Funktionelle Relevanz der genetischen Varianten von CD226 für die Pathogenese der Multiplen Sklerose

Dissertation

Zur Erlangung der Würde des Doktors der Naturwissenschaften des Fachbereichs Biologie, der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften, der Universität Hamburg

vorgelegt von

Melanie Yoko Piédavent

aus Kobe, Japan

Hamburg 2013

Genehmigt vom Fachbereich Biologie
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
an der Universität Hamburg
auf Antrag von Professor Dr. B. FLEISCHER
Weiterer Gutachter der Dissertation:
Professor Dr. T. DOBNER
Tag der Disputation: 16. August 2013

Hamburg, den 01. August 2013

Professor Dr. C. Lohr
Vorsitzender des
Fach-Promotionsausschusses Biologie

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung 1

1.1 Multiple Sklerose 1

1.1.1 Epidemiologie 1
1.1.2 Krankheitsbild 2
1.1.3 Therapie 3
1.1.4 Ätiologie 3
1.1.5 Immunpathogenese 8
1.1.6 Regulatorische T-Zellen in MS 13
1.1.7 Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis 15

1.2 CD226 18

1.2.1 Aufbau und Funktion von CD226 18
1.2.2 TIGIT 23

1.3 CD155 24

1.4 Zielsetzung 25

2 Material und Methoden 26

2.1 Humanes Probenmaterial 26

2.2 Mauslinien 28

2.3 Material 29

2.3.1 Reagenzien und Verbrauchsartikel 29
2.3.2 Reagenzien für die Durchflusszytometrie 32
2.3.3 Primer 34
2.3.4 Geräte 34
2.3.5 Software 35
2.3.6 Puffer, Lösungen und Zellkulturmedien 36

2.4 Methoden 38

2.4.1 Molekularbiologische Methoden 38
2.4.2 Genotypisierung humaner Individuen 38
2.4.3 Genotypisierung von transgenen Mauslinien 38
2.4.4 Zellbiologische Methoden (Humane Zellen) 42
2.4.5 Zellbiologische Methoden (murine Zellen) 43
2.4.6 Durchflusszytometrie 48
2.4.7 EAE 50

3 Ergebnisse 53

3.1 Charakterisierung der CD226-Expression auf humanen T-Zellen 53

3.1.1 CD226 ist auf humanen T- und NK-Zellpopulationen exprimiert 53

3.1.2 Genotypisierung gesunder Individuen und MS-Patienten für SNP-Varianten von *CD226* 55

3.1.3 Zellen von gesunden Trägern des Risikohaplotyps besitzen eine verminderte CD226-Expression 57

3.1.4 MS-Patienten weisen unabhängig vom Genotyp eine verringerte CD226-Expression im Vergleich zu gesunden Individuen auf 59

3.1.5 Aktivierungsinduzierte Regulation der CD226-Expression auf $CD4^+$ T-Zellen 59

3.1.6 $CD4^+$ T-Zellen von Trägern des Risikohaplotyps weisen eine defizitäre Hochregulation der CD226-Expression auf 62

3.2 Analyse der phänotypischen Konsequenz einer CD226-Defizienz in murinen Immunzellen 64

3.2.1 Analyse der CD226-Expression auf murinen Immunzellen 64

3.2.2 Stimulationskinetik der CD226-Expression 66

3.2.3 CD226-Expression auf ZNS-infiltrierenden T-Zellen 68

3.2.4 CD226-defiziente Mäuse besitzen eine erhöhte Frequenz $CD4^+$ regulatorischer T-Zellen in der Milz und im Thymus 69

3.2.5 CD226-defiziente T_{reg}-Zellen sind in ihrer suppressiven Kapazität eingeschränkt 71

3.2.6 Eine CD226-Defizienz führt zu einem schwereren Verlauf der EAE 72

3.2.7 Die zelluläre Zusammensetzung des ZNS-Infiltrats von Mäusen mit akut entzündetem ZNS wird von einer CD226-Defizienz nicht beeinflusst 74

3.2.8 Der adoptive Transfer von CD226-defizienten 2D2-transgenen T-Zellen beschleunigt das Einsetzen der EAE-Symptomatik 75

3.2.9 Möglicher Einfluss regulatorischer T-Zellen auf den adoptiven Transfer 77

3.3 Analyse des Einflusses einer Defizienz des CD226-Liganden CD155 auf murine Immunzellen und den Verlauf der EAE 80

3.3.1 Charakterisierung der CD155-Expression auf murinen Immunzellen 80

3.3.2 Stimulationskinetik der CD155-Expression 81

3.3.3 CD155-Expression auf ZNS-infiltrierenden Zellen 83

3.3.4 Charakterisierung der CD155-defizienten Maus 84

3.3.5 Kein Einfluss einer CD155-Defizienz auf die T-Zell-Proliferation bei Kokultur mit T_{reg}-Zellen 84

3.3.6 *Cd155*$^{-/-}$-Mäuse zeigen keine Änderung des EAE-Verlaufs 85

4 Diskussion 87

Zusammenfassung 105

Summary 106

Literaturverzeichnis 107

Abkürzungsverzeichnis 122

Abbildungsverzeichnis 125

Tabellenverzeichnis 127

Danksagung 128

1 Einleitung

1.1 Multiple Sklerose

Multiple Sklerose (MS) ist die häufigste entzündlich demyelinisierende Erkrankung des zentralen Nervensystems (ZNS), in der inflammatorische Prozesse zu wiederkehrenden Krankheitsschüben führen, die letztendlich mit Neurodegeneration und einer zunehmenden Behinderung der Betroffenen einhergehen[1]. Durch die in der Regel bereits im frühen Erwachsenenalter eintretende sehr heterogene Symptomatik und Verlaufsform ist eine Prognose über das weitere Fortschreiten der Erkrankung sehr schwierig. Eine kurative Therapie existiert bis heute nicht. Aufgrund der großen sozioökonomischen Folgen, mit der die Erkrankung in besonderem Maße in der westlichen Welt vergesellschaftet ist, konzentrieren viele Wissenschaftler ihre Forschung auf die Beantwortung der Frage, wie es zur autoreaktiven Inflammation des ZNS kommt und wie die fortschreitende Neurodegeneration eingedämmt werden kann.

1.1.1 Epidemiologie

MS ist in ihrer klinischen und pathologischen Präsentation eine vielgestaltige Krankheit. Es erkranken meist junge Erwachsene im Alter zwischen 20 und 40 Jahren und Frauen etwa doppelt so häufig wie Männer. In Europa beträgt die Prävalenz etwa 1 zu 1000, weltweit sind etwa 2,5 Millionen Menschen betroffen, wobei die Mehrzahl der Patienten kaukasischer Abstammung ist[2].

MS-Patienten leiden unter einer diversen Symptomatik, die sich je nach Lokalisation der inflammatorischen Läsion im ZNS unterscheidet. Typischerweise treten besonders in frühen Stadien der MS Seh- und Sensibilitätsstörungen auf, im späteren Verlauf mehren sich motorische Störungen wie Lähmungserscheinungen und Spastiken, aber auch kognitive und psychische Störungen werden häufig beobachtet[1].

Die Symptome treten zu Beginn der Erkrankung typischerweise in Schüben auf, die sich zunächst meist völlig zurückbilden. Man unterscheidet dabei Patienten, die einen ersten Schub durchlaufen – das so genannte klinisch-isolierte Syndrom – von Patienten, die eine zeitliche und räumliche Dissemination der Entzündungsherde aufweisen. Bei Letzteren spricht man von einer schubförmig-remittierenden MS. Etwa 80–85% der MS-Patienten entwickeln diese Form der MS, die damit die häufigste Verlaufsform ist. Erst nach mehrjähriger Krankheitsdauer entwickelt etwa die Hälfte der Patienten einen sekundär-progredienten Verlauf, der durch eine stetige Akkumulation neurologischer Defizite gekennzeichnet ist.

Etwa 15% der MS-Patienten leiden unter einem stetig fortschreitenden Krankheitsbild, der primär-progredienten MS, die durch eine stetige Zunahme der neurologischen Fehlfunktionen ohne Regeneration gekennzeichnet ist. Einzelne Schübe lassen sich in diesen Patienten häufig nicht abgrenzen.

1.1.2 Krankheitsbild

Die Pathologie der MS ist durch abgegrenzte Läsionen gekennzeichnet, die typischerweise im subkortikalen oder periventrikulären Bereich der weißen Substanz, den Sehnerven, dem Hirnstamm oder dem Rückenmark lokalisiert sind[3]. Histologisch unterscheidet sich die Pathologie zwischen verschiedenen Patienten und in unterschiedlichen Stadien der Erkrankung deutlich. Akute Phasen der schubförmig-remittierenden Form sind durch den Zusammenbruch der Blut-Hirn-Schranke gekennzeichnet, in dessen Folge sich perivaskuläre Läsionen bilden, bestehend aus T-Zellen, aktivierten Makrophagen und ferner B-Zellen, die aus dem Blut ins ZNS einwandern. Innerhalb dieser Ansammlungen entstehen fokale Entmarkungsherde in der weißen Substanz, gekennzeichnet durch Demyelinisierung, Gliose und axonalen Schaden. Neben der beobachteten Demyelinisierung, tritt jedoch auch von Beginn einer MS-Erkrankung an, axonale und neuronale Degeneration auf, die während der progredienten Phase der MS am besten mit dem klinischen Defizit korreliert[4,5]. Die zugrunde liegenden pathophysiologischen Mechanismen wurden bislang wenig untersucht, könnten jedoch unter anderem in einer Fehlregulation des Ionenhaushalts der Neurone und daraus folgend in einem Zusammenbruch des Energiehaushalts begründet liegen[6,7].

Die Diagnose der MS erfolgt anhand der so genannten McDonald-Kriterien[8], die in den letzten Jahren aufgrund der wachsenden Wichtigkeit bildgebender Verfahren mehrfach revidiert wurden[9,10]. Diese Kriterien postulieren, dass für eine MS-Erkrankung eine zeitliche und räumliche Streuung der neurologischen Läsionen vorliegen muss, die einen vorwiegend inflammatorischen Charakter haben müssen, der nicht durch eine andere Krankheit erklärt werden kann. Das Krankheitsbild ist häufig durch periodisch wiederkehrende Schübe neurologischer Störungen gekennzeichnet, deren Grad durch den *expanded disability status scale* (EDSS) wiedergegeben wird[11]. Außerdem wird der Nachweis oligoklonaler Banden im Liquor von Patienten als Indiz für eine intrathekale Immunglobulinproduktion durch B-Zellen ebenfalls als ein Kriterium für das Vorliegen einer inflammatorischen Aktivität im ZNS gewertet. Die Weiterentwicklung der MRT-Verfahren erlauben heute die sensitive und spezifische räumliche Identifizierung von Läsionen der weißen Substanz durch Analyse von T2-hyperintensen Läsionen und Gadolinium-aufnehmenden T1-Läsionen, die ebenfalls als wichtiges Kriterium bei der Diagnose der MS dienen[12].

1.1.3 Therapie

Bis heute existiert keine kurative Therapie für MS-Patienten. Die für die Behandlung der MS zugelassenen Medikamente beruhen bislang auf immunsuppressiven und immunmodulatorischen Mechanismen[13]. Während eines Schubes werden die Patienten mit Glucocorticoiden behandelt, die die entzündlichen Prozesse im ZNS inhibieren, ein Abklingen der Symptome beschleunigen und so einem Ausbreiten der Läsionen und damit der neurologischen Defizite vorbeugen sollen. Als Basistherapie werden Glatirameracetat und rekombinante IFN-β-Präparate empfohlen. Glatirameracetat ist eine zufällige Mischung von Polypeptiden der vier Aminosäuren Alanin, Lysin, Glutaminsäure und Tyrosin in einem bestimmten molaren Verhältnis, dessen Wirkmechanismus vermutlich auf einer Reduktion der Antigenpräsentation und Stimulation der Sekretion anti-inflammatorischer Zytokine durch T-Zellen beruht[14]. IFN-β hingegen induziert ebenfalls anti-inflammatorische Effekte, jedoch vermutlich durch Reduktion der Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke und durch Inhibition autoreaktiver T-Zellen[15,16]. Bei aggressiveren Verläufen der MS oder bei Nichtansprechen der Patienten auf die Basistherapie wird im Allgemeinen eine Eskalationstherapie erwogen. Der humanisierte monoklonale Antikörper Natalizumab, der gegen das α4-Integrin gerichtet ist, verhindert die Bindung und die Extravasation aktivierter T-Zellen über die Blut-Hirn-Schranke[17,18]. Mitoxantron, ein auch in der Krebstherapie eingesetztes Zytostatikum, verhindert die Proliferation von Immunzellen und kann so die Krankheitsaktivität reduzieren[19]. Vor Kurzem wurde das erste oral verfügbare Medikament, Fingolimod, für die Behandlung von MS-Patienten in Deutschland zugelassen[20,21]. Fingolimod bindet an den Sphingosin-1-phosphat Rezeptor 1 (S1PR1), inhibiert so die Auswanderung von Lymphozyten aus sekundären lymphatischen Organen und letztendlich eine Extravasation der Immunzellen ins ZNS[22]. Abgesehen von diesen bereits etablierten Therapieansätzen befinden sich weitere monoklonale Antikörper und oral verfügbare Wirkstoffe in der klinischen Testung[13].

1.1.4 Ätiologie

Die Faktoren, die zur Entstehung einer MS beitragen sind nach wie vor wenig verstanden. Es wird angenommen, dass vor allem genetisch prädisponierte Individuen unter dem Einfluss bestimmter Umweltfaktoren an MS erkranken.

1.1.4.1 Genetische Faktoren

Die Hinweise für eine genetische Komponente des MS-Risikos sind komplex und folgen nicht den Regeln der typischen Mendelschen Vererbungslehre. So sind nur bei 15–20% der MS-Patienten andere Familienmitglieder ebenfalls an MS erkrankt[1]. Während eineiige Zwillinge eine Konkordanzrate von 20–35% aufweisen, sinkt diese bei zweieiigen Zwillingen auf 5% ab. Außerdem konnte in mehreren Studien gezeigt werden, dass Verwandte ersten, zweiten und dritten Grades von MS-Patienten ebenfalls ein erhöhtes Risiko im Vergleich zur Gesamtbevölkerung tragen, dieses jedoch mit abnehmendem Verwandtschaftsgrad

ebenfalls fällt[23]. Die Abnahme der Übereinstimmung des genetischen Materials mit einem an MS erkrankten Individuum korreliert demnach direkt mit einer Abnahme der MS-Suszeptibilität.

Ergebnisse von Adoptionsstudien belegen zudem, dass adoptierte Kinder, die von Eltern mit MS aufgezogen wurden, kein erhöhtes MS-Risiko im Vergleich zur Gesamtbevölkerung aufweisen. Dieser Befund deutet darauf hin, dass eine familiäre Häufung von MS-Fällen nicht so sehr auf einheitliche Umweltfaktoren zurückzuführen ist, sondern vielmehr auf das gemeinsame genetische Material[24].

Aufgrund der Heterogenität der Erkrankung ist es besonders schwer genetische Varianten zu identifizieren, die das Risiko an MS zu erkranken erhöhen. Für Subtypen der Erkrankung könnte ein bestimmtes Gen auslösend sein, während es in anderen Fällen unerheblich ist. Darüber hinaus geht man im Kontext von MS davon aus, dass nicht ein einziges Gen die kausale Variante darstellt, sondern vielmehr das Zusammenspiel vieler genetischer Varianten in Kombination mit Umweltfaktoren, die zu einer Fehlregulation autoreaktiver Prozesse führen und zu einer überschießenden pathologischen Immunantwort beitragen.

Zu Beginn der siebziger Jahre wurden zum ersten Mal bestimmte Haplotypen des Haupthistokompatibilitätskomplexes (*major histocompatibility complex* [MHC]), beim Menschen als HLA (*human leukocyte antigen*) bezeichnet, mit einem erhöhten Risiko an MS zu erkranken assoziiert[25–27]. Vor allem die weit verbreiteten Haplotypen HLA-DR2 (HLA DRB1*15:01 und HLA-DRB5*01:01) und HLA-DQ6 (HLA-DQB1*06:02) gerieten in den Fokus der Aufmerksamkeit, da diese nach neuesten Erkenntnissen das Erkrankungsrisiko um das Dreifache erhöhen[28]. Haplotypen des HLA Klasse I Lokus sind ebenfalls mit MS assoziiert. Während HLA-A*0301 das Risiko an MS zu erkranken erhöht, vermittelt das Allel HLA-A*0201 einen protektiven Effekt[29].

Neben den seit Jahrzehnten bekannten Assoziationen mit dem HLA-Lokus, ist es erst durch die Sequenzierung des menschlichen Genoms und durch die Identifikation distinkter Einzelnukleotidpolymorphismen (*single nucleotide polymorphism,* SNP) gelungen, Gene außerhalb des HLA-Lokus zu identifizieren, die zu einem erhöhten MS-Risiko beitragen könnten. Zu diesem Zweck wurden mehrere genomweite Assoziationsstudien durchgeführt, die die SNP-Verteilung in MS-Patienten mit der in gesunden Kontrollindividuen verglichen[28,30]. Dabei wurden 95 Regionen des Genoms identifiziert, in denen mindestens ein SNP mit MS assoziiert ist[28]. Gleichzeitig konnten 23 Assoziationen, die in früheren Studien gefunden wurden, bestätigt werden.

Die Suche nach assoziierten Genen ähnlicher Funktion ergab ein erstaunliches Bild: Viele der Kandidatengene werden im Rahmen der Aktivierung und Proliferation von T-Zellen exprimiert, unter anderem Moleküle aus Zytokinsignalwegen, kostimulatorische sowie Signaltransduktionsproteine, das den wichtigen Faktor einer deregulierten T-Zell-Antwort für die Entstehung einer MS untermauert. Wie diese Gene jedoch miteinander interagieren, um eine erhöhte Suszeptibilität für MS zu erklären, muss sowohl in funktionellen als auch in

weiteren Assoziationsstudien untersucht werden. Es gibt unterschiedliche Theorien, die sich dem Problem der genetischen Suszeptibilität für komplexe Erkrankungen nähern[31]. Eine Theorie geht davon aus, dass etwa 20-100 weit verbreitete Allele die Suszeptibilität für eine Erkrankung definieren, wobei jedes einzelne Allel das Risiko nur minimal erhöht[32,33]. Die andere Hypothese postuliert hingegen, dass komplexe Erkrankungen wie MS eine Ansammlung genetisch diverser Krankheiten ist, die jede von einer einzelnen seltenen Genvariante ausgelöst wird und sich lediglich in der entstehenden Pathologie größtenteils ähneln[34].

Dennoch lässt sich aufgrund der nicht vollständigen Konkordanz von eineiigen Zwillingen argumentieren, dass selbst eine vollständige Übereinstimmung des genetischen Materials nicht zwingend zur Erkrankung an MS führen muss. Umweltfaktoren, welche das Epigenom und den Methylierungsstatus regulatorischer DNA-Elemente beeinflussen könnten und dadurch mit dem genetischen Material direkt in Wechselwirkung treten, stehen deshalb im Verdacht maßgeblich zum MS-Risiko beizutragen[35].

Assoziation eines CD226-Haplotyps mit Autoimmunerkrankungen

Neben genomweiten Assoziationsstudien wurden in den letzten Jahren vermehrt Ansätze verfolgt gemeinsame Risikoallele unterschiedlicher Autoimmunerkrankungen zu identifizieren, um Rückschlüsse auf Signalwege ziehen zu können, die für die Ausprägung mehrerer Erkrankungen kritisch sein könnten. Ein Risikoallel, für das eine Assoziation mit Typ-1 Diabetes gezeigt wurde[36], welche später ebenfalls für MS bestätigt wurde[37], befindet sich im Gen *CD226* (Abbildung 1.1), welches für das Protein *DNAX-accessory molecule 1* (DNAM-1 oder CD226) codiert. Neben der Assoziation mit Typ-1 Diabetes und Multiple Sklerose wurde der Risikohaplotyp im *CD226*-Gen ebenfalls mit einem erhöhten Risiko für rheumatoide Arthritis[37,38], Lupus erythematodes[38–40], Psoriasis[41], Sklerodermie[42], Morbus Basedow[37], Wegener Granulomatose[43] und Zöliakie[38] in Verbindung gebracht[44].

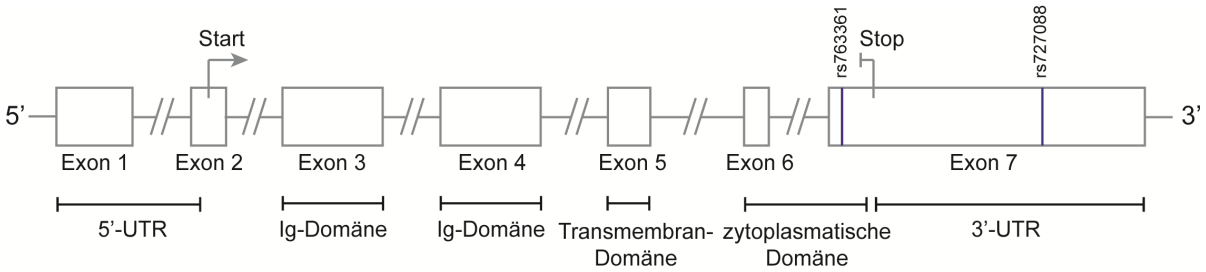


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung des Aufbaus des *CD226*-Gens. Übernommen und erweitert von Maier *et al.*[45] 5'-UTR: 5'-untranslatierte Region; Ig: Immunglobulin; 3'-UTR: 3'-untranslatierte Region.

Die beschriebene SNP-Assoziation bezieht sich auf einen nicht-synonymen SNP (rs763361), das bedeutet durch den SNP wird ein Basenaustausch induziert, welcher in der resultierenden Proteinsequenz einen Aminosäureaustausch bedingt. In diesem Fall codiert das vermeintlich vor Autoimmunerkrankungen schützende Allel für ein Glycin an der

Position 307, während das Risikoallel an dieser Position zum Einbau eines Serins führt. Die besagte Aminosäure befindet sich in der zytoplasmatischen und somit in der signalgebenden Domäne des Moleküls, wodurch der Aminosäureaustausch eventuell die Signaltransduktion des Proteins beeinflussen könnte (Vergleich dazu Abbildung 1.2; S. 19).

In einer Studie aus dem Labor von Sergey Kozyrev aus Uppsala, Schweden von 2010 wurde die proteincodierende Sequenz des *CD226*-Gens und zusätzlich jeweils 500 Basenpaare der flankierenden Introns durch Sequenzierung auf weitere SNPs untersucht, die mit einem erhöhten Risiko für Lupus erythematodes assoziiert sein könnten[39]. Die stärkste Assoziation wurde im Exon 7 detektiert, welcher die SNPs rs763361, rs34794968 und rs727088 umfasste. Diese drei SNPs werden in einem engen Kopplungsungleichgewicht vererbt, so dass fast ausschließlich die beiden Haplotypen G-G-T (protektiv) und A-T-C (erhöhtes Risiko) beobachtet werden. Den Forschern gelang es in einer phänotypischen Analyse den Risikohaplotyp mit einer verringerten CD226-Expression auf mRNA-Ebene in PBMCs und einer geringeren CD226-Oberflächenexpression auf T-Zellen und NK-Zellen zu korrelieren. Außerdem postulierten sie anhand einer Luciferase-basierten Expressionsanalyse, dass nicht der SNP rs763361 die kausale Variante der verringerten CD226-Expression in Risikohaplotyp-Zellen darstellt, sondern vielmehr die Risikovariante des SNP rs727088, welche sich in der 3‘-untranslatierten Region befindet. Abgesehen von dieser Studie von Löfgren *et al*. gibt es in der Literatur keine weiteren Hinweise auf den kausalen SNP, der die erhöhte Assoziation der Exon 7-Region des *CD226*-Gens mit einer funktionellen Veränderung verknüpft.

Aufklärung der funktionellen Relevanz mit MS assoziierter Gene

Eine Herausforderung der nächsten Jahre wird die Untersuchung der funktionellen Relevanz der in genomweiten Assoziationsstudien identifizierten Risikohaplotypen sein[46]. Die ersten Studien zu diesem Thema beschäftigten sich unter anderem mit den HLA-Haplotypen, die mit MS assoziiert sind, um zum einen die Erhöhung des Risikos durch den MHC-Klasse II-Haplotyp HLA-DR2 zu erklären[47] und zum anderen den teilweise entgegengesetzten Einfluss der MHC-Klasse I-Haplotypen HLA-A2 und –A3 darzulegen[48]. Neben den Risikohaplotypen des HLA-Lokus wurden darüber hinaus auch Risikovarianten außerhalb des HLA-Lokus untersucht. Sowohl für das Molekül CD58[49] sowie für die Varianten des Proteins CD6[50] wurde eine haplotypabhängige Veränderung der Expression dieser Proteine festgestellt, die je nach Haplotyp des Trägers zu einer Veränderung der Funktion regulatorischer T-Zellen beitragen könnte.

Vor kurzer Zeit erschien eine weitere Publikation des Labors von Lars Fugger, die die funktionelle Relevanz des SNPs rs180093 im *TNFRSF1A*-Gen identifizierte[51]. Die Risikovariante bedingt die Expression einer bisher unbeschriebenen löslichen Form des TNF-Rezeptor 1, welche in der Lage ist das inflammatorische Zytokin TNF-α zu binden und zu neutralisieren. Interessanterweise ahmt der Risikohaplotyp so funktionell TNF-α-neutralisierende Antikörper und Antagonisten nach, die bei der Therapie unterschiedlicher

Autoimmunerkrankungen wie rheumatoider Arthritis und Psoriasis erfolgreich zum Einsatz kommen. Diese Antikörper sind jedoch bei der Behandlung von MS-Patienten kontraindiziert, da sie in einigen Patienten Schübe auslösten[52,53]. Diese Studie lieferte so exemplarische Erkenntnisse, wie die Untersuchung von mit MS-assoziierten Genvarianten zum Verständnis der Pathogenese der MS und der Fortentwicklung medikamentöser Therapien beitragen kann.

Über diese ersten Studien hinaus, fehlen nach wie vor wichtige Erkenntnisse über die funktionelle Relevanz der mit MS assoziierten Gene. Die Untersuchung des Moleküls CD226, dessen Risikovariante ebenfalls mit einem erhöhten Risiko an MS zu erkranken assoziiert ist, fügt sich in diesen Forschungskontext ein und wird wichtige Erkenntnisse liefern, inwiefern der Austausch einer einzelnen Base letztendlich zur Änderung der Funktion eines Proteins und einer ganzen Zellpopulation beitragen kann.

1.1.4.2 Umweltfaktoren

Das Risiko an MS zu erkranken lässt eine grobe geographische Verteilung erkennen – so steigt es mit zunehmender Entfernung vom Äquator. Außerdem legen Migrationsstudien die Vermutung nahe, dass eine MS durch Umweltfaktoren ausgelöst werden könnte, die während der späten Kindheitsjahre wirksam sind[1].

Seitdem in strukturierten Untersuchungen der Frage nachgegangen wird, wodurch MS ausgelöst wird, wird über Infektionskrankheiten als potentielle Erkrankungsinitiatoren diskutiert[54]. Epstein-Barr Virus (EBV) ist einer der meistgenannten Viren in diesem Zusammenhang. 50% der Menschen infizieren sich bereits im frühen Kindesalter mit dem Virus, die in diesem Alter meist komplikationsfrei verläuft. Erfolgt die Infektion erst im Jugendalter, ist sie als infektiöse Mononukleose oder Pfeiffer-Drüsenfieber bekannt und durch grippeähnliche Beschwerden und starkes Anschwellen der peripheren Lymphorgane charakterisiert. Einige Studien zeigten nun eine Verdopplung des MS-Risikos für Individuen, die sich erst im Jugendalter mit EBV infiziert hatten[55]. Für Individuen, die zusätzlich den HLA-Risikohaplotyp HLA-DRB1*1501 trugen, wurde das Risiko im Erwachsenenalter eine MS zu entwickeln sogar versiebenfacht[56]. Eine mögliche Erklärung für diesen Zusammenhang besteht in einer potentiellen molekularen Mimikry, da ein degenerierter T-Zell-Rezeptor in der Lage ist sowohl ein MBP-Peptid gebunden an DR2b (HLA-DRB1*1501) als auch ein an DR2a (HLA-DRB5*0101) gebundenes EBV-Peptid zu erkennen [57]. Diese Mimikry könnte zu einer Kreuzreaktivität der T-Zellen beitragen und autoreaktive T-Zellen aktivieren. Außerdem könnte eine EBV-Infektion zur Fehlregulation von B-Zellen beitragen. Hinweise darauf lieferte eine Studie, die in Gehirnen von MS-Patienten eine große Zahl EBV-infizierter B-Zellen nachweisen konnte[58].

Neben der nicht sicher erwiesenen kausalen Verknüpfung zwischen Infektionskrankheiten und MS, wurden ebenfalls andere Umweltfaktoren untersucht, die mit einem erhöhten MS-Risiko assoziiert sein könnten[59]. Aufgrund der geographischen Verteilung der MS-Inzidenz wird über einen möglichen protektiven Einfluss des Vitamin D-Stoffwechsels spekuliert, der

durch erhöhte Sonneneinstrahlung aktiviert wird[60]. Darüber hinaus wird ebenfalls ein Zusammenhang zwischen MS und dem Rauchen sowie mit anderen Umwelttoxinen diskutiert[61]. Kürzlich erschienene Studien legen ebenfalls eine Verbindung zwischen dem Salzgehalt der Nahrung[62,63] und der Generierung potentiell autoreaktiver T-Zellen nahe, wobei auch die individuelle Zusammensetzung der kommensalen Bakterienflora das MS-Risiko beeinflussen könnte[64]. Wie die Wechselwirkung der Genetik eines Individuums mit den spezifischen Umweltfaktoren jedoch im Detail eine Autoimmunerkrankung auslösen kann, bleibt Gegenstand intensiver Forschungsbemühungen.

1.1.5 Immunpathogenese

Um der Vielzahl von Pathogenen, die in der Umwelt vorhanden sind, wirksam entgegentreten zu können, entwickelten sich Mechanismen angeborener und adaptiver Immunität. Während das angeborene Immunsystem in erster Linie Rezeptoren eingeschränkter Spezifität und Variabilität, so genannte *pattern recognition receptors* (PRR) aufweist, die konservierte Strukturen auf der Oberfläche von Bakterien und anderen Pathogenen zu erkennen vermag, verfügt das adaptive Immunsystem in Form von T- und B-Zell-Rezeptoren über ein fast unendliches Spektrum an Rezeptorspezifitäten, die potentiell jedes Fremdantigen erkennen können und durch die Differenzierung von Gedächtnis-Zellen im Falle einer wiederholten Infektion schneller und effizienter auf Pathogene reagieren können.

Zentrale Toleranz

Die Generierung der T- und B-Zellrezeptor-Spezifitäten ist ein zufällig erfolgender Prozess, der auf genetischer Rekombination beruht. Die Entwicklung von T-Zellen ist ein vielstufiger Prozess, der vorwiegend im Thymus stattfindet[65]. Myeloide Vorläuferzellen wandern aus dem Knochenmark in den Thymus ein und durchlaufen dort eine Entwicklung, deren Stadien unter anderem anhand der Expression der T-Zell-Korezeptoren CD4 und CD8 unterschieden werden können[66]. Ausgehend von Zellen, die doppelt-negativ sind hinsichtlich der CD4- und CD8-Expression, entwickeln sich CD4- und CD8-doppelt-positive Zellen, in denen bereits ein Rearrangement des Genlokus der β-Kette des T-Zell-Rezeptors stattgefunden hat und nun zunächst ein Prä-T-Zell-Rezeptor exprimiert wird. In diesem Stadium setzt die so genannte Positivselektion ein, in der diejenigen Zellen selektioniert werden, deren Rezeptoren in der Lage sind Antigen, im Fall von T-Zellen im Kontext der MHC-Moleküle, zu erkennen[67]. Im Laufe dieses Prozesses sind reifende T-Zellen in der Lage den Genlokus der α-Kette mehrfach zu rearrangieren. Gelingt jedoch dennoch die Bindung an MHC-Klasse I oder MHC-Klasse II Moleküle nicht, gehen die Zellen in Apoptose – ein Schicksal, das mehr als 95% der unreifen T-Zellen während ihrer Entwicklung ereilt. Im Anschluss an diesen Prozess stellen die doppelt-positiven Zellen die Expression entweder des CD4- oder des CD8-Korezeptors ein[68], je nachdem mit welcher Klasse der MHC-Moleküle eine produktive Interaktion eingegangen werden konnte. Diese Zellen

durchlaufen anschließend die so genannte Negativselektion, in der diejenigen Zellen eliminiert werden, die körpereigene Determinanten binden und durch Autoreaktivität eine Bedrohung für körpereigenes Gewebe darstellen könnten[69]. Die Deletion autoreaktiver T- und B-Zellen am Ort ihrer Reifung, dem Thymus, bzw. dem Knochenmark, bezeichnet man als zentrale Toleranz.

Aktivierung naiver T-Zellen

Naive T-Zellen, die den Thymus verlassen haben, treffen in peripheren lymphatischen Organen auf professionelle antigenpräsentierende Zellen (APZ)[70] und werden bei erfolgreicher Antigenerkennung in einem mehrstufigen Prozess aktiviert. APZ nehmen Antigene aus der Umgebung mittels Endozytose auf, prozessieren diese in den lysosomalen Kompartimenten und beladen MHC-Klasse II Moleküle mit daraus resultierenden kurzen Peptiden[71]. Diese Peptid-MHC II-Komplexe werden anschließend auf der Oberfläche der APZ für die Erkennung durch $CD4^+$ T-Zellen präsentiert. Die spezifische Bindung einer $CD4^+$ T-Zelle mit ihrem T-Zell-Rezeptor (TZR) und dem CD4-Korezeptor an diesen Komplex ist das erste Signal, das für eine erfolgreiche Aktivierung notwendig ist. $CD8^+$ T-Zellen hingegen werden durch Peptid-MHC I-Komplexe aktiviert[72]. Die Beladung der MHC I-Komplexe erfolgt in diesem Fall mit Peptiden, die während der Degradation endogener Proteine im Proteasom entstehen. Diese Komplexe werden auf jeder kernhaltigen Körperzelle exprimiert.

Während einer Infektion mit einem Pathogen werden APZ durch Bindung ihrer PRR an konservierte Pathogen-assoziierte Strukturen angeregt kostimulatorische Moleküle wie CD80 und CD86 zu exprimieren[73]. Diese interagieren mit CD28 auf der Oberfläche von T-Zellen und bilden das zweite Signal, welches die T-Zellen zur Aktivierung und Expansion lizenziert. Erfolgt kein zweites aktivierendes Signal durch die Bindung kostimulatorischer Moleküle tritt die T-Zelle in einen Zustand der Anergie, um autoreaktive Prozesse zu verhindern[74]. Das dritte Signal, das für die Ausbildung einer abgestimmten T-Zell-Antwort benötigt wird, sind inflammatorische Zytokine, die durch die APZ ausgeschüttet werden und in den T-Zellen definierte Differenzierungsprogramme initiieren[75]. So führt die Ausschüttung des Zytokins IL-12 in $CD4^+$ T-Helferzellen zur Differenzierung von so genannten T_H1-Zellen, die durch die Sekretion der Zytokine IL-2, IFN-γ und TNF-α gekennzeichnet sind und für die zelluläre Immunantwort bei der Abwehr intrazellulärer Pathogene benötigt werden. IL-4 hingegen begünstigt die Differenzierung von T_H2-Zellen, die maßgeblich an der Generierung einer humoralen Immunantwort mitwirken. Eine Ausschüttung von IL-23 hingegen ist für die Entstehung von IL-17-produzierenden T_H17-Zellen verantwortlich, die im Falle bakterieller und Pilzinfektionen über geeignete Effektormechanismen verfügen[76]. Während $CD4^+$ T-Zellen in erster Linie durch die Ausschüttung inflammatorischer und regulatorischer Zytokine an der Aktivierung und der Kontrolle einer Immunreaktion beteiligt sind und deshalb auch als T-Helferzellen bezeichnet werden, vermitteln $CD8^+$ T-Zellen vielfach kontaktabhängige Zytotoxizität gegenüber infizierten Zielzellen, die das Zielantigen der voraktivierten $CD8^+$ T-Zelle gebunden an ein MHC I-Molekül präsentieren.[77]

Mechanismen der Aktivierung autoreaktiver T-Zellen

An der autoimmunen Pathologie der MS wirkt im besonderen Maße die periphere Aktivierung autoreaktiver myelinspezifischer T-Zellen mit, die in der Folge ins ZNS eindringen und dort die Bildung inflammatorischer Läsionen begünstigen. Mechanismen der zentralen Toleranz im Thymus sorgen unter physiologischen Bedingungen dafür, dass auch Bestandteile der Myelinproteine an reifende T-Zellen präsentiert werden und eine Weiterentwicklung selbst-reaktiver T-Zellen im Rahmen der Negativselektion verhindert wird[78–82]. Die Tatsache, dass aber auch in gesunden Individuen myelinspezifische T-Zellen nachgewiesen werden können[83,84], deutet darauf hin, dass dieser Prozess unvollständig abläuft[85]. Komplexe toleranzinduzierende Vorgänge der Peripherie kontrollieren die Aktivität autoreaktiver T-Zellen und halten das System im Gleichgewicht. Zu diesen Mechanismen zählen Anergie, koinhibitorische Rezeptoren sowie die Suppression durch regulatorische T-Zellen (T_{reg}-Zellen). Versagen jedoch auch diese Regulationswege, kommt es zur Aktivierung autoreaktiver T-Zellen und damit zu selbstreaktiven Immunantworten.

Eine Theorie besagt, dass an der Aktivierung peripherer autoreaktiver T-Zellen ein Vorgang beteiligt ist, der als molekulare Mimikry bezeichnet wird. Danach werden autoreaktive T-Zellen aufgrund einer Kreuzreaktivität mit mikrobiellen Peptiden aktiviert, die in Folge einer Infektion von APZ im Kontext einer Entzündung präsentiert werden[54,57,86–88]. Dementsprechend wurde eine Reihe degenerierter T-Zell-Rezeptoren beschrieben, die sowohl auf Myelinantigene als auch auf Pathogen-assoziierte Peptide im Kontext eines MHC-Moleküls reagieren können[57,89–92]. Nach dieser Hypothese steigt die Wahrscheinlichkeit einer kreuzreaktiven Antwort und damit einer Autoimmunreaktion gegen Myelinantigene mit der Anzahl degenerierter T-Zell-Rezeptoren im peripheren Kreislauf eines Individuums und damit die Wahrscheinlichkeit, dass im Laufe einer normalen Infektion eine Kreuzreaktion mit Selbstantigenen entsteht. Eine andere Theorie, die kürzlich in einer Publikation vorgestellt wurde, postuliert die Existenz von T-Zellen, die zwei unterschiedliche T-Zell-Rezeptoren mit verschiedenen Spezifitäten tragen. Im Fall von MS könnten $CD8^+$ T-Zellen, die sowohl einen myelinspezifischen als auch einen virusantigenspezifischen T-Zell-Rezeptor tragen während einer viralen Infektion aktiviert und in der Folge eine autoreaktive Immunreaktion gegen Myelin auslösen[93].

Wie ZNS-spezifische Myelinantigene von APZ in peripheren lymphatischen Organen an naive T-Zellen präsentiert werden und zu einer Aktivierung autoreaktiver T-Zellen führen, ist bislang wenig verstanden. In einigen Mausmodellen der MS, der so genannten experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE), in denen die Expression transgener MBP- und PLP-spezifischer T-Zell-Rezeptoren zu einem spontanen Auftreten der EAE-typischen Lähmungserscheinungen führt, scheint sich die T-Zell-Aktivierung in den zervikalen Lymphknoten zu entwickeln[94,95]. Diese Lymphknoten sind für die lymphatische Drainage des ZNS verantwortlich[96], enthalten deshalb antigenpräsentierende Zellen, die Myelinantigene des ZNS präsentieren und stellen somit den Ort des ersten Kontakts myelinspezifischer T-Zellen mit ihrem Autoantigen dar.

Einfluss kostimulatorischer Signalwege

Die Bindung kostimulatorischer und koinhibitorischer Rezeptoren stellt einen wichtigen Kontrollpunkt der T-Zell-Aktivierung dar[97]. Je nachdem ob die Bindung an kostimulatorische oder koinhibitorische Rezeptoren überwiegt, entscheidet es sich, ob eine T-Zelle proliferiert, ob sie anerg wird oder in die Apoptose geht. Die Interaktion einer Reihe von Liganden auf der Oberfläche von APZ mit den korrespondierenden Rezeptoren auf T-Zellen trägt zu kostimulatorischen Signalen bei[98], jedoch ist die Interaktion der Rezeptoren CD28 und CTLA-4 auf T-Zellen mit den Liganden CD80 und CD86 auf der Oberfläche von APZ das bis dato am besten charakterisierte System und soll hier exemplarisch vorgestellt werden[99].

CD28 ist konstitutiv auf der Oberfläche naiver T-Zellen exprimiert und interagiert mit zwei Liganden, CD80 und CD86, die auf der Oberfläche von aktivierten professionellen APZ vorhanden sind. Von dieser Interaktion geht ein positives kostimulatorisches Signal für die Aktivierung und Proliferation der T-Zellen aus. CTLA-4 hingegen bindet ebenfalls an CD80 und CD86, sogar mit weit höherer Affinität. Dieses Molekül wird jedoch von naiven oder ruhenden T-Zellen nicht exprimiert, sondern erst nach T-Zell-Aktivierung hochreguliert. Bindet CTLA-4 an seine Liganden empfängt die T-Zelle ein koinhibitorisches Signal, welches der CD28-induzierten Aktivierung entgegenwirkt. Der Aktivierungszustand der T-Zelle wird eingedämmt und eine überschießende Immunantwort wird verhindert.

Einige koinhibitorische Rezeptoren, wie CTLA-4, PD-1, Tim-3 und TIGIT greifen an unterschiedlichen Signalwegen an, um autoreaktive T-Zell-Antworten zu unterdrücken und die Entwicklung einer gegen eigenes Gewebe gerichteten Autoimmunantwort zu verhindern[45,100]. Die Einschränkung eines oder mehrerer der genannten Signalwege ist mit einem erhöhten Risiko für Autoimmunerkrankungen assoziiert, eine Tatsache, die darauf hindeutet, dass die einzelnen Rezeptoren einzigartige, nicht-redundante Funktionen zur Wahrung der peripheren Toleranz ausüben.

Immunologie des ZNS

Eine eng kontrollierte Homöostase des ZNS ist die wichtigste Voraussetzung für die reibungslose Weiterleitung elektrischer Signale zwischen Neuronen. Aus diesem Grund ist der Zugang zum ZNS durch spezialisierte Barrieren, die Blut-Hirn-Schranke und die Blut-Liquor-Schranke stark eingeschränkt. Unter physiologischen Bedingungen wird die Immunkontrolle weitgehend auf perivaskuläre und subarachnoidale Räume begrenzt, das Parenchym wird ausgespart[101]. In Autoimmunerkrankungen des ZNS, wie MS, hingegen, verschaffen sich Immunzellen in großer Zahl Zutritt zu diesem immunprivilegierten Bereich und verursachen eine Entzündungsreaktion, die mit einem Zusammenbruch der Blut-Hirn-Schranke und einer Demyelinisierung von Axonen einhergeht.

Myelin wird im ZNS von Oligodendrozyten gebildet und im Laufe der Entwicklung als Schutzmantel um die Axone von Neuronen gewickelt[102]. Es dient als elektrischer Isolator, um die so genannte saltatorische Erregungsleitung und damit die schnelle

Erregungsweiterleitung zwischen Soma und axonalen Fortsätzen und von Neuron zu Neuron zu gewährleisten. Myelin setzt sich aus unterschiedlichen Proteinen zusammen, zum einen das Myelin-Basische Protein (MBP), das Proteolipid-Protein (PLP) sowie das Myelin-assoziierte Glykoprotein (MAG) und ferner Connexin32. Das Myelin des ZNS besitzt darüber hinaus noch große Anteile des Myelin-Oligodendrozyten-Glykoproteins (MOG).

Um eine Entzündung des ZNS zu initiieren bedarf es einer Aktivierung myelinspezifischer T-Zellen in der Peripherie, da nur aktivierte und Gedächtnis-T-Zellen durch die Expression bestimmter Adhäsionsmoleküle in der Lage sind die Blut-Hirn-Schranke an distinkten Stellen zu überqueren[103]. Neuere Studien belegen, dass die Epithelzellen des Plexus choroideus die nötigen Liganden von Chemokinrezeptoren, Selektinen und Adhäsionsmolekülen exprimieren, um einen Übertritt der T-Zellen in den Subarachnoidalraum zu ermöglichen[104]. Dieser Weg wird sowohl von Zellen genutzt, die an der physiologischen Immunkontrolle des ZNS beteiligt sind, als auch von autoreaktiven Zellen, die in der Peripherie aktiviert wurden. Im Subarachnoidalraum stoßen diese Zellen auf lokale APZ, werden reaktiviert und proliferieren[105]. Die so induzierte lokale Entzündungsreaktion führt zur Aktivierung von Mikrogliazellen, die ihrerseits inflammatorische Mediatoren sezernieren. Endothelzellen beginnen in der Folge mit der Hochregulation von Adhäsionsmolekülen und Chemokinen und locken so weitere Effektorzellen des angeborenen und adaptiven Immunsystems an[106].

Die Rolle von $CD4^+$ T-Zellen in autoimmuner Entzündung des ZNS

Bis vor einiger Zeit wurde angenommen, dass in erster Linie T_H1-Zellen an der Entstehung einer Entzündung des ZNS beteiligt sind. Diverse Studienergebnisse widersprachen jedoch dieser Theorie. So entwickeln Mäuse, die defizient sind für die essentiellen Zytokine der Differenzierung und Effektorfunktionen von T_H1-Zellen einen schwereren Verlauf der EAE[107]. Vielmehr zeigen IL-23-defiziente Mäuse eine vollständige Resistenz gegen die EAE[108]. In den folgenden Jahren wurde sukzessive erkannt, dass IL-23 der kritische Faktor bei der Entwicklung IL-17-produzierender $CD4^+$ T-Zellen darstellt und diese T_H17-Zellen an der Entzündung des ZNS während einer MS oder einer EAE mitwirken.

Aktuell geht man von einem zweiphasigen Modell der MS- und EAE-Entstehung aus[109]. Zunächst werden autoreaktive T_H17-Zellen in der Peripherie aktiviert, wandern zum Plexus choroideus und erhalten dort über die Interaktion des CCR6-Rezeptors auf T_H17-Zellen mit dem Liganden CCL20 auf Epithelzellen Zugang zum Liquor-System und zum periventrikulären ZNS[104]. IL-23 und der Transkriptionsfaktor RORγt fördern die GM-CSF-Produktion durch T_H17-Zellen, was seinerseits wiederum die IL-23-Sekretion durch APZ begünstigt. Dieses Feedback-System trägt entscheidend zur Enzephalitogenität der T_H17-Zellen und zur Suszeptibilität für eine EAE bei[110,111]. Als nächstes bedingt die Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine wie IL-17 und IL-22 durch die ZNS-infiltrierenden T_H17-Zellen, eine Erhöhung der Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke[112]. Andere Immunzellen, wie IFN-γ-produzierende T_H1-Zellen, zytotoxische $CD8^+$ T-Zellen,

B-Zellen und Granulozyten wandern ins ZNS ein und führen zur Ausbildung einer perivaskulären Läsion.

1.1.6 Regulatorische T-Zellen in MS

T_{reg}-Zellen wurden initial als $CD4^+CD25^+$ T-Zellen identifiziert, die in Mäusen Autoimmunerkrankungen und Abstoßungsreaktionen in Schach halten konnten[113,114]. Später konnten diese $CD4^+CD25^+$ T-Zellen auch im peripheren Blut von Menschen nachgewiesen und *in vitro* ihre suppressiven Eigenschaften untersucht werden[115–117]. Die klare Abgrenzung des T_{reg}-Phänotyps erfolgte erst mit der Entdeckung des Transkriptionsfaktors *forkhead box P3* (Foxp3)[118,119], der für die Funktion dieser Zellpopulation von essentieller Bedeutung ist. Mutationen im *Foxp3*-Gen führen zu schweren Autoimmunerkrankungen, die gleichzeitig mehrere Organe betreffen und auf das Versagen der regulatorischen T-Zellen zurückzuführen ist. In Menschen ist diese Krankheit als IPEX-Syndrom[120,121] und in Mäusen als *Scurfy*-Phänotyp bekannt[122].

$Foxp3^+$ T_{reg}-Zellen machen ca. 10% des peripheren $CD4^+$ T-Zell-Pools aus. Die Mehrheit dieser Zellen entwickelt sich als so genannte natürliche T_{reg}-Zellen (nT_{reg}) im Thymus[123,124] und weist ein von konventionellen $CD4^+$ T-Zellen abweichendes Repertoire exprimierter TZR mit einem erhöhten Anteil autoreaktiver T-Zell-Rezeptoren auf. Im Laufe einer Infektion oder *in vitro* unter Einfluss des Zytokins TGF-β entstehen jedoch auch aus naiven konventionellen $CD4^+$ T-Zellen $Foxp3^+$ T_{reg}-Zellen, die als induzierte T_{reg}-Zellen (iT_{reg}) bezeichnet werden[125]. Abgesehen von genetischen Modellen[126,127] und einer putativen Expression von Neuropilin-1 auf nT_{reg}-Zellen[128], lassen sich die beiden Zelltypen und das jeweilige Funktionsspektrum nur schwer voneinander abgrenzen. Die Aktivierung von T_{reg}-Zellen erfolgt analog zu konventionellen T-Zellen durch Erkennung des spezifischen Antigens im Kontext eines MHC-Klasse II Moleküls. Ist jedoch die Erstaktivierung einer T_{reg}-Zelle abgeschlossen, kann die darauf folgende Suppression von Effektor-T-Zellen auch ohne passende Antigenspezifität erfolgen.

Für die inhibitorischen Funktionen von T_{reg}-Zellen wurden bisher unterschiedliche Mechanismen beschrieben, die von kontaktabhängigen Vorgängen, wie der Granzym A- oder Perforin-abhängigen Zelllyse, über die Sekretion löslicher Faktoren wie IL-10, TGF-β oder IL-35 bis hin zur Veränderung der Funktion von antigenpräsentierenden Zellen reicht. Darüber hinaus kompetieren T_{reg}-Zellen durch ihre hohe CTLA-4-Oberflächenexpression mit CD28-exprimierenden Effektor-T-Zellen um die kostimulatorischen Liganden auf APZ und dämmen auch so eine überschießende T-Zell-Antwort ein. Des Weiteren sind T_{reg}-Zellen über ihre hohe Oberflächenexpression des hochaffinen IL-2-Rezeptors CD25 in der Lage das Zytokin IL-2 wegzufangen. Dadurch steht dieser wichtige Aktivierungs- und Proliferationsfaktor für Effektor-T-Zellen nicht mehr zur Verfügung, so dass eine T-Zell-Antwort gedämpft wird.

Neben den Foxp3$^+$ T_{reg}-Populationen, existieren weitere T-Zell-Populationen, deren Aktivierung regulatorische Effektormechanismen initiieren. Besonders hervorzuheben sind in diesem Kontext CD4$^+$ T_r1-Zellen, die nach TZR-Stimulation große Mengen des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10 sezernieren[129], sowie so genannte CD4$^+$ T_H3-Zellen, welche TGF-β produzieren[130]. Beide Subpopulationen entstehen in der Peripherie aus naiven konventionellen T-Zellen nach Aktivierung des TZR unter dem Einfluss eines definierten Zytokinmilieus und tragen ebenfalls zur Regulation einer Immunantwort bei.

Defizitäre Funktion von T_{reg}-Zellen in autoimmunen Erkrankungen

Um nun der Frage nachzugehen, inwiefern die suppressive Kapazität von regulatorischen T-Zellen in Autoimmunerkrankungen eingeschränkt ist, wurden unterschiedliche Szenarien postuliert[131]. Zum einen könnte eine verringerte Anzahl an T_{reg}-Zellen in der Peripherie und am Ort der Entzündung das Überschießen einer autoimmunen T-Zell-Antwort begünstigen. Gründe für eine verringerte Anzahl an T_{reg}-Zellen liegen in genetischen Mutationen, wie dem IPEX-Syndrom, und ferner in einer gestörten Homöostase und Proliferation in der Peripherie. Zum anderen könnten T_{reg}-Zellen zwar zahlenmäßig ausreichend vorhanden, jedoch in ihrer Funktionalität beeinträchtigt sein. Betroffen sein davon könnten Mechanismen der kontaktabhängigen Suppression, beispielsweise durch eine verringerte Expression der koinhibitorischen Moleküle CTLA-4 und Lag-3 oder durch Einschränkung der an der cytolytischen Signalkaskade beteiligten Proteine CD95 und Granzym A. Außerdem wäre ebenfalls eine gestörte Sekretion inhibitorischer Zytokine, wie IL-10, TGF-β oder IL-35 vorstellbar. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, dass die T_{reg}-Zellen zwar voll funktionsfähig sind, die zu kontrollierenden Effektor-T-Zellen jedoch unempfänglich auf die inhibitorischen Mechanismen der T_{reg}-Zellen reagieren. Hierbei stehen vor allem die wachstumsfördernden Zytokine IL-2, IL-7 und IL-15 im Verdacht, wenn im Überschuss vorhanden, Effektor-T-Zellen gegen eine T_{reg}-Zell-vermittelte Suppression resistent zu machen.

Dass eine eingeschränkte suppressive Kapazität von T_{reg}-Zellen zur Entstehung und zum Verlauf der Multiplen Sklerose beitragen kann, wurde in einigen Studien, sowohl anhand von *in vitro* Versuchen mit humanen Zellen, als auch *in vivo* am Mausmodell, gezeigt. Während in MS-Patienten im Großteil der veröffentlichten Studien keine Veränderung der Anzahl an T_{reg}-Zellen im peripheren Blut nachgewiesen werden konnte[132–138], scheint die Funktionalität der T_{reg}-Zellen von MS-Patienten im Vergleich zu den Zellen gesunder Individuen eingeschränkt zu sein. Zum einen scheint der Prozentsatz der naiven und der so genannten *recent thymic emigrant* T_{reg}-Zellen, die eine erhöhte suppressive Kapazität besitzen, in MS-Patienten verringert zu sein[134,137], auf der anderen Seite wurde ein erhöhter Prozentsatz CD127$^+$ T_{reg}-Zellen nachgewiesen, die keine inhibitorische Funktion besitzen[136] und von IFN-γ-produzierenden T_H1-artigen T_{reg}-Zellen mit einem potentiellen pro-inflammatorischen Potential[139].

Über die Quantifizierung der Anzahl und des Phänotyps der T_{reg}-Zellen hinaus, wurde eine Reihe von Studien veröffentlicht, die die Funktion der T_{reg}-Zellen von MS-Patienten mit der von T_{reg}-Zellen gesunder Individuen direkt verglichen. Alle Studien wiesen dabei eine verringerte suppressive Kapazität der T_{reg}-Zellen von MS-Patienten nach, wenn diese mit autologen Effektor-T-Zellen inkubiert wurden[132,136,140–142]. Außerdem waren die T_{reg}-Zellen in ihrer Fähigkeit eingeschränkt die IFN-γ-Produktion der Effektor-T-Zellen zu inhibieren[132,140]. Des Weiteren wurde eine mögliche Resistenz der Effektor-T-Zellen gegenüber der T_{reg}-Suppression in MS-Patienten untersucht. Dazu wurden Effektor-T-Zellen von MS-Patienten mit T_{reg}-Zellen gesunder Individuen kokultiviert. Diese Experimente konnten jedoch keine gesteigerte Resistenz der Effektor-T-Zellen nachweisen[132,134,140].

Da die Untersuchung des Einflusses von T_{reg}-Zellen auf komplexe Autoimmunerkrankungen *in vitro* anhand humanen Probenmaterials nur eingeschränkt möglich ist, wurden außerdem Studien mit dem Mausmodell EAE durchgeführt. So konnte schon früh gezeigt werden, dass regulatorische T-Zellen in der Lage sind enzephalitogene T-Zellen zu inhibieren und so das Auftreten einer EAE zu verhindern[143,144]. Sind diese Zellen hingegen in ihrer Zahl dezimiert, z.B. in Mäusen, die einen transgenen, MBP-spezifischen T-Zell-Rezeptor exprimieren und aufgrund einer genetischen Mutation der Rekombinase keine endogene T-Zell-Rezeptor-Rekombination durchführen können, entwickeln die Mäuse eine spontane EAE[145]. Dieser Phänotyp wurde auf das Fehlen von T_{reg}-Zellen zurückgeführt und deutet darauf hin, dass T_{reg}-Zellen essentiell an der Verhinderung einer autoimmunen ZNS-Inflammation beteiligt sind. Des Weiteren wurde gezeigt, dass die Depletion regulatorischer T-Zellen *in vivo* ebenfalls die Inzidenz der EAE erhöht und dass im Gegenzug ein adoptiver Transfer von T_{reg}-Zellen die Suszeptibilität der Mäuse verringert[145,146]. Mechanistisch scheint die Protektion auf der IL-10-Sekretion der T_{reg}-Zellen zu beruhen, da der Transfer von *Il10*$^{-/-}$ T_{reg}-Zellen den protektiven Effekt des Zelltransfers aufhob[147].

Interessanterweise ist eine Unterdrückung der ZNS-Inflammation durch T_{reg}-Zellen nur vor Einsetzen der EAE-Symptomatik erfolgreich. Während der akuten Phase der Erkrankung, sind T_{reg}-Zellen zwar im ZNS nachweisbar, diese sind jedoch nicht in der Lage die inflammatorische T-Zell-Antwort einzudämmen[148]. Eine Erklärung für dieses Phänomen läge in der Resistenz der Effektor-T-Zellen gegen die T_{reg}-vermittelte Suppression im EAE-Modell, möglicherweise aufgrund einer stark erhöhten Produktion der inflammatorischen Zytokine IL-6 und TNF-α in den ZNS-infiltrierenden $CD4^+$ T-Zellen. Eine solche Resistenz wurde jedoch in humanen $CD4^+$ T-Zellen von MS-Patienten bisher noch nicht bestätigt.

1.1.7 Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis

Vergleichbare Erkrankungen zur humanen MS sind, abgesehen von viralen Enzephalitiden, im Tierreich weitestgehend unbekannt. Keine spontan auftretende Erkrankung gleicht der Symptomatik der MS insofern, dass man sie als Modell-Krankheit nutzen könnte, um daraus Rückschlüsse auf die Pathogenese der MS ziehen zu können. Die experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis (EAE) ist eine Gruppe künstlich induzierter

neuroimmunologischer Krankheiten in Labortieren. Sie ähnelt den im Menschen beobachteten MS-Symptomen und wird seit der eher zufälligen Entdeckung vor rund 85 Jahren mehrheitlich dazu verwendet, zelluläre und molekulare Ursachen der MS aufzuklären[149–151].

Entwicklung der EAE

Ende des 19. Jahrhunderts wurden Emulsionen getrockneter Rückenmarkspräparate von mit Tollwut infizierten Kaninchen als Tollwutvakzine Menschen injiziert[149]. Die anfängliche Euphorie angesichts der Wirksamkeit der Impfung wich schnell einiger Besorgnis angesichts mehrerer Berichte über unerwünschte Nebenwirkungen in Form paralytischer Episoden. In etwa einem Drittel der Betroffenen betrafen diese Lähmungserscheinungen sogar die oberen Extremitäten und die Atemmuskulatur, so dass von einigen Todesfällen berichtet wurde. Die beobachteten Symptome waren jedoch untypisch für eine potentielle Infektion mit dem Tollwutvirus, zeigten die Patienten doch nicht die typische Wasserscheu. Auch histologisch wurden einige Unterschiede festgestellt, so z.B. eine Infiltration lymphoider Zellen und Demyelinisierung in der Nähe der Blutgefäße des ZNS, die stark von der in tollwutinfizierten Gehirnen gefundenen ausgeprägten Neurodegeneration ohne Demyelinisierung abwichen. Um nun die Frage zu beantworten, ob die paralytischen Schübe durch den Tollwutvirus verursacht wurden, wurden Primaten mit ZNS-Homogenaten gesunder Kaninchen behandelt[152,153]. Die auch bei dieser Form der Immunisierung auftretende Enzephalitis erbrachte den Beweis, dass die Symptomatik nicht durch den Tollwutvirus hervorgerufen wurde, sondern vielmehr in anderen Pathomechanismen begründet war, die in den folgenden Jahrzehnten detailliert untersucht wurden.

Zunächst wurde das Immunisierungsschema verfeinert, indem der Emulsion Paraffin-Öl und hitzeinaktiviertes *Mycobacterium tuberculosis* hinzugefügt wurden, um die Immunreaktion zu verstärken[154–156]. Dieses Prinzip beruhte auf einem Adjuvans, das Anfang der 1940er Jahre durch Jules T. Freund und Katherine McDermott entwickelt worden war[157]. Außerdem stellte sich heraus, dass ein Homogenat der weißen Substanz des ZNS effektiver eine EAE induzierte als Homogenate der grauen Substanz[158], und dass Bestandteile der Myelinscheide das auslösende Agens darstellten[159,160]. Zunächst wurde das enzephalitogene Potenzial für MBP beschrieben[159,160], anschließend folgten viele Studien, die ein solches Potenzial ebenfalls für PLP, MAG und MOG nachwiesen.

Anschließend begann man die Histologie der beobachteten Enzephalitis zu untersuchen und stellte eine Reihe von Gemeinsamkeiten zur humanen MS fest[161]. So ist die Pathologie in den Gehirnen immunisierter Tiere ebenfalls durch perivaskuläre Läsionen gekennzeichnet, die durch die Infiltration von Immunzellen hervorgerufen werden. Auch die Symptome der EAE ähneln denen der humanen MS zumindest in Bezug auf motorische Fehlfunktionen, die je nach gewähltem Tiermodell ebenfalls einen schubförmig-remittierenden oder progredienten Verlauf aufweisen.

Mit der Zeit verlagerte sich die Forschung von der Verwendung größerer Labortiere (Primaten, Kaninchen, Meerschweinchen) hin zu unter definierten Hygienestandards gezüchteten Labornagetieren, wie Mäusen und Ratten, aus genetisch vereinheitlichten Inzuchtstämmen. Fortschritte bei der Manipulation des Genoms dieser Tiere führen bis heute zu einem stetig wachsenden Arsenal transgener Linien, mit deren Hilfe der Einfluss einzelner Moleküle oder Zellpopulationen auf den Krankheitsprozess der EAE untersucht werden kann. Allerdings sind die Möglichkeiten verhaltensbiologischer und bildgebender Untersuchungen bei diesen Kleinnagern im Allgemeinen limitiert. Darüber hinaus weicht auch das Verteilungsmuster der Läsionen zwischen der MS und der EAE stark voneinander ab. Während in der MS die Läsionen häufig im Zerebrum (Großhirn) und im Zerebellum (Kleinhirn) lokalisiert sind, treten diese in der EAE fast ausschließlich in der weißen Substanz des Rückenmarks auf.

Induktion und Symptome einer EAE

Generell kann eine EAE durch die Injektion von MBP, PLP oder MOG induziert werden. Die daraus resultierende Symptomatik und Histopathologie unterscheidet sich jedoch je nach genetischem Hintergrund der verwendeten Mauslinien und für die Immunisierung verwendetem Antigen. So genannte SJL-Mäuse, welche mit dem enzephalitogenen $PLP_{139-151}$-Peptid immunisiert werden, entwickeln typischerweise einen schubförmig-remittierenden Krankheitsverlauf. Auf der anderen Seite resultiert die Immunisierung von C57BL/6-Mäusen mit dem Peptid MOG_{35-55} in einem chronischen, bzw. chronisch-progredienten Verlauf der EAE[162]. Die betroffenen Mäuse leiden an einer aufsteigenden Paralyse der hinteren Extremitäten, die durch Läsionen im Rückenmark hervorgerufen wird. Darüber hinaus lassen sich auch Läsionen im optischen Nerven nachweisen.

Neben der Immunisierung mit einem Antigen der Myelinscheide, die als aktive Immunisierung bezeichnet wird, lässt sich eine EAE auch durch den adoptiven Transfer enzephalitogener T-Zellen induzieren. Diese Art der Krankheitsübertragung wird als passive Immunisierung bezeichnet. Myelinspezifische T-Zellen werden dazu entweder aus den peripheren Lymphorganen aktiv immunisierter Mäuse isoliert oder aber aus naiven transgenen Mäusen, die einen myelinspezifischen T-Zell-Rezeptor tragen. Ein Modell, das auch in dieser Arbeit zum Einsatz kam, ist die so genannte 2D2-Maus[163], welche ein Transgen für einen T-Zell-Rezeptor trägt, der das Peptid MOG_{35-55} im Kontext des MHC-Klasse II-Moleküls I-A^b erkennt.

Die meisten Protokolle zur Induktion einer EAE beruhen auf der Injektion von MOG-Peptiden, die typische MHC-Klasse II-restringierte Epitope darstellen und damit eine myelinspezifische Antwort inflammatorischer $CD4^+$ T-Zellen generieren. Aus diesem Grund wird der Einfluss von $CD8^+$ T-Zellen und B-Zellen in diesen konventionellen Modellen nur unzureichend dargestellt. In den letzten Jahren wurden jedoch mehrere Mausmodelle etabliert, in denen die Funktion dieser Zellpopulationen verstärkt untersucht werden konnte[48,164]. Dennoch bleibt es eine Herausforderung der nächsten Jahre spontan

auftretende Mausmodelle der MS zu entwickeln, die der Symptomatik und der Pathogenese der MS möglichst nah kommen.

Die EAE hat seit ihrer Entwicklung zum wachsenden Verständnis von autoreaktiven Prozessen, Neuroinflammation und der Wirkung von Zytokinen beigetragen und so die MS-Forschung beschleunigt. Einige Strategien der MS-Therapie wurden anhand von EAE-Untersuchungen entwickelt[165], jedoch mit gemischtem Erfolg. In den meisten Fällen ließen sich vielversprechende Konzepte der EAE-Forschung nicht auf den Menschen übertragen. Weshalb diese Ansätze scheiterten und wie die Quote der Übertragbarkeit in Zukunft erhöht werden kann, evtl. durch die Verwendung humanisierter Mauslinien, bleibt der Gegenstand intensiver Forschungsbemühungen.

1.2 CD226

DNAX-accessory molecule 1 (DNAM-1 oder CD226) ist ein kostimulatorisches Adhäsionsmolekül auf der Oberfläche von unterschiedlichen Immunzellen, wie T-Zellen, NK-Zellen und Monozyten. Es wird aktiviert durch Bindung an seine Liganden, dem Poliovirus-Rezeptor (PVR oder CD155) und Nectin-2 (CD112). CD226 ist an einer Reihe immunologischer Funktionen beteiligt, unter anderem die zytotoxische Lyse von Zielzellen, welche die Liganden exprimieren, und die Aktivierung und Differenzierung von Immunzellen, die CD226 tragen. Aus diesem Grund ist CD226 ein wichtiger Bestandteil spezifischer Abwehrreaktionen, unter anderem gegen Tumorzellen und virale Infektionen, kann allerdings bei einer Fehlregulation auch zu Autoimmunerkrankungen beitragen.

1.2.1 Aufbau und Funktion von CD226

CD226 wurde 1985 zum ersten Mal von Burns *et al*. als ein spezifischer Marker von aktivierten T-Zellen beschrieben und als *T-lineage-specific activation antigen 1* (TLiSA 1) bezeichnet[166]. Einige Jahre später wies dieselbe Arbeitsgruppe eben jenes Molekül ebenfalls auf der Oberfläche von Thrombozyten nach und assoziierte es mit einer Funktion bei der Aktivierung und Aggregation von Thrombozyten[167]. Aus diesem Grund trägt das Molekül ebenfalls die Bezeichnung *platelet and T cell activation antigen 1* (PTA1). 1996 und 1997 veröffentlichten zwei unabhängige Labore die erfolgreiche Klonierung der codierenden Sequenz des Proteins[168,169]. Die Gruppe von Joseph Phillips vom *DNAX Research Institute* in Palo Alto, Kalifornien, benannte das vermeintlich neu identifizierte Molekül *DNAX accessory molecule-1* (DNAM-1), bevor es im Jahre 2002 von der 7. HLDA-Konferenz die Bezeichnung CD226 zugewiesen bekam[170] und so die Nomenklatur vereinheitlicht wurde.

CD226 ist ein Typ-I Transmembranprotein, welches der Superfamilie der immunglobulin-artigen Proteine zuzurechnen ist. Das Protein, das vornehmlich als Monomer extrazellulär exprimiert und von einem einzigen Gen auf dem Chromosom 18 codiert wird, umfasst 336 Aminosäuren und besitzt ein Molekulargewicht von 65 kDa[168,169]. Strukturell setzt sich

CD226 aus einer intrazellulären Signal-Domäne, einer kurzen Transmembran-Domäne und einer großen extrazellulären Domäne, die aus zwei immunglobulinartigen Domänen aufgebaut ist, zusammen. CD226 liegt an 8 Aminosäuren N-glykosyliert vor (Abbildung 1.2).

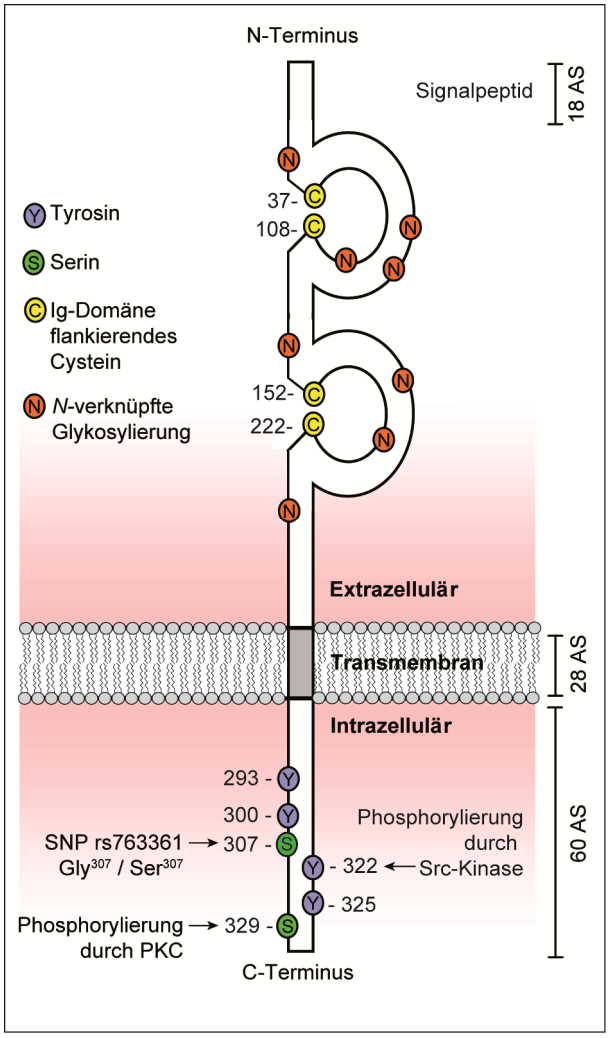


Abbildung 1.2: Schematische Darstellung des Aufbaus des CD226-Moleküls. Erweitert übernommen von Elishmereni *et al.*[171]

CD226 wird von vielen unterschiedlichen Immunzellpopulationen exprimiert. Dazu gehören T- und B-Zellen, NK- und NKT-Zellen, ferner Monozyten, Mastzellen und Thrombozyten. CD226 ist Teil eines komplexen Netzwerks bestehend aus unterschiedlichen aktivierenden und inhibitorischen Rezeptoren und Liganden (Abbildung 1.3). Zu den Liganden des Moleküls gehören der Poliovirus-Rezeptor (PVR oder CD155) sowie Nectin-2 (CD112)[172,173], die beide mit vergleichbarer Affinität an CD226 binden[174]. Neben CD226 binden auch die Rezeptoren TIGIT und CD96 an CD155 und kompetieren direkt um die gleiche Bindungsstelle[175]. Während CD226 jedoch primär kostimulatorische Eigenschaften zugeschrieben werden, scheint TIGIT diesen durch seine intrinsische koinhibitorische Funktion in Verbindung mit einer deutlich höheren Affinität für CD155 entgegenzuwirken[100,175]. Welchen Stellenwert der Rezeptor CD96 in diesem System einnimmt, muss noch in weiteren Studien aufgeklärt werden[176,177].

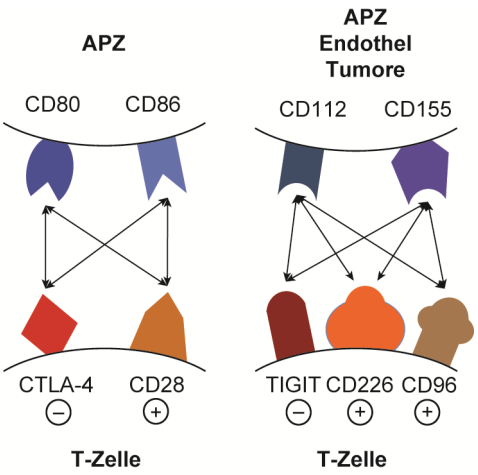


Abbildung 1.3: Schematische Darstellung wichtiger kostimulatorischer Signalwege. Verändert übernommen von Joller *et al.*[100]

CD155 und CD112 werden in hohem Maße von Tumorzellen exprimiert[178–183]. Die Interaktion von CD226 auf NK-Zellen oder CD8$^+$ T-Zellen mit CD155/CD112 führt zu einer Aktivierung der zytotoxischen Antwort seitens der Effektorzelle und letztendlich zur Eliminierung der CD155/CD112-exprimierenden Tumorzellen. Patienten, die an unterschiedlichen Tumoren leiden, weisen häufig eine verringerte CD226-Expression auf zytotoxischen Zellen auf. Diese ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass CD155-exprimierende Tumorzellen einer destruktiven Immunantwort bei niedriger CD226-Expression entgehen können[180,184]. Neben Tumorzellen, exprimieren unter anderem auch Endothelzellen CD155. Es wurde gezeigt, dass die Interaktion von CD226 und CD155 zur Extravasation von humanen Monozyten und CD4$^+$ Effektor-Gedächtnis-T-Zellen durch CD155-exprimierende Endothelien beiträgt [185,186].

CD226 ist neben seiner Funktion bei der Abwehr von entarteten Tumorzellen ebenfalls an Mechanismen beteiligt, die zur Differenzierung und Proliferation von CD4$^+$ und CD8$^+$ T-Zellen beitragen. Es wurde gezeigt, dass die Aktivierung von CD8$^+$ T-Zellen durch nicht-professionelle antigenpräsentierende Zellen, wie z.B. B-Zellen, abhängig ist von der Interaktion von CD226 mit CD155, während eine Aktivierung durch professionelle APZ, wie dendritische Zellen, CD226-unabhängig möglich ist[187]. Eine erfolgreiche Immunantwort gegen persistierende virale Infektionen scheint ebenfalls von einer funktionalen CD226-Signalgebung abhängig zu sein[188,189]. Eine reduzierte CD226-Expression auf virusspezifischen CD8$^+$ T-Zellen scheint mit einem immunologischen Erschöpfungszustand der Zellen in Verbindung zu stehen[188]. Ferner reduziert eine CD226-Defizienz die Menge an proinflammatorischen Zytokinen wie TNF-α und IL-2, die von CD8$^+$ T-Zellen ausgeschüttet werden, was ebenfalls zu einer schlechteren Virusabwehr beiträgt[189].

Über die bekannten Funktionen von CD226 auf zytotoxischen CD8$^+$ T-Zellen und NK-Zellen hinaus, gibt es einige Publikationen, die ebenfalls eine essentielle Funktion von CD226 für die Differenzierung und Aktivierung von CD4$^+$ T-Helferzellen nahelegen. So wurde in mehreren Studien gezeigt, dass nach der Antigenerkennung durch den T-Zell-Rezeptor

CD226 mit dem Adhäsionsmolekül *lymphocyte function-associated antigen 1* (LFA-1) interagiert[190,191]. Diese Wechselwirkung dient als kostimulatorisches Signal für die Differenzierung und Proliferation naiver T-Zellen[192]. In einer kürzlich erschienenen Publikation der Gruppe von Maria-Grazia Roncarolo aus Mailand wurde zudem darauf hingewiesen, dass regulatorische T_r1-Zellen durch eine hohe CD226-Expression ausgezeichnet sind[193]. T_r1-Zellen induzieren in CD155-exprimierenden Zielzellen, insbesondere myeloide APZ, in einem CD226-involvierenden Mechanismus außerdem Apoptose, wodurch das Spektrum der inhibitorischen Aktivitäten von T_r1-Zellen über die Sekretion anti-inflammatorischer Zytokine hinaus erweitert wird[194].

Auch im Kontext von Autoimmunerkrankungen gibt es einige Studien, die eine wichtige Funktion von CD226 nicht nur bei systemischer Immunaktivierung, sondern auch während einer abnormalen Autoimmunreaktion nahelegen. Eine Behandlung von Mäusen mit einem CD226-spezifischen Antikörper inhibierte die Proliferation und die Sekretion inflammatorischer Zytokine durch enzephalitogene $CD4^+$ T_H1-Zellen[195]. Darüber hinaus vermochte die Behandlung von Mäusen mit CD226-blockierenden Antikörpern den Verlauf einer durch adoptiven Transfer induzierten EAE in SJL-Mäusen zu mildern und das Einsetzen der Lähmungssymptomatik zeitlich zu verzögern. In Patienten mit rheumatoider Arthritis und Lupus erythematodes konnte eine im Vergleich zu gesunden Individuen erhöhte CD226-Expression auf peripheren T-Zellen festgestellt werden[196]. Außerdem wurde gezeigt, dass der Prozentsatz an CD226-exprimierenden T-Zellen in der Gelenkflüssigkeit von Patienten mit rheumatoider Arthritis erhöht war im Vergleich zum peripheren Blut[196]. Auch in der Sklerodermie wurde eine gesteigerte CD226-Expression in der Haut nachgewiesen[197], während hingegen eine CD226-Defizienz Mäuse vor Bleomycin-induzierter dermaler Fibrose schützte.

Zusammengefasst deuten die Ergebnisse der bisher veröffentlichten Studien darauf hin, dass eine hohe CD226-Expression mit einer verbesserten Immunabwehr gegen entartete Tumorzellen und virale Infekte assoziiert ist. Gleichzeitig scheint sich eine hohe CD226-Expression eher negativ auf den Verlauf von Autoimmunerkrankungen auszuwirken. Diese Annahme fügt sich in die Theorie ein, dass sich eine starke Immunaktivierung vorteilhaft auf die Abwehr von Tumoren auswirkt, während eine überschießende T-Zell-Aktivierung zu Autoimmunerkrankungen führen kann.

Signalkaskade

Die intrazelluläre Domäne des CD226-Moleküls umfasst mehrere Tyrosin- und Serin-Reste, die an der CD226-Signalkaskade beteiligt sind (Abbildung 1.4: 1–6). (1) Sobald ein Antigen im Kontext eines MHC-Komplexes an den T-Zell-Rezeptor bindet, werden spezialisierte Cluster in den so genannten *lipid rafts* gebildet, in der eine Reihe von Signalmolekülen miteinander interagieren[198,199]. Unter anderem bindet die kleine GTPase RAP an ihren Aktivator RAPL[200]. Dieser Komplex bindet und aktiviert anschließend LFA-1. (2+3) In Folge der Aktivierung des T-Zell-Rezeptors wird parallel durch die Proteinkinase C die Aminosäure Ser[329] der intrazellulären Domäne des CD226-Moleküls phosphoryliert[201], wodurch eine physikalische Interaktion von CD226 mit dem RAP-RAPL-LFA-1-Komplex ermöglicht wird[191]. (4) Der Komplex akkumuliert in peripheren Bereichen der immunologischen Synapse, den so genannten p-SMAC[202]. (5) Im aktivierten Zustand bindet LFA-1 an seinen Liganden ICAM-1 auf der Oberfläche von APZ, infolgedessen die an LFA-1-assoziierte Kinase Fyn die Position Tyr[322] des CD226-Moleküls phosphoryliert[192]. (6) Diese Phosphorylierung wiederum ist essentiell, um ein kostimulatorisches Signal für die Proliferation und Differenzierung von $CD4^+$ T-Zellen zu generieren. Dieser Prozess hängt maßgeblich von der Bindung an LFA-1 und von der Maschinerie der *lipid rafts* ab.

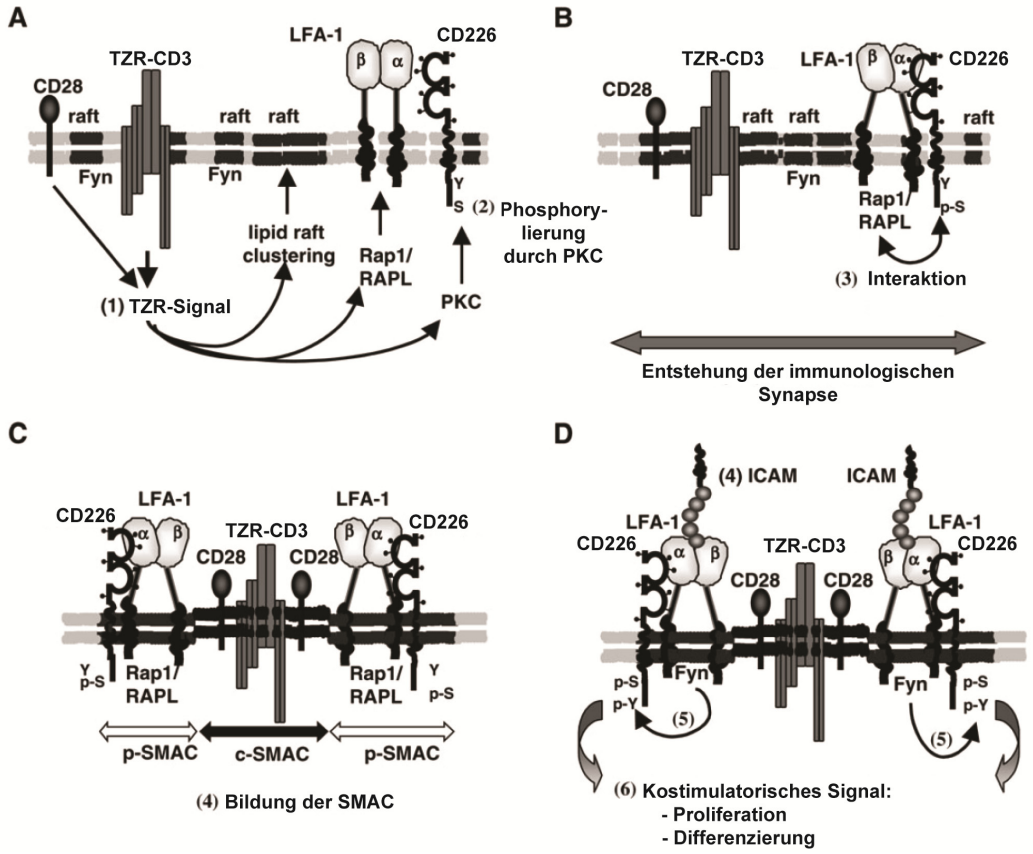


Abbildung 1.4: Modell der CD226-Signalkaskade. Verändert übernommen von Shirakawa *et al.*[191] Für detaillierte Erläuterungen siehe bitte Kapitel 1.2.1: Signalkaskade.

1.2.2 TIGIT

TIGIT wurde erst 2009 von drei Gruppen gleichzeitig beschrieben, die auf das Molekül durch die Analyse des menschlichen Genoms auf Sequenzen mit konservierten immunglobulinartigen Domänen gestoßen waren[175,203,204]. *T cell immunoreceptor with immunologlobulin and ITIM domains* (TIGIT) ist ein Protein der CD28-Familie und aus einer extrazellulären Immunglobulin-Domäne, einer Transmembran-Domäne und einer zytoplasmatischen Sequenz aufgebaut, die zwei ITIM-Motive enthält. TIGIT wird von NK-Zellen, T-Zell-Subpopulationen, im besonderen Gedächtnis-T-Zellen, follikulären T-Helferzellen und regulatorischen T-Zellen exprimiert und aktivierungsinduziert hochreguliert. Wie auch CD226, bindet TIGIT ebenfalls an CD155 und CD112 auf APZ. Während CD226 ein kostimulatorisches Signal vermittelt, handelt es sich bei der durch TIGIT-Bindung induzierten Kaskade um ein inhibitorisches Signal.

In vitro inhibiert TIGIT die zytotoxische Antwort von NK-Zellen sowie die Proliferation und Zytokin-Sekretion von $CD4^+$ T-Zellen[204–207]. Es wurde jedoch auch gezeigt, dass ein rekombinantes TIGIT-Fc-Fusionsmolekül in dendritischen Zellen die Produktion des regulatorischen Zytokins IL-10 anregt und über diesen indirekten Weg eine T-Zell-Aktivierung inhibiert[175]. *In vivo* konnte die immunmodulatorische Kapazität des TIGIT-Moleküls durch die Verwendung TIGIT-defizienter Mäuse bestätigt werden. Zum einen entwickeln *Tigit*$^{-/-}$-Mäuse einen stärkeren Verlauf der EAE[206,207], während die Behandlung mit einem TIGIT-Fc-Molekül den Verlauf abmildert[206]. Darüber hinaus hat die Injektion des TIGIT-Fc-Moleküls ebenfalls eine positive Wirkung auf den Verlauf der kollageninduzierten Arthritis, einem Tiermodell der rheumatoiden Arthritis[206].

Das resultierende Netzwerk, bestehend aus CD226/TIGIT auf der Seite der T-Zellen und CD155/CD112 auf der APZ-Seite ähnelt in vielen Aspekten dem oben beschriebenen CD28/CTLA-4 und CD80/CD86-Netzwerk (Abbildung 1.3), welches für die Aktivierung und Regulation von T-Zell-Antworten essentiell ist. CD226 und TIGIT scheinen um dieselben Liganden zu konkurrieren[205] und weitgehend entgegengesetzte Funktionen zu erfüllen. Inwiefern diese Interaktion zur engen Regulation einer T-Zell-Antwort beiträgt, muss in weiteren Experimenten untersucht werden.

1.3 CD155

CD155, das auch unter den Namen Necl-5 oder Poliovirus-Rezeptor (PVR) bekannt ist, ist ein Molekül der Immunglobulin-Superfamilie und gehört zu den Nectin-artigen Proteinen[208–210]. Initial wurde CD155 als Rezeptor des Poliovirus identifiziert, der den Wirts- und Gewebstropismus des Virus bestimmt[208]. Neben den bereits erläuterten Rezeptoren CD226, TIGIT und CD96, weisen ebenfalls Nectin-3 und Vitronectin eine Bindungsaffinität zu CD155 auf[172,177,211–216]. Exprimiert wird es vor allem von Tumorzellen und aktivierten dendritischen Zellen[216–218], ferner von T- und NK-Zellen[219]. Außerdem kann Ras-Aktivierung und genotoxischer Stress die CD155-Expression erhöhen[220,221].

Die Funktionen von CD155 sind sehr vielfältig und betreffen eine Reihe unterschiedlicher Immunfunktionen, die in Zukunft weiter konkretisiert und deren Verständnis weiter vertieft werden muss. So ist CD155 unter anderem an der Ausbildung von *adherens junctions* zwischen Endothel- und Epithelzellen beteiligt[209], ferner werden dem Protein Funktionen bei der Motilität von Zellen, der Migration und der Proliferation zugeschrieben[222,223].

Darüber hinaus spielt die CD155-Expression auf diversen Tumorzellarten eine große Rolle bei der immunvermittelten Abwehr entarteter Zellen durch NK-Zellen und zytotoxische $CD8^+$ T-Zellen[182,187]. Diese durch NK-Zellen vermittelte Zytotoxizität gegen CD155-exprimierende Zielzellen ist ebenfalls bei der Eliminierung von dendritischen Zellen relevant. Auf diese Art könnte das verfügbare Kontingent an dendritischen Zellen, die für die Stimulation von T-Helferzellen zur Verfügung stehen, geformt und verändert werden[224,225].

Ferner scheint CD155 eine Rolle bei der humoralen Immunantwort gegen oral aufgenommene Antigene zu spielen[219]. Dieser Befund wird durch eine weitere Studie unterstützt, die eine CD155-Defizienz mit einer verringerten Anzahl follikulärer T-Helferzellen in den Peyer-Plaques des Darmes assoziierte[226].

1.4 Zielsetzung

Mehrere genetische Assoziationsstudien haben einen SNP im *CD226*-Gen mit einem erhöhten Risiko für unterschiedliche Autoimmunerkrankungen in Verbindung gebracht. Im Rahmen dieser Doktorarbeit sollte die funktionelle Relevanz dieser genetischen Variante des CD226-Kostimulationsmoleküls für die Pathogenese der Multiple Sklerose und der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis untersucht werden.

Zunächst sollten die phänotypischen Konsequenzen der verschiedenen CD226-Haplotypen im Hinblick auf die CD226-Expression auf humanen Immunzellen untersucht werden. Die beobachteten Unterschiede zwischen Zellen von Trägern des Risikohaplotyps und Zellen von Trägern des protektiven Haplotyps, sollten mithilfe transgener Mauslinien nachgestellt werden. Da die phänotypische Untersuchung humaner Zellen auf *in vitro* Versuche beschränkt ist, bot die Verwendung CD226-defizienter Mäuse die Möglichkeit, den Konsequenzen einer verringerten CD226-Expression *in vivo* anhand eines Mausmodells nachzuforschen.

CD226-defiziente Mäuse sollten in Bezug auf die zelluläre Zusammensetzung zentraler und peripherer lymphatischer Organe untersucht werden. Die anhand dieser Phänotypisierung erzielten Erkenntnisse sollten durch funktionelle Analysen ergänzt werden.

Darüber hinaus sollte der Einfluss einer CD226-Defizienz auf den Verlauf einer EAE untersucht werden. Durch Verwendung dieses Mausmodells sollte der unmittelbare Effekt einer verringerten CD226-Expression auf eine autoimmune Pathologie analysiert werden.

Ein weiteres Ziel war es, den Einfluss eines Liganden von CD226, CD155 zu untersuchen. Dazu sollte zum einen die CD155-Expression muriner Immunzellen charakterisiert werden. Zum anderen sollten CD155-defiziente Mäuse phänotypisiert und der Verlauf der EAE in diesen Mäusen analysiert werden.

Durch die Kombination der Erkenntnisse aus den *in vitro* Ansätzen mit humanen Zellen und dem *in vivo* Mausmodell der EAE sollten neue Rückschlüsse ermöglicht werden, inwiefern CD226 im Zusammenspiel mit seinem Liganden CD155 die Ausbildung und den Verlauf einer autoimmunen Pathologie beeinflusst und inwiefern dieses Kostimulationssystem an einem potentiell konservierten Signalweg beteiligt sein könnte, dessen Fehlregulation unterschiedliche Autoimmunerkrankungen begünstigen könnte.

2 Material und Methoden

2.1 Humanes Probenmaterial

Alle MS-Patienten wurden durch die Multiple Sklerose Tagesklinik und Ambulanz des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf rekrutiert. Die Diagnosestellung erfolgte durch Ärzte der Tagesklinik anhand der McDonald-Kriterien[10], die auch die Schwere der Erkrankung anhand des EDSS einschätzten[11]. Keiner der Patienten war innerhalb des letzten Jahres vor der Probenentnahme mit immunmodulatorischen Medikamenten behandelt worden.

Die Kohorte der gesunden Kontrollen setzte sich zum einen aus Besuchern der MS-Tagesklinik und zum anderen aus Mitarbeitern und Angehörigen des Zentrums für molekulare Neurobiologie zusammen und wurde bezüglich des Alters und des Geschlechts der Individuen den MS-Patienten angepasst. Eine Kohorte wurde für die Analyse der CD226-Expression auf Zellen des peripheren Blutes verwendet (Tabelle 2.1). Kryokonservierte PBMC der zweiten Kohorte wurden für die Expressionsanalyse von CD226 auf T_{reg}-Zellen aufgetaut und analysiert (Tabelle 2.2).

Ferner wurden Leukozytenkonzentrate (*buffy coats*) verwendet, welche als Nebenprodukt bei Blutspenden entstehen und freundlicherweise von der Blutbank des UKE zu Forschungszwecken zur Verfügung gestellt wurden. Bei allen gesunden Donoren handelte es sich um freiwillige Spender, bei denen zum Zeitpunkt der Blutentnahme keine diagnostizierte Erkrankung vorlag.

Diese Studie wurde im Rahmen des durch die Ethikkommission der Hamburger Ärztekammer genehmigten Antrages „Heterogenität der Multiplen Sklerose – Studie zur Phänotypisierung, biologischen Markern und zur Risikokommunikation bei Multipler Sklerose“ (Referenznummer 2758) durchgeführt. Alle Donoren wurden über diese Studie aufgeklärt und haben sich schriftlich mit der Verwendung ihrer Proben zu wissenschaftlichen Zwecken einverstanden erklärt.

Die Aufarbeitung und Konservierung von PBMCs und DNA-Proben gesunder Individuen und MS-Patienten wurde routinemäßig von den Mitarbeiter/-innen der Biobank des Instituts für Neuroimmunologie und Klinische MS-Forschung (inims) durchgeführt.

Tabelle 2.1: Kohorte 1. Charakteristiken der MS-Patienten und gesunden Individuen, die für die durchflusszytometrische Analyse der CD226-Expression auf peripheren Blutzellen verwendet wurden.

	n	Geschlecht (W : M)	Alter (Jahre ± s.d.)	Krankheitsdauer (Monate; min – max)	EDSS (min – max)
RRMS	27	21:6	38 ± 10,0	61,2 (1 – 313)	1,89 (0 – 4)
RRMS/R	9	8:1	36,4 ± 11,0	115,6 (12 – 288)	2,06 (0 – 4)
SPMS	10	8:2	48,7 ± 5,5	228,2 (88 – 398)	3,95 (2,5 – 6,5)
Gesamt MS	46	37:9	40,0 ± 10,5	108,1 (1 – 313)	2,37 (0 – 6,5)
Gesunde Individuen	48	31:17	40,9 ± 9,9	n.a.	n.a.

RRMS: schubförmig-remittierende Multiple Sklerose; RRMS/R: RRMS im akuten Schub; SPMS: sekundär-progrediente MS; W: weiblich; M: männlich; s.d.: Standardabweichung; EDSS: *expanded disability status scale*; n.a.: nicht anwendbar.

Tabelle 2.2: Kohorte 2. Charakteristiken der MS-Patienten und gesunden Individuen, die für die Analyse der CD226-Expression auf T_{reg}-Zellen verwendet wurden.

	n	Geschlecht (W : M)	Alter (Jahre ± s.d.)	Krankheitsdauer (Monate; min – max)	EDSS (min – max)
Gesamt MS	30	24:6	40,3 ± 8,7	64,0 (1 – 250)	1,33 (0 – 4)
Gesunde Individuen	52	35:17	37,4 ± 8,64	n.a.	n.a.

W: weiblich; M: männlich; s.d.: Standardabweichung; EDSS: *expanded disability status scale*; n.a.: nicht anwendbar.

2.2 Mauslinien

C57BL/6-Mäuse wurden von Charles River, Deutschland, bezogen und in der Zentralen Versuchstierhaltung des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf gezüchtet. Diese Mäuse wurden ebenfalls als Hintergrundlinien für Embryotransfers importierter transgener Mauslinien verwendet.

Cd226$^{-/-}$-Mäuse wurden uns freundlicherweise von der Arbeitsgruppe von Marco Colonna, St. Louis, Missouri, USA zur Verfügung gestellt[187].

Cd155$^{-/-}$-Mäuse wurden uns freundlicherweise von der Arbeitsgruppe von Günter Bernhardt, Hannover, Deutschland zur Verfügung gestellt[219].

2D2-transgene Mäuse, Tg(Tcra2D2,Tcrb2D2)1Kuch, wurden von der Arbeitsgruppe von Vijay Kuchroo, Boston, Massachusetts, USA generiert[163]. Transgene Mäuse dieser Linie wurden vom Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine, USA erworben.

Alle Tierversuche wurden mit der Genehmigung durch die Behörde für Gesundheit und Verbraucherschutz, Hamburg durchgeführt. Für die vorliegende Arbeit wurden Versuche innerhalb der folgenden Tierversuchsanträge durchgeführt:

G09/121	Kostimulatorische Moleküle in der Pathogenese der Multiplen Sklerose
G12/050	Kostimulatorische Moleküle in der Pathogenese der Multiplen Sklerose
ORG580	EAE

2.3 Material

2.3.1 Reagenzien und Verbrauchsartikel

Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien, sofern nicht anders angegeben, wurden von den Firmen Sigma-Aldrich und Roth bezogen.

Tabelle 2.3: Reagenzien für Tierversuche

Reagenz	Hersteller
Inkomplettes Freund-Adjuvans	BD Difco
Maus/Ratte MOG_{35-55}-Peptid MEVGWYRSPFSRVVHLYRNGK-NH_2	Schafer-N
Mycobacterium tuberculosis H37Ra	BD Difco
Pertussis Toxin (*Bordetella pertussis*)	Merck Biosciences

Tabelle 2.4: Reagenzien für Zellisolation und Zellkultur

Reagenz	Hersteller
β-Mercaptoethanol	Invitrogen
[methyl-^{3}H]-Thymidin	Amersham
Hamster anti-Maus CD3 (Klon 145-2C11)	BioLegend
Hamster anti-Maus CD28 (Klon 37.51)	BioLegend
Maus anti-Human CD3 (Klon OKT3)	BioXCell
Ratte anti-Maus CD90.2 (Klon 30-H12)	BioLegend
Accutase	PAA
Brefeldin A	BioLegend
BD IMag Human CD4 T Lymphocyte Enrichment Set-DM	BD Biosciences
Bovines Serum Albumin (BSA)	PAA
$CD4^+CD25^+$ Regulatory T Cell Isolation Kit, Maus	Miltenyi Biotech
$CD4^+$ T Cell Isolation Kit II, Maus	Miltenyi Biotech
DNase I (aus bovinem Pankreas)	Roche
Dulbecco's PBS, 1x und 10x	PAA
Ethylendiamintetraacetat (EDTA; 0,5 M Lösung)	Sigma-Aldrich
Fötales Kälberserum (FCS)	PAA
GM-CSF	Immunotools
HBSS	PAA
Humanes Serum	PAA

Reagenz	Hersteller
rm IL-1β	Invitrogen
rm IL-2	eBioscience
rm IL-6	ImmunoTools
rm IL-7	Peprotech
rm IL-12	Peprotech
rm IL-18	MBL
Ionomycin	Sigma-Aldrich
Kollagenase A (*Clostridium hystolyticum*)	Roche
Lymphocyte Separation Medium LSM 1077	PAA
LowTox Rabbit Complement M	Cedarlane
Lipopolysaccharid (LPS) aus *Salmonella enterica* Serotyp typhimurium	Sigma-Aldrich
Penicillin/Streptomycin (10000 units/ml)	Invitrogen
Percoll	GE Healthcare
rm PGE-2	Sigma-Aldrich
Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA)	Sigma-Aldrich
RPMI 1640 mit stabilem L-Glutamin	PAA
Szintillationslösung	Perkin-Elmer
rm TNF-α	ImmunoTools
Trypan Blau Lösung (0,4%)	PAA
Türks Lösung	Merck

Tabelle 2.5: Verbrauchsartikel

Bezeichnung	Hersteller
12-*well* Zellkulturplatte	Greiner
96-*well* PCR Platte	Sarstedt
96-*well* Rundboden Zellkulturplatte	Greiner
96-*well* Flachboden Zellkulturplatte	Greiner
EDTA-Röhrchen (S-Monovette®, 9 ml)	Sarstedt
Einmalpipetten	Greiner
Eppendorfreaktionsgefäß	Sarstedt
FACS-Röhrchen	Sarstedt
Falcon-Gefäße	Sarstedt
Filtermatten	Perkin-Elmer
Kanülen	Braun

Bezeichnung	Hersteller
Kryogefäße	Greiner
Klarsichthüllen für Filtermatten	Perkin-Elmer
Neubauer-Zählkammer	Brand Digital Bio
Pipettenspitzen	Sarstedt
Spritzen	Braun
Sterilfilter (Stericup-GP; 0,22 µm)	Millipore
Verschlussfolie für PCR-Platten	Sarstedt
Zellsieb, 40 µm	BD Biosciences

Tabelle 2.6: Reagenzien zur DNA-Aufreinigung und Genotypisierungs-PCR

Reagenz	Hersteller
Agarose Ultra Pure	Invitrogen
dNTP Mix	Fermentas
DreamTaq DNA Polymerase	Fermentas
Ethanol ≥ 99,8 p.a.	Roth
GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder	Fermentas
Isopropanol	Roth
Maxima Hot Start Taq Polymerase	Fermentas
QuickExtract	Epicentre
RotiSafe	Roth
TaqMan Genotyping Master Mix	Applied Biosystems
TaqMan® SNP Genotyping Assay rs763361 (C__1464836_20) rs727088 (C__1464838_10)	Applied Biosystems
Primer (siehe Tabelle 2.11)	Biomers

2.3.2 Reagenzien für die Durchflusszytometrie

Tabelle 2.7 Antikörper gegen Mausantigene

Antigen	Fluorochrom	Klon	Hersteller
CD3ε	PerCP-Cy5.5	145-2C11	BioLegend
CD3ε	PacificBlue	500A2	BD Biosciences
CD4	PE PE-Cy7	GK1.5	eBioscience
CD4	APC-eFluor780 eFluor450	RM4-5	eBioscience
CD4	BrilliantViolet570	RM4-5	BioLegend
CD8a	PacificBlue	53-6.7	BioLegend
CD11b	FITC	M1/70	BioLegend
CD11c	APC PE-Cy7	N418	eBioscience
CD16/32 TruStain fcX	-	93	BioLegend
CD25	Alexa488 APC	PC61.5	eBioscience
CD44	APC	IM7	BioLegend
CD45	APC-Cy7	30-F11	BioLegend
CD45R (B220)	PE-Cy5.5	RA3-6B2	eBioscience
CD62L	PE-Cy7	MEL-14	eBioscience
CD69	FITC	H1.2F3	eBioscience
CD155*	DyL649	3F1	Zur Verfügung gestellt von Günter Bernhardt
CD226	PE	480.1	BioLegend
Foxp3	PE APC	FJK-16s	eBioscience
Gr-1	eFluor450	RB6-8C5	eBioscience
IFN-γ	PE	XMG1.2	eBioscience
IL-17A	Alexa647	eBio17B7	eBioscience
Ly-6G	V450	1A8	BD Biosciences
NK1.1	PE PE-Cy7	PK136	eBioscience
Vα3.2 TCR	FITC	RR3-16	BD Biosciences
Vβ11 TCR	PE	RR3-15	BD Biosciences

* Der CD155-Antikörper wurde mithilfe des DyLight649 Antibody Labeling Kit nach Herstellerangaben fluoreszenzmarkiert.

Tabelle 2.8 Antikörper gegen humane Antigene

Antigen	Fluorochrom	Klon	Hersteller
CCR7	PE-Cy7	3D12	BD Biosciences
CD3	V500	UCHT1	BD Biosciences
CD4	FITC APC-eFluor780	RPA-T4	eBioscience
CD8α	PacificBlue	DK 25	Dako
CD25	BrilliantViolet421	BC96	BioLegend
CD45RA	BrilliantViolet605 APC	HI100	BioLegend Invitrogen
CD56	Alexa488	B159	BD Biosciences
CD69	FITC	FN50	BD Biosciences
CD226	PE FITC	DX11	BD Biosciences
Foxp3	Alexa647	206D	BioLegend

Tabelle 2.9 Isotypkontrollantikörper

Isotyp	Fluorochrom	Klon	Firma
Maus IgG1, κ	PE	MOPC-21	BD Biosciences
Maus IgG2a, κ	PE	MOPC-173	BioLegend
Ratte IgG2a, κ	PE	RTK2758	BioLegend

Tabelle 2.10: Weitere Reagenzien für die Durchflusszytometrie

Reagenz	Hersteller
BD FACS Clean Solution	BD Biosciences
BD FACS Flow, 20 l	BD Biosciences
BD FACS Rinse Solution	BD Biosciences
BD FACS Lysing Solution	BD Biosciences
BD Cytometer Setup & Tracking Beads	BD Biosciences
BD Trucount Tubes	BD Biosciences
DyLight649 Microscale Antibody Labeling Kit	Thermo Scientific
Fixation Buffer	BioLegend
Foxp3/ Transcription Factor Staining Buffer Set	eBioscience
Humanes IgG	Jackson ImmunoResearch
LIVE/DEAD Fixable Aqua Dead Cell Stain Kit	Life Technologies
LIVE/DEAD Fixable Near-IR Dead Cell Stain Kit	Life Technologies
Permeabilization Wash Buffer	BioLegend

2.3.3 Primer

Tabelle 2.11: Primer zur Genotypisierung transgener Mauslinien

Primer	Sequenz	PCR
DNAM-1 18401	5‘-TGT TCA AAT CTA ACC CAG AG-3‘	Genotypisierung der *Cd226*$^{-/-}$ Mauslinie[187]
DNAM-1 18601	5’-GCA GAA GCC AGT ACA GTT TGA AGT T-3‘	
DNAM-1 18646	5‘-GCC ATT TTG TTA GGA AGA GGT TGA T-3‘	
35scrt	5‘-CGG CAA GAA CAT CAC CTG CAC G-3’	Genotypisierung der *Cd155*$^{-/-}$ Mauslinie[219]
3sgt	5‘-CCA CAG AGT GTG AGC ACC ATC C-3’	
P2as	5‘-GTG TAG CGC CAA GTG CCC AGC-3‘	
6711 tgfwd	5’-CCC GGG CAA GGC TCA GCC ATG CTC CTG-3’	Genotypisierung der 2D2-transgenen Mauslinie[163]
6712 tgrev	5‘-GCG GCC GCA ATT CCC AGA GAC ATC CCT CC-3‘	
Actin fwd	5‘-AGA GGG AAA TCG TGC GTG AC-3‘	
Actin rev	5‘-CAA TAG TGA TGA CCT GGC CGT-3‘	

2.3.4 Geräte

Tabelle 2.12: Geräte

Gerät	Hersteller
ABI Prism 7900HT Fast Real-Time PCR System	Applied Biosystems
BD FACS LSR II Durchflusszytometer	BD Biosciences
Bestrahlungsgerät Biobeam 2000 (^{137}Cs; 49,2 TBq)	Eckert & Ziegler
Beta-Zähler 1450 Microbeta	Perkin-Elmer
Filtermatten-Kassette	Perkin-Elmer
Flüssigstickstofftank LABS-40K	Tec Lab
Harvester 96 MACH III M	Tomtec
Einschweißgerät Heat Sealer 1295-012	Wallac

Gerät	Hersteller
Inkubator Hera Cell 240	Thermo Scientific
Inkubator INC153	Memmert
Kryobehälter Mr. Frosty	Nalgene
Kühlschrank	Liebherr
Nanodrop Nd-1000	Peqlab
PCR Gerät Flexcycler	Analytikjena
pH-Meter Hydrus 300	Fischer Brand
Pipetten	Eppendorf Gilson
Pipettierhilfe Accu-Jet	Brand
Sterile Werkbank Safe 2020	Thermo Scientific
Gefrierschrank (-20 °C)	Liebherr
Gefrierschrank (-80 °C)	Sanyo
Zellseparationsmagnet	BD Biosciences Miltenyi Biotech
Zentrifugen	Eppendorf Heraeus

2.3.5 Software

Tabelle 2.13: Software zur Akquisition und Auswertung von Daten

Software	Hersteller
BD FACSDiva v6	BD Biosciences
FlowJo v7.6	TreeStar
GraphPad PRISM 5	GraphPad Software
Mendeley Reference Manager	Mendeley
NanoDrop ND-1000 V3.5.2	Thermo Scientific
PLINK v1.07[227] http://pngu.mgh.harvard.edu/purcell/plink/	Shaun Purcell
SDS v2.4	Applied Biosystems

2.3.6 Puffer, Lösungen und Zellkulturmedien

FACS-Puffer
0,1% BSA
0,02% NaN_3
in 1x PBS

Zellseparationspuffer (MACS Puffer)
0,5% BSA
2 mM EDTA
in 1x PBS

Komplettmedium für die Kultur von murinen Lymphozyten
500 ml RPMI 1640 mit stabilem L-Glutamin
10% FCS
50 µM β-Mercaptoethanol
Penicillin/ Streptomycin 100 units/ml

Komplettmedium für die Kultur von humanen Lymphozyten
500 ml RPMI 1640 mit stabilem L-Glutamin
5% Humanes Serum
Penicillin/ Streptomycin 100 units/ml
Sterilfiltrieren

Medium zum Einfrieren humaner Zellen
50% RPMI1640
40% FCS
10% DMSO

Erythrozytenlysepuffer
0,15 M NH_4Cl
10 mM $KHCO_3$
0,1 mM Na_2EDTA
in ddH_2O
pH = 7,2 – 7,4

Kollagenase/ DNase-Lösung
1 mg/ml Kollagenase A
0,1 mg/ml DNaseI
in HBSS

Percoll Stammlösung (90%)
90 ml Percoll
10 ml 10x PBS

70%ige Percoll-Lösung
2,35 ml Percoll-Stammlösung
0,65 ml PBS

30%ige Percoll-Lösung
1,5 ml Percoll-Stammlösung
3 ml HBSS

5x Triton Lysepuffer

1,6 M Saccharose
5% Triton X-100 (v/v)
25 mM $MgCl_2$-$6H_2O$
60 mM Tris-HCl (pH 7,5)

1x Low TE Puffer

10 mM Tris-HCl (pH 7,5)
0,1 mM EDTA (pH 8,0)
Autoklavieren und bei 4 °C aufbewahren.

5x Proteinase K Puffer

0,375 M NaCl
0,12 M EDTA (pH 8,0)
Sterilfitrieren und bei 4 °C aufbewahren.

Gesättigte NaCl-Lösung

350,6 g NaCl
ad 1 l H_2O
Autoklavieren und bei 4 °C aufbewahren.

50x TAE-Puffer

2 M TRIS-Base
0,05 M EDTA
57,1 ml Eisessig
Auf 1 l mit ddH_2O auffüllen
pH 8,3
1x konzentriert für die Agarose-Gelelektrophorese einsetzen.

2.4 Methoden

2.4.1 Molekularbiologische Methoden

5–10 ml Vollblut oder 1 ml *buffy coat* wurden in ein 50 ml Falcon überführt. Das Blut wurde auf 40 ml mit 1x Triton Lysepuffer aufgefüllt, vorsichtig für 1 min gemischt und anschließend für 10 min bei 3000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde in 30 ml Triton Lysepuffer resuspendiert und erneut für 10 min bei 3000 rpm zentrifugiert. Wurde DNA aus *buffy coat* gewonnen, wurde auf diesen Schritt verzichtet. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 1120 µl dH_2O resuspendiert und mit 320 µl 5x Proteinase K Puffer, 60 µl Proteinase K (20 mg/ml) und 80 µl einer 20%igen SDS-Lösung versetzt. Die Proben wurden daraufhin über Nacht bei 37 °C oder für 2 - 4 Stunden bei 55 °C inkubiert und hin und wieder manuell gemischt. Das entstandene Lysat wurde in ein 15 ml Röhrchen überführt, mit 500 µl gesättigter NaCl-Lösung gemischt und 10 min bei 3800 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Röhrchen überführt und erneut für 10 min bei 3800 rpm zentrifugiert. Erneut wurde der Überstand in ein neues Röhrchen überführt und mit 1,8 ml Ethanol (reinst.) versetzt. Die Lösung wurde vorsichtig für maximal 2 min manuell gemischt, wodurch sich ein Präzipitat der DNA bildete, welches durch die folgende Zentrifugation (3000 rpm für 10 min bei 4 °C) pelletiert wurde. Der Überstand wurde verworfen und das DNA-Pellet erneut mit 70%igem Ethanol gewaschen (3000 rpm, 10 min, 4 °C). Nachdem der Überstand verworfen worden war, wurde das Pellet für etwa 5 min getrocknet, indem das Röhrchen auf Zellstoff auf den Kopf gestellt wurde. Abschließend wurde das DNA-Pellet in 100 µl 1x Low TE-Puffer aufgenommen und am NanoDrop Photometer die DNA-Konzentration bestimmt.

2.4.2 Genotypisierung humaner Individuen

Die Genotypisierung humaner Donoren hinsichtlich ihres *CD226*-Haplotyps erfolgte mithilfe des SNP Genotypisierungsassays der Firma Applied Biosystems nach Herstellerangaben. Es wurden die Kits zur Typisierung der SNPs rs763361 und rs727088 verwendet. 5–20 ng DNA von gesunden Donoren oder MS-Patienten wurden für die Reaktion eingesetzt. Die PCR-Reaktion sowie das Auslesen des Fluoreszenzsignals erfolgte mit einem 7900HT Fast Real-Time PCR System der Firma Applied Biosystems. Die Daten wurden mit der Software SDS2.4 analysiert.

2.4.3 Genotypisierung von transgenen Mauslinien

Kurz nach der Geburt wurden von den Nachkommen transgener Mauslinien Biopsien der Schwänze genommen und für die Genotypisierung mittels PCR eingesetzt. Dazu wurde zunächst das Biopsiegewebe durch Zugabe von 50 µl DNA QuickExtract und sechsminütige Inkubation bei 65 °C lysiert. Die Reaktion wurde durch eine Inkubation bei 98 °C für 2 min gestoppt. Dieses Lysat wurde direkt für nachfolgende PCR-Reaktionen eingesetzt.

Nach Abschluss der PCR-Reaktionen wurde die Größe der PCR-Produkte durch Agarose-Gelelektropherese bestimmt. Die Detektion der Banden im Gel erfolgte durch Zugabe des in die DNA interkalierenden Farbstoffes Roti-Safe Gelstain im Verhältnis von 3 µl auf 100 ml Agarose-Gel und anschließende Analyse unter UV-Licht.

Genotypisierung von CD226-defizienten Mauslinien

Zur Detektion des *Cd226*-Wildtyp- (WT), bzw. *Cd226*-Knock-Out-Allels (KO) wurden zwei unterschiedliche PCR-Reaktionen durchgeführt, wobei der in Vorwärtsrichtung bindende Primer für beide Reaktionen eingesetzt wurde und sich die in Rückwärtsrichtung bindenden Primer unterschieden (Tabelle 2.14).

Tabelle 2.14: Genotypisierungsprotokoll für CD226-defiziente Mauslinien

		1 x
H_2O		17,7 µl
DreamTaq Puffer (10x)		2,5 µl
dNTP-Mix (10 mM)		0,5 µl
Fwd Primer 18401 (10 µM)		1,0 µl
Rev Primer 18601 (10 µM)	**WT**	1,0 µl
Rev Primer 18646 (10 µM)	**KO**	
DreamTaq DNA Polymerase (5 U/µl)		0,3 µl
Zu testende DNA		2,0 µl
Σ		25 µl

PCR-Programm zur Amplifikation:

95 °C	10 min	
95 °C	30 s	40 Zyklen mit um 0,5 °C abnehmender *annealing*-Temperatur pro Zyklus
66 °C	1 min	
72 °C	30 s	
72 °C	10 min	
4 °C	∞	

Die Größe der PCR-Produkte wurde auf einem 3%igen Agarose-Gel analysiert. Die durch Amplifikation des *Cd226*-Wildtyp-Allels entstehende Bande hat eine Größe von 245 bp, während die Bande, die die Deletion eines Teils des *Cd226*-Gens anzeigt eine Größe von 200 bp aufweist.

Genotypisierung von CD155-defizienten Mauslinien

Zur Detektion des *Cd155*-Wildtyp- (WT), bzw. *Cd155*-Knock-Out-Allels (KO) wurden zwei unterschiedliche PCR-Reaktionen durchgeführt, wobei der in Vorwärtsrichtung bindende Primer für beide Reaktionen eingesetzt wurde und sich die in Rückwärtsrichtung bindenden Primer unterschieden (Tabelle 2.15).

Tabelle 2.15: Genotypisierungsprotokoll für CD155-defiziente Mauslinien

	1 x
H_2O	15,75 µl
Hot Start PCR Puffer (10x)	2,5 µl
$MgCl_2$ (25 mM)	2 µl
dNTP-Mix (10 mM)	0,5 µl
Fwd Primer 3sgt (10 µM)	1,0 µl
Rev Primer 35scrt (10 µM) **WT** Rev Primer P2as (10 µM) **KO**	1,0 µl
Maxima Hot Start Taq DNA Polymerase (5 U/µl)	0,25 µl
Zu testende DNA	2,0 µl
Σ	25 µl

PCR-Programm zur Amplifikation:

94 °C	5 min	
94 °C 63 °C 72 °C	30 s 40 s 45 s	20 Zyklen mit um 0,5 °C abnehmender *annealing*-Temperatur pro Zyklus
72 °C	5 min	
94 °C 57 °C 72 °C	30 s 40 s 45 s	15 Zyklen
72 °C	5 min	
4 °C	∞	

Die Größe der PCR-Produkte wurde auf einem 1,5%igen Agarose-Gel analysiert. Die durch Amplifikation des *Cd155*-Wildtyp-Allels entstehende Bande hat eine Größe von 440 bp, während die Bande, die die Deletion eines Teils des *Cd155*-Gens anzeigt, eine Größe von 600 bp aufweist.

Genotypisierung von 2D2-transgenen Mauslinien

Zur Detektion der Sequenz des 2D2-transgenen T-Zell-Rezeptors, die an einer unbekannten Stelle ins Genom integriert wurde, ist lediglich eine PCR-Reaktion nötig. Zusätzlich zur Amplifikation eines Teils der Sequenz des T-Zell-Rezeptors wird außerdem als interne Kontrolle der PCR ein Teil der β-Actin-Sequenz vervielfältigt. *(*Tabelle 2.16*).*

Tabelle 2.16: Genotypisierungsprotokoll für 2D2-transgene Mauslinien

		1 x
H_2O		16,7 µl
DreamTaq Puffer (10x)		2,5 µl
dNTP-Mix (10 mM)		0,5 µl
Primer 6711 tgfwd (10 µM)	**2D2**	1,0 µl
Primer 6712 tgrev (10 µM)	**2D2**	1,0 µl
Primer β-Actin fwd (10 µM)	**β-Actin**	1,0 µl
Primer β-Actin rev (10 µM)	**β-Actin**	1,0 µl
DreamTaq DNA Polymerase (5 U/µl)		0,3 µl
Zu testende DNA		2,0 µl
Σ		25 µl

PCR-Programm zur Amplifikation:

95 °C	3 min	
95 °C	30 s	40 Zyklen mit um 0,5 °C abnehmender *annealing*-Temperatur pro Zyklus
66 °C	1 min	
72 °C	1 min	
72 °C	10 min	
4 °C	∞	

Die Größe der PCR-Produkte wurde auf einem 3%igen Agarose-Gel analysiert. Die durch Amplifikation des Sequenz des transgenen T-Zell-Rezeptors entstehende Bande hat eine Größe von 675 bp, während die interne β-Actin-Kontrolle auf einer Höhe von 150 bp detektierbar ist.

2.4.4 Zellbiologische Methoden (Humane Zellen)

2.4.4.1 Isolation von mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC)

Humanes Blut oder Leukozytenkonzentrat wurde mit raumtemperiertem PBS im Verhältnis 1:2, bzw. 1:4 verdünnt und je 35 ml wurden auf 15 ml Lymphozyten Trennmedium (PAA) aufgeschichtet und zentrifugiert (2000 rpm, 30 min, RT, ohne Bremse). Die Interphase wurde abgenommen und durch Mischen mit kaltem PBS und erneuter Zentrifugation (1800 rpm, 10 min, 4 °C) wurden die Lymphozyten pelletiert. Dieser Waschschritt wurde noch zwei Mal mit kaltem PBS wiederholt (Zentrifugation bei 1500 rpm, 5 min, 4 °C). Anschließend wurde die Zellzahl mithilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Dazu wurden die Zellen entweder in Türks- oder in Trypanblau-Lösung verdünnt. Die so gewonnenen Zellen wurden direkt für Experimente eingesetzt oder für eine längere Aufbewahrung kryokonserviert.

2.4.4.2 Kryokonservierung humaner PBMCs

Zur langfristigen Lagerung humaner PBMCs in flüssigem Stickstoff wurden die Zellen zunächst doppelt konzentriert in sterilem Komplettmedium resuspendiert. Anschließend wurde das gleiche Volumen einer DMSO-haltigen Einfrierlösung tropfenweise zugegeben. Diese Zellsuspension wurde in Kryotubes aliquotiert und in einem „Mr. Frosty“ Kryo-Einfriergefäß, das eine schrittweise Abkühlung von ca. 1 °C pro Minute gewährleistet, in einen -80 °C kalten Tiefkühlschrank überführt. Nach 24 Stunden wurden die nun gefrorenen Zellen zur Langzeit-Aufbewahrung in einen Flüssigstickstoff-Tank einsortiert.

Zum Auftauen kryokonservierter Proben wurden diese in einem 37 °C warmen Wasserbad erwärmt, bis die Suspension beinahe vollständig aufgetaut war. Nun wurden tropfenweise 25 ml kaltes PBS hinzugegeben. Die Probe wurde zentrifugiert (1500 rpm, 5 min, 4 °C) und die Zellzahl sowie die Zellviabilität mithilfe einer Trypanblaufärbung bestimmt.

2.4.4.3 Isolierung von $CD4^+$ T-Zellen aus humanen PBMCs

$CD4^+$ T-Zellen wurden mithilfe der magnetisch aktivierten Zellsortierung (MACS) durch Negativselektion angereichert. Die Aufreinigung erfolgte mit dem BD IMag-System gemäß Herstellerangaben. PBMCs wurden mit einem Cocktail biotinylierter Antikörper behandelt, die gegen eine Reihe von Oberflächenantigenen gerichtet sind, die auf verschiedenen Zellpopulationen exprimiert werden, außer auf $CD4^+$ T-Zellen. Durch Zugabe von anti-Biotin-Microbeads wurden alle Nicht-$CD4^+$ T-Zellen magnetisch markiert. Diese Zellsuspension wurde einem starken Magnetfeld ausgesetzt, wodurch alle markierten Zellen an die Wand des Reaktionsgefäßes adhärierten und die unmarkierten $CD4^+$ T-Zellen in Lösung verblieben und vorsichtig abgenommen werden konnten. Die auf diese Art angereicherte Zelllösung bestand zu mehr als 95% aus $CD4^+$ T-Zellen, wie durch Durchflusszytometrie bestätigt wurde.

2.4.4.4 Stimulation von PBMCs

Kryokonservierte PBMCs aus Leukozytenkonzentraten wurden aufgetaut und die Zahl der lebenden Zellen wurde bestimmt. 1×10^6 Zellen wurden pro Vertiefung einer 96-*well* Flachboden-Zellkulturplatte in 200 µl Komplettmedium ausgesät und durch Zugabe von 1 µg/ml anti-CD3-Antikörper (Klon: OKT3) stimuliert. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten wurden die Zellen geerntet und für die Durchflusszytometrie mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gefärbt. Um tote Zellen von der Analyse auszuschließen wurde für jede Probe zusätzlich eine Lebend-Tot-Zellfärbung durchgeführt

2.4.4.5 Stimulation von $CD4^+$ T-Zellen

$CD4^+$ T-Zellen wurden aus den PBMCs von Leukozytenkonzentraten isoliert und gezählt. Anti-CD3-Antikörper (Klon: OKT3) wurde in einer Konzentration von 1 µg/ml in einem Volumen von 100 µl PBS an 96-*well* Flachbodenplatten für 3 Stunden bei 37 °C immobilisiert. Anschließend wurden die Platten dreimal mit 200 µl PBS gewaschen und 1×10^6 Zellen in 200 µl Komplettmedium pro Vertiefung hinzugegeben. Die Zellen wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten geerntet und für die durchflusszytometrische Analyse, inklusive Lebend-Tot-Zellfärbung gefärbt.

2.4.5 Zellbiologische Methoden (murine Zellen)

2.4.5.1 Isolierung von murinen Immunzellen

Milzen, Lymphknoten oder Thymi von Mäusen wurden unter sterilen Bedingungen durch ein 40 µm Zellsieb mit dem Stempel einer 2 ml Spritze gerieben. Die entstandene Zellsuspension wurde mit kaltem PBS gewaschen (1200 rpm, 7 min, 4 °C) und der Überstand verworfen. Im Falle von Milzzellen wurde anschließend 5 ml kalter Erythrozytenlysepuffer zugegeben und für 5 min auf Eis inkubiert. Die Lyse wurde durch Zugabe von 20 ml kaltem PBS gestoppt und die Suspension erneut zentrifugiert (1200 rpm, 7 min, 4 °C). Um restlichen Lysepuffer herauszuwaschen, wurde das Zellpellet erneut in PBS aufgenommen und die Zentrifugation wiederholt. Anschließend wurde ein Aliquot der Zellsuspension mit Trypanblau gefärbt und die Zellzahl in der Neubauer-Zählkammer bestimmt.

2.4.5.2 Aufreinigung distinkter Immunzellpopulationen

Für die Aufreinigung muriner $CD4^+$ T-Zellen wurde die Negativselektion mithilfe des MACS-Systems verwendet. Dazu wurden Kits der Firma Miltenyi Biotec gemäß Herstellerangaben verwendet. Zunächst wurden Einzelzellsuspensionen der Milz oder Lymphknoten hergestellt und mit biotinyliertem Antikörpercocktail behandelt, wodurch alle Zellen bis auf $CD4^+$ T-Zellen markiert wurden. Durch Zugabe von anti-Biotin-Microbeads wurden diese Nicht-$CD4^+$ T-Zellen magnetisch markiert. Im Falle des hier verwendeten MACS-Systems

werden mit Eisenpartikeln befüllte Säulen einem starken Magnetfeld ausgesetzt. Die Zellsuspension wurde über eine solche Säule gegeben, wodurch alle Nicht-$CD4^+$ T-Zellen an den Eisenpartikeln haften blieben und die $CD4^+$ T-Zellen mit dem Durchlauf aufgefangen werden konnten. Die auf diese Art angereicherte Zelllösung bestand zu mehr als 95% aus $CD4^+$ T-Zellen, wie durch Durchflusszytometrie bestätigt wurde.

Basierend auf dieser angereicherten Zelllösung wurden regulatorische T-Zellen isoliert. Dazu wurde die Suspension der $CD4^+$ T-Zellen zusätzlich mit einem CD25-PE Antikörper inkubiert, gefolgt von der Zugabe von anti-PE Microbeads, wodurch alle $CD25^+$ Zellen magnetisch markiert wurden. Die $CD25^+$-Fraktion korreliert in hohem Maße mit T-Zellen mit suppressiven Eigenschaften. Die so markierte Zellsuspension wurde wiederum über eine magnetisierte Säule aufgetrennt, wobei $CD25^-$ Zellen im Durchlauf aufgefangen wurden, während $CD25^+$-Zellen mithilfe eines Stempels von der Säule eluiert wurden. Die Säulenaufreinigung wurde einmal wiederholt, um die Reinheit der $CD25^+$ Fraktion zu erhöhen. Die finale Reinheit der beiden Populationen wurde durchflusszytometrisch bestimmt – sie entsprach bei der $CD25^-$-Fraktion mehr als 95%, während die $CD25^+$-Fraktion in der Regel eine Reinheit von 80–85% aufwies.

2.4.5.3 Stimulation von murinen Immunzellen

Murine Immunzellen wurden aus Milzen isoliert und gezählt. Anschließend wurden 1×10^6 Zellen pro Vertiefung von 96-*well* Flachbodenplatten oder bis zu 5×10^5 Zellen pro Vertiefung in 96-*well* Rundbodenplatten jeweils in 200 µl Komplettmedium ausgesät. Wildtyp-Milzzellen wurden entweder durch Zugabe von 1 µg/ml anti-CD3-Antikörper (Klon: 2C11) oder durch Zugabe von 1 µg/ml LPS stimuliert. Milzzellen 2D2-transgener Mäuse wurden mit 1 µg/ml MOG_{35-55} stimuliert. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten wurden die Zellen geerntet und mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern für die Durchflusszytometrie gefärbt.

2.4.5.4 Herstellung akzessorischer *Feeder*-Zellen

Die Milz einer naiven C57BL/6-Maus wurde präpariert, in eine Einzelzellsuspension überführt und die Erythrozyten lysiert. Anschließend wurden 30×10^6 Zellen abgenommen und in HBSS gewaschen (1200 rpm, 7 min, 4 °C). Das Zellpellet wurde in 900 µl HBSS resuspendiert und 100 µl LowTox Complement vom Kaninchen sowie 5 µl anti-CD90.2-Antikörper zugegeben. Die Suspension wurde für 30 min unter leichtem Schütteln bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von kaltem HBSS gestoppt und die Zellen pelletiert (1200 rpm, 7 min, 4 °C). Um die Proliferation der Zellen zu verhindern, wurden diese mit 40 Gy in einer ^{137}Cs-Quelle bestrahlt. Abschließend wurden die Zellen erneut mit HBSS gewaschen (1200 rpm, 7 min, 4 °C), die Zellzahl wurde mit einer Neubauer-Zählkammer bestimmt und die erfolgreiche Depletion der T-Zellen wurde durchflusszytometrisch bestätigt.

2.4.5.5 Suppressionsassay mit regulatorischen T-Zellen

Murine $CD25^+$ regulatorische T-Zellen und $CD25^-$ Effektor T-Zellen wurden mittels MACS aufgereinigt. Akzessorische *Feeder*-Zellen wurden mittels Komplement-Depletion und Bestrahlung hergestellt. Alle Zellen wurden auf eine Konzentration von 1×10^6 Zellen/ml in murinem Komplettmedium eingestellt. Es wurde eine serielle Verdünnungsreihe der regulatorischen T-Zellen hergestellt, durch den die Zellen 1:2, 1:4 und 1:8 in Komplettmedium verdünnt vorlagen. Der Assay wurde in Triplikaten durchgeführt. Dazu wurden in 96-*well* Rundbodenplatten pro Vertiefung 50 µl *Feeder*-Zellen vorgelegt. Hierzu wurden 50 µl $CD25^-$ Effektor T-Zellen hinzupipettiert. Anschließend wurden in Triplikaten jeweils 50 µl der vorverdünnten regulatorischen T-Zellen zugegeben. Zu zwei Triplikaten der Effektor T-Zellen wurden keine regulatorischen T-Zellen hinzugegeben, um die unsupprimierte Proliferation der T-Zellen aufzuzeichnen. Zur Stimulation der Zellen wurden pro Vertiefung 50 µl einer anti-CD3-Antikörperverdünnung zugegeben, so dass die Endkonzentration 0,25 µg/ml Antikörper entsprach. Ein Triplikat der Effektor T-Zellen blieb unstimuliert, um die Hintergrundproliferation der T-Zellen kontrollieren zu können. Die Zellen wurden für 3 Tage bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss daran wurde die Proliferation der Zellen mithilfe eines ^{3}H-Thymidin-Inkorporationsassays ermittelt.

Tabelle 2.17: Schematische Darstellung des Pipettierschemas eines T_{reg}-Suppressionsassays.

PBS	PBS	PBS	PBS	PBS
PBS	unstimuliert 0:1 T_{reg}:T_{eff}			PBS
PBS	stimuliert 0:1 T_{reg}:T_{eff}			PBS
PBS	stimuliert 1:1 T_{reg}:T_{eff}			PBS
PBS	stimuliert 0,5:1 T_{reg}:T_{eff}			PBS
PBS	stimuliert 0,25:1 T_{reg}:T_{eff}			PBS
PBS	stimuliert 0,125:1 T_{reg}:T_{eff}			PBS
PBS	PBS	PBS	PBS	PBS

2.4.5.6 ^{3}H-Thymidin-Inkorporationsassay

Der ^{3}H-Thymidin-Inkorporationsassay wurde verwendet, um die Proliferation von stimulierten Immunzellen zu analysieren. Dabei wird radioaktiv-markiertes Thymidin in die DNA proliferierender Zellen eingebaut und kann später durch Zugabe einer β-Szintillationsflüssigkeit quantifiziert werden. Immunzellen wurden stimuliert und 48 oder 72 Stunden später mit 1 µCi [Methyl-^{3}H]-Thymidin pro Vertiefung einer 96-*well* Rundbodenplatte gepulst. Nach 16 h Inkubation bei 37 °C wurden die Zellen mithilfe eines

Harvesters auf Filtermatten übertragen und dort durch 2 stündige Trocknung bei 60 °C immobilisiert. Die so konservierten Filtermatten wurden mit β-Szintillationsflüssigkeit getränkt und in Klarsichthüllen eingeschweißt. Die Aktivität des in die DNA eingelagerten ^{3}H-Thymidins wurde in einem β-Zähler als Zählereignis /min (cpm: *counts per minute*) quantifiziert.

2.4.5.7 T-Zell-Antigen-Restimulationsassay

Mäuse wurde mit einer Emulsion aus 200 µg MOG_{35-55} in komplettem Freund-Ajuvans mit 0,2 mg hitzeinaktivierten *M. tuberculosis* subkutan immunisiert, gefolgt von intravenösen Injektionen von je 100 ng Pertussis Toxin in PBS am Tag der Immunisierung und 48 Stunden später. Zum akuten Zeitpunkt der EAE wurden die Milzen präpariert, eine Einzelzellsuspension wurde daraus hergestellt und die Zellzahl bestimmt. 2×10^{5} Zellen wurden pro Vertiefung von 96-*well* Rundboden-Zellkulturplatten in 200 µl Komplettmedium ausgesät und durch Zugabe von 1 µg/ml MOG_{35-55} oder 10 µg/ml MOG_{35-55} stimuliert. Als Positivkontrolle der Proliferation dienten Zellen, die mit 0,2 µg/ml anti-CD3-Antikörper (Klon 2C11) stimuliert wurden. Als Negativkontrolle wurden ebenfalls Zellen ausgesät, die nicht stimuliert wurden. Für alle Bedingungen wurden Triplikate ausgesät. 48 Stunden später wurde die Proliferation der Zellen mithilfe eines ^{3}H-Thymidin-Inkorporationsassays bestimmt.

2.4.5.8 Isolierung ZNS-infiltrierender Immunzellen

C57BL/6-Mäuse, die akut an EAE erkrankt waren, wurden durch CO_2-Inhalation getötet und sofort transkardial mit eiskaltem PBS perfundiert. Gehirn und Rückenmark wurden entnommen, mit einem Skalpell zerkleinert und in Kollagenase/ DNaseI-Lösung für 60 min bei 37 °C im Wasserbad geschüttelt. Das Gewebe wurde mithilfe eines Stempels durch ein 40 µm Zellsieb gerieben und dadurch homogenisiert. Die Suspension wurde auf 50 ml mit kaltem PBS aufgefüllt und zentrifugiert (1200 rpm, 10 min, 4 °C). Der Überstand wurde verworfen und das Homogenat erneut mit kaltem PBS gewaschen. Um Myelin und Neurone abzutrennen und spezifisch Immunzellen anzureichern, wurde eine Percoll-basierte Gradientenzentrifugation durchgeführt. Dazu wurde das Homogenat mit 4 ml 30%igem isotonischen Percoll gemischt und in ein neues 15 ml Falcon Röhrchen überführt. Darin wurde es vorsichtig unter Zuhilfenahme einer Pasteurpipette mit 2 ml 78%igem isotonischen Percoll unterschichtet. Die Auftrennung der Phasen geschah durch Zentrifugation bei 2500 rpm für 30 min bei 4 °C ohne Bremse. Die Immunzellen bildeten die Interphase des Gradienten. Sie wurden vorsichtig abgenommen, in einem neuen 15 ml Falcon gründlich mit kaltem PBS gemischt und für 10 min bei 1800 rpm und 4 °C pelletiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet wurde erneut mit PBS gewaschen (1500 rpm, 5 min, 4 °C) und die Zellen in 1 ml PBS für Folgeexperimente eingesetzt.

2.4.5.9 Differenzierung und Stimulation von dendritischen Zellen aus Knochenmarksvorläuferzellen (BMDC)

So genannte *bone marrow derived dendritic cells* (BMDC) wurden *in vitro* aus Knochenmarksvorläuferzellen differenziert. Dazu wurden Mäuse durch CO_2-Inhalation getötet und die Tibia und der Femur der beiden Hinterbeine präpariert und von Haut und Muskelgewebe weitgehend befreit ohne die Knochen selbst zu verletzen. Anschließend wurden die Knochen für 5 min in 70%igem Ethanol desinfiziert und unter sterilem PBS von letzten Muskel- und Sehnenresten befreit. Tibia und Femur wurden am Kniegelenk voneinander getrennt und beide Enden der Knochen vorsichtig abgeschnitten. Das nun offenliegende Knochenmark wurde mit kaltem HBSS unter Zuhilfenahme einer Spritze mit einer 23 G-Kanüle aus den Knochen herausgespült. Die Knochenmarkszellen wurden in kaltem HBSS vereinigt, durch auf- und abpipettieren homogenisiert und durch Zentrifugation pelletiert (1200 rpm, 10 min, 4 °C). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 1 ml Erythrozytenlysepuffer resuspendiert. Nach 5 minütiger Inkubation auf Eis wurde die Lyse durch Zugabe von 5 ml kaltem PBS gestoppt und die Zellen erneut durch Zentrifugation pelletiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Zellpellet in kaltem PBS resuspendiert und die Zellzahl bestimmt. Anschließend wurden 2×10^7 Zellen in 20 ml vorgewärmtem Komplettmedium mit 5 ng/ml GM-CSF aufgenommen und in 75 cm^2 Zellkulturflaschen liegend kultiviert.

Nach zwei Tagen wurden 20 ml Komplettmedium mit 5 ng/ml GM-CSF hinzugegeben. Nach weiteren zwei Tagen erfolgte ein Mediumwechsel, bei dem vorsichtig das alte Medium abgesogen und durch 40 ml frisches Komplettmedium mit 5 ng/ml GM-CSF ersetzt wurde. Nicht-adhärente Zellen können bei diesem Vorgang mit abgesogen werden, da die dendritischen Zellen zu diesem Zeitpunkt bereits eine ausreichend hohe Adhärenz aufweisen, so dass sie auf diese Weise von nicht-adhärenten Zellpopulationen abgetrennt werden können. Nach weiteren zwei Tagen konnten die Zellen für Folgeanalysen verwendet werden.

Dazu wurde das Medium vorsichtig abgesogen, der Zellrasen vorsichtig zweimal mit warmem PBS gewaschen und 10 ml Accutase hinzugegeben. Nach ca. 20 Minuten konnte der Zellrasen durch Auf- und Abpipettieren vom Boden der Flasche gelöst werden. Die Zellzahl wurde bestimmt und 5×10^5 Zellen pro Vertiefung von 12-*well*-Zellkulturplatten in 2 ml Komplettmedium ausgesät. Durch Zugabe von 1 µg/ml LPS, 100 µg/ml hitzeinaktivierten *M. tuberculosis* oder einer Mischung maturierender Zytokine[228] (MAT: 2 ng/ml IL-1β, 10 ng/ml IL-6, 10 ng/ml TNF-α und 1 µg/ml PGE-2) wurden die Zellen stimuliert. 24 Stunden später wurden die Zellen geerntet und für die Durchflusszytometrie mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gefärbt.

2.4.6 Durchflusszytometrie

2.4.6.1 Färbung von Oberflächenantigenen mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern

Die Färbung der Zellen erfolgte in 5 ml FACS-Röhrchen. 2×10^5 bis 2×10^6 Zellen wurden in FACS-Röhrchen gegeben, mit 2 ml FACS-Puffer aufgefüllt und pelletiert (1500 rpm, 5 min – Standardeinstellung für alle Zentrifugationsschritte während einer FACS-Färbung). Der Überstand wurde verworfen und 50 µl eines entsprechend vorbereiteten Antikörpercocktails hinzugegeben. Dieser Cocktail enthielt neben den fluoreszenzmarkierten Antikörpern in geeigneter Konzentration ebenfalls einen unmarkierten, blockierenden Antikörper gegen CD16 und CD32 (Maus) oder humanes IgG, um unspezifische Bindung der Antikörper an Zellen zu inhibieren. Die Färbung wurde 30 min bei 4 °C im Dunkeln inkubiert, die Reaktion wurde durch Zugabe von 2 ml FACS-Puffer gestoppt und die Zellen erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Zellen in 300 µl FACS-Puffer resuspendiert und am LSRII FACS-Gerät der Firma BD analysiert.

2.4.6.2 Lebend-/ Totzellfärbung

Um lebende von toten Zellen unterscheiden zu können, wurden tote Zellen mithilfe des *LIVE/DEAD Fixable Dead Cell Stain Kit* der Firma Invitrogen nach Herstellerangaben angefärbt. Die Zellen wurden mit 2 ml kaltem PBS gewaschen und anschließend mit 150 µl einer 1:1000 in PBS verdünnten Lösung des Reagenzes gemischt. Nach einer 30 minütigen Inkubationszeit wurden die Zellen erneut mit 2 ml kaltem PBS gewaschen und anschließend mit Antikörpern gegen Oberflächenantigene gefärbt.

2.4.6.3 Zellzahlbestimung mit *TruCount*®-Röhrchen

100 µl der aus dem ZNS isolierten Zellen, entsprechend genau 1/10 des Gesamtvolumens von 1 ml, wurden in *TruCount* Röhrchen der Firma BD überführt. Diese enthalten eine definierte Anzahl an Partikeln, welche durchflusszytometrisch quantifiziert werden können und so eine genaue Aussage über die gemessene Anzahl Beads bzw. Zellen zulassen. Es wurde 1 µl des anti-CD45-APC-Cy7-Antikörpers hinzugegeben, gemischt und für 20 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden 200 µl FACS-Puffer zugegeben und direkt am LSRII gemessen. Für die Auswertung wurde auf $CD45^+$-Zellen gegatet. Die Gesamtzellzahl einer Lösung mit definiertem Volumen berechnet sich dann nach der folgenden Formel:

$$\text{Gesamtzahl CD45}^+ = \frac{Gesamtzahl\ Beads}{Gemessene\ Anzahl\ Beads} \times Gemessene\ Anzahl\ CD45^+ \times Verdünnungsfaktor$$

2.4.6.4 Färbung von intrazellulären Antigenen

Foxp3

Der kernständige Transkriptionsfaktor Foxp3 wurde mithilfe des Foxp3/ *Transcription Factor Staining Buffer* Set der Firma eBioscience gefärbt. Dazu wurden zunächst die Oberflächenantigene gefärbt. Anschließend wurden die Zellen in 500 µl Fixierungslösung aufgenommen, die zu einem Teil aus Fixations-Lösung und drei Teilen Diluent-Lösung frisch angesetzt wurde und für 30 min bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Die Fixierung wurde durch Zugabe von 2 ml Permeabilisationspuffer (Maus) bzw 2 ml FACS-Puffer (Human) gestoppt und die Zellen zentrifugiert. Nachdem der Überstand verworfen worden war, wurde der fluoreszenzmarkierte Foxp3-Antikörper in 50 µl Permeabilisationspuffer vorverdünnt auf die Zellen gegeben (Maus) oder 2 µl des unverdünnten Antikörpers direkt ins Residualvolumen zugegeben (Human). Nach 30 min Inkubation bei 4 °C im Dunkeln wurden die Zellen pelletiert und in 300 µl FACS-Puffer am LSRII analysiert.

Intrazelluläre Zytokinfärbung von T-Zellen

Zellen wurden mit 100 ng/ml PMA und 2 µg/ml Ionomycin für 6 Stunden bei 37 °C stimuliert. Nach 3 Stunden wurde für die verbliebene Inkubationszeit 1:500 Brefeldin A hinzugegeben, um die Sekretion der Zytokine zu inhibieren. Nach der Inkubation wurden die Zellen mit kaltem FACS-Puffer gewaschen und es wurden zunächst die entsprechenden Oberflächenantigene gefärbt. Anschließend wurden die Zellen in 100 µl *Fixation Buffer* der Firma BioLegend aufgenommen und für 20 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal in 1 ml *Permeabilization Wash Buffer* gewaschen. Die zytokinspezifischen Antikörper wurden in 50 µl *Permeabilization Wash Buffer* verdünnt zu den Zellen hinzugegeben und für 30 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Nachdem die Reaktion mit 1 ml *Permeabilization Wash Buffer* gestoppt und die Zellen zentrifugiert worden waren, wurden diese in 300 µl FACS-Puffer am LSRII gemessen.

2.4.7 EAE

2.4.7.1 Aktive Immunisierung

Um eine EAE in suszeptiblen Mauslinien auszulösen, erfolgt eine Injektion einer Emulsion aus einem T-Zell-Epitop des Myelin-Oligodendrozyten Glykoproteins (MOG_{35-55}) in komplettem Freund-Adjuvans (KFA) subkutan an zwei Seiten der Flanken der Mäuse, gefolgt von zwei intravenösen Injektionen des Pertussis Toxins (PTx), die am Tag der subkutanen Injektionen erfolgt und zwei Tage später ebenfalls intravenös wiederholt wird. In der vorliegenden Arbeit wurde zwischen einem vollen und einem reduzierten Immunisierungsprotokoll unterschieden. Die Unterschiede dieser beiden Protokolle wurden in Tabelle 2.18 zusammengefasst.

Tabelle 2.18: Vergleich der Immunisierungsprotokolle zur Induktion einer EAE. Die Angaben entsprechen der Dosierung pro Maus.

	MOG_{35-55} in 50 µl PBS	Hitzeinaktivierte *M. tuberculosis* Bakterien	Volumen KFA	Gesamt-volumen Emulsion	Pertussis Toxin pro Injektion
Volle Immunisierung	100 µg	0,2 mg	50 µl	100 µl	200 ng
Reduzierte Immunisierung	100 µg	0,1 mg	50 µl	100 µl	100 ng

Etwa 7 Tage nach der Immunisierung beginnen die Mäuse eine EAE-Symptomatik zu entwickeln, welche durch eine aszendierende Parese gekennzeichnet ist. Zunächst kommt es zu Lähmungserscheinungen des Schwanzes, die über die Parese der Hinterläufe letztendlich in der Plegie beider Hinterextremitäten mündet (Tabelle 2.19). Sollte die Parese ebenfalls auf die Vorderextremitäten übergreifen, wie es bei fulminanten Verläufen der EAE manchmal beobachtet wird, müssen die Mäuse tierschutzkonform durch CO_2-Inhalation getötet werden.

Tabelle 2.19: Schema der Beurteilung der EAE-Symptomatik

Score	EAE-Symptome
0	Keine
1	Plegie des Schwanzes
2	Parese der Hinterläufe
3	Plegie der Hinterläufe
4	Plegie der Hinterläufe und Parese der Vorderläufe
5	Moribund, tot.

Parallel zu den Lähmungserscheinungen und der zunehmenden Bewegungseinschränkung der Mäuse kommt es zu einem nicht unerheblichen Gewichtsverlust der Mäuse. Da die Mäuse in ihrer Fähigkeit Futter selbständig aufzunehmen mit steigender Behinderung zunehmend eingeschränkt sind, wird ihnen täglich Weichfutter gereicht.

2.4.7.2 Passive Immunisierung

Neben der aktiven Immunisierung durch Injektion von Myelinantigenen in KFA kann eine EAE auch durch den Transfer enzephalitogener T-Zellen erfolgen. In der vorliegenden Arbeit wurde dazu ein Modell verwendet, in dem T-Zellen mit einem MOG_{35-55}-spezifischen T-Zell-Rezeptor, dem so genannten 2D2 T-Zell-Rezeptor, *in vitro* voraktiviert wurden und die resultierenden T-Zell-Blasten in naive C57BL/6-Mäuse injiziert wurden.

Dazu wurden 2D2-transgene Mäuse durch CO_2-Inhalation getötet, die Milzen und Lymphknoten wurden präpariert, vereinigt und homogenisiert. Anschließend wurden die Erythrozyten lysiert (siehe 2.4.5.1) und die Zellzahl bestimmt. Die Zellen wurden auf eine Konzentration von 4×10^6 Zellen/ml in Komplettmedium mit 20 µg/ml MOG_{35-55}, 5 ng/ml IL-2 und 5 ng/ml IL-7 eingestellt und 1 ml wurde pro Vertiefung von 12-*well* Zellkulturplatten ausgesät. Nach 48 stündiger Inkubation bei 37 °C wurden die Zellen geerntet und mit warmem PBS gewaschen (Zentrifugation: 1200 rpm, 10 min, RT). Der Überstand wurde verworfen und die Zellzahl bestimmt. Anschließend wurde eine Zellkonzentration von 1×10^6 Zellen/ml in Komplettmedium mit 5 ng/ml IL-2 und 5 ng/ml IL-7 eingestellt und wiederum 1 ml pro Vertiefung von 12-*well* Zellkulturplatten ausgesät. Nach viertägiger Inkubation wurden 1 µg/ml anti-CD3-Antikörper (Klon OKT3) und 1 µg/ml anti-CD28-Antikörper (Klon 37.51) in PBS an die Vertiefungen neuer 12-*well* Zellkulturplatten immobilisiert (3 Stunden, 37 °C). Die Zellen wurden geerntet. Nach einem Waschschritt mit warmem PBS (Zentrifugation: 1200 rpm, 10 min, RT) wurde die Zellzahl bestimmt und wiederum auf 1×10^6 Zellen/ml in Komplettmedium eingestellt. Außerdem wurde der Zellsuspension 20 ng/ml IL-12 und 25 ng/ml IL-18 hinzugegeben. Die Platten mit den immobilisierten Antikörpern wurden zweimal mit PBS gespült, um nichtgebundenen Antikörper zu entfernen. Anschließend wurde 1 ml der Zellsuspension pro Vertiefung verteilt und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Die restimulierten T-Zell-Blasten wurden von den Platten gründlich abgespült. Durch zweimaliges Waschen mit warmem PBS wurden lösliche Zytokine und Zelldebris entfernt. Die Zellen wurden in warmem PBS resuspendiert und gezählt. Abschließend wurden $1\text{-}2\times10^6$ Zellblasten in einem Volumen von 200 µl PBS pro Maus intraperitoneal injiziert. Außerdem wurde den Mäusen 67 ng Pertussis Toxin 100 µl PBS intravenös injiziert. Die Behandlung mit Pertussis Toxin wurde 48 Stunden später wiederholt.

Als Empfängertiere dienten naive C57BL/6-Mäuse oder naive Mäuse der unterschiedlichen *Cd226*- oder *Cd155*-Genotypen. Etwa 5-10 Tage nach dem Transfer der Zellen entwickelten die Mäuse eine EAE-Symptomatik, die täglich nach dem Schema in Tabelle 2.19 begutachtet wurde.

2.4.7.3 Adoptiver Transfer mit T_{reg}-Zell-Vorkultur

Um den Einfluss von T_{reg}-Zellen unterschiedlicher Genotypen auf die Entwicklung einer EAE untersuchen zu können, wurde die *in vitro* Vorkultur der passiven Immunisierung entsprechend erweitert.

Zunächst wurden die Milzen und Lymphknoten von Mäusen der entsprechenden 2D2-transgenen *Cd226*-Genotypen präpariert und mithilfe des Protokolls zur Isolierung distinkter Immunzellpopulationen (siehe 2.4.5.2) wurden $CD4^+CD25^+$ T_{reg}-Zellen und $CD4^+CD25^-$ T_{eff}-Zellen voneinander separiert. Außerdem wurden Milzzellen naiver Wildtyp-Mäuse ohne vorhergehende Depletion der T-Zellen mit 40 Gy in einer ^{137}Cs-Quelle bestrahlt, anschließend mit PBS gewaschen (1200 rpm, 10 min, 4 °C), gezählt und später als akzessorische *feeder*-Zellen eingesetzt. Diese drei Zellpopulationen wurden anschließend in einem definierten Verhältnis von 1 Teil $CD4^+CD25^-$ T_{eff}-Zellen : 0,125 Teile $CD4^+CD25^+$ T_{reg}-Zellen : 4 Teile akzessorische *feeder*-Zellen gemischt und wie im vorangegangenen Kapitel beschrieben für die Vorkultur des adoptiven Transfers eingesetzt. Lediglich der Zeitraum der initialen Stimulation mit MOG_{35-55}-Peptid wurde von zwei Tagen auf drei Tage verlängert. Außerdem wurde in allen Experimenten eine definierte Zellzahl von 1×10^6 Zellblasten pro Maus injiziert.

2.4.8 Statistische Analyse

Die Assoziation der untersuchten SNP-Varianten rs763361 und rs727088 des *CD226*-Gens wurden mithilfe des Programms PLINK im Hinblick auf die *minor allele frequency*, das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht, die Analyse des Kopplungsungleichgewichts, die Assoziation der einzelnen Genotypen sowie der unterschiedlichen Haplotypen analysiert.

Die Normalverteilung der Messpunkte wurde mithilfe des Kolmogorov-Smirnov-Test überprüft. Bei Normalverteilung wurden folgende Analysen durchgeführt: Der *two-tailed student's t-test* wurde für den statistischen Vergleich von zwei unabhängigen Gruppen verwendet. Zur Veranschaulichung von Genotyp-Phänotyp-Korrelationen wurden lineare Regressionsanalysen durchgeführt, wobei von einem linearen Zusammenhang zwischen Genotyp und Phänotyp ausgegangen wurde. Multiple Varianzanalysen wurden mittels *one*- oder *two-way*-ANOVA und anschließendem Bonferroni Post-hoc-Test vorgenommen. Im Falle von nicht-normalverteilten Stichproben wurde entweder der Mann-Whitney-Test zum Vergleich von zwei unabhängigen Gruppen verwendet oder im Falle der multiplen Varianzanalyse der Kruskal-Wallis-Test mit Dunn's Post-hoc-Test. Die Analyse der Überlebensrate von Mäusen im Verlauf der EAE erfolgte mit dem Mantel-Cox-Test. Alle statistischen Analysen wurden mithilfe der Software GraphPad PRISM 5 durchgeführt. Ab einem *P*-Wert von < 0,05 wurde ein statistisch signifikanter Unterschied angenommen, der durch ein Asterisk symbolisiert wurde. Zwei Asteriske symbolisierten einen *P*-Wert von < 0,01. Drei Asteriske entsprachen einem *P*-Wert von < 0,001. Für *P*-Werte < 0,01 wurde von einem hochsignifikanten Unterschied ausgegangen.

3 Ergebnisse

In mehreren Assoziationsstudien wurde ein Einzelnukleotidpolymorphismus im Gen, welches für das Molekül CD226 codiert, mit einem erhöhten Risiko für Autoimmunerkrankungen assoziiert. Um die funktionelle Relevanz dieses Polymorphismus für die Pathogenese der Multiplen Sklerose zu untersuchen, wurde zunächst die Oberflächenexpression des CD226-Moleküls auf humanen PBMCs analysiert. Darüber hinaus wurden gesunde Individuen sowie MS-Patienten für zwei SNP-Varianten von *CD226* genotypisiert und die CD226-Expression mit diesem Genotyp korreliert. Im Mausmodell der MS, der EAE, wurde der Frage nachgegangen, welchen Effekt eine Defizienz des CD226-Moleküls auf den Verlauf einer autoimmunen Entzündung des ZNS hat und auf welche Zellpopulation sich eine CD226-Defizienz im besonderen Maße auswirkt. Abschließend wurde der Ligand CD155 hinsichtlich seines Expressionsprofils sowie seines Einflusses auf den Verlauf der EAE untersucht.

3.1 Charakterisierung der CD226-Expression auf humanen T-Zellen

Um die funktionelle Relevanz des Polymorphismus im *CD226*-Gen für die Pathogenese der Autoimmunerkrankung MS zu untersuchen, wurde zunächst damit begonnen die CD226-Expression auf der Oberfläche unterschiedlicher Immunzellpopulationen durchflusszytometrisch zu quantifizieren und mit dem Genotyp gesunder Individuen und MS-Patienten zu korrelieren. Anschließend wurde die Veränderung der CD226-Expression im Verlauf einer T-Zell-Stimulation analysiert, wobei wiederum ein besonderes Augenmerk auf genotypspezifische Unterschiede gelegt wurde.

3.1.1 CD226 ist auf humanen T- und NK-Zellpopulationen exprimiert

Die Oberflächenexpression des CD226-Moleküls wurde auf humanen PBMCs untersucht. Dazu wurde das Blut gesunder Individuen mit Fluoreszenzfarbstoff-markierten Antikörpern gefärbt, die Erythrozyten wurden lysiert und verschiedene Lymphozytenpopulationen hinsichtlich ihrer CD226-Antikörper bindenden Eigenschaften im Durchflusszytometer analysiert.

Für die Analyse wurde zunächst zwischen CD56-exprimierenden NK-Zellen und anderen Lymphozyten unterschieden und anschließend zwischen $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen differenziert (Abbildung 3.1 A). Innerhalb der $CD4^+$ T-Zellen ließen sich durch intrazelluläre Färbung des Transkriptionsfaktors Foxp3 außerdem regulatorische T-Zellen identifizieren.

CD4$^+$ T-Zellen zeigten ein heterogenes CD226-Expressionsmuster, wobei sich im Speziellen zwei Populationen unterscheiden ließen: Zum einen Zellen mit einer hohen CD226-Expression (CD226^{high}) sowie Zellen mit einer niedrigen Expression (CD226^{low}, Abbildung 3.1 B). Bei näherer Untersuchung der beiden Subpopulationen hinsichtlich ihres Maturierungsstatus zeigte sich, dass CD226^{low}-Zellen vornehmlich einen CD45RA$^+$CCR7$^+$-Phänotyp aufwiesen, der typisch für naive T-Zellen ist. CD226^{high} Zellen umfassten hingegen einen großen Anteil CD45RA$^-$-Zellen, welches ein Merkmal von Gedächtniszellen darstellt (Abbildung 3.1 B).

Bei näherer Betrachtung des CD226-Expressionsniveaus von naiven und Gedächtnis-T-Zellen zeigte sich, dass Gedächtnis-T-Zellen eine konstitutiv hohe CD226-Expression aufwiesen, während man bei naiven T-Zellen zwischen Populationen mit geringer und hoher CD226-Expression unterscheiden konnte (Abbildung 3.1 C).

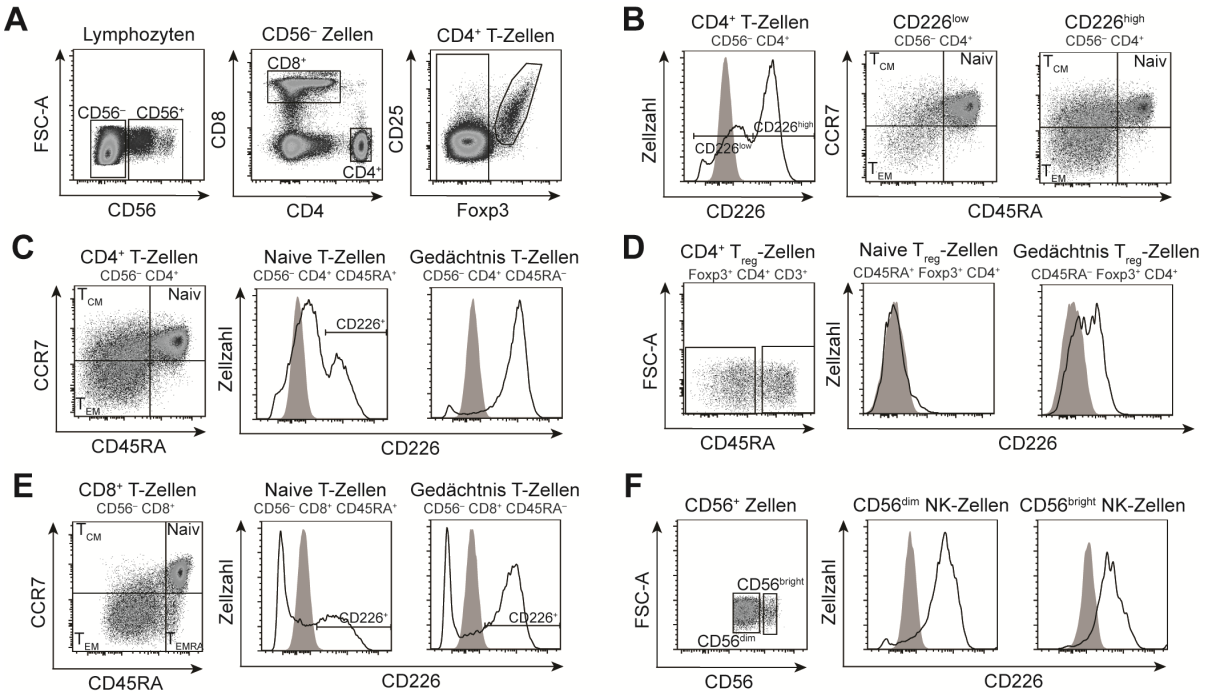


Abbildung 3.1: Oberflächenexpression des CD226-Moleküls auf humanen Lymphozyten. Blutzellen (A-C, E, F) oder kryokonservierte PBMCs (D) wurden mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. (A) Schema zur Unterscheidung der Immunzellpopulationen anhand der Marker CD56, CD4, CD8, CD25 und Foxp3. (B) CD226-Expression von CD4$^+$ T-Zellen und Analyse des Gedächtnis-Zell-Phänotyps von CD226^{low} und CD226^{high}-Zellen: CD45RA$^-$CCR7$^-$: Effektor-Gedächtnis-Zellen (T_{EM}); CD45RA$^-$CCR7$^+$: Zentrale Gedächtnis-Zellen (T_{CM}); CD45RA$^+$CCR7$^+$: Naive Zellen (Naiv). (C) Analyse der CD226-Expression auf CD4$^+$ Gedächtnis- (CD45RA$^-$) und naiven Zellen (CD45RA$^+$). (D) CD226-Expression von naiven (CD45RA$^+$) und Gedächtnis-(CD45RA$^-$) CD4$^+$CD25^{high}Foxp3$^+$ T-Zellen. (E) CD226-Expression von CD8$^+$ T-Zellen: CD45RA$^-$CCR7$^-$: Effektor-Gedächtnis-Zellen (T_{EM}); CD45RA$^-$CCR7$^+$: Zentrale Gedächtnis-Zellen (T_{CM}); CD45RA$^+$CCR7$^+$: Naive Zellen (Naiv); CD45RA$^+$CCR7$^-$: CD45RA$^+$ Effektor-Gedächtnis-Zellen (T_{EMRA}). CD226-Expression auf naiven CD8$^+$ T-Zellen (CD45RA$^+$CCR7$^+$) und CD8$^+$ Gedächtnis-T-Zellen (CD45RA$^-$). (F) Unterteilung der CD56$^+$ NK-Zellen in CD56^{dim} und CD56^{bright}-Zellen und Analyse der CD226-Expression.

Im Gegensatz zu $CD4^+$ T-Effektorzellen wiesen $Foxp3^+CD4^+$ regulatorische T-Zellen ein konstitutiv niedriges CD226-Expressionsniveau auf. Die CD226-Expression naiver $CD45RA^+$ T_{reg}-Zellen war dabei unwesentlich erhöht im Vergleich zur Isotypkontrollfärbung, während $CD45RA^-$ Gedächtnis-T_{reg}-Zellen eine niedrige CD226-Expression aufwiesen (Abbildung 3.1 D).

Auch $CD8^+$ T-Zellen waren durch ein heterogenes CD226-Expressionsprofil gekennzeichnet. Hier konnte zwischen zwei Populationen unterschieden werden: Eine Population wies keine CD226-Oberflächenexpression auf, während die andere CD226 exprimierte. Jedoch ließ sich diesen beiden Populationen kein eindeutiger Gedächtnis-Zell-Phänotyp zuweisen, da sowohl naive, als auch Gedächtnis-T-Zellen eine $CD226^-$-oder $CD226^+$-Expression besaßen (Abbildung 3.1 E).

NK-Zellen, welche durch die Expression des Markers CD56 von anderen Lymphozyten-Populationen unterschieden wurden, besaßen eine konstitutive CD226-Expression. Bei näherer Betrachtung zweier Subpopulationen der NK-Zellen, den so genannten $CD56^{bright}$ und $CD56^{dim}$-Zellen zeigte sich, dass die als inflammatorisch bezeichneten $CD56^{dim}$-Zellen ein höheres CD226-Expressionsniveau aufwiesen, als die $CD56^{bright}$-Zellen, denen ein eher regulatorisches Funktionsspektrum zugeschrieben wird (Abbildung 3.1 F).

3.1.2 Genotypisierung gesunder Individuen und MS-Patienten für SNP-Varianten von *CD226*

Die CD226-Expression sollte im nächsten Schritt mit dem *CD226*-Genotyp korreliert werden. Im Bereich des *CD226*-Gens wurden mehrere SNPs beschrieben, die jedoch im Kopplungsungleichgewicht vorliegen und damit in etwa 95% der Individuen gemeinsam vererbt werden[39]. Da bis heute nicht bekannt ist, welcher SNP die kausale Ursache der beobachteten Effekte und des erhöhten Risikos für Autoimmunerkrankungen darstellt, wurde die DNA der Individuen für zwei unterschiedliche SNPs innerhalb der Region des CD226-Gens genotypisiert. Hierbei handelte es sich um die SNPs rs763361 und rs727088.

Die Analyse des Hardy-Weinberg-Gleichgewichts (HWG) bestätigte, dass keiner der untersuchten SNPs in einer der beiden genotypisierten Kohorten das HWG verletzte (P > 0,01; Tabelle 3.1). Beide SNPs erfüllten damit die formalen Voraussetzungen, um in darauf aufbauende Analysen integriert zu werden[229].

Auf der Ebene der Genotypen war kein Trend hinsichtlich einer Assoziation eines bestimmten Genotyps mit MS abzulesen (Tabelle 3.2). Bei Betrachtung einer möglichen Assoziation auf Allelebene hingegen, zeichnete sich ein Trend hin zu einer Prädisposition für Träger des $rs763361^T$ (P = 0,175), bzw. $rs727088^G$ (P = 0,068) -Allels ab (Tabelle 3.3). Dieses Ergebnis deckt sich mit der in mehreren Studien postulierten Prädisposition für Autoimmunerkrankungen durch die SNP-Variante $rs763361^T$.

Tabelle 3.1: Ausgewählte SNPs des *CD226*-Gens. Die *minor allele frequency* (MAF) und der *P*-Wert des Hardy-Weinberg-Gleichgewichts (HWG) wurden mit dem Programm PLINK berechnet.

SNP	Assoziation		Position	Minor/Major Allel	MAF	HWG *P*-Wert
rs763361	Protektiv: Risiko:	C T	18: 67531642	T / C	0,4938	0,7002
rs727088	Protektiv: Risiko:	A G	18: 67530439	A / G	0,5	0,6991

Tabelle 3.2: Genotypverteilung in 119 MS-Patienten und 125 gesunden Individuen. Der *P*-Wert eines Tests zur Bestimmung der genotypischen Assoziation (*genotypic association*) wurde mit dem Programm PLINK berechnet.

SNP	Genotyp	Anzahl in MS-Patienten	Anzahl in gesunden Individuen	Frequenz in MS-Patienten	Frequenz in gesunden Individuen	*P*-Wert
rs763361	C/C	26	39	0,22	0,31	
	C/T	61	57	0,51	0,46	
	T/T	32	29	0,27	0,23	0,297
rs727088	A/A	25	38*	0,21	0,31	
	A/G	59	58	0,5	0,47	
	G/G	35	27	0,29	0,22	0,189

* Für zwei gesunde Individuen ergab die Genotypisierung für rs727088 kein eindeutiges Ergebnis, sie wurden von der Analyse ausgeschlossen.

Tabelle 3.3: Allelverteilung in 119 MS-Patienten und 125 gesunden Individuen. Der *P*-Wert und das *Odds Ratio* (OR) eines Tests der Assoziation auf Allelebene (*allelic association*) wurden mit dem Programm PLINK berechnet.

SNP	Allel	Anzahl in MS-Patienten	Anzahl in gesunden Individuen	Frequenz in MS-Patienten	Frequenz in gesunden Individuen	*P*-Wert	OR
rs763361	C	87	96	0,48	0,54		
	T	93	86	0,52	0,46	0,175	1,279
rs727088	A	84	96	0,46	0,54		
	G	94	85	0,54	0,46	0,068	1,395

Tabelle 3.4: Haplotypverteilung in MS-Patienten und gesunden Individuen.

	Haplotyp	Anzahl in MS-Patienten	Anzahl in gesunden Individuen	Frequenz in MS-Patienten	Frequenz in gesunden Individuen	Abk.
Haplotyp 1	T G	90	86	0,51	0,47	R
Haplotyp 2	C A	83	94	0,47	0,52	P
Haplotyp 3	C G	3	1	0,02	0,01	n.a.

Abk.: In den folgenden Abbildungen verwendete Abkürzung; R: Risikohaplotyp; P: Protektiver Haplotyp; n.a. nicht anwendbar.

Aufgrund der begrenzten Anzahl untersuchter Individuen und dem kompletten Kopplungsungleichgewicht (D‘ = 1,00; r^2=0,96), in dem die beiden Allele gemeinsam vererbt werden (Tabelle 3.4), war es nicht möglich den individuellen Einfluss der beiden SNPs getrennt voneinander zu untersuchen. Aus diesem Grund wurde bei der Analyse zwischen zwei Haplotypen unterschieden, dem protektiven Haplotyp (rs763361^{C}, rs727088^{A}) und dem Risikohaplotyp (rs763361^{T}, rs727088^{G}). Zur Erhöhung der Übersichtlichkeit der Darstellung der Analysen, wurde der potentiell protektive Haplotyp im Folgenden mit P, der im Gegensatz dazu mögliche Risikohaplotyp mit R abgekürzt. Träger des Haplotyps 3 (rs763371^{C}, rs727088^{G}), die in der vorliegenden Kohorte einen Anteil von etwa 3% ausmachten, wurden von den folgenden Analysen ausgeschlossen.

3.1.3 Zellen von gesunden Trägern des Risikohaplotyps besitzen eine verminderte CD226-Expression

Nachdem der *CD226*-Genotyp gesunder Individuen bestimmt worden war, wurden Blutzellen mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. CD4^{+} und CD8^{+} T-Zellen wurden anhand ihres Gedächtnis-Zell-Phänotyps unterschieden und NK-Zellen anhand der Höhe der CD56-Expression in zwei Subpopulationen unterteilt.

Bei Betrachtung der CD4^{+} und CD8^{+} Gedächtnis-T-Zellen zeigte sich ein signifikanter Gen-Dosis-abhängiger Zusammenhang zwischen der CD226-Expression und dem CD226-Genotyp (Abbildung 3.2 A-C). CD4^{+} und CD8^{+} Gedächtnis-T-Zellen gesunder, homozygoter Träger des protektiven Haplotyps wiesen eine signifikant erhöhte CD226-Expression im Vergleich zu gesunden homozygoten Trägern des Risikohaplotyps auf. Schließt man in eine lineare Regressionsanalyse ebenfalls die heterozygoten Träger mit ein, ergibt sich eine lineare Korrelation der Expressionsintensität in Abhängigkeit vom Genotyp, da heterozygote Träger eine intermediäre CD226-Expression aufwiesen. Auch für regulatorische CD4^{+} T-Zellen konnte dieses Ergebnis bestätigt werden (Abbildung 3.2 B). Homozygote Träger des protektiven Haplotyps zeigten auch in regulatorischen Gedächtnis-T-Zellen eine signifikant erhöhte CD226-Expression, jedoch konnte die intermediäre Expression der

heterozygoten Träger in dieser Kohorte nicht bestätigt werden, da das Expressionsniveau mit dem von Zellen der homozygoten Risikohaplotyp-Träger vergleichbar war.

Die Beobachtung der verringerten Expression in Zellen der homozygoten Träger des Risikohaplotyps traf lediglich auf Gedächtnis-T-Zellen zu. In naiven T-Zellen und NK-Zellen konnte keine Korrelation zwischen dem Genotyp und der Höhe der CD226-Expression nachgewiesen werden (Abbildung 3.2 D).

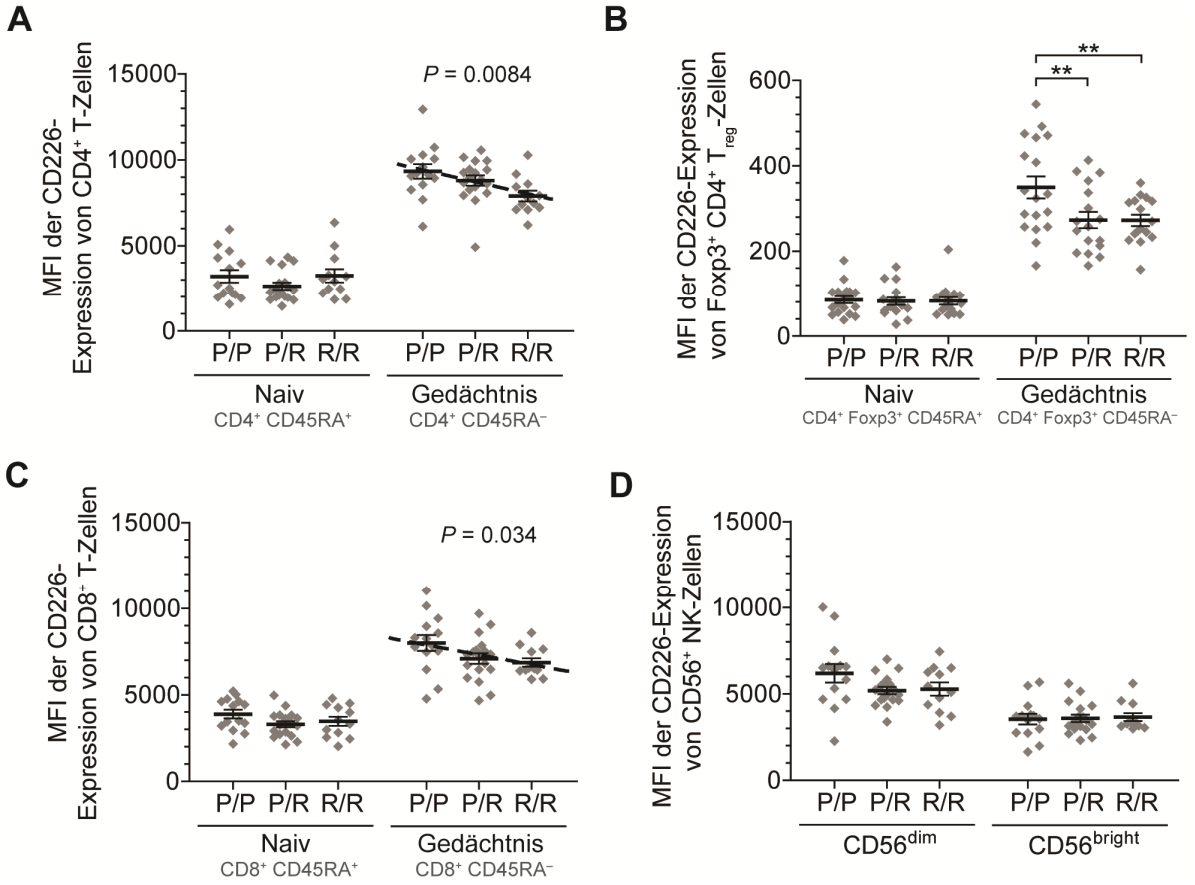


Abbildung 3.2: Korrelation der CD226-Expression mit dem *CD226*-Genotyp gesunder Individuen. Der *CD226*-Genotyp gesunder Individuen wurde bestimmt und Blutzellen von n=44 Individuen (A, C, D) bzw. kryokonservierte PBMCs von n=52 Individuen (B) wurden mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Die mediane Fluoreszenzintensität wurde in Abhängigkeit vom *CD226*-Genotyp dargestellt. (A) CD226-Expression auf $CD4^+$ T-Zellen mit einem naiven ($CD45RA^+$) oder Gedächtnis-Differenzierungsstatus ($CD45RA^-$). Eine Regressionsanalyse wurde verwendet, um die Korrelation zwischen dem *CD226*-Genotyp und dem CD226-Expressionslevel zu überprüfen, wobei ein linearer Genotyp-zu-Phänotyp-Zusammenhang angenommen wurde. (B) CD226-Expression auf $Foxp3^+CD4^+$ T_{reg}-Zellen in Abhängigkeit vom Gedächtniszell-Differenzierungsstatus und Genotyp. Zwei Asteriske indizieren einen *P*-Wert von < 0,01 in der *two-way* ANOVA mit Bonferroni Post-hoc-Test. (C) CD226-Expression auf naiven bzw. Gedächtnis-$CD8^+$ T-Zellen in Abhängigkeit vom Genotyp mit linearer Regressionsanalyse. (D) CD226-Expression von $CD56^+$-NK-Zell-Subpopulationen in Abhängigkeit vom Genotyp. P: Protektiver Haplotyp; R: Risikohaplotyp.

3.1.4 MS-Patienten weisen unabhängig vom Genotyp eine verringerte CD226-Expression im Vergleich zu gesunden Individuen auf

Da eine Korrelation der Expressionsintensität des CD226-Moleküls mit dem *CD226*-Genotyp gesunder Individuen vorlag, wurde als nächstes analysiert, ob diese Beobachtung auch für Gedächtnis-T-Zellen von MS-Patienten zutraf. Dazu wurden MS-Patienten genotypisiert und die Analyse der CD226-Oberflächenexpression wurde in dieser Kohorte wiederholt. Überraschenderweise wiesen die MS-Patienten im Gegensatz zu gesunden Individuen keine Gen-Dosis-Korrelation der CD226-Expressionshöhe weder in $CD4^+$ Gedächtnis-T-Zellen (Abbildung 3.3 A), noch in $CD8^+$ Gedächtnis-T-Zellen (Abbildung 3.3 C) auf. Darüber hinaus war auch die CD226-Expression in Gedächtnis-T_{reg}-Zellen von homozygoten Trägern des protektiven Haplotyps im Vergleich zu Zellen von Trägern des Risikohaplotyps nicht erhöht (Abbildung 3.3 B), wie es in gesunden Trägern der unterschiedlichen Haplotypen beobachtet worden war.

Dieses Ergebnis warf die Frage auf, ob die CD226-Expression generell in Zellen von MS-Patienten im Vergleich zu Zellen von gesunden Individuen verändert sein könnte. Beim Vergleich der CD226-Expression von $CD4^+$ und $CD8^+$ Gedächtnis-T-Zellen sowie $CD56^{bright}$-Zellen zwischen gesunden Individuen und MS-Patienten wiesen MS-Patienten, unabhängig vom Haplotyp, eine verminderte CD226-Expression auf, die im Falle der $CD4^+$ Gedächtnis-T-Zellen und der $CD56^{bright}$-Zellen statistische Signifikanz erreichte (Abbildung 3.3 E-G). Dieser Unterschied in der CD226-Expression legte den Schluss nahe, dass eine niedrige CD226-Expression nicht nur mit dem Risikohaplotyp, sondern darüber hinaus auch generell mit einer MS-Erkrankung korrelierte.

3.1.5 Aktivierungsinduzierte Regulation der CD226-Expression auf $CD4^+$ T-Zellen

In der phänotypischen Charakterisierung der CD226-Expression von humanen Immunzellen wiesen $CD4^+$ Gedächtnis-T-Zellen eine im Vergleich zu naiven $CD4^+$ T-Zellen deutlich erhöhte CD226-Expression auf. Die Höhe der CD226-Expression scheint demnach mit einem Gedächtnis-Zell-Phänotyp zu korrelieren.

Um nun zu untersuchen, inwiefern CD226 auch aktivierungsinduziert reguliert wird, wurden PBMCs mit löslichem anti-CD3-Antikörper stimuliert. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Stimulation wurden die Zellen mit Antikörpern gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Dabei wurden $CD4^+$ T-Zellen betrachtet, wobei ein besonderes Augenmerk auf die Unterscheidung zwischen T-Effektorzellen und regulatorischen T-Zellen sowie die Abgrenzung von Gedächtnis- ($CD45RA^-$) und naiven ($CD45RA^+$) T-Zellen gelegt wurde.

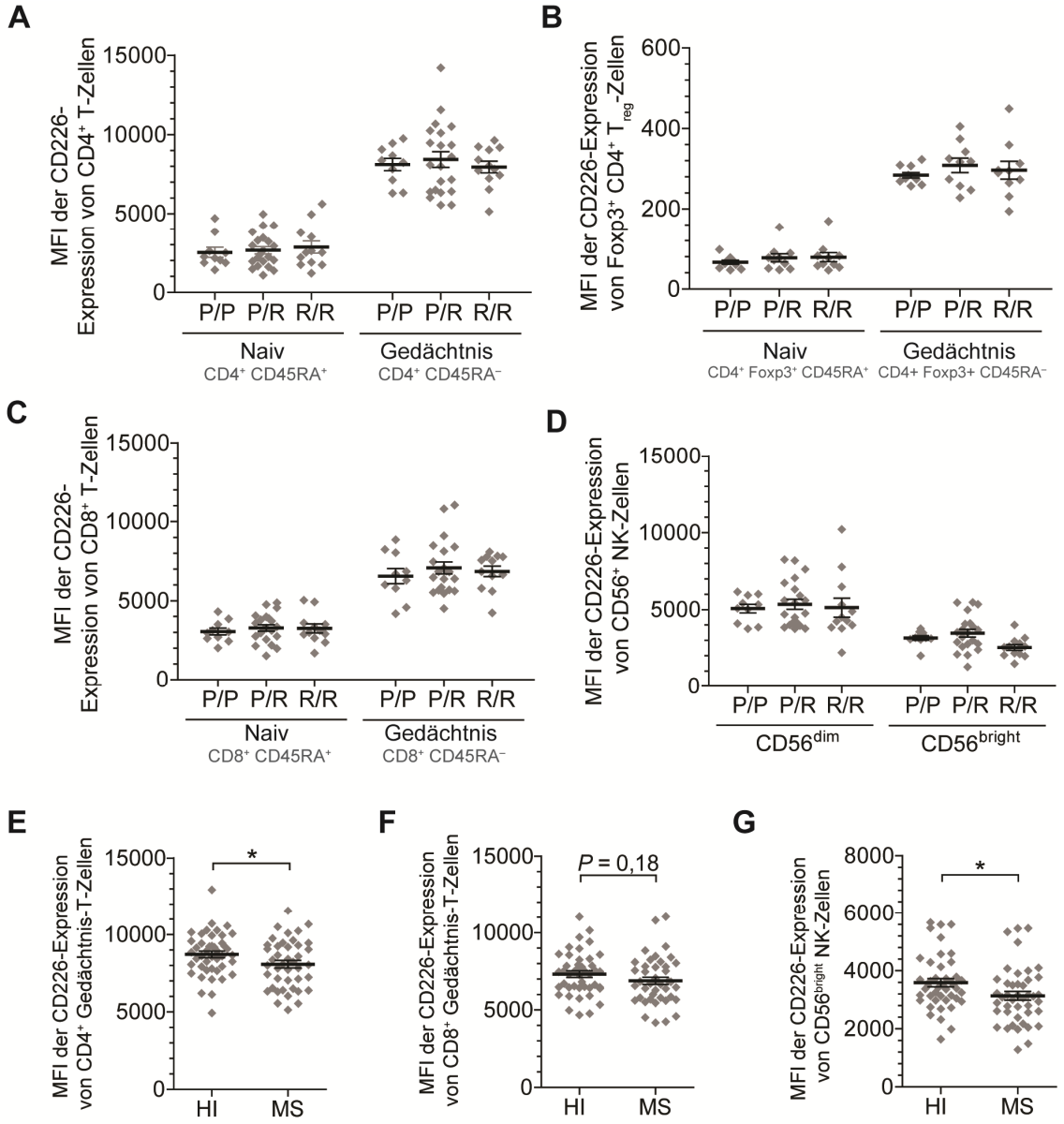


Abbildung 3.3: Korrelation der CD226-Expression mit dem CD226-Genotyp von MS-Patienten. Der CD226-Genotyp von MS-Patienten wurde bestimmt und Blutzellen von n=43 Individuen (A, C-G) bzw. kryokonservierte PBMCs von n=30 Individuen (B) wurden mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Die mediane Fluoreszenzintensität wurde in Abhängigkeit vom *CD226*-Genotyp (A-D), bzw. vom Krankheitsstatus dargestellt (E-G). (A) CD226-Expression auf $CD4^+$ T-Zellen mit einem naiven ($CD45RA^+$) oder Gedächtniszell-Differenzierungsstatus ($CD45RA^-$). (B) CD226-Expression auf $Foxp3^+CD4^+$ T_{reg}-Zellen in Abhängigkeit vom Gedächtniszell-Differenzierungsstatus. (C) CD226-Expression auf naiven bzw. Gedächtnis-$CD8^+$ T-Zellen. (D) CD226-Expression von $CD56^+$-NK-Zell-Subpopulationen. (E-G) Vergleich der CD226-Expression zwischen gesunden Individuen (HI) und MS-Patienten (MS) auf $CD4^+$ Gedächtnis-T-Zellen (E), auf $CD8^+$ Gedächtnis-T-Zellen (F) und $CD56^{bright}$-Zellen (G). Ein Asterisk entspricht einem *P*-Wert von < 0,05 im *two-tailed student's t-test*. P: Protektiver Haplotyp; R: Risikohaplotyp.

Während regulatorische T-Zellen unabhängig von ihrer Gedächtnis-Zell-Differenzierung und naive T-Zellen unstimuliert ein sehr niedriges CD226-Expressionsniveau besaßen, zeigten $CD4^+$ Gedächtnis-T-Zellen einen recht hohen Ausgangswert ihrer CD226-Expression (Abbildung 3.4). In den ersten 24 Stunden der Stimulation verschob sich die CD226-Expression deutlich: Gedächtnis-T_{eff}-Zellen reduzierten ihre Expression, während Gedächtnis-T_{reg}-Zellen deutlich mehr CD226-Protein exprimierten, so dass sich die Expressionsintensität der beiden Zellpopulationen einander stark annäherte und nach 24 Stunden ein ähnliches Niveau erreichte. Bei naiven T-Zellen ließ sich ein ähnlicher Effekt beobachten, so dass 24 Stunden nach Stimulationsbeginn naive T_{eff} und naive T_{reg}-Zellen ein vergleichbares, wenn auch sehr niedriges Expressionsniveau erreichten. Im weiteren Verlauf der Stimulation entfernten sich die Expressionsniveaus wieder voneinander. Während die Foxp3-exprimierenden T-Zellen ihre CD226-Oberflächenexpression verringerten, konnte auf Effektor-T-Zellen wieder eine größere Anzahl CD226-Moleküle nachgewiesen werden, bis nach 72 Stunden in etwa das Ausgangsniveau wieder erreicht wurde. Lediglich regulatorische Gedächtnis-T-Zellen schienen auch nach 72 Stunden eine deutlich erhöhte CD226-Oberflächenexpression aufzuweisen.

In diesem System der Stimulation von PBMCs mit einem T-Zell-Rezeptor-Stimulus wurde die CD226-Expression in erster Linie von regulatorischen T-Zellen gesteigert, während Effektor-T-Zellen ihre CD226-Expression in der frühen Phase der Stimulation erst verringerten und im weiteren Verlauf wieder ihr Ausgangsniveau erreichten.

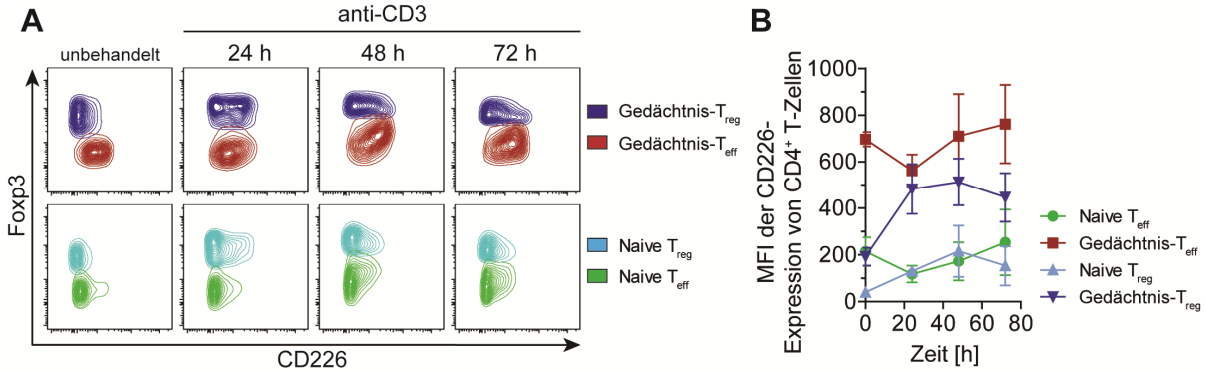


Abbildung 3.4: CD226 wird von Gedächtnis-T-Zellen aktivierungsinduziert hochreguliert. Kryokonservierte PBMCs gesunder Individuen wurden aufgetaut, mit 1 µg/ml anti-CD3-Antikörper (OKT3) für die angegebene Zeit stimuliert und für die Durchflusszytometrie gefärbt. (A) Repräsentative Kontur-Grafik der CD226-Expression im Laufe einer Stimulation der Zellen eines Individuums. Obere Reihe: $CD4^+$ Gedächtnis-T-Zellen (T_{reg}: blau; T_{eff}: rot); untere Reihe: naive $CD4^+$ T-Zellen (T_{reg}: hellblau; T_{eff}: hellgrün). (B) Mediane Fluoreszenzintensität der CD226-Expression von $CD4^+$ T-Zellen der angegebenen Phänotypen zu den angegebenen Zeitpunkten. Die Fluoreszenzintensität der Isotypkontrollfärbung wurde jeweils abgezogen. Zusammengefasste Daten von n=3 heterozygoten Individuen.

3.1.6 $CD4^+$ T-Zellen von Trägern des Risikohaplotyps weisen eine defizitäre Hochregulation der CD226-Expression auf

Träger des CD226-Risikogenotyps besaßen *ex vivo* eine verringerte CD226-Expression auf der Oberfläche von $CD4^+$ T-Zellen. Im nächsten Schritt sollte untersucht werden, ob die niedrigere CD226-Expression in Zellen von Trägern des Risikogenotyps auch nach der Stimulation von T-Zellen noch evident ist. Zu diesem Zweck wurden $CD4^+$ T-Zellen mittels magnetisch aktivierter Zellsortierung aus PBMCs isoliert und mit an Zellkulturplatten immobilisiertem anti-CD3-Antikörper stimuliert. Nach 48 bzw. 72 Stunden Stimulation wurden die Zellen für die Durchflusszytometrie mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gefärbt. Im Vergleich mit dem im letzten Absatz angewandten Protokoll werden die Zellen bei dieser Form der T-Zellstimulation stärker aktiviert. Die Dichte der immobilisierten anti-CD3-Antikörper ist so hoch gewählt, dass die T-Zell-Rezeptoren quervernetzt werden, so dass kein weiteres kostimulatorisches Signal für die T-Zellaktivierung benötigt wird. So wird der Einfluss der Kostimulation durch akzessorische APZ, die sich ebenfalls zwischen den Individuen unterscheiden, vernachlässigbar und die Aktivierung von $CD4^+$ T-Zellen kann isoliert betrachtet werden.

In diesem Modell der T-Zellstimulation regulieren $CD4^+$ T-Zellen nach 48 Stunden die CD226-Expression auf ihrer Oberfläche hoch und während die CD69-Expression, ein Marker der während der Aktivierung von T-Zellen schnell hochreguliert wird, nach 72 Stunden bereits wieder reduziert wird, bleibt die CD226-Expression erhöht (Abbildung 3.5 A). Vergleicht man nun die CD226-Expression zwischen T-Zellen von Trägern der unterschiedlichen *CD226*-Genotypen miteinander, lässt sich sowohl im unstimulierten Zustand, wie auch nach 48-stündiger Stimulation ein signifikanter Expressionsunterschied zwischen Zellen von homozygoten Trägern des protektiven Haplotyps und Zellen von homozygoten Trägern des Risikohaplotyps beobachten (Abbildung 3.5 B). Für Zellen von Trägern des heterozygoten Genotyps wurde sowohl unstimuliert als auch stimuliert eine intermediäre CD226-Expression festgestellt. Die lineare Regressionsanalyse ergab für unstimulierte Zellen einen *P*-Wert von $< 0{,}05$, während stimulierte Zellen sogar eine hochsignifikante Korrelation mit einem *P*-Wert von $< 0{,}01$ aufwiesen.

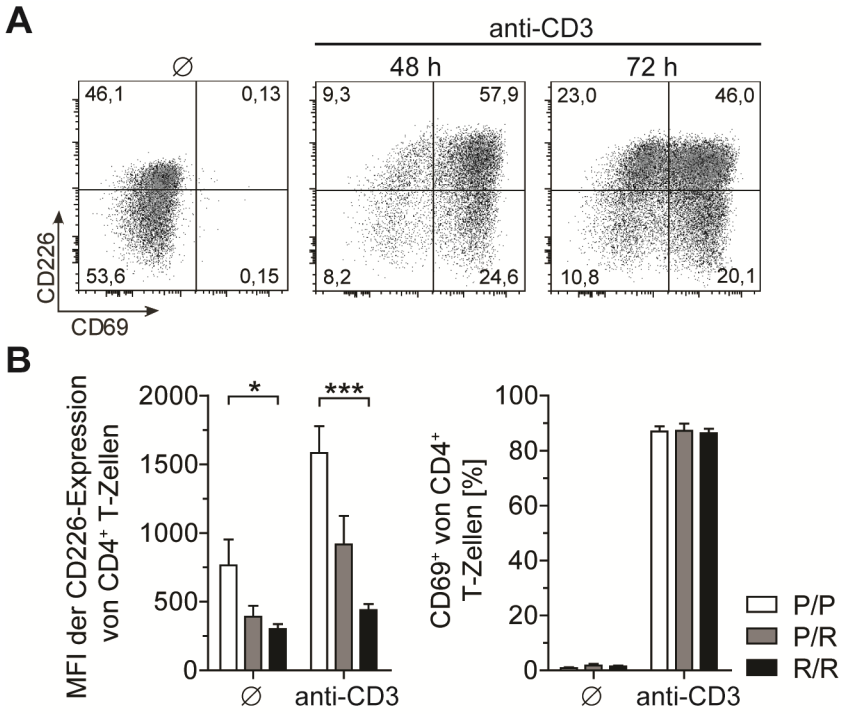


Abbildung 3.5: CD4$^+$ T-Zellen von Trägern des Risikohaplotyps regulieren CD226 aktivierungsinduziert nur eingeschränkt hoch. CD4$^+$ T-Zellen wurden mittels magnetisch-aktivierter Zellsortierung aus PBMCs gesunder Individuen aufgereinigt und mit 1 µg/ml an Plastik immobilisiertem anti-CD3-Antikörper stimuliert. Nach 48 und 72 Stunden wurden die Zellen mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gefärbt und durchflusszytometrisch die Expression von CD226 und CD69 quantifiziert. (A) Repräsentative Punktauftragung der CD69 und CD226-Expression der CD4$^+$ T-Zellen eines gesunden Individuums zu den angegebenen Zeitpunkten. (B) CD4$^+$ T-Zellen wurden für 48 Stunden stimuliert und die mediane Fluoreszenzintensität von CD226 und der Prozentsatz an CD69$^+$ Zellen wurde mit dem CD226-Genotyp der Individuen korreliert. Im Balkendiagramm wurden gemittelte Fluoreszenzintensitäten von n=3-6 gesunden Individuen pro Genotyp dargestellt. Ein Asterisk steht für $P < 0{,}05$, drei Asteriske für $P < 0{,}01$ in der *two-way* ANOVA mit Bonferroni Post-hoc-Test. P: Protektiver Haplotyp; R: Risikohaplotyp.

Da CD226 mehrfach als ein Marker aktivierter T-Zellen beschrieben wurde[195,205,207], könnte dieser Unterschied in der Expressionshöhe in einer reduzierten Aktivierung der CD4$^+$ T-Zellen von Trägern des Risikohaplotyps begründet liegen. Aus diesem Grund wurde neben der CD226-Expression auch die Expression des Aktivierungsmarkers CD69 quantifiziert. Sowohl in unstimulierten Zellen als auch unter stimulierten Bedingungen konnte kein Unterschied im Prozentsatz der CD69$^+$ Zellen und damit kein Unterschied in der Aktivierung der T-Zellen der unterschiedlichen Individuen festgestellt werden (Abbildung 3.5 B). Die beobachtete Defizienz der CD226-Hochregulation scheint demnach auf einen CD226-intrinsischen Effekt und nicht auf eine reduzierte Grundaktivierung der Zellen unterschiedlicher Genotypen zurückzuführen zu sein.

3.2 Analyse der phänotypischen Konsequenz einer CD226-Defizienz in murinen Immunzellen

In gesunden Individuen ist der Risikohaplotyp mit einer verringerten CD226-Expression auf der Oberfläche von Gedächtnis-T-Zellen korreliert. Diese defizitäre CD226-Expression ließ sich auch in MS-Patienten beobachten und scheint damit nicht nur durch den CD226-Risikohaplotyp, sondern vermutlich auch krankheitsinduziert bedingt zu sein. Um nun den kausalen Zusammenhang zwischen verringerter CD226-Expression und erhöhtem Risiko für MS nachzugehen, wurden CD226-defiziente Mäuse verwendet. So konnte die Konsequenz einer verringerten CD226-Expression zum einen auf die zelluläre Zusammensetzung lymphatischer Organe und zum anderen auf den Verlauf des Mausmodells der MS, der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE), analysiert werden.

3.2.1 Analyse der CD226-Expression auf murinen Immunzellen

Zunächst wurde die Fluoreszenzintensität der CD226-Expression auf murinen Milzzellen in Abhängigkeit vom Genotyp der Mäuse bestimmt. Dazu wurden 6-8 Wochen alte Mäuse verwendet, die entweder *Cd226*$^{+/+}$, heterozygot oder homozygot CD226-defizient waren. Milzzellen dieser Mäuse wurden mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert. Dabei wurde zwischen diversen Zellpopulationen, wie T-Zellpopulationen (CD4$^+$, CD8$^+$ und Foxp3$^+$CD4$^+$ regulatorische T-Zellen), NK-Zellen (NK1.1$^+$) und Granulozyten (CD11b$^+$) unterschieden, um die CD226-Expression auf verschiedenen Zelltypen zu vergleichen (Abbildung 3.6).

Auch murine CD4$^+$ T-Zellen wiesen zwei distinkte CD226-Populationen auf, eine kleine hoch-exprimierende CD226^{high} und eine prozentual stärker auftretende CD226^{low}-Population mit niedriger CD226-Expression (Abbildung 3.6 A). Bei Betrachtung dieser zwei Populationen im Hinblick auf ihren Gedächtnis-Zell-Phänotyp, ließen sich diese murinen Zellen ähnlich wie humane Zellen in zwei Gruppen einteilen. Die CD226^{low}-Zellen ließen sich aufgrund ihrer hohen CD62L-Expression und der niedrigen CD44-Expression vornehmlich als naive T-Zellen identifizieren, während CD226^{high}-Zellen durch ihre niedrige CD62L-Expression und die hohe CD44-Expression einen Phänotyp aufwiesen, der murinen Gedächtnis-T-Zellen entsprach (Abbildung 3.6 B). Die Population der Gedächtnis-T-Zellen war in diesem Fall sehr gering ausgeprägt, da hier so genannte *specific pathogen free* (SPF) Mäuse verwendet wurden. Aufgrund ihres hohen Hygienestatus hatten diese Mäuse keinerlei Kontakt zu Umweltpathogenen und hatten keine Infektionen durchlaufen, die zur Differenzierung von Gedächtnis-T-Zellen geführt hätte.

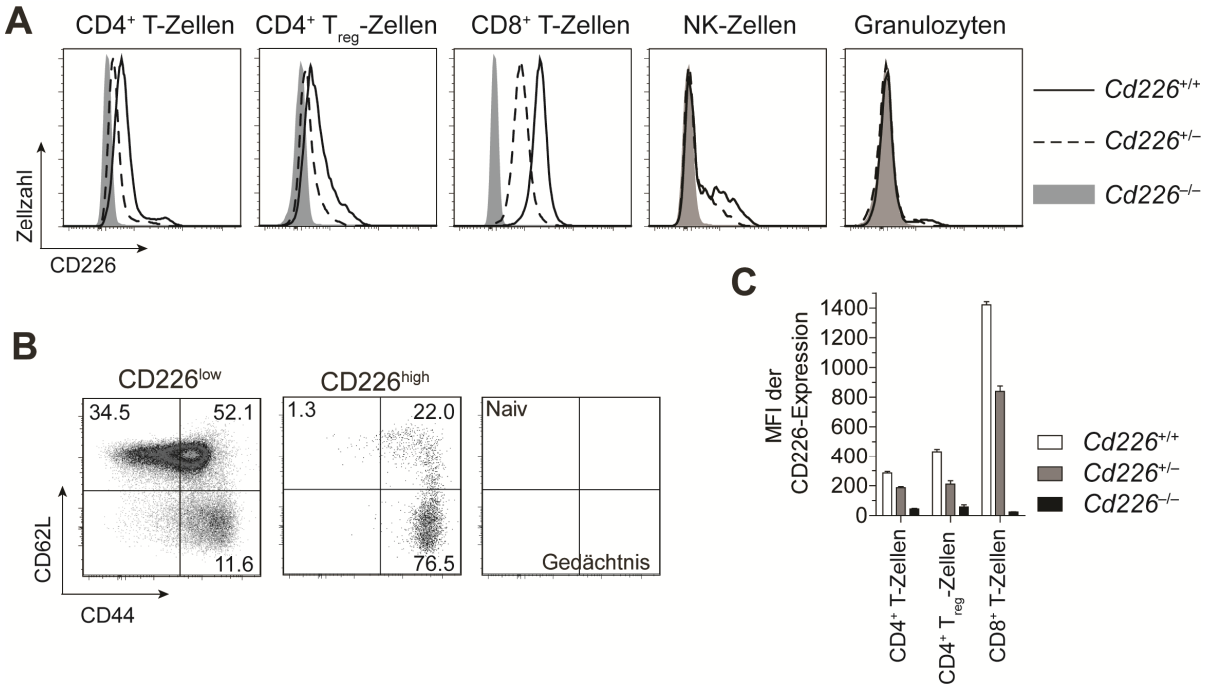


Abbildung 3.6: CD226-Expression muriner Milzzellen. Milzzellen von Mäusen unterschiedlicher *Cd226*-Genotypen wurden isoliert, mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. (A) Repräsentative Histogramm-Überlagerungen der CD226-Expression unterschiedlicher Immunzellpopulationen der angegebenen Genotypen. (B) Differenzierungsstatus von CD226^{high} oder CD226^{low} CD4^{+} T-Zellen anhand der Expression folgender Oberflächenmarker: CD44^{-}CD62L^{+}: Naiv; CD44^{+}CD62L^{-}: Gedächtniszellen. (C) Gemittelte mediane Fluoreszenzintensität der CD226-Expression von T-Zell-Subpopulationen des angegebenen *Cd226*-Genotyps von n=3-4 Mäusen pro Genotyp.

Im Falle von regulatorischen CD4^{+} T-Zellen und CD8^{+} T-Zellen handelte sich um ein homogenes Expressionsmuster, wobei regulatorische CD4^{+} T-Zellen ein konstitutiv niedriges, CD8^{+} T-Zellen ein sehr hohes CD226-Expressionsniveau aufwiesen. Im Gegensatz dazu existierten bei NK-Zellen eine CD226^{+} und eine CD226-negative Population. In CD11b^{+} Granulozyten und anderen Immunzellpopulationen wie B-Zellen und Neutrophile war keine CD226-Expression nachweisbar.

Erwartungsgemäß lag in *Cd226*$^{-/-}$ und *Cd226*$^{+/-}$-Mäusen verglichen mit *Cd226*$^{+/+}$-Mäusen in Bezug auf die CD226-Expressionsintensität ein Gen-Dosis-Effekt vor. In *Cd226*$^{-/-}$ wird durch das Fehlen des Startcodons und des Genabschnitts, der für die ersten 129 Aminosäuren des Proteins codiert, kein funktionales Protein gebildet[187]. Die Fluoreszenzintensität der CD226-Färbung lag dementsprechend in *Cd226*$^{-/-}$-Milzzellen auf dem gleichen Niveau wie eine Färbung mit einer Isotypenkontrolle. Im Gegensatz dazu wird in *Cd226*$^{+/-}$-Mäusen ein funktionsfähiges *Cd226*-Gen auf einem Chromosom transkribiert und translatiert, was dazu führt, dass in diesem Fall CD226-Protein gebildet wird. Die Proteinmenge, die man anhand der Fluoreszenzintensität abschätzen konnte, schien im Vergleich zur *Cd226*$^{+/+}$-Situation halbiert zu sein (Abbildung 3.6 C).

3.2.2 Stimulationskinetik der CD226-Expression

In humanen T-Zellen wird die CD226-Expression aktivierungsinduziert gesteigert. Mit dem folgenden Experiment sollte überprüft werden, ob diese Beobachtung ebenfalls auf murine $CD4^+$ T-Zellen übertragbar ist. Dazu wurden Milzzellen von Wildtyp, *Cd226*$^{+/-}$ oder *Cd226*$^{-/-}$-Mäusen isoliert und mit anti-CD3-Antikörpern stimuliert.

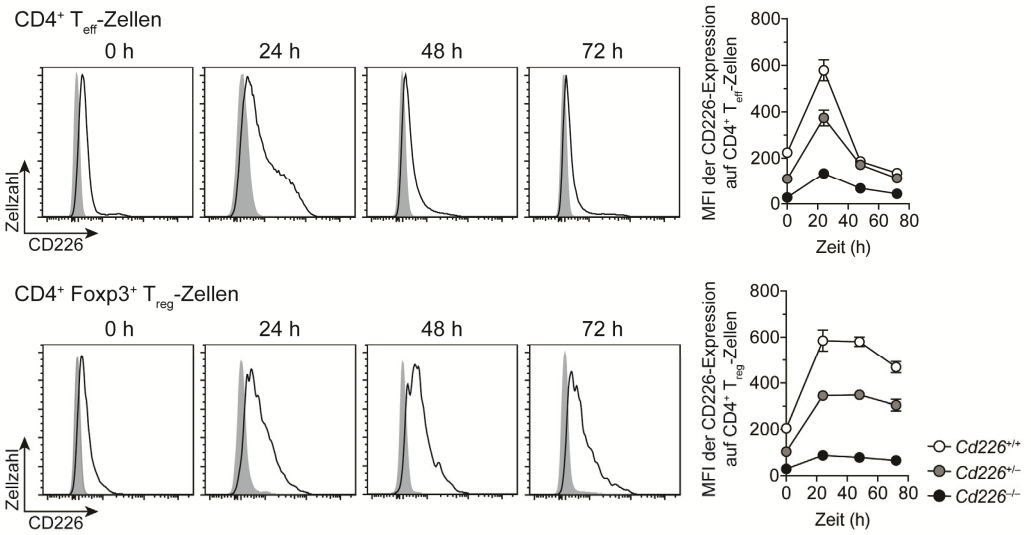


Abbildung 3.7: Kinetik der CD226-Expression auf $CD4^+$ T-Zellen. Milzzellen wurden aus Mäusen der angegebenen Genotypen isoliert und mit 1 µg/ml anti-CD3-Antikörper stimuliert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen durchflusszytometrisch auf die Expression des CD226-Moleküls untersucht. Dabei wurde zwischen $CD4^+Foxp3^-$ (T_{eff}; oben) und $CD4^+Foxp3^+$ (T_{reg}; unten) T-Zellen unterschieden. Links: repräsentative Histogramm-Überlagerungen von $Cd226^{+/+}$- (schwarze Linie) und $Cd226^{-/-}$- (graue Fläche) Zellen; rechts: gemittelte Werte der medianen Fluoreszenzintensität der CD226-Expression von n=5 Mäusen pro Genotyp.

Die durchflusszytometrische Analyse der CD226-Expression nach einer 24-stündigen Inkubation zeigte eine Verdreifachung der Oberflächenexpression des Proteins sowohl auf $CD4^+$ T-Effektorzellen als auch auf $CD4^+$ regulatorischen T-Zellen (Abbildung 3.7). Bei fortwährender Stimulation sank die Expression in $CD4^+$ Effektorzellen bereits nach 48 Stunden wieder auf ein dem Ausgangwert vergleichbares Niveau, während diese in regulatorischen T-Zellen über einen Zeitraum von etwa 24 Stunden konstant blieb und erst danach langsam wieder abfiel. $CD4^+$ T-Zellen heterozygoter Mäuse wiesen auch im Verlauf der Stimulation eine intermediäre CD226-Expression auf, deren Kinetik der in Wildtyp-T-Zellen beobachteten Kurve folgte (Abbildung 3.7).

Da es sich bei einer Stimulation mit anti-CD3-Antikörpern um einen sehr starken Stimulus handelt, der alle T-Zellen unabhängig von der Spezifität und der Affinität der T-Zell-Rezeptoren gleichermaßen stark stimuliert und deshalb die physiologische Situation nur eingeschränkt wiederspiegelt, wurde ein zweites Stimulationssystem verwendet, bei dem T-Zellen mit bekannter Spezifität des T-Zell-Rezeptors zum Einsatz kamen. Es handelte sich dabei um Milzzellen so genannter transgener 2D2-Mäuse, welche einen transgenen T-Zell-Rezeptor besitzen, der spezifisch das Peptid MOG_{35-55} im Kontext des MHC-II-Moleküls $I\text{-}A^b$ bindet.

Milzzellen aus 2D2-transgenen Mäuse wurden aufgereinigt und durch Zugabe von 1 µg/ml MOG_{35-55}-Peptid stimuliert. Das Peptid wird im Laufe der Stimulation auf der Oberfläche von APZ durch I-A^b präsentiert. Die Detektion der 2D2-transgenen T-Zellen erfolgte zu unterschiedlichen Zeitpunkten durch Färbung des 2D2 T-Zell-Rezeptors, der aus den Ketten Vα3.2 und Vβ11 aufgebaut ist, mit anschließender durchflusszytometrischer Analyse. Bereits 24 Stunden nach Beginn der Stimulation waren etwa 40% der 2D2-T-Zellen positiv für das CD226-Molekül (Abbildung 3.8). Diese Zellen waren darüber hinaus $CD62L^-$ und $CD44^+$, was dem Expressionsprofil aktivierter T-Zellen entspricht. Im weiteren Verlauf der Stimulation stieg der Prozentsatz der $CD226^+$ 2D2-T-Zellen weiter an, während diese stimulierten Zellen ihre CD62L-Expression verringerten und ihre CD44-Expression steigerten. Nach 72 Stunden lag ein hohes CD226-Expressionsniveau auf allen 2D2-T-Zellen vor.

Im Falle einer T-Zell-Rezeptor-Stimulation durch Verwendung des spezifischen Antigens schien es sich demnach um eine von der Pan-T-Zell-Stimulation durch anti-CD3-Antikörper abweichenden CD226-Expressionskinetik zu handeln. In diesem Fall dauerte es länger, bis eine maximale CD226-Expression erreicht wurde und während bei einer anti-CD3-Stimulation CD226 schon nach 48 Stunden wieder abnahm, blieb das hohe CD226-Expressionsniveau bei antigenspezifischer Stimulation über längere Zeit erhalten.

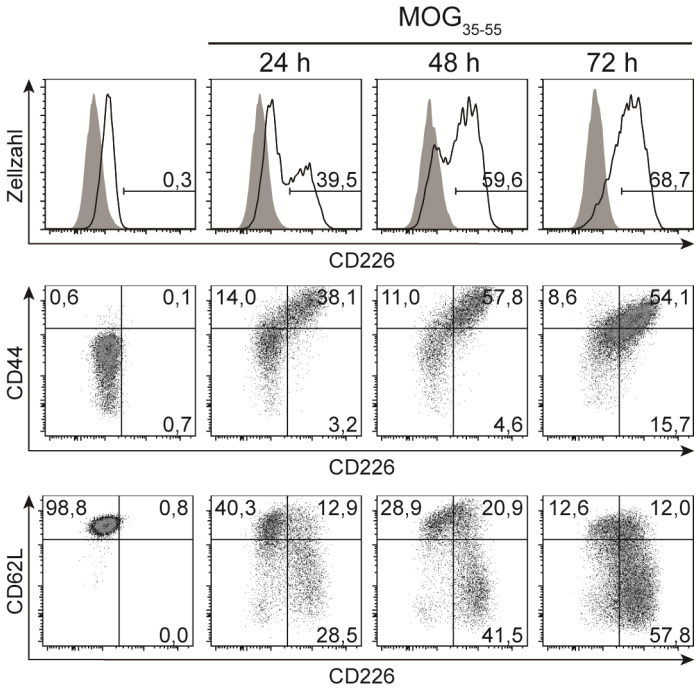


Abbildung 3.8: Kinetik der CD226-Expression auf 2D2-transgenen $CD4^+$ T-Zellen nach Stimulation mit spezifischem Antigen. Milzzellen einer 2D2-transgenen Maus wurden isoliert und mit 1 µg/ml MOG_{35-55}-Peptid inkubiert. Durch Färbung des 2D2 T-Zell-Rezeptors, CD226 (schwarze Linie) oder Isotypkontrolle (graue Fläche), CD44 (Mitte) und CD62L (unten) wurde zu den angegebenen Zeitpunkten in 2D2-transgenen T-Zellen die CD226-Expression sowie die Aktivierung analysiert.

3.2.3 CD226-Expression auf ZNS-infiltrierenden T-Zellen

Die Arbeit am Mausmodell ermöglicht es auch Zellen zu untersuchen, die bereits in entzündetes Gewebe eingedrungen sind und somit die Untersuchung der Expression von Molekülen auf Zellen, die möglicherweise an der Pathogenese einer Erkrankung beteiligt sind. Da CD226 in erster Linie auf T- und NK-Zellen exprimiert war und in T-Zellen aktivierungsinduziert hochreguliert wurde, wurde untersucht, ob die CD226-Expression auch für die Pathogenese des Mausmodells der MS, der EAE von Bedeutung ist.

In C57BL/6-Mäusen wurde eine EAE durch Injektion des MOG_{35-55}-Peptids in KFA induziert und die Mäuse zum akuten Zeitpunkt der Inflammation an Tag 10 nach Immunisierung getötet. Die ZNS-infiltrierenden Immunzellen wurden durch Percoll-Gradientenzentrifugation von Neuronen und Myelin getrennt und für die Durchflusszytometrie mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gefärbt.

Die CD226-Expression in peripheren Immunzellen der Milzen in Mäusen, die an einer akuten Entzündung des ZNS leiden, ist zur Situation in naiven Mäusen vergleichbar (Abbildung 3.9 A, oben). ZNS-infiltrierende T-Zellen und damit die antigenspezifischen Hauptakteure der Inflammation wiesen jedoch eine starke Erhöhung der CD226-Expression auf (Abbildung 3.9 A, unten). In $CD4^+$ T-Zellen handelte es sich um eine etwa 15-fache Erhöhung, in $CD4^+$ T-Zellen des regulatorischen Phänotyps handelte es sich um eine etwa 5-fache Erhöhung, während sich die Expression in $CD8^+$ T-Zellen im ZNS noch verdreifachte (Abbildung 3.9 B).

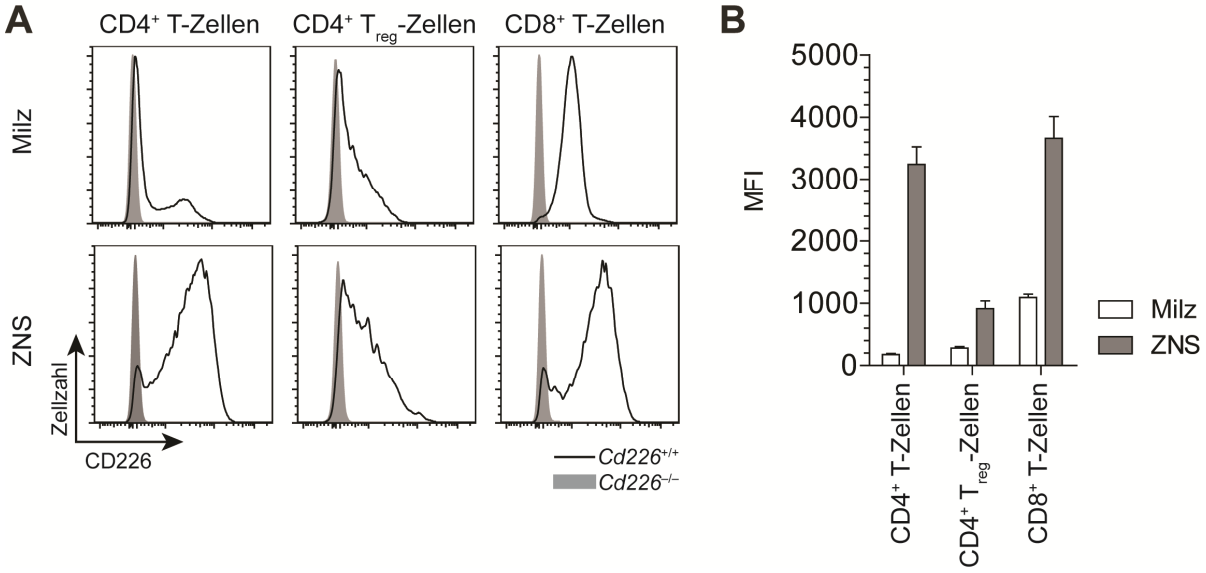


Abbildung 3.9: ZNS-infiltrierende T-Zellen weisen eine hohe CD226-Expression auf. In naiven C57BL/6 wurde eine EAE induziert, im akuten Stadium die Mäuse getötet, die ZNS-infiltrierenden Immunzellen durch Percoll-Gradientenzentrifugation isoliert und mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern für die Durchflusszytometrie gefärbt. (A) CD226-Expression in den angegebenen T-Zell-Populationen der Milz und des ZNS. (B) Gemittelte mediane Fluoreszenzintensität der CD226-Expression zusammengefasst für n=5 Mäuse.

Da nur aktivierte Gedächtnis-T-Zellen in der Peripherie lizenziert werden in das ZNS zu infiltrieren um dort Effektormechanismen auszulösen, korrelierte dieser Befund mit den bisherigen Ergebnissen, dass es sich bei CD226 um einen Aktivierungs- und Gedächtnis-Zellmarker auf der Oberfläche von T-Zell-Subpopulationen handelt. Er scheint darüber hinaus ein exklusives Merkmal ZNS-infiltrierender $CD4^+$ und $CD8^+$ Effektor-T-Zellen zu sein, da alle T-Zellen im akut entzündeten ZNS einen $CD226^{high}$-Phänotyp aufwiesen. CD226 und die Interaktion des Moleküls mit seinen Liganden könnte somit maßgeblich an einer Lizenzierung der T-Zellen in der Peripherie und an der Infiltration der T-Zellen ins ZNS beteiligt sein. Jedoch bleibt die differentielle Bedeutung der CD226-Expression auf Effektor- und regulatorischen T-Zellen bisher ungeklärt.

3.2.4 CD226-defiziente Mäuse besitzen eine erhöhte Frequenz $CD4^+$ regulatorischer T-Zellen in der Milz und im Thymus

Um die Bedeutung von CD226 für die Entwicklung und Differenzierung von Immunzellen weiter zu charakterisieren, wurde eine umfangreiche Phänotypisierung von CD226-defizienten Mäusen durchgeführt. In diese Analyse wurden neben homozygot defizienten Mäusen ebenfalls heterozygot defiziente Mäuse eingeschlossen, da diese eine intermediäre CD226-Expression aufwiesen (Abbildung 3.6) und so möglicherweise den Einfluss einer reduzierten CD226-Expression auf die Entwicklung von Immunzellpopulationen wiederspiegelten.

Die Analyse unterschiedlicher Zellpopulationen, wie NK-Zellen, B-Zellen und APZ in der Milz zeigte keine signifikanten Unterschiede der prozentualen Verteilung zwischen Mäusen der drei *CD226*-Genotypen (Abbildung 3.10 A). Auch das Verhältnis von $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen zueinander wurde von einer CD226-Defizienz nicht beeinflusst (Abbildung 3.10 B). Bei näherer Betrachtung der regulatorischen $CD4^+$ T-Zellen zeigte sich jedoch überraschenderweise, dass eine CD226-Defizienz zu einer Erhöhung der Frequenz $CD4^+$ regulatorischer T-Zellen innerhalb der $CD4^+$ T-Zellen führte (Abbildung 3.10 C). Des Weiteren konnte ein Gen-Dosis-abhängiger Zusammenhang festgestellt werden, da nicht nur die vollständige Defizienz der CD226-Expression mit einer Erhöhung der Frequenz der T_{reg}-Zellen einherging, sondern auch schon die erniedrigte CD226-Expression in heterozygoten Mäusen genügte, um eine signifikante Steigerung des Prozentsatzes der T_{reg}-Zellen zu bewirken.

Da eine Änderung in den reifen peripheren regulatorischen T-Zellen vorlag, wurde als nächstes analysiert, ob diese Veränderung sich bereits während der Entwicklung der T-Zellen im Thymus manifestiert. Zu diesem Zweck wurde die Zellzusammensetzung des Thymusgewebes untersucht. Wie auch schon in der Milz konnte auch im Thymus kein Unterschied zwischen CD226-defizienten und -suffizienten konventionellen T-Zellen festgestellt werden (Abbildung 3.10 D). Alle unterscheidbaren Stadien der T-Zell-Reifung lagen in vergleichbaren Anteilen in den Thymi der Mäuse der unterschiedlichen Genotypen vor. Die Frequenz $Foxp3^+$ regulatorischer T-Zellen, die in erster Linie innerhalb der

CD3$^+$CD4$^+$-Population zu finden sind und damit den reifen CD4$^+$ T-Zellen zuzurechnen sind, war jedoch auch im Thymus heterozygoter und homozygoter CD226-defizienter Mäuse signifikant erhöht im Vergleich zur Frequenz der T_{reg}-Zellen in den Thymi CD226-suffizienter Mäuse (Abbildung 3.10 E). Dies legte den Schluss nahe, dass es sich bei der Erhöhung der Foxp3$^+$ T_{reg}-Zellen um einen T-Zell-intrinsischen Effekt handelte, der sich bereits früh in der Entwicklung der regulatorischen T-Zellen manifestierte und auch nach Verlassen des Thymus in der Peripherie evident blieb.

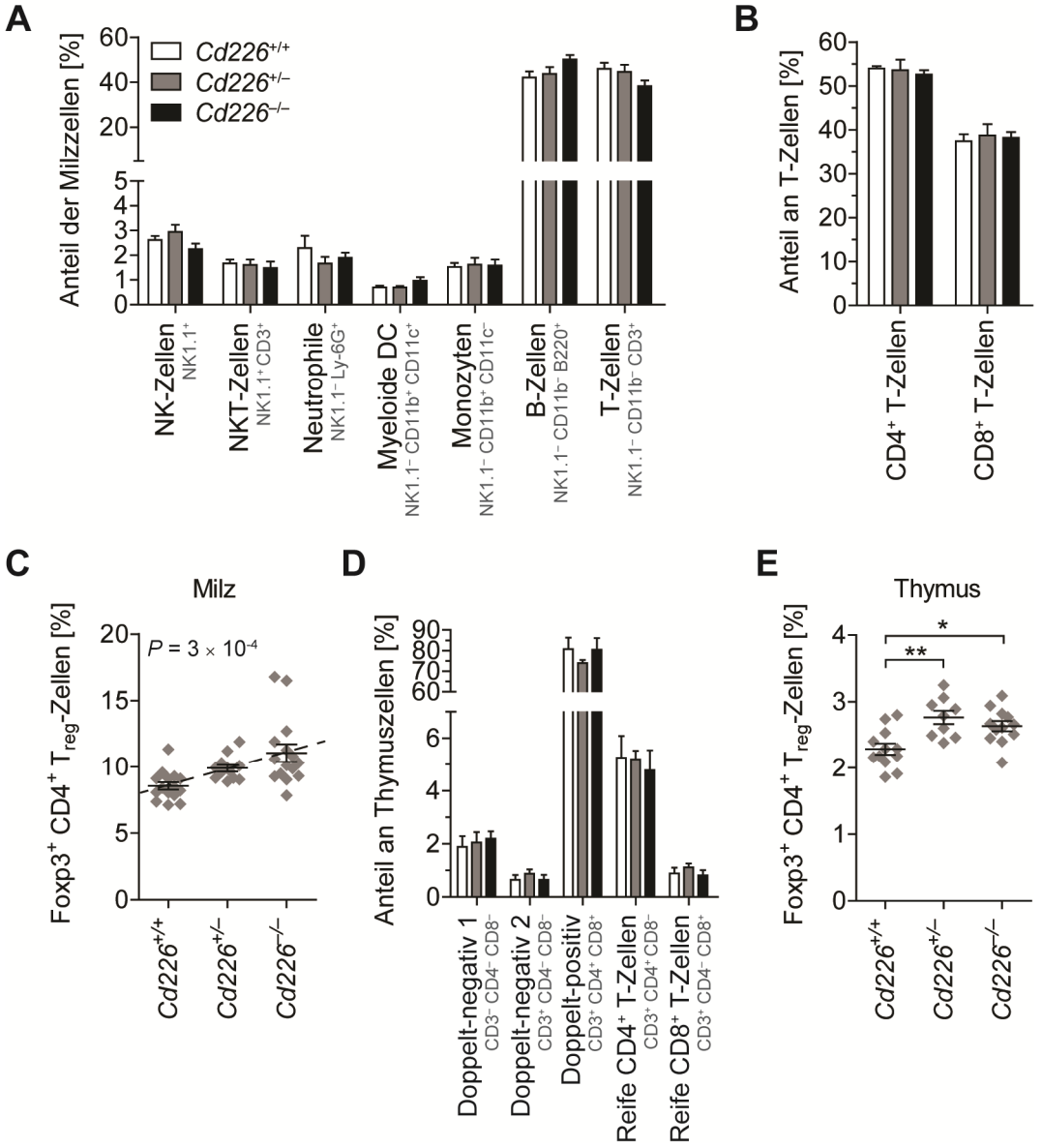


Abbildung 3.10: Phänotypisierung CD226-defizienter Milz- und Thymuszellen. Milzen und Thymi von Mäusen der angegebenen Genotypen wurden präpariert und mittels Durchflusszytometrie analysiert. (A) Prozentuale Verteilung der angegebenen Populationen in Milzzellen (n=7–11). (B) Anteil von CD4$^+$ und CD8$^+$ T-Zellen an CD3$^+$ T-Zellen (n=7–11). (C) Auftragung der Prozentsatzes Foxp3$^+$CD4$^+$ T-Zellen innerhalb der Gesamt CD4$^+$ T-Zellen der Milz (n=12–15) mit linearer Regressionsanalyse. (D) Analyse der Zusammensetzung der Thymi von Mäusen der angegebenen Genotypen (n=4–8). (E) Prozentsatz der Foxp3$^+$CD4$^+$ T-Zellen an CD3$^+$CD4$^+$ T-Zellen des Thymus (n=9–13). Ein Asterisk symbolisiert einen *P*-Wert von < 0,05, zwei Asteriske einen *P*-Wert von < 0,01 in der *one-way* ANOVA mit Bonferroni Post-hoc-Test.

3.2.5 CD226-defiziente T_{reg}-Zellen sind in ihrer suppressiven Kapazität eingeschränkt

Da die Frequenz Foxp3$^+$-T_{reg}-Zellen in CD226-defizienten Mäusen im Vergleich zu CD226-suffizienten Mäusen erhöht war, wurde als nächstes untersucht, ob sich diese Beobachtung auf die suppressive Kapazität der regulatorischen T-Zellen auswirkte. Zu diesem Zweck wurde ein so genannter T_{reg}-Suppressionsassay durchgeführt. CD4$^+$CD25$^-$ Effektor-T-Zellen und CD4$^+$CD25$^+$ T-Zellen wurden mittels MACS-Technologie isoliert und anhand der unterschiedlichen CD25-Expressionshöhe voneinander getrennt. Anschließend wurden die beiden T-Zell-Typen in titrierten Verhältnissen miteinander gemischt und durch Zugabe von anti-CD3-Antikörper stimuliert. Nach drei Tagen wurde die resultierende Proliferation der Effektor-T-Zellen mittels ^{3}H-Thymidin-Inkorporation quantifiziert.

Beim Vergleich der Proliferation von *Cd226*$^{+/+}$ T_{eff}-Zellen, die mit *Cd226*$^{-/-}$ T_{reg}-Zellen inkubiert wurden mit der Proliferation von *Cd226*$^{+/+}$ T_{eff}-Zellen, die mit *Cd226*$^{+/+}$ T_{reg}-Zellen inkubiert wurden, konnte eine hochsignifikant verminderte Suppression der T_{eff}-Proliferation durch *Cd226*$^{-/-}$ T_{reg}-Zellen beobachtet werden (Abbildung 3.11). CD226-defiziente regulatorische T-Zellen scheinen demnach eine eingeschränkte suppressive Kapazität zu besitzen.

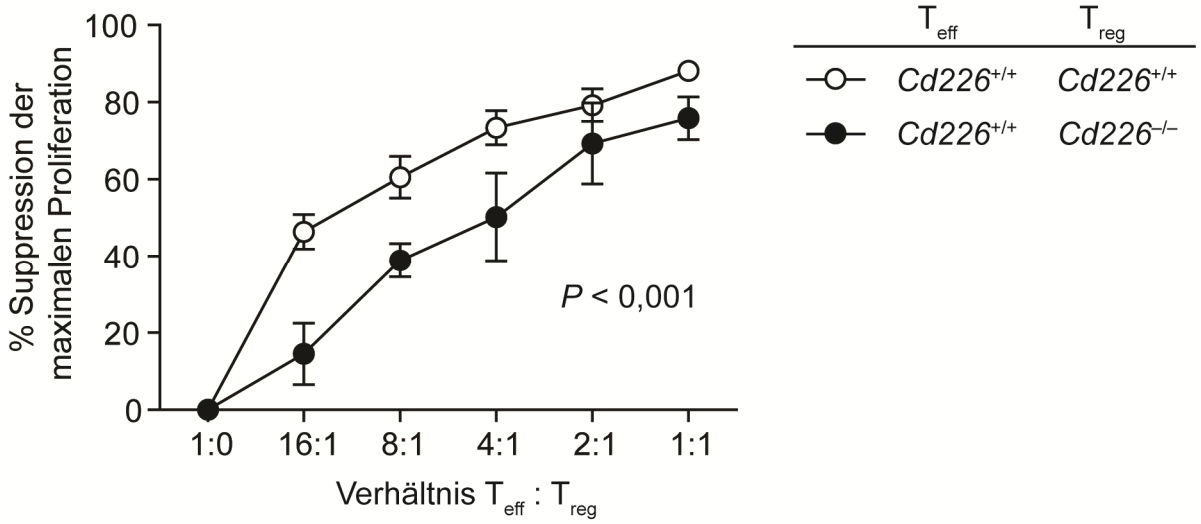


Abbildung 3.11: CD226-defiziente T_{reg}-Zellen zeigen eine verminderte suppressive Kapazität im T_{reg}-Suppressionsassay. *Cd226*$^{+/+}$ CD4$^+$CD25$^-$ T_{eff}- und CD4$^+$CD25$^+$ T_{reg}-Zellen des angegebenen *Cd226*-Genotyps wurden mittels magnetisch-aktivierter Zellsortierung aufgereinigt und in den dargestellten Zellzahlverhältnissen zusammen unter anti-CD3-Antikörper-Stimulation inkubiert. Nach dreitägiger Inkubation wurde die Proliferation mittels ^{3}H-Thymidin-Inkorporation quantifiziert und auf die maximale Proliferation der T_{eff}-Zellen ohne T_{reg} normiert. Gezeigt sind gemittelte Daten aus drei unabhängigen Experimenten. Der statistisch signifikante Unterschied zwischen den Gruppen wurde mittels *two-way* ANOVA festgestellt.

3.2.6 Eine CD226-Defizienz führt zu einem schwereren Verlauf der EAE

Nach Abschluss der Phänotypisierung der CD226-defizienten Zellen wurde als nächstes die Auswirkung einer reduzierten CD226-Expression *in vivo*, am Mausmodell der MS, der EAE untersucht. *Cd226*$^{+/-}$, *Cd226*$^{-/-}$ und nicht-transgene Wurfgeschwister wurden im ersten Ansatz mit 200 µg MOG_{35-55}/ KFA-Emulsion, die 0,2 mg hitzeinaktivierte *Mycobacterium tuberculosis* Bakterien enthielt, immunisiert. Außerdem wurden am gleichen Tag und 48 Stunden später jeweils 200 ng PTx gelöst in PBS intravenös injiziert. Bei Auftragung des Behinderungsgrades gegen die Zeit nach Immunisierung ist bei diesem EAE-Induktionsprotokoll kein Unterschied im Verlauf der Erkrankung der Mäuse erkennbar (Abbildung 3.12 A; Tabelle 3.5).

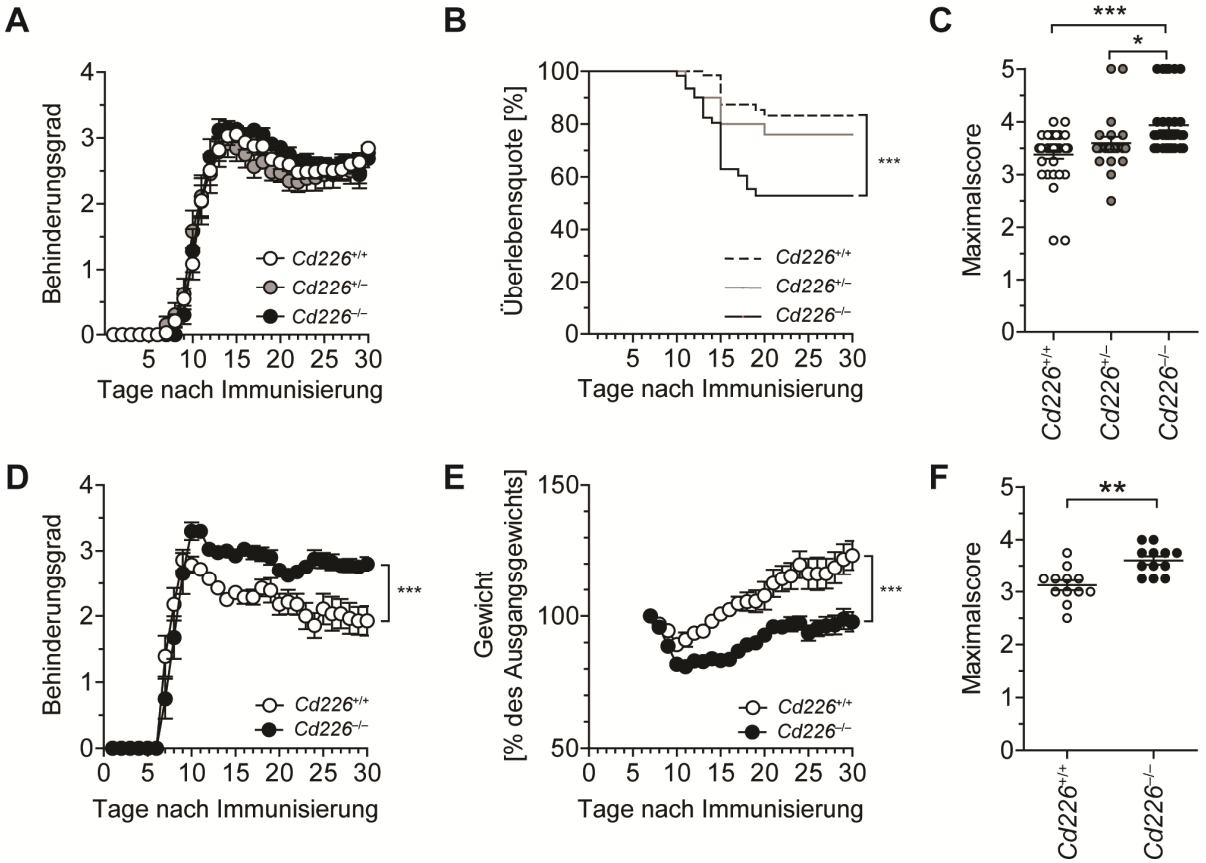


Abbildung 3.12: CD226-Defizienz verursacht einen schwereren Verlauf der EAE. In *Cd226*$^{+/-}$, *Cd226*$^{-/-}$ und nicht-transgenen Wurfgeschwister wurde nach dem Protokoll der vollen Immunisierung (A-C) oder der reduzierten Immunisierung (D-F) eine EAE induziert (siehe Kapitel 2.4.7.1). (A, D) Der Behinderungsgrad der Mäuse wurde täglich beurteilt. 0: keine Krankheitssymptome; 1: Plegie des Schwanzes; 2: Parese der Hinterläufe; 3. Plegie der Hinterläufe; 4: Plegie der Hinterläufe und Parese der Vorderläufe; 5: Tod. (B) Überlebenskurve der Mäuse mit Mantel-Cox-Test. Drei Asteriske entsprechen einem *P*-Wert von < 0,001. (C) Maximalscore. Ein Asterisk entspricht einem *P*-Wert von < 0,05; drei Asteriske einem *P*-Wert von < 0,001 im Kruskal-Wallis-Test mit Dunn's Post-hoc-Test. (E) Auftragung der Gewichtsentwicklung in % des Ausgangsgewichts. (D, E) Statistische Evaluierung erfolgte mit einer *two-way* ANOVA. Ein *P*-Wert von < 0,001 wurde durch drei Asteriske symbolisiert. (F) Maximalscore. Zwei Asteriske entsprechen einem *P*-Wert von < 0,01 im Mann-Whitney-Test.

Tabelle 3.5: EAE in CD226-defizienten Mäusen bei voller Immunisierungsdosis. Gemittelte Werte ± SEM.

	Inzidenz	Mortalität	Krankheitsbeginn (Tage nach Immunisierung)	Kumulativer Score	Maximal-score
***Cd226*$^{+/+}$**	37/37	4/37 (11%)	10,4 ± 1,8	53,8 ± 11,9	3,4 ± 0,5
***Cd226*$^{+/-}$**	21/21	3/21 (7%)	10,4 ± 2,4	53,0 ± 11,4	3,6 ± 0,6
***Cd226*$^{-/-}$**	32/32	13/32 (40%)	10,6 ± 1,2	55,5 ± 7,8	3,9 ± 0,5

Jedoch zeigte sich ein signifikanter Unterschied in der Überlebensquote der Mäuse: Die CD226-defizienten Tiere zeigten dabei eine signifikant verringerte Überlebensrate und einen signifikant erhöhten Maximalscore im Vergleich zu nicht-transgenen Wurfgeschwistern (Abbildung 3.12 B und C, Tabelle 3.5). Diese Differenz in der Mortalität lässt sich in der klassischen Verlaufskurve nur eingeschränkt darstellen, da Mäuse, die aufgrund der Schwere ihrer Symptomatik, z.B. mit einer Tetraplegie getötet werden mussten oder aber im Laufe des Experimentes verstarben, vom Experimentator aus der Analyse ausgeschlossen werden, da sonst die Verlaufskurve stark von diesen bereits verstorbenen Tieren verfälscht werden würde. In der Auftragung des Maximalscores wurde zudem eine Gen-Dosis-Korrelation festgestellt, da *Cd226*$^{+/-}$-Mäuse einen intermediären Maximalscore im Vergleich zu *Cd226*$^{+/+}$ und *Cd226*$^{-/-}$-Mäusen aufwiesen (Abbildung 3.12 B).

Mithilfe eines reduzierten Immunisierungsprotokolls wurde im nächsten Schritt der Frage nachgegangen, ob es sich bei dem beobachteten Effekt tatsächlich um eine erhöhte Mortalität der *Cd226*$^{-/-}$ Mäuse handelte oder vielmehr um eine gesteigerte Pathogenese der EAE, da zu erwarten wäre, dass diesen beiden Phänomenen unterschiedliche Mechanismen zugrunde lägen. Aus diesem Grund wurden Mäuse der CD226-defizienten Linie und nicht-transgene Wurfgeschwister mit 200 µg MOG_{35-55} immunisiert, welches in diesem Experiment jedoch mit halbierter Menge hitzeinaktivierter Mycobakterien, 0,1 mg, im gleichen Volumen KFA emulsifiziert worden war. Außerdem wurde die Menge Pertussis Toxin, die pro intravenöser Injektion appliziert wurde auf 100 ng halbiert. Mit diesem Immunisierungsprotokoll gelang es die EAE-Symptomatik abzuschwächen (Abbildung 3.12 D, Tabelle 3.6). Unabhängig vom Genotyp der Mäuse setzten die Lähmungserscheinungen etwa an Tag 7 nach der Immunisierung ein. Während jedoch die *Cd226*$^{+/+}$ einen maximalen Score von 3,1 ± 0,3 zeigten, was einer Parese beider Hinterextremitäten entspricht, wurde bei *Cd226*$^{-/-}$-Mäusen ein signifikant erhöhter Maximalscore von 3,6 ± 0,3 beobachtet, d.h. der Großteil der Mäuse litt während der akuten Phase der ZNS-Inflammation an einer Plegie beider Hinterextremitäten (Abbildung 3.12 F). Im weiteren Verlauf der Erkrankung regenerierten sich die nicht-transgenen Mäuse signifikant besser als *Cd226*$^{-/-}$-Mäuse. Dieser Befund spiegelt sich ebenfalls im kumulativen Score wieder, welcher als Summe aller Scores von Tag 1 bis Tag 30 gebildet wird. Einen

weiteren Hinweis auf die eingeschränkte Regeneration der CD226-defizienten Mäuse gab die Betrachtung der Gewichtsentwicklung der einzelnen Mäuse (Abbildung 3.12 E). Während *Cd226*$^{+/+}$-Mäuse bereits kurz nach Überwindung der akuten Phase der EAE wieder ihr Ausgangsgewicht erreicht hatten, verloren die CD226-defizienten Mäuse initial mehr Gewicht und konnten diese Gewichtsabnahme bis zum Ende des Experiments nach 30 Tagen auch nur eingeschränkt kompensieren.

Tabelle 3.6: EAE in CD226-defizienten Mäusen bei reduzierter Immunisierungsdosis. Gemittelte Werte ± SEM.

	Inzidenz	Mortalität	Krankheitsbeginn (Tage nach Immunisierung)	Kumulativer Score	Maximal-score
***Cd226*$^{+/+}$**	12/12	0/12	7,2 ± 0,6	53,4 ± 6,9	3,1 ± 0,3
***Cd226*$^{-/-}$**	12/12	0/12	7,7 ± 0,9	65,9 ± 3,3	3,6 ± 0,3

3.2.7 Die zelluläre Zusammensetzung des ZNS-Infiltrats von Mäusen mit akut entzündetem ZNS wird von einer CD226-Defizienz nicht beeinflusst

Da im vorangegangenen Experiment gezeigt werden konnte, dass eine CD226-Defizienz zu einem schwereren Verlauf der EAE führte, wurde in den nächsten Versuchen der Frage nachgegangen, welche zellulären Mechanismen an diesem Befund beteiligt sein könnten.

Zunächst wurde eine durchflusszytometrische Analyse der Zusammensetzung des Infiltrats der akut-entzündeten zentralen Nervensysteme von Mäusen der unterschiedlichen *Cd226*-Genotypen angefertigt. Weder in der absoluten Zellzahl des ZNS-Infiltrats (Abbildung 3.13 A) noch in der zellulären Zusammensetzung (Abbildung 3.13 B) konnten signifikante Unterschiede zwischen *Cd226*$^{+/+}$, *Cd226*$^{+/-}$ und *Cd226*$^{-/-}$-Mäusen beobachtet werden. Auch die Frequenz der T_{reg}-Zellen innerhalb der $CD3^+$ T-Zellen unterschied sich nicht zwischen den unterschiedlichen Genotypen (Abbildung 3.13 C). Darüber hinaus war außerdem das Zytokinsekretionsprofil der $CD4^+$ T-Zellen zwischen Mäusen der unterschiedlichen Genotypen vergleichbar (Abbildung 3.13 D). Außerdem ließ sich ebenfalls kein Unterschied in der Proliferation nach Restimulation der peripheren T-Zellen mit MOG_{35-55} oder anti-CD3-Antikörper detektieren (Abbildung 3.13 E).

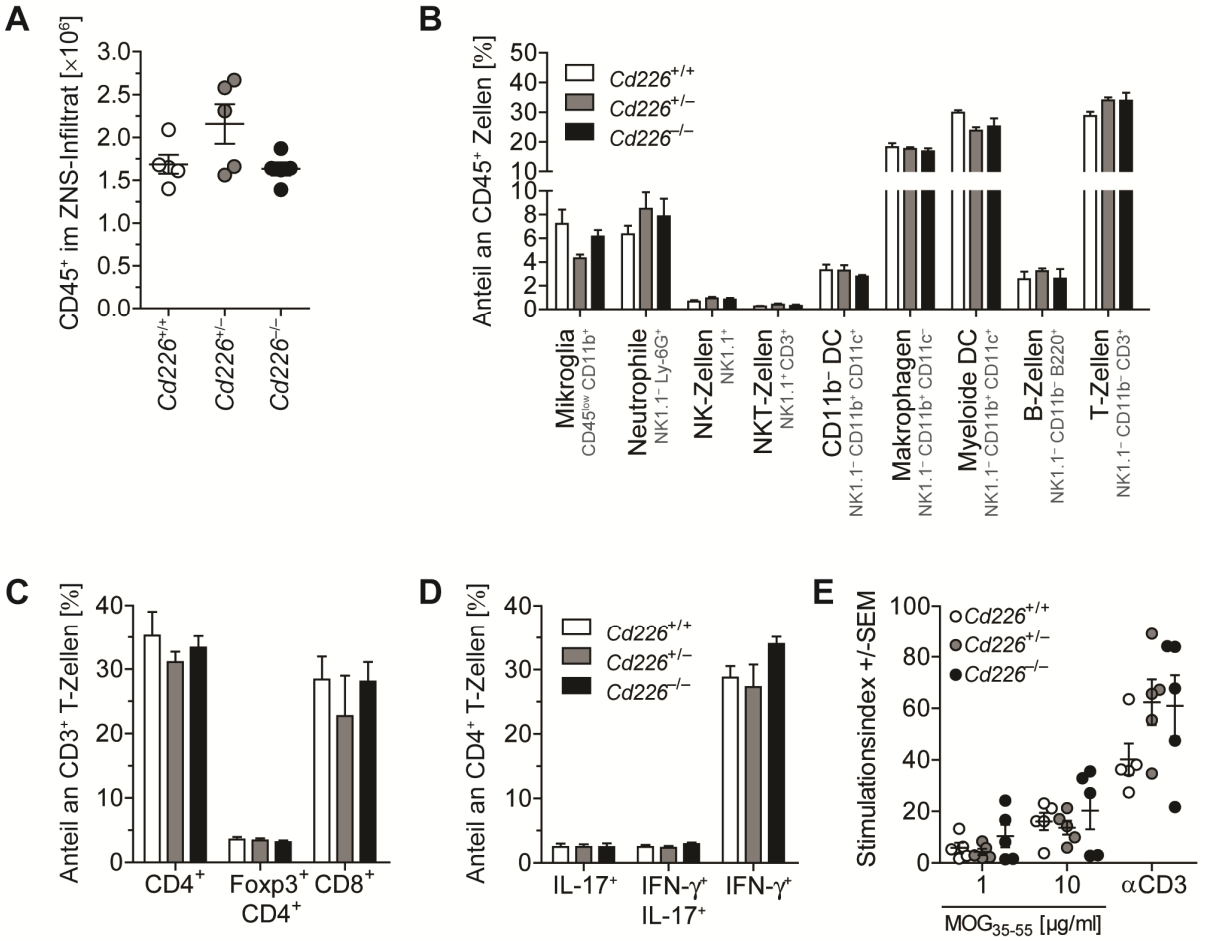


Abbildung 3.13: FACS der ZNS-infiltrierenden Zellen von CD226-defizienten Mäusen mit EAE. In Mäusen der angegebenen *Cd226*-Genotypen wurde eine EAE induziert. Zum Zeitpunkt der akuten Inflammation wurden die Mäuse getötet, die ZNS-infiltrierenden Zellen wurden isoliert und deren Zusammensetzung durchflusszytometrisch analysiert (n=5 Mäuse pro Genotyp). (A) Absolute Anzahl der $CD45^+$ Immunzellen im ZNS. (B) Prozentuale Zellzusammensetzung des ZNS-Infiltrats. (C) Anteil der angezeigten T-Zell-Subpopulationen an Gesamt $CD3^+$ T-Zellen. (D) Zytokinsekretionsprofil der $CD4^+$ T-Zellen, gemessen durch intrazelluläre Zytokinfärbung. (E) Milzzellen der akut erkrankten Mäuse der angegebenen Genotypen wurden mit MOG_{35-55} oder anti-CD3-Antikörper restimuliert und die resultierende Proliferation wurde durch ^{3}H-Thymidin-Inkorporation quantifiziert. Gezeigt sind die Stimulationsindices, der Quotient aus der stimulierten Kondition und der unstimulierten Kontrolle.

3.2.8 Der adoptive Transfer von CD226-defizienten 2D2-transgenen T-Zellen beschleunigt das Einsetzen der EAE-Symptomatik

Neben der so genannten aktiven Immunisierung durch Injektion eines Myelinantigens existieren weitere Protokolle zur Induktion einer EAE-Symptomatik. Um zu untersuchen, ob es sich bei der verstärkten EAE in CD226-defizienten Mäusen um einen T-zellintrinsischen Effekt handelte, wurde ein so genannter adoptiver Transfer enzephalitogener T-Zellen durchgeführt. Dazu wurden Milzzellen 2D2-transgener Mäuse, die ein Transgen für einen MOG_{35-55}-spezifischen T-Zell-Rezeptor tragen, *in vitro* für 48 Stunden mit ihrem Antigen MOG_{35-55} unter Zusetzung von IL-2 und IL-7 stimuliert. Nach einer 4-tägigen Stimulationspause, in der zusätzliches IL-2 und IL-7 das Überleben der T-Zellen sicherstellte und in der die Zellen ihr Aktivierungsniveau drosselten und einen

gedächtniszellartigen Phänotyp annahmen, wurden die Zellen mit an Zellkulturplatten immobilisiertem anti-CD3- und anti-CD28-Antikörper restimuliert und durch Zugabe der Zytokine IL-12 und IL-18 zur Produktion großer Mengen IFN-γ angeregt. Die resultierenden T-Zell-Blasten, die überwiegend einen T_H1-Phänotyp aufwiesen, wurden intraperitoneal in naive Wildtyp-Mäuse injiziert, gefolgt von einer Injektion von PTx, welche 48 Stunden später wiederholt wurde.

Zum Vergleich der Enzephalitogenität CD226-defizienter T-Zellen mit CD226-suffizienten T-Zellen, wurden zunächst *Cd226*$^{-/-}$- mit 2D2-transgenen Mäusen gekreuzt, um in der zweiten Generation 2D2-transgene *Cd226*$^{-/-}$ -Mäuse zu erhalten. Anschließend wurden die Milzzellen der resultierenden Mauslinien unterschiedlicher Genotypen nach dem oben beschriebenen Protokoll *in vitro* aktiviert und in naive C57BL/6-Mäuse injiziert.

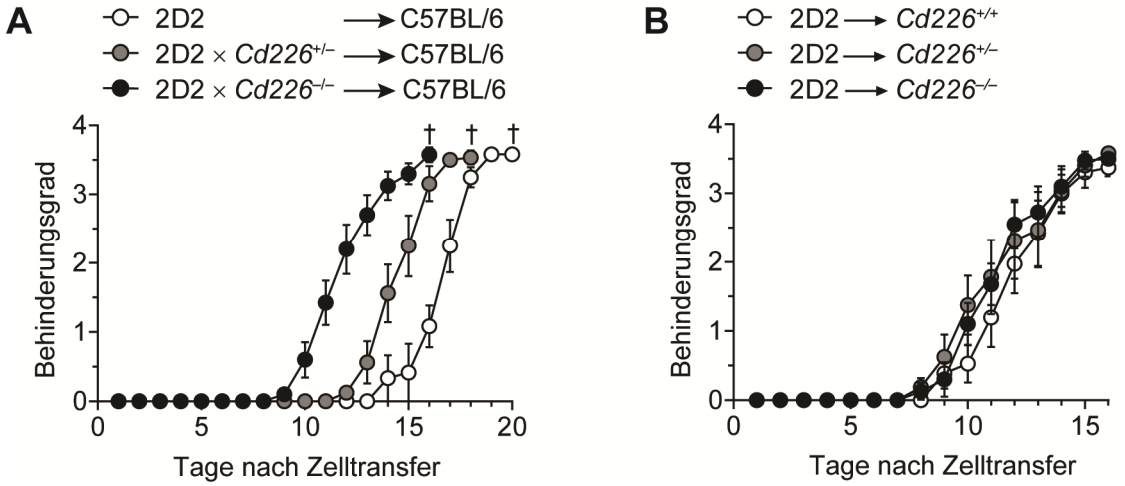


Abbildung 3.14. Der Transfer CD226-defizienter 2D2-Zellen bedingt ein schnelleres Einsetzen der EAE-Symptomatik. 1×10^6 *in vitro* aktivierte 2D2-transgene T-Zellen des angegebenen Genotyps wurden intraperitoneal in naive C57BL/6-Mäuse (A) bzw. in *Cd226*$^{+/-}$, *Cd226*$^{-/-}$ oder nicht-transgene Wurfgeschwister (B) transferiert, gefolgt von zwei Injektionen 67 ng PTx an Tag 0 und Tag 2. Die Beurteilung der EAE-Symptomatik erfolgte täglich: 0: keine Krankheitssymptome; 1: Plegie des Schwanzes; 2: Parese der Hinterläufe; 3. Plegie der Hinterläufe; 4: Plegie der Hinterläufe und Parese der Vorderläufe; 5: Tod. Nach Erreichen der Abbruchkriterien wurden die Mäuse getötet.

Mäuse, in die 2D2-transgene *Cd226*$^{-/-}$ Zellen injiziert worden waren, entwickelten schneller Lähmungserscheinungen als Mäuse, in die 2D2-transgene *Cd226*$^{+/+}$ transferiert worden waren (Abbildung 3.14 A). Das Einsetzen der Symptomatik geschah wiederum in einem Gen-Dosis-abhängigen Zusammenhang, da bei Mäusen, denen 2D2-transgene *Cd226*$^{+/-}$-Zellen gespritzt worden waren ein intermediärer Beginn der Symptome beobachtet wurde. Die Untersuchung weiterer Parameter ist in diesem Modell der EAE aufgrund des fulminanten Verlaufes nur eingeschränkt möglich. Diese Ergebnisse lassen jedoch auf einen T-zellintrinsischen Effekt der CD226-Defizienz auf die Pathogenese der EAE schließen, da alle Empfängertiere der gleichen Zuchtlinie entstammten und somit der einzige Unterschied in der Behandlung der Tiere in der Injektion von 2D2-Zellen unterschiedlicher *Cd226*-Genotypen bestand.

Um nun einen potentiellen Effekt anderer CD226-defizienter Zellen abgesehen von enzephalitogenen T-Zellen, z.B. APZ und Zellen des Nervensystems, auf den Verlauf der EAE zu untersuchen wurde ein adoptiver Transfer 2D2-transgener Wildtyp-T-Zellen in CD226-defiziente, -heterozygote und –suffiziente Mäuse durchgeführt. In diesem Experiment konnte keine Verschiebung des Einsetzens der EAE-Symptomatik beobachtet werden (Abbildung 3.14 B). Auch in der Kinetik des weiteren Verlaufs konnte kein Unterschied festgestellt werden. Dieses Ergebnis untermauert in Kombination mit den oben genannten Beobachtungen den Befund, dass es sich bei dem Effekt der CD226-Defizienz auf den Verlauf der EAE um einen T-zellvermittelten Effekt handeln könnte.

3.2.9 Möglicher Einfluss regulatorischer T-Zellen auf den adoptiven Transfer

Da ein Defekt der T_{reg}-Funktion in *Cd226*$^{-/-}$-Mäusen vorzuliegen scheint, wurde untersucht, ob regulatorische T-Zellen ebenfalls an dem durch CD226-Defizienz bedingten früheren Einsetzen der EAE-Symptomatik beteiligt sind. Im Laufe der *in vitro*-Aktivierung der 2D2-transgenen T-Zellen, die dem adoptiven Transfer vorausging, ging ein Großteil der Zellen, die keinen transgenen T-Zell-Rezeptor trugen aufgrund mangelnder Stimulation in Apoptose. Die Zellsuspension, die letztlich in die Mäuse injiziert wurde, bestand zu 90% aus $CD4^+$ TZR-transgenen T-Zellen, von denen lediglich 0,1% $Foxp3^+$ regulatorische T-Zellen waren (Abbildung 3.15). Sollte also der beobachtete Effekt auf die Funktion von CD226 in T_{reg}-Zellen zurückzuführen sein, so müsste diese bereits in der Kultur ihren Einfluss auf die Effektor-T-Zellen nehmen und nachhaltig beeinflussen, so dass der Verlauf der EAE verändert wird.

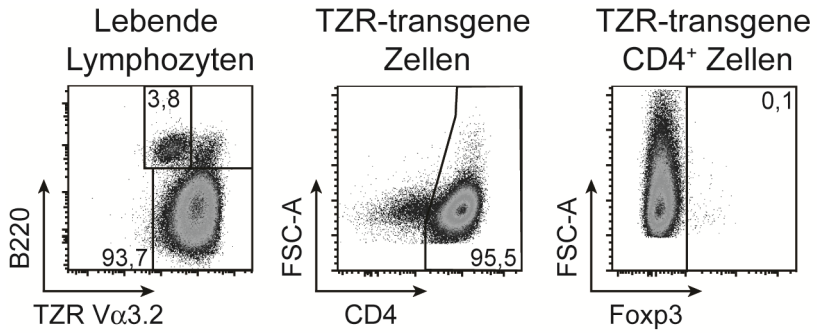


Abbildung 3.15: Zellzusammensetzung der Suspension, die beim adoptiven Transfer in Empfängertiere injiziert wird. 2D2-transgene Milzzellen wurden nach dem Protokoll 2.4.7.2 *in vitro* für eine Woche voraktiviert. Anschließend wurden die Zellen auf die Expression von Populationsmarkern durchflusszytometrisch analysiert. Es sind nur lebende Zellen dargestellt, da tote Zellen mithilfe einer Lebend-Tot-Zellfärbung im Vorfeld ausgeschlossen wurden.

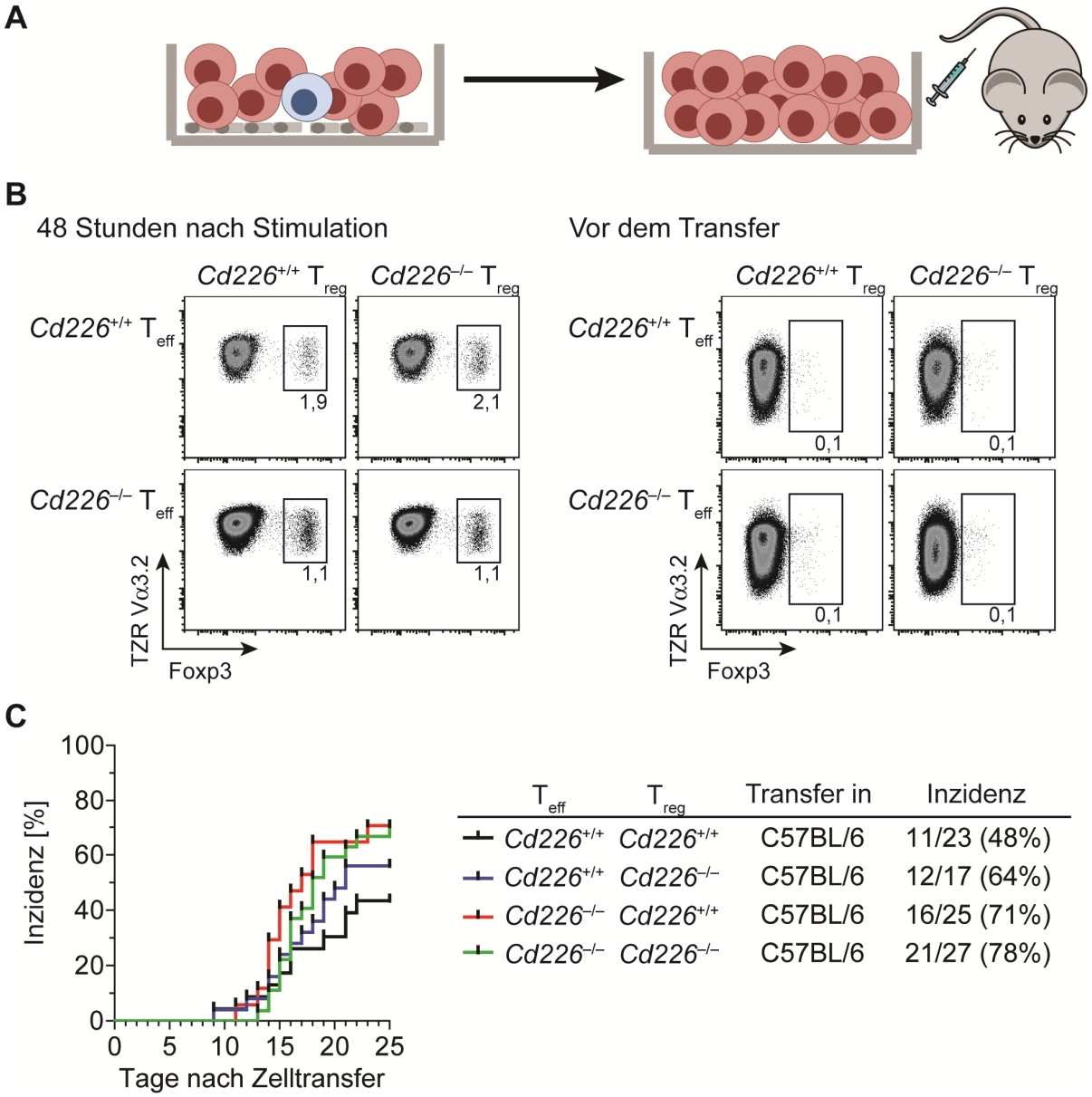


Abbildung 3.16: Kokultur mit *Cd226*$^{-/-}$ regulatorischen T-Zellen erhöht die Inzidenz der durch adoptiven Transfer induzierten EAE. (A) Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus: rot: CD4$^+$CD25$^-$ T_{eff}; blau: CD4$^+$CD25$^+$ T_{reg}; grau: bestrahlte, akzessorische Zellen. (B, C) CD4$^+$CD25$^-$ T_{eff}- und CD4$^+$CD25$^+$ T_{reg}-Zellen wurden mittels MACS-Isolation aus 2D2-transgenen Mäusen des angegebenen *Cd226*-Genotyps aufgereinigt und mit bestrahlten akzessorischen Zellen im Verhältnis 1 : 0,125 : 4 (T_{eff} : T_{reg} : *Feeder*) mit MOG_{35-55}, IL-2 und IL-7 stimuliert. Nach weiteren vier Tagen Inkubation mit IL-2 und IL-7 wurden die Zellen mit immobilisiertem anti-CD3- und anti-CD28-Antikörper für 24 Stunden restimuliert und 1×10^6 T-Zell-Blasten wurden jeweils in naive C57BL/6-Mäuse intraperitoneal injiziert. (B) Nach 48 Stunden (links) und vor dem Transfer (rechts) wurde der Anteil der Foxp3$^+$ T_{reg}-Zellen an 2D2-transgenen CD4$^+$ T-Zellen bestimmt. (B) Auftragung der Inzidenz der EAE-Symptomatik.

Um diese Frage zu beantworten, wurde ein abgewandeltes System für die Voraktivierung der 2D2-transgenen T-Zellen entwickelt. CD4$^+$CD25$^-$ Effektor-T-Zellen und CD4$^+$CD25$^+$ regulatorische T-Zellen wurden aus naiven 2D2-transgenen Mäusen der Genotypen *Cd226*$^{+/+}$ und *Cd226*$^{-/-}$ mittels MACS-Technologie isoliert und anschließend im distinkten Verhältnis von 8 : 1 (T_{eff} : T_{reg}) gemischt und mit einem 4-fachen Überschuss nicht-

transgener, bestrahlter akzessorischer Wildtypzellen in Kultur genommen (Abbildung 3.16 A). Die weitere Behandlung der Zellen erfolgte analog zur konventionellen Vorkultur des adoptiven Transfers. Nach Abschluss des Protokolls wurden 1×10^6 aktivierte T-Zell-Blasten in nicht-transgene naive Wildtyp-Mäuse injiziert und die Inzidenz gegen die Zeit nach dem Zelltransfer aufgetragen. Während zwei Tage nach Inkulturnahme noch etwa 1% lebende regulatorische T-Zellen nachweisbar waren, waren diese nach Ende der Kultur vor dem Transfer kaum noch detektierbar (Abbildung 3.16 A).

Dieses Experiment wurde dreimal durchgeführt und obwohl keine statistische Signifikanz erreicht wurde, lässt sich doch eine Tendenz erkennen (Abbildung 3.16 C). Unabhängig vom Genotyp der T_{reg}-Zellen, mit denen *Cd226*$^{-/-}$-T_{eff}-Zellen kultiviert worden waren, zeigten die Gruppen der Empfängertiere dieser Zellen die höchste Inzidenz. Im Gegensatz dazu war die Inzidenz der Mäuse, die mit *Cd226*$^{+/+}$ T_{eff}-Zellen behandelt worden waren, die einer *Cd226*$^{+/+}$ T_{eff} mit *Cd226*$^{+/+}$ T_{reg}-Kokultur entstammten bis zu 30% niedriger. *Cd226*$^{+/+}$ T_{eff}-Zellen, die mit *Cd226*$^{-/-}$-T_{reg}-Zellen kultiviert worden waren, lösten immerhin in 64% der Mäusen eine EAE aus, eine Steigerung um etwa 15% gegenüber einer Inzidenz von 48% in Mäusen, die mit Zellen einer reinen *Cd226*$^{+/+}$-Kultur behandelt worden waren.

Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass CD226-defiziente T-Zellen eine T_{reg}-unabhängige inhärente gesteigerte Enzephalitogenität im Vergleich zu CD226-suffizienten Zellen besitzen. Darüber hinaus scheinen regulatorische T-Zellen tatsächlich die *in vitro* Aktivierung von T-Zellen für den adoptiven Transfer dergestalt zu beeinflussen, dass eine eingeschränkte suppressive Kapazität, wie sie in *Cd226*$^{-/-}$ T_{reg}-Zellen vorliegt, zu einer erhöhten Inzidenz der EAE führen kann.

3.3 Analyse des Einflusses einer Defizienz des CD226-Liganden CD155 auf murine Immunzellen und den Verlauf der EAE

Eine reduzierte CD226-Expression führte im EAE-Modell zu einem verstärkten Krankheitsverlauf immunisierter Mäuse. Diese Beobachtung könnte auf die defizitäre suppressive Kapazität regulatorischer T-Zellen zurückzuführen sein. Um zu untersuchen, ob die Interaktion von CD226 mit dem Liganden CD155 für die beobachteten Phänomene verantwortlich ist, wurden weitere Charakterisierungen und Versuche mit CD155-defizienten Mäusen durchgeführt.

3.3.1 Charakterisierung der CD155-Expression auf murinen Immunzellen

Zunächst wurde die CD155-Expression auf murinen Immunzellen durchflusszytometrisch analysiert. Das Molekül war in naiven Mäusen sowohl auf T-Zellen, als auch auf einer Subpopulation von NK-Zellen exprimiert (Abbildung 3.17 A). Im Gegensatz zu CD226 ließ sich eine CD155-Färbung auch auf CD11b$^+$ Monozyten detektieren.

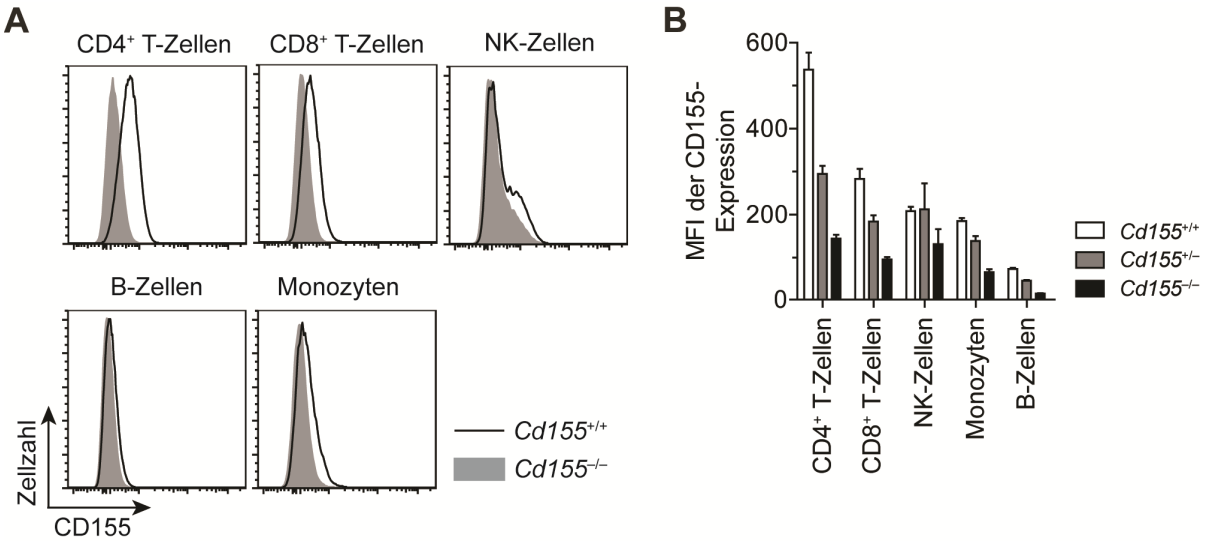


Abbildung 3.17: Charakterisierung der CD155-Expression auf murinen Immunzellen. Milzzellen naiver Mäuse des angegebenen *Cd155*-Genotyps wurden mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gefärbt und die CD155-Expression wurde durchflusszytometrisch analysiert. (A) Repräsentative Histogramm-Überlagerung der CD155-Expression in *Cd155*$^{+/+}$ und *Cd155*$^{-/-}$ Zellen. (B) Gemittelte mediane Fluoreszenzintensität aus n=3 Mäusen.

Die CD155-Expression folgte in *Cd155*$^{-/-}$ und *Cd155*$^{+/-}$-Mäusen einer Gen-Dosis-abhängigen Korrelation. In *Cd155*$^{-/-}$ konnte mithilfe durchflusszytometrischer Färbungen keine CD155-Expression nachgewiesen werden, während die Expression in *Cd155*$^{+/-}$-Mäusen in etwa der halben Expression in *Cd155*$^{+/+}$-Milzzellen entsprach (Abbildung 3.17 B).

3.3.2 Stimulationskinetik der CD155-Expression

CD155 könnte Teil eines Kostimulationsnetzwerks sein, das über die Interaktion mit CD226 auf T-Zellen zur Aktivierung von T-Zellen beitragen könnte. Da eine CD155-Expression *ex vivo* auf APZ, wie Monozyten, nachgewiesen werden konnte und diese somit eine CD155-vermittelte Kostimulation begünstigen könnten, wurde als nächstes untersucht, wie die CD155-Expression als Antwort auf unterschiedliche aktivierende Stimuli reguliert wird.

Zunächst wurden Milzzellen mit dem TLR4-Agonisten LPS stimuliert. Die so aktivierten B-Zellen, die im naiven Zustand keine CD155-Expression zeigten, regulierten CD155 stark hoch (Abbildung 3.18 A). Außerdem wurden aus Knochenmarkszellen dendritische Zellen generiert (BMDC; engl. *bone marrow-derived dendritic cells*) und diese mit unterschiedlichen Stimulantien behandelt. Diese Zellen exprimierten bereits im unstimulierten Zustand CD155, erhöhten diese Expression jedoch im Laufe der Stimulation mit LPS oder mit hitzeinaktivierten Mycobakterien um ein Vielfaches (Abbildung 3.18 B). Lediglich der Maturierungsmix, eine Mischung der Zytokine IL-1β, IL-6, TNF-α und PGE-2 führte nicht zu einer signifikanten Steigerung der CD155-Expression.

Da auch naive T-Zellen *ex vivo* eine CD155-Expression zeigten, war es von Interesse zu untersuchen, ob auch eine Interaktion von T-Zellen untereinander durch die Wechselwirkung von CD226 und CD155 zur Kostimulation beitragen könnte. In diesem Zusammenhang wurde analysiert, ob auch T-Zellen die CD155-Expression aktivierungsinduziert erhöhen. Milzzellen wurden mit anti-CD3-Antikörper behandelt und die CD155-Expression auf aktivierten $CD4^+$ T-Zellen gemessen. Interessanterweise erhöhten sowohl Effektor- als auch regulatorische T-Zellen ihre CD155-Expression aktivierungsinduziert um ein Vielfaches (Abbildung 3.18 C). Dabei wurde nach 24 Stunden die maximale Expression beobachtet, die im weiteren Verlauf der Inkubation wieder zurückging. Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass sowohl die CD226- als auch die CD155-Expression mit vergleichbarer Kinetik von T-Zellen reguliert wird und eine Rezeptor-Ligand-Interaktion nicht nur von T-Zellen mit APZ, sondern darüber hinaus von T-Zellen untereinander zur Kostimulation oder gegenseitiger Regulation beitragen könnte.

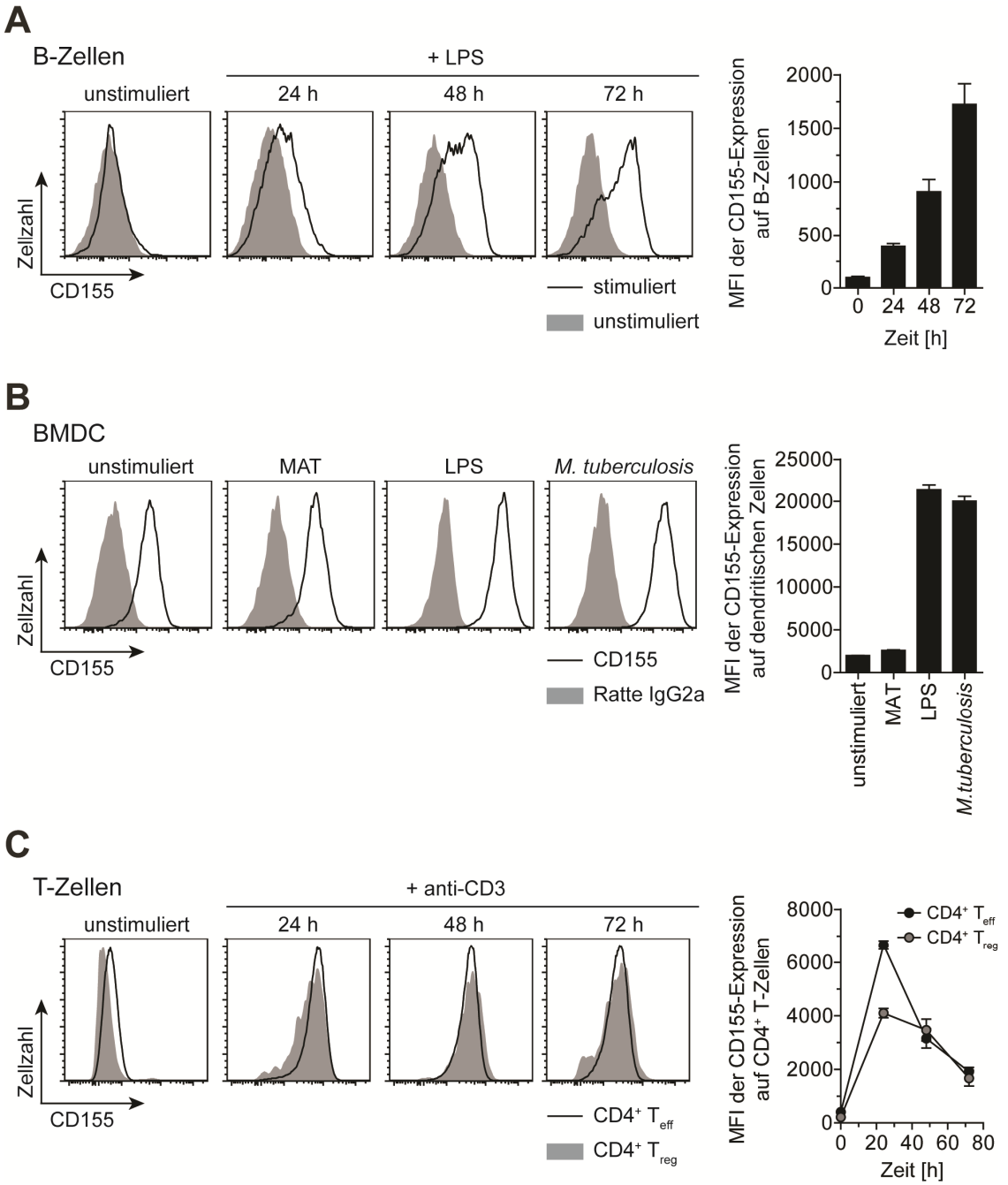
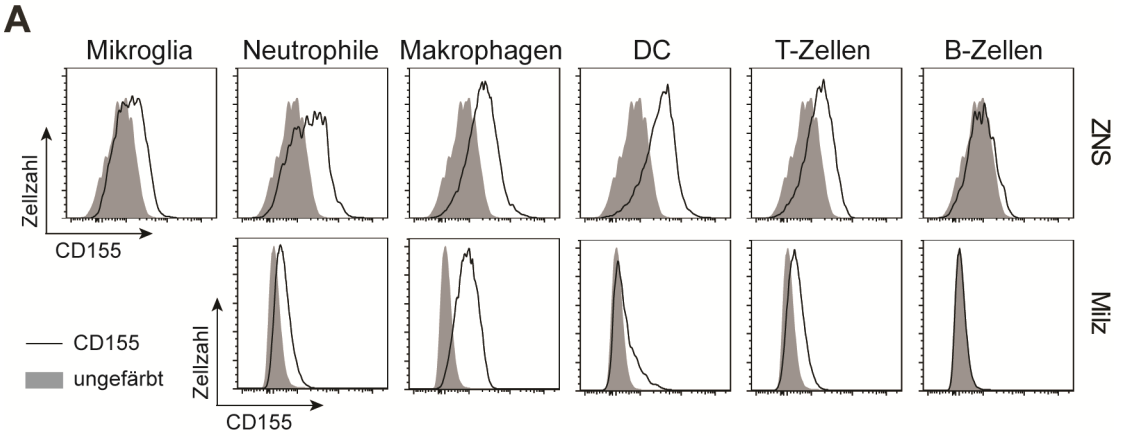


Abbildung 3.18: CD155 wird aktivierungsinduziert von B-Zellen, dendritischen Zellen und T-Zellen hochreguliert. (A) Milzzellen von naiven Wildtyp-Mäusen wurden mit 1 µg/ml LPS stimuliert und zu den angegebenen Zeitpunkten für die Durchflusszytometrie gefärbt. Links: repräsentative Histogramm-Überlagerungen der CD155-Expression auf stimulierten (schwarze Linie) im Vergleich zu unstimulierten B-Zellen (graue Fläche). Rechts: Gemittelte mediane Fluoreszenzintensitäten aus n=3 Experimenten. (B) Dendritische Zellen wurden aus Knochenmarksvorläuferzellen differenziert und mit 1 µg/ml LPS, 100 µg/ml hitzeinaktivierten *M. tuberculosis* oder mit einer Zytokinmischung (MAT) für 24 Stunden stimuliert. CD155-Expression wurde links in repräsentativen Histogramm-Überlagerungen (CD155-Färbung: schwarze Linie; Isotypkontrollfärbung: graue Fläche) und rechts als gemittelte mediane Fluoreszenzintensität aus n=3 Experimenten dargestellt. (C) Milzzellen naiver Wildtyp-Mäuse wurden mit 1 µg/ml anti-CD3-Antikörper stimuliert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen gefärbt. Bei der Analyse wurde zwischen $CD4^+Foxp3^-$ T_{eff}- (schwarze Linie) und $CD4^+Foxp3^+$ T_{reg}-Zellen (graue Fläche) unterschieden. Links: repräsentative Histogramm-Überlagerungen von T_{eff}- und T_{reg}-Zellen; rechts: zusammengefasste Daten aus n=5 Mäusen.

3.3.3 CD155-Expression auf ZNS-infiltrierenden Zellen

Da eine hohe CD155-Expression mit der Aktivierung insbesondere von APZ und T-Zellen korrelierte, wurde im nächsten Schritt untersucht, inwiefern die starke autoimmune Inflammation während einer EAE, die CD155-Expression beeinflusst. Dazu wurde die CD155-Expression auf unterschiedlichen Zellpopulationen in der Milz und auf ZNS-infiltrierenden Zellen während der akuten Phase der EAE-Erkrankung getestet.

Mikroglia-Zellen, ZNS-residente Granulozyten, wiesen im akuten Stadium der EAE ein niedriges CD155-Expressionsniveau auf (Abbildung 3.19). Neutrophile, professionelle APZ, wie Makrophagen und dendritische Zellen sowie T-Zellen schienen ihre CD155-Expression mit der Infiltration ins ZNS im Vergleich zu peripheren Zellen zu erhöhen. Besonders prominent ist die Steigerung der Expression in dendritischen Zellen und Makrophagen zu beobachten. B-Zellen, die auch als nicht-professionelle antigenpräsentierende Zellen fungieren, veränderten ihre CD155-Expression im Laufe der EAE nicht.



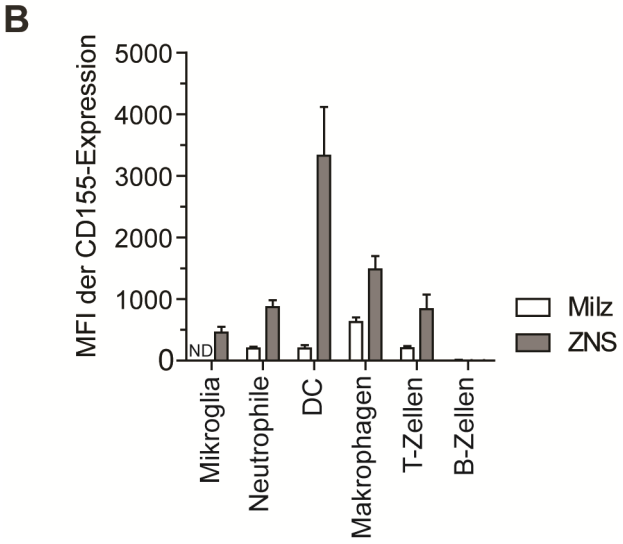


Abbildung 3.19: ZNS-infiltrierende antigenpräsentierende Zellen besitzen eine hohe CD155-Expression. In C57BL/6-Mäusen wurde eine EAE induziert. Zum akuten Zeitpunkt wurden ZNS-infiltrierende Immunzellen isoliert, für Zellpopulationsmarker und CD155 gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Dabei wurde zwischen den angegebenen Zellpopulationen unterschieden. (A) Repräsentative Histogramm-Überlagerungen der CD155-Expression (schwarze Linie) mit für CD155-ungefärbten Kontrollzellen (graue Fläche) im ZNS (oben) und in der Milz (unten). (B) Gemittelte mediane Fluoreszenzintensität der CD155-Expression, von der die Fluoreszenzintensität der ungefärbten Kontrolle abgezogen wurde von n=5 Mäusen.

3.3.4 Charakterisierung der CD155-defizienten Maus

Da eine CD226-Defizienz zu einem erhöhten Prozentsatz regulatorischer T-Zellen innerhalb der $CD4^+$ T-Zellen führte, und dieser Befund evtl. durch eine gestörte Wechselwirkung mit dem CD226-Liganden CD155 zu erklären sein könnte, wurde als nächstes untersucht, ob in CD155-defizienten Mäusen ebenfalls Veränderungen im T-Zell-Kompartiment oder in anderen Zellpopulationen der Milz nachgewiesen werden können. Dazu wurden Milzzellen von *Cd155*$^{-/-}$ und *Cd155*$^{+/-}$-Mäusen hinsichtlich der Zusammensetzung der Zellpopulationen mit Milzzellen von nicht-transgenen Wurfgeschwistern verglichen. Bei der Analyse konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Milzen der unterschiedlichen Genotypen festgestellt werden. Im Gegensatz zu CD226-defizienten Mäusen war auch der Anteil $Foxp3^+$ regulatorischer T-Zellen an Gesamt-$CD4^+$ T-Zellen zwischen allen Gruppen vergleichbar.

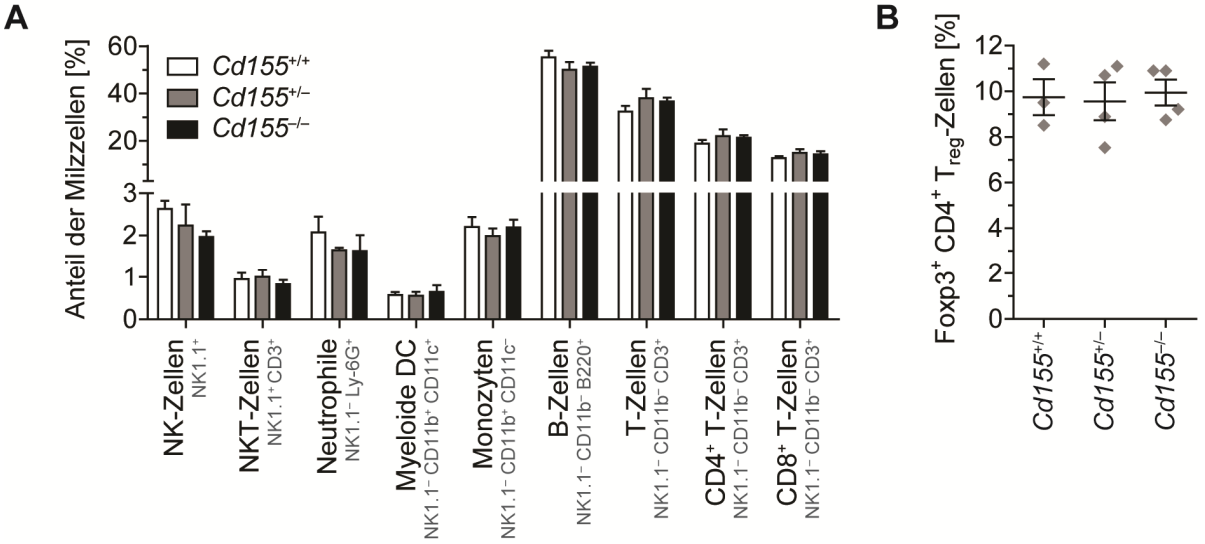


Abbildung 3.20: Zellpopulationen der Milz von *Cd155*-defizienten Mäusen. Milzen von *Cd155*$^{-/-}$-Mäusen wurden mit heterozygoten bzw. nicht-transgenen Wurfgeschwistern hinsichtlich der Zusammensetzung der Immunzellpopulationen verglichen. (A) Zusammengefasste Daten des prozentualen Anteils der angegebenen Immunzellpopulationen an der Gesamtmilz von n=3-4 Mäusen. (B) Anteil der $Foxp3^+$ T_{reg}-Zellen an Gesamt-$CD4^+$ T-Zellen der Milz.

3.3.5 Kein Einfluss einer CD155-Defizienz auf die T-Zell-Proliferation bei Kokultur mit T_{reg}-Zellen

CD226-defiziente regulatorische T-Zellen zeigten eine verminderte suppressive Kapazität im Vergleich zu Wildtyp-T_{reg}-Zellen. CD226 scheint demnach für die inhibitorische Funktion von regulatorischen T-Zellen eine wichtige Rolle zu spielen. Da CD155 ein wichtiger Interaktionspartner von CD226 ist, lag die Vermutung nahe, dass die Funktion von CD226 für die Aktivität von T_{reg}-Zellen über eine Interaktion mit CD155 auf Effektor-T-Zellen vermittelt werden könnte.

Um diese Frage zu beantworten wurde ein T_{reg}-Suppressionsassay mit CD155-defizienten T_{reg}- und T_{eff}-Zellen durchgeführt. $CD4^+CD25^+$ T_{reg}-Zellen und $CD4^+CD25^-$ T_{eff}-Zellen

wurden mittels MACS-Technologie aus Milzen von CD155-defizienten Mäusen und nicht-transgenen Wurfgeschwistern isoliert und unter Zugabe von akzessorischen Milzzellen von Wildtyp-Mäusen in unterschiedlichen Verhältnissen wieder gemischt und mit anti-CD3-Antikörper stimuliert.

Die resultierende Proliferation wies keine signifikanten Unterschiede zwischen den unterschiedlichen Bedingungen auf (Abbildung 3.21). Weder eine CD155-Defizienz der T_{reg}-Zellen noch eine CD155-Defizienz der T_{eff}-Zellen beeinflusste die Suppression der Proliferation der T_{eff}-Zellen, so dass jeweils kein Unterschied zu nicht-transgenen Bedingungen festgestellt werden konnte. Die CD155-Expression von $CD4^+$ T_{eff}-Zellen und von $CD4^+$ T_{reg}-Zellen hat somit keinen Einfluss auf die suppressive Kapazität von regulatorischen T-Zellen *in vitro*.

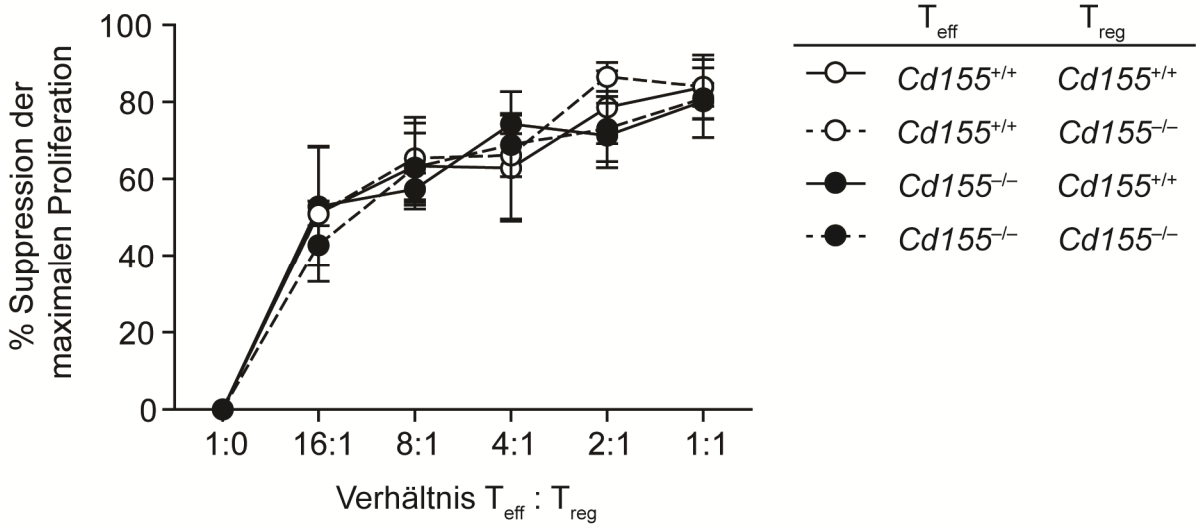


Abbildung 3.21: Eine CD155-Defizienz beeinflusst weder die suppressive Kapazität von regulatorischen T-Zellen noch die Supprimierbarkeit von Effektor-T-Zellen. $CD4^+CD25^-$ T_{eff}- und $CD4^+CD25^+$ T_{reg}-Zellen der angegebenen *Cd155*-Genotypen wurden mittels magnetisch-aktivierter Zellsortierung aufgereinigt und in den dargestellten Zellzahlverhältnissen zusammen unter anti-CD3-Antikörper-Stimulation inkubiert. Nach dreitägiger Inkubation wurde die Proliferation mittels ^{3}H-Thymidin-Inkorporation quantifiziert und auf die maximale Proliferation der T_{eff}-Zellen ohne Zugabe von T_{reg}-Zellen normalisiert.

3.3.6 *Cd155*$^{-/-}$-Mäuse zeigen keine Änderung des EAE-Verlaufs

Da CD155 ein wichtiger Ligand von CD226 ist und eine reduzierte CD226-Expression zu einem schwereren EAE-Verlauf führte, wurde als nächstes der Frage nachgegangen, ob eine CD155-Defizienz ebenfalls den Krankheitsverlauf der EAE beeinflusst. Dazu wurden CD155-defiziente und heterozygote Mäuse sowie nicht-transgene Wurfgeschwister durch Injektion einer Emulsion des MOG_{35-55}-Peptids in KFA, gefolgt von intravenösen Injektionen von Pertussis Toxin zum Zeitpunkt der Immunisierung und 48 Stunden später immunisiert, wobei Konzentrationen der Agenzien verwendet wurden, die der vollen Immunisierungsdosis entsprachen.

Der EAE-Verlauf von Mäusen der drei *Cd155*-Genotypen wies nach 30 Tagen Beobachtungszeit keine signifikanten Unterschiede auf (Abbildung 3.22 A). Sowohl im Beginn der Symptomatik als auch im Maximalscore sowie im kumulativen Score und der Inzidenz- und Abbruchrate war kein genotypenspezifischer Unterschied nachweisbar (Tabelle 3.7). Eine CD155-Defizienz hat somit keinen Einfluss auf den Verlauf der aktiv induzierten EAE.

Tabelle 3.7: EAE in CD155-defizienten Mäusen bei aktiver Immunisierung. Gemittelte Werte ± SEM.

	Inzidenz	Mortalität	Krankheitsbeginn (Tage nach Immunisierung)	Kumulativer Score	Maximal-score
***Cd155*$^{+/+}$**	21/21	3/21	8,4 ± 1,5	53,2 ± 10,8	3,3 ± 0,3
***Cd155*$^{+/-}$**	18/18	4/18	8,2 ± 1,3	54,5 ± 8,2	3,4 ± 0,5
***Cd155*$^{-/-}$**	17/18	2/18	8,0 ± 0,8	54 ± 7,1	3,5 ± 0,5

Neben der aktiven Immunisierung, wurde außerdem in *Cd155*$^{-/-}$, *Cd155*$^{+/-}$ und *Cd155*$^{+/+}$-Mäusen eine EAE durch den adoptiven Transfer von *in vitro* aktivierten 2D2-transgenen CD4^{+} T-Zellen induziert. So sollte der Einfluss einer CD155-Defizienz in APZ auf die Restimulation enzephalitogener T-Zellen untersucht werden und inwiefern bei dieser Konstellation der Verlauf einer passiv induzierten EAE verändert wird. Auch bei diesem Protokoll war kein Unterschied zwischen Mäusen der verschiedenen Genotypen festzustellen (Abbildung 3.22 B). Die Interaktion von CD226 mit CD155 in Empfängertieren ist somit ebenfalls von untergeordneter Bedeutung für die Entwicklung einer EAE.

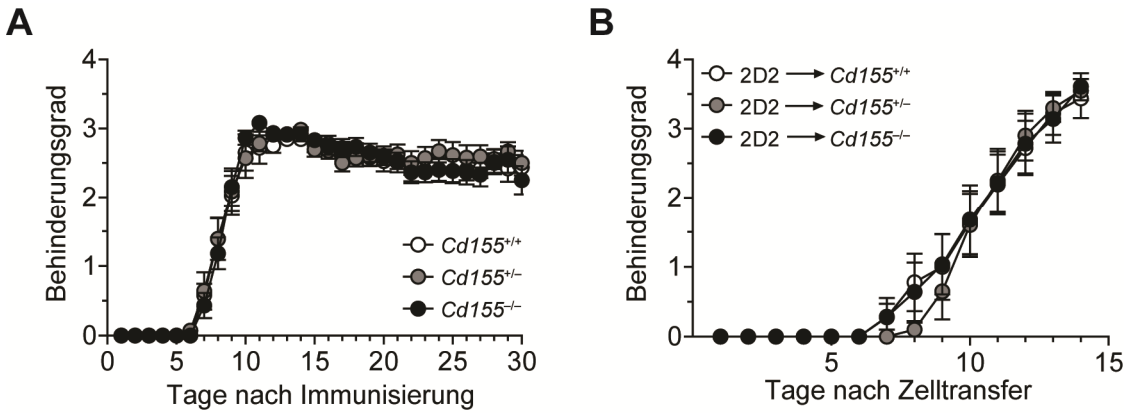


Abbildung 3.22: Eine CD155-Defizienz verändert den Verlauf der EAE nicht. (A) In Mäusen der angegebenen *Cd155*-Genotypen wurde nach dem Protokoll der vollen Immunisierung eine EAE induziert (siehe Kapitel 2.4.7.1). Der Behinderungsgrad der Mäuse wurde täglich beurteilt. 0: keine Krankheitssymptome; 1: Plegie des Schwanzes; 2: Parese der Hinterläufe; 3. Plegie der Hinterläufe; 4: Plegie der Hinterläufe und Parese der Vorderläufe; 5: Tod. (B) 1×10^{6} *in vitro* aktivierte 2D2-transgene T-Zell-Blasten wurden intraperitoneal in Mäuse des angezeigten *Cd155*-Genotyps injiziert, gefolgt von zwei Injektionen 67 ng PTx an Tag 0 und Tag 2. Der Behinderungsgrad wurde täglich begutachtet und gegen die Zeit nach Zelltransfer dargestellt.

4 Diskussion

In mehreren genetischen Studien wurde ein SNP im *CD226*-Gen mit einem erhöhten Risiko für Autoimmunerkrankungen assoziiert[44]. Die funktionelle Relevanz dieses SNPs für die Expression des Moleküls und für die Pathogenese der MS und der EAE sollte im Rahmen dieser Doktorarbeit analysiert werden.

Assoziation eines SNP-Haplotyps des CD226-Gens mit einem erhöhten Risiko für Multiple Sklerose

Zunächst wurden gesunde Individuen und MS-Patienten hinsichtlich ihres *CD226*-Genotyps untersucht. Dabei wurde der Fokus auf zwei unterschiedliche SNPs gelegt, zum einen den SNP rs763361, der initial als kausaler Faktor des erhöhten Risikos im *CD226*-Genlokus identifiziert wurde[36] und zum anderen den SNP rs727088, der in einer Studie von Löfgren *et al.* als entscheidende SNP-Variante postuliert wurde[39]. Das Kopplungsungleichgewicht, in dessen Folge die beiden SNPs mit einer Wahrscheinlichkeit von ca. 95%[39] gemeinsam vererbt werden, wurde auch in der vorliegenden Kohorte bestätigt, weshalb eine Analyse der Effekte der beiden SNPs unabhängig voneinander nicht möglich war.

Interessanterweise ist auch in der zahlenmäßig recht kleinen Kohorte, die im Rahmen dieser Arbeit analysiert wurde, der Trend eines erhöhten MS-Risikos in Trägern des Risikohaplotyps zu erkennen (P=0,068 für rs727088^{G} und P=0,175 für rs763361^{T}). In den großen genomweiten Assoziationsstudien, die mehrere Tausend MS-Patienten und gesunde Individuen analysierten, war keine statistisch signifikante Assoziation eines SNPs im *CD226*-Genlokus mit einem erhöhten MS-Risiko identifiziert worden[28,30]. Lediglich kleinere Studien distinkter Populationen untermauerten den Einfluss dieses Genlokus für das MS-Risiko[44], was eventuell ein Hinweis darauf sein könnte, dass die Effektgröße dieser Genvariante recht klein ist und sich nur in gut kontrollierten Kohorten, mit MS-Patienten mit einem möglichst homogenen Krankheitsverlauf herauskristallisiert.

Auch wenn die bekannten Autoimmunerkrankungen in der Pathogenese und in den zugrundeliegenden Mechanismen stark variieren, wurden durch genetische Assoziationsstudien einige konservierte Signalwege identifiziert, die zur Pathologie unterschiedlicher Autoimmunerkrankungen beizutragen scheinen. So lässt sich für die Erkrankungen, für die eine Assoziation mit der Risikovariante des *CD226*-Gens beschrieben wurde, unter anderem rheumatoide Arthritis, Typ-1 Diabetes und Multiple Sklerose[44] das gemeinsame Merkmal einer fehlregulierten T-Zell-Immunität feststellen, die letztendlich in verschiedenen organspezifischen Pathologien resultiert[230]. Dieser Befund wird unter anderem dadurch untermauert, dass die stärksten Assoziationen der genannten Autoimmunerkrankungen mit unterschiedlichen Risikoallelen des MHC-II-Lokus vorliegen[231]. Die Varianten dieses Lokus sind untrennbar mit der Entwicklung und der

Formung des Repertoires exprimierter T-Zell-Rezeptoren und damit mit der Differenzierung autoreaktiver T-Zellen verknüpft. Über Risikoassoziationen des MHC-Lokus hinaus wurden unter anderem auch genetische Varianten des IL-2Rα sowohl mit MS als auch mit Typ-1 Diabetes assoziiert[232]. Eine Risikovariante führt zur Erhöhung des Serumspiegels des löslichen IL-2-Rezeptors[233]. Dieser ist wiederum in der Lage das für die Homöostase und Aktivierung von T_{reg}-Zellen essentielle Zytokin IL-2 zu neutralisieren. So wäre es möglich, dass eine Risikovariante des IL-2-Rezeptors direkt die Funktion von T_{reg}-Zellen beeinträchtigt – ein Effekt, der für eine Reihe von Autoimmunerkrankungen relevant sein könnte und so eine gemeinsame genetische Assoziation plausibel erklären würde. Auch CD226 ist an der Kostimulation von T-Zellen beteiligt und könnte so Teil eines bis jetzt wenig verstandenen, konservierten immunologischen Netzwerks sein, dessen Assoziation deshalb für unterschiedliche Autoimmunerkrankungen nachgewiesen wurde.

Träger des Risikohaplotyps besitzen eine verringerte CD226-Expression auf der Oberfläche von Gedächtnis-T-Zellen.

CD226 wird in unterschiedlichen Immunzellpopulationen exprimiert. Während in der Literatur vor allem ein Fokus auf die Untersuchung der Funktion der CD226-Expression von zytotoxischen $CD8^+$ T-Zellen und NK-Zellen für die Immunantwort gegen entartete Tumorzellen gelegt wurde[234], konzentrierte sich die vorliegende Arbeit auf die Funktion des Moleküls für $CD4^+$ Effektor-T-Zellen und regulatorische $CD4^+$ T-Zellen.

Besonders auffällig war zunächst das unterschiedliche Expressionsniveau in naiven verglichen mit Gedächtnis-T-Zellen, die sowohl in humanen als auch in murinen $CD4^+$ T-Zellen beobachtet wurde. Obwohl auch in naiven $CD4^+$ T-Zellen eine $CD226^+$-Population zu beobachten ist, scheinen alle $CD45RA^-$ und damit Gedächtnis-T-Zellen eine konstitutiv hohe CD226-Expression aufzuweisen.

In einer 2011 von Löfgren *et al*. veröffentlichten Publikation wurde ebenfalls eine genotypspezifische Verringerung der CD226-Expression in Zellen von Trägern des Risikogenotyps beschrieben[39], wobei keine Stratifizierung anhand des Gedächtnis-Zell-Differenzierungsstatus der T-Zellen erfolgte. Diese Ergebnisse wurden in der vorliegenden Arbeit bestätigt und um einige Erkenntnisse erweitert. So traf die verringerte CD226-Expression in Zellen von homozygoten Trägern des Risikohaplotyps in erster Linie auf $CD4^+$ und $CD8^+$ Gedächtnis-T-Zellen zu – in naiven T-Zellen war kein Unterschied nachweisbar. Dieses Ergebnis wird des Weiteren untermauert, da es sich bei dem beobachteten Effekt um einen Gen-Dosis-abhängigen Zusammenhang handelte, da Gedächtnis-T-Zellen heterozygoter Träger eine intermediäre CD226-Expression aufwiesen.

Darüber hinaus konnte der besagte Effekt nicht nur in $CD4^+$ Effektor-T-Zellen festgestellt werden, sondern auch in $CD4^+$ T_{reg}-Zellen. Dieses Ergebnis ist insofern von großem Interesse, da die Expression von CD226 auf Gedächtnis-T_{reg}-Zellen in dieser Form bisher

noch nicht gezeigt wurde. Auch Hinweise auf die Funktion von CD226 auf Foxp3$^+$ T_{reg}-Zellen fehlen in der Literatur.

Bereits in der ersten Assoziationsstudie, die eine Verbindung zwischen einem SNP im *CD226*-Gen und einem erhöhten Risiko an Diabetes zu erkranken, herstellte, wurde postuliert, dass der SNP rs763361 die Expression der mRNA beeinflussen könnte[36]. Die Risikovariante rs763361^T komplettiert eine putative *exonic splicing silencer* Sequenz (ESS), die im Falle der protektiven SNP-Sequenz unterbrochen wird. In Trägern des Risiko-SNPs würde demnach eine Einschränkung des Splice-Prozesses zwischen dem Exon 6 und Exon 7 erfolgen und damit geringere Mengen der reifen CD226-mRNA gebildet werden. Ferner handelt es sich beim SNP rs763361 um einen nicht-synonymen SNP, der zu einem Austausch der Aminosäuren Glycin (protektiv) gegen Serin (Risiko) führt. Da diese Aminosäuresubstitution an der Position 307 die signalgebende, intrazelluläre Domäne des Proteins betrifft, könnte es zu einer veränderten Signalkaskade nach CD226-Aktivierung kommen. Dies könnte vor allem relevant sein, da sich in direkter Umgebung zwei bekannte Serin-Phosphorylierungsstellen, Ser^{322} und Ser^{329}, befinden, die für die Interaktion des CD226-Moleküls mit LFA-1 und damit für die Kostimulation von T-Zellen erforderlich sind[45,190,202].

Im Gegensatz zu diesen zwei Theorien stellten Löfgren *et al.* die These auf, dass es sich bei der kausalen Risikovariante des *CD226*-Genlokus nicht wie bislang angenommen um den SNP rs763361, sondern vielmehr um den SNP rs727088 handelt, der im Kopplungsungleichgewicht mit rs763361 vererbt wird[39]. Dazu führten sie Expressionsstudien mithilfe eines Luciferase-Konstruktes durch, deren Ergebnisse sie zu dem Schluss brachte, dass die Risikovariante des rs727088 SNPs eine verringerte Expression der CD226-mRNA hervorruft. Da dieser SNP in der 3‘-untranslatierten Region der CD226-mRNA lokalisiert ist, wäre die Reduktion der Expression vermutlich auf Mechanismen zurückzuführen, die entweder die Transkription oder Translation der RNA beeinflussen oder aber die RNA destabilisieren, die dadurch schneller degradiert wird. Löfgren *et al*. konnten in dem von ihnen gewählten experimentellen System keine Beschleunigung der Degradation der mRNA der Risikohaplotypsequenz feststellen[39]. Weitere Experimente werden nötig sein, um die regulatorischen Elemente, wie z.B. miRNA zu identifizieren, die zur verringerten Expression des CD226-Proteins in Trägern des Risikohaplotyps beitragen.

Auch Gedächtnis-T-Zellen und NK-Zellen von MS-Patienten weisen eine im Vergleich zu gesunden Individuen verringerte CD226-Expression auf

Überraschenderweise ließ sich in Zellen von MS-Patienten kein Unterschied der CD226-Expression in Abhängigkeit vom Genotyp der Individuen nachweisen. Es zeigte sich vielmehr, dass die CD226-Expression in CD4$^+$ Gedächtnis-T-Zellen von MS-Patienten eine signifikant geringere Fluoreszenzintensität aufwies als vergleichbare Zellen von gesunden

Individuen. Der gleiche Trend wurde auch für $CD8^+$ Gedächtnis-T-Zellen sowie $CD56^{bright}$-Zellen bestätigt.

Diese Beobachtung legt den Schluss nahe, dass eine niedrige CD226-Expression nicht nur mit einem potentiellen Risikohaplotyp in gesunden Individuen korreliert, sondern sogar ein spezifisches Charakteristikum von Gedächtnis-T-Zellen an MS erkrankter Patienten darstellt, die unabhängig vom Genotyp der Patienten auftritt.

Für ein solches Phänomen gibt es verschiedene Erklärungsansätze. Zum einen weisen die Erkenntnisse dieser Arbeit darauf hin, dass eine reduzierte CD226-Expression mit einer deregulierten Immunantwort durch T_{reg}-Zellen und einer Hyperresponsivität von T_{eff}-Zellen korreliert. In MS-Patienten des Risikohaplotyps könnte eine solche Fehlregulation vorliegen, wodurch die verringerte CD226-Expression genetisch bedingt im Zusammenspiel mit weiteren bislang unbekannten Risikofaktoren zur Pathogenese der MS beitragen könnte.

Auf der anderen Seite wiesen auch MS-Patienten des protektiven Haplotyps eine geringere CD226-Expression auf als gesunde Träger dieses Haplotyps. Neben der verringerten CD226-Expression auf Zellen von Trägern des Risikohaplotyps wurde eine vergleichbare Reduktion der CD226-Expression ebenfalls mit einem Erschöpfungszustand HIV-spezifischer $CD8^+$ T-Zellen assoziiert[188]. Auch $CD4^+$ T-Zellen können bei anhaltender Antigenstimulation im Falle von chronischen viralen Infektionen[235–237] oder Tumorerkrankungen[238–240] einen Erschöpfungszustand einnehmen, im Zuge dessen sie die Sekretion der pro-inflammatorischen Zytokine IL-2, TNF-α und IFN-γ reduzieren und letztendlich sogar in einigen Fällen in Apoptose gehen. Dieser Erschöpfungszustand der Immunantwort führt zwar nicht zur Eliminierung, sondern nur zu Eindämmung einer viralen Infektion, bzw. des Tumors, wendet aber pathologische Effekte einer überschießenden Immunantwort vom Wirtsorganismus ab[241]. Erschöpfungszustände von T-Zellen wurden für Autoimmunerkrankungen bisher nicht beschrieben, da diese Pathologien eher durch eine überschießende Immunantwort und mangelnde Regulation gekennzeichnet sind. Auch potentielle Erschöpfungszustände von T_{reg}-Zellen aufgrund derer sie ihre suppressive Kapazität verringern, wurden im Zusammenhang mit MS zwar diskutiert[132], aber bislang nicht schlüssig bewiesen.

Die Erkenntnisse von murinen *in vivo* Experimenten dieser Arbeit legen außerdem den Schluss nahe, dass eine verringerte CD226-Expression zu einer Erhöhung der Enzephalitogenität von $CD4^+$ T-Zellen beiträgt, die sich nur schwer mit einem potentiellen Erschöpfungszustand dieser Zellen vereinbaren ließe. Die Frage, was die Ursache der niedrigen CD226-Expression in MS-Patienten des protektiven Genotyps ist, sollte in weiteren Studien adressiert werden. Außerdem wäre es interessant langfristig gesunde Träger des protektiven Haplotyps zu verfolgen, die ebenfalls eine niedrige CD226-Expression aufweisen. Eventuell liegt in diesen Individuen ebenfalls eine Prädisposition für Autoimmunerkrankungen vor und so könnte eine niedrige CD226-Expression unabhängig von genetischen Varianten als diagnostischer Marker zu Rate gezogen werden.

T-Zellen erhöhen ihre CD226-Expression aktivierungsinduziert

Eine stimulationsinduzierte Erhöhung der CD226-Expression wurde sowohl für humane[205], als auch für murine[207] $CD4^+$ T-Zellen beschrieben und konnte ebenfalls im Rahmen dieser Arbeit bestätigt werden. Jedoch scheint die Regulation des Expressionsniveaus im besonderen Maße von der Art, der Intensität und der Dauer des Stimulus abzuhängen. Eine schnelle Hochregulation scheint vor allem bei starker Stimulation einzutreten, entweder durch Zugabe der Antikörper gegen CD3 und CD28[205,207], durch Quervernetzung der T-Zell-Rezeptoren durch immobilisierten anti-CD3-Antikörper oder durch Zugabe des spezifischen Antigens der T-Zellen. Stimuliert man die Zellen hingegen weniger intensiv, beispielsweise durch Zugabe einer niedrigen Konzentration des löslichen anti-CD3-Antikörpers in den Überstand, bleibt die CD226-Expression in $CD4^+$ Effektor-T-Zellen beinahe konstant und wird nur in $Foxp3^+$ T_{reg}-Zellen erhöht. Dieses Ergebnis könnte auf eine spezifische Regulation des CD226-Moleküls in T_{reg}-Zellen auch unter suboptimalen Stimulationsbedingungen hindeuten.

Darüber hinaus scheint durch eine Stimulation der T-Zellen eine Anpassung des CD226-Expressionsniveaus zwischen T_{eff}- und T_{reg}-Zellen stattzufinden. Kurzzeitig ist die Expressionshöhe von CD226 auf beiden T-Zellsubpopulationen nahezu identisch, beide Zellpopulationen können damit auch Signale gleicher Intensität durch eine CD226-Kostimulation empfangen. Ob diese Kostimulation durch CD155 oder CD112 auf APZ vermittelt wird und welcher Art die resultierende Reaktion im Hinblick auf Differenzierung, Zytokinsekretion und Effektormechanismen der T_{eff}- und T_{reg}-Zellen sind, sollte in weiteren Experimenten analysiert werden.

Ex vivo wiesen homozygote Träger des Risikohaplotyps eine verringerte CD226-Expression auf der Oberfläche von $CD4^+$ und $CD8^+$ Gedächtnis-T-Zellen auf. Bemerkenswerterweise konnte der Unterschied der CD226-Expression zwischen Individuen unterschiedlicher *CD226*-Genotypen nicht nur *ex vivo* beobachtet werden, sondern auch nach einer Stimulation der T-Zellen bestätigt werden. Während $CD4^+$ T- Zellen von homozygoten Trägern des protektiven Haplotyps die CD226-Expression aktivierungsinduziert erhöhten, steigerten Zellen von homozygoten Trägern des Risikohaplotyps die CD226-Expression nur marginal. Dies hing nicht mit einer defizitären Aktivierung der T-Zellen zusammen, da kein Unterschied in der Hochregulation des Aktivierungsmarkers CD69, ein Glykoprotein, das in Folge einer Stimulation von T-Zellen schnell hochreguliert wird[242], beobachtet werden konnte.

In Kombination mit der beobachteten Anpassung des CD226-Expressionsniveaus von T_{eff}- und T_{reg}-Zellen nach Stimulation stellt sich die Frage, ob in Zellen von Trägern des Risikohaplotyps eventuell keine entsprechende Erhöhung der CD226-Expression in T_{reg}-Zellen vollzogen wird. T_{eff}-Zellen, die durch eine erhöhte Ausgangsexpression von CD226 gekennzeichnet sind, würden vermutlich nach der Stimulation eine gegenüber T_{reg}-Zellen deutlich erhöhte CD226-Expression aufweisen, da diese aufgrund ihrer defizitären Kapazität einer CD226-Hochregulation das Expressionsniveau nach Stimulation nicht

anpassen könnten. In der Folge würde ein stärkeres kostimulatorisches Signal an T_{eff}-Zellen erfolgen, während T_{reg}-Zellen aufgrund des verminderten CD226-Signals weniger effizient aktiviert würden, was zur verminderten suppressiven Kapazität beitragen könnte. Eine Reihe von Studien weisen darauf hin, dass das exakte Zusammenspiel von kostimulatorischen und koinhibitorischen Interaktionen über den Ausgang einer T-Zell-Immunreaktion entscheidet[98]. Da diese Systeme untereinander nur wenig Redundanz aufweisen, so dass Funktionen nicht gegenseitig kompensiert werden können, könnte schon die verringerte Expression eines Rezeptors wie CD226 und dessen defizitäre Hochregulation nach Stimulation, wie sie in Zellen von Trägern des Risikohaplotyps vorliegt, eine Fehlregulation bedingen, die letztendlich zu autoreaktiven Pathologien beitragen könnte[45].

Die Expression von kostimulatorischen und koinhibitorischen Rezeptoren folgt einer sich gegenseitig regulierenden Kinetik, die von Zhu *et al*. mit einem Gezeitenmodell verglichen wurde[98]. Grundlage dieses Modells ist die Beobachtung, dass naive T-Zellen zunächst viele kostimulatorische Moleküle exprimieren, jedoch kaum koinhibitorische. Nach Antigenerkennung durch den T-Zell-Rezeptor binden diese kostimulatorischen Moleküle an ihre Liganden und initiieren so im Idealfall die Aktivierung der T-Zellen. Gleichzeitig beginnen die T-Zellen die Expression koinhibitorischer Rezeptoren zu erhöhen, die durch ein starkes negatives Feedback-Signal einer Überstimulation entgegenwirken. Diese Interaktionen sind streng reguliert und variieren zwischen den Differenzierungsstadien der T-Zellen, dem Gewebe und dem lokalen Milieu, unter dessen Einfluss sich die Zellen gerade befinden. Es stellt sich nunmehr die Frage, inwiefern der koinhibitorische Partner von CD226, TIGIT sowie CD96, dessen Funktion bislang wenig verstanden ist, in das System der CD226-CD155-Interaktion eingreifen und wie die Expression dieser beiden Interaktionspartner, im Verhältnis zu CD226 reguliert ist. Für TIGIT wurde bereits eine aktivierungsinduzierte Erhöhung der Expression in $CD4^+$ T_{eff}-Zellen gezeigt[205,207]. Da TIGIT über eine höhere Affinität für den Bindungspartner CD155 verfügt als CD226[175], muss man davon ausgehen, dass TIGIT CD226 im Laufe der Aktvierung von T-Zellen von der CD155-Bindung verdrängt und so das kostimulatorische Signal durch ein koinhibitorisches ersetzt wird.

Im Falle einer reduzierten CD226-Expression, wie sie in Trägern des Risikohaplotyps vorliegt, könnte es zu einer kompensatorischen Erhöhung der Expression des dritten Interaktionspartners von CD155, CD96 kommen. Im Kontext von Tumorerkrankungen wurde CD96 eine aktivierende Funktion zugeschrieben[177]. In diesem Fall könnte eine reduzierte CD226-Expression und eine eingeschränkte Kostimulation eventuell durch CD96 kompensiert werden. CD96 besitzt eine deutlich höhere Bindungsaffinität für CD155 als CD226, die jedoch immer noch niedriger ist als die Bindungsaffinität von TIGIT für CD155[175]. Dennoch könnte eine kompensatorische Regulation von CD96 bei verminderter CD226-Expression das Gleichgewicht zwischen Kostimulation durch CD226/CD96 und Koinhibition durch TIGIT empfindlich stören und zu einer gesteigerten Reaktivität von $CD4^+$ T_{eff}-Zellen beitragen.

Die diesen Überlegungen zugrunde liegenden Mechanismen sollten in weiteren Experimenten auf ihre Richtigkeit überprüft werden. Es sollten Expressionskinetiken für CD96 und TIGIT angefertigt werden und mit der Expression von CD226 verglichen werden. Außerdem müsste die Regulation der Expression in unterschiedlichen $CD4^+$ Subpopulationen unter variierenden Stimulationsbedingungen verglichen werden, um eine Hypothese generieren zu können, inwiefern eine verminderte CD226-Expression kompensatorische Mechanismen in einem streng regulierten kostimulatorischen System auslöst.

Eine hohe CD226-Expression ist keine Voraussetzung für die Infiltration von T-Zellen ins ZNS

Eine EAE wird unter anderem durch autoreaktive, myelinspezifische $CD4^+$ T-Zellen vermittelt, die im Laufe der ZNS-Entzündung über den Plexus choroideus die Blut-Liquor-Schranke überqueren, im Subarachnoidalraum reaktiviert werden und expandieren. Da eine hohe CD226-Expression sowohl mit dem Gedächtnis-Zell-Phänotyp als auch mit dem Aktivierungsstatus von $CD4^+$ T-Zellen korrelierte und eben diese Zellen einen geeigneten Phänotyp aufweisen könnten, um die Blut-Hirn-Schranke zu überqueren, wurde als nächstes untersucht, inwiefern eine CD226-Expression für ZNS-infiltrierende T-Zellen bedeutsam ist. Interessanterweise wiesen alle drei analysierten T-Zell-Populationen, $CD4^+$ Effektor-T-Zellen, $CD4^+$ T_{reg}-Zellen sowie $CD8^+$ T-Zellen eine im Vergleich zur Peripherie stark erhöhte CD226-Expression in T-Zellen des entzündeten ZNS auf. Diese hohe Expression legt zwei Vermutungen nahe: Zum einen untermauert sie die Hinweise, dass es sich bei CD226 um einen Aktivierungs- und Gedächtnis-Zell-Marker handelt. Zum anderen deutet ein so hohes Expressionsniveau auf eine unmittelbare Funktion des CD226-Proteins bei der Aktivierung und Extravasation enzephalitogener T-Zellen hin. Außerdem wurde bereits in zwei Studien gezeigt, dass die Interaktion von CD155 auf Endothelzellen mit CD226 auf Monozyten bzw. $CD4^+$ Gedächtnis-T-Zellen die Diapedese der Zellen beschleunigen kann[185,186]. Dementsprechend könnte es sich bei CD226 um einen Marker handeln, dessen hohe Expression eine Voraussetzung für den Übertritt von T-Zellen ins ZNS darstellt.

Diese Theorie konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht bestätigt werden. CD226-defiziente Mäuse wiesen überraschenderweise einen schwereren Verlauf der EAE auf, wobei sich weder die Restimulation der peripheren T-Zellen, noch die zelluläre Zusammensetzung des ZNS-Infiltrats signifikant zwischen *Cd226*$^{+/+}$, *Cd226*$^{+/-}$ und *Cd226*$^{-/-}$-Mäusen unterschied. Diese Ergebnisse sprechen gegen eine essentielle Funktion des CD226-Moleküls für die Aktivierung von inflammatorischen T-Zellen in der Peripherie und für deren Infiltration ins ZNS. Inwiefern andere kostimulatorische Moleküle in der Lage sind die Funktion von CD226 zu übernehmen und eine Defizienz zu kompensieren, sollte in Folgeexperimenten aufgeklärt werden.

Ein Kandidat wäre CD96, dessen Funktion bislang wenig untersucht wurde, das jedoch ebenfalls auf aktivierten T-Zellen exprimiert wird[176,243] und eine höhere Bindungsaffinität für den gemeinsamen Bindungspartner CD155 aufweist als CD226[175]. Inwiefern diese beiden Moleküle redundante Funktionen übernehmen können und wie die Expressionshöhe beider Moleküle durch Feedback-Mechanismen aufeinander abgestimmt ist und mit der Expression des inhibitorischen Gegenspielers TIGIT korreliert, sollte ebenfalls untersucht werden.

CD226-defiziente Mäuse dienen als Modell der reduzierten CD226-Expression in humanen Zellen von Trägern des Risikohaplotyps

Da die Möglichkeiten mit humanen Zellen funktionelle Analysen durchzuführen auf *in vitro* Versuche limitiert ist, wurden CD226-defiziente Mäuse verwendet, in denen die in Trägern des Risikohaplotyps beobachtete reduzierte CD226-Expression nachgestellt werden konnte. Während auf der Oberfläche von Zellen von homozygot CD226-defizienten Mäusen erwartungsgemäß keine CD226-Expression nachgewiesen werden konnte, entsprach die Expression auf heterozygot CD226-defizienten Mäusen etwa der halbmaximalen Expression der CD226-suffizienten Mäuse. Dieses Modell ermöglichte die Analyse des Einflusses einer abgestuften Verminderung der CD226-Expression zum einen auf die zelluläre Zusammensetzung peripherer lymphatischer Gewebe und zum anderen auf den Verlauf der EAE.

Überaschenderweise kristallisierte sich bei der Phänotypisierung dieser Mäuse eine Gen-Dosis-abhängige Korrelation des prozentualen Anteils Foxp3$^+$ T_{reg}-Zellen innerhalb der CD4$^+$ T-Zellen im Thymus, dem Ort der Entwicklung von T-Zellen, und in der Milz heraus. Mit sinkender CD226-Expression, erhöhte sich der Anteil an T_{reg}-Zellen. Ein Phänotyp, in dem ein erhöhter Anteil T_{reg}-Zellen innerhalb der CD4$^+$ T-Zellen auftritt, könnte auf eine veränderte Entwicklung und Selektion regulatorischer T-Zellen im Thymus hindeuten[244], die in der Folge den Thymus in erhöhter Anzahl verlassen und anschließend in bleibend hoher Anzahl in der Peripherie auftreten.

CD226 ist wichtig für die Funktion regulatorischer T-Zellen.

CD4$^+$ regulatorische T-Zellen, die durch die Expression des Transkriptionsfaktors Foxp3 gekennzeichnet sind, sind essentiell an der Aufrechterhaltung eines immunologischen Gleichgewichts und an peripherer Toleranz beteiligt[244]. Die Expression und Funktion des CD226-Moleküls in diesen T_{reg}-Zellen wurde bisher nicht gezeigt. In einer kürzlich erschienenen Studie wurde hingegen in einer anderen Population regulatorischer CD4$^+$ T-Zellen, den IL-10-produzierenden T_r1-Zellen, eine hohe CD226-Expression nachgewiesen[193], die mit der kontaktabhängigen Lyse von APZ in einem Granzym B- und Perforin-abhängigen Mechanismus in Zusammenhang gebracht wurde[194]. Es liegt demnach die Vermutung nahe, dass eine über CD226-vermittelte Kostimulation für die Aktivierung

oder die Funktion auch für andere Zellpopulationen mit suppressivem Funktionsspektrum von Bedeutung sein könnte.

Da die erhöhte Frequenz von T_{reg}-Zellen im Thymus und in der Peripherie von CD226-defizienten Mäusen ein Indiz für eine veränderte Funktion der T_{reg}-Zellen sein könnte, wurde als nächstes die inhibitorische Kapazität der T_{reg}-Zellen im Rahmen eines T_{reg}-Suppressionsassays analysiert. *Cd226*$^{-/-}$ T_{reg}-Zellen wiesen darin im Vergleich zu *Cd226*$^{+/+}$ T_{reg}-Zellen eine eingeschränkte suppressive Kapazität auf. CD226 scheint demnach eine Rolle bei der suppressiven Funktion von Foxp3^{+} regulatorischen T-Zellen zu spielen. Zusätzlich deuten die Ergebnisse darauf hin, dass eine Einschränkung dieser CD226-vermittelten Funktion, z.B. bei CD226-Defizienz, *in vivo* durch eine gesteigerte Anzahl T_{reg}-Zellen kompensiert wird.

Dieser Befund deutet eher auf einen durch CD226 induzierten Effekt auf die Entwicklung von natürlichen, aus dem Thymus stammenden nT_{reg}-Zellen hin, da die Veränderung der Frequenz von Foxp3^{+} T_{reg}-Zellen bereits im Thymus zu beobachten war. Zunächst müsste der Frage nachgegangen werden, ob die beobachtete erhöhte Frequenz der CD226-defizienten T_{reg}-Zellen in erster Linie nT_{reg}-Zellen betrifft, oder ob diese ebenfalls auf iT_{reg}-Zellen zutrifft. iT_{reg}-Zellen sind in einem genetischen Mausmodell, in dem die periphere Generierung von iT_{reg}-Zellen stark reduziert ist, für die Pathologie einer primär durch T_H1- und T_H17-Zellen vermittelten EAE von untergeordneter Bedeutung[126]. Vielmehr scheinen sie eher an der Unterdrückung von T_H2-vermittelten asthmatischen Erkrankungen maßgeblich beteiligt zu sein. Diese Ergebnisse in Kombination mit den Beobachtungen, dass eine Mutation im Foxp3-Gen[120–122] sowie die Thymektomie neonataler Mäuse[245,246] zu starker systemischer Autoimmunität führt, deuten auf eine maßgebliche regulatorische Funktion von nT_{reg}-Zellen bei T-Zell-vermittelten Autoimmunerkrankungen hin[244]. Die verringerte Expression eines putativen kostimulatorischen Moleküls von nT_{reg}-Zellen könnte die Funktion dieser wichtigen Regulatoren einschränken und so T-Zell-vermittelte Autoimmunerkrankungen begünstigen.

Die veränderte Frequenz von T_{reg}-Zellen im Thymus und in der Milz von CD226-defizienten Mäusen deutet auf eine veränderte Selektion dieser Zellen im Thymus hin. Einen ähnlichen Phänotyp weisen Mäuse auf, die für das Molekül CD5 defizient sind. CD5 agiert als negativer Regulator der T-Zell-Rezeptor-Aktivierung. Eine CD5-Defizienz führte zu einer Hyperresponsivität von sich entwickelnden Thymuszellen auf eine Stimulation des T-Zell-Rezeptors, was zu einer gesteigerten Frequenz von nT_{reg}-Zellen im Thymus und in der Peripherie führte[247,248], die jedoch in der Peripherie mit einer stärkeren suppressiven Kapazität verknüpft war[249]. CD5-defiziente Mäuse wiesen darüber hinaus eine verminderte EAE-Symptomatik auf, was auf den aktivierungsinduzierten Zelltod von antigenspezifischen CD4^{+} T-Zellen aufgrund ihrer intrinsischen Hyperresponsivität zurückgeführt wurde[250].

Es sollte in Betracht gezogen werden, dass CD226 in der Entwicklung von T-Zellen und bei Effektormechanismen der Peripherie unterschiedliche Funktionen einnimmt. Es könnte sein, dass CD226 zwar auf der einen Seite eine inhibitorische Funktion für die

T-Zell-Rezeptor-Stimulation übernimmt, die im Thymus die Selektion von T_{reg}-Zellen reguliert und bei einer Defizienz eine vermehrte Selektion von T_{reg}-Zellen begünstigt. Gleichzeitig könnte diese CD226-Defizienz eine Hyperresponsivität von T_{eff}-Zellen bereits ab der Entwicklung im Thymus bedingen, die sich später in der Peripherie auswirkt. Der putative inhibitorische Effekt von CD226 auf die T-Zell-Rezeptor-Stimulation fällt vermutlich deutlich subtiler aus als der starke Effekt von CD5. Somit wäre auch plausibel, dass die überschießende Aktivierung bei CD226-Defizienz nicht ausreicht, um den aktivierungsinduzierten Zelltod auszulösen. Die hyperreaktiven CD226-defizienten $CD4^+$ T-Zellen könnten so eine schwerere EAE auslösen, als CD226-suffiziente $CD4^+$ T-Zellen.

Es wird angenommen, dass TIGIT ein koinhibitorischer Gegenspieler von CD226 ist[100]. Konform mit dieser Theorie gehen Beobachtungen von TIGIT-defizienten Mäusen, die einen schwereren Verlauf der EAE entwickeln[207]. In diesem Fall überwiegt die CD226-vermittelte Stimulation von T-Zellen und es findet keine Gegenregulation über TIGIT statt. Im System einer CD226-Defizienz hingegen würde man davon ausgehen, dass eine TIGIT-vermittelte Inhibition der T-Zell-Antwort überwiegt und zu einer verminderten EAE-Symptomatik beitragen müsste. In einer solchen Theorie wird der wichtige Einfluss kostimulatorischer Signale auf die Entwicklung und Funktion von T_{reg}-Zellen vernachlässigt. Wie auch schon im CD28/CTLA-4 – CD80/CD86-Kostimulationssystem gezeigt werden konnte, ist CD28, das evtl. eine ähnliche Funktion innehaben könnte wie CD226, nicht nur für die Aktivierung von T_{eff}-Zellen essentiell, sondern auch für die Funktion von T_{reg}-Zellen[251,252]. Zwar weisen CD28-defiziente Mäuse vordergründig eine stark abgeschwächte EAE-Symptomatik auf[253], da keine Kostimulation an enzephalitogene T-Zellen erfolgt, jedoch bewies eine kürzlich erschienene Untersuchung konditionaler Knockout-Mäuse, die nur eine CD28-Defizienz in $Foxp3^+$ T_{reg}-Zellen aufwiesen, dass CD28 ebenfalls für inhibitorische Immunantworten essentiell ist, die einer Autoimmunreaktion entgegenwirken[254]. Ein ähnliches Modell wäre ebenfalls für CD226 denkbar. T_{eff}- und T_{reg}-Zellen könnten beide eine CD226-vermittelte Kostimulation erfahren, die jedoch für die Lizenzierung von T_{reg}-Zellen und für die Auslösung regulatorischer Mechanismen in T_{reg}-Zellen von großer Bedeutung wäre. Die durch CD226 induzierte Kostimulation für T_{eff}-Zellen könnte hingegen bei CD226-Defizienz durch andere kostimulatorische Systeme oder durch eine intrinsische Hyperresponsivität kompensiert werden.

Übertragung der Erkenntnisse aus der murinen CD226-Defizienz auf humane T-Zellen

Beim Versuch die oben beschriebenen Erkenntnisse auf humane T_{reg}-Zellen zu übertragen, konnte weder in gesunden Trägern des Risikohaplotyps noch in MS-Patienten eine analoge Erhöhung der T_{reg}-Frequenz festgestellt werden, was in der großen Variabilität der Anzahl peripherer T_{reg}-Zellen im Menschen, unter anderem wegen der Krankheitsgeschichte der Individuen begründet liegen könnte. Vielmehr sollte in Zukunft vermehrt die Funktion der T_{reg}-Zellen untersucht und zwischen den Trägern der unterschiedlichen Haplotypen verglichen werden.

Der Unterschied in der CD226-Expression regulatorischer T-Zellen in Abhängigkeit vom Genotyp der Individuen konnte ausschließlich in CD45RA^{-} Gedächtnis-T_{reg}-Zellen nachgewiesen werden. Von diesen Zellen wird angenommen, dass sie den murinen CD4^{+}CD25^{+} T_{reg}-Zellen am ehesten in ihrer Funktion ähneln[115,117,255–258]. Diese Zellen supprimieren die Proliferation von CD4^{+} Effektor-T-Zellen effektiver als CD45RA^{+} naive T_{reg}-Zellen[259,260]. Eine genotyp- bzw. MS-induzierte verringerte Expression eines Moleküls, das für die Funktion einer hochsuppressiven T_{reg}-Population wichtig sein könnte untermauert die Vermutung, dass man die in murinen Zellen aufgedeckte defizitäre Funktion bei verringerter CD226-Expression eventuell auf humane Zellen übertragen kann.

Zum einen sollte eine weiterführende Charakterisierung der CD226-exprimierenden T_{reg}-Populationen in Bezug auf die Expression von Aktivierungsmarkern und Zytokinsekretionsprofil erfolgen und zwischen Zellen von Trägern der unterschiedlichen Genotypen verglichen werden. Außerdem sollten T_{reg}-Suppressionstests durchgeführt werden, in denen die suppressive Kapazität von T_{reg}-Zellen von Trägern der unterschiedlichen Genotypen miteinander verglichen werden können. Die Kombination der Ergebnisse dieser beiden Ansätze sollten Rückschlüsse darüber zulassen, ob eine reduzierte CD226-Expression in Trägern des Risikohaplotyps auch im Menschen zu einer defizitären Funktion der T_{reg}-Zellen beiträgt. Interessant wäre ein solcher Befund in besonderem Maße, da für die eingeschränkte Funktion von T_{reg}-Zellen von MS-Patienten bisher kein kausaler Mechanismus identifiziert wurde[132]. MS-Patienten weisen eine verringerte CD226-Expression in CD4^{+} T-Zellen auf, die eine Erklärung für die defizitäre Funktion regulatorischer T-Zellen in MS-Patienten darstellen könnte.

Eine CD226-Defizienz verschlimmert den Verlauf der EAE

Über die defizitäre inhibitorische Funktion von T_{reg}-Zellen in *Cd226*$^{-/-}$-Mäusen hinaus, wurde außerdem ein schwerer Verlauf der EAE in *Cd226*$^{-/-}$-Mäusen beobachtet, der direkt mit der eingeschränkten Funktion der T_{reg}-Zellen in Zusammenhang stehen könnte. Das Einsetzen der EAE-Symptomatik erfolgte in Mäusen der verschiedenen *Cd226*-Genotypen mit vergleichbarer Kinetik. *Cd226*$^{-/-}$-Mäuse wiesen jedoch im Vergleich zu *Cd226*$^{+/+}$-Mäusen einen erhöhten Maximalscore auf, an die sich eine eingeschränkte Remissionsphase anschloss. Zwar konnte durch die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente kein Unterschied in der peripheren Aktivierung von T_{eff}-Zellen, gemessen durch den T-Zell-Restimulationsversuch sowie in der zellulären Zusammensetzung des ZNS-Infiltrats und des Differenzierungsstatus der ZNS-infiltrierenden T-Zellen festgestellt werden, jedoch widerspricht dies nicht einer Rolle von CD226 für die Funktionalität von T_{reg}-Zellen in der EAE. Zum einen wurde der T-Zell-Restimulationsversuch zum Zeitpunkt einer akuten Entzündung des ZNS durchgeführt, an dem die periphere Aktivierung von antigenspezifischen CD4^{+} T-Zellen weitgehend abgeschlossen ist und die aktivierten Zellen bereits den Ort der Entzündung, das ZNS erreicht haben. Dieser Versuch müsste demnach zu einem früheren Zeitpunkt nach Immunisierung wiederholt werden, an dem sowohl T_{eff}- als auch T_{reg}-Zellen vollständig aktiviert wurden, jedoch noch nicht bereits die peripheren

lymphatischen Organe verlassen haben, um ins Zielorgan einzuwandern. Der erhöhte Maximalscore der Mäuse mit einer CD226-Defizienz weist auf eine erhöhte Enzephalitogenität der $CD4^+$ T_{eff}-Zellen hin, die bereits während der Aktivierung in der Peripherie durch eine verminderte suppressive Kapazität von T_{reg}-Zellen und durch eine intrinsische Hyperresponsivität der T_{eff}-Zellen zu erklären sein könnte.

Es wurde gezeigt, dass T_{reg}-Zellen zwar bereits während der akuten Phase der EAE ins ZNS eindringen, aber erst während der Remission etwa um das Fünffache expandieren und anschließend zum Abklingen der ZNS-Entzündung beitragen[148]. Legt man diese Theorie zugrunde, wäre es durchaus denkbar, dass die beobachtete eingeschränkte Remission der EAE in *Cd226*$^{-/-}$-Mäusen auf einen T_{reg}-Effekt zurückzuführen sein könnte. Um diesen Effekt in einer Veränderung der zellulären Zusammensetzung des ZNS-Infiltrats abzubilden, müsste die FACS-Analyse des Infiltrats zu einem späteren Zeitpunkt wiederholt werden. Die T_{reg}-Zellen von Mäusen der drei *Cd226*-Genotypen müssten während der Remission der EAE auf ihre suppressive Kapazität gegenüber myelinspezifischen T_{eff}-Zellen, auf ihr Zytokinsekretionsprofil sowie die Expression kostimulatorischer und koinhibitorischer Oberflächenmarker wie CTLA-4, untersucht werden.

Neben der aktiven Immunisierung durch Injektion enzephalitogener Peptide in KFA lässt sich eine EAE ebenfalls durch adoptiven Transfer von T-Zellen induzieren. Der Vorteil einer solchen Immunisierung besteht darin, dass es möglich ist T-Zell-intrinsische von anderen Effekten auf den Verlauf der EAE zu unterscheiden. So kann man beispielsweise T-Zellen transferieren, welche eine Defizienz für ein bestimmtes Protein tragen und den resultierenden EAE-Verlauf mit dem von Mäusen vergleichen, in die Wildtyp-T-Zellen transferiert worden waren. Die beobachtbaren Unterschiede sind lediglich auf eine abweichende Wechselwirkung der T-Zellen mit dem Empfängerorganismus zurückzuführen und lassen so direkt Rückschlüsse auf die Funktion eines bestimmten Moleküls für die Pathogenese der EAE zu. In dieser Arbeit wurden 2D2-transgene *Cd226*$^{-/-}$-T-Zellen in naive C57BL/6-Mäuse transferiert und die resultierende EAE mit der von Mäusen verglichen, die entweder mit 2D2-transgenen *Cd226*$^{+/-}$- oder 2D2-transgenen *Cd226*$^{+/+}$-T-Zellen behandelt worden waren. Interessanterweise stellte sich eine Gen-Dosis-abhängige Korrelation mit dem Zeitpunkt des Einsetzens der EAE-Symptomatik ein. Mäuse, denen 2D2-transgene *Cd226*$^{-/-}$-T-Zellen injiziert worden waren, erkrankten zuerst, gefolgt von Mäusen, die mit heterozygoten Zellen immunisiert worden waren. Zuletzt erkrankten mit 2D2-transgenen Wildtyp-Zellen behandelte Mäuse. Die Enzephalitogenität der 2D2-transgenen T-Zellen steigt demnach mit sinkender CD226-Expression. Bei Injektion von 2D2-transgenen *Cd226*$^{+/+}$-T-Zellen in Mäuse der drei unterschiedlichen *Cd226*-Genotypen ließ sich kein Unterschied der EAE-Verläufe beobachten. Es scheint sich demnach um einen rein T-Zell-intrinsischen Effekt zu handeln. In diesem Zusammenhang ist es wichtig darauf hinzuweisen, dass ein adoptiver Transfer von 2D2-transgenen T-Zellen ein fulminant verlaufendes EAE-Modell darstellt, welches in der Regel nicht durch T_{reg}-Zellen der Empfängermäuse kontrolliert werden kann.

Da die Vermutung nahe lag, dass der schwerere EAE-Verlauf in *Cd226*$^{-/-}$-Mäusen auf eine defizitäre inhibitorische Funktion von T_{reg}-Zellen zurückzuführen sein könnte, wurde ebenfalls der Frage nachgegangen, inwiefern T_{reg}-Zellen den Verlauf einer durch adoptiven Transfer induzierten EAE beeinflussen können. Interessanterweise sind in der Zellsuspension, die nach siebentägiger Kultur in die Mäuse injiziert wird, maximal 0,1% Foxp3^{+} T_{reg}-Zellen detektierbar. Ein Einfluss von injizierten T_{reg}-Zellen auf den Verlauf der EAE ist demnach unwahrscheinlich. Um zu analysieren, ob T_{reg}-Zellen bereits in der *in vitro* Voraktivierung T_{eff}-Zellen beeinflussen, wurde eine Kokultur verwendet, in welchem zunächst T_{eff}-Zellen und T_{reg}-Zellen mittels MACS-Technologie voneinander getrennt und anschließend in definiertem Verhältnis wieder zusammengegeben wurden. T_{eff}-Zellen des *Cd226*$^{+/+}$-Genotyps wurden dazu mit T_{reg}-Zellen aus *Cd226*$^{-/-}$-Mäusen gemischt und umgekehrt. Durch Kultur von *Cd226*$^{+/+}$-T_{eff}-Zellen mit *Cd226*$^{-/-}$-T_{reg}-Zellen konnte die Inzidenz der EAE tatsächlich um etwa 15% gegenüber einer reinen *Cd226*$^{+/+}$-Kultur gesteigert werden. *Cd226*$^{-/-}$-T_{reg}-Zellen scheinen demnach durch ihre eingeschränkte suppressive Kapazität in der Lage zu sein die Enzephalitogenität und Aktivierung von *Cd226*$^{+/+}$-T_{eff}-Zellen zu erhöhen. Wichtig wäre es in Folgeexperimenten der Frage nachzugehen, inwiefern sich *Cd226*$^{-/-}$-von *Cd226*$^{+/+}$-T_{reg}-Zellen auf molekularer Ebene, z.B. in Bezug auf ihr Sekretionsprofil inhibitorischer Zytokine, wie IL-10, TGF-β und IL-35 und der Expression koinhibitorischer Moleküle, wie CTLA-4 und Lag-3 unterscheiden.

Erhöhte intrinsische Enzephalitogenität von CD226-defizienten T_{eff}-Zellen

Darüber hinaus scheinen *Cd226*$^{-/-}$-T_{eff}-Zellen jedoch außerdem über eine intrinsische erhöhte Enzephalitogenität zu verfügen. Mäuse, denen *Cd226*$^{-/-}$-T-Zellen injiziert wurden, unabhängig davon, ob diese mit *Cd226*$^{-/-}$- oder *Cd226*$^{+/+}$-T_{reg}-Zellen kultiviert worden waren, zeigten eine EAE mit der höchsten Inzidenz. Ähnlich wie im Modell der oben beschriebenen CD5-defizienten Mäuse könnte es auch in CD226-defizienten Mäusen zu einer veränderten CD226-abhängigen Signalkaskade in CD4^{+} T-Zellen während der Entwicklung im Thymus kommen, woraus eine Hyperresponsivität der T_{eff}-Zellen resultiert, die wiederum die Enzephalitogenität dieser Zellen erhöhen könnte. Die Entwicklung von CD226-defizienten CD4^{+} T-Zellen im Thymus sollte in Bezug auf Veränderungen der Signalkaskade analysiert werden. Gute Anhaltspunkte wären unter anderem die Untersuchung des Aufbaus der immunologischen Synapse, da CD226 ein wichtiger Bestandteil der peripheren SMACs ist. Außerdem ist die PKC-θ, die unter anderem im Verdacht steht CD226-Moleküle nach Aktivierung des T-Zell-Rezeptors zu phosphorylieren[202], ebenfalls ein wichtiger Bestandteil sowohl der immunologischen Synapse von T_{eff}- als auch von T_{reg}-Zellen[261]. Eine Fehlregulation dieser Signalkaskade könnte bereits zu einer Hyperresponsivität von T_{eff}-Zellen beitragen.

Neben dem direkten Zusammenhang der CD226-Expression mit der Funktion von T_{reg}-Zellen, sollte außerdem der Einfluss des Interaktionspartners LFA-1 auf die beobachteten Effekte in Erwägung gezogen werden. LFA-1 ist ein Adhäsionsmolekül, das sowohl für die Funktion von Effektor-T-Zellen als auch für T_{reg}-Zellen von entscheidender

Bedeutung ist[262]. LFA-1 spielt eine Rolle bei der kontaktabhängigen Regulation von APZ durch T_{reg}-Zellen[263,264]. Außerdem verursachte der adoptive Transfer von enzephalitogenen T-Zellen in LFA-1-defiziente Mäuse einen schwereren Verlauf der EAE, was der verringerten Anzahl und eingeschränkten Funktion von T_{reg}-Zellen in LFA-1-defizienten Mäusen zugeschrieben wurde[262,265]. Auch in anderen Modellen von Autoimmunerkrankungen wurde eine LFA-1-Defizienz mit einer eingeschränkten Funktionalität von T_{reg}-Zellen assoziiert, die in der Folge zur Fehlregulation der Immunaktivierung beitrug[266,267]. In keiner dieser Studien wurde auf einen möglichen Einfluss des LFA-1-Interaktionspartners CD226 für die Funktion von T_{reg}-Zellen hingewiesen. Es müsste dementsprechend untersucht werden, inwiefern die Signalkaskade des LFA-1-Moleküls durch eine verringerte CD226-Expression beeinträchtigt wird und inwiefern ein solcher Effekt die Funktionalität von T_{reg}-Zellen beeinflussen könnte.

Implikation der Funktion von CD226 für Autoimmunerkrankungen

Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse stehen in Bezug auf den Einfluss der CD226-Expression auf den Verlauf von Autoimmunerkrankungen im scheinbaren Gegensatz zu bisher veröffentlichten Studien. So wurde eine hohe CD226-Expression bisher mit einer fehlregulierten Immunantwort in Verbindung gebracht, die zur Entstehung von Sklerodermie[197], EAE[195], Lupus erythematodes[268] und rheumatoider Arthritis[196] beiträgt. Die meisten Autoimmunerkrankungen basieren jedoch auf der Fehlregulation von Immunmechanismen, die sich grundlegend von den in MS beobachteten Gegebenheiten unterscheiden. Genetische Assoziationsstudien legen zwar die Existenz gemeinsamer Risikovarianten nahe, dennoch differieren die Autoimmunerkrankungen stark in Bezug auf Effektormechanismen, die an der organspezifischen Pathologie beteiligt sind. Deshalb lassen sich Erkenntnisse aus anderen Autoimmunerkrankungen auch nur mit einigen Einschränkungen auf MS übertragen.

Eine Studie von Dardalhon *et al.* untersuchte direkt den Einfluss des CD226-Moleküls auf den Verlauf der EAE[195]. Mäuse, denen im Rahmen eines adoptiven Transfers enzephalitogene T_H1-Zellen injiziert worden waren, wurden durch die Behandlung mit einem CD226-blockierenden Antikörper vor der Entstehung einer EAE geschützt. Die besagte Studie beruht auf der Verwendung eines EAE-Modells, das auf dem genetischen Hintergrund von SJL/J-Mäusen basiert, welcher sich erheblich von dem in der vorliegenden Arbeit verwendeten C57BL/6-Hintergrund unterscheidet[150]. In diesem speziellen Fall wurden die T-Zellen, die transferiert wurden, aus SJL/J-Mäusen isoliert, die mit $PLP_{139-151}$ immunisiert worden waren. Die resultierenden T-Zell-Blasten wurden in RAG2-defiziente SJL/J-Mäuse injiziert –Mäuse, die aufgrund einer genetischen Mutation keine funktionelle Rekombinase bilden und damit keine genetische Rekombination durchführen können. In der Folge fehlen diesen Mäusen reife T- und B-Zellen, darunter auch T_{reg}-Zellen, da für deren Entwicklung die genetische Rekombination ein unverzichtbarer Schritt ist. In dem besagten, sehr speziellen Modell, war eine Behandlung mit einem CD226-blockierenden Antikörper erfolgreich. Bei der Untersuchung des zugrunde liegenden Mechanismus wurde

jedoch nicht ausgeschlossen, dass durch die Antikörperbehandlung CD226^{high}-Zellen mit Antikörper markiert und anschließend von NK-Zellen eliminiert wurden. Der protektive Effekt der CD226-Blockade wäre dann nicht auf die Blockade einer CD226-Interaktion zurückzuführen, sondern vielmehr auf die Eliminierung CD226-exprimierender Zellen und damit aktivierter T-Zellen. Durch die Blockade des CD226-Moleküls wird außerdem die Bindung des negativen Regulators TIGIT an CD155 begünstigt, was ebenfalls zur Eindämmung der T-Zell-Antwort beitragen könnte.

Darüber hinaus legen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit den Schluss nahe, dass sich eine CD226-Defizienz bereits auf die Entwicklung von T-Zellen im Thymus auswirkt und dadurch einige der beobachteten Effekte zu erklären sein könnten. Bei therapeutischer Antikörperapplikation werden diese Entwicklungsdefekte ausgeschaltet, so dass die beiden experimentellen Ansätze nicht miteinander vergleichbar sind. Die Immunisierung CD226-defizienter Mäuse spiegelt insofern die Situation humaner Patienten besser wieder, da auch hier eine verringerte CD226-Expression aufgrund einer genetischen Variante nachgewiesen werden kann.

CD155

Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, dass eine reduzierte CD226-Expression mit einer eingeschränkten suppressiven Kapazität von T_{reg}-Zellen assoziiert sein könnte. Darüber hinaus wurde ebenfalls der Frage nachgegangen, welche Mechanismen für diese Beobachtungen verantwortlich sein könnten. Dazu wurde im Rahmen dieser Arbeit dem Einfluss von CD155, einem Liganden des CD226-Proteins[172–174] nachgegangen. Die Analyse der CD155-Expression auf Immunzellpopulationen der Milz ergab eine CD155-Expression auf der Oberfläche von $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen, NK-Zellen und Monozyten, wobei $CD4^+$ T-Zellen die prominenteste Expression aufwiesen. In B-Zellen und T_{reg}-Zellen konnte im unstimulierten Zustand keine CD155-Expression festgestellt werden. Dieses Ergebnis deckt sich mit einer Studie aus dem Labor von Günter Bernhardt aus Hannover, die die CD155-Expression ebenfalls analysierten[219].

Einfluss von CD155 auf die Funktion von APZ

Anschließend wurde die CD155-Expression nach Stimulation verschiedener Zellpopulationen mit auf den entsprechenden Zelltyp abgestimmten Stimulantien quantifiziert. B-Zellen wurden mit bakteriellem Lipopolysaccharid (LPS), einem Liganden des Toll-like Rezeptor 4 (TLR 4) behandelt, der zu robuster Aktivierung und Hochregulation kostimulatorischer Moleküle durch B-Zellen beiträgt[269]. B-Zellen erhöhten aufgrund dieser Aktivierung CD155 stark. Ein Ergebnis, welches die von Maier *et al.* gezeigte stimulationsinduzierte Erhöhung der CD155-Expression in B-Zellen bestätigte[219].

Einen ähnlichen Effekt konnte man bei der Stimulation von aus Knochenmarks-Vorläuferzellen differenzierten dendritischen Zellen beobachten. Sowohl die Behandlung mit

LPS, als auch mit hitzeinaktivierten *M. tuberculosis* Bakterien führte zu einer Hochregulation der CD155-Expression. Dieser Effekt ist vermutlich auf die direkte Wechselwirkung der Stimulantien mit konservierten PRR zurückzuführen. Diese Signale, die normalerweise im Kontext einer Infektion auftreten, induzieren die Hochregulation kostimulatorischer Moleküle, um in der Folge antigenspezifische T-Zellen für eine Aktivierung und Expansion lizensieren zu können. Interessanterweise scheint die Wechselwirkung mit PRR eine Voraussetzung für die Hochregulation von CD155 zu sein, da die Behandlung der dendritischen Zellen mit einer Mischung der pro-inflammatorischen Zytokine IL-1β, IL-6, TNF-α und PGE-2, die eine Maturierung der dendritischen Zellen bewirken[228], nicht zur Hochregulation der CD155-Expression führte. Die aktivierungsinduzierte Hochregulation von CD155 von dendritischen Zellen in Folge einer TLR-Stimulation wurde kürzlich von Kamran *et al.* beschrieben[270], deren Ergebnisse mit den in dieser Arbeit erzielten Erkenntnissen übereinstimmen. In der gleichen Studie wurde die Erhöhung der CD155-Expression auf einen MYD88, TRIF und NF-κB-involvierenden Mechanismus zurückgeführt und postuliert, dass CD155 für die Ausbildung einer funktionalen T_H2-Antwort benötigt wird. Dieses legt den Schluss nahe, dass die CD155-Expression professioneller APZ einen ähnlich wichtigen Einfluss auf die Ausbildung einer funktionalen und abgestimmten T-Zell-Antwort haben könnte, wie die Expression anderer kostimulatorischer Moleküle wie CD80 und CD86. Für CD80 und CD86 wurde darüber hinaus eine essentielle Funktion für die Entwicklung von $Foxp3^+$ T_{reg}-Zellen im Thymus und in der Peripherie nachgewiesen[252]. Mäuse, die eine CD80/CD86-Defizienz aufweisen, zeichnen sich durch eine defizitäre Entwicklung regulatorischer T-Zellen aus, die letztendlich zur Ausbildung systemischer Autoimmunerkrankungen dieser Mäuse beiträgt[251].

CD155 wird zwar nach TLR-Aktivierung von APZ hochreguliert, scheint jedoch bei der Entwicklung von $CD4^+$ T-Zellen und T_{reg}-Zellen im Thymus eine untergeordnete Rolle zu spielen[219]. CD155 wird im Thymus exprimiert und scheint die Retention reifer $CD8^+$ T-Zellen im Thymus zu verlängern, jedoch ist dieser Effekt stark vom genetischen Hintergrund der Mäuse abhängig und nicht auf $CD4^+$ T-Zellen übertragbar[219]. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die zelluläre Zusammensetzung der Milz von *Cd155*$^{-/-}$-Mäusen mit der von *Cd155*$^{+/+}$-Mäusen verglichen. Es konnte jedoch weder in der Frequenz der analysierten T-Zell-Subpopulationen, noch in anderen Immunzellpopulationen ein Unterschied festgestellt werden. Ein Effekt der CD155-Expression auf die Entwicklung und die Aufrechterhaltung von T-Zell-Populationen, unter anderem auch der T_{reg}-Zellen auf dem genetischen Hintergrund von C57BL/6 ist damit sehr unwahrscheinlich. Darüber hinaus waren *Cd155*$^{-/-}$ T_{reg}-Zellen in ihrer suppressiven Kapazität nicht gegenüber *Cd155*$^{+/+}$ T_{reg}-Zellen verändert. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass CD155 wenn überhaupt eine redundante Rolle bei der Entwicklung und der Funktion von T_{reg}-Zellen spielt, die bei vollständiger CD155-Defizienz eventuell durch andere Liganden, wie z.B. CD112 übernommen werden kann.

Eine weitere Analogie, die zu den kostimulatorischen Liganden CD80 und CD86 gezogen werden kann, ist die erhöhte Expression von CD155 auf professionellen APZ des akut

entzündeten ZNS[271]. Vor allem myeloide dendritische Zellen und Makrophagen, die im Verdacht stehen myelinspezifische T-Zellen im Subarachnoidalraum zu reaktivieren, weisen eine im Vergleich zur Peripherie gesteigerte CD155-Expression im ZNS auf. Überraschenderweise ist dieses CD155-Expressionsmuster jedoch kein kritischer Regulationspunkt für die Entstehung der EAE. Weder im Verlauf einer durch aktive Immunisierung mit Myelin-Peptid, noch in einer durch adoptiven Transfer von T-Zellen induzierten EAE von *Cd155*$^{-/-}$-Mäusen ließ sich ein Unterschied im Vergleich zu *Cd155*$^{+/+}$-Mäusen beobachten. Einer putativen Funktion von CD155 für die Kostimulation von T-Zellen müsste somit weiter nachgeforscht werden. Denkbar wäre eine Kompensation der CD155-Funktion durch CD112. Auch im CD80/CD86-System wird die Funktion eines Interaktionspartners bei Defizienz durch den anderen ausgeglichen, so dass die eigentliche Funktion beider Moleküle erst durch die Generierung einer Maus aufgeklärt werden konnte, die für beide Moleküle defizient war[253,272].

Einfluss von CD155 auf die Funktion von T-Zellen

Ein weiterer Aspekt, der bislang in der Literatur wenig untersucht wurde, ist der Einfluss der CD155-Expression auf die Funktion von T-Zellen. CD155 wird in murinen naiven T-Zellen exprimiert, wobei CD4$^+$ T-Zellen eine höhere Expression aufweisen als CD8$^+$ T-Zellen[219]. Diese Expression wird stimulationsinduziert sowohl in Effektor-T-Zellen, wie bereits von Lozano *et al.* gezeigt[205], als auch in T_{reg}-Zellen erhöht. Doch auch für die Funktion von CD4$^+$ T-Zellen scheint die CD155-Expression redundant zu sein und die suppressive Kapazität von T_{reg}-Zellen nicht zu beeinflussen, da sowohl im T_{reg}-Suppressionsassay als auch in der EAE kein durch CD155-Defizienz verursachter Effekt festgestellt werden konnte. Eine mögliche Erklärung dafür liegt zum einen in einer möglichen Redundanz der Funktion von CD155 mit CD112, die bisher wenig charakterisiert wurde. Zum anderen wurde CD155 in zwei Studien mit einer Funktion von T_H2-Zellen assoziiert[219,270], die bei der Entstehung einer EAE eine eher untergeordnete Rolle spielen[273].

Die Ergebnisse der aktivierungsinduzierten Regulation von CD155 auf CD4$^+$ T-Zellen lassen außerdem die Interpretation zu, dass die Interaktion von CD226/TIGIT mit CD155 ebenfalls zur Kostimulation und Regulation von T-Zellen untereinander beitragen könnte, was als bidirektionales Kosignalling bezeichnet wird[97]. Eine Möglichkeit wäre, dass CD155 auf der Oberfläche von T_{eff}-Zellen mit CD226 auf T_{reg}-Zellen interagiert und diese so das kostimulatorische Signal erhalten, das sie zur Generierung suppressiver Effektormechanismen benötigen, um eine Überaktivierung von T_{eff}-Zellen zu begrenzen. Auf der anderen Seite könnte man ebenfalls spekulieren, dass CD155 auf T_{reg}-Zellen dazu dient mit TIGIT auf T_{eff}-Zellen zu interagieren, um ebenfalls in der Folge supprimierend auf die T_{eff}-Zellen einzuwirken. Da jedoch die CD155-Defizienz keine offensichtlichen Auswirkungen auf den Verlauf der EAE hat, scheinen auch diese putativen Interaktionsmöglichkeiten zwischen T-Zellen unterschiedlicher Differenzierung von untergeordneter Bedeutung zu sein oder durch andere Interaktionspartner oder kostimulatorische Systeme kompensiert zu werden.

Fazit

Bei MS handelt es sich um eine multifaktoriell hervorgerufene Erkrankung, die vermutlich durch das Zusammenspiel genetischer Prädispositionen mit Umweltfaktoren und die daraus resultierende Fehlregulation autoreaktiver Prozesse ausgelöst wird[274]. Die in dieser Doktorarbeit analysierten phänotypischen Varianten des *CD226*-Gens liefern neue Hinweise darauf, wie eine einzelne Variante zunächst auf Proteinebene komplexe Regulationsmechanismen der T-Zell-Aktivierung und durch Wechselwirkung mit anderen Risikofaktoren, letztendlich das MS-Risiko beeinflussen könnte.

Mausmodelle, wie das in dieser Arbeit verwendete EAE-Modell, bieten die Möglichkeit die Funktion eines einzelnen Proteins im Krankheitszusammenhang isoliert zu betrachten. Auf diese Weise war es möglich den Effekt eines schwereren EAE-Verlaufs in CD226-defizienten Mäusen auf eine wichtige Funktion des CD226-Moleküls für die suppressive Kapazität von T_{reg}-Zellen zurückzuführen. Bei dem gewählten System handelte es sich um eine modellhafte Übertreibung einer im Menschen vorliegenden verringerten CD226-Expression, die wichtige Aufschlüsse darüber zulässt, welche weiteren Ansätze zur Aufklärung der Funktion von CD226 in T_{reg}-Zellen und in der Pathogenese der MS verfolgt werden sollten.

Viele der kürzlich identifizierten Assoziationen genetischer Risikovarianten mit Autoimmunerkrankungen erhöhen das Risiko nur unwesentlich, mit *odds ratios*, die zwischen 1,1 und 1,5 liegen[232]. In den meisten Fällen wird daraus nicht direkt ein klinischer Nutzen ersichtlich. Vielmehr liegt der große Wert dieser Daten darin das Wissen über pathogenetische Signalwege zu erweitern und so das Verständnis für die Ätiologie und die Pathogenese von Autoimmunerkrankungen zu vertiefen. Im Falle von CD226 wird es vor allem darauf ankommen, die unterschiedlichen Funktionen dieses Moleküls zum einen für die Selektion von T_{reg}- und T_{eff}-Zellen im Thymus näher zu charakterisieren und inwiefern CD226 differenzielle Funktionen auf die Aktivierung von T_{reg}- und T_{eff}-Zellen in der Peripherie ausübt. Antworten auf diese Fragen werden vermutlich nicht unmittelbar Ansätze für therapeutische Interventionen für Autoimmunerkrankungen liefern können. Allerdings ist eine genaue Aufklärung der an autoimmunen Pathologien beteiligten kostimulatorischen und regulatorischen Systeme unabdingbar, um die Ätiologie von Autoimmunerkrankungen besser zu verstehen und daraus prognostische und Therapieansätze zu entwickeln, die in Zukunft zur besseren Behandlung von Patienten beitragen können.

Zusammenfassung

Multiple Sklerose ist eine entzündliche, demyelinisierende Autoimmunerkrankung des zentralen Nervensystems (ZNS), an deren Pathologie eine Infiltration myelinspezifischer T-Zellen ins ZNS beteiligt ist. Es wird angenommen, dass Menschen unter dem Einfluss einer komplexen genetischen Prädisposition im Zusammenspiel mit diversen Umweltfaktoren eine MS entwickeln. Assoziationsstudien haben eine Reihe von Genen identifiziert, die zu einem erhöhten Risiko beitragen an MS zu erkranken. Unter anderem wurde ein Polymorphismus im Gen, welches für das Protein *DNAX-accessory molecule 1* (DNAM-1; CD226) codiert, identifiziert. CD226 ist ein Adhäsions- und Kostimulationsmolekül, das unter anderem auf der Oberfläche von $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen und NK-Zellen exprimiert wird und das an der Aktivierung, Differenzierung und Effektormechanismen dieser Zellen beteiligt ist. Die Untersuchung der funktionellen Relevanz dieses Polymorphismus im CD226-Gen für die Pathogenese der Multiplen Sklerose wurde im Rahmen dieser Arbeit analysiert.

Durch Korrelation des Haplotyps mit der Expressionsintensität des Proteins auf der Oberfläche von Immunzellen konnte gezeigt werden, dass neben $CD4^+$ Gedächtnis-T-Helferzellen auch $CD4^+$ regulatorische Gedächtnis-T-Zellen von Trägern des *CD226*-Risikohaplotyps eine verringerte CD226-Expression aufweisen als Zellen von Trägern des protektiven Haplotyps. Zudem wiesen MS-Patienten unabhängig vom Haplotyp eine niedrigere CD226-Expression auf als Zellen von gesunden Individuen. Eine geringe CD226-Expression scheint demnach nicht nur mit einem potentiellen Risikohaplotyp in gesunden Individuen assoziiert zu sein, sondern sogar ein spezifisches Charakteristikum von Gedächtnis-T-Zellen an MS erkrankter Patienten darzustellen. Durch Verwendung heterozygot und homozygot CD226-defizienter Mäuse konnte der Einfluss unterschiedlicher CD226-Expressionsniveaus *in vivo* untersucht werden. Eine CD226-Defizienz korrelierte mit einer erhöhten Frequenz $Foxp3^+$ regulatorischer T-Zellen (T_{reg}-Zellen) im Thymus und in der Milz, die jedoch im Vergleich zu CD226-suffizienten T_{reg}-Zellen eine verminderte inhibitorische Kapazität aufwiesen. Gleichzeitig führte eine CD226-Defizienz zu einem verschlechterten Verlauf der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE), einem Mausmodell der MS, in einem Gen-Dosis-abhängigen Zusammenhang. Diese eingeschränkte Inhibition durch regulatorische T-Zellen bei niedriger CD226-Expression könnte dazu führen, dass eine Autoimmunantwort, wie sie im Laufe der Multiplen Sklerose, bzw. der EAE abläuft, nicht adäquat gebremst werden kann und diese zu einer überschießenden Immunantwort und zu einer gesteigerten Immunpathogenese beitragen könnte. CD226 vermittelt dabei nicht über die Interaktion mit CD155, einer seiner Liganden, die beschriebenen Effekte, da sich CD155-defiziente Mäuse weder in der Frequenz regulatorischer T-Zellen noch im Verlauf der EAE von CD155-suffizienten Mäusen unterschieden.

Summary

Multiple sclerosis (MS) is considered an autoimmune disease, characterized by inflammatory demyelination and axonal degeneration of the central nervous system (CNS). It is evolving in genetically susceptible individuals under certain environmental conditions. Recent association studies have shown that a certain SNP haplotype in the DNAX accessory molecule 1 (DNAM-1 or CD226) gene is associated with a variety of autoimmune diseases, including MS. CD226 is an adhesion and costimulatory molecule of the immunoglobulin superfamily, which is constitutively expressed on the surface of NK cells, $CD4^+$ and $CD8^+$ T cells and is involved in their activation, expansion, differentiation, and effector functions. However, the implication of *CD226*-genotype induced alterations and the functional role of CD226 in autoimmunity has not yet been defined and its elucidation was the primary goal of this thesis.

Comparison of CD226 expression levels on immune cells from peripheral blood of healthy donors showed that carriers of the risk haplotype possess a significantly reduced CD226 expression on the surface of subpopulations of memory $CD4^+$ effector and regulatory T cells compared to carriers of the protective haplotype. Moreover, this reduced expression level can also be observed in MS patients irrespective of their *CD226* haplotype. To understand the functional relevance of this phenotypical difference for the disease development of autoimmunity CD226-deficient mice were used, which exhibit a constitutively reduced or absent expression of CD226. These mice showed elevated frequencies of $Foxp3^+$ regulatory T cells among thymocytes and splenocytes. Moreover, T_{reg} cells isolated from *Cd226*$^{-/-}$ mice were characterized by a reduced capacity to suppress proliferation of $CD4^+$ T_{eff} cells. Active immunization with the MOG_{35-55} peptide resulted in an aggravated experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) disease course, an animal model of MS, in CD226-deficient mice in comparison to wildtype littermate controls. Additionally, passive immunization using adoptive transfer of encephalitogenic MOG_{35-55}-specific 2D2-transgenic $CD4^+$ T cells showed an earlier disease onset when CD226-deficient 2D2 cells were injected into wildtype recipient mice. Both effects seen after induction of EAE emerge in a gene-dose dependent manner. These results suggest that reduced expression levels of CD226 may lead to a reduced suppressive capacity of regulatory T cells, culminating in enhanced autoreactivity of T cells. The observed effects appeared independently of ligand interactions with CD155 that represents one of CD226 ligands. Although CD155 is expressed on a variety of antigen-presenting cells as well as T cells, deficiency in CD155 expression does not alter the frequency of regulatory T cells, their suppressive behaviour or the course of EAE.

Literaturverzeichnis

1. Compston, A. & Coles, A. Multiple sclerosis. *Lancet.* **372**, 1502–17 (2008).

2. *Atlas Multiple Sclerosis Resources in the World*. (World Health Organization: 2008).

3. Pittock, S. J. & Lucchinetti, C. F. The pathology of MS: new insights and potential clinical applications. *Neurologist.* **13**, 45–56 (2007).

4. Kornek, B. *et al.* Multiple sclerosis and chronic autoimmune encephalomyelitis: a comparative quantitative study of axonal injury in active, inactive, and remyelinated lesions. *Am J Pathol.* **157**, 267–76 (2000).

5. Lovas, G., Szilágyi, N., Majtényi, K., Palkovits, M. & Komoly, S. Axonal changes in chronic demyelinated cervical spinal cord plaques. *Brain.* **123 (Pt 2)**, 308–17 (2000).

6. Schattling, B. *et al.* TRPM4 cation channel mediates axonal and neuronal degeneration in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Nat Med.* **18**, 1805–11 (2012).

7. Friese, M. a *et al.* Acid-sensing ion channel-1 contributes to axonal degeneration in autoimmune inflammation of the central nervous system. *Nat Med.* **13**, 1483–9 (2007).

8. McDonald, W. I. *et al.* Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the diagnosis of multiple sclerosis. *Ann Neurol.* **50**, 121–7 (2001).

9. Polman, C. H. *et al.* Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2005 revisions to the “McDonald Criteria”. *Ann Neurol.* **58**, 840–6 (2005).

10. Polman, C. H. *et al.* Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the McDonald criteria. *Ann Neurol.* **69**, 292–302 (2011).

11. Kurtzke, J. F. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). *Neurology.* **33**, 1444–52 (1983).

12. Filippi, M. & Rocca, M. A. MR imaging of multiple sclerosis. *Radiology.* **259**, 659–81 (2011).

13. Haghikia, A., Hohlfeld, R., Gold, R. & Fugger, L. Therapies for multiple sclerosis: translational achievements and outstanding needs. *Trends Mol Med.* **19**, 309–19 (2013).

14. Lalive, P. H. *et al.* Glatiramer acetate in the treatment of multiple sclerosis: emerging concepts regarding its mechanism of action. *CNS Drugs.* **25**, 401–14 (2011).

15. Comabella, M. *et al.* Changes in matrix metalloproteinases and their inhibitors during interferon-beta treatment in multiple sclerosis. *Clin Immunol.* **130**, 145–50 (2009).

16. Prinz, M. *et al.* Distinct and nonredundant in vivo functions of IFNAR on myeloid cells limit autoimmunity in the central nervous system. *Immunity.* **28**, 675–86 (2008).

17. Yednock, T. A. *et al.* Prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis by antibodies against alpha 4 beta 1 integrin. *Nature.* **356**, 63–6 (1992).

18. Polman, C. H. *et al.* A randomized, placebo-controlled trial of natalizumab for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med.* **354**, 899–910 (2006).

19. Hartung, H.-P. *et al.* Mitoxantrone in progressive multiple sclerosis: a placebo-controlled, double-blind, randomised, multicentre trial. *Lancet.* **360**, 2018–25 (2002).

20. Cohen, J. A. *et al.* Oral fingolimod or intramuscular interferon for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med.* **362**, 402–15 (2010).

21. Kappos, L. *et al.* A placebo-controlled trial of oral fingolimod in relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med.* **362**, 387–401 (2010).

22. Schwab, S. R. & Cyster, J. G. Finding a way out: lymphocyte egress from lymphoid organs. *Nat Immunol.* **8**, 1295–301 (2007).

23. Dyment, D. A., Ebers, G. C. & Sadovnick, A. D. Genetics of multiple sclerosis. *Lancet Neurol.* **3**, 104–10 (2004).

24. Ebers, G. C., Sadovnick, A. D. & Risch, N. J. A genetic basis for familial aggregation in multiple sclerosis. Canadian Collaborative Study Group. *Nature.* **377**, 150–1 (1995).

25. Jersild, C., Svejgaard, A. & Fog, T. HL-A antigens and multiple sclerosis. *Lancet.* **1**, 1240–1 (1972).

26. Naito, S., Namerow, N., Mickey, M. R. & Terasaki, P. I. Multiple sclerosis: association with HL-A3. *Tissue antigens.* **2**, 1–4 (1972).

27. Jersild, C. *et al.* Histocompatibility determinants in multiple sclerosis, with special reference to clinical course. *Lancet.* **2**, 1221–5 (1973).

28. Sawcer, S. *et al.* Genetic risk and a primary role for cell-mediated immune mechanisms in multiple sclerosis. *Nature.* **476**, 214–9 (2011).

29. Brynedal, B. *et al.* HLA-A confers an HLA-DRB1 independent influence on the risk of multiple sclerosis. *PLoS One.* **2**, e664 (2007).

30. Hafler, D. A. *et al.* Risk alleles for multiple sclerosis identified by a genomewide study. *N Engl J Med.* **357**, 851–62 (2007).

31. Sawcer, S. The complex genetics of multiple sclerosis: pitfalls and prospects. *Brain.* **131**, 3118–31 (2008).

32. Reich, D. E. & Lander, E. S. On the allelic spectrum of human disease. *Trends Genet.* **17**, 502–10 (2001).

33. Pritchard, J. K. & Cox, N. J. The allelic architecture of human disease genes: common disease-common variant...or not? *Hum Mol Genet.* **11**, 2417–23 (2002).

34. Yang, Q., Khoury, M. J., Friedman, J., Little, J. & Flanders, W. D. How many genes underlie the occurrence of common complex diseases in the population? *Int J Epidemiol.* **34**, 1129–37 (2005).

35. Baranzini, S. E. *et al.* Genome, epigenome and RNA sequences of monozygotic twins discordant for multiple sclerosis. *Nature.* **464**, 1351–6 (2010).

36. Todd, J. a *et al.* Robust associations of four new chromosome regions from genome-wide analyses of type 1 diabetes. *Nat Genet.* **39**, 857–64 (2007).

37. Hafler, J. P. *et al.* CD226 Gly307Ser association with multiple autoimmune diseases. *Genes Immun.* **10**, 5–10 (2009).

38. Maiti, A. K. *et al.* Non-synonymous variant (Gly307Ser) in CD226 is associated with susceptibility to multiple autoimmune diseases. *Rheumatology (Oxford).* **49**, 1239–44 (2010).

39. Löfgren, S. E. *et al.* A 3'-untranslated region variant is associated with impaired expression of CD226 in T and natural killer T cells and is associated with susceptibility to systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* **62**, 3404–14 (2010).

40. Du, Y. *et al.* Association of the CD226 single nucleotide polymorphism with systemic lupus erythematosus in the Chinese Han population. *Tissue antigens.* **77**, 65–7 (2011).

41. Douroudis, K. *et al.* The CD226 Gly307Ser gene polymorphism is associated with severity of psoriasis. *J Dermatol Sci.* **58**, 160–1 (2010).

42. Dieudé, P. *et al.* Association of the CD226 Ser(307) variant with systemic sclerosis: evidence of a contribution of costimulation pathways in systemic sclerosis pathogenesis. *Arthritis Rheum.* **63**, 1097–105 (2011).

43. Wieczorek, S. *et al.* Novel association of the CD226 (DNAM-1) Gly307Ser polymorphism in Wegener's granulomatosis and confirmation for multiple sclerosis in German patients. *Genes Immun.* **10**, 591–5 (2009).

44. Qiu, Z.-X., Zhang, K., Qiu, X.-S., Zhou, M. & Li, W.-M. CD226 Gly307Ser association with multiple autoimmune diseases: a meta-analysis. *Hum Immunol.* **74**, 249–55 (2013).

45. Maier, L. M. & Hafler, D. a Autoimmunity risk alleles in costimulation pathways. *Immunol Rev.* **229**, 322–36 (2009).

46. Gourraud, P.-A., Harbo, H. F., Hauser, S. L. & Baranzini, S. E. The genetics of multiple sclerosis: an up-to-date review. *Immunol Rev.* **248**, 87–103 (2012).

47. Gregersen, J. W. *et al.* Functional epistasis on a common MHC haplotype associated with multiple sclerosis. *Nature.* **443**, 574–7 (2006).

48. Friese, M. a *et al.* Opposing effects of HLA class I molecules in tuning autoreactive CD8+ T cells in multiple sclerosis. *Nat Med.* **14**, 1227–35 (2008).

49. De Jager, P. L. *et al.* The role of the CD58 locus in multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **106**, 5264–9 (2009).

50. Kofler, D. M., Severson, C. a, Mousissian, N., De Jager, P. L. & Hafler, D. a The CD6 multiple sclerosis susceptibility allele is associated with alterations in CD4+ T cell proliferation. *J Immunol.* **187**, 3286–91 (2011).

51. Gregory, A. P. *et al.* TNF receptor 1 genetic risk mirrors outcome of anti-TNF therapy in multiple sclerosis. *Nature.* **488**, 508–11 (2012).

52. Group, T. L. M. S. S. G. and T. U. of B. C. M. A. TNF neutralization in MS: results of a randomized, placebo-controlled multicenter study. The Lenercept Multiple Sclerosis Study Group and The University of British Columbia MS/MRI Analysis Group. *Neurology.* **53**, 457–65 (1999).

53. Van Oosten, B. W. *et al.* Increased MRI activity and immune activation in two multiple sclerosis patients treated with the monoclonal anti-tumor necrosis factor antibody cA2. *Neurology.* **47**, 1531–4 (1996).

54. Münz, C., Lünemann, J. D., Getts, M. T. & Miller, S. D. Antiviral immune responses: triggers of or triggered by autoimmunity? *Nat Rev Immunol.* **9**, 246–58 (2009).

55. Luzuriaga, K. & Sullivan, J. L. Infectious mononucleosis. *N Engl J Med.* **362**, 1993–2000 (2010).

56. Nielsen, T. R. *et al.* Effects of infectious mononucleosis and HLA-DRB1*15 in multiple sclerosis. *Mult Scler.* **15**, 431–6 (2009).

57. Lang, H. L. E. *et al.* A functional and structural basis for TCR cross-reactivity in multiple sclerosis. *Nat Immunol.* **3**, 940–3 (2002).

58. Serafini, B. *et al.* Dysregulated Epstein-Barr virus infection in the multiple sclerosis brain. *J Exp Med.* **204**, 2899–912 (2007).

59. Marrie, R. A. Environmental risk factors in multiple sclerosis aetiology. *Lancet Neurol.* **3**, 709–18 (2004).

60. Ascherio, A., Munger, K. L. & Simon, K. C. Vitamin D and multiple sclerosis. *Lancet Neurol.* **9**, 599–612 (2010).

61. Hernán, M. A. *et al.* Cigarette smoking and the progression of multiple sclerosis. *Brain.* **128**, 1461–5 (2005).

62. Kleinewietfeld, M. *et al.* Sodium chloride drives autoimmune disease by the induction of pathogenic TH17 cells. *Nature.* **496**, 518–22 (2013).

63. Wu, C. *et al.* Induction of pathogenic TH17 cells by inducible salt-sensing kinase SGK1. *Nature.* **496**, 513–7 (2013).

64. Berer, K. *et al.* Commensal microbiota and myelin autoantigen cooperate to trigger autoimmune demyelination. *Nature.* **479**, 538–41 (2011).

65. Spits, H. Development of alphabeta T cells in the human thymus. *Nat Rev Immunol.* **2**, 760–72 (2002).

66. Takahama, Y. Journey through the thymus: stromal guides for T-cell development and selection. *Nat Rev Immunol.* **6**, 127–35 (2006).

67. Starr, T. K., Jameson, S. C. & Hogquist, K. A. Positive and negative selection of T cells. *Ann Rev Immunol.* **21**, 139–76 (2003).

68. Singer, A., Adoro, S. & Park, J.-H. Lineage fate and intense debate: myths, models and mechanisms of CD4- versus CD8-lineage choice. *Nat Rev Immunol.* **8**, 788–801 (2008).

69. Palmer, E. Negative selection--clearing out the bad apples from the T-cell repertoire. *Nat Rev Immunol.* **3**, 383–91 (2003).

70. Steinman, R. M. Decisions about dendritic cells: past, present, and future. *Ann Rev Immunol.* **30**, 1–22 (2012).

71. Neefjes, J., Jongsma, M. L. M., Paul, P. & Bakke, O. Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. *Nat Rev Immunol.* **11**, 823–36 (2011).

72. Gras, S. *et al.* A structural voyage toward an understanding of the MHC-I-restricted immune response: lessons learned and much to be learned. *Immunol Rev.* **250**, 61–81 (2012).

73. Sharpe, A. H. Mechanisms of costimulation. *Immunol Rev.* **229**, 5–11 (2009).

74. Mueller, D. L. Mechanisms maintaining peripheral tolerance. *Nat Immunol.* **11**, 21–7 (2010).

75. Zhu, J., Yamane, H. & Paul, W. E. Differentiation of effector CD4 T cell populations (*). *Ann Rev Immunol.* **28**, 445–89 (2010).

76. Iwakura, Y., Nakae, S., Saijo, S. & Ishigame, H. The roles of IL-17A in inflammatory immune responses and host defense against pathogens. *Immunol Rev.* **226**, 57–79 (2008).

77. Zhang, N. & Bevan, M. J. CD8(+) T cells: foot soldiers of the immune system. *Immunity.* **35**, 161–8 (2011).

78. Liu, H., MacKenzie-Graham, A. J., Kim, S. & Voskuhl, R. R. Mice resistant to experimental autoimmune encephalomyelitis have increased thymic expression of myelin basic protein and increased MBP specific T cell tolerance. *J Neuroimmunol.* **115**, 118–26 (2001).

79. Derbinski, J., Schulte, A., Kyewski, B. & Klein, L. Promiscuous gene expression in medullary thymic epithelial cells mirrors the peripheral self. *Nat Immunol.* **2**, 1032–9 (2001).

80. Klein, L., Klugmann, M., Nave, K. A., Tuohy, V. K. & Kyewski, B. Shaping of the autoreactive T-cell repertoire by a splice variant of self protein expressed in thymic epithelial cells. *Nat Med.* **6**, 56–61 (2000).

81. Egwuagu, C. E., Charukamnoetkanok, P. & Gery, I. Thymic expression of autoantigens correlates with resistance to autoimmune disease. *J Immunol.* **159**, 3109–12 (1997).

82. Pribyl, T. M., Campagnoni, C., Kampf, K., Handley, V. W. & Campagnoni, A. T. The major myelin protein genes are expressed in the human thymus. *J Neurosci Res.* **45**, 812–9 (1996).

83. Burns, J., Rosenzweig, A., Zweiman, B. & Lisak, R. P. Isolation of myelin basic protein-reactive T-cell lines from normal human blood. *Cell Immunol.* **81**, 435–40 (1983).

84. Pette, M. *et al.* Myelin basic protein-specific T lymphocyte lines from MS patients and healthy individuals. *Neurology.* **40**, 1770–6 (1990).

85. Gallegos, A. M. & Bevan, M. J. Central tolerance: good but imperfect. *Immunol Rev.* **209**, 290–6 (2006).

86. Lünemann, J. D. *et al.* EBNA1-specific T cells from patients with multiple sclerosis cross react with myelin antigens and co-produce IFN-gamma and IL-2. *J Exp Med.* **205**, 1763–73 (2008).

87. Fujinami, R. S. & Oldstone, M. B. Amino acid homology between the encephalitogenic site of myelin basic protein and virus: mechanism for autoimmunity. *Science.* **230**, 1043–5 (1985).

88. Harkiolaki, M. *et al.* T cell-mediated autoimmune disease due to low-affinity crossreactivity to common microbial peptides. *Immunity.* **30**, 348–57 (2009).

89. Markovic-Plese, S. *et al.* High level of cross-reactivity in influenza virus hemagglutinin-specific CD4+ T-cell response: implications for the initiation of autoimmune response in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* **169**, 31–8 (2005).

90. Holmøy, T., Kvale, E. Ø. & Vartdal, F. Cerebrospinal fluid CD4+ T cells from a multiple sclerosis patient cross-recognize Epstein-Barr virus and myelin basic protein. *J Neurovirol.* **10**, 278–83 (2004).

91. Wucherpfennig, K. W. & Strominger, J. L. Molecular mimicry in T cell-mediated autoimmunity: viral peptides activate human T cell clones specific for myelin basic protein. *Cell.* **80**, 695–705 (1995).

92. Tejada-Simon, M. V, Zang, Y. C. Q., Hong, J., Rivera, V. M. & Zhang, J. Z. Cross-reactivity with myelin basic protein and human herpesvirus-6 in multiple sclerosis. *Ann Neurol.* **53**, 189–97 (2003).

93. Ji, Q., Perchellet, A. & Goverman, J. M. Viral infection triggers central nervous system autoimmunity via activation of CD8+ T cells expressing dual TCRs. *Nat Immunol.* **11**, 628–34 (2010).

94. Furtado, G. C. *et al.* Swift entry of myelin-specific T lymphocytes into the central nervous system in spontaneous autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol.* **181**, 4648–55 (2008).

95. Zhang, H., Podojil, J. R., Luo, X. & Miller, S. D. Intrinsic and induced regulation of the age-associated onset of spontaneous experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol.* **181**, 4638–47 (2008).

96. Weller, R. O., Djuanda, E., Yow, H.-Y. & Carare, R. O. Lymphatic drainage of the brain and the pathophysiology of neurological disease. *Acta Neuropathol.* **117**, 1–14 (2009).

97. Chen, L. & Flies, D. B. Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. *Nat Rev Immunol.* **13**, 227–242 (2013).

98. Zhu, Y., Yao, S. & Chen, L. Cell surface signaling molecules in the control of immune responses: a tide model. *Immunity.* **34**, 466–78 (2011).

99. Greenwald, R. J., Freeman, G. J. & Sharpe, A. H. The B7 family revisited. *Ann Rev Immunol.* **23**, 515–48 (2005).

100. Joller, N., Peters, A., Anderson, A. C. & Kuchroo, V. K. Immune checkpoints in central nervous system autoimmunity. *Immunol Rev.* **248**, 122–39 (2012).

101. Engelhardt, B. & Coisne, C. Fluids and barriers of the CNS establish immune privilege by confining immune surveillance to a two-walled castle moat surrounding the CNS castle. *Fluids Barriers CNS.* **8**, 4 (2011).

102. Aggarwal, S., Yurlova, L. & Simons, M. Central nervous system myelin: structure, synthesis and assembly. *Trends Cell Biol.* **21**, 585–93 (2011).

103. Ransohoff, R. M., Kivisäkk, P. & Kidd, G. Three or more routes for leukocyte migration into the central nervous system. *Nat Rev Immunol.* **3**, 569–81 (2003).

104. Reboldi, A. *et al.* C-C chemokine receptor 6-regulated entry of TH-17 cells into the CNS through the choroid plexus is required for the initiation of EAE. *Nat Immunol.* **10**, 514–23 (2009).

105. Kivisäkk, P. *et al.* Localizing central nervous system immune surveillance: meningeal antigen-presenting cells activate T cells during experimental autoimmune encephalomyelitis. *Ann Neurol.* **65**, 457–69 (2009).

106. Brown, D. A. & Sawchenko, P. E. Time course and distribution of inflammatory and neurodegenerative events suggest structural bases for the pathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Comp Neurol.* **502**, 236–60 (2007).

107. Steinman, L. A brief history of T(H)17, the first major revision in the T(H)1/T(H)2 hypothesis of T cell-mediated tissue damage. *Nat Med.* **13**, 139–45 (2007).

108. Cua, D. J. *et al.* Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. *Nature.* **421**, 744–8 (2003).

109. Nylander, A. & Hafler, D. A. Multiple sclerosis. *J Clin Invest.* **122**, 1180–8 (2012).

110. El-Behi, M. *et al.* The encephalitogenicity of T(H)17 cells is dependent on IL-1- and IL-23-induced production of the cytokine GM-CSF. *Nat Immunol.* **12**, 568–75 (2011).

111. Codarri, L. *et al.* RORγt drives production of the cytokine GM-CSF in helper T cells, which is essential for the effector phase of autoimmune neuroinflammation. *Nat Immunol.* **12**, 560–7 (2011).

112. Kebir, H. *et al.* Human TH17 lymphocytes promote blood-brain barrier disruption and central nervous system inflammation. *Nat Immunol.* **13**, 1173–5 (2007).

113. Powrie, F. & Mason, D. OX-22high CD4+ T cells induce wasting disease with multiple organ pathology: prevention by the OX-22low subset. *J Exp Med.* **172**, 1701–8 (1990).

114. Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Asano, M., Itoh, M. & Toda, M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol.* **155**, 1151–64 (1995).

115. Baecher-Allan, C., Brown, J. A., Freeman, G. J. & Hafler, D. A. CD4+CD25high regulatory cells in human peripheral blood. *J Immunol.* **167**, 1245–53 (2001).

116. Stephens, L. A., Mottet, C., Mason, D. & Powrie, F. Human CD4(+)CD25(+) thymocytes and peripheral T cells have immune suppressive activity in vitro. *Eur J Immunol.* **31**, 1247–54 (2001).

117. Taams, L. S. *et al.* Antigen-specific T cell suppression by human CD4+CD25+ regulatory T cells. *Eur J Immunol.* **32**, 1621–30 (2002).

118. Fontenot, J. D., Gavin, M. A. & Rudensky, A. Y. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol.* **4**, 330–6 (2003).

119. Hori, S., Nomura, T. & Sakaguchi, S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science.* **299**, 1057–61 (2003).

120. Wildin, R. S. *et al.* X-linked neonatal diabetes mellitus, enteropathy and endocrinopathy syndrome is the human equivalent of mouse scurfy. *Nat Genet.* **27**, 18–20 (2001).

121. Ochs, H. D., Gambineri, E. & Torgerson, T. R. IPEX, FOXP3 and regulatory T-cells: a model for autoimmunity. *Immunol Res.* **38**, 112–21 (2007).

122. Brunkow, M. E. *et al.* Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfin, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nat Genet.* **27**, 68–73 (2001).

123. Fontenot, J. D. & Rudensky, A. Y. A well adapted regulatory contrivance: regulatory T cell development and the forkhead family transcription factor Foxp3. *Nat Immunol.* **6**, 331–7 (2005).

124. Hsieh, C.-S., Lee, H.-M. & Lio, C.-W. J. Selection of regulatory T cells in the thymus. *Nat Rev Immunol.* **12**, 157–67 (2012).

125. Bilate, A. M. & Lafaille, J. J. Induced CD4+Foxp3+ regulatory T cells in immune tolerance. *Ann Rev Immunol.* **30**, 733–58 (2012).

126. Josefowicz, S. Z. *et al.* Extrathymically generated regulatory T cells control mucosal TH2 inflammation. *Nature.* **482**, 395–9 (2012).

127. Zheng, Y. *et al.* Role of conserved non-coding DNA elements in the Foxp3 gene in regulatory T-cell fate. *Nature.* **463**, 808–12 (2010).

128. Weiss, J. M. *et al.* Neuropilin 1 is expressed on thymus-derived natural regulatory T cells, but not mucosa-generated induced Foxp3+ T reg cells. *J Exp Med.* **209**, 1723–42 (2012).

129. Roncarolo, M. G., Bacchetta, R., Bordignon, C., Narula, S. & Levings, M. K. Type 1 T regulatory cells. *Immunol Rev.* **182**, 68–79 (2001).

130. Weiner, H. L. Induction and mechanism of action of transforming growth factor-beta-secreting Th3 regulatory cells. *Immunol Rev.* **182**, 207–14 (2001).

131. Buckner, J. H. Mechanisms of impaired regulation by CD4(+)CD25(+)FOXP3(+) regulatory T cells in human autoimmune diseases. *Nat Rev Immunol.* **10**, 849–59 (2010).

132. Viglietta, V., Baecher-Allan, C., Weiner, H. L. & Hafler, D. a Loss of functional suppression by CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with multiple sclerosis. *J Exp Med.* **199**, 971–9 (2004).

133. Putheti, P., Pettersson, A., Soderstrom, M., Link, H. & Huang, Y. M. Circulating CD4+CD25+ T regulatory cells are not altered in multiple sclerosis and unaffected by disease-modulating drugs. *J Clin Immunol.* **24**, 155–61 (2004).

134. Haas, J. *et al.* Prevalence of newly generated naive regulatory T cells (Treg) is critical for Treg suppressive function and determines Treg dysfunction in multiple sclerosis. *J Immunol.* **179**, 1322–30 (2007).

135. 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.* **147**, 412–8 (2007).

136. Michel, L. *et al.* Patients with relapsing-remitting multiple sclerosis have normal Treg function when cells expressing IL-7 receptor alpha-chain are excluded from the analysis. *J Clin Invest.* **118**, 3411–9 (2008).

137. Venken, K. *et al.* Natural naive CD4+CD25+CD127low regulatory T cell (Treg) development and function are disturbed in multiple sclerosis patients: recovery of memory Treg homeostasis during disease progression. *J Immunol.* **180**, 6411–20 (2008).

138. Borsellino, G. *et al.* Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3+ Treg cells: hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression. *Blood.* **110**, 1225–32 (2007).

139. Dominguez-Villar, M., Baecher-Allan, C. M. & Hafler, D. A. Identification of T helper type 1-like, Foxp3+ regulatory T cells in human autoimmune disease. *Nat Med.* **17**, 673–5 (2011).

140. Haas, J. *et al.* Reduced suppressive effect of CD4+CD25high regulatory T cells on the T cell immune response against myelin oligodendrocyte glycoprotein in patients with multiple sclerosis. *Eur J Immunol.* **35**, 3343–52 (2005).

141. Huan, J. *et al.* Decreased FOXP3 levels in multiple sclerosis patients. *J Neurosci Res.* **81**, 45–52 (2005).

142. Astier, A. L., Meiffren, G., Freeman, S. & Hafler, D. A. Alterations in CD46-mediated Tr1 regulatory T cells in patients with multiple sclerosis. *J Clin Invest.* **116**, 3252–7 (2006).

143. Olivares-Villagómez, D., Wang, Y. & Lafaille, J. J. Regulatory CD4(+) T cells expressing endogenous T cell receptor chains protect myelin basic protein-specific transgenic mice from spontaneous autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med.* **188**, 1883–94 (1998).

144. Lafaille, J. J., Nagashima, K., Katsuki, M. & Tonegawa, S. High incidence of spontaneous autoimmune encephalomyelitis in immunodeficient anti-myelin basic protein T cell receptor transgenic mice. *Cell.* **78**, 399–408 (1994).

145. Hori, S., Haury, M., Coutinho, A. & Demengeot, J. Specificity requirements for selection and effector functions of CD25+4+ regulatory T cells in anti-myelin basic protein T cell receptor transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **99**, 8213–8 (2002).

146. Kohm, A. P., Carpentier, P. A., Anger, H. A. & Miller, S. D. Cutting edge: CD4+CD25+ regulatory T cells suppress antigen-specific autoreactive immune responses and central nervous system inflammation during active experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol.* **169**, 4712–6 (2002).

147. Zhang, X. *et al.* IL-10 is involved in the suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis by CD25+CD4+ regulatory T cells. *Int Immunol.* **16**, 249–56 (2004).

148. Korn, T. *et al.* Myelin-specific regulatory T cells accumulate in the CNS but fail to control autoimmune inflammation. *Nat Med.* **13**, 423–31 (2007).

149. Baxter, A. G. The origin and application of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Nat Rev Immunol.* **7**, 904–12 (2007).

150. Gold, R., Linington, C. & Lassmann, H. Understanding pathogenesis and therapy of multiple sclerosis via animal models: 70 years of merits and culprits in experimental autoimmune encephalomyelitis research. *Brain.* **129**, 1953–71 (2006).

151. Ransohoff, R. M. Animal models of multiple sclerosis: the good, the bad and the bottom line. *Nat Neurosci.* **15**, 1074–7 (2012).

152. Rivers, T. M., Sprunt, D. H. & Berry, G. P. Observations on attempts to produce acute disseminated encephalomyelitis in monkeys. *J Exp Med.* **58**, 39–53 (1933).

153. Rivers, T. M. & Schwentker, F. F. Encephalomyelitis accompanied by myelin destruction experimentally produced in monkeys. *J Exp Med.* **61**, 689–702 (1935).

154. Kabat, E. A., Wolf, A. & Bezer, A. E. The rapid production of acute disseminated encephalomyelitis in rhesus monkeys by injection of heterologous and homologous brain tissue with adjuvants. *J Exp Med.* **85**, 117–30 (1947).

155. Morgan, I. M. Allergic encephalomyelitis in monkeys in response to injection of normal monkey nervous tissue. *J Exp Med.* **85**, 131–40 (1947).

156. Freund, J., Stern, E. R. & Pisani, T. M. Isoallergic encephalomyelitis and radiculitis in guinea pigs after one injection of brain and Mycobacteria in water-in-oil emulsion. *J Immunol.* **57**, 179–94 (1947).

157. Freund, J.; McDermott, K. Sensitisation to horse serum by means of adjuvants. *Proc Soc Exp Biol.* **49**, 548–553 (1942).

158. Waksman, B. H., Porter, H., Lees, M. D., Adams, R. D. & Folch, J. A study of the chemical nature of components of bovine white matter effective in producing allergic encephalomyelitis in the rabbit. *J Exp Med.* **100**, 451–71 (1954).

159. Laatsch, R. H., Kies, M. W., Gordon, S. & Alvord, E. C. The encephalomyelitic activity of myelin isolated by ultracentrifugation. *J Exp Med.* **115**, 777–88 (1962).

160. Einstein, E. R., Robertson, D. M., DiCaprio, J. M. & Moore, W. The isolation from bovine spinal cord of a homogeneous protein with encephalitogenic activity. *J Neurochem.* **9**, 353–61 (1962).

161. Waksman, B. H. & Adams, R. D. A histologic study of the early lesion in experimental allergic encephalomyelitis in the guinea pig and rabbit. *Am J Pathol.* **41**, 135–62 (1962).

162. Mendel, I., Kerlero de Rosbo, N. & Ben-Nun, A. A myelin oligodendrocyte glycoprotein peptide induces typical chronic experimental autoimmune encephalomyelitis in H-2b mice: fine specificity and T cell receptor V beta expression of encephalitogenic T cells. *Eur J Immunol.* **25**, 1951–9 (1995).

163. Bettelli, E. *et al.* Myelin oligodendrocyte glycoprotein-specific T cell receptor transgenic mice develop spontaneous autoimmune optic neuritis. *J Exp Med.* **197**, 1073–1081 (2003).

164. Pöllinger, B. *et al.* Spontaneous relapsing-remitting EAE in the SJL/J mouse: MOG-reactive transgenic T cells recruit endogenous MOG-specific B cells. *J Exp Med.* **206**, 1303–16 (2009).

165. Steinman, L. & Zamvil, S. S. How to successfully apply animal studies in experimental allergic encephalomyelitis to research on multiple sclerosis. *Ann Neurol.* **60**, 12–21 (2006).

166. Burns, G. F., Triglia, T., Werkmeister, J. A., Begley, C. G. & Boyd, A. W. TLiSA1, a human T lineage-specific activation antigen involved in the differentiation of cytotoxic T lymphocytes and anomalous killer cells from their precursors. *J Exp Med.* **161**, 1063–78 (1985).

167. Scott, J. L. *et al.* Characterization of a novel membrane glycoprotein involved in platelet activation. *J Biol Chem.* **264**, 13475–82 (1989).

168. Shibuya, a *et al.* DNAM-1, a novel adhesion molecule involved in the cytolytic function of T lymphocytes. *Immunity.* **4**, 573–81 (1996).

169. Sherrington, P. D. *et al.* TLiSA1 (PTA1) activation antigen implicated in T cell differentiation and platelet activation is a member of the immunoglobulin superfamily exhibiting distinctive regulation of expression. *J Biol Chem.* **272**, 21735–44 (1997).

170. Mason, D. *et al.* CD antigens 2002. *Blood.* **99**, 3877–80 (2002).

171. Elishmereni, M., Bachelet, I. & Levi-Schaffer, F. DNAM-1: an amplifier of immune responses as a therapeutic target in various disorders. *Curr Opin Investig Drugs.* **9**, 491–6 (2008).

172. Bottino, C. *et al.* Identification of PVR (CD155) and Nectin-2 (CD112) as cell surface ligands for the human DNAM-1 (CD226) activating molecule. *J Exp Med.* **198**, 557–67 (2003).

173. Tahara-Hanaoka, S. *et al.* Identification and characterization of murine DNAM-1 (CD226) and its poliovirus receptor family ligands. *Biochem Biophys Res Commun.* **329**, 996–1000 (2005).

174. Tahara-Hanaoka, S. *et al.* Functional characterization of DNAM-1 (CD226) interaction with its ligands PVR (CD155) and nectin-2 (PRR-2/CD112). *Int Immunol.* **16**, 533–8 (2004).

175. Yu, X. *et al.* The surface protein TIGIT suppresses T cell activation by promoting the generation of mature immunoregulatory dendritic cells. *Nat Immunol.* **10**, 48–57 (2009).

176. Seth, S. *et al.* The murine pan T cell marker CD96 is an adhesion receptor for CD155 and nectin-1. *Biochem Biophys Res Commun.* **364**, 959–65 (2007).

177. Fuchs, A., Cella, M., Giurisato, E., Shaw, A. S. & Colonna, M. Cutting edge: CD96 (tactile) promotes NK cell-target cell adhesion by interacting with the poliovirus receptor (CD155). *J Immunol.* **172**, 3994–8 (2004).

178. Carlsten, M. *et al.* DNAX accessory molecule-1 mediated recognition of freshly isolated ovarian carcinoma by resting natural killer cells. *Cancer Res.* **67**, 1317–25 (2007).

179. Castriconi, R. *et al.* Natural killer cell-mediated killing of freshly isolated neuroblastoma cells: critical role of DNAX accessory molecule-1-poliovirus receptor interaction. *Cancer Res.* **64**, 9180–4 (2004).

180. El-Sherbiny, Y. M. *et al.* The requirement for DNAM-1, NKG2D, and NKp46 in the natural killer cell-mediated killing of myeloma cells. *Cancer Res.* **67**, 8444–9 (2007).

181. Moretta, L. *et al.* Surface NK receptors and their ligands on tumor cells. *Semin Immunol.* **18**, 151–8 (2006).

182. Pende, D. *et al.* PVR (CD155) and Nectin-2 (CD112) as ligands of the human DNAM-1 (CD226) activating receptor: involvement in tumor cell lysis. *Mol Immunol.* **42**, 463–9 (2005).

183. Pende, D. *et al.* Analysis of the receptor-ligand interactions in the natural killer-mediated lysis of freshly isolated myeloid or lymphoblastic leukemias: evidence for the involvement of the Poliovirus receptor (CD155) and Nectin-2 (CD112). *Blood.* **105**, 2066–73 (2005).

184. Carlsten, M. *et al.* Primary human tumor cells expressing CD155 impair tumor targeting by down-regulating DNAM-1 on NK cells. *J Immunol.* **183**, 4921–30 (2009).

185. Reymond, N. *et al.* DNAM-1 and PVR regulate monocyte migration through endothelial junctions. *J Exp Med.* **199**, 1331–41 (2004).

186. Manes, T. D. & Pober, J. S. Identification of endothelial cell junctional proteins and lymphocyte receptors involved in transendothelial migration of human effector memory CD4+ T cells. *J Immunol.* **186**, 1763–8 (2011).

187. Gilfillan, S. *et al.* DNAM-1 promotes activation of cytotoxic lymphocytes by nonprofessional antigen-presenting cells and tumors. *J Exp Med.* **205**, 2965–73 (2008).

188. Cella, M. *et al.* Loss of DNAM-1 contributes to CD8+ T-cell exhaustion in chronic HIV-1 infection. *Eur J Immunol.* **40**, 949–54 (2010).

189. Welch, M. J., Teijaro, J. R., Lewicki, H. a, Colonna, M. & Oldstone, M. B. a CD8 T cell defect of TNF-α and IL-2 in DNAM-1 deficient mice delays clearance in vivo of a persistent virus infection. *Virology.* **429**, 163–70 (2012).

190. Shibuya, K. *et al.* Physical and functional association of LFA-1 with DNAM-1 adhesion molecule. *Immunity.* **11**, 615–23 (1999).

191. Shirakawa, J. *et al.* LFA-1-dependent lipid raft recruitment of DNAM-1 (CD226) in CD4+ T cell. *Int Immunol.* **18**, 951–7 (2006).

192. Shibuya, K. *et al.* CD226 (DNAM-1) is involved in lymphocyte function-associated antigen 1 costimulatory signal for naive T cell differentiation and proliferation. *J Exp Med.* **198**, 1829–39 (2003).

193. Gagliani, N. *et al.* Coexpression of CD49b and LAG-3 identifies human and mouse T regulatory type 1 cells. *Nat Med.* **178**, 537–47 (2013).

194. Magnani, C. F. *et al.* Killing of myeloid APCs via HLA class I, CD2 and CD226 defines a novel mechanism of suppression by human Tr1 cells. *Eur J Immunol.* **41**, 1652–62 (2011).

195. Dardalhon, V. *et al.* CD226 is specifically expressed on the surface of Th1 cells and regulates their expansion and effector functions. *J Immunol.* **175**, 1558–65 (2005).

196. Tabata, H. *et al.* Expression of TLiSA1 on T cells from patients with rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Clin Immunol Immunopathol.* **52**, 366–75 (1989).

197. Avouac, J. *et al.* Critical role of the adhesion receptor DNAX accessory molecule-1 (DNAM-1) in the development of inflammation-driven dermal fibrosis in a mouse model of systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis.* **1**, 1–10 (2012).

198. Janes, P. W., Ley, S. C. & Magee, A. I. Aggregation of lipid rafts accompanies signaling via the T cell antigen receptor. *J Cell Biol.* **147**, 447–61 (1999).

199. Xavier, R., Brennan, T., Li, Q., McCormack, C. & Seed, B. Membrane compartmentation is required for efficient T cell activation. *Immunity.* **8**, 723–32 (1998).

200. Katagiri, K., Maeda, A., Shimonaka, M. & Kinashi, T. RAPL, a Rap1-binding molecule that mediates Rap1-induced adhesion through spatial regulation of LFA-1. *Nat Immunol.* **4**, 741–8 (2003).

201. Shibuya, a, Lanier, L. L. & Phillips, J. H. Protein kinase C is involved in the regulation of both signaling and adhesion mediated by DNAX accessory molecule-1 receptor. *J Immunol.* **161**, 1671–6 (1998).

202. Shirakawa, J., Shibuya, K. & Shibuya, A. Requirement of the serine at residue 329 for lipid raft recruitment of DNAM-1 (CD226). *Int Immunol.* **17**, 217–23 (2005).

203. Stanietsky, N. *et al.* The interaction of TIGIT with PVR and PVRL2 inhibits human NK cell cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **106**, 17858–63 (2009).

204. Boles, K. S. *et al.* A novel molecular interaction for the adhesion of follicular CD4 T cells to follicular DC. *Eur J Immunol.* **39**, 695–703 (2009).

205. Lozano, E., Dominguez-Villar, M., Kuchroo, V. & Hafler, D. A. The TIGIT/CD226 axis regulates human T cell function. *J Immunol.* **188**, 3869–75 (2012).

206. Levin, S. D. *et al.* Vstm3 is a member of the CD28 family and an important modulator of T-cell function. *Eur J Immunol.* **41**, 902–15 (2011).

207. Joller, N. *et al.* Cutting edge: TIGIT has T cell-intrinsic inhibitory functions. *J Immunol.* **186**, 1338–42 (2011).

208. Mendelsohn, C. L., Wimmer, E. & Racaniello, V. R. Cellular receptor for poliovirus: molecular cloning, nucleotide sequence, and expression of a new member of the immunoglobulin superfamily. *Cell.* **56**, 855–65 (1989).

209. Takai, Y., Irie, K., Shimizu, K., Sakisaka, T. & Ikeda, W. Nectins and nectin-like molecules: roles in cell adhesion, migration, and polarization. *Cancer Sci.* **94**, 655–67 (2003).

210. Chadéneau, C., LeMoullac, B. & Denis, M. G. A novel member of the immunoglobulin gene superfamily expressed in rat carcinoma cell lines. *J Biol Chem.* **269**, 15601–5 (1994).

211. Bernhardt, G., Harber, J., Zibert, A., DeCrombrugghe, M. & Wimmer, E. The poliovirus receptor: identification of domains and amino acid residues critical for virus binding. *Virology.* **203**, 344–56 (1994).

212. Ikeda, W. *et al.* Tage4/Nectin-like molecule-5 heterophilically trans-interacts with cell adhesion molecule Nectin-3 and enhances cell migration. *J Biol Chem.* **278**, 28167–72 (2003).

213. Lange, R., Peng, X., Wimmer, E., Lipp, M. & Bernhardt, G. The poliovirus receptor CD155 mediates cell-to-matrix contacts by specifically binding to vitronectin. *Virology.* **285**, 218–27 (2001).

214. Meyer, D. *et al.* CD96 interaction with CD155 via its first Ig-like domain is modulated by alternative splicing or mutations in distal Ig-like domains. *J Biol Chem.* **284**, 2235–44 (2009).

215. Mueller, S. & Wimmer, E. Recruitment of nectin-3 to cell-cell junctions through trans-heterophilic interaction with CD155, a vitronectin and poliovirus receptor that localizes to alpha(v)beta3 integrin-containing membrane microdomains. *J Biol Chem.* **278**, 31251–60 (2003).

216. Ravens, I., Seth, S., Förster, R. & Bernhardt, G. Characterization and identification of Tage4 as the murine orthologue of human poliovirus receptor/CD155. *Biochem Biophys Res Commun.* **312**, 1364–71 (2003).

217. Qiu, Q. *et al.* CD155 is involved in negative selection and is required to retain terminally maturing CD8 T cells in thymus. *J Immunol.* **184**, 1681–9 (2010).

218. Xu, Z. & Jin, B. A novel interface consisting of homologous immunoglobulin superfamily members with multiple functions. *Cell Mol Immunol.* **7**, 11–9 (2010).

219. Maier, M. K. *et al.* The adhesion receptor CD155 determines the magnitude of humoral immune responses against orally ingested antigens. *Eur J Immunol.* **37**, 2214–25 (2007).

220. Hirota, T., Irie, K., Okamoto, R., Ikeda, W. & Takai, Y. Transcriptional activation of the mouse Necl-5/Tage4/PVR/CD155 gene by fibroblast growth factor or oncogenic Ras through the Raf-MEK-ERK-AP-1 pathway. *Oncogene.* **24**, 2229–35 (2005).

221. Soriani, A. *et al.* ATM-ATR-dependent up-regulation of DNAM-1 and NKG2D ligands on multiple myeloma cells by therapeutic agents results in enhanced NK-cell susceptibility and is associated with a senescent phenotype. *Blood.* **113**, 3503–11 (2009).

222. Ogita, H. & Takai, Y. Nectins and nectin-like molecules: roles in cell adhesion, polarization, movement, and proliferation. *IUBMB ILife.* **58**, 334–43 (2006).

223. Sakamoto, Y., Ogita, H., Komura, H. & Takai, Y. Involvement of nectin in inactivation of integrin alpha(v)beta(3) after the establishment of cell-cell adhesion. *J Biol Chem.* **283**, 496–505 (2008).

224. Seth, S. *et al.* Heterogeneous expression of the adhesion receptor CD226 on murine NK and T cells and its function in NK-mediated killing of immature dendritic cells. *J Leukoc Biol.* **86**, 91–101 (2009).

225. Pende, D. *et al.* Expression of the DNAM-1 ligands, Nectin-2 (CD112) and poliovirus receptor (CD155), on dendritic cells: relevance for natural killer-dendritic cell interaction. *Blood.* **107**, 2030–6 (2006).

226. Seth, S. *et al.* Abundance of follicular helper T cells in Peyer's patches is modulated by CD155. *Eur J Immunol.* **39**, 3160–70 (2009).

227. Purcell, S. *et al.* PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *Am J Hum Genet.* **81**, 559–75 (2007).

228. McDonald, C. L. *et al.* Nogo receptor is involved in the adhesion of dendritic cells to myelin. *J Neuroinflammation.* **8**, 113 (2011).

229. Clarke, G. M. *et al.* Basic statistical analysis in genetic case-control studies. *Nat Protoc.* **6**, 121–33 (2011).

230. Davidson, A. & Diamond, B. Autoimmune diseases. *N Engl J Med.* **345**, 340–50 (2001).

231. Fernando, M. M. A. *et al.* Defining the role of the MHC in autoimmunity: a review and pooled analysis. *PLoS Genet.* **4**, e1000024 (2008).

232. Gregersen, P. K. & Olsson, L. M. Recent advances in the genetics of autoimmune disease. *Ann Rev Immunol.* **27**, 363–91 (2009).

233. Lowe, C. E. *et al.* Large-scale genetic fine mapping and genotype-phenotype associations implicate polymorphism in the IL2RA region in type 1 diabetes. *Nat Genet.* **39**, 1074–82 (2007).

234. Chan, C. J., Andrews, D. M. & Smyth, M. J. Receptors that interact with nectin and nectin-like proteins in the immunosurveillance and immunotherapy of cancer. *Curr Opin Immunol.* **24**, 246–51 (2012).

235. Fuller, M. J. & Zajac, A. J. Ablation of CD8 and CD4 T cell responses by high viral loads. *J Immunol.* **170**, 477–86 (2003).

236. Golden-Mason, L. *et al.* Negative immune regulator Tim-3 is overexpressed on T cells in hepatitis C virus infection and its blockade rescues dysfunctional CD4+ and CD8+ T cells. *J Virol.* **83**, 9122–30 (2009).

237. Iyasere, C. *et al.* Diminished proliferation of human immunodeficiency virus-specific CD4+ T cells is associated with diminished interleukin-2 (IL-2) production and is recovered by exogenous IL-2. *J Virol.* **77**, 10900–9 (2003).

238. Sakuishi, K. *et al.* TIM3(+)FOXP3(+) regulatory T cells are tissue-specific promoters of T-cell dysfunction in cancer. *Oncoimmunology.* **2**, e23849 (2013).

239. Goding, S. R. *et al.* Restoring immune function of tumor-specific CD4+ T cells during recurrence of melanoma. *J Immunol.* **190**, 4899–909 (2013).

240. Yang, Z.-Z. *et al.* IL-12 upregulates TIM-3 expression and induces T cell exhaustion in patients with follicular B cell non-Hodgkin lymphoma. *J Clin Invest.* **122**, 1271–82 (2012).

241. Yi, J. S., Cox, M. A. & Zajac, A. J. T-cell exhaustion: characteristics, causes and conversion. *Immunology.* **129**, 474–81 (2010).

242. López-Cabrera, M. *et al.* Molecular cloning, expression, and chromosomal localization of the human earliest lymphocyte activation antigen AIM/CD69, a new member of the C-type animal lectin superfamily of signal-transmitting receptors. *J Exp Med.* **178**, 537–47 (1993).

243. Wang, P. L., O'Farrell, S., Clayberger, C. & Krensky, a M. Identification and molecular cloning of tactile. A novel human T cell activation antigen that is a member of the Ig gene superfamily. *J Immunol.* **148**, 2600–8 (1992).

244. Josefowicz, S. Z., Lu, L.-F. & Rudensky, A. Y. Regulatory T Cells: Mechanisms of Differentiation and Function. *Ann Rev Immunol.* **30**, 531–64 (2012).

245. Asano, M., Toda, M., Sakaguchi, N. & Sakaguchi, S. Autoimmune disease as a consequence of developmental abnormality of a T cell subpopulation. *J Exp Med.* **184**, 387–96 (1996).

246. Bonomo, A. *et al.* Pathogenesis of post-thymectomy autoimmunity. Role of syngeneic MLR-reactive T cells. *J Immunol.* **154**, 6602–11 (1995).

247. Ordoñez-Rueda, D. *et al.* Increased numbers of thymic and peripheral CD4+ CD25+Foxp3+ cells in the absence of CD5 signaling. *Eur J Immunol.* **39**, 2233–47 (2009).

248. Tarakhovsky, A. *et al.* A role for CD5 in TCR-mediated signal transduction and thymocyte selection. *Science.* **269**, 535–7 (1995).

249. Dasu, T. *et al.* CD5 plays an inhibitory role in the suppressive function of murine CD4(+) CD25(+) T(reg) cells. *Immunol Lett.* **119**, 103–13 (2008).

250. Axtell, R. C., Webb, M. S., Barnum, S. R. & Raman, C. Cutting edge: critical role for CD5 in experimental autoimmune encephalomyelitis: inhibition of engagement reverses disease in mice. *J Immunol.* **173**, 2928–32 (2004).

251. Salomon, B. *et al.* B7/CD28 costimulation is essential for the homeostasis of the CD4+CD25+ immunoregulatory T cells that control autoimmune diabetes. *Immunity.* **12**, 431–40 (2000).

252. Bour-Jordan, H. & Bluestone, J. A. Regulating the regulators: costimulatory signals control the homeostasis and function of regulatory T cells. *Immunol Rev.* **229**, 41–66 (2009).

253. Chang, T. T., Jabs, C., Sobel, R. A., Kuchroo, V. K. & Sharpe, A. H. Studies in B7-deficient mice reveal a critical role for B7 costimulation in both induction and effector phases of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med.* **190**, 733–40 (1999).

254. Zhang, R. *et al.* An obligate cell-intrinsic function for CD28 in Tregs. *J Clin Invest.* **123**, 580–93 (2013).

255. Dieckmann, D., Plottner, H., Berchtold, S., Berger, T. & Schuler, G. Ex vivo isolation and characterization of CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties from human blood. *J Exp Med.* **193**, 1303–10 (2001).

256. Jonuleit, H. *et al.* Identification and functional characterization of human CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties isolated from peripheral blood. *J Exp Med.* **193**, 1285–94 (2001).

257. Levings, M. K., Sangregorio, R. & Roncarolo, M. G. Human cd25(+)cd4(+) t regulatory cells suppress naive and memory T cell proliferation and can be expanded in vitro without loss of function. *J Exp Med.* **193**, 1295–302 (2001).

258. Ng, W. F. *et al.* Human CD4(+)CD25(+) cells: a naturally occurring population of regulatory T cells. *Blood.* **98**, 2736–44 (2001).

259. Ashley, C. W. & Baecher-Allan, C. Cutting Edge: Responder T cells regulate human DR+ effector regulatory T cell activity via granzyme B. *J Immunol.* **183**, 4843–7 (2009).

260. Vukmanovic-Stejic, M. *et al.* Human CD4+ CD25hi Foxp3+ regulatory T cells are derived by rapid turnover of memory populations in vivo. *J Clin Invest.* **116**, 2423–33 (2006).

261. Zanin-Zhorov, A. *et al.* Protein kinase C-theta mediates negative feedback on regulatory T cell function. *Science.* **328**, 372–6 (2010).

262. Hu, X., Wohler, J. E., Dugger, K. J. & Barnum, S. R. beta2-integrins in demyelinating disease: not adhering to the paradigm. *J Leukoc Biol.* **87**, 397–403 (2010).

263. Tran, D. Q. *et al.* Analysis of adhesion molecules, target cells, and role of IL-2 in human FOXP3+ regulatory T cell suppressor function. *J Immunol.* **182**, 2929–38 (2009).

264. Onishi, Y., Fehervari, Z., Yamaguchi, T. & Sakaguchi, S. Foxp3+ natural regulatory T cells preferentially form aggregates on dendritic cells in vitro and actively inhibit their maturation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **105**, 10113–8 (2008).

265. Dugger, K. J., Zinn, K. R., Weaver, C., Bullard, D. C. & Barnum, S. R. Effector and suppressor roles for LFA-1 during the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol.* **206**, 22–7 (2009).

266. Wang, H. *et al.* TGF-beta-dependent suppressive function of Tregs requires wild-type levels of CD18 in a mouse model of psoriasis. *J Clin Invest.* **118**, 2629–39 (2008).

267. Haasken, S., Auger, J. L. & Binstadt, B. A. Absence of β2 integrins impairs regulatory T cells and exacerbates CD4+ T cell-dependent autoimmune carditis. *J Immunol.* **187**, 2702–10 (2011).

268. Huang, Z. *et al.* Involvement of CD226+ NK cells in immunopathogenesis of systemic lupus erythematosus. *J Immunol.* **186**, 3421–31 (2011).

269. Xu, H. *et al.* The modulatory effects of lipopolysaccharide-stimulated B cells on differential T-cell polarization. *Immunology.* **125**, 218–28 (2008).

270. Kamran, N. *et al.* Toll-Like Receptor Ligands Induce Expression of the Costimulatory Molecule CD155 on Antigen-Presenting Cells. *PLoS One.* **8**, e54406 (2013).

271. Issazadeh, S., Navikas, V., Schaub, M., Sayegh, M. & Khoury, S. Kinetics of expression of costimulatory molecules and their ligands in murine relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis in vivo. *J Immunol.* **161**, 1104–12 (1998).

272. Girvin, A. M. *et al.* A critical role for B7/CD28 costimulation in experimental autoimmune encephalomyelitis: a comparative study using costimulatory molecule-deficient mice and monoclonal antibody blockade. *J Immunol.* **164**, 136–43 (2000).

273. Jäger, A., Dardalhon, V., Sobel, R. A., Bettelli, E. & Kuchroo, V. K. Th1, Th17, and Th9 effector cells induce experimental autoimmune encephalomyelitis with different pathological phenotypes. *J Immunol.* **183**, 7169–77 (2009).

274. Oksenberg, J. R., Baranzini, S. E., Sawcer, S. & Hauser, S. L. The genetics of multiple sclerosis: SNPs to pathways to pathogenesis. *Nat Rev Genet.* **9**, 516–26 (2008).

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
ANOVA	*Analysis of variance*
APZ	Antigenpräsentierende Zelle
BMDC	*Bone marrow derived dendritic cells*
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
CD	*Cluster of differentiation*
CD226	Humanes oder murines CD226-Protein
CD226	Humanes Gen, das für CD226 kodiert
Cd226	Murines Gen, das für CD226 kodiert
CIS	Klinisch-isoliertes Syndrom
cpm	Zählereignisse pro Minute (engl. *counts per minute*)
CTLA-4	*Cytotoxic T lymphocyte antigen 4*
DC	Dendritische Zelle (engl. *dendritic cell*)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EAE	Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis
EBV	Epstein-Barr Virus
EDSS	*Expanded disability status scale*
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FACS	*Fluorescence activated cell sorting*
FCS	Fötales Kälberserum
Foxp3	*Forkhead box P3*
Fc	Konstante Region eines Immunglobulins
FSC	Vorwärtsstreulicht (engl. *forward scatter*)
GM-CSF	*Granulocyte macrophage colony-stimulating*
h	Stunde (engl. *hour*)
HI	Gesunde Individuen (engl. *healthy individuals*)
HLA	*Human leukocyte antigen*
HWG	Hardy-Weinberg-Gleichgewicht
IFN	Interferon

IL	Interleukin
Ig	Immunglobulin
i.p.	Intraperitoneal
i.v.	Intravenös
kDa	Kilodalton
KFA	Komplettes Freund-Adjuvans
LPS	Lipopolysaccharid
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (engl. *major histocompatibility complex*)
MAF	*Minor allele frequency*
MAG	Myelin-assoziiertes Glykoprotein
MBP	Myelin-Basisches Protein
MOG	Myelin-Oligodendrozyten Glykoprotein
mRNA	*Messenger* RNA
MS	Multiple Sklerose
M. tuberculosis	*Mycobacterium tuberculosis*
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
OR	Quotenverhältnis (engl. *ddds ratio*)
P	Protektiver Haplotyp des *CD226*-Gens (rs763361^{C} und rs727088^{A})
P-Wert	Signifikanzwert (engl. *probability value*)
PBMCs	Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (engl. *peripheral blood mononuclear cells*)
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (engl. *phosphate buffered saline*)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PLP	Proteolipid-Protein
PRR	*Pattern recognition receptor*
PPMS	Primär progrediente Multiple Sklerose
PTx	Pertussis Toxin von *Bordetella pertussis*
R	Risikohaplotyp des *CD226*-Gens (rs763361^{T} und rs727088^{G})
RAG	*Recombination-activating genes* codieren für Rekombinasen RAG-1 und RAG-2
rm	Rekombinant hergestelltes murines Protein
RNA	Ribonukleinsäure
RRMS	Schubförmig-remittierende Multiple Sklerose in Remission
RRMS/R	Schubförmig-remittierende Multiple Sklerose im Schub

RT	Raumtemperatur
s.d.	Standardabweichung (engl. *standard deviation*)
SEM	Standardfehler (engl. *standard error of mean*)
SNP	Einzelnukleotidpolymorphismus (engl. *single nucleotide polymorphism*)
SPF	Spezifiziert Pathogen frei (engl. *specific pathogen free*)
SPMS	Sekundär progrediente Multiple Sklerose
SSC	Seitwärtsstreulicht (engl. *side scatter*)
T_{CM}-Zelle	Zentrale Gedächtnis-T-Zelle
T_{eff}-Zelle	T-Effektor-Zelle
T_{EM}-Zelle	Effektor-Gedächtnis-T-Zelle
T_{EMRA}-Zelle	$CD45RA^+$ Effektor-Gedächtnis-T-Zelle
T_H-Zelle	T-Helferzelle
TIGIT	*T cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains*
TGF	*Transforming growth factor*
TLR	*Toll-like receptor*
TNF	Tumornekrosefaktor
T_{reg}-Zelle	Regulatorische T-Zelle
TZR	T-Zell-Rezeptor
UTR	Untranslatierte Region
ZNS	Zentrales Nervensystem

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Schematische Darstellung des Aufbaus des *CD226*-Gens. 5
Abbildung 1.2: Schematische Darstellung des Aufbaus des CD226-Moleküls.....19
Abbildung 1.3: Schematische Darstellung wichtiger kostimulatorischer Signalwege. 20
Abbildung 1.4: Modell der CD226-Signalkaskade. 22
Abbildung 3.1: Oberflächenexpression des CD226-Moleküls auf humanen Lymphozyten. 54
Abbildung 3.2: Korrelation der CD226-Expression mit dem *CD226*-Genotyp gesunder Individuen. 58
Abbildung 3.3: Korrelation der CD226-Expression mit dem CD226-Genotyp von MS-Patienten. 60
Abbildung 3.4: CD226 wird von Gedächtnis-T-Zellen aktivierungsinduziert hochreguliert. 61
Abbildung 3.5: $CD4^+$ T-Zellen von Trägern des Risikohaplotyps regulieren CD226 aktivierungsinduziert nur eingeschränkt hoch. 63
Abbildung 3.6: CD226-Expression muriner Milzzellen.....65
Abbildung 3.7: Kinetik der CD226-Expression auf $CD4^+$ T-Zellen. 66
Abbildung 3.8: Kinetik der CD226-Expression auf 2D2-transgenen $CD4^+$ T-Zellen nach Stimulation mit spezifischem Antigen. 67
Abbildung 3.9: ZNS-infiltrierende T-Zellen weisen eine hohe CD226-Expression auf. 68
Abbildung 3.10: Phänotypisierung CD226-defizienter Milz- und Thymuszellen. 70
Abbildung 3.11: CD226-defiziente T_{reg}-Zellen zeigen eine verminderte suppressive Kapazität im T_{reg}-Suppressionsassay. 71
Abbildung 3.12: CD226-Defizienz verursacht einen schwereren Verlauf der EAE.....72
Abbildung 3.13: FACS der ZNS-infiltrierenden Zellen von CD226-defizienten Mäusen mit EAE. 75
Abbildung 3.14. Der Transfer CD226-defizienter 2D2-Zellen bedingt ein schnelleres Einsetzen der EAE-Symptomatik. 76
Abbildung 3.15: Zellzusammensetzung der Suspension, die beim adoptiven Transfer in Empfängertiere injiziert wird. 77
Abbildung 3.16: Kokultur mit *Cd226*$^{-/-}$ regulatorischen T-Zellen erhöht die Inzidenz der durch adoptiven Transfer induzierten EAE. 78
Abbildung 3.17: Charakterisierung der CD155-Expression auf murinen Immunzellen.....80

Abbildung 3.18: CD155 wird aktivierungsinduziert von B-Zellen, dendritischen Zellen und T-Zellen hochreguliert. 82
Abbildung 3.19: ZNS-infiltrierende antigenpräsentierende Zellen besitzen eine hohe CD155-Expression. 83
Abbildung 3.20: Zellpopulationen der Milz von *Cd155*-defizienten Mäusen. 84
Abbildung 3.21: Eine CD155-Defizienz beeinflusst weder die suppressive Kapazität von regulatorischen T-Zellen noch die Supprimierbarkeit von Effektor-T-Zellen. 85
Abbildung 3.22: Eine CD155-Defizienz verändert den Verlauf der EAE nicht. 86

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1: Kohorte 1. 27
Tabelle 2.2: Kohorte 2. 27
Tabelle 2.3: Reagenzien für Tierversuche 29
Tabelle 2.4: Reagenzien für Zellisolation und Zellkultur 29
Tabelle 2.5: Verbrauchsartikel 30
Tabelle 2.6: Reagenzien zur DNA-Aufreinigung und Genotypisierungs-PCR 31
Tabelle 2.7 Antikörper gegen Mausantigene 32
Tabelle 2.8 Antikörper gegen humane Antigene 33
Tabelle 2.9 Isotypkontrollantikörper 33
Tabelle 2.10: Weitere Reagenzien für die Durchflusszytometrie 33
Tabelle 2.11: Primer zur Genotypisierung transgener Mauslinien 34
Tabelle 2.12: Geräte 34
Tabelle 2.13: Software zur Akquisition und Auswertung von Daten 35
Tabelle 2.14: Genotypisierungsprotokoll für CD226-defiziente Mauslinien 39
Tabelle 2.15: Genotypisierungsprotokoll für CD155-defiziente Mauslinien 40
Tabelle 2.16: Genotypisierungsprotokoll für 2D2-transgene Mauslinien 41
Tabelle 2.17: Schematische Darstellung des Pipettierschemas eines T_{reg}-Suppressionsassays. 45
Tabelle 2.18: Vergleich der Immunisierungsprotokolle zur Induktion einer EAE. 50
Tabelle 2.19: Schema der Beurteilung der EAE-Symptomatik 50
Tabelle 3.1: Ausgewählte SNPs des *CD226*-Gens. 56
Tabelle 3.2: Genotypverteilung in 119 MS-Patienten und 125 gesunden Individuen. 56
Tabelle 3.3: Allelverteilung in 119 MS-Patienten und 125 gesunden Individuen. 56
Tabelle 3.4: Haplotypverteilung in MS-Patienten und gesunden Individuen. 57
Tabelle 3.5: EAE in CD226-defizienten Mäusen bei voller Immunisierungsdosis. 73
Tabelle 3.6: EAE in CD226-defizienten Mäusen bei reduzierter Immunisierung. 74
Tabelle 3.7: EAE in CD155-defizienten Mäusen bei aktiver Immunisierung. 86

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich zunächst bei Prof. Dr. Bernhard Fleischer für die Betreuung dieser Doktorarbeit als Erstgutachter bedanken. Prof. Dr. Thomas Dobner danke ich für die Bereitschaft diese Arbeit als Zweitgutachter zu bewerten.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Manuel Friese, der mir dieses komplexe Thema anvertraut hat und durch wissenschaftliche Diskussionen und richtungsweisende Ideen immer neue Ansatzpunkte vermittelte.

Dr. Karin Steinbach und Anne Willing danke ich für unzählige nicht nur wissenschaftliche Hilfestellungen in allen Lebenslagen. Anne Willing danke ich außerdem für die enge Zusammenarbeit im Hinblick auf die Etablierung und Durchführung der durchflusszytometrischen Analysen humaner Proben.

Für hervorragende technische Assistenz möchte ich mich bei Simone Bauer, Petra Breiden, Franziska Hesse, Nina Kursawe und Sabine Wehrmann bedanken.

Nicht unerwähnt bleiben soll die liebevolle Pflege der Mitarbeiter der Versuchstierhaltung, mit der die anvertrauten Mauslinien gehegt und gepflegt wurden. Dafür möchte ich mich hier herzlich bedanken.

Bei allen Blutspendern möchte ich mich für ihre Mithilfe bedanken. Den Mitarbeitern der MS-Ambulanz danke ich für die Rekrutierung der MS-Patienten und die unermüdliche Sammlung wertvoller humaner Proben. Bei den Mitarbeitern der Biobank des Instituts für Neuroimmunologie und Klinische MS-Forschung (inims) möchte ich mich für die Aufarbeitung und Konservierung dieser Proben bedanken. Ohne die enge Zusammenarbeit von Blutspendern, Klinik und Labor wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Für die entgegengebrachte Hilfsbereitschaft, das angenehme Arbeitsklima und anregende Diskussionen bedanke ich mich bei allen Mitarbeitern der AG Neuroimmunologie und des inims.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Tim René Salomon, Dr. Marthe Janßen und Dr. Katja Kleinsteuber, die abseits vom Laboralltag für Abwechslung und Ausgleich sorgten. Dr. Marthe Janßen danke ich außerdem für das gründliche Lesen dieser Arbeit.

Nicht zuletzt geht ein großer Dank an meine Familie, insbesondere meine Eltern und meine Großeltern, für ihren Rückhalt und unermüdliche Unterstützung.