatorischen T Zellen

Die Vorversuche beinhalteten die Antikörperkonzentrationsfindung mittels Verdünnungsreihen.

Beispielsweise wurden für die PHA-L Verdünnungsreihe mononukleäre Zellen mit verschiedenen PHA-L Konzentrationen gefärbt.

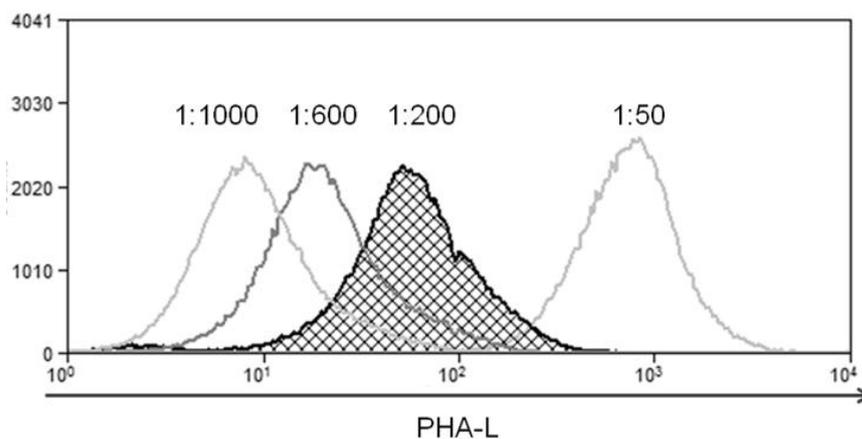


Abbildung 6: Verdünnungsreihe PHA-L

Durchflusszytometrische Analyse der PHA-L Bindung. Das Overlay zeigt die N-Glykosylierung bei den PHA-L Konzentrationen: 1:1000; 1:600; 1:200, 1:50. Wobei 1:200 die für die weiteren Versuche verwendete Konzentration ist.

4.1.1 α 2,3-Sialylierung auf regulatorischen T Zellen und Effektor T Zellen

Es wurden Proben gesunder Probanden verwendet. Die Proben wurden wie beschrieben aufbereitet und die gewonnenen Lymphozyten mit fluoreszenzgekoppeltem antiCD4 und antiFoxP3 zur Zelltypidentifizierung markiert.

Die α 2,3 Sialylierung wurde durch simultane Färbung mit dem Lektin MAL bestimmt und als Mittlere Fluoreszenz Intensität (MFI) angegeben. Die Messwerte sind nicht normalverteilt. Zum Vergleich der unabhängigen Stichproben wurde daher der nichtparametrische Mann-Whitney-U Test

verwendet. Es besteht kein statistisch signifikanter Unterschied der α 2,3-Sialylierung ($p=0,233$) zwischen CD4+FoxP3- Effektor T Zellen (Mittelwert: 8,85 SEM:1,02) und CD4+FoxP3+ regulatorischen T Zellen (Mittelwert:14,89 SEM: 2,92).

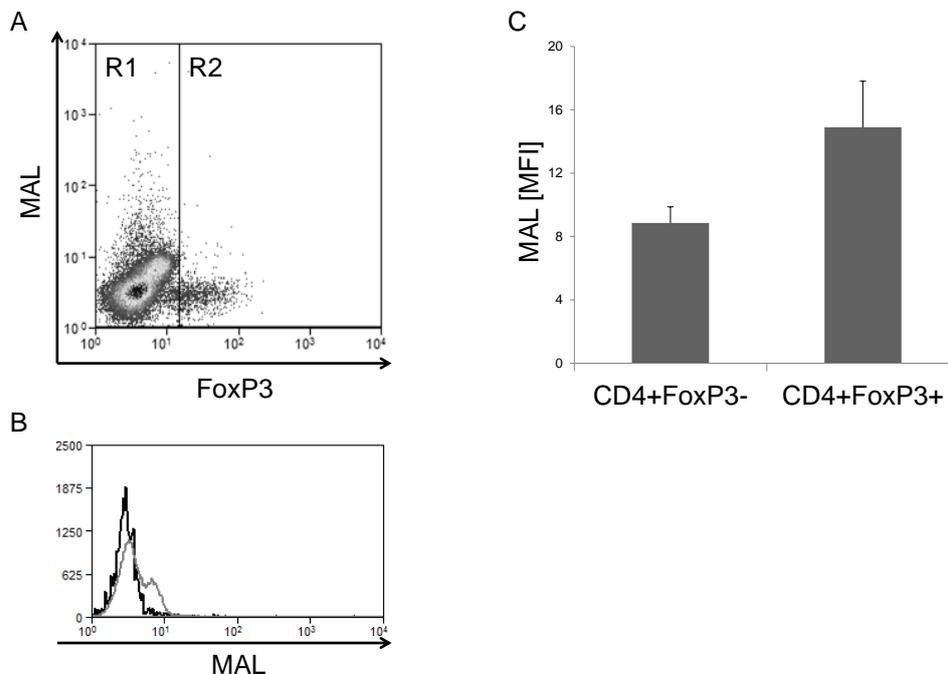


Abbildung 7: α 2,3-Sialylierung auf CD4+FoxP3- Effektor T Zellen und CD4+FoxP3+ regulatorischen T Zellen (n=15)

A und B: Durchflusszytometrische Analyse der α 2,3-Sialylierung auf Effektor T Zellen (R1) und regulatorischen T Zellen (R2). C: Diagramm: Gegenüberstellung von Effektor T Zellen und regulatorischen T Zellen jeweils mit Mittelwert der Fluoreszenzintensität (MFI) für MAL ($p=0,233$; Fehlerbalken entsprechen SEM)

4.1.2 α 2,6 Sialylierung von regulatorischen T Zellen und Effektor T Zellen

Die isolierten regulatorischen T Zellen und Effektor T Zellen wurden durch simultane Färbung mit dem Lektin SNL auf die α 2,6 Sialylierung untersucht. Die α 2,6 Sialylierung als Mittlere Fluoreszenz Intensität (MFI) angegeben. Die Messwerte sind normalverteilt. Es besteht kein signifikanter Unterschied der α 2,6 Sialylierung ($p=0,434$) zwischen CD4+FoxP3- Effektor T Zellen (Mittelwert: 514,86 SEM: 75,1) und CD4+FoxP3+ regulatorischen T Zellen (Mittelwert: 611,02 SEM: 95,18).

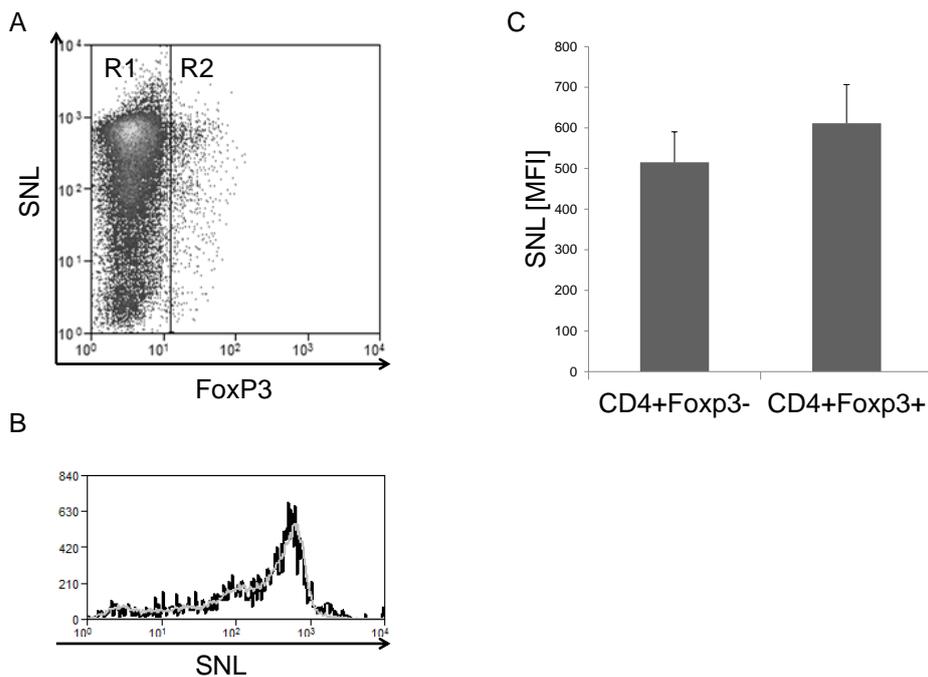


Abbildung 8: α 2,6 Sialylierung von CD4+FoxP3⁻ Effektor T Zellen und CD4+FoxP3⁺ regulatorischen T Zellen. (n=16)

A und B: Durchflusszytometrische Analyse der α 2,6 Sialylierung auf Effektor T Zellen (R1) und regulatorischen T Zellen (R2). C: Diagramm: Gegenüberstellung der Effektor T Zellen und regulatorischen T Zellen jeweils mit Mittelwert der Fluoreszenzintensität (MFI) für SNL ($p=0,434$; Fehlerbalken entsprechen SEM)

4.1.3 α 1,2 Glykosylierung von regulatorischen T Zellen und Effektor T Zellen

Die isolierten regulatorischen T Zellen und Effektor T Zellen wurden durch simultane Färbung mit dem Lektin UEA auf die α 1,2 Glykosylierung hin untersucht. Die α 1,2 Glykosylierung wurde als Mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) angegeben. Die Messwerte sind nicht normalverteilt. Zum Vergleich der unabhängigen Stichproben wurde der nichtparametrische Mann-Whitney-U Test verwendet. Es besteht kein statistisch signifikanter Unterschied der α 1,2 Glykosylierung ($p=1,000$) zwischen CD4+FoxP3⁻ Effektor T Zellen (Mittelwert:6,1 SEM:1,24) und CD4+FoxP3⁺ regulatorischen T Zellen (Mittelwert:5,46 SEM:0,86).

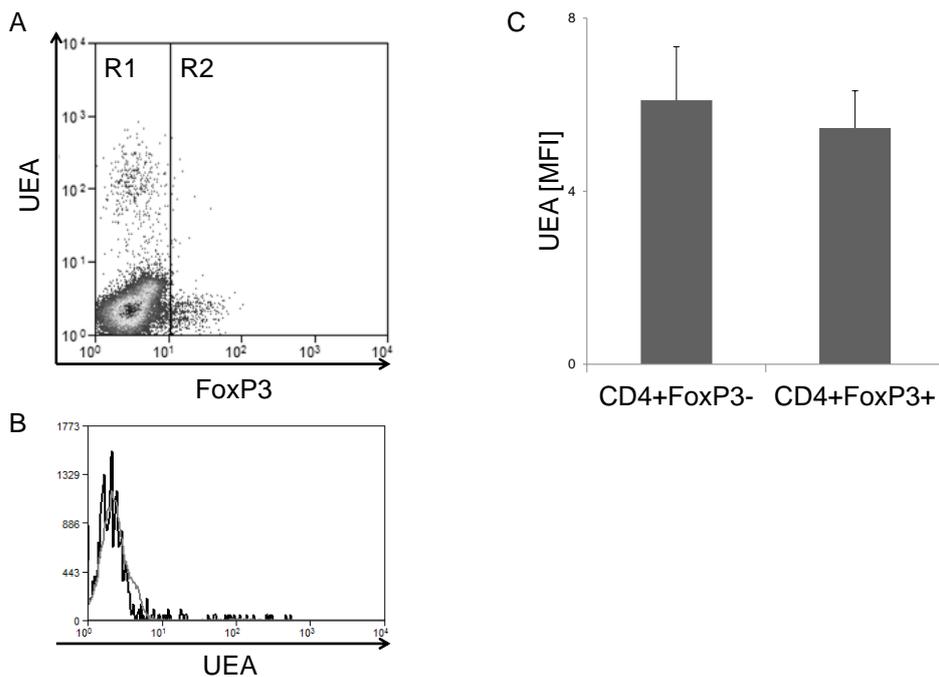


Abbildung 9: α 1,2 Glykosylierung von Effektor T Zellen und regulatorischen T Zellen (n=13).

A und B: Durchflusszytometrische Analyse der α 1,2 Glykosylierung auf CD4+FoxP3- Effektor T Zellen (R1) und CD4+FoxP3+ regulatorischen T Zellen (R2). C: Diagramm: Gegenüberstellung der α 1,2 Glykosylierung an Effektor T Zellen und regulatorischen T Zellen jeweils mit Mittelwert der Fluoreszenzintensität (MFI) für UEA ($p=1,000$; Fehlerbalken entsprechen SEM)

4.1.4 β 1,6 N-Glykosylierung von regulatorischen T Zellen und Effektor T Zellen

Es wurden Proben gesunder Probanden verwendet, die wie beschrieben aufbereitet wurden. So gewonnene Lymphozyten wurden mit fluoreszenzgekoppeltem antiCD4 und antiFoxP3 zur Zelltypidentifizierung markiert.

Die β 1,6 N-Oberflächenglykosylierung wurde durch simultane Färbung mit dem Lektin PHA-L bestimmt und als Mittlere Fluoreszenz Intensität (MFI) angegeben. Die Messwerte sind normalverteilt. Es besteht kein signifikanter Unterschied in der β 1,6 N-Glykosylierung ($p=0,088$) zwischen CD4+FoxP3- Effektor T Zellen (Mittelwert: 89,59 SEM: 3,33) und CD4+FoxP3+ regulatorischen T Zellen (Mittelwert: 103,39 SEM: 6,84).

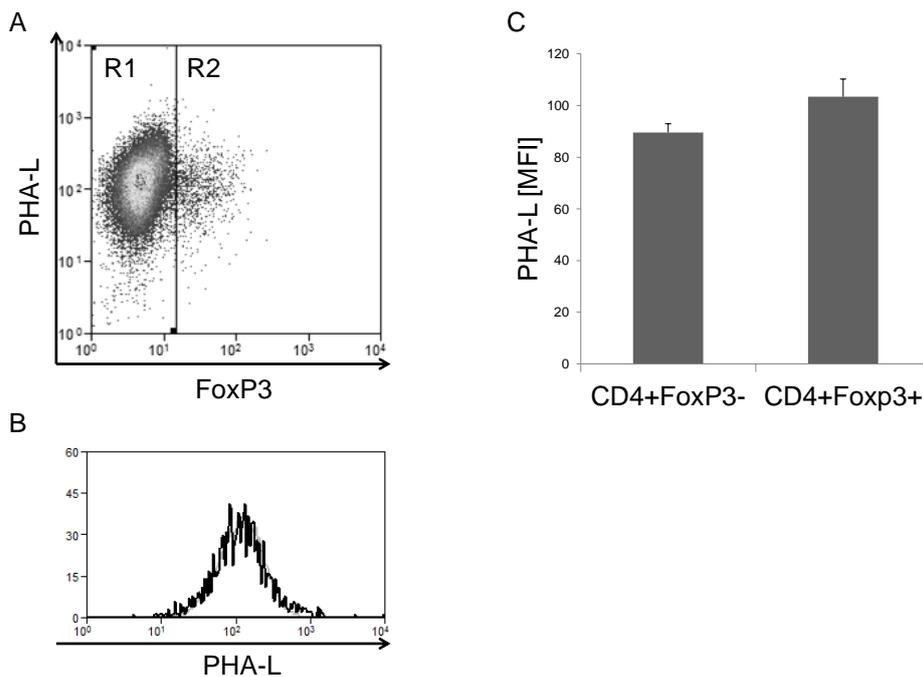


Abbildung 10: β 1,6 N-Glykosylierung von Effektor T Zellen und regulatorischen T Zellen. (n=12)

A und B: Durchflusszytometrische Analyse der β 1,6 N-Glykosylierung auf CD4+FoxP3- Effektor T Zellen (R1) und CD4+FoxP3+ regulatorischen T Zellen (R2). C: Diagramm: Gegenüberstellung der PHA-L Bindung an Effektor T Zellen und regulatorischen T Zellen jeweils mit Mittelwert der Fluoreszenzintensität (MFI) für PHA-L ($p=0,088$, Fehlerbalken entsprechen SEM)

Die Testreihe zeigte, es besteht jeweils kein signifikanter Unterschied zwischen Effektor T Zellen und regulatorischen T Zellen im Bindungsverhalten der untersuchten Lektine.

4.2 β 1,6 N-Glykosylierung auf CD4 Zellpopulationen

Es wurden Proben gesunder Probanden verwendet und wie beschrieben aufbereitet. So gewonnene Lymphozyten wurden mit fluoreszenzgekoppeltem antiCD4 und antiFoxP3 zur Zelltypidentifizierung markiert. Die β 1,6 N-Oberflächenglykosylierung wurde durch simultane Färbung mit dem Lektin PHA-L bestimmt und als Mittlere Fluoreszenz Intensität (MFI) angegeben. Im Folgenden wird die MFI der PHA-L Bindung an CD4+FoxP3+ regulatorischen T Zellen mit der MFI der CD4+FoxP3- Effektor T Zellen, der CD4^{lo} Zellen und der CD4^{hi} Zellen verglichen. Alle Zellen wurden für die FoxP3 Färbung permeabilisiert. Die Messwerte der Proben sind normalverteilt.

Aktiviert CD4lo Zellen sind stärker β 1,6 n-glykosyliert als nicht aktivierte CD4hi ($p=0,006$) und stärker als Effektor T Zellen ($p=0,013$). Außerdem sind regulatorische T Zellen stärker β 1,6 n-glykosyliert als nicht aktivierte CD4hi ($p=0,013$). Sonst zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied in der β 1,6 N-Glykosylierung.

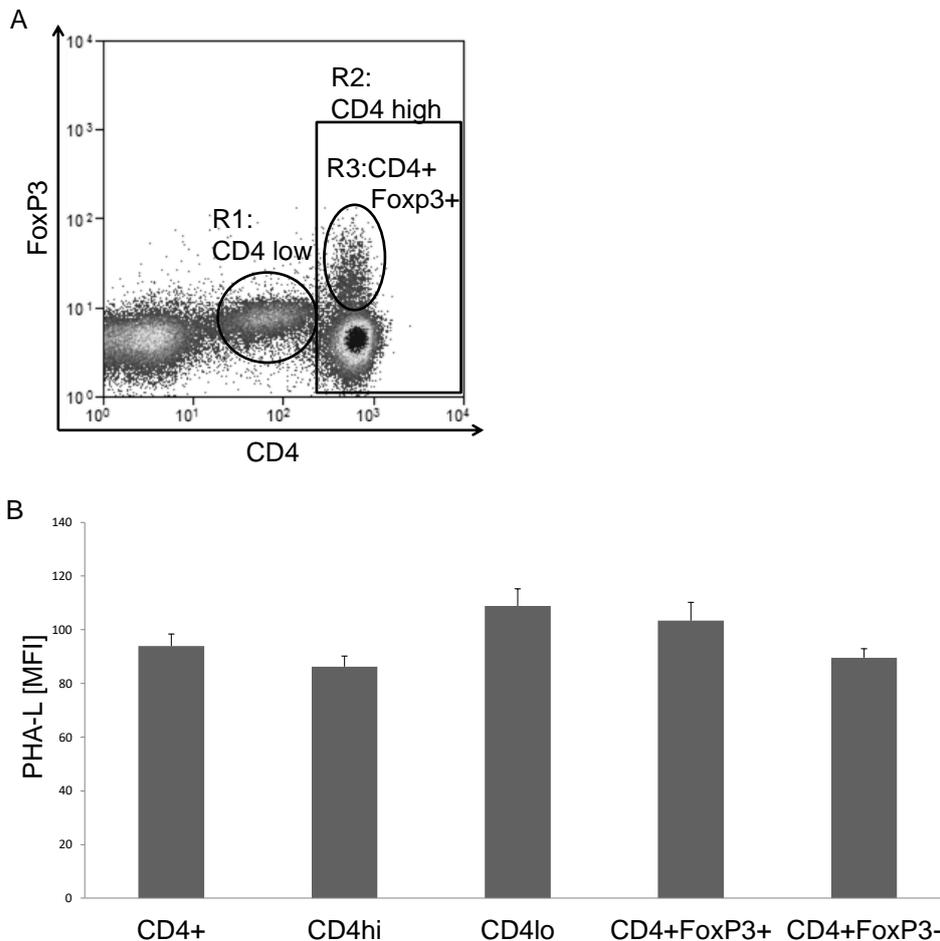


Abbildung 11: β 1,6 N-Glykosylierung an den CD4 Zellpopulationen. (n=12)

Die Zellen wurden mit antiCD4 und antiFoxP3 markiert. A: Dargestellt sind in R1: CD4lo Zellen, R2 ohne R3: CD4hi Zellen, R3: CD4+FoxP3+ regulatorische T Zellen; B: Im Diagramm dargestellt sind die Mittelwerte der Fluoreszenzintensität (MFI) für PHA-L und der SEM als positiven Fehlerindikator. CD4hi Zellen sind schwächer β 1,6 n-glykosyliert als CD4lo Zellen ($p=0,006$) und regulatorische T Zellen ($p=0,041$). CD4lo Zellen sind zusätzlich stärker β 1,6 n-glykosyliert als Effektor T Zellen ($p=0,013$).

Zelltyp je n=12	MFI	SEM	CD4hi	CD4lo	CD4+FoxP3+	CD4+FoxP3-
CD4+	93,98	4,45	p=0,208	p=0,068	p=0,261	p=0,437
CD4hi	86,27	3,95		p=0,006	p=0,041	p=0,527
CD4lo	108,89	6,35			p=0,562	p=0,013
CD4+FoxP3+	103,39	6,84				p=0,088
CD4+FoxP3-	89,59	3,33				

Tabelle 8: Vergleich der β 1,6 N-Glykosylierung der einzelnen CD4 Zelltypen.

Die p-Werte beziehen sich auf die Unterschiede der β 1,6 N-Glykosylierung zwischen den einzelnen Zellpopulationen der ersten Zeile der Tabelle und der ersten Spalte der Tabelle.

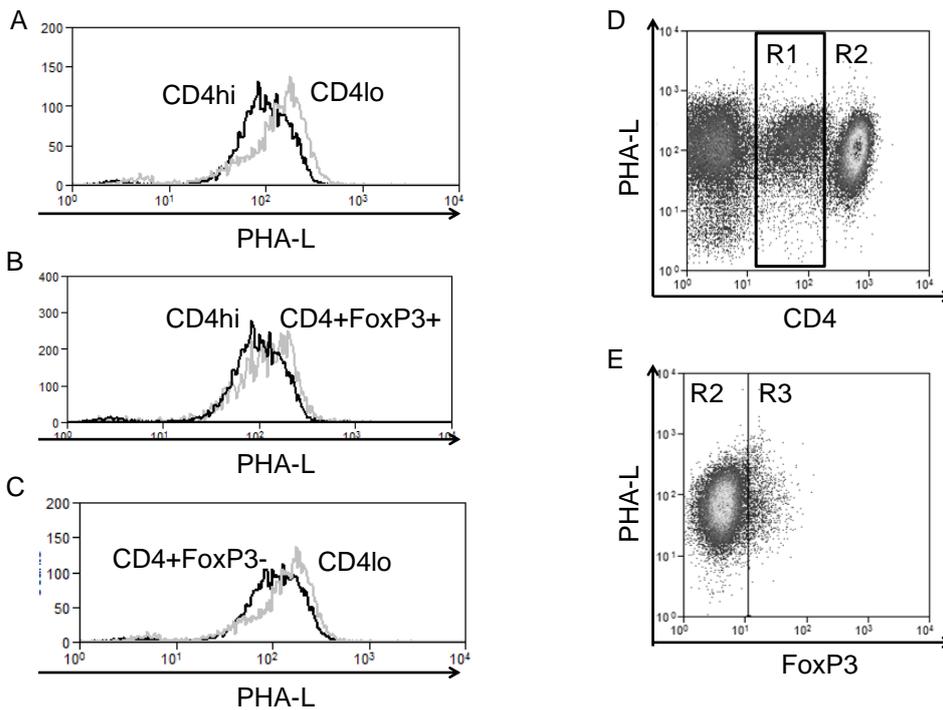


Abbildung 12: CD4lo Zellen und CD4+FoxP3+ regulatorische T Zellen sind stärker β 1,6 N-glykosyliert als CD4hi Zellen ($p=0,006$ und $p=0,041$). CD4lo Zellen sind stärker β 1,6 n-glykosyliert als CD4+FoxP3- Effektor T Zellen ($p=0,013$).

A-C: Durchflusszytometrische Analyse der β 1,6 N-Glykosylierung auf den CD4hi-, CD4lo-, regulatorischen- und Effektor T Zellen. D und E: Das Gate R1 beinhaltet die CD4lo Zellen; R2 die CD4hi Zellen, R3 die CD4+FoxP3+regulatorischen T Zellen. Die Zellen wurden mit antiCD4, PHA-L und pacific Blue gefärbt.

In dieser Messreihe zeigte sich, dass regulatorische T Zellen signifikant stärker β 1,6 N-glykosyliert sind, als CD4hi Zellen und dass aktivierte CD4lo Zellen stärker β 1,6 N-glykosyliert sind, als Effektor T Zellen und CD4hi Zellen.

4.3 Erhöhte β 1,6 N-Glykosylierung auf aktivierten T-Zellen

Effektor T Zellen exprimieren nach Aktivierung den Interleukin-2-Rezeptor CD25. CD25 wird ebenfalls auf regulatorischen T Zellen exprimiert.

Im Folgenden wird die β 1,6 N-Glykosylierung bei verschiedenen T Zellsubtypen verglichen. Sie wurde durch simultane Färbung mit dem Lektin PHA-L bestimmt und als Mittlere Fluoreszenz Intensität (MFI) angegeben. Es wurden Proben gesunder Probanden analysiert. Alle Messwerte sind in den jeweiligen Gruppen normalverteilt. Die β 1,6 N-Glykosylierung ist bei CD4lo Zellen signifikant höher als bei CD4hi Zellen, CD4+CD25hi regulatorischen T Zellen und CD4+CD25lo Effektor T Zellen. Die β 1,6 N-Glykosylierung ist bei CD4hi Zellen signifikant niedriger als bei CD4lo Zellen, CD4+CD25hi regulatorischen T Zellen und CD4+CD25lo Effektor T Zellen. Die β 1,6 N-Glykosylierung unterscheidet sich nicht auf CD4+CD25hi regulatorischen T Zellen und CD4+CD25lo Effektor T Zellen.

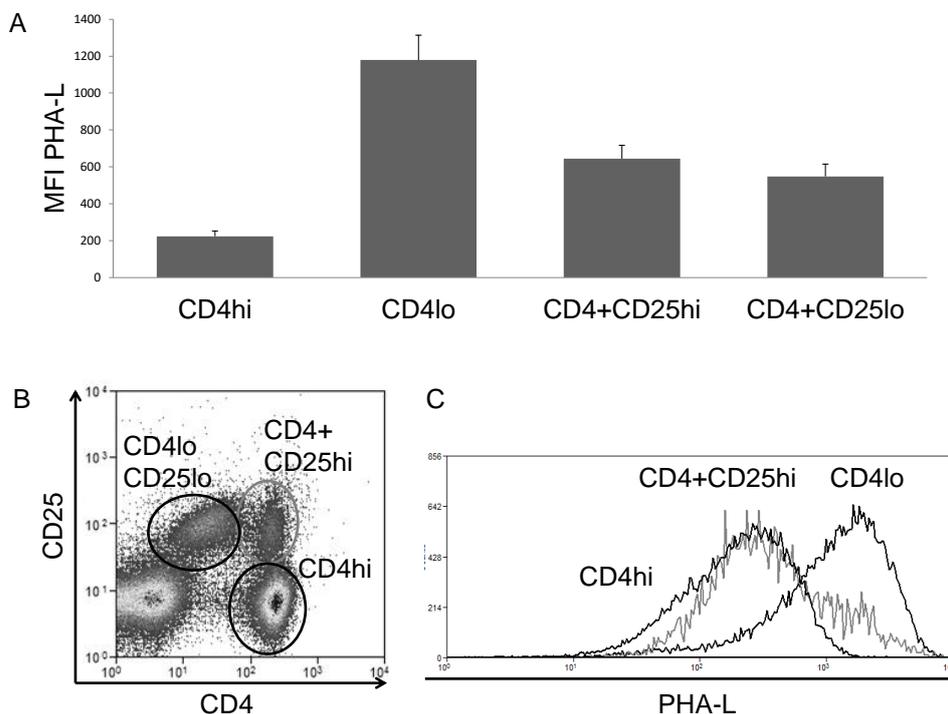


Abbildung 13: Gegenüberstellung der β 1,6 N-Glykosylierung an CD4hi Zellen, CD4lo Zellen, regulatorischen T Zellen und Effektor T Zellen. (n=12)

A: Im Diagramm dargestellt sind die Mittelwerte der Fluoreszenzintensität (MFI) für PHA-L und der SEM als positiver Fehlerindikator. CD4hi Zellen sind weniger β 1,6 n-glykosyliert als CD4lo Zellen ($p < 0,001$), CD4+CD25hi regulatorische T Zellen ($p < 0,001$) und als CD4+CD25lo Effektor

T Zellen ($p < 0,001$). CD4lo Zellen sind zusätzlich stärker $\beta 1,6$ n-glykosyliert als CD4+CD25hi regulatorische T Zellen ($p = 0,003$) und als CD4+CD25lo Effektor T Zellen ($p = 0,001$). B: Dargestellt sind CD4+ T Zellen. C: Overlay mit CD4hi Zellen (schwarz), CD4lo Zellen (schwarz) und CD4+CD25hi Zellen (grau)

Zelltyp je n=12	Mittelwert	SEM	CD4lo	CD4+CD25hi	CD4+CD25lo
CD4hi	223,90	28,62	$p < 0,001$	$p < 0,001$	$p < 0,001$
CD4lo	1179,02	135,08		$p = 0,003$	$p = 0,001$
CD4+CD25hi	644,41	72,53			$p = 0,34$
CD4+CD25lo	548,21	66,94			

Tabelle 9: Vergleich der $\beta 1,6$ N-Glykosylierung der einzelnen CD4 Zelltypen.

Die p-Werte beziehen sich auf die Unterschiede der $\beta 1,6$ N-Glykosylierung zwischen den einzelnen Zellpopulationen der ersten Zeile der Tabelle und der ersten Spalte der Tabelle.

In dieser Versuchsreihe zeigte sich, dass die regulatorischen T Zellen stärker $\beta 1,6$ n-glykosyliert sind als CD4hi Zellen. Aktivierte CD4lo Zellen sind stärker $\beta 1,6$ n-glykosyliert als Effektor T Zellen, regulatorische T Zellen und CD4hi Zellen. Regulatorische T Zellen sind stärker $\beta 1,6$ n-glykosyliert als CD4hi Zellen.

4.4 Behandlung mit Natalizumab führt zur erhöhten $\beta 1,6$ N-Glykosylierung auf Effektor T Zellen bei Patienten mit schubförmiger Multipler Sklerose

Um Unterschiede in der $\beta 1,6$ N-Glykosylierung auf Zellen gesunder Probanden und Zellen von MS Patienten unter Natalizumab Therapie zu analysieren wurden die Blutproben der jeweiligen Gruppe nach oben beschriebenem Schema aufbereitet und die so gewonnenen Lymphozyten mit fluoreszenzgekoppeltem antiCD4 und antiFoxP3 zur Zelltypidentifizierung markiert. Die $\beta 1,6$ N-Glykosylierung wurde durch simultane Färbung mit dem Lektin PHA-L bestimmt und als Mittlere Fluoreszenz Intensität (MFI) angegeben. Die Messwerte sind normalverteilt. Es zeigte sich eine signifikant stärkere $\beta 1,6$ N-Glykosylierung der untersuchten CD4+ Zellenpopulationen von MS Patienten unter Natalizumab Therapie im Vergleich zu entsprechenden Zellpopulationen gesunder Probanden.

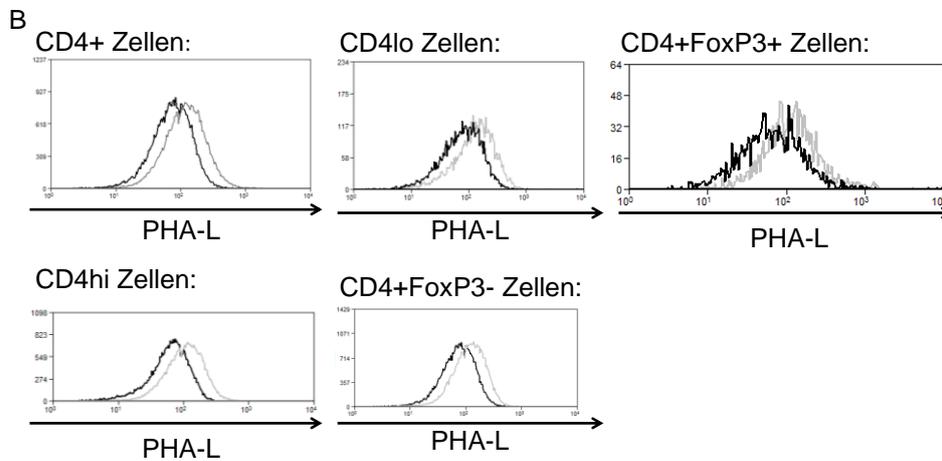
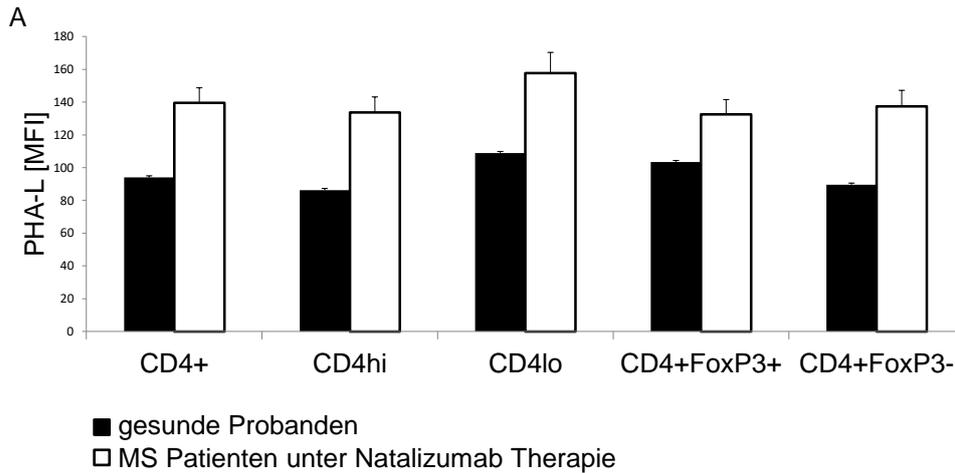


Abbildung 14: β 1,6 N-Glykosylierung auf den CD4+Zellpopulationen von gesunden Probanden (n=12) und von MS Patienten unter Natalizumab Therapie (n=16)

A: Im Diagramm dargestellt sind die Mittelwerte der Fluoreszenzintensität (MFI) für PHA-L und SEM als positiver Fehlerindikator bei Zellen gesunder Probanden und Zellen von MS Patienten unter Natalizumab Therapie. B: Im Overlay dargestellt ist jeweils die PHA-L Bindung auf den untersuchten T-Zelltypen stets im Vergleich gesunder Probanden (schwarz) zu MS Patienten unter Natalizumab Therapie (grau).

Probanden (n=12)	MS Patienten unter Natalizumab Therapie (n=16)	
CD4+ Zellen Mittelwert: 93,98 SEM: 4,45	CD4+ Zellen Mittelwert: 136,53 SEM: 9,21	p<0,001
CD4hi Zellen Mittelwert: 86,27 SEM: 3,95	CD4hi Zellen Mittelwert: 133,68 SEM: 9,47	p<0,001
CD4lo Zellen Mittelwert: 108,89 SEM: 6,35	CD4lo Zellen Mittelwert: 157,79 SEM: 12,6	p=0,002
CD4+Foxp3+ Zellen Mittelwert: 103,54	CD4+Foxp3+ Zellen Mittelwert: 132,57	p=0,022

SEM: 16,84	SEM: 9,01	
CD4+Foxp3- Zellen Mittelwert: 89,59 SEM: 3,33	CD4+Foxp3- Zellen Mittelwert: 137,43 SEM: 9,8	p<0,001

Tabelle 10: β 1,6 N-Glykosylierung auf den CD4+Zellpopulationen von gesunden Probanden und MS Patienten unter Natalizumab Therapie.

Die p-Werte beziehen sich auf die Unterschiede zwischen der β 1,6 N-Glykosylierung auf Zellen von Probanden und der β 1,6 N-Glykosylierung auf Zellen von MS Patienten unter Natalizumab Therapie.

4.5 β 1,6 N-Glykosylierung auf T Helferzellsubpopulationen

Die Proben wurden wie beschrieben aufbereitet und die so gewonnenen Lymphozyten mit PMA, Ionomycin und Monensin für 4 Stunden stimuliert. Anschließend wurden sie mit fluoreszenzgekoppeltem antiCD4 und Infy PE bzw. Il4 PE und Il17 PE zur Zelltypidentifizierung markiert. Die β 1,6 N-Glykosylierung wurde durch simultane Färbung mit dem Lektin PHA-L bestimmt und als Mittlere Fluoreszenz Intensität (MFI) angegeben.

Die Th1, Th2 und Th17 Zellen wurden zusätzlich mit CD4+FoxP3+ regulatorischen T Zellen verglichen, wobei die regulatorischen T Zellen nicht stimuliert wurden.

Th17 Zellen sind statistisch signifikant stärker β 1,6 n-glykosyliert als Th2 Zellen ($p=0,02$). Am wenigsten β 1,6 n-glykosyliert sind die CD4+FoxP3+ regulatorischen T Zellen, siehe dazu auch 4.2.

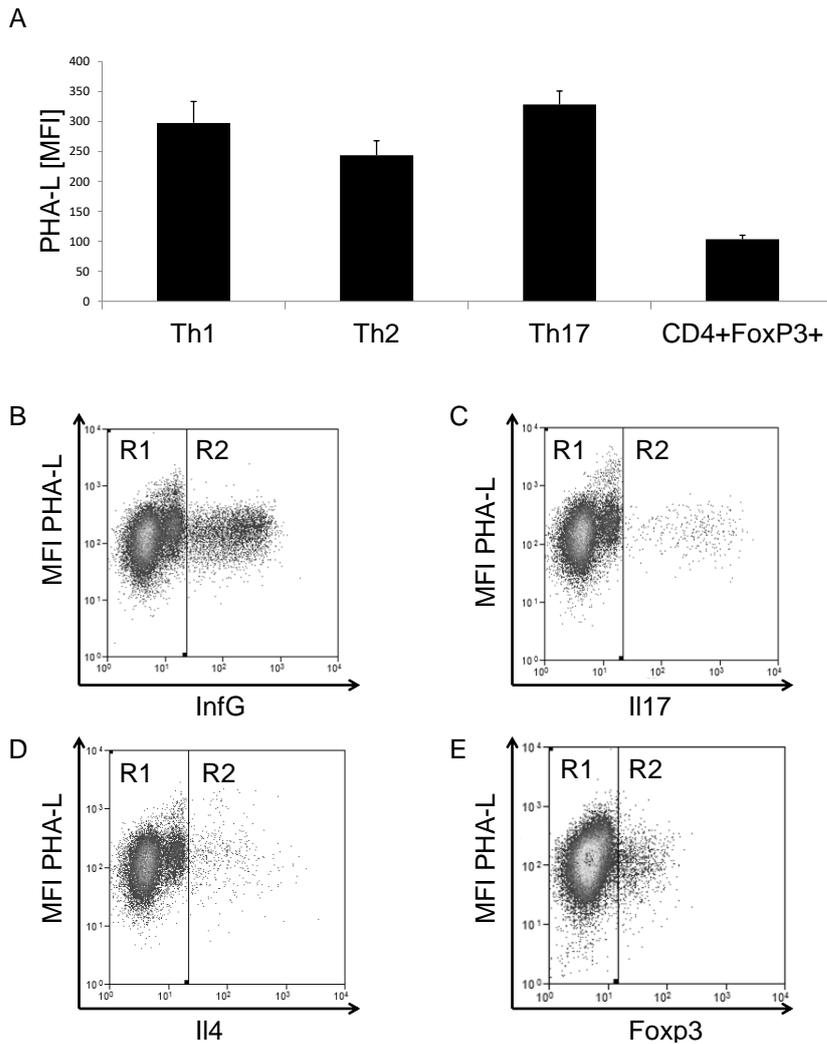


Abbildung 15: Vergleich der β 1,6 N-Glykosylierung auf T Helferzellsubpopulationen

A: Im Diagramm dargestellt sind die Mittelwerte der Fluoreszenzintensität (MFI) für PHA-L und SEM als positiver Fehlerindikator. B-C: In den Dotplots ist die PHA-L Bindung an den CD4+ Zellen abgebildet; R2 beinhaltet in B: Th1 Zellen; in C: Th17 Zellen; in D: Th2 Zellen und in E: regulatorische T Zellen.

Zelltyp	Mittelwert	SEM	Th2	Th17	CD4+FoxP3+ (n=12)
Th1 (n=8)	297,60	35,64	p=0,220	p=0,478	p<0,001
Th2 (n=9)	243,75	23,974		p=0,022	p<0,001
Th17 (n=8)	328,30	22,37			p<0,001

Tabelle 11: : Vergleich der β 1,6 N-Glykosylierung auf den T-Helferzellpopulationen.

Die p-Werte beziehen sich auf die Unterschiede der PHA-L Bindung zwischen den einzelnen Zellpopulationen der ersten Zeile der Tabelle und der ersten Spalte der Tabelle.

4.6 Behandlung mit Natalizumab führt zur erniedrigten β 1,6 N-Glykosylierung auf TH1 und Th17 Zellen bei Patienten mit schubförmiger Multipler Sklerose

Um Unterschiede zwischen der β 1,6 N-Glykosylierung gesunder Probanden und der von MS Patienten unter Natalizumab Therapie zu analysieren, wurden die Blutproben der jeweiligen Gruppe nach oben beschriebenem Schema aufbereitet. Die Analyse der PHA-L MFI ergab normalverteilte Messwerte. Es zeigte sich eine signifikant stärkere β 1,6 N-Glykosylierung auf Th1 Zellen gesunder Probanden als auf Th1 Zellen von MS Patienten unter Natalizumab Therapie ($p= 0,04$). Ebenfalls zeigte sich eine signifikant stärkere β 1,6 N-Glykosylierung auf Th17 Zellen gesunder Probanden als auf Th17 Zellen von MS Patienten unter Natalizumab Therapie ($p=0,02$). Die β 1,6 N-Glykosylierung auf Th2 Zellen ist bei Probanden und Patienten unter Therapie ohne statistisch signifikanten Unterschied ($p=0,32$). Die β 1,6 N-Glykosylierung auf CD4+FoxP3+ regulatorischen T Zellen ist bei Probanden statistisch signifikant weniger ausgeprägt als bei MS Patienten unter Therapie ($p=0,02$), wie bereits unter 4.4 beschrieben.

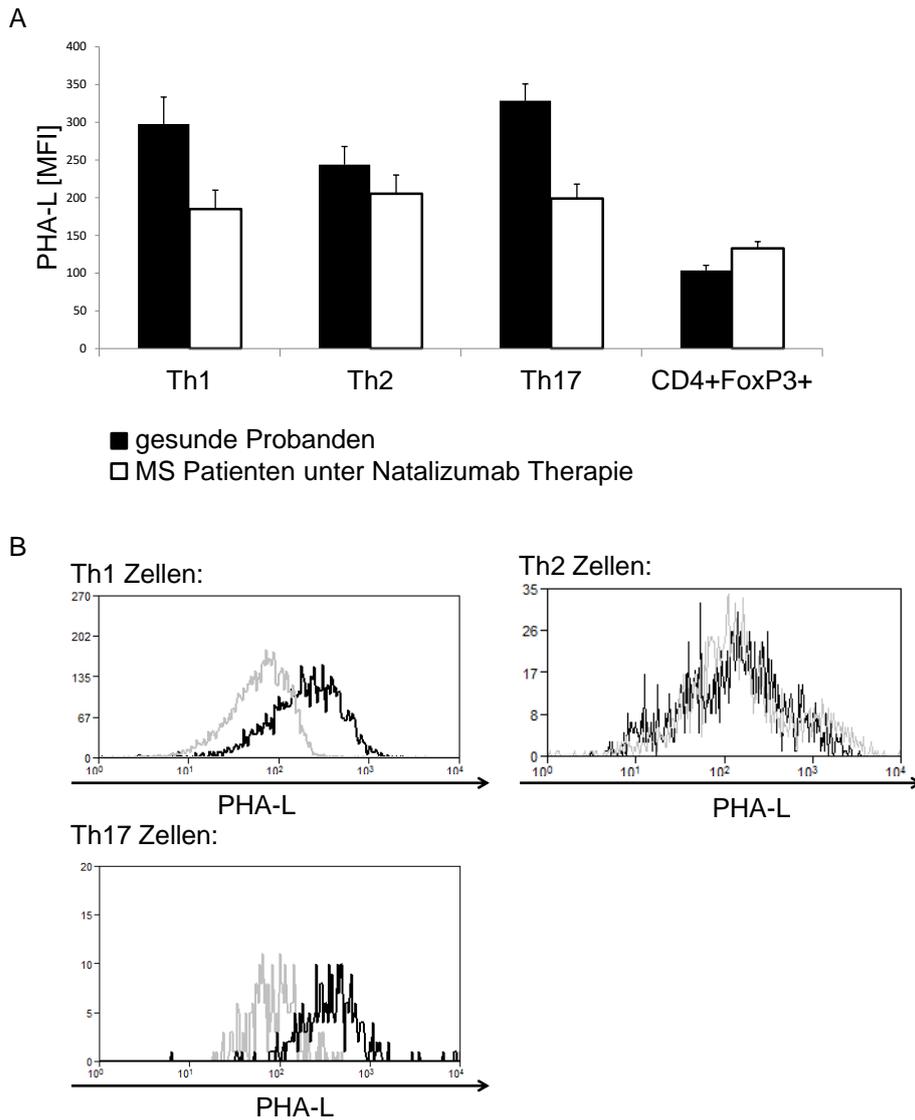


Abbildung 16: β 1,6 N-Glykosylierung auf T Helferzellsubpopulationen bei gesunden Probanden und MS Patienten unter Natalizumab Therapie.

A: Dargestellt sind die Mittelwerte der Fluoreszenzintensität (MFI) für PHA-L und SEM als positiver Fehlerindikator. B: Darstellung der PHA-L Bindung an Th1, Th2 und Th17 Zellen in Form eines Overlays wobei jeweils Zellen gesunder Probanden (schwarz) und Zellen von MS Patienten unter Natalizumab Therapie (grau) gegenübergestellt sind.

Gesunde Probanden	MS Patienten unter Natalizumab Therapie	
Th1 Zellen (n=8) Mittelwert: 287,60 SEM: 35,64	Th1 Zellen (n=5) Mittelwert:184,72 SEM:25,17	p=0,044
Th2 Zellen (n=9) Mittelwert: 243,75 SEM: 23,97	Th2 Zellen (n=5) Mittelwert:205,33 SEM:24,68	p=0,323
Th17 Zellen (n=8) Mittelwert: 328,30 SEM: 22,36	Th17 Zellen (n=5) Mittelwert:198,90 SEM:19,03	p=0,002
Treg Zellen (n=12) Mittelwert: 103,54 SEM: 16,84	Treg Zellen (n=16) Mittelwert: 132,57 SEM: 9,01	p=0,022

Die β 1,6 N-Glykosylierung auf Th1 und Th17 Zellen ist bei MS Patienten unter Natalizumab Therapie geringer und auf regulatorischen T Zellen bei MS Patienten unter Natalizumab Therapie stärker ausgeprägt, als auf der jeweiligen Zellpopulation bei gesunden Probanden.

4.7 Erhöhte β 1,6 N-Glykosylierung von Effektor T Zellen nach Aktivierung

Verwendet wurden die Lymphozyten gesunder Probanden. Diese wurden mit PMA, Ionomycin und Monensin stimuliert und anschließend zur Zelltypisierung mit antiCD4 und zur Analyse der Oberflächenglykosylierung mit PHA-L und Pacific Blue markiert. Ausgewertet wurde die β 1,6 N-Glykosylierung auf den CD4+ Zellen. Die Daten sind jeweils normalverteilt.

Die β 1,6 N-Glykosylierung ist statistisch signifikant niedriger auf unstimulierten CD4+ Zellen (n=8; Mittelwert: 91,77 SEM: 2,08), als auf stimulierten CD4+ Zellen (n=7; Mittelwert: 217,34 SEM: 20,09) ($p < 0,001$).

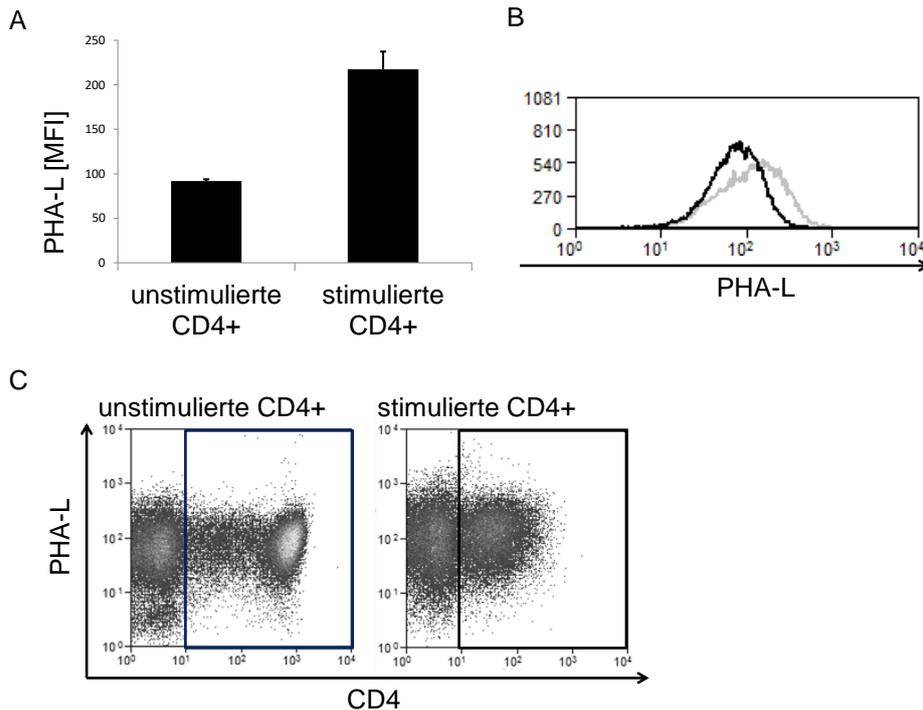


Abbildung 17: Stimulierte CD4+ Zellen sind stärker β 1,6 n-glykosyliert als unstimulierte.

A: Dargestellt sind die Mittelwerte der Fluoreszenzintensität (MFI) für PHA-L und die SEM als positiver Fehlerindikator jeweils von unstimulierten (n=8) und stimulierten CD4+ Zellen (n=7). B: Dargestellt ist die β 1,6 N-Glykosylierung auf den CD4+ Zellen in einem Overlay: unstimulierte Zellen (schwarz) gegen stimulierte Zellen (grau). C: Darstellung der β 1,6 N-Glykosylierung auf mononukleären Zellen in einem Dotplot einmal vor Stimulation und einmal nach Stimulation.

4.8 Erniedrigte β 1,6 N-Oberflächenglykosylierung bei Inhibition der alpha-1,2-Mannosidase

In Vorversuchen wurde die Kifunensin (KIF) Konzentration durch Verdünnungsreihen ermittelt. Ebenso wurden verschiedene Inkubationszeiten (24h, 48h, 72h) getestet. Dabei zeigte sich, dass die optimale Wirkung durch eine 48 stündige Inkubation bei 37° C mit 2 μ l Kifunensin [1mM] erreicht wird.

Die Lymphozyten wurden separiert und mit Kifunensin zur Hemmung der alpha-1,2-Mannosidase für 48 Stunden inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zur Subtypisierung mit antiCD4 und antiCD25 sowie zur Analyse der N-Oberflächenglykosylierung mit PHA-L sowie pacific Blue markiert.

Zur statistischen Auswertung wurde die MFI von PHA-L der CD4+CD25hi regulatorischen T Zellen aus verschiedenen Blutproben von gesunden Probanden analysiert. Die Daten sind normalverteilt. Die untersuchten Immunzellen, deren alpha-1,2-Mannosidase mit Kifunensin gehemmt wurde, (Mittelwert: 167,96 SEM: 13,55) sind signifikant weniger β 1,6 n-glykosyliert als die nur mit PBS behandelten Kontrollen (Mittelwert: 496,37 SEM: 63,44) ($p < 0,001$).

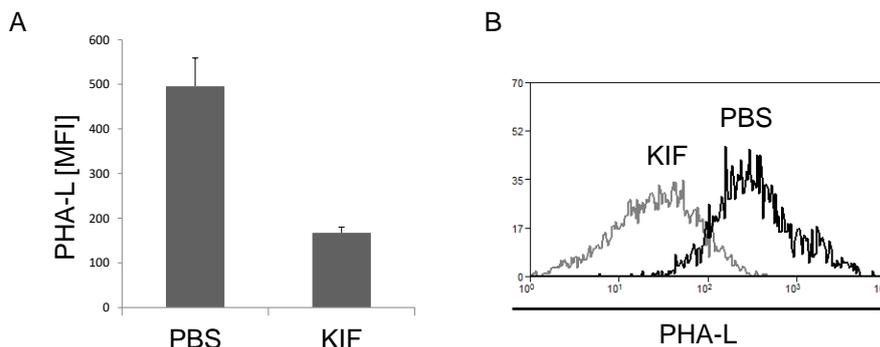


Abbildung 18: Die β 1,6 N-Glykosylierung ist bei Zellen mit inhibierter alpha-1,2-Mannosidase schwächer.

A: Dargestellt sind die Mittelwerte der Fluoreszenzintensität (MFI) für PHA-L und die SEM als positiver Fehlerindikator von mit PBS behandelten regulatorischen T Zellen und mit Kifunensin behandelten regulatorischen T Zellen. B: Overlay der regulatorischen T Zellen. Mit Kifunensin inkubierte regulatorische T Zellen (grau); mit PBS behandelte regulatorische T Zellen (schwarz). (n=11)

4.9 Verstärkte suppressive Wirkung der regulatorischen T Zellen mit gehemmter alpha-1,2-Mannosidase auf die Proliferation von Effektor T Zellen

Um die Frage zu beantworten, ob die N-Glykosylierung mitverantwortlich ist für die Fähigkeit der regulatorischen T Zellen zur Suppression von Effektor-T-Zellen, wurden CD4+CD25hi regulatorische T Zellen für 3 Tage zusammen mit CD4+CD25lo Effektor T Zellen und mit 1 μ l anti-CD3 und 1 μ l anti-CD28 inkubiert. In einem Ansatz wurde die alpha-1,2-Mannosidase der regulatorischen T Zellen mit Kifunensin (KIF) gehemmt, im anderen Ansatz wurde statt KIF PBS verwendet. Anschließend wurde der prozentuale Anteil an Tochterzellen verglichen.

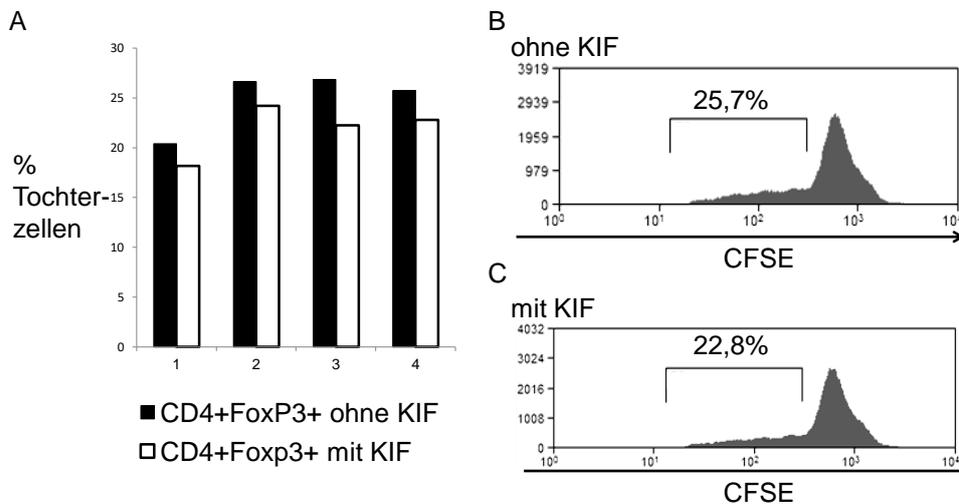


Abbildung 19: Regulatorische T Zellen mit Kifunensin (KIF) hemmen die Proliferation von Effektor T Zellen effektiver als regulatorische T Zellen ohne Kifunensin

A: Diagramm auf der y-Achse: %Tochterzellen an der Gesamtzellzahl; auf der x-Achse: die vier Versuche, jeweils einmal mit regulatorischen T Zellen ohne Kifunensin Behandlung und einmal mit. Stets war der Anteil an Tochterzellen unter mit KIF behandelten regulatorischen T Zellen kleiner. B und C: CFSE Färbung. B: Stimulation mit regulatorischen T Zellen ohne KIF-Behandlung; C: Stimulation mit regulatorischen T Zellen mit KIF-Behandlung

Bei der statistischen Auswertung wurden alle vier Versuche berücksichtigt. Wobei jeweils die Differenz zwischen dem prozentualen Anteil von Tochterzellen an Effektor T Zellen bei Stimulation unter Anwesenheit von regulatorischen T Zellen ohne KIF und dem prozentualen Anteil von Tochterzellen an Effektor T Zellen bei Stimulation unter Anwesenheit von regulatorischen T Zellen mit KIF gebildet wurde.

Kurz: $(Treg\ ohne\ KIF\ \%Tochterzellen) - (Treg\ mit\ KIF\ \%Tochterzellen)$

Die Differenzwerte sind normalverteilt. (n=4; Mittelwert: 3,05 SEM: 0,54) regulatorische T Zellen mit KIF hemmen die Proliferation von Effektor T Zellen effektiver als regulatorische T Zellen ohne KIF (p = 0,011).

4.10 Oberflächenglykosylierung auf Effektor T Zellen und regulatorischen T Zellen bei MS Patienten unter Natalizumabtherapie im Vergleich zu Gesunden

Um Unterschiede im Lektinbindungsverhalten zwischen gesunden Probanden und MS Patienten unter Natalizumab Therapie zu analysieren wurden die Lymphozyten separiert und anschließend zur weiteren Zelltypisierung mit antiCD4 und antiFoxP3 und zur Analyse der Oberflächenglykosylierung mit dem untersuchten Lektin (MAL, SNL oder UEA) und pacific Blue markiert.

4.10.1 Die α 2,3 Sialylierung auf Effektor T Zellen und regulatorischen T Zellen ist bei MS Patienten unter Natalizumabtherapie nicht verändert

Analyse der α 2,3 Sialylierung auf regulatorischen T Zellen:

Die Messwerte sind normalverteilt. Es besteht kein Unterschied in der α 2,3 Sialylierung auf regulatorischen T Zellen von Gesunden (n=15; Mittelwert 14,89 SEM 2,92) im Vergleich zu MS Patienten unter Natalizumab Therapie (n=15; Mittelwert:14,06 SEM: 2,38) ($p= 0,826$).

Analyse der α 2,3 Sialylierung auf Effektor T Zellen:

Die Messwerte sind jeweils nicht normalverteilt. Deshalb wurde der Mann-Whitney-U-Test durchgeführt. Es besteht kein Unterschied bei der α 2,3 Sialylierung auf Effektor T Zellen bei Gesunden (n=15; Mittelwert: 8,85 SEM 1,02) im Vergleich zu MS Patienten unter Natalizumab Therapie (n=15 Mittelwert: 12,1 SEM: 1,87)($p= 0,202$).

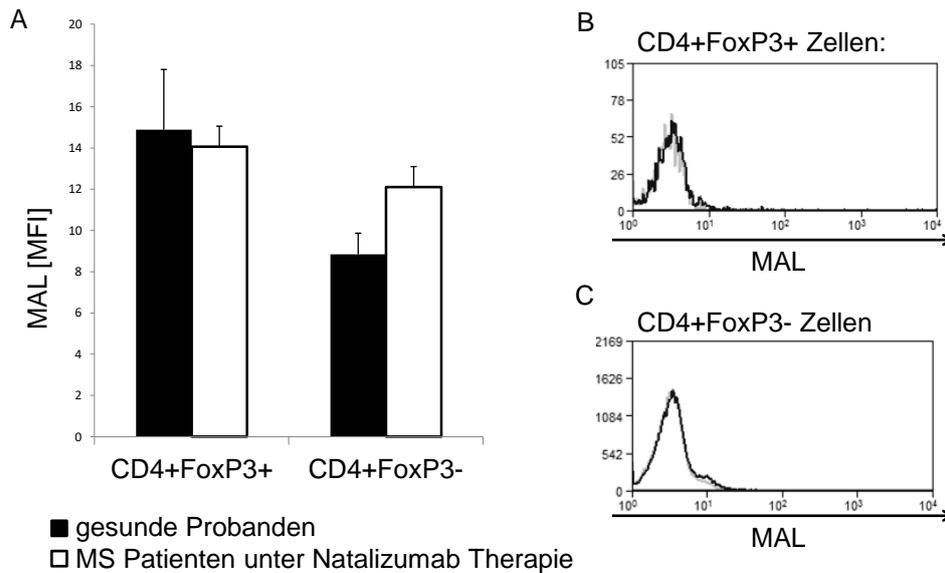


Abbildung 20: α 2,3 Sialylierung auf CD4+FoxP3+ regulatorischen T Zellen und CD4+FoxP3- Effektor T Zellen gesunder Probanden und MS Patienten unter Natalizumab Therapie.

A: Dargestellt sind die Mittelwerte der Fluoreszenzintensität (MFI) für MAL und SEM als positiver Fehlerindikator auf CD4+FoxP3+ regulatorischen T Zellen und CD4+FoxP3- Effektor T Zellen. B: Overlay der regulatorischen T Zellen. C: Overlay der Effektor T Zellen. B und C: Zellen von gesunden Probanden (schwarz); Zellen von MS Patienten mit Natalizumab Therapie (grau).

4.10.2 Die α 2,6 Sialylierung auf regulatorischen T Zellen und Effektor T Zellen ist bei MS Patienten unter Natalizumab Therapie und gesunden Kontrollpersonen identisch

Analyse der α 2,6 Sialylierung auf regulatorischen T Zellen:

Die Messwerte der regulatorischen T Zellen von MS Patienten unter Natalizumab Therapie sind nicht normalverteilt. Deshalb wurde zur Analyse jeweils der Mann-Whitney-U-Test durchgeführt. Es besteht kein statistisch signifikanter Unterschied in der α 2,6 Sialylierung auf regulatorischen T Zellen gesunder Probanden (n=16; Mittelwert: 611,02 SEM: 95,18) im Vergleich zu MS Patienten unter Natalizumab Therapie (n=16; Mittelwert: 734,24 SEM: 108,59) ($p=0,423$).

Analyse der α 2,6 Sialylierung auf Effektor T Zellen:

Die Messwerte von Effektor T Zellen der MS Patienten unter Natalizumab Therapie sind nicht normalverteilt. Deshalb wurde zur Analyse jeweils der Mann-Whitney-U-Test durchgeführt. Es besteht ebenfalls kein statistisch signifikanter Unterschied in der SNL Bindung auf Effektor T Zellen bei gesunden Probanden (n=16; Mittelwert: 514,86 SEM: 75,1) im Vergleich zu MS Patienten unter Natalizumab Therapie (n=16; Mittelwert: 634,87 SEM: 77,26) (p=0,270).

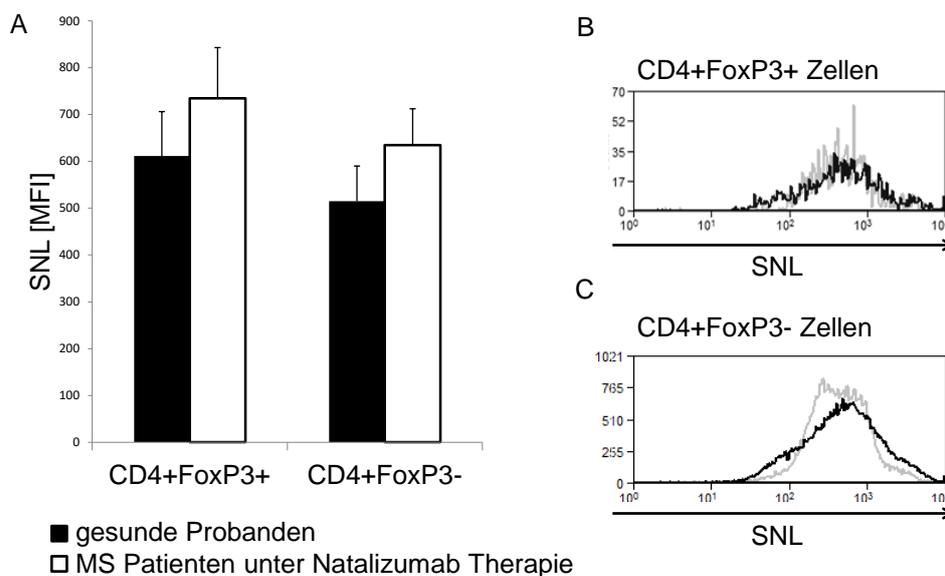


Abbildung 21: α 2,6 Sialylierung auf CD4+FoxP3+ regulatorischen T Zellen und CD4+FoxP3- Effektor T Zellen gesunder Probanden und MS Patienten unter Natalizumab Therapie.

A: Dargestellt sind die Mittelwerte der Fluoreszenzintensität (MFI) für SNL und SEM als positiver Fehlerindikator auf regulatorischen- und Effektor T Zellen. B: Overlay der regulatorischen T Zellen. C: Overlay der Effektor T Zellen. B und C: Zellen von gesunde Probanden (schwarz); Zellen von MS Patienten unter Natalizumab Therapie (grau).

4.10.3 Behandlung mit Natalizumab führt zur erhöhten α 1,2-Glykosylierung auf Effektor T Zellen und regulatorischen T Zellen bei Patienten mit schubförmiger Multipler Sklerose

Analyse der α 1,2 Glykosylierung auf regulatorischen T Zellen:

Die Messwerte von regulatorischen T Zellen von MS Patienten unter Natalizumab Therapie sind nicht normalverteilt. Deshalb wurde zur Analyse jeweils der Mann-Whitney-U-Test durchgeführt. Regulatorische T Zellen

gesunder Probanden (n=13; Mittelwert 5,46 SEM 0,86) sind statistisch signifikant weniger stark α 1,2 glykosyliert als regulatorische T Zellen von MS Patienten unter Natalizumab Therapie (n=14; Mittelwert: 9,57 SEM: 1,13) (p=0,007).

Analyse der α 1,2 Glykosylierung auf Effektor T Zellen:

Die Messwerte der Effektor T Zellen von MS Patienten unter Natalizumab Therapie sind nicht normalverteilt. Deshalb wurde zur Analyse jeweils der Mann-Whitney-U-Test durchgeführt. Effektor T Zellen gesunder Probanden (n=13; Mittelwert: 6,1 SEM 1,24) sind statistisch signifikant weniger stark α 1,2 glykosyliert als MS Patienten unter Natalizumab Therapie (n=14; Mittelwert: 9,66 SEM: 1,38) (p=0,002).

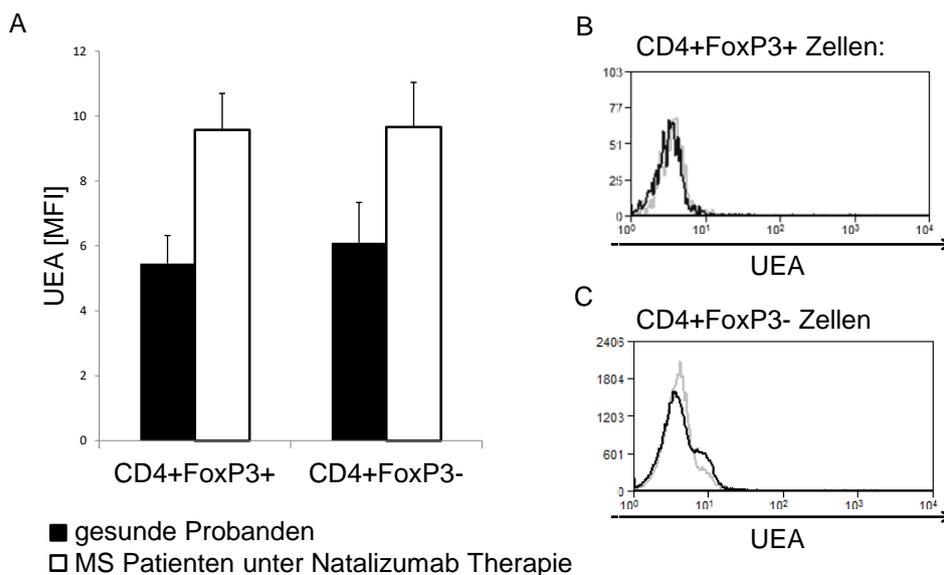


Abbildung 22: regulatorische T Zellen und Effektor T Zellen von MS Patienten unter Natalizumab Therapie sind stärker α 1,2 glykosyliert als die gesunder Probanden.

A: Dargestellt sind die Mittelwerte der Fluoreszenzintensität (MFI) für UEA und SEM als positiver Fehlerindikator auf regulatorischen T Zellen und Effektor T Zellen. B: Overlay der regulatorischen T Zellen. C: Overlay der Effektor T Zellen. B und C: Zellen von gesunde Probanden (schwarz); Zellen von MS Patienten mit Natalizumab Therapie (grau).

Insgesamt zeigte die Versuchsreihe, dass es keine Unterschiede in der α 2,3 und der α 2,6 Sialylierung auf regulatorischen T Zellen und Effektor T Zellen zwischen gesunden Probanden und MS Patienten unter Natalizumab Therapie

gibt. Die Versuchsreihe zeigt aber eine erhöhte α 1,2 Glykosylierung bei MS Patienten unter Natalizumab Therapie im Vergleich zu Gesunden sowohl auf regulatorischen T Zellen, als auch auf Effektor T Zellen.

5 Diskussion

Posttranslationale Modifikationen von Proteinen, wie die Sialylierung und Glykosylierung spielen eine Schlüsselrolle bei der Regulation von Immunreaktionen [84, 106, 107]. Ebenfalls ist bereits seit längerem bekannt, dass sich die Oberflächenglykosylierung mit der Immunzellreifung verändert [108]. Dabei ist die Bedeutung der Oberflächenglykosylierung bei der Regulation der T Zellantwort noch wenig untersucht. Deshalb wurde in der vorliegenden Arbeit systematisch die Oberflächenglykosylierung auf den einzelnen T Helferzellpopulationen untersucht.

Bei der Gegenüberstellung von CD4+Foxp3- Effektor T Zellen und den CD4+Foxp3+ regulatorischen T Zellen konnte festgestellt werden, dass die α 2,3 und die α 2,6 Sialylierung auf den regulatorischen Zellen etwas stärker ausgeprägt ist als auf den Effektor T Zellen. Dies deckt sich mit Ergebnissen von vorausgegangen Studien mit Mäusen. Dort ergab sich, dass regulatorische T Zellen signifikant stärker α 2,3 und α 2,6 sialyliert sind [109]. Die fehlende Signifikanz bei humanen Immunzellen liegt möglicherweise daran, dass die Sialylierung beim Menschen interindividuell inhomogener ist als bei genetisch identischen Zuchtmäusen. Dazu passt, dass unsere Daten eine große Streubreite aufweisen (α 2,6 Sialylierung: Standardabweichung von Effektor T Zellen: 300,40 Mittelwert: 514,86; Standardabweichung von regulatorischen T Zellen: 380,72 Mittelwert: 611,02 und α 2,3 Sialylierung: Standardabweichung von Effektor T Zellen: 3,96 Mittelwert 8,85; Standardabweichung von regulatorischen T Zellen: 11,29 Mittelwert: 14,89). Für eine bessere Aussagekraft wäre deshalb möglicherweise eine größere Stichprobe notwendig. Zur eigentlichen Funktion der α 2,6 Sialylierung ist bisher nicht viel bekannt. In Experimenten mit Mäusen konnte dargelegt werden, dass die α 2,6 sialylierten Effektor T Zellen mehr CD25 und CD69 exprimieren, stärker proliferieren und mehr IL2 und IFN γ produzieren, als nicht α 2,6 sialylierte Effektor T Zellen [109].

Die ebenfalls untersuchte α 1,2 Glykosylierung ist auf CD4+Foxp3- Effektor T Zellen und auf den CD4+Foxp3+ regulatorischen T Zellen gleich stark

ausgeprägt. Bisher gibt es allerdings zur α 1,2 Glykosylierung kaum Experimente und über ihre Bedeutung ist noch weniger bekannt.

Ein besonderes Augenmerk unserer Experimentreihe kommt der β 1,6 N-Glykosylierung zu, da diese möglicherweise die suppressive Funktion der regulatorischen T Zellen beeinflusst [110]. Die regulatorischen T Zellen vermitteln ihre Suppression über Zell-Zell-Kontakte [111] und über lösliche Mediatoren. Über die Bedeutung der Glykosylierung der Oberflächenproteine von regulatorischen T Zellen für ihre regulatorische Funktion ist bislang nichts bekannt. Im Mausmodell demonstrierten E.T. Long et al., dass regulatorische T Zellen stärker n-glykosyliert sind als Effektor T Zellen [110]. Diese Ergebnisse ließen sich mit unseren Untersuchungen nicht auf den Menschen übertragen. Möglicherweise liegt dies daran, dass humane Lymphozyten heterogener sind, als die genetisch identischer Zuchtmäuse. Unsere Daten weisen eine relativ große Streubreite auf (N-Glykosylierung: Standardabweichung von Effektor T Zellen: 11,54 Mittelwert: 89,59; Standardabweichung von regulatorischen T Zellen: 23,68 Mittelwert: 103,39). Ein weiterer möglicher Grund ist, dass FoxP3 möglicherweise bei Menschen nur einen Teil der regulatorischen T Zellen erfasst [62].

Hängt die N-Glykosylierung also vom Aktivitätsniveau der T Zelle ab? Um dieser Frage nachzugehen betrachteten wir die T Zellen mit Hilfe von antiCD25 näher. AntiCD25 bindet an den Interleukin 2 Rezeptor, welcher bei regulatorischen T Zellen coexprimiert und bei aktivierten CD4+ T Zellen hochreguliert ist. Dabei sind die aktivierten CD4^{lo} Zellen am stärksten n-glykosyliert und die CD4^{hi} Zellen am schwächsten. Zwischen CD4+CD25- Effektor T Zellen und CD4+CD25+ regulatorischen T Zellen bestand kein signifikanter Unterschied. Diese Ergebnisse decken sich mit unseren Ergebnissen mit FoxP3 als Marker für regulatorische T Zellen, obwohl mit antiCD25 auch aktivierte T Zellen und nicht nur regulatorische T Zellen erfasst werden. Daraus lässt sich schließen, dass die unterschiedlichen Ergebnisse bei Maus- und humanen Zellen nicht an einer fehlenden Sensitivität des FoxP3 Markers für regulatorische T Zellen liegt.

Wir konnten in in-vitro-Versuchen nachweisen, dass die β 1,6 N-Glykosylierung auf CD4+Zellen durch unspezifische Stimulation mit PMA und Ionomycin zunimmt. Dies deckt sich mit Ergebnissen aus dem Mausmodell. Dort wurden die Zellen, anders als bei uns polyklonal aktiviert mit anti-CD3 und anti-CD28 [110]. Eine andere Studie konnte außerdem nachweisen, dass die T Zellaktivierung zu einer verstärkten Expression der β 1,6 N-Acetylglucosaminyltransferase 5, einem Enzym des N-Glykosylierungsprozesses, führt [86].

Die β 1,6 verzweigte N-Glykosylierung auf Th1, Th2 und Th17 Zellen, wurde in dieser Experimentreihe erstmals untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass Th17 Zellen am stärksten n-glykosyliert sind, gefolgt von Th1 Zellen. Th2 Zellen sind nur schwach n-glykosyliert. Bisher gibt es keine vergleichbaren Untersuchungen zur N-Oberflächenglykosylierung. Eine Studie untersuchte die Oberflächenglykosylierung von Maus-T Helferzellen mit den Lektinen SNA und PNA. Dabei stellte sich heraus, dass Th1 und Th17 Zellen eine ähnlich ausgeprägte α 2,6 Sialylierung und β 1,3 O-Glykosylierung haben [112]. Th1 und Th17 Zellen sind danach stärker α 2,6 sialyliert und β 1,3 O-glykosyliert als Th2 Zellen. Während die α 2,3 Sialylierung, untersucht mit MAL auf allen drei Zellpopulationen gleich stark ausgeprägt ist [112].

In unserem Experiment sind regulatorische T Zellen deutlich schwächer n-glykosyliert als die Th1 und Th17 Zellen. Allerdings wurden die regulatorischen T Zellen, anders als die Th1, Th2 und Th17 Zellen, auch nicht stimuliert und aktiviert. Möglicherweise liegt die Ursache der schwächeren n-Glykosylierung der regulatorischen T Zellen an ihrer fehlenden Aktivierung. Dies würde zu unseren vorangegangenen Versuchen passen, welche zeigten, dass die N-Oberflächenglykosylierung bei unspezifischer Zellstimulation zunimmt.

Die N-Oberflächenglykosylierung auf den einzelnen T Zellpopulationen ändert sich bei MS Patienten unter Natalizumab Therapie teilweise erheblich. Dies wird im Folgenden näher betrachtet, wobei stets T Zellen gesunder Probanden mit den T Zellen von MS Patienten unter Natalizumab Therapie verglichen werden:

Die α 2,3 und α 2,6 Sialylierung auf regulatorischen T Zellen war bei MS Patienten unter Natalizumab Therapie höher, als bei gesunden Probanden. Die Sialylierung der Effektor T Zellen war dagegen nicht signifikant unterschiedlich. Aus Mausversuchen ist bekannt, dass die α 2,6 Sialylierung unter inflammatorischen Bedingungen beispielsweise im Verlauf der EAE auf regulatorischen T Zellen hochreguliert wird. Nach antiCD3 Stimulation zeigen α 2,6 sialylierte T Zellen eine höhere CD25 und CD69 Expression. Dieser veränderte Aktivitätsstatus könnte eine Hypersensibilität der TCR auf diesen Zellen widerspiegeln [109]. Desweiteren führt die Interaktion von α 2,6 sialylierten regulatorischen T Zellen mit Sialoadhesinen, die ebenfalls bei Inflammation erhöht sind, zur Apoptose der regulatorischen T Zellen. Die dadurch fehlende Suppression der Effektor T Zellen führt zu einer verstärkten Inflammation [98, 109].

Die α 1,2 Glykosylierung steigt auf regulatorischen T Zellen und Effektor T Zellen bei MS Patienten unter Natalizumab Therapie an. Da über die Bedeutung der α 1,2 Glykosylierung kaum etwas bekannt ist, lässt sich über Gründe für diese Änderung nur spekulieren.

Auffallend ist, dass die β 1,6 N-Glykosylierung auf den Effektor T Zellen, den CD4^{hi} Zellen, den CD4^{lo} Zellen und den regulatorischen T Zellen, bei MS Patienten unter Natalizumab Therapie deutlich stärker ausgeprägt ist, im Vergleich zu entsprechenden Zellpopulationen gesunder Probanden.

Dadurch, dass in unseren Experimenten T Zellen gesunder Probanden mit den T Zellen von MS Patienten unter Natalizumab Therapie verglichen werden, ergibt sich eine Einschränkung bei der Interpretation der Ergebnisse. Es kann nicht geklärt werden, ob die Veränderungen der N-Glykosylierung, an der MS Erkrankung oder der Wirkung des Natalizumab liegen. Hierfür würde eine Vergleichsgruppe mit MS Patienten ohne Therapie benötigt. Wie in der Einleitung bereits erwähnt, sehen die Leitlinien allerdings vor, dass jeder MS Patient unmittelbar nach Diagnose einer Therapie zugeführt wird, so dass hier eine Probandenrekrutierung ethisch nicht verantwortlich wäre.

Über Natalizumab ist bisher bekannt, dass es weniger stark an regulatorische T Zellen als an Effektor T Zellen bindet. Die alpha-4 Integrin Expression fällt auf allen Immunzellpopulationen unter Natalizumab-Therapie ab. Effektor T Zellen sind dabei stärker betroffen als regulatorische T Zellen [39]. Bei unseren Ergebnissen sind die Unterschiede in der N-Glykosylierung auf Effektor T Zellen ebenfalls stärker ausgeprägt, als auf regulatorischen T Zellen. Der relative Verlust von alpha-4 Integrin korreliert direkt mit der Migrationsfähigkeit der T und B Lymphozyten sowie der Monozyten [38]. Des Weiteren verändert die VLA-4 Blockade, durch Natalizumab möglicherweise das Aktivitätsniveau der CD4 Zellen. So konnte bei Mäusen gezeigt werden, dass T Zellen stärker stimuliert werden, wenn anti-VLA-4 zu antiCD3 und antiCD28 gegeben wird [38, 113]. Bereits frühere Studien zeigten, dass VLA-4 ein Costimulationsmolekül auf T Zellen ist [114, 115]. Möglicherweise ist dies ein Erklärungsansatz, für die Zunahme der N-Glykosylierung unter Natalizumab.

Ebenso könnte die Zunahme der N-Glykosylierung an der MS Erkrankung liegen. So wurde eine Zunahme der N-Glykosylierung bei EAE beobachtet. Die Daten dazu sind allerdings noch nicht publiziert.

Ebenfalls erstmals untersucht wurde die β 1,6 verzweigte N-Glykosylierung auf T-Helferzellpopulationen bei MS Patienten unter Natalizumab Therapie. Dabei stellte sich heraus, dass die N-Glykosylierung auf Th1 und Th17 Zellen bei MS Patienten unter Natalizumab Therapie abnimmt. Wohingegen bei Th2 Zellen die N-Glykosylierung bei Probanden und Patienten unter Therapie gleich stark ausgeprägt ist. Bisher existieren weder Studien zur veränderten N-Glykosylierung auf T Helferzellsubtypen bei MS Patienten noch zu der bei MS Patienten unter Natalizumab Therapie. Frühere Studien zeigten, dass bei der MS vor allem Th1 und Th17 Zellen beteiligt sind [47, 54, 55]. Möglicherweise wird die N-Glykosylierung durch die verstärkte Th1 und Th17 Zellaktivität beeinflusst.

Die Erkenntnis, dass die mRNA der alpha-1,2-Mannosidase in regulatorischen T Zellen bei Nieren und Herztransplantierten stärker exprimiert wird und mit der Transplantatakzeptanz korreliert [87], legt die Vermutung nahe, dass die alpha-

1,2-Mannosidase mit der Suppressionsfähigkeit der regulatorischen T Zellen zu tun hat [110]. Um dies näher zu untersuchen wurden Immunzellen mit Kifunensin behandelt. Kifunensin hemmt spezifisch die katalytische Aktivität der alpha-1,2-Mannosidase [116, 117]. In diesem Versuch bestätigt sich die Annahme, dass auch humane Immunzellen, deren alpha-1,2-Mannosidase mit Kifunensin gehemmt wurde, weniger stark n-glykosyliert sind als unbehandelte, was mit den Ergebnissen von E.T. Long et al. im Mausmodell übereinstimmt [110]. Allerdings gibt es methodische Unterschiede: Bei den Versuchen mit Mauszellen, wurden die Zellen nur 30min mit Kifunensin inkubiert wohingegen in unseren Versuchen die Inkubation 48h dauerte. In unseren Vorversuchen erreichten wir erst bei 48h Inkubation eine effektive Suppression der N-Glykosylierung, bei gleichzeitigem Erhalt von ausreichend vitalen Zellen. Dies stimmt auch mit anderen Protokollen überein, die 24 h und länger mit Kifunensin inkubieren [87, 118].

Es stellte sich die Frage, ob die N-Glykosylierung für die Fähigkeit der regulatorischen Zellen zur Suppression von Aktivierung und Proliferation von Effektor-T Zellen verantwortlich ist. Dazu wurden CD4+CD25+ regulatorische T Zellen mit Kifunensin vorbehandelt und anschließend für 3 Tage mit CD4+CD25- Effektor T Zellen und antiCD3 sowie antiCD28 inkubiert. Dabei zeigte sich eine verstärkte suppressive Wirkung der regulatorischen T Zellen mit inhibierter alpha-1,2-Mannosidase auf die Proliferation der Effektor T Zellen. Auch dies stimmt mit den Ergebnissen im Mausmodell überein [110]. In vitro konnte nachgewiesen werden, dass mit Kifunensin behandelte regulatorische T Zellen weniger gut an Adhäsionsmoleküle (KAM-1, MADCAM) binden [110]. Möglicherweise gelangen sie so schlechter zum Zielgewebe und wirken dann dort aufgrund ihrer geringen Anzahl in der Summe weniger suppressiv. Dass eine Hemmung der alpha-1,2-Mannosidase zu einem veränderten T-Zellverhalten führt, bewiesen bereits frühere Untersuchungen [87]. Auch eine Hemmung der N-Acetylglucosaminyltransferase V (Mgat5), einem Enzym, dass der alpha-1,2-Mannosidase im N-Glykosylierungsprozess vorgeschaltet ist, führt zu einer verstärkten Aktivierbarkeit von T Zellen über den TCR. Außerdem sind Mgat5 defiziente Mäuse für die EAE empfänglicher [86]. Möglicherweise

liegt das daran, dass es durch Mgat5 zu einer Zunahme von N-Acetyllactosamin, dem Liganden für Galektine kommt. Galektine sind endogene Lektine, welche die T Zellproliferation und - apoptose beeinflussen [119, 120]. Es ist allerdings fraglich, ob sich diese Ergebnisse auf humane Zellen übertragen lassen, denn andere Untersuchungen zeigen, dass humane regulatorische T Zellen die Proliferation von Effektor T Zellen, anders als im Mausmodell ohne Apoptoseinduktion der Effektor T Zellen hemmen [121].

Die Verwendung von Lektinen beschränkt die Analyse auf die Untersuchung der Oberflächenglykosylierung. Interessant wäre zusätzlich die quantitative Bestimmung der an der Glykosylierung beteiligten Enzyme mittels RT-PCR wie in Versuchen von Sawitzki et al. [87] oder mittels Western-Blots. Eine weitere Limitation der Aussagen ergibt sich daraus, dass eine veränderte N-Oberflächenglykosylierung auf regulatorischen T Zellen gezeigt werden konnte, ohne dass die Proteine oder Lipide, die diese Glykosylierung tragen, weiter untersucht wurden.

Mit unseren Experimenten konnte gezeigt werden, dass die N-Oberflächenglykosylierung auf den einzelnen Immunzellsubpopulationen sehr unterschiedlich ist und sich je nach Aktivität der Zellen ändert. Desweiteren demonstrierten unsere Versuche, dass neben dem Phänotyp auch die Funktion der Zellen durch eine geänderte Oberflächenglykosylierung beeinflusst wird.

6 Zusammenfassung

Die Oberflächenglykosylierung beeinflusst wesentlich die Interaktion von Zellen des Immunsystems und deren Regulation. In der vorliegenden Arbeit wurde ihre Bedeutung in der Aktivierung und Differenzierung der T Zellen, welche eine zentrale Rolle in der Pathogenese der Multiplen Sklerose spielen näher untersucht.

Dazu wurden Immunzellen aus dem Blut gesunder Probanden und von Patienten mit Multiple Sklerose durchflusszytometrisch mittels Fluoreszenzantikörpern spezifiziert. Anschließend wurde die Intensität verschiedener Glykosylierungen ihrer Oberflächenproteine mit Hilfe von Lektinen analysiert. Eine weitere Fragestellung war, inwieweit sich die Oberflächenglykosylierung durch in-vitro Stimulation verändert. Weiterhin wurde die Auswirkung auf die β 1,2 N-Oberflächenglykosylierung auf regulatorischen T Zellen durch spezifische Inhibition der α 1,2 Mannosidase untersucht.

Bei der Untersuchung der Effektor T Zellen und regulatorischen T Zellen zeigte sich, dass sich die α 2,3 und die α 2,6 Sialylierung sowie auf Effektor T Zellen und regulatorischen T Zellen sowohl bei gesunden Probanden als auch bei Patienten unter Natalizumabtherapie nicht wesentlich unterscheidet. Anders verhält es sich bei der α 1,2 Glykosylierung, die bei Patienten mit Multipler Sklerose unter Natalizumabtherapie deutlich erhöht ist.

Im Gegensatz hierzu stellte sich heraus, dass die in dieser Arbeit erstmals auf humanen T Zellen untersuchte N-Oberflächenglykosylierung sich in ihrer Ausprägung signifikant auf den einzelnen T Zell Subpopulationen unterscheidet. So konnte gezeigt werden, dass aktivierte T Zellen und regulatorische T Zellen stärker n-glykosyliert sind, als nicht aktivierte T Helfer Zellen. T Helfer Typ 17 Zellen waren stärker n-glykosyliert als T Helfer Typ 2 Zellen.

Die Ausprägung unterscheidet sich auf den vergleichbaren Subpopulationen zudem zwischen gesunden Probanden und MS Patienten unter Natalizumabtherapie. So ist die β 1,6 N Glykosylierung auf T Helfer Typ 1 und T

Helfer Typ 17 Zellen bei MS Patienten erniedrigt und auf T Effektor Zellen erhöht.

In unseren in-vitro Versuchen konnten wir weiterhin nachweisen, dass die N-Oberflächenglykosylierung durch spezifische Stimulation zunimmt und eine Hemmung der intrazellulären n-glykosylierenden Prozesse die suppressive Funktion regulatorischer T Zellen steigert. Damit scheint eine effiziente Oberflächenglykosylierung kritisch für die immunregulatorische Funktion von regulatorischen T Zellen zu sein.

In unseren Untersuchungen ergeben sich Hinweise darauf, dass die immunologische Funktion von T Zellen mit der Intensität ihrer Oberflächenglykosylierung korreliert und dass die Oberflächenglykosylierung von Immunzellen bei Patienten mit Multipler Sklerose verändert ist und sich unter Therapie mit dem Integrin-Inhibitor Natalizumab verändert.

7 Literaturverzeichnis

1. Kobelt, G., et al., *Costs and quality of life of multiple sclerosis in Germany*. Eur J Health Econ, 2006. **7 Suppl 2**: p. S34-44.
2. Flachenecker, P., et al., *[MS registry in Germany--design and first results of the pilot phase]*. Nervenarzt, 2005. **76**(8): p. 967-75.
3. Kurtzke, J.F., *Epidemiology of multiple sclerosis. Does this really point toward an etiology? Lectio Doctoralis*. Neurol Sci, 2000. **21**(6): p. 383-403.
4. Pugliatti, M., S. Sotgiu, and G. Rosati, *The worldwide prevalence of multiple sclerosis*. Clin Neurol Neurosurg, 2002. **104**(3): p. 182-91.
5. Poeck K, H.W., *Multiple sklerose*, in *Neurologie*. 2006, Springer Medizin Verlag: Heidelberg, Germany. p. 490-506.
6. Neurologie, D.G.f. *Diasgnose und Therapie der Multiplen Sklerose*. [AWMF Leitlinien] 2012.
7. Polman, C.H., et al., *Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the McDonald criteria*. Ann Neurol, 2011. **69**(2): p. 292-302.
8. Lassmann, H., W. Bruck, and C. Lucchinetti, *Heterogeneity of multiple sclerosis pathogenesis: implications for diagnosis and therapy*. Trends Mol Med, 2001. **7**(3): p. 115-21.
9. Noseworthy, J.H., et al., *Multiple sclerosis*. N Engl J Med, 2000. **343**(13): p. 938-52.
10. Barnett, M.H. and I. Sutton, *The pathology of multiple sclerosis: a paradigm shift*. Curr Opin Neurol, 2006. **19**(3): p. 242-7.
11. Locatelli, G., et al., *Primary oligodendrocyte death does not elicit anti-CNS immunity*. Nat Neurosci, 2012. **15**(4): p. 543-50.
12. Löffler G, P.P., Heinrich PC, *Vitamine*, in *Biochemie und Pathobiochemie*, L. G, Editor. 2007, Springer Medizinverlag: Heidelberg, Germany. p. 688-691.
13. Provvedini, D.M., et al., *1,25-dihydroxyvitamin D3 receptors in human leukocytes*. Science, 1983. **221**(4616): p. 1181-3.
14. Veldman, C.M., M.T. Cantorna, and H.F. DeLuca, *Expression of 1,25-dihydroxyvitamin D(3) receptor in the immune system*. Arch Biochem Biophys, 2000. **374**(2): p. 334-8.
15. Dong, X., et al., *Regulation of relB in dendritic cells by means of modulated association of vitamin D receptor and histone deacetylase 3 with the promoter*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(44): p. 16007-12.
16. Muthian, G., et al., *1,25 Dihydroxyvitamin-D3 modulates JAK-STAT pathway in IL-12/IFNgamma axis leading to Th1 response in experimental allergic encephalomyelitis*. J Neurosci Res, 2006. **83**(7): p. 1299-309.
17. Bhalla, A.K., E.P. Amento, and S.M. Krane, *Differential effects of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on human lymphocytes and monocyte/macrophages: inhibition of interleukin-2 and augmentation of interleukin-1 production*. Cell Immunol, 1986. **98**(2): p. 311-22.

18. Muller, K., M. Diamant, and K. Bendtzen, *Inhibition of production and function of interleukin-6 by 1,25-dihydroxyvitamin D3*. Immunol Lett, 1991. **28**(2): p. 115-20.
19. Muller, K., N. Odum, and K. Bendtzen, *1,25-dihydroxyvitamin D3 selectively reduces interleukin-2 levels and proliferation of human T cell lines in vitro*. Immunol Lett, 1993. **35**(2): p. 177-82.
20. Reichel, H., et al., *1 alpha,25-Dihydroxyvitamin D3 inhibits gamma-interferon synthesis by normal human peripheral blood lymphocytes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1987. **84**(10): p. 3385-9.
21. Boonstra, A., et al., *1alpha,25-Dihydroxyvitamin d3 has a direct effect on naive CD4(+) T cells to enhance the development of Th2 cells*. J Immunol, 2001. **167**(9): p. 4974-80.
22. Smolders, J., et al., *Vitamin D as an immune modulator in multiple sclerosis, a review*. J Neuroimmunol, 2008. **194**(1-2): p. 7-17.
23. International Multiple Sclerosis Genetics, C., et al., *Risk alleles for multiple sclerosis identified by a genomewide study*. N Engl J Med, 2007. **357**(9): p. 851-62.
24. Ebers, G.C., et al., *A population-based study of multiple sclerosis in twins*. N Engl J Med, 1986. **315**(26): p. 1638-42.
25. Baranzini, S.E., et al., *Genome, epigenome and RNA sequences of monozygotic twins discordant for multiple sclerosis*. Nature, 2010. **464**(7293): p. 1351-6.
26. Gale, C.R. and C.N. Martyn, *Migrant studies in multiple sclerosis*. Prog Neurobiol, 1995. **47**(4-5): p. 425-48.
27. Ascherio, A. and M. Munch, *Epstein-Barr virus and multiple sclerosis*. Epidemiology, 2000. **11**(2): p. 220-4.
28. Hernan, M.A., et al., *Multiple sclerosis and age at infection with common viruses*. Epidemiology, 2001. **12**(3): p. 301-6.
29. Levin, L.I., et al., *Multiple sclerosis and Epstein-Barr virus*. JAMA, 2003. **289**(12): p. 1533-6.
30. Buljevac, D., et al., *Epstein-Barr virus and disease activity in multiple sclerosis*. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 2005. **76**(10): p. 1377-81.
31. Srivastava, R., et al., *Potassium channel KIR4.1 as an immune target in multiple sclerosis*. N Engl J Med, 2012. **367**(2): p. 115-23.
32. Ransohoff, R.M., *Natalizumab for multiple sclerosis*. N Engl J Med, 2007. **356**(25): p. 2622-9.
33. Stuve, O. and J.L. Bennett, *Pharmacological properties, toxicology and scientific rationale for the use of natalizumab (Tysabri) in inflammatory diseases*. CNS Drug Rev, 2007. **13**(1): p. 79-95.
34. Yousry, T.A., et al., *Evaluation of patients treated with natalizumab for progressive multifocal leukoencephalopathy*. N Engl J Med, 2006. **354**(9): p. 924-33.
35. Kleinschmidt-DeMasters, B.K. and K.L. Tyler, *Progressive multifocal leukoencephalopathy complicating treatment with natalizumab and interferon beta-1a for multiple sclerosis*. N Engl J Med, 2005. **353**(4): p. 369-74.

36. Bloomgren, G., et al., *Risk of natalizumab-associated progressive multifocal leukoencephalopathy*. N Engl J Med, 2012. **366**(20): p. 1870-80.
37. Stuve, O., et al., *Altered CD4+/CD8+ T-cell ratios in cerebrospinal fluid of natalizumab-treated patients with multiple sclerosis*. Arch Neurol, 2006. **63**(10): p. 1383-7.
38. Niino, M., et al., *Natalizumab effects on immune cell responses in multiple sclerosis*. Ann Neurol, 2006. **59**(5): p. 748-54.
39. Stenner, M.P., et al., *Effects of natalizumab treatment on Foxp3+ T regulatory cells*. PLoS One, 2008. **3**(10): p. e3319.
40. Böcker W, D.H., Heitz Ph U, Moch H, *Immunreaktionen*, in *Pathologie*, I.B.A. Müller C, Holländer G A, Editor. 2010, Elsevier GmbH, München: München, Germany. p. 74-114.
41. Seamons, A., A. Perchellet, and J. Goverman, *Immune tolerance to myelin proteins*. Immunol Res, 2003. **28**(3): p. 201-21.
42. Harrington, C.J., et al., *Differential tolerance is induced in T cells recognizing distinct epitopes of myelin basic protein*. Immunity, 1998. **8**(5): p. 571-80.
43. Mosmann, T.R. and R.L. Coffman, *TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties*. Annu Rev Immunol, 1989. **7**: p. 145-73.
44. Goverman, J., *Autoimmune T cell responses in the central nervous system*. Nat Rev Immunol, 2009. **9**(6): p. 393-407.
45. Baron, J.L., et al., *Surface expression of alpha 4 integrin by CD4 T cells is required for their entry into brain parenchyma*. J Exp Med, 1993. **177**(1): p. 57-68.
46. Segal, B.M. and E.M. Shevach, *IL-12 unmasks latent autoimmune disease in resistant mice*. J Exp Med, 1996. **184**(2): p. 771-5.
47. Gutcher, I. and B. Becher, *APC-derived cytokines and T cell polarization in autoimmune inflammation*. J Clin Invest, 2007. **117**(5): p. 1119-27.
48. Panitch, H.S., et al., *Exacerbations of multiple sclerosis in patients treated with gamma interferon*. Lancet, 1987. **1**(8538): p. 893-5.
49. Coffman, R.L., *Origins of the T(H)1-T(H)2 model: a personal perspective*. Nat Immunol, 2006. **7**(6): p. 539-41.
50. Moss, R.B., et al., *Th1/Th2 cells in inflammatory disease states: therapeutic implications*. Expert Opin Biol Ther, 2004. **4**(12): p. 1887-96.
51. Mosmann, T.R., et al., *Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins*. J Immunol, 1986. **136**(7): p. 2348-57.
52. Korn, T., et al., *IL-17 and Th17 Cells*. Annu Rev Immunol, 2009. **27**: p. 485-517.
53. Chung, Y., et al., *Critical regulation of early Th17 cell differentiation by interleukin-1 signaling*. Immunity, 2009. **30**(4): p. 576-87.
54. Lock, C., et al., *Gene-microarray analysis of multiple sclerosis lesions yields new targets validated in autoimmune encephalomyelitis*. Nat Med, 2002. **8**(5): p. 500-8.

55. Tzartos, J.S., et al., *Interleukin-17 production in central nervous system-infiltrating T cells and glial cells is associated with active disease in multiple sclerosis*. Am J Pathol, 2008. **172**(1): p. 146-55.
56. Langrish, C.L., et al., *IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation*. J Exp Med, 2005. **201**(2): p. 233-40.
57. Kebir, H., et al., *Human TH17 lymphocytes promote blood-brain barrier disruption and central nervous system inflammation*. Nat Med, 2007. **13**(10): p. 1173-5.
58. Belkaid, Y., *Regulatory T cells and infection: a dangerous necessity*. Nat Rev Immunol, 2007. **7**(11): p. 875-88.
59. Gavin, M. and A. Rudensky, *Control of immune homeostasis by naturally arising regulatory CD4+ T cells*. Curr Opin Immunol, 2003. **15**(6): p. 690-6.
60. Fontenot, J.D., M.A. Gavin, and A.Y. Rudensky, *Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells*. Nat Immunol, 2003. **4**(4): p. 330-6.
61. Hori, S., T. Nomura, and S. Sakaguchi, *Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3*. Science, 2003. **299**(5609): p. 1057-61.
62. Roncador, G., et al., *Analysis of FOXP3 protein expression in human CD4+CD25+ regulatory T cells at the single-cell level*. Eur J Immunol, 2005. **35**(6): p. 1681-91.
63. Miyara, M., et al., *Functional delineation and differentiation dynamics of human CD4+ T cells expressing the FoxP3 transcription factor*. Immunity, 2009. **30**(6): p. 899-911.
64. Zhang, H., et al., *Intrinsic and induced regulation of the age-associated onset of spontaneous experimental autoimmune encephalomyelitis*. J Immunol, 2008. **181**(7): p. 4638-47.
65. Viglietta, V., et al., *Loss of functional suppression by CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with multiple sclerosis*. J Exp Med, 2004. **199**(7): p. 971-9.
66. Kumar, M., et al., *CD4+CD25+FoxP3+ T lymphocytes fail to suppress myelin basic protein-induced proliferation in patients with multiple sclerosis*. J Neuroimmunol, 2006. **180**(1-2): p. 178-84.
67. Feger, U., et al., *Increased frequency of CD4+ CD25+ regulatory T cells in the cerebrospinal fluid but not in the blood of multiple sclerosis patients*. Clin Exp Immunol, 2007. **147**(3): p. 412-8.
68. Lowther, D.E. and D.A. Hafler, *Regulatory T cells in the central nervous system*. Immunol Rev, 2012. **248**(1): p. 156-69.
69. O'Connor, R.A. and S.M. Anderton, *Foxp3+ regulatory T cells in the control of experimental CNS autoimmune disease*. J Neuroimmunol, 2008. **193**(1-2): p. 1-11.
70. Lim, H.W., et al., *Cutting edge: direct suppression of B cells by CD4+ CD25+ regulatory T cells*. J Immunol, 2005. **175**(7): p. 4180-3.
71. Zhao, D.M., et al., *Activated CD4+CD25+ T cells selectively kill B lymphocytes*. Blood, 2006. **107**(10): p. 3925-32.
72. Azuma, T., et al., *Human CD4+ CD25+ regulatory T cells suppress NKT cell functions*. Cancer Res, 2003. **63**(15): p. 4516-20.

73. Smyth, M.J., et al., *CD4+CD25+ T regulatory cells suppress NK cell-mediated immunotherapy of cancer*. J Immunol, 2006. **176**(3): p. 1582-7.
74. Taams, L.S., et al., *Modulation of monocyte/macrophage function by human CD4+CD25+ regulatory T cells*. Hum Immunol, 2005. **66**(3): p. 222-30.
75. Misra, N., et al., *Cutting edge: human CD4+CD25+ T cells restrain the maturation and antigen-presenting function of dendritic cells*. J Immunol, 2004. **172**(8): p. 4676-80.
76. Löffler G, P.P., Heinrich PC, *Biosynthese, Modifikation und Abbau von Proteinen*, in *Biochemie und Pathobiochemie*, H. A, Editor. 2007, Springer Medizinverlag: Heidelberg, Germany. p. 286-324.
77. Löffler G, P.P., Heinrich PC, *Biosynthese von Kohlenhydraten*, in *Biochemie und Pathobiochemie*, L. G, Editor. 2007, Springer Medizinverlag: Heidelberg, Germany. p. 540-552.
78. Priatel, J.J., et al., *The ST3Gal-I sialyltransferase controls CD8+ T lymphocyte homeostasis by modulating O-glycan biosynthesis*. Immunity, 2000. **12**(3): p. 273-83.
79. Pappu, B.P. and P.A. Shrikant, *Alteration of cell surface sialylation regulates antigen-induced naive CD8+ T cell responses*. J Immunol, 2004. **173**(1): p. 275-84.
80. Moody, A.M., et al., *Developmentally regulated glycosylation of the CD8alpha coreceptor stalk modulates ligand binding*. Cell, 2001. **107**(4): p. 501-12.
81. Razi, N. and A. Varki, *Cryptic sialic acid binding lectins on human blood leukocytes can be unmasked by sialidase treatment or cellular activation*. Glycobiology, 1999. **9**(11): p. 1225-34.
82. Herscovics, A., *Structure and function of Class I alpha 1,2-mannosidases involved in glycoprotein synthesis and endoplasmic reticulum quality control*. Biochimie, 2001. **83**(8): p. 757-62.
83. Mkhikian, H., et al., *Genetics and the environment converge to dysregulate N-glycosylation in multiple sclerosis*. Nat Commun, 2011. **2**: p. 334.
84. Daniels, M.A., K.A. Hogquist, and S.C. Jameson, *Sweet 'n' sour: the impact of differential glycosylation on T cell responses*. Nat Immunol, 2002. **3**(10): p. 903-10.
85. Comelli, E.M., et al., *Activation of murine CD4+ and CD8+ T lymphocytes leads to dramatic remodeling of N-linked glycans*. J Immunol, 2006. **177**(4): p. 2431-40.
86. Demetriou, M., et al., *Negative regulation of T-cell activation and autoimmunity by Mgat5 N-glycosylation*. Nature, 2001. **409**(6821): p. 733-9.
87. Sawitzki, B., et al., *Identification of gene markers for the prediction of allograft rejection or permanent acceptance*. Am J Transplant, 2007. **7**(5): p. 1091-102.
88. Lau, K.S., et al., *Complex N-glycan number and degree of branching cooperate to regulate cell proliferation and differentiation*. Cell, 2007. **129**(1): p. 123-34.

89. Grigorian, A., et al., *Control of T Cell-mediated autoimmunity by metabolite flux to N-glycan biosynthesis*. J Biol Chem, 2007. **282**(27): p. 20027-35.
90. Wang, W.C. and R.D. Cummings, *The immobilized leucoagglutinin from the seeds of Maackia amurensis binds with high affinity to complex-type Asn-linked oligosaccharides containing terminal sialic acid-linked alpha-2,3 to penultimate galactose residues*. J Biol Chem, 1988. **263**(10): p. 4576-85.
91. Knibbs, R.N., et al., *Characterization of the carbohydrate binding specificity of the leucoagglutinating lectin from Maackia amurensis. Comparison with other sialic acid-specific lectins*. J Biol Chem, 1991. **266**(1): p. 83-8.
92. Kono, M., et al., *Mouse beta-galactoside alpha 2,3-sialyltransferases: comparison of in vitro substrate specificities and tissue specific expression*. Glycobiology, 1997. **7**(4): p. 469-79.
93. Moody, A.M., et al., *Sialic acid capping of CD8beta core 1-O-glycans controls thymocyte-major histocompatibility complex class I interaction*. J Biol Chem, 2003. **278**(9): p. 7240-6.
94. Garcia, G.G., et al., *Age-associated changes in glycosylation of CD43 and CD45 on mouse CD4 T cells*. Eur J Immunol, 2005. **35**(2): p. 622-31.
95. Berger, S.B., et al., *CD43-independent augmentation of mouse T-cell function by glycoprotein cleaving enzymes*. Immunology, 2006. **119**(2): p. 178-86.
96. Takashima, S., S. Tsuji, and M. Tsujimoto, *Comparison of the enzymatic properties of mouse beta-galactoside alpha2,6-sialyltransferases, ST6Gal I and II*. J Biochem, 2003. **134**(2): p. 287-96.
97. Amano, M., et al., *The ST6Gal I sialyltransferase selectively modifies N-glycans on CD45 to negatively regulate galectin-1-induced CD45 clustering, phosphatase modulation, and T cell death*. J Biol Chem, 2003. **278**(9): p. 7469-75.
98. Wu, C., et al., *Sialoadhesin-positive macrophages bind regulatory T cells, negatively controlling their expansion and autoimmune disease progression*. J Immunol, 2009. **182**(10): p. 6508-16.
99. Hartnell, A., et al., *Characterization of human sialoadhesin, a sialic acid binding receptor expressed by resident and inflammatory macrophage populations*. Blood, 2001. **97**(1): p. 288-96.
100. Jiang, H.R., et al., *Sialoadhesin promotes the inflammatory response in experimental autoimmune uveoretinitis*. J Immunol, 2006. **177**(4): p. 2258-64.
101. Sughii S, K.E., Baer HH, *Further immunochemical studies on the combining sites of Lotus tetragonolobus and Ulex europaeus I and II lectins*. Carbohydr Res., 1982: p. 99-101.
102. eBioscience. *Flow Cytometry – BestProtocols®*. 2010 2000-2010.
103. GmbH, P.L. *Protocol for Use Lymphocyte Separation Medium LSM 1077*. 2012.
104. Biotec, M. *CD4+CD25+ Regulatory T Cell Isolation Kit*. 1999 - 2012.
105. GmbH, M.B. *MACS® Technology - Gold standard in cell separation*. [Protocol] 2011 [cited 1-8; 5-6].

106. Brennan, P.J., et al., *Sialylation regulates peripheral tolerance in CD4+ T cells*. *Int Immunol*, 2006. **18**(5): p. 627-35.
107. Jenner, J., et al., *Increased alpha2,6-sialylation of surface proteins on tolerogenic, immature dendritic cells and regulatory T cells*. *Exp Hematol*, 2006. **34**(9): p. 1212-8.
108. Pink, J.R., *Changes in T-lymphocyte glycoprotein structures associated with differentiation*. *Contemp Top Mol Immunol*, 1983. **9**: p. 89-113.
109. Kidder, D., et al., *Sialoadhesin ligand expression identifies a subset of CD4+Foxp3- T cells with a distinct activation and glycosylation profile*. *J Immunol*, 2013. **190**(6): p. 2593-602.
110. Long, E.T., et al., *Alpha-1,2-mannosidase and hence N-glycosylation are required for regulatory T cell migration and allograft tolerance in mice*. *PLoS One*, 2010. **5**(1): p. e8894.
111. Sakaguchi, S., et al., *Regulatory T cells and immune tolerance*. *Cell*, 2008. **133**(5): p. 775-87.
112. Toscano, M.A., et al., *Differential glycosylation of TH1, TH2 and TH-17 effector cells selectively regulates susceptibility to cell death*. *Nat Immunol*, 2007. **8**(8): p. 825-34.
113. Theien, B.E., et al., *Discordant effects of anti-VLA-4 treatment before and after onset of relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis*. *J Clin Invest*, 2001. **107**(8): p. 995-1006.
114. Avdalovic, M., D. Fong, and B. Formby, *Adhesion and costimulation of proliferative responses of human gamma delta T cells by interaction of VLA-4 and VLA-5 with fibronectin*. *Immunol Lett*, 1993. **35**(2): p. 101-8.
115. Sato, T., et al., *Role of the VLA-4 molecule in T cell costimulation. Identification of the tyrosine phosphorylation pattern induced by the ligation of VLA-4*. *J Immunol*, 1995. **155**(6): p. 2938-47.
116. Elbein, A.D., et al., *Kifunensine, a potent inhibitor of the glycoprotein processing mannosidase I*. *J Biol Chem*, 1990. **265**(26): p. 15599-605.
117. Weng, S. and R.G. Spiro, *Endoplasmic reticulum kifunensine-resistant alpha-mannosidase is enzymatically and immunologically related to the cytosolic alpha-mannosidase*. *Arch Biochem Biophys*, 1996. **325**(1): p. 113-23.
118. Ryan, S.O., et al., *MHCII glycosylation modulates Bacteroides fragilis carbohydrate antigen presentation*. *J Exp Med*, 2011. **208**(5): p. 1041-53.
119. Perillo, N.L., et al., *Apoptosis of T cells mediated by galectin-1*. *Nature*, 1995. **378**(6558): p. 736-9.
120. Vespa, G.N., et al., *Galectin-1 specifically modulates TCR signals to enhance TCR apoptosis but inhibit IL-2 production and proliferation*. *J Immunol*, 1999. **162**(2): p. 799-806.
121. Vercoulen, Y., et al., *Human regulatory T cell suppressive function is independent of apoptosis induction in activated effector T cells*. *PLoS One*, 2009. **4**(9): p. e7183.

8 Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift

Die Arbeit wurde in der Klinik für Neurologie an der Universität Tübingen unter der Betreuung von Privatdozent Dr. F. Bischof durchgeführt

Die Konzeption der Studien erfolgte durch Privatdozent Dr. F. Bischof.

Die Versuche wurden (nach Einarbeitung durch PD Dr. F. Bischof; E. Dubios, leitende MTA; Jan Piel und Dr. med. J. Mörike, Doktoranden) von mir eigenständig durchgeführt. Ausnahme waren die Verdünnungsreihen zur Konzentrationsbestimmung von MAL, SNL und UEA, welche in Zusammenarbeit mit J. Piel erfolgten.

Die statistische Auswertung erfolgte (nach Anleitung durch PD Dr. F. Bischof und Dr. rer. nat. J. Klose) eigenständig durch mich.

Ich versichere, das Manuskript selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Stuttgart, den 23.01.2017

9 Danksagung

An erster Stelle möchte ich meinem Doktorvater und Betreuer PD Dr. Bischof danken, für die Überlassung des interessanten Themas, für die wissenschaftlichen Gespräche sowie für seine Korrekturen und seine große Bereitschaft, meine Fragen zu beantworten.

Besonders danke ich auch meinen Mitdoktoranden Jan Piel und Johannes Mörike, für die unzähligen gemeinsamen Stunden im Labor, die wissenschaftlichen und privaten Diskussionen und ihren ansteckenden Optimismus, wenn es mal nicht so voranging wie erwartet.

Außerdem möchte ich an dieser Stelle Frau Evelyn Dubois danken für ihre Hilfe und Unterstützung bei der praktischen Durchführung der Arbeit im Labor. Ihre Erfahrung und Kompetenz war mir stets eine große Hilfe.

Ein herzliches Dankeschön geht vor allem auch an meine Eltern und meine Schwester für ihre Unterstützung und ihren Rückhalt.