

**Analyse der funktionellen Relevanz unterschiedlicher
Interleukin-7 Rezeptor Alpha Haplotypen für die Ätiologie
und 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

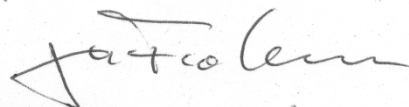
vorgelegt von
Jan Christian Jäger

aus Hamburg

Hamburg 2012

Genehmigt vom Fachbereich Biologie
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
an der Universität Hamburg
auf Antrag von Professor Dr. R. MARTIN
Weitere Gutachterin der Dissertation:
Priv.-Doz. Dr. M. BRELOER
Tag der Disputation: 30. März 2012

Hamburg, den 15. März 2012



Professor Dr. J. Fromm
Vorsitzender des Promotionsausschusses
Biologie

1	Einleitung.....	1
1.1	Multiple Sklerose.....	1
1.1.1	Ätiologie der MS	3
1.1.2	Immunpathogenese.....	9
1.2	Der Interleukin-7 Rezeptor	11
1.2.1	Die IL-7R Signalkaskade	13
1.2.2	IL-7 und seine Funktion in der Lymphozytenentwicklung und Homeostase	15
1.2.3	Funktionelle Relevanz des IL-7RA in der MS.....	17
2	Ziele der Arbeit.....	18
3	Material und Methoden.....	19
3.1	Material	19
3.1.1	Reagenzien für immunologische Experimente	19
3.1.2	Reagenzien für molekularbiologische Versuche	21
3.1.3	Materialien für die Zellkultur	24
3.1.4	Geräte.....	26
3.1.5	Verbrauchsartikel.....	27
3.1.6	Chemikalien.....	28
3.1.7	Software	30
3.2	Methoden	31
3.2.1	MS-Patienten und Gesunde Kontrollen	31
3.2.2	Zellbiologische Methoden	31
3.2.3	Immunologische Methoden	33
3.2.4	Molekularbiologische Methoden	36
4	Ergebnisse.....	42
4.1	Zusammensetzung der „Hamburger Kohorte“	42
4.2	Genotypisierung der Hamburger Kohorte	42
4.3	Phänotypische Charakterisierung der unterschiedlichen IL-7RA Haplotypen	45

Inhaltsverzeichnis

4.3.1	Es gibt haplotypabhängige, aber nicht signifikante Unterschiede in der Oberflächenexpression des IL-7RA	45
4.3.2	Der Haplotyp korreliert mit der Menge an löslicher IL-7RA kodierender mRNA	53
4.3.3	Der IL-7RA Haplotyp bestimmt die Serumkonzentration des löslichen IL-7RA	54
4.3.4	Die IL-7 Konzentration korreliert nicht mit der des löslichen IL-7RA	55
4.3.5	Zusammenfassung der phänotypischen Charakterisierung	56
4.4	Analyse der funktionellen Relevanz des löslichen IL-7RA	57
4.4.1	Der lösliche IL-7RA verringert in CD4 ⁺ T-Zellen die IL-7-vermittelte Phosphorylierung von STAT5	57
4.4.2	PBMCs des protektiven Haplotypen weisen eine erhöhte Proliferation auf	63
4.5	Die IL-7RA Haplotypen unterscheiden sich nicht nur in der Menge an löslichem IL-7RA - „Mikroarray-Analyse“	64
4.5.1	Nach 6-stündiger IL-7 Stimulation weisen CD4 ⁺ T-Lymphozyten die stärkste Veränderung in ihrer IL-7RA sowie Bcl-2 Expression auf	64
4.5.2	IL-7-stimulierte und unstimulierte CD4 ⁺ Zellen unterscheiden sich in ihrer Genexpression	65
4.5.3	Die IL-7RA Haplotypen zeigen leichte Unterschiede in ihrer basalen Genexpression	66
4.5.4	Funktionelle Charakterisierung differentiell exprimierter Gene - „Gene Ontology Analyse“	67
5	Diskussion	71
5.1	Der IL-7RA ist auch in der Hamburger Kohorte mit MS assoziiert	71
5.2	Phänotypische Unterschiede zwischen den IL-7RA Haplotypen	71
5.3	Die IL-7RA Haplotypen unterscheiden sich auch in ihren Genexpressionsprofilen	74
5.4	Der lösliche IL-7RA verringert die IL-7-vermittelte STAT5 Phosphorylierung und hemmt die Proliferation	77

Inhaltsverzeichnis

5.5	Wie könnte der erhöhte lösliche IL-7RA Serumspiegel des Risikohaplotypen die Suszeptibilität für MS erhöhen?	78
5.6	Schlussfolgerung.....	81
6	Zusammenfassung – Summary.....	83
6.1	English summary.....	83
6.2	Deutsche Zusammenfassung	84
7	Literaturverzeichnis.....	85
8	Anhang.....	97
8.1	Abkürzungsverzeichnis	97
8.1.1	Abkürzungen für Aminosäuren	99
8.1.2	Symbole für Nukleotide	100
8.2	Vektorkarte.....	100
8.3	Übersicht über die MS-Patienten und die Verwendung der Proben	101
8.4	Danksagung	108

1 Einleitung

Jeder Mensch besitzt selbstreaktive Lymphozyten, aber nur 3-5% der Bevölkerung in den Industriestaaten entwickeln Autoimmunkrankheiten (1). In gesunden Personen wird die Aktivität von autoreaktiven Zellen durch eine Vielzahl von Selbsttoleranzmechanismen reguliert (2). Umwelteinflüsse und genetische Faktoren können zu einem Versagen der Selbsttoleranzmechanismen führen, wodurch Autoimmunkrankheiten entstehen können. Grundsätzlich werden Autoimmunkrankheiten in systemische und organspezifische Autoimmunkrankheiten unterteilt. Bei den organspezifischen Autoimmunerkrankungen, wie Diabetes mellitus Typ 1, Morbus Basedow oder Multipler Sklerose (MS), richtet sich die Immunantwort normalerweise gegen Antigene, die spezifisch für ein Organ sind. Demgegenüber ist die Immunantwort bei systemischen Autoimmunerkrankungen wie systemischem Lupus erythematodes (SLE) oder rheumatoider Arthritis (RA) nicht gegen ein organspezifisches Antigen gerichtet, sondern gegen Antigene, die im ganzen Körper vorkommen (3, 4). Obwohl die Immunantwort gegen ein ubiquitär exprimiertes Antigen gerichtet ist kann es jedoch auch vorkommen, dass sie sich organspezifisch manifestiert.

1.1 Multiple Sklerose

Bei MS handelt es sich um eine autoimmunvermittelte Erkrankung des Zentralen Nervensystems (ZNS). Charakteristisch für MS sind großflächige Entmarkungsherde, die auch als Läsionen oder Plaques bezeichnet werden. Dabei beschreibt „Entmarkung“ den Verlust der das Axon umhüllenden Myelin- /Markscheide. Dies kann bei MS-Patienten unterschiedlichste sensorische, motorische, visuelle und kognitive Störungen hervorrufen (5).

In Europa und Nordamerika ist MS die Hauptursache für nichttraumatische neurologische Störungen bei jungen Erwachsenen (6, 7). Weltweit leiden etwa 2,5 Millionen Menschen an MS, wobei die Mehrzahl der MS-Fälle kaukasischer Abstammung ist (5, 8, 9). Hervorzuheben ist, dass Frauen von MS, wie von den meisten Autoimmunerkrankungen, doppelt so häufig betroffen sind wie Männer (10). MS beginnt meistens im Alter zwischen 20-40 Jahren (11). Über 80% der MS-Patienten haben 15 Jahre nach Diagnosestellung funktionelle Einschränkungen und mehr als 70% sind in ihrem alltäglichen Leben so stark eingeschränkt, dass sie ihrer Arbeit nicht mehr nachgehen können. Trotzdem ist die Lebenserwartung von MS-Patienten nur um etwa 7-8 Jahre verkürzt (9).

Einleitung

Obwohl MS in Bezug auf Verlauf und Symptome eine sehr heterogene Erkrankung ist, lässt sie sich in drei Grundformen unterteilen. Bei rund 85% der MS-Patienten beginnt MS mit einem sogenannten klinisch-isolierten Syndrom (CIS), der Erstmanifestation der Erkrankung, die in einen schubförmig-remittierenden Verlauf (RR-MS) übergehen kann. Diese Phase ist gekennzeichnet durch das intermittierende Auftreten neurologischer Fehlfunktionen (MS-Schübe), die sich jedoch nach einiger Zeit vollständig oder teilweise zurückbilden. Als Schub bezeichnet man dabei die akute Verschlechterung bzw. das Auftreten neuer Symptome für einen Zeitraum von mindestens 24 h, wobei zwischen zwei Schüben ein Abstand von einem Monat liegen muss. Bei etwa 50% der RR-MS-Patienten konvertiert die Verlaufsform 8-10 Jahre nach Erkrankungsbeginn von RR-MS zu einem sekundär chronisch-progredienten Verlauf (SP-MS). Hierbei kommt es zu einer kontinuierlichen Verschlechterung der Symptome. Nur etwa 15% der Betroffenen weisen von Beginn an einen progredienten Verlauf (primär-chronisch-progrediente MS/ PP-MS), mit einer kontinuierlichen Zunahme der Behinderung auf.

Die MS-Diagnose erfolgt als Ausschlussdiagnose. Das bedeutet, dass die MS-Diagnose nur dann gestellt werden kann, wenn die Gesamtheit der Symptome nicht durch andere Erkrankungen erklärt werden kann. Die Richtlinien, nach denen die MS-Diagnose gestellt wird, erfordern den Nachweis der räumlichen oder zeitlichen Dissemination. Bis zum Jahr 2001 mussten zwei klinische Schübe vorliegen (Poser-Kriterien) (12). Der Einzug von bildgebenden Verfahren, wie der Magnetresonanztomographie (MRT), eröffnete neue Möglichkeiten bei der Diagnosestellung. Bei den 2001 vorgestellten McDonald-Kriterien stehen die MRT-Befunde im Mittelpunkt der Diagnosestellung (13). Die 2010 abermals revidierten McDonald-Kriterien erlauben mittlerweile schon beim ersten klinischen Ereignis und dem Nachweis des zeitgleichen Auftretens von Kontrastmittel aufnehmenden und Kontrastmittel stummen Läsionen die gesicherte Diagnose einer MS (14). Auch die Liquoranalyse kann zur Diagnosestellung genutzt werden und nimmt in den Diagnose-Kriterien der PP-MS einen besonderen Stellenwert ein. Der Nachweis von oligoklonalen Banden im Liquor ist ein Indiz für die intrathekale IgG (Immunglobulin G) Produktion und gilt als typischer Befund bei MS (ca. 95% der MS-Patienten) (15, 16). Eine Möglichkeit, den Behinderungsgrad eines MS-Patienten zu messen, bietet die Bewertung funktioneller Fähigkeiten anhand einer standardisierten Skala (EDSS vom engl.: Expanded Disability Status Scale) (17). Dabei richtet sich der EDSS ab einem Wert von vier primär nach der Gehstrecke, sodass eine Unschärfe für Beschwerden wie kognitive Defizite oder Sehstörungen eintritt.

Einleitung

1.1.1 Ätiologie der MS

Bereits Ende des 19. Jahrhunderts wurden von Jean-Martin Charcot erste humane Studien zu MS durchgeführt (18). Jedoch sind bis heute, trotz intensiver Forschung, die genauen Faktoren, die zu MS führen, nicht bekannt. Es wird jedoch vermutet, dass MS durch die komplexe Interaktion von genetischen Faktoren und Umwelteinflüssen hervorgerufen wird (Abbildung 1).

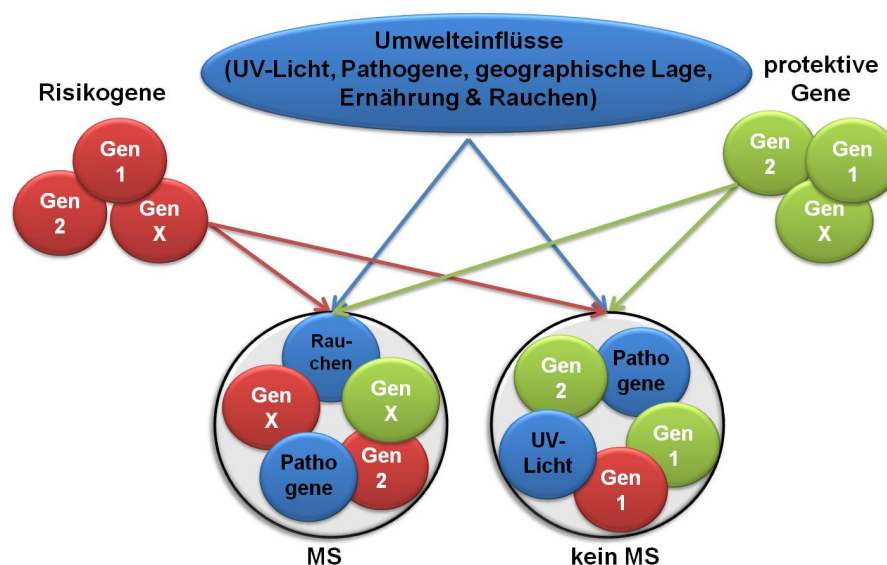


Abbildung 1. Modellhafte Darstellung der komplexen Verknüpfungen von genetischen Faktoren und Umwelteinflüssen, die über das individuelle MS Risiko entscheiden

1.1.1.1 Genetische Faktoren

MS folgt, wie auch andere komplexe genetische Erkrankungen, nicht den typischen Mendelschen Vererbungsgesetzen. Nur bei 15-20% der MS-Patienten gibt es in der Familie weitere MS-Fälle (19–21). Trotzdem zeigten eine Vielzahl von Zwillings- und Familienstudien eine Korrelation zwischen Verwandtschaftsgrad und MS-Risiko. So nimmt die Konkordanzrate bei Verwandten ersten Grades (3%) zu Verwandten zweiten Grades (1%) ab (21). Auch der Vergleich der Konkordanz von Zwillingen (eineiige Zwillinge: 20-35%, zweieiige Zwillinge nur etwa 5%) zeigt eine Abnahme der MS-Suszeptibilität mit Abnahme der genetischen Übereinstimmung (22, 23).

Das genetische MS-Risiko wird vermutlich von einer Vielzahl polymorpher Gene kodiert. Dieses hohe Maß der genetischen Heterogenität der MS sowie die unbekannt Interaktion zwischen Genen und Umwelteinflüssen sowie zwischen unterschiedlichen Genen erschweren die Suche nach einzelnen mit MS assoziierten Genen.

Einleitung

Anfang der siebziger Jahre wurde die Assoziation des Haupthistokompatibilitätskomplexes (MHC; engl.: Major Histocompatibility Complex), bei Menschen als HLA (engl. Human Leukocyte Antigen) bezeichnet, auf Chromosom 6p21-23 mit MS entdeckt (24–26). Bei Nordeuropäern und Menschen kaukasischer Abstammung wird das Hauptrisiko vor allem von den Haplotypen HLA-DR15 und HLA-DQ6 mit den entsprechenden Genotypen HLA DRB1*15:01, HLA-DRB5*01:01, HLA-DQA1*01:02 und HLA-DQB1*06:02 getragen (27). Vor allem zwischen den Genen HLA DRB1*15:01 und HLA-DRB5*01:01 besteht ein sehr hohes Kopplungs-Ungleichgewicht (LD; engl.: Linkage Disequilibrium), deshalb werden diese Gene in Europäern ausschließlich zusammen vererbt. Träger des DR15 Haplotypen haben ein 3-4 fache erhöhtes Risiko an MS zu erkranken (28).

Neue Studien deuten zudem auf eine Assoziation der HLA Klasse I Region mit MS hin. Brynedal und Kollegen sowie Yeo und Kollegen konnten einen protektiven Effekt der Gene HLA-C5 und HLA-A2 zeigen (29, 30).

Die Assoziation zwischen HLA und MS erklärt mit etwa 17-62% den größten Teil des genetischen Risikos (31). Mit Hilfe von Genkopplungsstudien (engl.: linkage studies) gelang es bis Anfang dieses Jahrzehnts nicht, weitere mit MS assoziierte Gene außerhalb der HLA-Region ausfindig zu machen (32). Erst in den letzten Jahren erlaubten die Sequenzierung des menschlichen Genoms sowie die Beschreibung der häufigen Polymorphismen innerhalb des Genoms die Durchführung von genomweiten Assoziationsstudien (GWAS). Diese führten zur Entdeckung neuer Risikogene. Bis heute wurden 11 GWAS durchgeführt (Tabelle 1) (33, 34).

Tabelle 1. Veröffentlichte GWAS. In Anlehnung an Kempainen et al., 2011 (34)

Anzahl der MS-Fälle	Anzahl der Kontrollen	Population/en	Plattform/en	Referenz
1618	3413	Australien, Neuseeland, UK, USA	Illumina 370CNV (Fälle), Illumina Infinium (Kontrollen)	ANZgene; 2007 (35)
975	1466	UK	individuell gefertigter Infinium Array für 14,436 nsSNPs (Illumina)	Burton, P.R. et al.; 2007 (36)
931	1862 (Eltern)	UK, USA	Affymetrix 5.0	IMSGC; 2007 (37)
242 Pooled	242 Pooled	Spanien	Affymetrix 5.0	Comabella, M. et al.; 2008 (38)
45	195	Niederlande	Affymetrix 250KNsp	Aulchenko, Y.S. et al. 2008 (39)
978	883	Niederland, Schweiz, USA	Sentrix® HumanHap550	Baranzini, S.E. et al.; 2009 (40)

Einleitung

Anzahl der MS-Fälle	Anzahl der Kontrollen	Population/en	Plattform/en	Referenz
860	1720	USA	Affymetrix 6.0	De Jager, P.L. et al.; 2009 (41)
68	136	Finnland (Isoliert)	Illumina 300	Jakkula, E. et al.; 2010 (42)
592	825	Deutschland	Illumina 300 und 370CNV	Nischwitz, S. et al.; 2010 (43)
882	872	Sardinien	Affymetrix 6.0	Sanna, S. et al.; 2010 (44)
9772	17376	von Populationen mit europäischer Abstammung	Illumina 660-Quad (MS-Fälle) Illumina 1.2M und weitere Plattformen (Kontrollen)	IMSGC; 2011(33)

In GWAS und weiteren Replikationsstudien wurden bisher 46 Gene gefunden, deren p-Werte den von Risch und Merikangas (45) vorgeschlagenen Grenzwert von 5×10^{-8} überschreiten (Tabelle 2). Die genannten Studien ermittelten noch weitere Gene, wie CD226 und CD40 (35, 46), die in Verdacht stehen, mit MS assoziiert zu sein, deren p-Werte jedoch größer als 5×10^{-8} sind und sich somit in einer „Grauzone“ befinden.

Tabelle 2. Bisher entdeckte nicht-MHC Risikoallele. In Anlehnung an Kempainen et al., 2011 (34)

SNP (Risiko-Allel)	nächstgelegenes Gen	p-Wert	Odds ratio	Referenzen
rs9657904 (A)	CBLB	1,60E-10	1,4	Sanna <i>et al.</i> (44)
rs10492972 (C)	KIF1B	2,50E-10	1,34	Aulchenko <i>et al.</i> (39)
rs34536443 (G)	TYK2	5,08E-09	1,3	WTCCC & TASC (47); Ban <i>et al.</i> (48), Mero <i>et al.</i> (49)
rs17445836 (G)	IRF8	3,73E-09	1,25	De Jager <i>et al.</i> (41)
rs2104286 (T)	IL2RA	2,38E-23	1,25	IMSGC (37); IMSGC (50)
rs1132200 (C)	TMEM39A	3,09E-08	1,24	IMSGC (37); IMSGC (51)
rs2300747 (A)	CD58	4,0E-09	1,23	IMSGC (37); De Jager <i>et al.</i> (52); Hoppenbrouwers <i>et al.</i> (53)
rs703842 (A)	METTL1	5,4E-11	1,23	ANZgene (35)
rs12122721 (G)	KIF21B	6,56E-10	1,22	IMSGC (37); IMSGC (51)
rs12708716 (A)	CLEC16A	1,6E-16	1,2	Hoppenbrouwers <i>et al.</i> (53); IMSGC (46)
rs1800693 (G)	TNFRSF1A	1,59E-11	1,2	De Jager <i>et al.</i> (41)

Einleitung

SNP (Risiko-Allel)	nächstgelegenes Gen	p-Wert	Odds ratio	Referenzen
rs6897932 (C)	IL7R	1,21E-17	1,2	IMSGC (37); IMSGC (50)
rs9282641 (G)	CD86	1,00E-11	1,2	IMSGC (33)
rs17824933 (G)	CD6	3,79E-09	1,18	De Jager <i>et al.</i> (41)
rs12466022 (C)	kein Gen	6,20E-10	1,16	IMSGC (33)
rs2019960b (G)	PVT1	5,20E-09	1,16	IMSGC (33)
rs2760524 (G)	RGS1	3,55E-09	1,15	De Jager <i>et al.</i> (41); IMSGC (54)
rs744166 (G)	STAT3	2,75E-10	1,15	De Jager <i>et al.</i> (41); Jakkula <i>et al.</i> (42)
rs7595037 (A)	PLEK	5,10E-11	1,15	IMSGC (33)
rs17174870 (G)	MERTK	1,30E-08	1,15	IMSGC (33)
rs10201872 (A)	SP140	1,80E-10	1,15	IMSGC (33)
rs669607 (C)	kein Gen	1,90E-15	1,15	IMSGC (33)
rs2546890 (A)	IL12B	1,20E-11	1,15	IMSGC (33)
rs17066096 (G)	IL22RA2	6,00E-13	1,14	IMSGC (33)
rs1738074 (G)	TAGAP	6,80E-15	1,14	IMSGC (33)
rs354033 (G)	ZNF746	4,70E-09	1,14	IMSGC (33)
rs7238078 (A)	MALT1	2,50E-09	1,14	IMSGC (33)
rs1077667 (G)	TNFSF14	9,40E-14	1,14	IMSGC (33)
rs802734 (A)	THEMIS	5,50E-09	1,13	IMSGC (33)
rs4902647 (G)	ZFP36L1	9,30E-12	1,13	IMSGC (33)
rs10466829 (A)	CLECL1	1,40E-08	1,12	IMSGC (33)
rs2119704 (C)	GALC	2,20E-10	1,12	IMSGC (33)
rs2283792 (C)	MAPK1	4,70E-09	1,12	IMSGC (33)
rs140522 (A)	SCO2	1,70E-08	1,12	IMSGC (33)

Einleitung

SNP (Risiko-Allel)	nächstgelegenes Gen	p-Wert	Odds ratio	Referenzen
rs4680534 (C)	IL12A	3,08E-08	1,11	De Jager <i>et al.</i> (41); IMSGC (54)
rs2303759 (C)	DKKL1	5,20E-09	1,11	IMSGC (33)
rs2248359 (G)	CYP24A1	2,50E-11	1,11	IMSGC (33)
rs1790100 (G)	MPHOSPH9	3,96E-08	1,1	De Jager <i>et al.</i> (41); IMSGC (54)
rs11129295 (A)	EOMES	1,20E-09	1,09	IMSGC (33)
rs11154801 (A)	MYB	1,00E-13	1,09	IMSGC (33)
rs4410871 (G)	MYC	7,70E-09	1,09	IMSGC (33)
rs7923837 (G)	HHEX	4,90E-09	1,09	IMSGC (33)
rs12212193 (G)	BACH2	3,80E-08	1,08	IMSGC (33)
rs2300603 (A)	BATF	2,00E-08	1,08	IMSGC (33)
rs11581062 (G)	VCAM1	2,50E-10	1,07	IMSGC (33)
rs874628 (A)	MPV17L2	1,30E-08	1,07	IMSGC (33)

Bereits in der ersten GWAS, die 2007 vom International Multiple Sclerosis Genetic Consortium (IMSGC) publiziert wurde, ist die in dieser Arbeit untersuchte Assoziation des Interleukin-7 Rezeptor Alpha Gens (Genname : IL7RA, Proteinname: IL-7RA) mit MS beschrieben worden (37). Einer Vielzahl weiterer GWAS und Kandidat-Gen-Assoziationsstudien gelang es, die Assoziation des SNP (eng.: Single Nucleotide Polymorphism) rs6897932, der im Exon 6 des IL7RA lokalisiert ist, mit zum Teil hochsignifikanten p-Werten (1.21×10^{-17}) zu bestätigen (33, 55–57). Gregory und Kollegen fanden bei der Analyse von 14 SNPs innerhalb des IL7RA nur vier Haplotypen. Diese konnten wiederum mit Hilfe der vier SNPs rs1494555, rs6897932, rs987107 und rs987106 beschrieben werden (56). Die beiden SNPs rs1494555 und rs6897932 sind non-synonymous SNPs wohingegen die anderen beiden SNPs in Introns lokalisiert sind und keinen Aminosäureaustausch zur Folge haben (Abbildung 2). Der Haplotyp 1 (C-C-C-T) kommt häufiger in MS-Patienten vor als in gesunden Kontrollen (HD; engl. Healthy Donor) (MS: 35.0%; HD: 31.6% (56)). Daher wird der Haplotyp 1 auch als Risikohaplotyp bezeichnet. Demgegenüber besitzt der Haplotyp 3 (T-T-C-A) einen protektiven Charakter. Er kommt bei MS-Patienten seltener vor als bei

Einleitung

HDs (MS: 21,8% und HD: 31,6% (56)). Von nun an werden diese beiden Haplotypen daher in dieser Arbeit als **protektiver** bzw. **Risikohaplotyp** geführt.

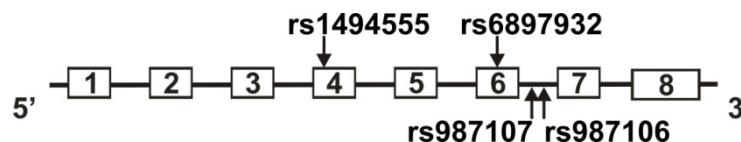


Abbildung 2. Schematische Darstellung der genomischen IL7RA Sequenz sowie der Lokalisation der vier SNPs. Die beiden SNPs rs1494555 und rs6897932 sind in den Exons vier und sechs lokalisiert. Der SNP rs1494555 bewirkt einen Aminosäureaustausch von Valin zu Isoleucin und der SNP rs6897932 führt zu einem Aminosäureaustausch von Threonin zu Isoleucin. Die beiden SNPs rs987107 und rs987106 sind in einem Intron lokalisiert und haben daher keinen Einfluss auf die Proteinsequenz des IL-7RA.

1.1.1.2 Umweltfaktoren

Es gibt viele Argumente die dafür sprechen, dass Umweltfaktoren eine entscheidende Rolle bei der Entstehung von MS spielen. Zum einen kann das MS-Risiko nicht nur durch die genetischen Faktoren erklärt werden. Denn wie oben bereits erwähnt, haben selbst eineiige Zwillinge eine Konkordanzrate von nur 20%-35% (21). Des Weiteren zeigt die Häufigkeit der Erkrankungen ein grobes, geographisches Verteilungsmuster. So steigt die Anzahl der MS-Fälle mit der Entfernung zum Äquator. Jedoch gibt es viele Ausnahmen, wie z.B. Japan oder Lappland, wo die MS-Rate weit unter der geographisch zu erwartenden liegt (58). Zum anderen haben Migrationsstudien gezeigt, dass sich das MS-Risiko von Personen die vor dem Erreichen des 15. Lebensjahrs in ein Land mit höherem MS-Risiko migrierten, dem der dortigen Bevölkerung anpasste. Im Unterschied dazu behielten Personen das Risiko ihres Heimatlandes, wenn sie zu einem späteren Zeitpunkt migrierten (22, 59). Diese Studien zeigen, dass nicht nur die Art des Umwelteinflusses von Bedeutung ist, sondern auch der Zeitpunkt, zu dem eine Person diesem ausgesetzt ist.

Die Umweltfaktoren die zur Entstehung von MS beitragen, sind weitestgehend unbekannt. Eine Vielzahl an Publikationen deutet jedoch auf eine Assoziation von MS mit Umwelteinflüssen wie Viruserkrankungen, Rauchen und Vitamin D bzw. Sonneneinstrahlung hin.

Unterschiedliche virale und bakterielle Infektionen, vor allem der Atemwege und des Magen-Darmtrakts, stehen in Verdacht MS auszulösen. Bisher gibt es aber keine Studien, die reproduzierbar belegen, dass ein Infektionserreger der Auslöser von MS ist (60–62).

Einleitung

Nur für das Epstein-Barr-Virus (EBV) konnte eine Assoziation mit MS nachgewiesen werden. Nahezu 100% der an MS erkrankten Personen besitzen Antikörper gegen EBV, wohingegen in der Normalbevölkerung nur 90%-95% EBV-spezifische Antikörper aufweisen (63–65). Das Paradoxe an dieser Assoziation ist jedoch, dass nur ein Bruchteil der EBV-infizierten Personen je MS entwickelt. Bis zum Erreichen des dritten Lebensjahres verlaufen EBV-Infektionen meist asymptomatisch. Erfolgt die EBV-Infektion jedoch erst mit dem Erreichen der Pubertät, so zeigen sich bei 50% der Fälle Symptome einer infektiösen Mononukleose (IM). Das relative MS-Risiko ist bei Individuen die eine IM durchlaufen haben 20-fach höher als bei Individuen die seronegativ für EBV sind (66). Neue Studien fanden zudem Belege für eine Assoziation zwischen der klinischen Aktivität der MS und der Reaktivierung des EBV. Auch deuten die Ergebnisse neuer Studien darauf hin, dass EBV-infizierte B-Zellen in Läsionen von MS-Patienten vorkommen (67).

Insgesamt spricht also vieles für eine Assoziation zwischen EBV und MS. Fraglich ist jedoch, ob Individuen die EBV seropositiv sind eine höhere Suszeptibilität für MS besitzen oder ob es einen weiteren Faktor gibt, der die Prädisposition für beides, MS und EBV, erhöht (68).

Ein weiterer wichtiger Faktor, der in Verdacht steht das MS-Risiko zu beeinflussen, ist Vitamin D. Vor allem neue Studien in denen Vitamin D in Zusammenhang mit der Ernährung, der Sonneneinstrahlung oder der Serumkonzentration von 25-Hydroxyvitamin D gemessen wurde, legen einen protektiven Effekt des Vitamin D nahe (69). Allerdings sind auch hier die genauen Mechanismen durch die Vitamin D das MS-Risiko beeinflusst noch völlig offen.

Aber auch andere Faktoren, wie der Konsum von Zigaretten beeinflussen das MS-Risiko. In mehreren Studien konnte eine Assoziation zwischen Rauchen und MS gezeigt werden (70, 71). Einiges deutet sogar darauf hin, dass Rauchen ein Risikofaktor für den Wechsel von RR-MS zu SP-MS darstellt (71). Der funktionelle Mechanismus, über den der Konsum von Tabak das MS-Risiko beeinflusst, ist, wie bei den meisten Umweltfaktoren, noch unklar.

1.1.2 Immunpathogenese

Der wohl entscheidendste Schritt bei der Entstehung von MS ist der Zusammenbruch der Selbsttoleranz (72). Dies kann durch eine Vielzahl unterschiedlicher Mechanismen geschehen. Die Assoziation zwischen EBV und MS wurde, wie bereits oben erwähnt,

Einleitung

mehrfach beschrieben. Zudem deutet vieles auf eine Verbindung zwischen dem Auftreten von Schüben und viralen Infektionen hin (73). Daher wird im Folgenden kurz auf die Bedeutung von viralen Infektionen beim Zusammenbruch der Selbsttoleranz eingegangen.

Zwei häufig diskutierte Mechanismen, die „bystander activation“ und „molecular mimicry“, erklären beide wie z.B. virale Infektionen autoreaktive T-Zellen aktivieren können (74). Bei der „bystander activation“ werden autoreaktive T-Lymphozyten durch unspezifische inflammatorische Ereignisse aktiviert. Ein Beispiel hierfür ist die Aktivierung einer autoreaktiven T-Zelle durch eine antigenpräsentierende Zelle, die sowohl Selbstantigen als auch Virusantigen zu einer autoreaktiven und zu einer virusspezifischen T-Zelle präsentiert (11, 75). Demgegenüber werden bei dem als „molecular mimicry“ bezeichneten Mechanismus autoreaktive T-Lymphozyten durch ein, dem Autoantigen ähnliches, Fremdanigen aktiviert (11, 75). Aber auch andere Gründe, wie ein erhöhtes Aufkommen von autoreaktiven T-Zellen durch „Lücken“ in der zentralen oder peripheren Toleranz, können die Selbsttoleranz aus ihrem Gleichgewicht bringen. Nach der Aktivierung von autoreaktiven T-Zellen in der Peripherie, überqueren diese die Bluthirnschranke und infiltrieren das ZNS. Dort werden sie durch professionelle antigenpräsentierende Zellen (APC), die Myelin-Epitope z.B. MBP (Myelin-Basisches Protein) aus dem ZNS präsentieren, reaktiviert. Die Reaktivierung der T-Zellen führt zur Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine, die Mikroglia aktivieren und zu einem Öffnen der Bluthirnschranke führen. Zudem werden durch Chemotaxis weitere Immunzellen wie natürliche Killerzellen (NK-Zellen), Neutrophile, Monozyten, B-Lymphozyten und weitere T-Lymphozyten angezogen. Die Aktivierung der Phagozyten führt zur Sekretion von proinflammatorischen, T-Lymphozyten aktivierenden Zytokinen wie Interleukin-12 (IL-12) und Interleukin-23 (IL-23) und zur Freisetzung von Stickstoffmonoxid (NO) und Sauerstoffradikalen, die zu Gewebeschädigung führen können (9). Die so in Gang gesetzten inflammatorischen Prozesse können zur Demyelinisierung und axonalen Schädigung führen (76). Demyelinisierte Axone können sich spontan entladen und sind sensitiv für mechanische Reize (5). Die Degeneration von chronisch demyelinisierten Axonen ist einer der Hauptgründe für neurologische Störungen und die Atrophie des Gehirns (8). Bis heute wird angenommen, dass $CD4^+$ T_H1 Zellen eine Schlüsselrolle bei MS spielen. Diese Annahme wird von einer Vielzahl von Studien gestützt. So wurde, wie bereits erwähnt (Abschnitt 1.1.1.1), für die von $CD4^+$ T-Lymphozyten exprimierten HLA Klasse II Moleküle, besonders HLA-DR Moleküle, die stärkste Assoziation mit MS gefunden. Des Weiteren können aus dem Blut sowie dem Liquor von MS-Patienten MBP-

Einleitung

spezifische T-Lymphozyten isoliert werden (77–79). Zudem zeigte eine klinische Phase II Studie, bei der sich die Schwere der MS durch die Behandlung mit veränderten Peptidliganden verschlechterte, dass MBP ein enzephalitogenes Potential besitzt (80). Auch Experimente am Tiermodell der MS, der Experimentellen Autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE), stützen die Hypothese, dass MS eine CD4⁺ T_H1 Zell-vermittelte Autoimmunerkrankung ist. So lässt sich EAE durch den adaptiven Transfer von MBP-spezifischen, *in vitro* reaktivierten CD4⁺ T-Lymphozyten auslösen (81). Zudem entwickeln humanisierte transgene Mäuse, die sowohl den mit MS assoziierten HLA-DR als auch einen von MS-Patienten stammenden, MBP-spezifischen T-Zell-Antigenrezeptor (TCR) exprimieren, eine spontane (82) oder induzierte (83) EAE. Neue Studien, die vor allem auf Experimenten im EAE-Modell basieren, deuten auf eine mögliche Rolle von IL-17- und GM-CSF-produzierenden CD4⁺ sowie CD8⁺ T-Lymphozyten bei MS hin (84–86). Da diese Daten jedoch größtenteils auf dem EAE-Modell beruhen und dieses, wie sich immer wieder gezeigt hat, nur ein Modell ist, ist es nicht sicher inwieweit sich die dort gewonnenen Erkenntnisse auf das humane System und MS übertragen lassen. Daher ist zu betonen, dass noch viele Fragen über die genauen Mechanismen der Immunpathogenese der MS offen sind.

Diese Arbeit befasst sich mit der Rolle des mit der MS assoziierten IL-7RA. Daher wird im Folgenden kurz der Aufbau sowie die Funktion des IL-7RA erläutert und ein Einblick in die schon bekannten Studien über die funktionelle Relevanz des IL-7RA bei MS gewährt.

1.2 Der Interleukin-7 Rezeptor

Der Interleukin-7 Rezeptor (IL-7R) ist ein Heterodimer bestehend aus der IL-7RA Kette (auch bekannt als CD127) und der Interleukin-2 Rezeptor Gamma (IL-2R_γ) Kette (auch bekannt als CD132) (87, 88). Er teilt die Gamma-Kette mit den Rezeptoren für Interleukin-2 (IL-2), IL-4, IL-9, IL-15 und IL-21 und die Alpha-Kette mit dem Thymus-Stroma-Lymphopoietin (TSLP) Rezeptor (89–92). Der IL-7R wird vornehmlich von Zellen mit lymphoider Abstammung, wie sich entwickelnden B- und T-Zellen, reifen T-Zellen, und dendritischen Zellen und in geringen Mengen auch von Neuronen und Astrozyten exprimiert (93, 94).

Das den IL-7RA kodierende Gen ist 19,93 kb (Gene ID: 3575) groß, beinhaltet acht Exons und befindet sich auf Chromosom Nummer 5. Schon 1990 wurde von Goodwin und Kollegen die Existenz unterschiedlicher IL-7RA Isoformen gezeigt (95). Die komplementäre DNA (cDNA) Sequenz der beiden Isoformen H6 und H20

Einleitung

unterscheidet sich nur in dem Fehlen bzw. Vorhandensein der Basenpaare 729-822 (Exon 6) (Abbildung 3) (95). Das Fehlen des Exon 6 führt nicht nur zum Fehlen der Transmembrandomäne (kodiert durch Exon 6), sondern auch zu einer Verschiebung des Leserahmens.

Die Isoform H20 (UniProt Datenbank P16871-1) ist membranständig, besteht aus 439 Aminosäuren (AS) und besitzt ein Molekulargewicht von 49,5 kDa. Wie alle Rezeptoren der Typ I Zytokinfamilie besitzt die IL-7RA Kette in der 219 AS langen extrazellulären Domäne zwei Fibronectin ähnliche Domänen, vier konservierte Cysteinreste sowie ein WS-Motiv (WSXWS), das bei der Faltung des Proteins vermutlich eine entscheidende Rolle spielt (93). Auf die extrazelluläre Domäne folgt eine kurze Transmembrandomäne sowie die intrazelluläre Domäne, deren Box-1 Motiv als Bindungsstelle für Proteinkinasen und Adapterproteine dient.

Die extrazellulären Domänen der Isoform H20 und H6 (UniProt Datenbank, P16871-3) sind identisch. Sie unterscheiden sich jedoch in ihren C-Termini. Aufgrund des fehlenden Exon 6 und des veränderten Leserahmens endet die Isoform H6 kurz nach dem Ende der extrazellulären Domäne (Abbildung 3). Daher ist die Isoform H6 im Gegensatz zur Isoform H20 nicht membranständig, sondern wird in die extrazelluläre Umgebung in löslicher Form freigesetzt.

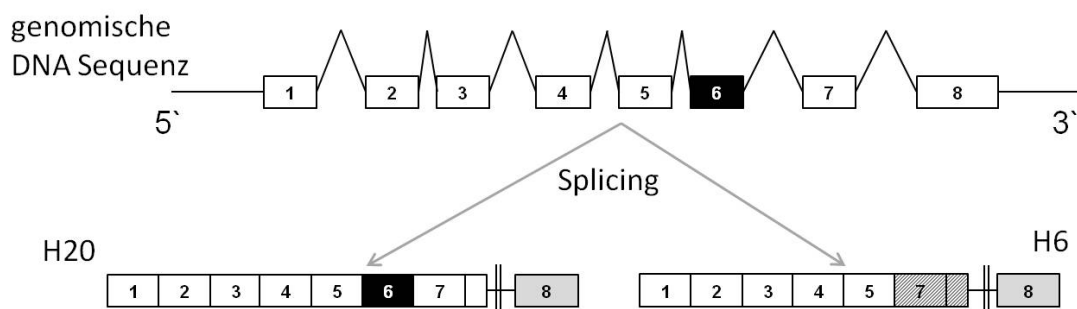


Abbildung 3. Schematische Darstellung der genomischen IL7RA Sequenz sowie der durch unterschiedliches Splicing entstehenden mRNA-Isoformen H20 und H6. Die beiden Isoformen unterscheiden sich durch das Vorhandensein des Exon 6 (dargestellt in schwarz). Durch den Verlust des Exon 6 kodiert die mRNA H6 den löslichen IL-7RA wohingegen die mRNA H20 den membranständigen Rezeptor kodiert. Der Verlust des Exon 6 führt zu einer Verschiebung des Leserahmens (schraffiert dargestellt). Der nicht translatierte Bereich des Exon 8 ist in grau dargestellt.

Rose und Kollegen fanden bei massenspektroskopischen Analysen von humanen Plasmaproteinen (96) nur die Isoform H6 und zeigten so, dass der im Plasma vorhandene IL-7RA nicht durch ein durch proteolytischen Verdau bedingtes Abstoßen des membranständigen IL-7RA, sondern vor allem durch das Ausspleißen des Exon 6 gebildet wird.

Einleitung

1.2.1 Die IL-7R Signalkaskade

Die IL-2R γ -Kette bindet Interleukin-7 (IL-7) in einem kaum messbaren Maße. Demgegenüber bindet die IL-7RA-Kette IL-7 mit einer hohen Affinität ($K_d=250$ pM) (87). Aber erst die Bindung von IL-7 an den IL-7RA führt zur Rekrutierung des IL-2R γ und zur Dimerisierung der beiden Ketten, wodurch der hochaffine IL-7R ($K_d=40$ pM) entsteht (87, 97, 98).

Die Quervernetzung der beiden Rezeptoren bringt die mit den intrazellulären Domänen der Rezeptoren assoziierten Januskinasen (JAK) (IL-7RA, JAK1 und IL-2R γ , JAK3) in räumliche Nähe, was zur Transphosphorylierung führt und die Aktivität der Kinasen erhöht (93, 99, 100). Diese wiederum phosphorylieren Tyrosinreste wie Y449 am IL-7RA, welches als Bindungsstelle für Proteine mit SH2 (vom engl.: Src-homology 2) Domäne wie die Transkriptionsfaktoren STAT1, 2, 3 und 5a/b (vom engl.: Signal Transducers and Activators of Transcription) dient. Vermutlich besitzt STAT5 eine höhere Affinität für Y449 als die anderen STATs, was die kompetitive Situation zugunsten von STAT5 verschieben könnte (90). Das gebundene STAT5 wird dann wiederum von JAK1 und JAK3 phosphoryliert, was zur Multimerisierung und zur Translokation in den Nukleus führt (90, 93, 100). Dort beeinflusst STAT5 die Transkription verschiedener Gene. Unter anderem wird die Expression der anti-apoptotischen Proteine Bcl-2 (engl.: B-cell lymphoma 2) und Mcl-1 (engl.: myeloid-cell leukemia sequence 1) erhöht, wodurch sich das Verhältnis zwischen pro-apoptotischen Proteinen, wie BAX (engl.: Bcl-2-associated X protein) und BAD (engl.: Bcl-2-antagonist of cell death), und anti-apoptotischen Proteinen zugunsten von Bcl-2 und Mcl-1 verschiebt (90, 92) (Abbildung 4).

In humanen T-Lymphozyten und B-Lymphozyten Vorläuferzellen führt die Stimulation des IL-7R auch zur Aktivierung des PI3K/AKT Signalweges (101). Es wird angenommen, dass dieser über die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) und die Proteinkinase B (AKT) verlaufende Signalweg, zur erhöhten Expression des Glukosetransporters GLUT1 und zur Inhibition von pro-apoptotischen Proteinen führt (100). Auch deutet vieles darauf hin, dass die IL-7 vermittelte Aktivierung von PI3K und AKT sowohl auf Ebene der Transkription als auch auf Proteinebene zur Herunterregulation des Cyclin-abhängigen Kinasen-Inhibitors p27^{kip1} führt und so ein Fortschreiten des Zellzyklus von G₁ nach S erlaubt (93, 102). Neben der PI3K/AKT-vermittelten Inhibition von p27^{kip1} führt auch die Inhibition der p38-mitogenaktivierten Proteinkinase (p38 MAPK) zur Aktivierung Cyclin-abhängiger Kinasen (Cdk) und zur Steigerung der Proliferation (100) (Abbildung 4). Der genaue Mechanismus über den die Stimulation des IL-7R zur Inhibition der p38 MAPK führt ist jedoch noch unklar.

Einleitung

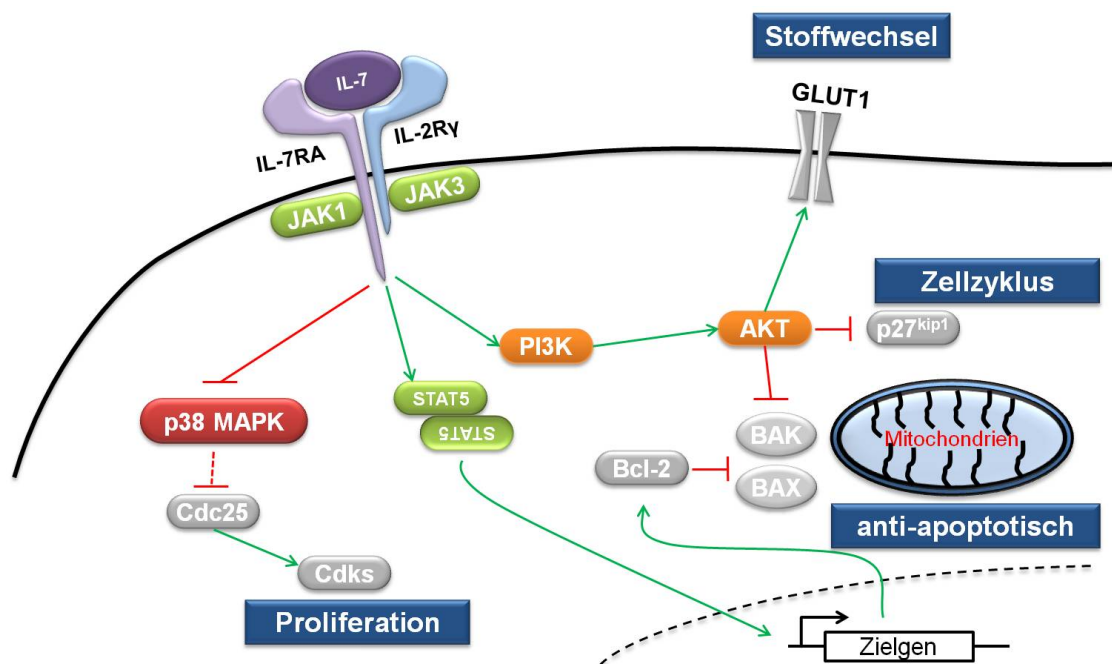


Abbildung 4. Signalkaskade des IL-7R. Die Bindung von IL-7 führt zur Dimerisierung der IL-7RA und IL-2R γ Kette. Dies führt zur Transphosphorylierung von JAK1 und JAK3 (grün) und in Folge dessen zur Phosphorylierung und Translokation von STAT5 (grün) in den Nukleus. Dies führt unter anderem zur Expression des Überlebensfaktors Bcl-2, der pro-apoptische Proteine wie BAK und BAX bindet und so anti-apoptisch wirkt. Neben dem JAK/STAT Signalweg, werden auch andere Signalwege wie der PI3K/AKT Signalweg (orange), der pro-apoptische Proteine und den Zellzyklus-Inhibitor p27^{kip1} inhibiert sowie die Glukoseaufnahme durch die gesteigerte Expression von GLUT1 anregt, aktiviert. Die Stimulation des IL-7R führt auch zur Herunterregulation der p38 MAPK (rot) und stabilisiert somit die Expression der Phosphatase Cdc25 (engl.: cell division cycle 25). Dies führt zur Aktivierung von Cdk's und zur Anregung der Proliferation.

Da IL-7 für das Überleben von T-Zellen von entscheidender Bedeutung ist, wird die Expression des IL-7RA streng kontrolliert.

Die Bindung von IL-7 an den IL-7R führt nicht nur zur Übermittlung von Signalen, die das Überleben, die Glukoseaufnahme sowie die Proliferation regulieren, sondern verringert auch durch verschiedene Mechanismen die IL-7RA Expression. Zum einen bewirkt die Bindung von IL-7 an den IL-7RA die Internalisierung des Rezeptors (103) und zum anderen wird die Transkription des IL-7RA gehemmt (104, 105). Die Aktivierung der IL-7R Signalkaskade erhöht auch die Transkription des Suppressors SOCS1 (engl.: suppressor of cytokine signalling) (106). Proteine der SOCS Familie markieren Signalmoleküle zum Abbau und regulieren durch die Bindung an die katalytischen Domänen von JAKs und Bindungsstelle von STAT die Signalkaskade des IL-7R (107). Neben IL-7 selbst unterdrücken auch IL-2, IL-4, IL-6 und IL-15 sowie die Stimulation des TCR die Transkription des IL7RA Gens (104, 105).

Einleitung

1.2.2 IL-7 und seine Funktion in der Lymphozytenentwicklung und Homeostase

1988 wurde IL-7 als Wachstumsfaktor von Pro-B-Zellen entdeckt (108). IL-7 wird vornehmlich von nicht-lymphoiden Zellen in lymphoiden Organen wie Thymus und Knochenmark produziert. Im Thymus sind besonders HLA Klasse II exprimierende kortikale Epithelzellen für die IL-7 Expression verantwortlich (109), wohingegen im Knochenmark VCAM-1 (engl.: vascular cell adhesion molecule 1) exprimierende retikulär Stromazellen IL-7 produzieren (110). Zusätzlich wird IL-7 auch von intestinalen Epithelzellen (111), Keratinozyten (112), folliculären dendritischen Zellen (113) und dendritischen Zellen gebildet (114, 115).

Experimente mit IL-7 Knockout-Mäusen haben gezeigt, dass diese ein stark reduziertes Repertoire an B-Zellen, T-Zellen, NK-Zellen, NKT-Zellen und intraepithelialen Lymphozyten besitzen (116). IL-7RA defiziente Mäuse weisen einen noch stärker ausgeprägten Phänotyp auf, da bei diesen Mäusen sowohl die Signalweiterleitung über den IL-7R als auch über den TSLPR nicht möglich ist (117). Auch in Menschen führt eine IL-7 oder IL-7RA Defizienz zu einem SCID (engl.: severe combined immunodeficiency) ähnlichen Phänotyp (118). Bis vor kurzem wurde davon ausgegangen, dass IL-7 im Menschen, im Gegensatz zu Mäusen, für die B-Zell-Entwicklung nicht notwendig ist (119). Neue Studien belegen jedoch, dass nur die fötale B-Zellentwicklung IL-7 unabhängig verläuft, IL-7 jedoch für die postnatale B-Zellentwicklung unabdingbar ist (120).

Während der B-Zellentwicklung ist die Expression des IL-7RA streng kontrolliert. So wird der IL-7RA auf der Zelloberfläche von CLPs (vom engl.: common lymphoid progenitor) und Pro-B-Zellen nicht aber von Pre-B-Zellen und reifen B-Zellen exprimiert. Der IL-7RA vermittelt während der B-Zellentwicklung Signale, die unter anderem für Rekombination der Gensegmente der schweren als auch der leichten Kette und für das Passieren des Pre-Pro-B-Zell-Stadiums wichtig sind (121–123).

Auch während der T-Zellentwicklung wird der IL-7RA nicht konstitutiv exprimiert. So exprimieren doppelt negative (DN) und einfach positive (SP) T-Zellen den IL-7RA wohingegen er auf doppelt positiven (DP) T-Zellen abwesend ist (124). IL-7-vermittelte Signale schützen DN T-Zellen vor Apoptose, führen zur Proliferation und sind für die Koordination der Rekombination der TCR-Gensegmente wichtig. In Experimenten mit IL-7RA defizienten Mäusen konnte gezeigt werden, dass durch Überexpression von Bcl-2 oder aber die verringerte Expression von pro-apoptotischen Molekülen wie Bax, die T-Zellentwicklung von α/β T-Zellen aufrecht erhalten werden kann (125–127). In γ/δ T-Zellen kann die IL-7RA Defizienz nicht durch die Überexpression von Bcl-2 ausgeglichen werden, da IL-7-vermittelte Signale hier für das erfolgreiche

Einleitung

Rearrangement der γ -Ketten notwendig sind (128). Ein entscheidender Unterschied zwischen B-Zellen und T-Zellen besteht darin, dass reife T-Zellen, je nach Differenzierungs- und Aktivierungszustand, weiterhin den IL-7RA exprimieren, B-Zellen hingegen nicht. Sowohl naive als auch Gedächtnis $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen exprimieren den IL-7RA, wohingegen aktivierte T-Zellen (Effektor T-Zellen) die Expression des IL-7RA herunterregulieren (129, 130).

Die Homeostase von T-Zellen wird vor allem durch IL-7 und die Interaktion zwischen TCR und HLA Klasse II kontrolliert. Die IL-7 Produktion wurde lange als konstitutiv und unabhängig von äußeren Einflüssen beschrieben (92). Neue Erkenntnisse deuten jedoch darauf hin, dass die Produktion von IL-7 durch eine Rückkopplungsschleife reguliert wird (131). Trotzdem ist davon auszugehen, dass die IL-7 Menge stärker durch den Verbrauch als durch die Produktion reguliert wird. Die T-Zellen konkurrieren um das verfügbare IL-7, sodass die verfügbare Menge an IL-7 die Größe und Diversität des T-Zell-Pools bestimmt. Daher ist es zwingend notwendig, dass die Expression des IL-7R so reguliert wird, dass nur die Zellen den IL-7R exprimieren, die IL-7 zum Überleben benötigen. Da diese Art der Regulation nicht der einzelnen T-Zelle dient, sondern für die Diversität des T-Zell-Repertoires von Bedeutung ist, wird in der Literatur häufig vom „altruistischen“ Verhalten der Zellen gesprochen. Dieses altruistische Verhalten erklärt auch weshalb T-Zellen, wie im vorherigen Abschnitt beschrieben, nach Antigenkontakt oder IL-7 Stimulation die Expression ihres IL-7RA verringern. Denn die Herunterregulation des IL-7RA in Folge einer IL-7, IL-2 oder TCR Stimulation verringert den IL-7 Verbrauch, sodass mehr IL-7 für andere, unstimulierte, T-Zellen zur Verfügung steht. Die Aktivierung von T-Zellen führt zur Proliferation antigenspezifischer T-Zellen. Damit diese T-Zellen nicht mit den naiven T-Zellen um das vorhandene IL-7 konkurrieren und dadurch die Diversität des T-Zell-Repertoires abnimmt, verringern diese die IL-7RA Expression (104). Zudem sind aktivierte T-Zellen nicht auf IL-7 angewiesen, da sie über z.B. IL-2, IL-4 und IL-6 vermittelte Signalwege Überlebens- und Proliferationssignale erhalten.

Park und Kollegen (132) konnten zudem zeigen, dass IL-7 und andere Gamma-Ketten-Zytokin-vermittelte Signale, die Transkription und somit Expression des CD8 Korezeptors regulieren. Zudem zeigten sie, dass die Stimulation des TCRs mit Selbstantigenen, in $CD8^+$ T-Lymphozyten, die Signalkaskade von Gamma-Ketten-Zytokinen inhibiert. Daraus folgerten sie, dass eine negative Korrelation zwischen der Expression des CD8 Korezeptors und der Intensität des Selbstantigen-vermittelten TCR-Signals besteht. Somit dient das IL-7/IL-7R Signal zur „Feinjustierung“ des CD8

Einleitung

Korezeptors und erlaubt so eine hohe Reaktivität der Zellen gegenüber Selbstantigenen innerhalb der Grenzen der Selbsttoleranz (132)

1.2.3 Funktionelle Relevanz des IL-7RA in der MS

Wie in Abschnitt 1.1.1.1 beschrieben, wurde die Assoziation zwischen dem IL-7RA und MS durch eine Vielzahl von Assoziationsstudien demonstriert. Damit war jedoch noch unklar, durch welche molekularen Mechanismen die SNPs des IL-7RA einen Einfluss auf das veränderte MS-Risiko haben.

Erste Anstrengungen, die funktionellen Auswirkungen der IL-7RA SNPs zu untersuchen, wurden von Gregory und Kollegen unternommen (56). Mit Hilfe von Minigenkonstrukten untersuchten sie den Einfluss der unterschiedlichen Allele „C“ und „T“ des SNPs rs6897932 auf das Splicing des IL-7RA. Sie fanden heraus, dass das mit MS assoziierte „C“ Allel verglichen mit dem „T“ Allel zu einem zweifachen Anstieg des Ausspleißens des Exon 6 führt. Daraus schlossen sie, dass Personen, die das „C“ Allel tragen, einen höheren Anteil an löslichem IL-7RA besitzen. Diese Erkenntnisse wurden durch Genexpressionsanalysen von Fiona McKay und Kollegen gestützt (133). Sie verglichen die Genexpression der IL-7RA Isoformen H6 und H20 in gesunden Donoren die homozygot für den Risikohaplotypen und für den protektiven Haplotypen waren. Sie konnten zeigen, dass sich das Verhältnis von membranständiger zu löslicher IL-7RA kodierender mRNA Isoform zwischen den beiden Haplotypen unterschied. Träger des Risikohaplotypen exprimierten deutlich größere Mengen der H6 kodierenden mRNA Isoform als Träger des protektiven Haplotypen. In der gleichen Publikation wurde auch die IL-7RA Oberflächenexpression auf CD3 positiven T-Lymphozyten von gesunden Donoren und PP-MS-Patienten untersucht. Dabei wurden jedoch keine Unterschiede in der IL-7RA Expression zwischen dem Risikohaplotyp und dem protektiven Haplotyp festgestellt.

Gregory und Kollegen (56) vermuteten, dass das haplotypabhängige Verhältnis der beiden IL-7RA Isoformen H6 und H20 einen Einfluss auf IL-7-vermittelte Signale haben könnte und somit die Aktivität von T-Lymphozyten gegenüber Myelinproteinen erhöhen könnte. Zudem spekulierten sie, dass Träger des Risikohaplotypen aufgrund einer verringerten B- und T-Lymphozyten Differenzierung eine erhöhte Suszeptibilität für Virusinfektionen haben. Die schon in Abschnitt 1.1.1.2 besprochene Assoziation zwischen Virusinfektionen, z.B. EBV, und MS würde demnach das erhöhte Risiko von Trägern des Risikohaplotypen erklären.

2 Ziele der Arbeit

Die Assoziation des IL-7RA mit MS wurde 2007 als erste HLA-unabhängige Assoziation mit MS entdeckt. Trotzdem ist bis heute nur wenig über den Einfluss der unterschiedlichen IL-7RA Haplotypen auf die Pathogenese und Ätiologie von MS bekannt. In dieser Arbeit wurde daher die funktionelle Relevanz der einzelnen IL-7RA Haplotypen für die Pathogenese der MS analysiert. Dazu wurde die Hamburger Kohorte erst genotypisiert, dann phänotypisch charakterisiert und dann die funktionellen Auswirkungen der gefundenen Unterschiede untersucht.

Innerhalb dieser drei Teilabschnitte wurden folgende Fragestellungen bearbeitet:

1) Genotypisierung der aus Hamburg stammenden MS-Patienten und HDs (Hamburger Kohorte)

- a. *Wie ist die Verteilung der Haplotypen innerhalb der Hamburger Kohorte und ist die Haplotypverteilung mit der anderer Kohorten vergleichbar?*
 - Genotypisierung der MS-Patienten und HDs auf die vier SNPs rs1494555, rs6897932, rs987107 und rs987106

2) Phänotypische Charakterisierung der einzelnen Haplotypen

- a. *Besteht eine Korrelation zwischen IL-7RA Oberflächenexpression und Haplotyp?*
 - Analyse der IL-7RA Oberflächenexpression auf unterschiedlichen Leukozyten-Subpopulationen im Durchflusszytometer
- b. *Hat der Haplotyp einen Einfluss auf die Expression der löslichen IL-7RA Isoform?*
 - Messung der IL-7RA mRNA und Proteinexpression

3) Analyse der funktionellen Relevanz

- a. *Welche Auswirkungen hat ein erhöhtes lösliches IL-7RA Level auf die Signalkaskade des IL-7R und auf die Proliferation von PBMCs?*
 - Messung der STAT5 Phosphorylierung und Proliferation in Gegenwart bzw. Abwesenheit von löslichem IL-7RA
- b. *Welchen Einfluss haben die IL-7RA Haplotypen auf die Genexpression?*
 - Mikroarray-Analyse der Genexpression von CD4⁺ T-Zellen

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Reagenzien für immunologische Experimente

3.1.1.1 Antikörper für das Durchflusszytometer

Tabelle 3. Antikörper für durchflusszytometrische Analysen

Antigen	Fluorochrom	Klon	Firma	Produktnummer
STAT5-P (pY694)	APC	47	BD Bioscience	612599
HLA (DR,DQ,DP)	FITC	Hu39	BD Bioscience	555558
FoxP3	PE	3G3	Miltenyi	130-093-014
CD1c	APC	AD5-8E7	Miltenyi	130-090-903
CD3	V500	UCHT1	BD Bioscience	561417
CD3	PE-cy7	UCHT1	eBioscience	25-0038-42
CD4	Pacific Blue	MT310	Dako/Biozol	DAK-PB98301
CD4	Alexa 700	RPA-T4	Biolegend	300526
CD8	Alexa 700	HIT8a	Biolegend	300919
CD14	Pacific Blue	MjP9.1	BD Bioscience	560349
CD16	Pacific Blue	3G8	Biolegend	302021
CD19	Pacific Blue	HIB19	BD Bioscience	560353
CD25	APC	BC96	eBioscience	17-0259
CD27	Alexa 700	O323	Biolegend	302814
CD45RO	FITC	UCHL1	eBioscience	11-0457-73
CD56	FITC	B159	BD Bioscience	557699
CD127	PE-cy5.5	R34.34	Beckman Coulter	Custom Designed
CD127	Brilliant Violet	A019D5	Biolegend	351309
CD127	APC	HCD127	Biolegend	317606
CD141	APC	AD5-14H12	Miltenyi	130-090-907
CD303	APC	AC144	Miltenyi	130-090-905

Material und Methoden

Tabelle 4. Isotypkontrollen für durchflusszytometrische Analysen

Isotyp	Fluorochrom	Klon	Firma	Produktnummer
Maus IgG1, κ	APC	MOPC-21	Biolegend	400130
Maus IgG1, κ	Brilliant Violet	MOPC-21	Biolegend	400157
Maus IgG1, κ	PE-cy5.5		invitrogen	MG119
Maus IgG2a, κ	FITC	G155-178	BD Bioscience	555574

3.1.1.2 ELISA

Tabelle 5. Reagenzien und Antikörper für ELISA

Bezeichnung	Firma	Produktnummer
Anti-human IL-7RA (biotinyliert)	R&D	BAF306
Anti-human IL-7RA (monoklonal)	R&D	MAB306
Quantikine HS Human IL-7 Immunoassay	R&D	HS750
Reagent Diluent	R&D	DY994
Rekombinanter IL-7RA	R&D	306-IR
Streptavidin-HRP	R&D	DY998
Substrate Reagent	R&D	DY999
Stopplösung (1,8 N Schwefelsäure)	Roth	0967.3

3.1.1.3 Kits und Reagenzien für die Durchflusszytometrie

Tabelle 6. Reagenzien für die Durchflusszytometrie

Bezeichnung	Firma	Produktnummer
FACS Flow, 20 L	BD Bioscience	342003
BD FACS Clean Solution	BD Bioscience	340345
BD FACS Rinse Solution	BD Bioscience	340346
BD Cytofix Fixation Buffer	BD Bioscience	554655
BD Phosflow Perm Buffer III	BD Bioscience	558050
Paraformaldehyd	AppliChem	A3813
FoxP3 Staining Buffer Set	Miltenyi	130-093-142
Humanes IgG	Jackson Immune Research	015-000-002

Material und Methoden

3.1.1.4 Puffer und Lösungen für das Durchflusszytometer und den ELISA

- Paraformaldehyd (PFA) 4%
 - 4 g PFA bei 80°C in 100 mL PBS (0,1M) gelöst
- FACS-Puffer
 - 0,1% BSA
 - 0,02% NaN₃
 - in PBS (0,1M)
- Tris Buffered Saline (TBS) pH: 7,4
 - 150 mM NaCl
 - 50 mM Tris HCL
- ELISA Waschpuffer
 - PBS (0,1M)
 - 0,05% Tween 20

3.1.2 Reagenzien für molekularbiologische Versuche

3.1.2.1 Bakterienstämme

Tabelle 7. Bakterienstämme

Bezeichnung	Firma	Produktnummer
DH5 alpha	invitrogen	18265-017
TOP10F'	invitrogen	K2030-01

3.1.2.2 Enzyme und Marker

Tabelle 8. Restriktionsenzyme, Polymerasen und Marker

Art des Enzyms	Bezeichnung	Firma	Produktnummer
DNA Polymerase	Pfu DNA Polymerase	Fermentas	EP0501
DNA Polymerase	Maxima® Hot Start Taq DNA Polymerase	Fermentas	EP0601
Master Mix Genotypisierung	TaqMan Genotyping Master Mix	Applied Biosystems	4371355
Master Mix Genexpression	TaqMan Gene Expression Master Mix	Applied Biosystems	4369016
Restriktionsenzym	EcoRI	Fermentas	ER0271
Restriktionsenzym	XhoI	Fermentas	ER0691

Material und Methoden

Art des Enzyms	Bezeichnung	Firma	Produktnummer
Restriktionsenzym	DpnI	Fermentas	ER1701
Restriktionsenzym	PvuI	Fermentas	ER0621
Standard (DNA Ladder)	GenRuler Low Range	Fermentas	SM1191
Standard (DNA Ladder)	GenRuler 1kb	Fermentas	SM0311
T4 DNA Ligase	T4 DNA Ligase	Fermentas	EL0011

3.1.2.3 Kits für molekularbiologische Versuche

Tabelle 9. Molekularbiologische Kits

Funktion	Bezeichnung	Firma	Produktnummer
cDNA Synthese	RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit	Fermentas	K1632
DNA Aufreinigung	illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification kit	GE Healthcare	28-9034-70
Plasmidisolierung (Midiprep)	PureLink™ HiPure Plasmid Midiprep Kit	invitrogen	K2100-04
Plasmidisolierung (Miniprep)	peqGOLD Plasmid Miniprep Kit I	peqlab	12-6942-02
RNA Isolierung	RNeasy Mini Kit	Qiagen	74104
RNA Isolierung	QIAshredder	Qiagen	79654
Transfektion	Lipofectamine 2000 Transfection Reagent	invitrogen	11668-027

3.1.2.4 Oligonukleotide und TaqMan Sonden

Tabelle 10. Oligonukleotide

Nummer	Primer	Sequenz (5'-3')	Verwendungszweck
3	H6_revers	GACTCGAGCTCACTTTT CTTGGTTTCTTAC	Anfügen einer XhoI Schnittstelle
7	H6_from_ex_6_Fwd	CAATAATAGCTCAGGAT TAAGCCTATCG	cDNA Amplifikation

Material und Methoden

8	H6_from_ex_6_rev	CGATAGGCTTAATCCTG AGCTATTATTG	cDNA Amplifikation
9	H20/H6_to_ex_6_Fwd	AATGACAATTCTAGGTA CAACTTTTGGCATGGTT TTTTC	cDNA Amplifikation
10	H6_to_Exon_6_rev	CTCACTTTTCTTGGTTT CTTACAAAGATGTTC	cDNA Amplifikation
11	IL-7Ra_for_EcoR1	GTAGAATTCGCCTCCAT GACAATTCTAGGTACAA CTTTTGGCATGGTTTT	Anfügen einer EcoRI Schnittstelle
12	mut_seq6.5_for_279bp	GACCCAGATGTCAACAC CACCAATCTG	Mutagenese
13	mut_seq6.5_rev_279bp	CAGATTGGTGGTGTGGA CATCTGGGTC	Mutagenese
14	mut_seq6.5_for_779bp	CTCCAGAGATCAATAAT AGCTCAGG	Mutagenese
15	mut_seq6.5_rev_799bp	CCTGAGCTATTATTGAT CTCTGGAG	Mutagenese

Tabelle 11. TaqMan Genexpressions-Assays

Gen	kodiertes Protein	Bezeichnung	Firma
IL7RA	Alle IL-7RA Isoformen	HS_00902334_m1	Applied Biosystems
IL7RA	H20	HS_00904815_m1	Applied Biosystems
IL7RA	H6	Hs_00902337_m1	Applied Biosystems
BCL2	Bcl-2	Hs_00608023_m1	Applied Biosystems
18S		Hs99999901_s1	Applied Biosystems

Tabelle 12. TaqMan SNP Genotypisierungs-Assays

SNP	Allele	Firma
rs1494555	C/T	Applied Biosystems
rs6897932	C/T	Applied Biosystems
rs987107	C/T	Applied Biosystems
rs987106	A/T	Applied Biosystems

Material und Methoden

3.1.2.5 Vektoren

Tabelle 13. Vektoren

Bezeichnung	Firma	Produktnummer
pcDNA3.1 (+)	invitrogen	V790-20

3.1.2.6 Puffer und Lösungen für molekularbiologische Versuche

- 50x TAE-Puffer, pH 7,8
 - 2 M Tris/Essigsäure,
 - 0,5 M C₂H₃NaO₂
 - 50 mM EDTA
- 1x TE-Puffer, pH 8
 - 1 mM EDTA
 - 10 mM Tris/HCl
- Ladepuffer, pH 7,6 (Bromphenol Blau)
 - 10 mM Tris/HCl
 - 0,15% Orange G
 - 0,03% Bromphenol Blau
 - 60% Glycerin
 - 1% SDS
 - 100 mM EDTA
- Ladepuffer, pH 7,6 (Orange G + Xylenecyanol)
 - 10 mM Tris/HCl
 - 0,15% Orange G
 - 0,03% Xylene cyanol FF
 - 60% Glycerin
 - 1% SDS
 - 60 mM EDTA

3.1.3 Materialien für die Zellkultur

3.1.3.1 Zelllinien

Alle eukaryotischen Zelllinien sowie alle Primärzellen wurden in einem mit CO₂ (5%) begasten Brutschrank bei 37 °C und 90% Luftfeuchtigkeit kultiviert.

Tabelle 14. Eukaryotische Zelllinien

Bezeichnung	Herkunft
HEK 293 (Human Embryonic Kidney)	Adenovirus 5 transfizierte humane Epithelzellen

Material und Methoden

3.1.3.2 Zellkulturmedien und Mediumzusätze

Tabelle 15. Verwendete Zellkulturmedien und Mediumzusätze

Bezeichnung	Hersteller	Produktnummer
Dimethylsulfoxid (DMSO)	AppliChem	A3672.0250
DMEM + GlutaMAX	Gibco	6195
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA); 0,5M	AppliChem	A4892.0100
Gentamicin (50 mg/mL)	PAA	P11-005
L-Glutamin; 200 mM	Gibco	25030
Lymphocyte Separation Medium	PAA	J15-004
Penicillin/Streptomycin	PAA	P11-010
RPMI 1640	PAA	E15-842
Serum (Fetales Kälberserum)	Biochrom	S00115
Serum human	PAA	C15-021
X-VIVO 15	Lonza	BE 04-418F

3.1.3.3 Medien und Puffer für die Zellkultur

- HEK 293 Medium
 - DMEM + GlutaMAX
 - 10% FCS
 - 1% Penicillin/Streptomycin
- Einfriermedium
 - 50% RPMI 1640
 - 40% FCS
 - 10% DMSO
- Standard Medium
 - RPMI
 - 10% FCS
 - 1% Penicillin/ Streptomycin
 - 2 mM L-Glutamin
- MACS-Puffer
 - PBS
 - 0,5% humanes Serum
 - 2 mM EDTA

Material und Methoden

3.1.3.4 Antikörper für die Zellkultur

Tabelle 16. Antikörper für die Zellkultur

Antigen/ Bezeichnung	Klon	Firma	Produktnummer
Anti-IL-7 Antikörper	7417	R&D	MAB207

3.1.3.5 Stimulanzen

Tabelle 17. Reagenzien zur Stimulation von Zellen

Bezeichnung	Hersteller	Produktnummer
Humanes IL-7	Sigma Aldrich	I5896
PHA	Sigma Aldrich	L9017
Rekombinanter IL-7RA	R&D	306-IR
Tetanus Toxoid	Novartis Behring	

3.1.4 Geräte

Tabelle 18. Verwendete Geräte

Gerät	Bezeichnung	Firma
Agarosegel Laufkammer	IB50000	IBI Scientific
Beta-Zähler	1450 Microbeta	Perkin-Elmer
Coulter Counter	Coulter AC.T diff™	Beckman Coulter
Cycler	Flexcycler	Analytikjena
Durchflusszytometer	LSRII	BD Bioscience
Einschweißgerät	Haet Sealer 1295-012	Wallac
elektrische Pipetten	Rainin	Rainin
ELISA Lesegerät	Wallac Victor 1420 multilabel plate reader	Perkin-Elmer
ELISA Lesegerät	Bio-Tek	µQuant
Filtermatten-Kassette	Filtermatten-Kassette	Perkin-Elmer
Flüssigstickstofftank	LABS-40K	Tec Lab
Harvester	Harvester 96 MACH III M	Tomtec
Inkubator Zellkultur	HERA cell 240	Thermo Scientific
Kryobehälter	Mr. Frosty	Nalgene
Kühlschrank	Liebherr	Liebherr
Magnet BD	Cell Separation Magnet	BD Bioscience
Mehrkanalpipette	Research Plus	Eppendorf
Mikroskop Zellkultur	CX21	Olympus

Material und Methoden

Gerät	Bezeichnung	Firma
Nanodrop	Nd-1000	Peqlab
Netzteil	PowerPack P25	Biometra
pH-Meter	Hydrus 300	Fischer Brand
Pipetten Molekularbiologie	Pipetman Classic	Gilson
1 µL-10 µL		
20 µL-200 µL		
100 µL-1000 µL		
Pipetten Zellkultur	Research Plus	Eppendorf
1 µL-10 µL		
20 µL-200 µL		
100 µL-1000 µL		
Pipettierhilfe	Accu Jet	Hassa
Real Time Cycler	7900HT Fast Real-Time PCR System	Applied Biosystems
Schüttelwasserbad	GLS Aqua Plus Serie	Grant
Sterilbank	Steril Gard	The Baker Company
Thermomixer	Thermomixer comfort	Eppendorf
Tiefkühlschrank (-20°C)	Liebherr Comfort	Liebherr
Tiefkühlschrank (-80°C)	VIP Series	Sanyo
Tischzentrifuge Zellkultur	Centrifuge 5417R	Eppendorf
Vortexer	Vortex-Genie 2	Scientific Industries
Waage	PM4000	Metler
Zentrifuge Molekularbiologie	Centrifuge 5804R	Eppendorf
Zentrifuge Zellkultur	Multifuge SR+	Thermo Scientific
Zentrifuge Zellkultur	Varifuge 3.0R	Heraeus Sepatech

3.1.5 Verbrauchsartikel

Tabelle 19. Verbrauchsmaterialien

Produkt	Hersteller
96-Well PCR Platten	Sarstedt
96-Well round bottom Zellkulturplatten	Greiner, Sarstedt
EDTA-Röhrchen	Sarstedt
Einmalpipetten	Greiner, Sarstedt

Material und Methoden

Produkt	Hersteller
ELISA Platten (EIA/RIA (96 Well Flat Bottom))	Costar
Eppendorfgefäße	Sarstedt
FACS-Röhrchen	Sarstedt
FACS-Röhrchen (steril)	BD Bioscience
Falcon-Gefäße	Sarstedt
Filtermatten	Perkin-Elmer
Kryogefäße	Greiner
Klarsichthüllen für Filtermatten	Perkin-Elmer
Centricons (Spin-X® UF20 Concentrator 10 K MWCO)	Corning
PCR-Platten Verschlussfolie	Sarstedt
Pipettenspitzen Zellkultur und Molekularbiologie	Sarstedt
Pipettenspitzen PCR & RT-PCR (Nerbe 10 µL)	Nerbe
Pipettenspitzen (mit Filter)	Greiner
Serum-Röhrchen	Sarstedt
Sterilfilter (GP express plus membrane; 0,22 µm)	Millipore
Wanne für Mehrkanalpipette	Roth
Zählkammer	Digital Bio
Zellkulturflaschen	Sarstedt

3.1.6 Chemikalien

Tabelle 20. Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller	Produktnummer
[methyl- ³ H]-Thymidin	Amersham	TRK300
Agarose (Ultra pure)	invitrogen	P1379-500ML
Bovine Serum Albumin (BSA)	PAA	K45-001
Bromphenol-Blau	Roth	A512.1
Dulbecco's Phosphat Buffered Saline (PBS) 10x	PAA	H15-011
Dulbecco's Phosphat Buffered Saline (PBS) 1x	PAA	H15-002
Essigsäure	Roth	3738.2
Ethanol ≥ 99,8 p.a.	Roth	9065.3

Material und Methoden

Bezeichnung	Hersteller	Produktnummer
Ethidiumbromid	Roth	2218.1
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Roth	8043.2
Glycerin	Roth	3783.1
Isopropanol	Roth	6752.4
LB Agar, Pulver	invitrogen	22700-025
LB Broth Base, Pulver	invitrogen	12780-052
Natriumacetat	Roth	6773
Natriumazid	Roth	K305.1
Natriumchlorid	Roth	3957.2
Orange G	Roth	0318.1
Salzsäure 37%	Roth	4625.2
SDS	Roth	2326.2
Szintillationslösung	Perkin Elmer	1205-440
Tris (2-Amino-2-(hydroxymethyl)-propan-1,3-diol)	AppliChem	A1086
Trypan Blue Lösung (0,4%)	Sigma	T8154
Türks Lösung	Merck	1.09277.0100
Tween 20	Sigma	PI379-500ML
Xylenecyanol	Roth	A513.1

Material und Methoden

3.1.7 Software

Tabelle 21. Verwendete Software

Bezeichnung	Verwendungszweck
Corel Draw 12	Graphik
DAVID (http://david.abcc.ncifcrf.gov/)	Mikroarray-Analyse
FACSDiva	Durchflusszytometrie
FlowJo	Durchflusszytometrie
GraphPad Prism 5	Statistik
HaploView 4.2 (http://www.broadinstitute.org/scientific-community/science/programs/medical-and-population-genetics/haploview/haploview)	Haplotypanalyse
Microsoft Excel	Tabellenkalkulation
pDRAW32	Klonierung
PLINK (http://pngu.mgh.harvard.edu/~purcell/plink/)	Haplotypanalyse
SDS2.4	Genexpressionsanalyse

Material und Methoden

3.2 Methoden

3.2.1 MS-Patienten und Gesunde Kontrollen

Alle MS-Patienten wurden über die MS-Poliklinik des Universitätsklinikums Hamburg Eppendorf (UKE) rekrutiert. Die Einteilung der MS-Patienten in die unterschiedlichen klinischen Verlaufsformen und die MS-Diagnose erfolgte ebenfalls durch die MS-Poliklinik des UKE an Hand der McDonald Kriterien (13). Die gesunden Kontrollen stammen aus der Blutbank des UKE (freundlicherweise bereitgestellt von Prof. Dr. Eiermann), oder es handelt sich um Spender aus dem Zentrum für Molekulare Neurobiologie Hamburg (ZMNH).

Diese Studie wurde durch die Ethikkommission der Hamburger Ärztekammer genehmigt (Referenznummer: 2758, Titel: Heterogenität der Multiplen Sklerose - Studie zur Phänotypisierung, biologischen Markern und zur Risikokommunikation bei Multipler Sklerose) und alle beteiligten Personen haben sich schriftlich mit der Verwendung ihrer Proben einverstanden erklärt.

3.2.2 Zellbiologische Methoden

3.2.2.1 *Isolierung von mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMCs)*

Die Isolierung von PBMCs aus humanem Vollblut oder Leukapheresen erfolgte über Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation. Dazu wurden die Blutproben mit PBS verdünnt (Vollblut: 1/2; Leukapherese:1/4), auf das Ficoll aufgeschichtet und anschließend zentrifugiert (20 min, 2000 rpm, RT). Die Interphase wurde abgenommen, mit kaltem PBS versetzt und bei 1800 rpm und 4°C für 10 min zentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde ein- bis zweimal wiederholt (5 min, 1300 rpm und 4°C). Die so erhaltenen PBMCs wurden anschließend entweder für weitere Experimente verwendet oder kryokonserviert.

3.2.2.2 *Kryokonservierung von PBMCs und Zelllinien*

PBMCs und Zelllinien wurden zur Langzeitkonservierung in Flüssigstickstoff gelagert. Dafür wurden 5×10^6 - 50×10^6 Zellen pelletiert und anschließend in 1 mL Einfriermedium aufgenommen und in Kryoröhrchen überführt. Um ein gleichmäßiges Sinken der Temperatur (1°C/Minute) zu gewährleisten, wurden die Kryoröhrchen für 24 h bei -80°C in „Mr. Frosty“ gelagert und anschließend zur Langzeitkonservierung in einen Flüssigstickstofftank überführt.

Material und Methoden

3.2.2.3 Auftauen von kryokonservierten Proben

Beim Auftauen der Zellen wurde darauf geachtet, dass die Zellen nur möglichst kurze Zeit dem DMSO-haltigen Einfriermedium ausgesetzt wurden. Die Kryoröhrchen wurden im 37°C warmen Wasserbad erwärmt, bis nur noch kleine Eispartikel übrig waren. Anschließend wurde die Zellsuspension in PBS oder Nährmedium überführt und für 5 min bei 1300 rpm abzentrifugiert.

3.2.2.4 Gewinnung von Serum aus Vollblut

Das Blut wurde in Serumröhrchen abgenommen und für 10 min bei 3000 rpm zentrifugiert. Das Serum wurde abpipettiert und bei -80°C eingefroren.

3.2.2.5 Isolierung von CD4⁺ T-Zellen aus PBMCs

Mit Hilfe des BD Bioscience CD4⁺ Anreicherungskits wurden CD4⁺ T-Zellen durch Negativselektion isoliert. Die Isolierung erfolgte nach Herstellerangaben. Die PBMCs wurden mit einem biotinylierten Antikörpercocktail versetzt, der gegen unterschiedliche Zellpopulationen, außer CD4⁺ T- Zellen, gerichtet ist. Anschließend wurden die Zellen mit magnetischen Anti-Biotin-Mikropartikeln inkubiert und einem magnetischen Feld ausgesetzt. Die nicht markierten CD4⁺ T- Zellen blieben in der Lösung, wohingegen alle anderen markierten Zellen am Magneten haften blieben. Die Reinheit der Zellen wurde im Durchflusszytometer kontrolliert und lag immer über 95%.

3.2.2.6 Stimulation von Zellen mit IL-7

Die Stimulation von CD4⁺ T-Lymphozyten mit IL-7 erfolgte in 96 Well Rundbodenplatten. Dazu wurden 2×10^5 CD4⁺ T-Lymphozyten / Well in Standard Medium mit IL-7 stimuliert (10 ng/mL; Sigma Aldrich) oder zur Kontrolle unstimuliert gelassen. Nach 0 h, 6 h, 12 h, 24 h und 48 h wurden die Zellen geerntet und im Durchflusszytometer analysiert oder einmal in PBS gewaschen (350 g, 5 min, 4°C) und anschließend in Flüssigstickstoff schockgefroren.

3.2.2.7 ³H Thymidin-Inkorporationsassay

Zur Messung der Proliferation wurden 2×10^5 PBMCs / Well auf eine 96 Well-Platte in RPMI 1640 Medium (1% Penicillin/Streptomycin; 2 mM L-Glutamin) mit 5% autologem Serum ausplattiert. Die Zellen wurden für 48 h, 72 h und 168 h mit 1 µg/mL PHA oder 5 µg/mL Tetanus Toxoid stimuliert oder unstimuliert gelassen. 15 h vor dem Ernten der

Material und Methoden

Zellen wurden diese mit 1 μCi ^3H -Thymidin pro Well gepulst. Die Zellen wurden mit Hilfe des Harvesters geerntet und auf ein Filterpapier gesaugt. Das Filterpapier wurde bei 60°C getrocknet, mit 5 mL Szintillationslösung durchtränkt und in einen Klarsichtbeutel eingeschweißt. Die Menge des in die DNA eingelagerten ^3H Thymidin wurde mit Hilfe eines Beta-Zählers gemessen. Dabei wurde die Anzahl der Zählereignisse / min (cpm) gemessen.

3.2.2.8 Stabile Transfektion von HEK 293-Zellen

Für die Transfektion von HEK-Zellen wurde Lipofectamine 2000 (Invitrogen) entsprechend der Herstellerangaben verwendet. Um stabil transfizierte HEK 293-Zellen zu erhalten, wurden diese 24 h nach der Transfektion in 0,8 mg/mL Gentamicin-haltigem Selektionsmedium kultiviert.

3.2.2.9 Ankonzentration des IL-7RA HEK-Zellüberstands

Um den HEK-Zellüberstand von Zellen und groben zellulären Bestandteilen zu befreien, wurde dieser einmal für 5 min bei 4°C und 1300 rpm zentrifugiert und anschließend sterilfiltriert (GP express plus membrane, 0,22 μm). Dann wurden 10 mL des Überstands auf die Centricons (Corning) gegeben und bei 4°C und 8000 g etwa 30 min zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde mehrmals wiederholt.

3.2.3 Immunologische Methoden

3.2.3.1 Durchflusszytometrie

Das Durchflusszytometer, auch FACS (vom eng.: fluorescence activated cell sorter) genannt, ermöglicht die Unterscheidung von Zellen aufgrund der spezifischen Expression von Oberflächenmolekülen und intrazellulären Strukturen. Sämtliche FACS-Färbungen wurden zur Schonung der Fluorochrome im Dunkeln durchgeführt und an einem LSRII Durchflusszytometer unter Verwendung der BD Bioscience FACSDiva Software analysiert. Die Auswertung der Messungen erfolgte mit Hilfe von FlowJo.

3.2.3.1.1 Oberflächenfärbung

Soweit nicht besonders vermerkt, wurden für alle Oberflächenfärbungen aufgetaute PBMCs verwendet. Diese wurden in FACS-Puffer aufgenommen und auf eine Konzentration von 1×10^6 Zellen / 100 μL eingestellt. Anschließend wurden freie Fc-

Material und Methoden

Rezeptoren durch Zugabe von humanem-IgG (1:1000 verdünnt) für 10 min auf Eis geblockt. Das Anfärben von spezifischen Oberflächenmarkern erfolgte für 45 min bei 4°C mit den in Tabelle 3 aufgeführten Antikörpern. Die angefärbten Zellen wurden einmal mit 2 mL FACS-Puffer gewaschen (350 g, 5 min, RT) und dann durch Zugabe von 100 µL 1% PFA für 10 min bei RT fixiert. Anschließend wurden die Zellen erneut mit FACS-Puffer gewaschen und nach Lösen des Pellets in 350 µL FACS-Puffer im Durchflusszytometer analysiert.

3.2.3.1.2 Intrazelluläre FoxP3-Färbung

Die Anfärbung des Transkriptionsfaktors FoxP3 erfolgte zur Charakterisierung von regulatorischen T-Zellen (Treg) immer in Kombination mit der Oberflächenfärbung von CD3, CD4 und CD25 und wurde in Anlehnung an die Herstellerangaben (Miltenyi) durchgeführt. Das Anfärben der Oberflächenmarker wurde, bis zum Fixierungsschritt, wie in Abschnitt 3.2.3.1.1 beschrieben durchgeführt. Dann wurden die Zellen für 30 min bei 4°C in 1 mL frisch angesetzter Fixier- / Permeabilisierungslösung inkubiert. Anschließend wurden die Zellen einmal mit 1 mL FACS-Puffer und zweimal mit 1 mL kaltem 1xPermeabilisierungspuffer gewaschen (350 g, 5 min, RT). Daraufhin wurden 20 µL Blockierlösung (25% humanes-IgG und 75% 1xPermeabilisierungspuffer) hinzugegeben und die Zellen für 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen durch Zugabe von 10 µL Anti-FoxP3-PE Antikörper für 30 min bei RT angefärbt. Nach einem Waschschrift mit FACS-Puffer (350 g, 5 min) wurden die Zellen in 350 µL FACS-Puffer aufgenommen und im Durchflusszytometer analysiert.

3.2.3.1.3 Messung der STAT5 Phosphorylierung (Phosflow)

Die Messung der STAT5 Phosphorylierung erfolgte in CD4⁺ T-Zellen und wurde in Anlehnung an die Herstellerangaben (BD Bioscience, Phosflow Protocol II and III) durchgeführt. Dazu wurden 1x10⁶ CD4⁺ T-Zellen in sterilen FACS-Röhrchen in **1:** Standard Medium, **2:** Standard Medium mit Anti-IL-7 Antikörper (10 µg/mL), **3:** ankonzentriertem HEK 293 Überstand, **4:** ankonzentriertem HEK 293-IL-7RA Überstand oder **5:** Standard Medium mit rekombinantem IL-7RA (5000 ng/mL), für 2 h im Inkubator vorinkubiert. Anschließend wurden die Zellen durch Zugabe von IL-7 (0-1000 pg/mL) für 15 min im Wasserbad (37°C) stimuliert. Die Zellen wurden sofort nach Beendigung der Stimulationsspanne durch Zugabe von 1 mL vorgewärmten „BD Cytfix™ Fixation Buffer“ für 10 min im Wasserbad (37°C) fixiert. Dann wurden die Zellen pelletiert (350 g, 5 min, RT) und in eiskaltem „BD Phosflow™ Perm Buffer III“

Material und Methoden

aufgenommen und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit 3 mL FACS-Puffer gewaschen (350 g, 5 min, RT) und dann durch Zugabe von 20 µL Anti-Stat5-PE (pY694) für 1 h bei RT gefärbt. Vor dem Messen im Durchflusszytometer wurden die Zellen erneut mit 3 mL FACS-Puffer gewaschen und in 350 µL FACS-Puffer aufgenommen.

3.2.3.2 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Beim ELISA handelt es sich um eine Methode zur quantitativen Bestimmung von Antigen- oder Antikörperkonzentrationen.

3.2.3.2.1 IL-7RA ELISA

Die IL-7RA-Konzentration in Seren und Zellüberständen wurde mittels eines IL-7RA Sandwich ELISA gemessen. Dazu wurde eine 96 Well Platte (Corning) über Nacht bei RT mit 100 µL / Well Anti-IL-7RA Antikörper (2 µg/mL, R&D, MAB306; in PBS) beschichtet. Dann wurde die Platte dreimal mit 300 µL / Well ELISA-Waschpuffer gewaschen und die freien Proteinbindestellen durch eine 2 h Inkubation mit 10% BSA (R&D, Reagent Diluent 1/10 verdünnt mit PBS) geblockt. Anschließend wurde die Platte erneut dreimal mit 300 µL ELISA-Waschpuffer gewaschen und die zu messenden Proben (wenn nötig mit 10% FCS in PBS verdünnt) sowie der Standard (R&D, 306-IR) auf die Platte aufgetragen und für 2 h bei RT inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde die Platte wieder dreimal mit 300 µL ELISA-Waschpuffer gewaschen und 100 µL / Well Anti-IL-7RA Antikörper (200 ng/mL R&D, BAF306; in TBS + 1% Reagent Diluent) auf die Platte gegeben und für 2 h bei RT inkubiert. Nach erneutem dreimaligen Waschen der Platte mit 300 µL ELISA-Waschpuffer wurden 100 µL / Well Streptavidin-HRP (R&D, DY998; 1/200 verdünnt in PBS + 1% Reagent Diluent) auf die Platte aufgetragen und für 20 min bei RT inkubiert. Vor der Zugabe des Substrats (R&D, DY999) wurde die Platte erneut dreimal mit 300 µL ELISA-Waschpuffer gewaschen.

10 min nach Zugabe des Substrats wurde die Enzymreaktion durch Zugabe von 50 µL Schwefelsäure pro Well (1,8 N) beendet und die Platte im „Victor Wallac plate reader“ ausgelesen.

Material und Methoden

3.2.3.2.2 IL-7 ELISA

Die IL-7 Konzentration in Seren von MS-Patienten wurden mittels eines IL-7 Quantikine-ELISAs gemessen. Der ELISA wurde nach den Herstellerangaben durchgeführt und die Platte im „µQuant“ ELISA-Reader ausgelesen

3.2.4 Molekularbiologische Methoden

3.2.4.1 *SNP Genotypisierung*

Die Genotypisierung der MS-Patienten und HDs wurde von der Firma Bioglobe durchgeführt oder erfolgte mit Hilfe des SNP Genotypisierungs-Assays von Applied Biosystems.

Der SNP Genotypisierungs-Assay von Applied Biosystems wurde entsprechend der Herstellerangaben verwendet. Dabei wurde eine Einfachbestimmung der Proben vorgenommen. Sowohl die PCR-Reaktion als auch das Auslesen der Platten erfolgte in einem 7900HT Fast Real-Time PCR System der Firma Applied Biosystems. Die Genotypisierung wurde mittels der SDS 2.4 Software ausgewertet.

3.2.4.2 *Isolation von RNA aus PBMCs*

Für die Isolation von RNA aus PBMCs wurden diese nach der Aufreinigung erneut mit PBS gewaschen und anschließend 5×10^6 PBMCs in Flüssigstickstoff schockgefroren. Die RNA Isolation erfolgte mit Hilfe des Quiagen RNeasy Mini Kits und der QIAshredder Säulen und wurde entsprechend der Herstellerangaben durchgeführt. Die aufgereinigte RNA wurde bei -80°C gelagert.

3.2.4.3 *cDNA-Synthese*

Die Synthese von cDNA erfolgte unter Verwendung des RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kits von Fermentas. Dabei wurden immer 1 µg RNA umgeschrieben, wobei die Durchführung entsprechend der Herstellerangaben erfolgte.

3.2.4.4 *Real Time-PCR*

Die Real Time-PCR (RT-PCR) ermöglicht die Quantifizierung bestimmter mRNAs in unterschiedlichen Geweben oder Zellen. Die RT-PCR wurde mit Genexpressions-Assays von Applied Biosystems entsprechend der Herstellerangaben durchgeführt. Dabei wurden die Proben in Duplikaten gemessen. Die PCR-Reaktion erfolgte in einem

Material und Methoden

7900HT Fast Real-Time PCR System der Firma Applied Biosystems und wurde mit Hilfe der SDS 2.4 Software ausgewertet.

Die Bestimmung der relativen Genexpression erfolgte über die $\Delta\Delta C_t$ -Methode wobei 18S oder die IL-7RA gesamt mRNA-Menge als Standard (housekeeping gene) diente.

3.2.4.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion dient der in vitro Amplifikation von spezifischen DNA-Fragmenten. Für die Amplifikation von cDNA wurde die Maxima Hot Start Taq DNA Polymerase und für die Amplifikation von DNA sowie für Mutagenese-PCRs wurde die Pfu DNA Polymerase, beide von Fermentas, verwendet.

• Standard PCR

Die PCR-Reaktion wurde in 50 μ L Ansätzen durchgeführt und bestand aus folgenden Komponenten.

Tabelle 22. Standard PCR-Ansatz

Komponenten	Ansatz (50 μ L)
Template	10-100 ng
Vorwärtsprimer	10 pmol
Rückwärtsprimer	10 pmol
dNTPs	0,2 mM
Polymerasepuffer 10 x	5 μ l
ddH ₂ O	x μ l
Polymerase	1,25 U

Die Anzahl der Zyklen sowie die Annealing-Temperatur und die Länge der Elongation wurden in Abhängigkeit der gewünschten „Zielsequenz“ als auch der Primer gewählt (siehe: Tabelle 23 und Tabelle 24).

Tabelle 23. PCR-Programm: Primer 8-9; Maxima Hot Start Taq DNA Polymerase

Temperatur	Zeit	Zyklen
95°C	4 min	-
95°C	30 sek	
57°C	30 sek	35
72°C	45 sek	
72°C	10 min	-
4°C	∞	-

Tabelle 24. PCR-Programm: Primer 7-10; Maxima Hot Start Taq DNA Polymerase

Temperatur	Zeit	Zyklen
95°C	4 min	-
95°C	30 sek	
57°C	30 sek	35
72°C	10 sek	
72°C	10 min	-
4°C	∞	-

Material und Methoden

Tabelle 25. PCR-Programm: Primer 3-11; Pfu DNA Polymerase

Temperatur	Zeit	Zyklen
95°C	3 min	-
95°C	30 sek	
57°C	30 sek	40
72°C	2 min	
72°C	10 min	-
4°C	∞	-

• Zielgerichtete Mutagenese

Vorhandene Punktmutationen wurden mit Hilfe zielgerichteter Mutagenesen aus dem den IL-7RA kodierenden Konstrukt entfernt. Dazu wurden sogenannte Overlap-Extension-PCRs verwendet. Bei dieser Methode werden vier verschiedene Primer verwendet, zwei die Zielsequenz flankierende Primer und zwei Mutagenese Primer. Mit den ersten zwei PCR-Reaktionen wurden zwei sich zum Teil überlappende DNA-Fragmente amplifiziert, wobei sich die Punktmutation in dem überlappenden Bereich befand. Mit der dritten PCR wurden die zwei DNA-Fragmente wieder zu einem DNA-Fragment verbunden.

Zur Entfernung von Punktmutationen wurden folgende PCR-Konditionen verwendet:

- Zur Entfernung der Punktmutation an Position 779

Tabelle 26. Mutagenese-Programm: Primer 11-15

T	Zeit	Zyklen
95°C	3 min	-
95°C	30 sek	
57°C	30 sek	35
72°C	85 sek	
72°C	10 min	-
4°C	∞	-

Tabelle 27. Mutagenese-Programm: Primer 3-14

T	Zeit	Zyklen
95°C	3 min	-
95°C	30 sek	
57°C	30 sek	35
72°C	15 sek	
72°C	10 min	-
4°C	∞	-

Tabelle 28. Mutagenese-Programm: Primer 3-11

T	Zeit	Zyklen
95°C	3 min	-
95°C	30 sek	
57°C	30 sek	35
72°C	95 sek	
72°C	10 min	-
4°C	∞	-

Material und Methoden

- Zur Entfernung der Punktmutation an Position 279

Tabelle 29. Mutagenese-Programm: Primer 11-13

T	Zeit	Zyklen
95°C	3 min	-
95°C	30 sek	
60°C	30 sek	35
72°C	90 sek	
72°C	10 min	-
4°C	∞	-

Tabelle 30. Mutagenese-Programm: Primer 3-12

T	Zeit	Zyklen
95°C	3 min	-
95°C	30 sek	
60°C	30 sek	35
72°C	30 sek	
72°C	10 min	-
4°C	∞	-

Tabelle 31. Mutagenese-Programm: Primer 3-11

T	Zeit	Zyklen
95°C	3 min	-
95°C	30 sek	
57°C	30 sek	35
72°C	2 min	
72°C	10 min	-
4°C	∞	-

3.2.4.6 Agarosegel-Elektrophorese

Je nach Größe der DNA-Fragmente wurden Agarosegele zwischen 1% und 2,5% verwendet. Die DNA wurde mit einem 6x Ladepuffer (Bromphenol Blau oder Orange G + Xylenecyanol) vermischt und zusammen mit einem Standard (GeneRuler 1 kb oder GeneRuler Low Range) auf das Agarosegel geladen. Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung der Proben in einer, mit TAE-Puffer gefüllten, horizontalen Gelelektrophoresekammer wurde das Agarosegel für 10 min in einem Ethidiumbromidbad (0,7 µg/mL) gefärbt und die DNA unter UV-Licht sichtbar gemacht.

3.2.4.7 Isolierung von DNA-Fragmenten aus einem Agarosegel

Für die Isolation von DNA-Fragmenten aus einem Agarosegel wurde ein Kit von GE Healthcare verwendet. Dazu wurde die gewünschte Bande aus dem Agarosegel ausgeschnitten und die DNA mit Hilfe des Kits, entsprechend der Herstellerangaben, aus dem Agarosegel isoliert.

3.2.4.8 Fragmentierung von DNA mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen

Zum sequenzspezifischen Spalten von DNA wurden Restriktionsendonukleasen der Firma Fermentas verwendet und entsprechend der Herstellerangaben angewendet.

3.2.4.9 Ligation von DNA

Die Ligation eines DNA-Fragments in einen linearen Vektor mit komplementären Enden erfolgte mittels T4-Ligase der Firma Fermentas. Für einen 10 µL

Material und Methoden

Reaktionsansatz mit 2,5 U T4-Ligase wurden die eingesetzten DNA-Mengen über folgende Formel berechnet:

$$\text{Insert (ng)} = 6 \times \left[\frac{\text{Insert (bp)}}{\text{Vektor (bp)}} \right] \times \text{Vektor (ng)}$$

Der Ligationsansatz wurde für mindestens 1 h bei 22°C inkubiert. Um die Möglichkeit einer Religation des Vektors zu überprüfen, wurde ein Kontrollansatz mit Vektor, aber ohne Zugabe des Inserts verwendet. Anschließend wurden 5 µL des Ligationsansatzes in kompetente Bakterien transformiert.

3.2.4.10 Transformation

Für die Transformation wurden 50 µL kompetente Bakterien auf Eis aufgetaut. Anschließend wurden 50 ng Plasmid-DNA hinzugegeben und der Ansatz für 30 min auf Eis inkubiert. Nach dem Hitzeschock für 2 min bei 37 °C wurden die Bakterien für 2 min auf Eis abgekühlt und dann zur Regeneration zusammen mit 250 µL LB-Medium bei 650 rpm und 37 °C für 10 min auf dem Thermomixer geschüttelt. Der gesamte Transformationsansatz wurde auf eine antibiotikumhaltige Agarplatte ausplattiert und für 12-16 h bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

3.2.4.11 Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli* (Mini/ Midipräparation)

Die Isolation von Plasmid-DNA erfolgte mit Hilfe des „PureLink™ HiPure Plasmid Midiprep Kits“ von „invitrogen“ oder des „peqGOLD Plasmid Miniprep Kit I“ von „peqlab“. Beide Kits wurden entsprechend der Herstellerangaben angewendet.

3.2.4.12 Sequenzierung

Die Sequenzierung der Proben wurde von der Firma „Eurofins MWG Operon“ durchgeführt.

3.2.4.13 Mikroarray-Analyse

Die Genexpression von CD4⁺ T-Zellen nach 6 h IL-7 (10 ng/mL) Stimulation bzw. von unstimulierten CD4⁺ T-Zellen wurde mittels eines Mikroarrays analysiert. Dazu wurden die PBMCs von RR-MS- und CIS-Patienten im Alter zwischen 22 und 41 Jahren aus Vollblut (siehe: 3.2.2.1) isoliert und die CD4⁺ T-Zellen angereichert (siehe: 3.2.2.5). Diese wurden auf eine 96 Well-Platte in X-VIVO Medium ausgesät und wie bereits oben erwähnt für 6 h stimuliert oder unstimuliert gelassen. Anschließend wurden die

Material und Methoden

Zellen geerntet und einmal mit PBS gewaschen (350 g, 5 min, 4°C). Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet in Flüssigstickstoff schockgefrostet.

Die Isolierung der RNA sowie der Mikroarray (Affymetrix GeneChip® Human 1.0 ST Array) wurden vom Transkriptomanalyselabor der Universität Göttingen durchgeführt. Die Mikroarray-Daten wurden mit Hilfe von Dr. Christian Schulze ausgewertet.

4 Ergebnisse

4.1 Zusammensetzung der „Hamburger Kohorte“

Für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente wurden Proben von 484 MS-Patienten (Durchschnittsalter 45 Jahre; 70,2% weiblich) und 310 HDs (Durchschnittsalter 37 Jahre; 50% weiblich) aus Hamburg (Hamburger Kohorte) mit kaukasischer Abstammung verwendet (Tabelle 32). Alle MS-Patienten hatten eine nach McDonald-Kriterien (13) diagnostizierte MS. Die Bestimmung des Beeinträchtigungsgrads der MS-Patienten erfolgte anhand des EDSS (17). Im Durchschnitt wiesen die MS-Patienten der Hamburger Kohorte einen EDSS von 3,3 auf. Bis auf die Genotypisierung wurde für alle Experimente Material von therapienaiven Patienten verwendet.

Tabelle 32. Zusammensetzung der Hamburger Kohorte

	Anzahl	Alter (Jahre)	Frauen (%)	EDSS
MS gesamt	484	45,4	70,2	3,3
CIS	8	39	87,5	-
RR-MS	288	41,4	76,4	3,1
SP-MS	102	49,5	72,6	3,6
PP-MS	86	53,2	64	3,4
HD	310	36,5	50	-

4.2 Genotypisierung der Hamburger Kohorte

In dieser Arbeit wurde der Einfluss unterschiedlicher IL-7RA Haplotypen auf die Pathogenese und Ätiologie der MS untersucht. Für die Durchführung funktioneller Studien war es notwendig die MS-Patienten mit den entsprechenden Haplotypen innerhalb der Hamburger MS-Patienten ausfindig zu machen. Daher wurden die MS-Patienten und HDs der Hamburger Kohorte auf die vier von Gregory und Kollegen (56) verwendeten SNPs rs1494555, rs6897932, rs987107 und rs987106 genotypisiert und entsprechend ihrer Haplotypen gruppiert (Abbildung 5). Die Mehrzahl der bisherigen Studien deutet darauf hin, dass sich die Haplotypen aufgrund des SNPs rs6897932 unterscheiden. Für diesen SNP tragen alle Haplotypen außer dem protektiven Haplotypen ein C Allel.

Ergebnisse

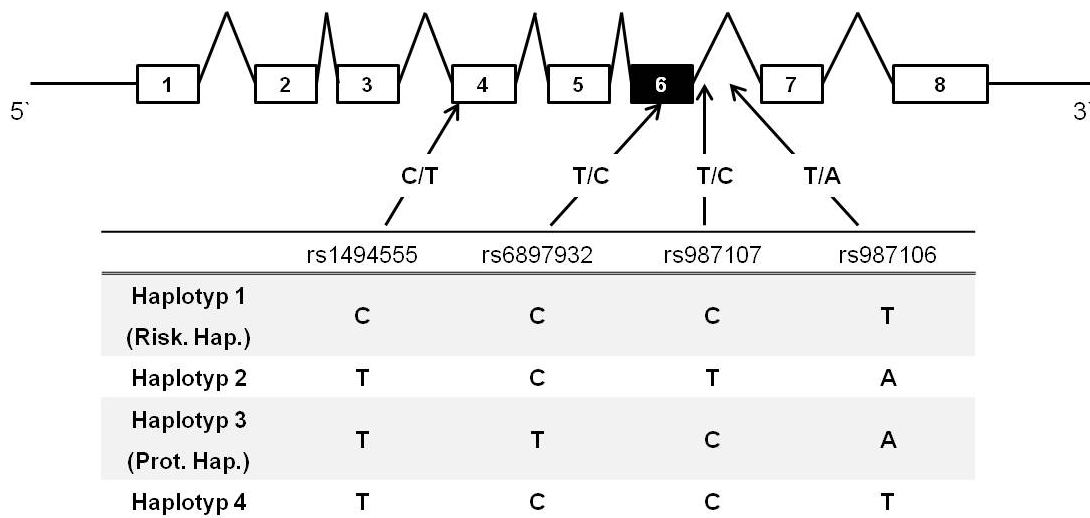


Abbildung 5. Schematische Darstellung der genomischen DNA-Sequenz des IL-7RA und der Position der SNPs sowie der durch sie beschriebenen vier häufigen Haplotypen (Risk. Hap.= Risikohaplotyp; Prot. Hap.= protektiver Haplotyp)

Die Analyse des Hardy-Weinberg Gleichgewichts (HWE) der vier SNPs erfolgte mit Hilfe von HaploView. Weder die Genotypfrequenzen der HDs noch die der MS-Patienten verletzen das HWE ($p > 0,01$) (Tabelle 33). Daher mussten keine SNPs von der Auswertung ausgeschlossen werden. Zum Vergleich der Genotypverteilung wurde der Cochran-Armitage Test (PLINK) verwendet. Dabei werden nicht die einzelnen Allele sondern die Individuen verglichen. Es zeigte sich, dass das dominante Modell (vergleicht Individuen: homozygot major Allel gegen homozygot minor Allel + heterozygot) am besten zu den erhobenen Daten passte. MS-Patienten die homozygot für das „C“ Allel des SNP rs6897932 sind haben demnach ein höheres Risiko an MS zu erkranken (p -Wert=0,028; OR=1,38). Die p -Werte und Quotenverhältnisse (Odds ratio; OR) der anderen SNPs zeigten keine Signifikanz und sind in Tabelle 34 aufgeführt. Für die Allelverteilung konnten bei keinem der SNPs signifikante p -Werte ($p < 0,05$) erzielt werden (Tabelle 35).

Die Analyse der Haplotypen wurde unter Verwendung von HaploView durchgeführt (Tabelle 36). Es traten in der Hamburger Kohorte vier häufige Haplotypen auf. Für keinen der Haplotypen konnte jedoch eine Assoziation mit MS gezeigt werden. Lediglich der Haplotyp 2 zeigte mit einem p -Wert von 0,0883 eine leichte Tendenz. Hervorzuheben ist jedoch, dass die gefundenen Haplotypfrequenzen mit denen von Gregory und Kollegen übereinstimmen (56).

Ergebnisse

Tabelle 33. IL-7RA SNPs. Die angegebenen Werte für MAF (Minor Allele Frequency) und den HWE p-Wert (Hardy–Weinberg equilibrium p-value) wurden mit Hilfe von HaploView erstellt.

SNP	Position	Minor/Major Allel	MAF	HWE p-Wert
rs1494555	35906947	C/T	0,3445	0,314
rs6897932	35910332	T/C	0,2487	0,6348
rs987107	35910984	T/C	0,2821	0,5479
rs987106	35911350	T/A	0,4679	0,162

Tabelle 34. Genotypverteilung in 484 MS-Patienten und 310 HDs aus der Hamburger Kohorte. Die p-Werte wurden durch den Cochran-Armitage Test unter Verwendung von PLINK ermittelt. Die signifikanten p-Werte sind dick hervorgehoben.

SNP	Genotyp	Anzahl in MS-Patienten	Anzahl in HDs	Frequenz in MS-Patienten	Frequenz in HDs	p-Wert	OR
rs1494555	C/C	58	43	0,12	0,14		
	C/T	220	125	0,45	0,4		
	T/T	206	142	0,43	0,46	0,38	0,88
rs6897932	T/T	36	16	0,07	0,05		
	C/T	158	133	0,33	0,43		
	C/C	290	161	0,6	0,52	0,028	1,38
rs987107	T/T	48	19	0,1	0,06		
	C/T	192	122	0,4	0,39		
	C/C	244	169	0,5	0,55	0,275	0,85
rs987106	T/T	114	70	0,24	0,23		
	A/T	220	155	0,45	0,5		
	A/A	150	85	0,31	0,27	0,301	1,19

Tabelle 35. Allelverteilung in 484 MS-Patienten und 310 HDs aus der Hamburger Kohorte.

SNP	Allel	Anzahl in MS-Patienten	Anzahl in HDs	Frequenz in MS-Patienten	Frequenz in HDs	Chi Quadrat	p-Wert	OR
rs1494555	C	336	211	0,35	0,34	0,077	0,78	1,03
	T	632	409	0,65	0,66			
rs6897932	T	230	165	0,24	0,27			
	C	738	455	0,76	0,73	1,646	0,20	1,16
rs987107	T	288	160	0,30	0,26	2,905	0,09	1,22
	C	680	460	0,70	0,74			
rs987106	T	448	295	0,46	0,48			
	A	520	325	0,54	0,52	0,256	0,61	1,05

Tabelle 36. Haplotypverteilung in 484 MS-Patienten und 310 HDs aus der Hamburger Kohorte

Haplotyp	Frequenz	MS; HD Anzahl	MS; HD Frequenz	Chi Quadrat	p-Wert	
Haplotyp 1 (risk. Hap.)	CCCT	0,344	336 : 632; 211 : 409	0,347; 0,340	0,077	0,7813
Haplotyp 2	TCTA	0,282	288 : 680; 160 : 460	0,298; 0,258	2,905	0,0883
Haplotyp 3 (prot. Hap.)	TTCA	0,249	230 : 738; 165 : 455	0,238; 0,266	1,646	0,1995
Haplotyp 4	TCCT	0,123	112 : 856; 84 : 536	0,116; 0,135	1,367	0,2423

Ergebnisse

4.3 Phänotypische Charakterisierung der unterschiedlichen IL-7RA Haplotypen

4.3.1 Es gibt haplotypabhängige, aber nicht signifikante Unterschiede in der Oberflächenexpression des IL-7RA

Der IL-7RA kommt in einer membranständigen und einer löslichen Isoform vor. Neue Publikationen zeigen, dass der protektive bzw. risikobehaftete IL-7RA Haplotyp einen Einfluss auf das Spliceverhalten und auf das Verhältnis von membranständiger zu löslicher IL-7RA kodierender mRNA hat (56, 133). Um zu untersuchen, ob sich die IL-7RA Haplotypen auch auf die Oberflächenexpression des IL-7RA auswirken, wurde die Oberflächenexpression des IL-7RA auf unterschiedlichen Zellen des Immunsystems untersucht. Dazu wurden eingefrorene PBMCs von MS-Patienten die homozygot für den jeweiligen Haplotypen waren sowie von heterozygoten HDs verwendet. Nach dem Auftauen wurden diese mit den entsprechenden Antikörpern gefärbt und anschließend im Durchflusszytometer analysiert. Die Oberflächenexpression des IL-7RA wurde durch Messen der MedFl (Median Fluoreszenzintensität) ermittelt.

4.3.1.1 Messung der IL-7RA Oberflächenexpression auf CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen

CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten spielen eine Schlüsselrolle in der Pathogenese der MS. Um den Einfluss des protektiven bzw. Risikohaplotypen auf die Oberflächenexpression des IL-7RA auf unterschiedlichen Subgruppen von CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten zu untersuchen, wurden diese mit Hilfe der Oberflächenmarker CD4, CD8, CD27 und CD45RO erst in CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten und dann weiter in naive- (CD27⁺, CD45RO⁻), Gedächtniszellen (CD27⁺; CD45RO⁺) sowie T-Effektorzellen (CD27⁻, CD45RO⁻) unterteilt (Abbildung 6 A). Erwartungsgemäß wurde der IL-7RA vor allem von naiven und Gedächtnis CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen und nur in geringem Maße von T-Effektorzellen exprimiert. Da die geringe Anzahl der T-Effektorzellen zudem keine exakte Auswertung der IL-7RA Oberflächenexpression ermöglichte, wurde diese Zellpopulation in der Auswertung nicht berücksichtigt. Die Analyse der CD8⁺ und CD4⁺ Subpopulationen zeigte keine signifikanten haplotypabhängigen Unterschiede in der Oberflächenexpression des IL-7RA (Abbildung 6 B-G). Jedoch war der IL-7RA sowohl auf CD4⁺ als auch auf CD8⁺ T-Lymphozyten von Trägern des protektiven Haplotypen geringfügig stärker exprimiert als auf denen von MS-Patienten des Risikohaplotypen (Abbildung 6 B & E).

Ergebnisse

4.3.1.2 Analyse der IL-7RA Oberflächenexpression auf Tregs

Für die Charakterisierung der IL-7RA Oberflächenexpression auf regulatorischen T-Zellen (Treg) wurden zuerst die Lymphozyten über den „Forward Scatter“ (FSC) und „Sideward Scatter“ (SSC) identifiziert. Anschließend folgte die Auftrennung der Lymphozytenpopulation über CD3 und CD4. Die CD4⁺ T-Lymphozyten (CD4⁺ und CD3⁺) wurden auf Basis der CD25 und FoxP3 Expression in Tregs (CD25^{high}, FoxP3⁺) und nicht-Tregs (CD25^{low}, FoxP3⁻) unterteilt (Abbildung 7 A).

Der Vergleich der IL-7RA Expression auf Tregs und nicht-Tregs zeigt deutlich, dass Tregs nur geringe Mengen IL-7RA auf ihrer Oberfläche exprimieren (Abbildung 7 B-C). Auch auf Tregs wies die IL-7RA Expression bei MS-Patienten keine signifikanten, haplotypabhängigen Unterschiede auf. Jedoch wiesen auch hier die Tregs von Trägern des protektiven Haplotypen eine etwas höhere IL-7RA Expression auf, als die Tregs von Trägern des Risikohaplotypen. Interessanterweise war dieser Effekt auf nicht-Tregs genau entgegengesetzt. Hier wiesen Träger des protektiven Haplotypen eine geringfügig geringere Expression des IL-7RA auf als Träger des Risikohaplotypen.

Bemerkenswert ist auch, dass die IL-7RA Oberflächenexpression sowohl auf Tregs als auch auf nicht-Tregs von HDs gegenüber der von MS-Patienten signifikant reduziert war.

4.3.1.3 Quantifizierung der IL-7RA Oberflächenexpression auf NK-Zellen

Es ist bekannt, dass MS-Patienten weniger NK-Zellen besitzen als gesunde Personen (134). Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Einfluss des IL-7RA Haplotypen auf die Expression des IL-7RA auf NK-Zellen untersucht. Dazu wurden die NK-Zellen mit Hilfe des Durchflusszytometers in CD56 bright (CD16⁻, CD56^{bright}) und CD56 dim (CD16⁺ CD56^{dim}) NK-Zellen aufgetrennt (Abbildung 8 A). Es zeigte sich, dass nur die CD56 bright NK-Zellen den IL-7RA exprimierten, wohingegen auf den CD56 dim NK-Zellen nahezu kein IL-7RA nachweisbar war (Abbildung 8 B-C). Interessanterweise wiesen die CD56 bright Zellen von Trägern des protektiven Haplotypen eine erhöhte Expression des IL-7RA auf, wohingegen die von heterozygoten HDs und MS-Patienten des Risikohaplotypen nahezu gleich war (Abbildung 8 B). Allerdings waren auch hier die Unterschiede nicht signifikant.

Ergebnisse

4.3.1.4 Bestimmung der IL-7RA Oberflächenexpression auf dendritischen Zellen

Dendritische Zellen (DC) wurden aufgrund der spezifischen Oberflächenmarker CD1c, CD141 und CD303 in myeloide DCs (CD1c⁺ oder CD141⁺) und plasmazytoide DCs (CD303⁺) unterteilt. Zuvor wurden jedoch die B-Zellen und Monozyten über CD14 und CD19 ausgegrenzt („ausgegatet“) (Abbildung 9 A). Um zu überprüfen, ob die IL-7RA Oberflächenexpression auf DCs vom IL-7RA Haplotypen beeinflusst wird und ob sie mit der Expression des HLA-DR, -DP, -DQ korreliert, wurde sowohl die IL-7RA als auch die HLA-DR, -DP, -DQ Expression auf den drei DC-Populationen bestimmt.

Haplotypunabhängig wiesen die myeloiden DCs eine deutlich höhere IL-7RA als auch HLA-DR, -DP, -DQ Oberflächenexpression auf als die plasmazytoiden DCs (Abbildung 9 B & C). Beim Vergleich der IL-7RA Expression zwischen den Haplotypen war bei den CD141⁺ myeloiden DCs als auch bei den plasmazytoiden DCs wieder das Muster zu erkennen, dass die Zellen von Trägern des protektiven Haplotypen eine höhere IL-7RA Expression aufweisen als die von Trägern des risikobehafteten Haplotypen (Abbildung 9 B). Bei CD1c myeloiden Zellen war diese Tendenz jedoch nicht ersichtlich.

Interessanterweise besteht eine positive Korrelation zwischen der IL-7RA und der HLA-DR, -DP, -DQ Oberflächenexpression (Abbildung 10). So wiesen CD1c⁺ myeloide sowie plasmazytoide DCs von Trägern des Risikohaplotypen und CD141⁺ myeloide und plasmazytoide DCs von MS-Patienten des protektiven Haplotypen mit zunehmender IL-7RA Oberflächenexpression auch eine erhöhte Oberflächenexpression des HLA-DR, -DP, -DQ auf.

Ergebnisse

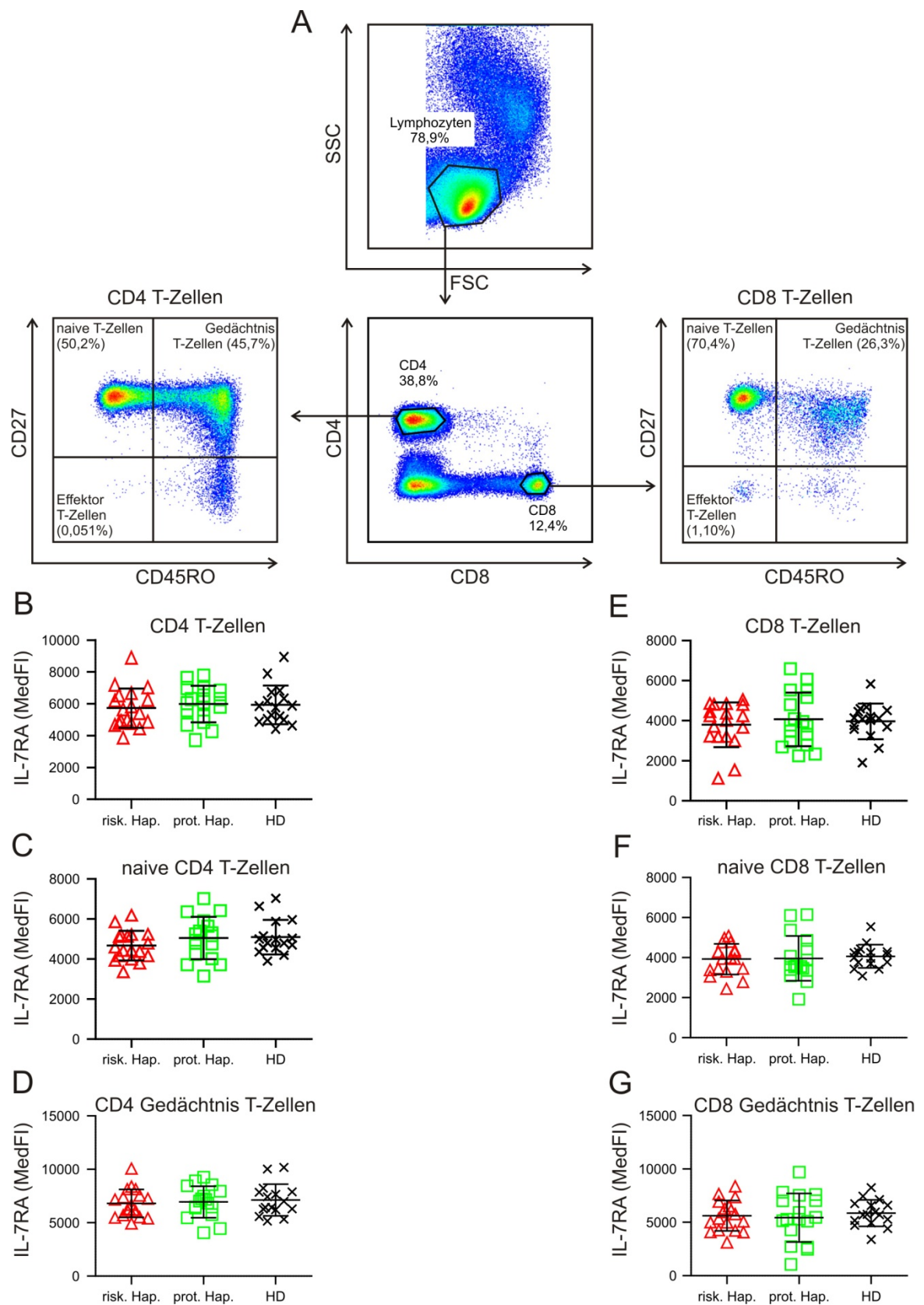


Abbildung 6. Expression des IL-7RA auf CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen. (A) Exemplarische Darstellung der Gatingstrategie. Die IL-7RA Oberflächenexpression wurde auf aufgetauten PBMCs mit Hilfe des Durchflusszytometers analysiert. Die unterschiedlichen CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen Subgruppen wurden durch eine sequenzielle Gatingstrategie identifiziert. Dabei wurden die Zellen in naive (CD27⁺, CD45RO⁻) sowie Gedächtnis (CD27⁺; CD45RO⁺) CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen unterteilt. (B-G) Mediane

Ergebnisse

Fluoreszenzintensität (MedFI) des IL-7RA auf CD4⁺ und CD8⁺ sowie Naiven- und Gedächtniszellen von homozygoten MS-Patienten des Risikohaplotypen (n=18) und des protektiven Haplotypen (n=17) sowie heterozygoten HDs (n=16).

Ergebnisse

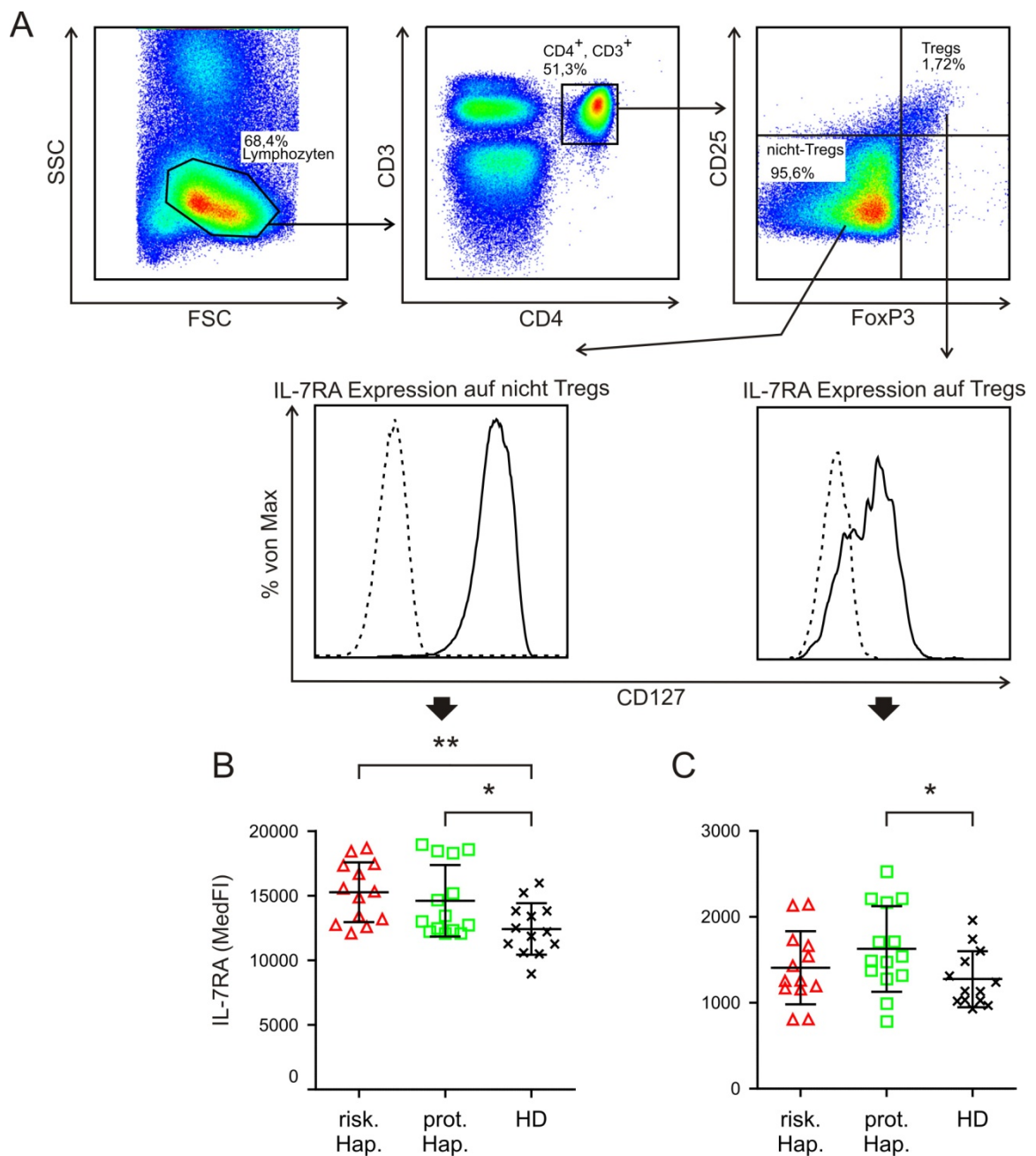


Abbildung 7. Expression des IL-7RA auf Tregs und nicht-Tregs. (A) Die IL-7RA Oberflächenexpression wurde auf aufgetauten PBMCs mit Hilfe des Durchflusszytometers analysiert. Tregs ($CD3^+$, $CD4^+$, $CD25^{\text{high}}$, $FoxP3^+$) und nicht-Tregs ($CD3^+$, $CD4^+$, $CD25^{\text{low}}$, $FoxP3^-$) wurden durch eine sequenzielle Gatingstrategie identifiziert. Die Histogramme zeigen eine repräsentative Färbung (gepunktete Linie: Kontrollfärbung; schwarze Linie: CD127 Expression). (B-C) Mediane Fluoreszenzintensität (MedFI) des IL-7RA auf Tregs und nicht-Tregs von homozygoten MS-Patienten des Risikohaplotypen ($n=13$) und des protektiven Haplotypen ($n=14$) sowie heterozygoten HDs ($n=13$). Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwert \pm s.d.; ** $p < 0,005$ und * $p < 0,05$; Student t-Test.

Ergebnisse

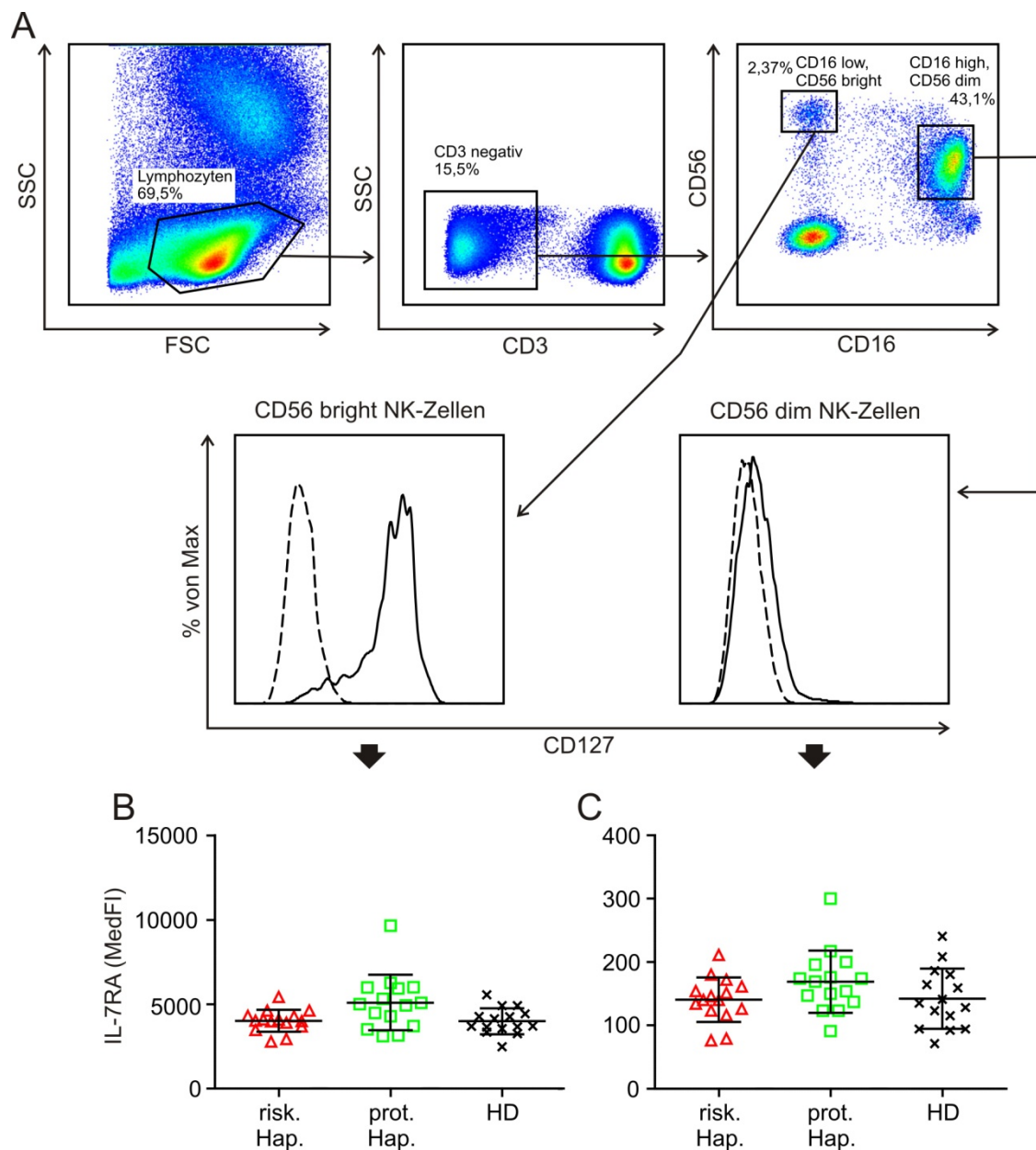


Abbildung 8. Expression des IL-7RA auf NK-Zellen. (A) Die IL-7RA Oberflächenexpression wurde auf aufgetauten PBMCs mit Hilfe des Durchflusszytometers analysiert. Die unterschiedlichen NK-Zellen Subgruppen wurden durch eine sequenzielle Gatingstrategie identifiziert. Dabei wurden die NK-Zellen in CD56 bright NK-Zellen (CD16⁻ und CD56^{bright}) und CD56 dim NK-Zellen (CD16⁺ und CD56^{dim}) unterteilt. Die Histogramme zeigen eine repräsentative Färbung (gepunktete Linie: Kontrollfärbung; schwarze Linie: CD127 Expression). (B-C) Mediane Fluoreszenzintensität (MedFI) des IL-7RA auf CD56 bright und CD56 dim NK-Zellen von homozygoten MS-Patienten des Risikohaplotypen (n=15) und des protektiven Haplotypen (n=15) sowie heterozygoten HDs (n=15).

Ergebnisse

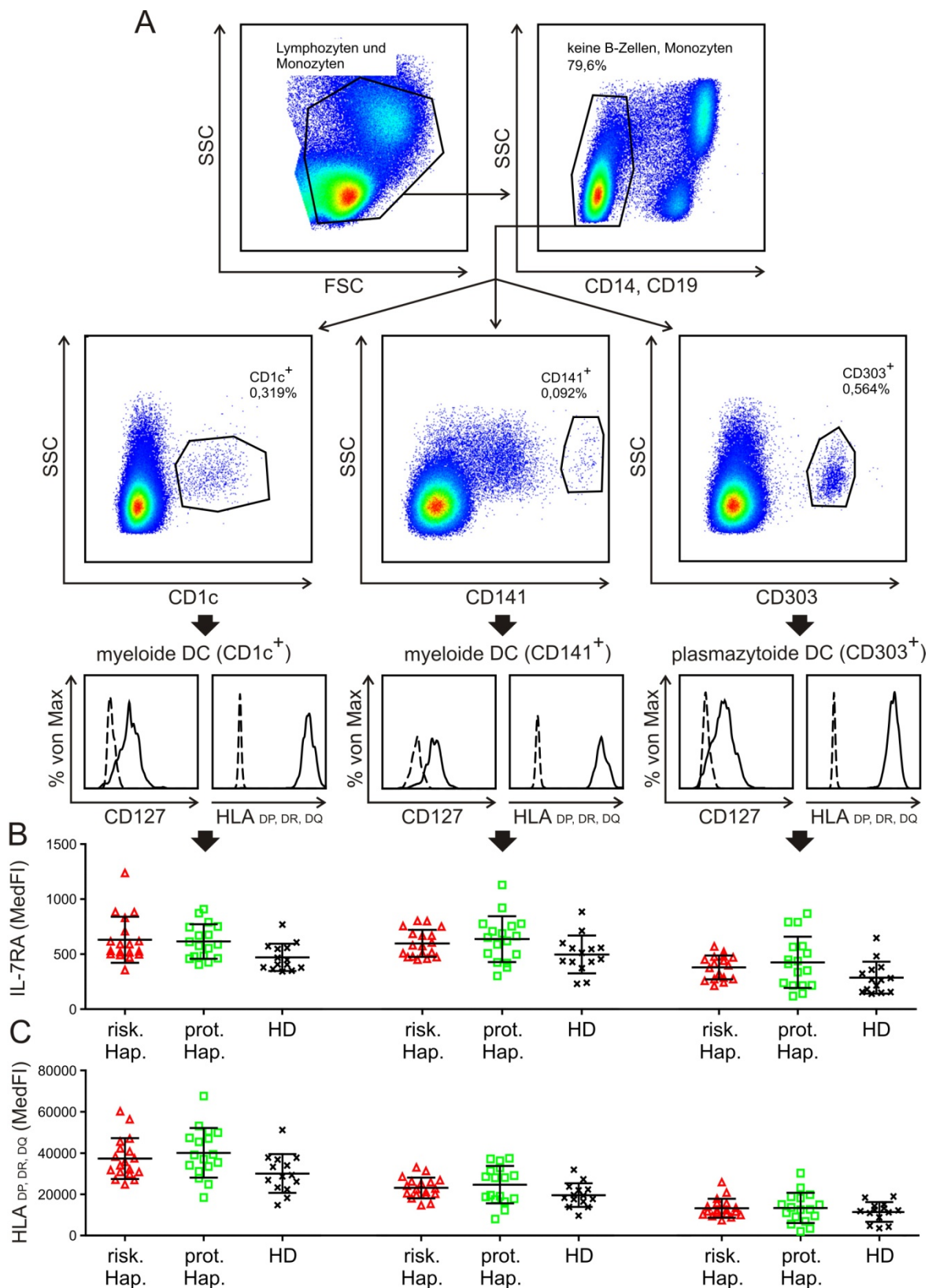


Abbildung 9. Expression des IL-7RA sowie des HLA-DR, -DP, -DQ auf DCs. (A) Exemplarische Darstellung der Gatingstrategie. Die IL-7RA sowie HLA-DR, -DP, -DQ Oberflächenexpression wurde auf aufgetauten PBMCs mit Hilfe des Durchflusszytometers analysiert. Die unterschiedlichen DC Subpopulationen wurden durch eine sequenzielle Gatingstrategie identifiziert. Dabei wurden die DCs in myeloide DCs (CD14⁺, CD19⁻, CD1c⁺ oder CD141⁺) und plasmazytoide DCs (CD14⁺, CD19⁻, CD303⁺) unterteilt. Die Histogramme zeigen eine repräsentative Färbung (gepunktete Linie: Kontrollfärbung;

Ergebnisse

schwarze Linie: CD127 bzw. HLA-DR, -DP, -DQ Expression). (B-C) Mediane Fluoreszenzintensität (MedFI) des IL-7RA und des HLA-DR, -DP, -DQ auf myeloiden sowie plasmazytoiden DCs von homozygoten MS-Patienten des Risikohaplotypen (n=18) und des protektiven Haplotypen (n=17) sowie heterozygoten HDs (n=14).

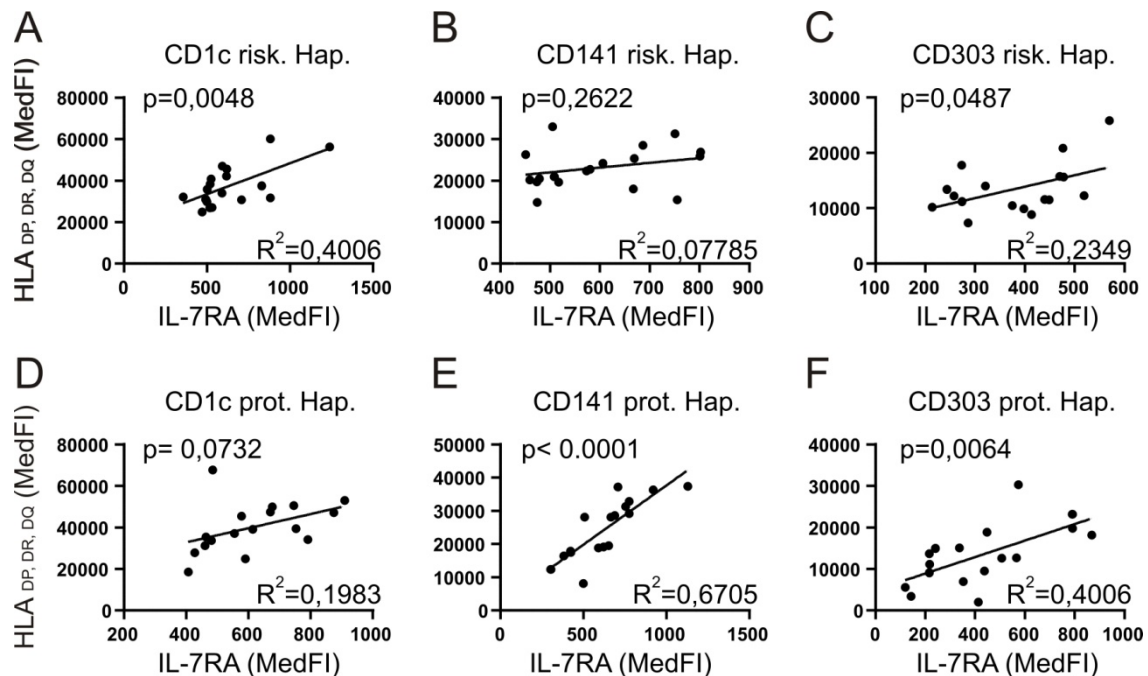


Abbildung 10 Korrelation zwischen IL-7RA und HLA-DR,-DP,-DQ Oberflächenexpression auf myeloiden und plasmazytoiden DCs. Die IL-7RA und HLA-DR, -DP, -DQ Oberflächenexpression wurde wie unter 4.3.1.4 beschrieben auf myeloiden und plasmazytoiden DCs von Trägern des Risikohaplotypen (risk. Hap.) und des protektiven Haplotypen (prot. Hap.) bestimmt. (A-F) Die Mediane Fluoreszenzintensität (MedFI) des HLA-DR, -DP, -DQ wurde gegen die MedFI des IL-7RA aufgetragen und einer Regressionsanalyse unterzogen.

4.3.2 Der Haplotyp korreliert mit der Menge an löslicher IL-7RA kodierender mRNA

Der australischen Gruppe um Stewart und Booth (133) gelang es, haplotypspezifische Unterschiede in der Genexpression des IL-7RA zu zeigen. Um zu überprüfen, ob diese Unterschiede auch in der Hamburger Kohorte wiedergefunden werden können, wurde die Genexpression der IL-7RA Isoformen H20 und H6 wie unter 3.2.4.4 beschrieben mit Hilfe spezifischer TaqMan Proben in allen vier Haplotypen untersucht.

Wie erwartet traten auch in der Hamburger Kohorte haplotypspezifische Unterschiede in der Genexpression des IL-7RA auf. Besonders deutlich wurden diese durch Bildung des Quotienten der relativen Genexpression der Isoform H20 (membranständig) zur relativen Genexpression der Isoform H6 (löslich) (Abbildung 11 A). Der protektive Haplotyp unterscheidet sich vom Risikohaplotypen sowie den Haplotypen 2 und 4 durch ein dreifach erhöhtes Verhältnis von membranständiger zu löslicher IL-7RA

Ergebnisse

kodierender mRNA ($p < 0,001$ bzw. $p < 0,05$). Wird die Genexpression der unterschiedlichen IL-7RA Isoformen in Bezug auf die gesamte IL-7RA mRNA Menge gesetzt, so wird deutlich sichtbar, dass Träger des Risikohaplotypen verglichen mit Trägern des protektiven Haplotypen eine dreifach erhöhte Expression des löslichen IL-7RA (Isoform H6) aufweisen (Abbildung 11 B). Auch die Genexpression der membranständigen Isoform H20 unterscheidet sich zwischen den Haplotypen. Wie schon bei der Analyse der Oberflächenexpression wiesen auch hier die Träger des protektiven Haplotypen eine leicht erhöhte Expression der Isoform H20 auf. Allerdings war diese nicht signifikant.

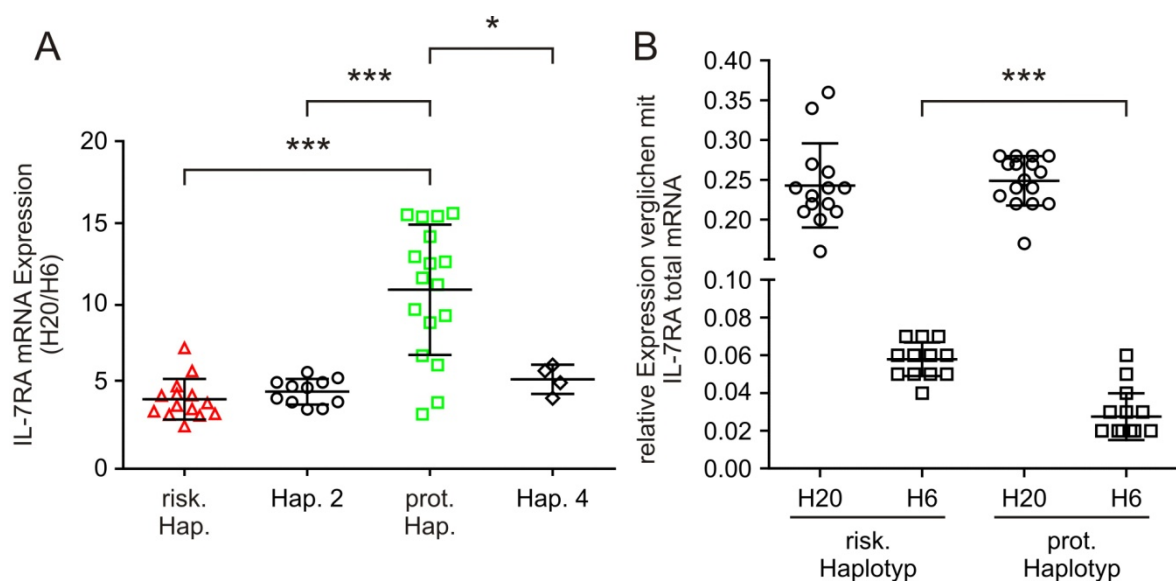


Abbildung 11. Einfluss der IL-7RA Haplotypen auf die Genexpression des IL-7RA. Die Genexpression der unterschiedlichen IL-7RA mRNA Isoformen (kodierend für H20 und H6) wurde in PBMCs von MS-Patienten mittels RT-PCR ermittelt. (A) Verhältnis der Genexpression von membranständiger (H20) zu löslicher (H6) IL-7RA kodierender mRNA. (B) Relative Genexpression der einzelnen IL-7RA Isoformen bezogen auf die gesamte IL-7RA kodierende mRNA Menge. Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwert \pm s.d.; *** $p < 0,001$ und * $p < 0,05$; Student t-Test.

4.3.3 Der IL-7RA Haplotyp bestimmt die Serumkonzentration des löslichen IL-7RA

Zur Bestätigung der IL-7RA Genexpressionsdaten auf Proteinebene wurde die Menge an IL-7RA im Serum von MS-Patienten bestimmt. Zur Messung der IL-7RA Konzentration im Serum wurde ein Sandwich ELISA etabliert, der dies ermöglicht.

Die Messung der IL-7RA Serumkonzentration bestätigte die haplotypspezifischen Unterschiede in der Genexpression des IL-7RA auf Proteinebene (Abbildung 12). Auch hier wiesen homozygote MS-Patienten des protektiven Haplotypen eine dreifach

Ergebnisse

geringere Konzentration an IL-7RA auf als Träger des Risikohaplotypen sowie des Haplotypen 2. Der Vergleich des protektiven Haplotypen mit dem Haplotypen 4 zeigte zwar, dass ein hoch signifikanter Unterschied in der IL-7RA Serumkonzentration vorhanden ist, dieser war jedoch geringer als zwischen den anderen Haplotypen.

Interessanterweise lag die Serumkonzentration des IL-7RA bei MS-Patienten, die heterozygot für den SNP rs6897932 waren, zwischen der von homozygoten MS-Patienten. Daher kann von einem „Allel-Dosis“ abhängigen Einfluss des SNPs auf die IL-7RA Konzentration im Serum gesprochen werden.

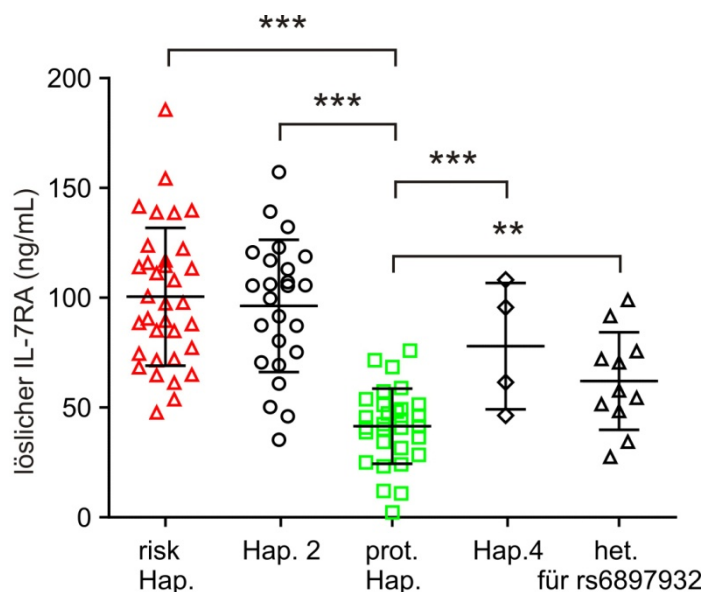


Abbildung 12. Haplotypabhängige Unterschiede in der Menge an löslichem IL-7RA im Serum von MS-Patienten. Die Menge an löslichem IL-7RA wurde mit einem neu etablierten Sandwich-ELISA im Serum von MS-Patienten gemessen. Die MS-Patienten waren entweder homozygot für Haplotyp 1-4 oder heterozygot für den SNP rs6897932. Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwert \pm s.d.; *** $p < 0,001$ und ** $p < 0,005$; Student t-Test.

4.3.4 Die IL-7 Konzentration korreliert nicht mit der des löslichen IL-7RA

Die Ergebnisse des löslichen IL-7RA ELISA zeigen eindeutig, dass MS-Patienten mit dem Risikohaplotypen erhöhte IL-7RA Serumkonzentrationen aufweisen. Um zu überprüfen, ob die IL-7RA Serumkonzentration mit der IL-7 Serumkonzentration korreliert, wurde die IL-7 Konzentration mittels eines Sandwich-ELISA bestimmt. Die IL-7 Serumkonzentration lag bei Trägern des protektiven und des Risikohaplotypen bei etwa 14 pg/mL (Abbildung 13 A). Die Auftragung der IL-7RA Konzentration gegen die IL-7 Konzentration zeigt deutlich, dass die IL-7RA und die IL-7 Serumkonzentration nicht korrelieren (Abbildung 13 B).

Ergebnisse

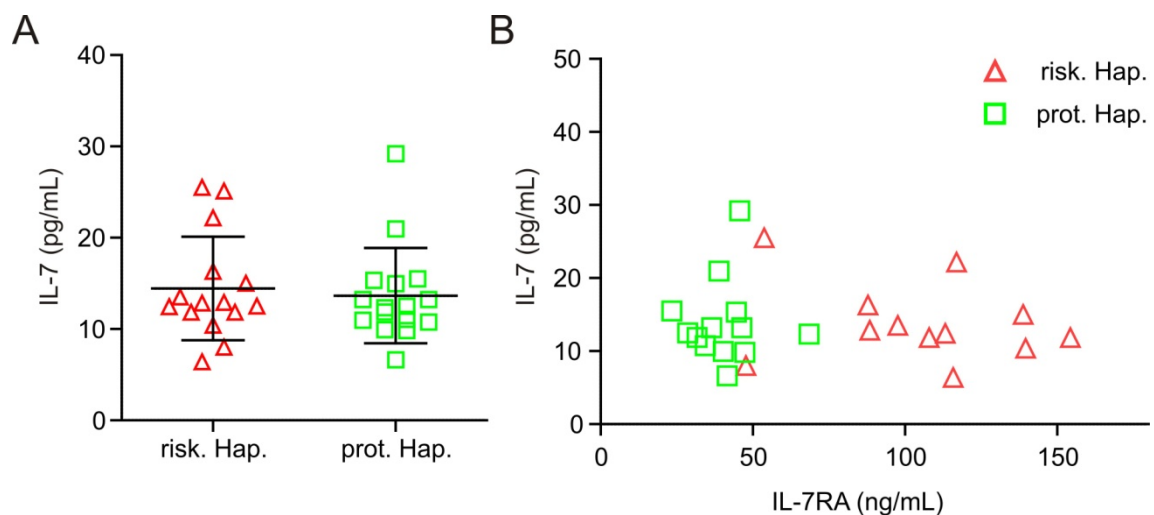


Abbildung 13. Bestimmung der IL-7 Konzentration im Serum von MS-Patienten des protektiven sowie des Risikohaplotypen. (A) Quantifizierung der IL-7 Serumkonzentration mittels eines Sandwich-ELISA. (B) Die IL-7 Konzentration wurde gegen die IL-7RA Konzentration aufgetragen.

4.3.5 Zusammenfassung der phänotypischen Charakterisierung

Die phänotypische Charakterisierung der IL-7RA Haplotypen zeigte, sowohl bei der Analyse der IL-7RA Oberflächenexpression als auch bei der Untersuchung der IL-7RA Genexpression und der IL-7RA Serumspiegel, deutliche, haplotypabhängige Unterschiede. Träger des Risikohaplotypen wiesen auf fast allen untersuchten Zelltypen eine leicht geringere IL-7RA Oberflächenexpression auf als Träger des protektiven Haplotypen (Tabelle 37). Dies ging bei Trägern des Risikohaplotypen mit einer dreifach erhöhten Gen- sowie Proteinexpression des löslichen IL-7RA einher.

Tabelle 37. Zusammenfassung der phänotypischen Charakterisierung des Risikohaplotypen sowie des protektiven Haplotypen. Unterschiede zwischen den Haplotypen sind durch Pfeile dargestellt (signifikante Unterschiede: \uparrow : hoch, \downarrow : niedrig; Tendenzen: $\hat{\uparrow}$: hoch, $\hat{\downarrow}$: niedrig).

	Untersuchter Aspekt	Risikohaplotyp	protektiver Haplotyp
IL-7RA Oberflächenexpression	CD4 T-Zellen	\downarrow	$\hat{\uparrow}$
	CD8 T-Zellen	\downarrow	$\hat{\uparrow}$
	Tregs	\downarrow	$\hat{\uparrow}$
	CD56 bright NK-Zellen	\downarrow	$\hat{\uparrow}$
	CD56 dim NK-Zellen	\downarrow	$\hat{\uparrow}$
	myeloide DCs (CD1c)	=	=
	myeloide DCs (CD141)	\downarrow	$\hat{\uparrow}$

Ergebnisse

Untersuchter Aspekt	Risikohaplotyp	protektiver Haplotyp	
IL-7RA Genexpression	plasmazytoide DCs (CD303)	↓	↑
	membranebundener IL-7RA	↓	↑
	löslicher IL-7RA	↑	↓
Serumspiegel	IL-7RA	↑	↓
	IL-7	=	=

4.4 Analyse der funktionellen Relevanz des löslichen IL-7RA

Bei der phänotypischen Charakterisierung der Haplotypen wurde in dieser Arbeit ein Unterschied in der Menge an löslichem IL-7RA zwischen dem protektiven Haplotypen und den restlichen Haplotypen gefunden. Hohe Konzentrationen an löslichem IL-7RA könnten mit dem membranständigen IL-7RA um das vorhandene IL-7 konkurrieren und so die Wirkung des IL-7 auf die Homeostase von Lymphozyten verringern. Im folgenden Abschnitt wurde der Einfluss des löslichen IL-7RA auf die Signalkaskade des IL-7R sowie auf die Proliferation untersucht.

4.4.1 Der lösliche IL-7RA verringert in CD4⁺ T-Zellen die IL-7-vermittelte Phosphorylierung von STAT5

Die Signalkaskade des IL-7R läuft (wie in 1.2.1 beschrieben) unter anderem über den JAK/STAT-Signalweg ab. Zur Untersuchung eines möglichen inhibitorischen Effektes des löslichen IL-7RA auf die Signalkaskade des IL-7R wurde die STAT5 Phosphorylierung in CD4⁺ T-Zellen analysiert.

4.4.1.1 Bereits bei 10 pg/mL IL-7 ist eine deutliche STAT5 Phosphorylierung erkennbar

Um die IL-7 Konzentration zu finden, die nötig ist, um mit einer möglichst niedrigen IL-7 Konzentration eine möglichst starke STAT5 Phosphorylierung zu erzielen wurden unterschiedliche IL-7 Konzentrationen (1-1000 pg/mL) austitriert (Abbildung 14). Dabei

Ergebnisse

stellte sich heraus, dass eine Konzentration von 10 pg/mL IL-7 ausreicht, um eine gut nachweisbare STAT5 Phosphorylierung hervorzurufen.

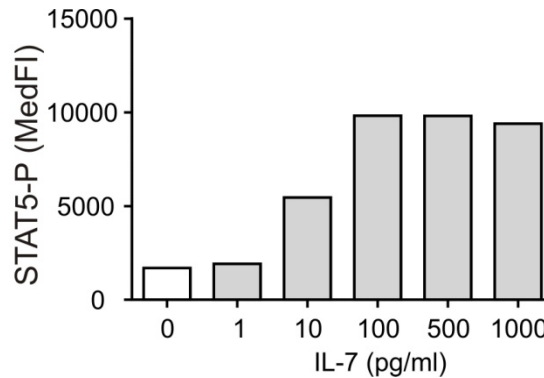


Abbildung 14. Titration der IL-7 Konzentration anhand der STAT5 Phosphorylierung. CD4⁺ T-Zellen wurden für 15 min mit IL-7 stimuliert und anschließend im Durchflusszytometer die STAT5 Phosphorylierung analysiert. Steigende Konzentrationen an IL-7 (1-1000 pg/mL) führten zu einer erhöhten STAT5 Phosphorylierung.

4.4.1.2 Ein gegen IL-7 gerichteter Antikörper verringert die IL-7-vermittelte Phosphorylierung von STAT5

Um zu überprüfen, ob die Neutralisation von IL-7 eine verringerte STAT5 Phosphorylierung zur Folge hat, wurden CD4⁺ T-Zellen in Gegenwart von 10 µg/mL Anti-IL-7 Antikörper für 15 min mit unterschiedlichen Konzentrationen IL-7 (10-1000 pg/mL) stimuliert und anschließend die STAT5 Phosphorylierung durchflusszytometrisch quantifiziert (Abbildung 15). Bei den mit 1000 pg/mL IL-7 stimulierten CD4⁺ T-Zellen war zwischen den zwei Konditionen (mit bzw. ohne Anti-IL-7 Antikörper) nur ein geringer Unterschied in der STAT5 Phosphorylierung zu erkennen (Abbildung 15 A und D). Demgegenüber wiesen die mit 100 pg/mL IL-7 stimulierten CD4⁺ T-Zellen in Gegenwart von Anti-IL-7 Antikörper eine um 77% ($p < 0,005$) reduzierte STAT5 Phosphorylierung auf (Abbildung 15 B und D). Der stärkste Rückgang der STAT5 Phosphorylierung wurde in Gegenwart von Anti-IL-7 Antikörper bei einer Stimulation mit 10 pg/mL IL-7 erreicht (Mittelwert der Reduktion der STAT5-P: 93%; $p < 0,005$). Die Ergebnisse dieses Experiments zeigen, dass die Reduktion der STAT5 Phosphorylierung von dem Konzentrationsunterschied zwischen IL-7 und Anti-IL-7 Antikörper abhängt.

Ergebnisse

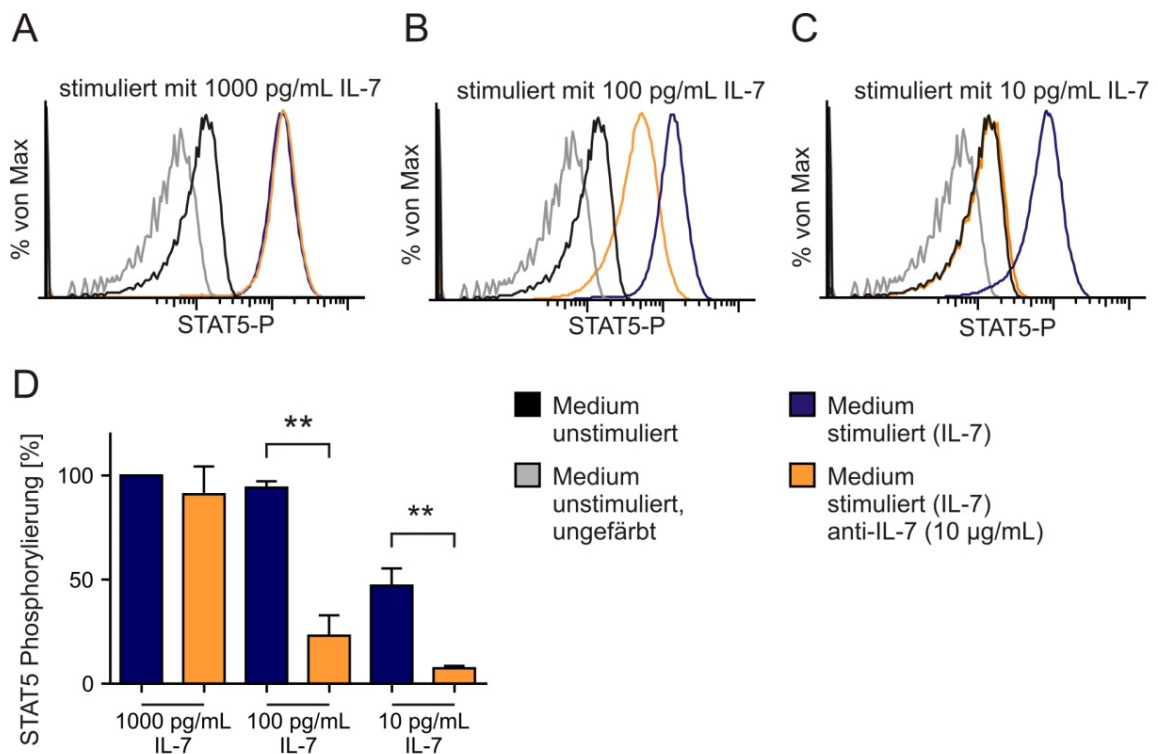


Abbildung 15. Reduktion der STAT5 Phosphorylierung in Abhängigkeit von der IL-7 und Anti-IL-7 Antikörper Konzentration. CD4⁺ T-Lymphozyten wurden für 15 min mit unterschiedlichen IL-7 Konzentrationen (10-1000 pg/ml) stimuliert und die STAT5 Phosphorylierung anschließend im Durchflusszytometer analysiert. (A-C) Repräsentative Histogramme der STAT5 Phosphorylierung in CD4⁺ T-Lymphozyten. Die Zellen wurden vor der Stimulation mit IL-7 für 2 h in Medium (blaue Linie) oder in Medium mit 10 µg/mL Anti-IL-7 Antikörper (gelbe Linie) vorinkubiert. (D) Zusammenfassung der Ergebnisse, dargestellt als Mittelwert der Phosphorylierung in % ± s.d.; **p < 0,005; Student t-Test (n=3).

4.4.1.3 Rekombinanter IL-7RA verringert die IL-7-vermittelte STAT5 Phosphorylierung

Die lösliche Isoform des IL-7RA ist kommerziell nicht verfügbar. Zur Überprüfung der Hypothese, dass der lösliche IL-7RA die IL-7-vermittelte Phosphorylierung von STAT5 verringert, wurde daher rekombinanter IL-7RA (Isoform H20) verwendet. Zu diesem Zweck wurden die Zellen für 2 h mit verschiedenen Konzentrationen an rekombinantem IL-7RA (500-5000 ng/mL; R&D; 306-IR) vorinkubiert, dann für 15 min mit IL-7 (10-1000 pg/mL) stimuliert und anschließend im Durchflusszytometer analysiert. Nur mit niedrigen IL-7 Konzentrationen (10 pg/mL) und sehr hohen IL-7RA Konzentrationen (5 µg/mL) konnte die STAT5 Phosphorylierung um 11% reduziert werden (Abbildung 16).

Da es mit kommerziell erhältlichem, membranständigen IL-7RA, nur unzureichend gelang eine Reduktion der IL-7-vermittelten STAT5 Phosphorylierung zu zeigen, wurde der lösliche IL-7RA aus humaner cDNA kloniert und in HEK 293 Zellen exprimiert.

Ergebnisse

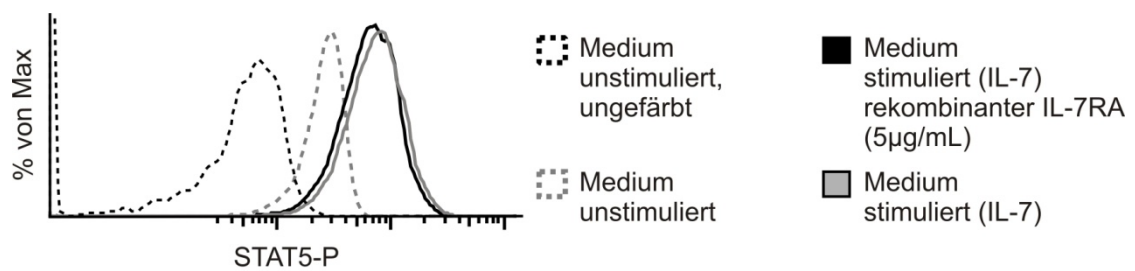


Abbildung 16. Reduktion der IL-7-vermittelten STAT5 Phosphorylierung durch rekombinanten IL-7RA. $CD4^+$ T-Lymphozyten wurden für 15 min mit IL-7 (10 µg/mL) stimuliert und die STAT5 Phosphorylierung anschließend im Durchflusszytometer analysiert. Die Zellen wurden vor der Stimulation mit IL-7 für 2 h in Medium (graue Linie) oder in Medium mit 5 µg/mL rekombinantem IL-7RA (schwarze Linie) vorinkubiert.

4.4.1.4 Klonierung der cDNA des löslichen IL-7RA und Überexpression in HEK 293 Zellen

Es gibt verschiedene Isoformen des IL-7RA. Die den löslichen IL-7RA (Isoform H6) kodierende mRNA wird in einem deutlich geringeren Maße exprimiert als die den membranständigen IL-7RA (H20) kodierende mRNA. Daher wurde in dieser Arbeit die cDNA Sequenz des löslichen IL-7RA (GenBank: AK301220.1) artifiziell nachgebildet. Dazu wurde aus PBMCs gewonnene mRNA in cDNA umgeschrieben und aus dieser zwei DNA Fragmente, die Teile des IL-7RA kodieren, amplifiziert. Eines dieser DNA-Fragmente kodierte den Bereich von Exon 1 bis Exon 5, das andere DNA-Fragment kodierte den Bereich von Exon 7 bis Exon 8 (Abbildung 17). Mit Hilfe weiterer PCR-Reaktionen wurden die zwei DNA-Fragmente zu einem verbunden und mit Schnittstellen für spezifische Restriktionsendonukleasen versehen. Über diese wurde das DNA-Fragment in den Vektor pcDNA3.1 kloniert (siehe Anhang Abbildung 25). Die Korrektheit des so erhaltenen Konstrukts wurde mittels einer Sequenzierung überprüft.

Ergebnisse

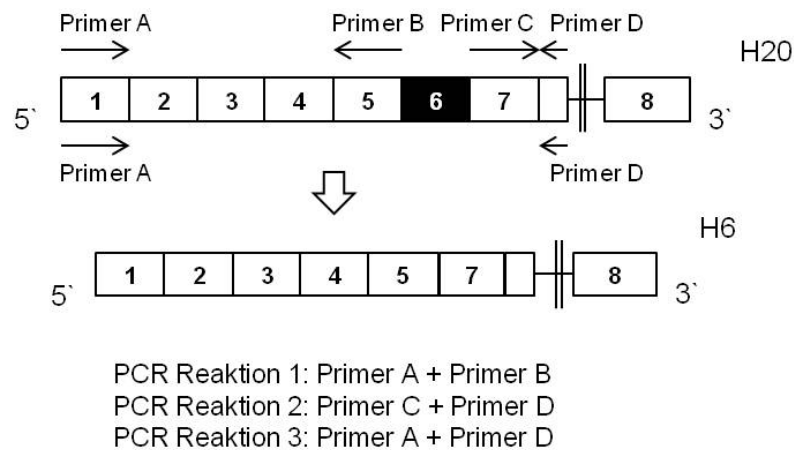


Abbildung 17. Schematische Darstellung der PCR-Reaktionen die zur Erstellung eines den löslichen IL-7RA kodierenden Konstrukts verwendet wurden.

Die stabile Transfektion von HEK 293 Zellen mit dem erstellten „IL-7RA Konstrukt“ führte zur Expression und Sekretion des löslichen IL-7RA. Die Menge an löslichem IL-7RA im HEK 293-Zellüberstand wurde mittels eines spezifischen ELISA gemessen (Abbildung 18). Die Analyse der IL-7RA Konzentration im Zellüberstand zeigte deutlich, dass HEK 293 Zellen keinen IL-7RA sezernieren. Nur die transfizierten HEK 293 Zellen (HEK 293-IL-7RA) exprimierten den löslichen IL-7RA (Mittelwert: 324 ng/mL). Durch Ankonzentrieren des HEK 293-IL-7RA-Zellüberstands wurde die Konzentration des löslichen IL-7RA noch um das 18-fache erhöht.

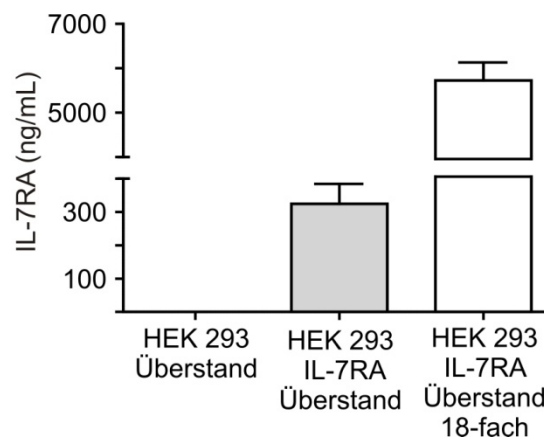


Abbildung 18. Quantifizierung der IL-7RA Konzentration im Zellüberstand von transfizierten (mit einem für den löslichen IL-7RA kodierenden Konstrukt) als auch von nicht transfizierten HEK 293 Zellen. Die HEK Zellen wurden für 3-4 Tage kultiviert, der Überstand abgenommen, zentrifugiert und sterilfiltriert. Um die IL-7RA Konzentration zu erhöhen, wurde der Zellüberstand mit Hilfe von Centricons 18-fach ankonzentriert.

Ergebnisse

4.4.1.5 HEK 293-IL-7RA-Zellüberstand verringert die IL-7-vermittelte STAT5 Phosphorylierung in CD4⁺ T-Zellen

Um zu überprüfen, ob der in HEK 293 Zellen produzierte lösliche IL-7RA IL-7 binden kann und womöglich die STAT5 Phosphorylierung noch stärker inhibiert als der rekombinante IL-7RA (R&D; 306-IR), wurde die STAT5 Phosphorylierung in CD4⁺ T-Zellen wie unter 3.2.3.1.3 beschrieben gemessen. Der aus HEK 293-IL-7RA gewonnene IL-7RA ist in der Lage IL-7 zu binden und die IL-7-vermittelte STAT5 Phosphorylierung zu inhibieren (Abbildung 19 A-D). Der Vergleich der unterschiedlichen Stimulationsbedingungen zeigt deutlich, dass die Reduktion der STAT5 Phosphorylierung von dem Konzentrationsverhältnis zwischen löslichem IL-7RA und IL-7 abhängt (Abbildung 19 A-D). So wurde, wie schon bei Verwendung des Anti-IL-7 Antikörpers, die größte Reduktion der STAT5 Phosphorylierung bei einer Stimulation der CD4⁺ T-Zellen mit 10 pg/mL IL-7 erzielt (Abbildung 19 C & D).

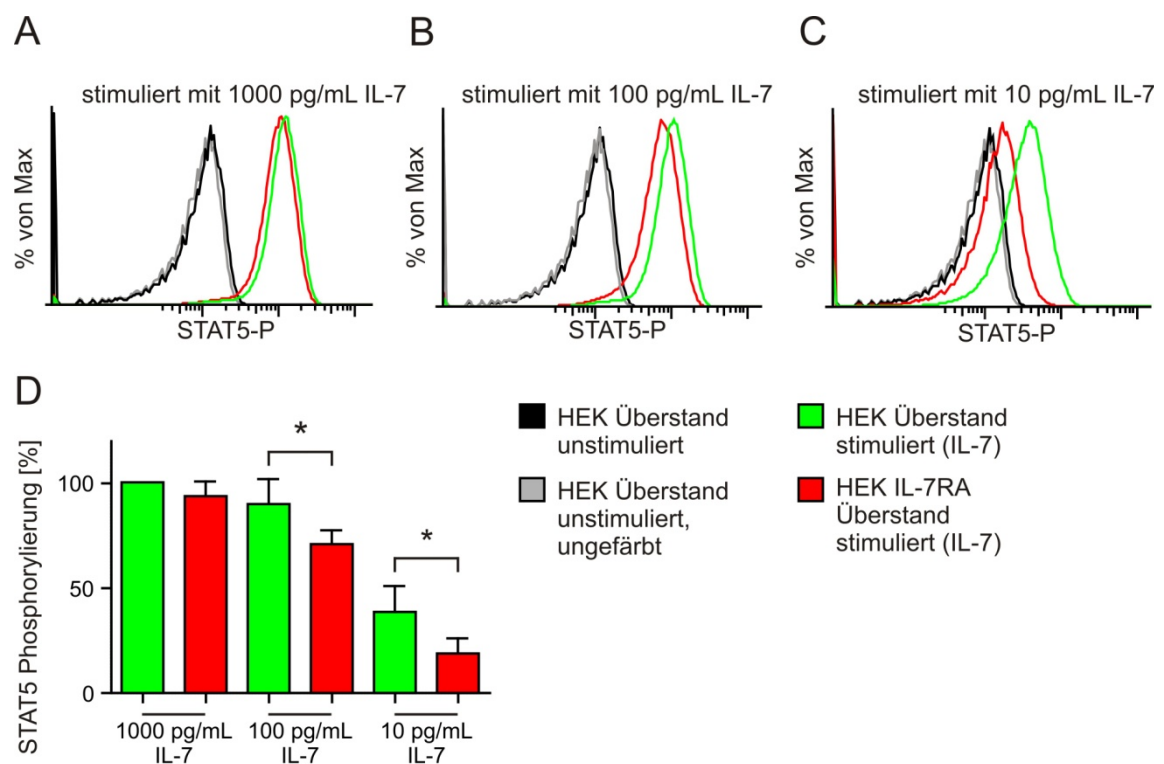


Abbildung 19. Reduktion der IL-7-vermittelten STAT5 Phosphorylierung durch den löslichen IL-7RA. CD4⁺ T-Lymphozyten wurden für 15 min mit unterschiedlichen IL-7 Konzentrationen (10-1000 pg/ml) stimuliert und die STAT5 Phosphorylierung anschließend im Durchflusszytometer analysiert. (A-C) Repräsentative Histogramme der STAT5 Phosphorylierung in CD4⁺ T-Lymphozyten. Die Zellen wurden vor der Stimulation mit IL-7 für 2 h in ankonzentriertem HEK 293 Zellüberstand (grüne Linie) oder in ankonzentriertem HEK 293-IL-7RA Zellüberstand (rote Linie) vorinkubiert. (D) Zusammenfassung der Ergebnisse, dargestellt als Mittelwert der Phosphorylierung in % ± s.d.; *p < 0,005; Student t-Test (n=3).

Ergebnisse

4.4.2 PBMCs des protektiven Haplotypen weisen eine erhöhte Proliferation auf

Es ist bekannt, dass IL-7 einen Effekt auf das Proliferationsverhalten von T-Zellen hat. Zur Überprüfung des Einflusses des löslichen IL-7RA auf die Proliferation von PBMCs, wurden PBMCs von homozygoten MS-Patienten des protektiven sowie des Risikohaplotypen in RPMI Medium mit 5% autologem Serum für 48 h, 72 h und 168 h kultiviert. Um den Effekt des IL-7 noch zu verstärken, wurden die Zellen mit Tetanus Toxoid oder PHA stimuliert.

Die Messung der Proliferation von unstimulierten Zellen ergab, dass die PBMCs von Patienten des protektiven und des Risikohaplotypen nach 48 h und 72 h ein nahezu gleiches Proliferationsverhalten zeigten. Erst nach 168 h wiesen die PBMCs von Trägern des protektiven Haplotypen eine leicht erhöhte Proliferation auf (Abbildung 20 A). Diese Tendenz wurde bei den mit Tetanus Toxoid stimulierten PBMCs noch deutlicher (Abbildung 20 B). Auch hier wiesen die Zellen von MS-Patienten des protektiven Haplotypen eine stärkere Proliferation auf als die von Trägern des risikobehafteten Haplotypen. Die mit PHA stimulierten Zellen erreichten erwartungsgemäß nach 72 h ihr maximales Proliferationsniveau. Auch hier wiesen die PBMCs von Trägern des protektiven Haplotypen eine höhere Proliferationsrate als die von MS-Patienten des Risikohaplotypen auf (Abbildung 20 C).

Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass in autologem Serum kultivierte PBMCs von Patienten des protektiven Haplotypen eine höhere Proliferation aufweisen als die von Trägern des Risikohaplotypen.

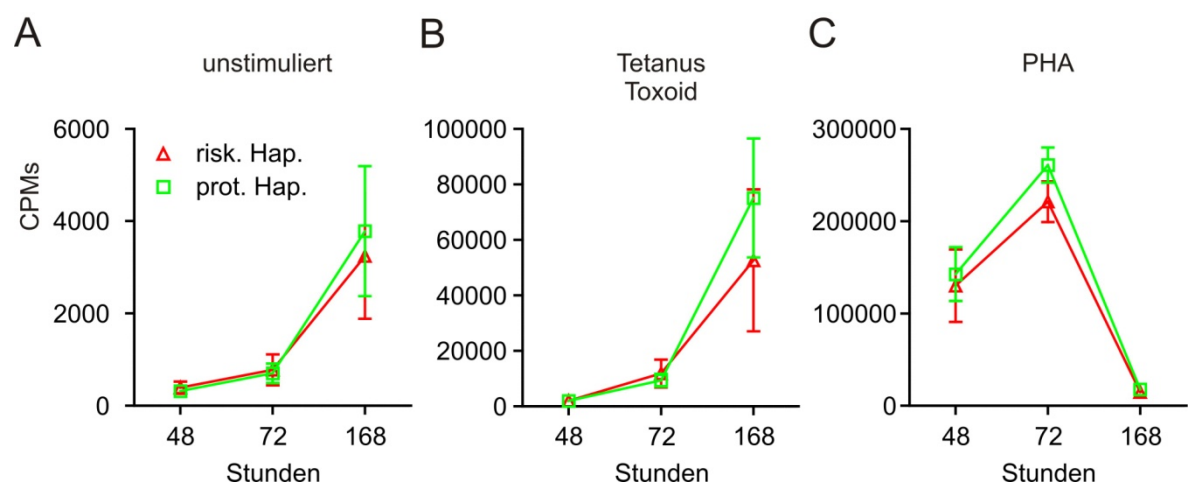


Abbildung 20. Einfluss des IL-7RA auf die Proliferation von PBMCs. PBMCs von MS-Patienten des Risikohaplotypen (n=4) (rote Linie) und des protektiven Haplotypen (n=4) (grüne Linie) wurden in Medium mit 5% autologem Serum für 48 h, 72 h und 168 h kultiviert. Die Proliferation wurde mittels eines ^3H -Thymidin-Inkorporations-Assay gemessen. Die Ergebnisse zeigen die CPMs (Zählereignisse pro Minute) in (A) unstimulierten, (B) Tetanus Toxoid und (C) PHA stimulierten PBMCs.

Ergebnisse

4.5 Die IL-7RA Haplotypen unterscheiden sich nicht nur in der Menge an löslichem IL-7RA - „Mikroarray-Analyse“

Die bisherigen Experimente zeigten, dass sich die IL-7RA Haplotypen in der Menge an löslichem IL-7RA unterscheiden und dieser IL-7-vermittelte Signale in CD4⁺ T-Zellen sowie die Proliferation in PBMCs hemmt. Um zu überprüfen, ob sich die IL-7RA Haplotypen in weiteren, bisher nicht bekannten Eigenschaften, unterscheiden, wurde eine Genexpressionsanalyse durchgeführt. Dazu wurden CD4⁺ T-Lymphozyten von drei unterschiedlichen MS-Patienten je Haplotyp (protektiver, risikobehafteter und Haplotyp 2), aufgereinigt und mit IL-7 stimuliert. Bei der Auswertung des Mikroarray wurden zwei Proben ausgeschlossen, da sie eine schwächere Gesamtintensität als der Rest besaßen. Es wurde sowohl die basale Genexpression als auch die Genexpression nach IL-7 Stimulation analysiert. Da es sich bei dem verwendeten Mikroarray um einen Gen-Array und nicht um einen Exon-Array handelte, konnten aus technischen Gründen Unterschiede in der Expression von Isoformen, wie zwischen dem membranständigen und löslichen IL-7RA, nicht detektiert werden.

4.5.1 Nach 6-stündiger IL-7 Stimulation weisen CD4⁺ T-Lymphozyten die stärkste Veränderung in ihrer IL-7RA sowie Bcl-2 Expression auf

Um den idealen Zeitpunkt für die Genexpressionsanalyse zu finden, wurden CD4⁺ T-Lymphozyten für 6 h, 12 h, 24 h und 48 h mit IL-7 (10 ng/mL) stimuliert (3.2.2.6). Zu jedem Zeitpunkt wurden die IL-7RA Oberflächenexpression und die Genexpression vom IL-7RA und Bcl-2 analysiert (Abbildung 21). Erwartungsgemäß nahm die IL-7RA Oberflächenexpression erst ab und erreichte dann nach 48 h Stunden wieder das Ausgangsniveau (Abbildung 21 A). Diese Beobachtung wurde von den IL-7RA Genexpressionsdaten unterstützt (Abbildung 21 B). Auch hier war die IL-7RA Expression nach 6 h um etwa 50% reduziert. Wie bereits in der Literatur beschrieben (104) stieg die Genexpression von Bcl-2 nach der Stimulation der CD4⁺ Zellen mit IL-7 stark an und nahm dann kontinuierlich ab (Abbildung 21 B). Da auch die Genexpression von Bcl-2 nach 6-stündiger IL-7 Stimulation den stärksten Effekt aufwies, wurden die CD4⁺ T-Lymphozyten auch für die Mikroarray-Analyse für 6 h mit IL-7 (10 ng/mL) stimuliert.

Ergebnisse

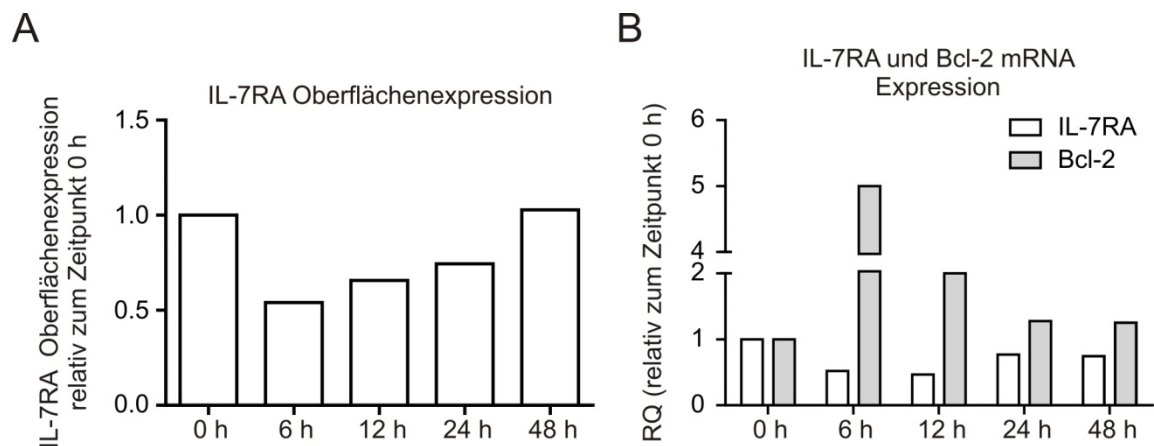


Abbildung 21. Reduktion der IL-7RA Oberflächenexpression und Genexpression sowie Anstieg der Bcl-2 Transkription. CD4⁺ T-Lymphozyten wurden über Nacht in Medium kultiviert und dann für 0 h, 6 h, 12 h, 24 h und 48 h mit 10 ng/mL IL-7 stimuliert. (A) Durchflusszytometrische Analyse der IL-7RA Oberflächenexpression. (B) Die IL-7RA und Bcl-2 Genexpression wurde mittels quantitativer PCR gemessen.

4.5.2 IL-7-stimulierte und unstimulierte CD4⁺ Zellen unterscheiden sich in ihrer Genexpression

Die IL-7-induzierten Veränderungen in der Genexpression wurden als Mittelwert über alle Proben ausgewertet. Die Mehrheit der Gene war hochreguliert (91 von 104; bereinigter p-Wert $\leq 5E-2$; absolute log fold change $\geq 1,0$). Beispielhaft zu nennen sind hier Gene wie CISH, CDK6, PTGER2, DACT1, SOCS2, IRF4 und BCL2 die hochreguliert waren und Gene wie GCNT4, IL7RA, AOA1, AIM2, CR1, FAIM3 und SYTL2 die herunterreguliert waren. Die nicht-überwachte Ballungsanalyse (engl.: unsupervised clustering) zeigte eine klare, haplotypunabhängige Trennung der Proben in IL-7-stimulierte und unstimulierte Proben (Abbildung 22). Die klare Trennung der Proben in stimulierte und unstimulierte Proben ist ein klares Indiz dafür, dass die experimentelle Durchführung des Versuches funktioniert hat.

Ergebnisse

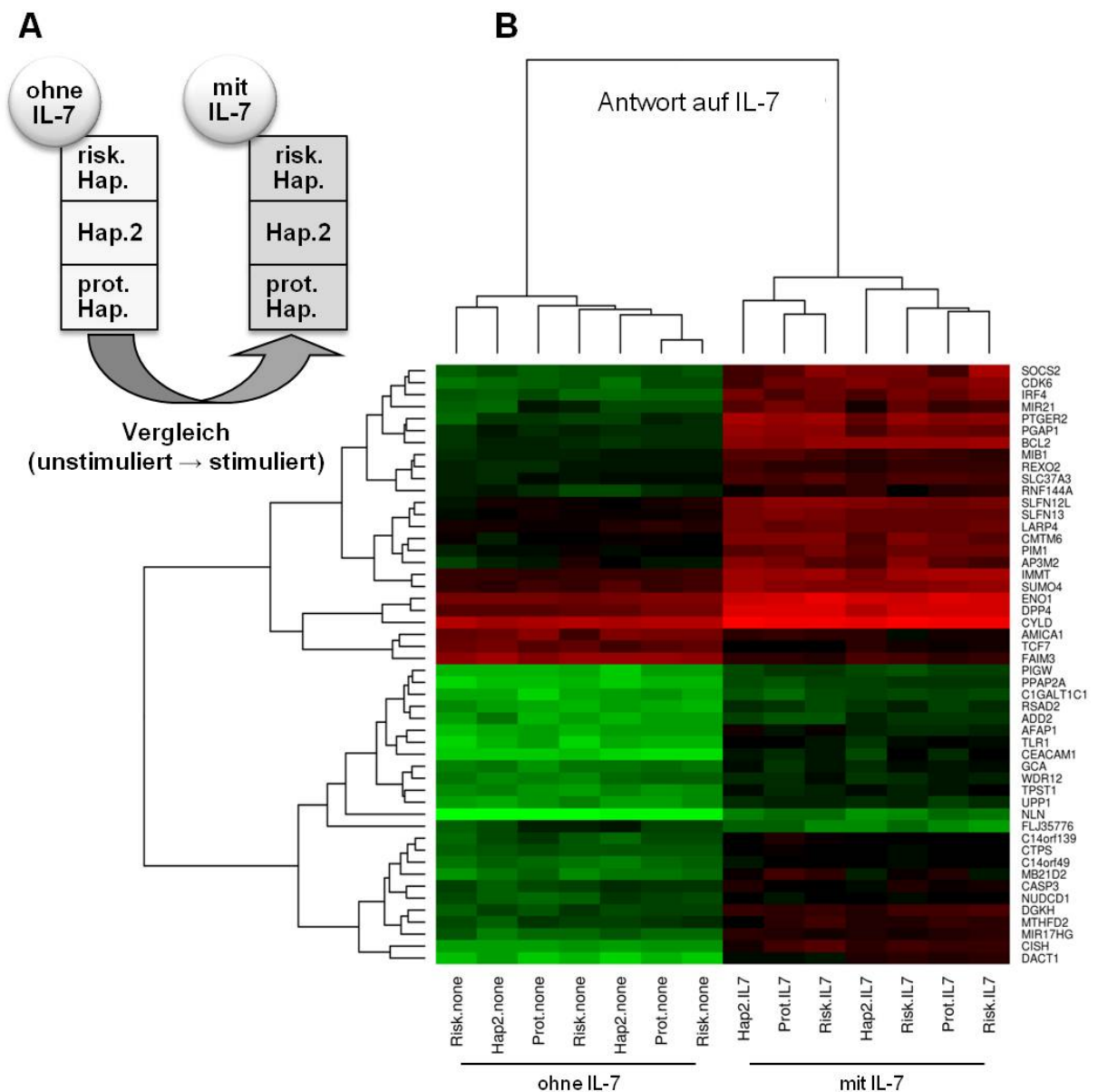


Abbildung 22. Mikroarray-Analyse der mRNA von IL-7-stimulierten und unstimulierten CD4⁺ T-Lymphozyten von Trägern des protektiven Haplotypen, des Risikohaplotypen sowie des Haplotypen 2. (A) Schematische Darstellung des durchgeführten Vergleichs. (B) Die Heatmap der Genexpression zeigt die nicht überwachte (engl.: unsupervised) Gruppierung der Proben in IL-7-stimulierte (IL7) und nicht stimulierte (none) Proben. Hochregulierte Gene sind in dieser Darstellung rot und herunterregulierte Gene sind grün hervorgehoben.

4.5.3 Die IL-7RA Haplotypen zeigen leichte Unterschiede in ihrer basalen Genexpression

Die Mikroarray-Analyse der unbehandelten CD4⁺ T-Lymphozyten zeigte keine signifikanten Unterschiede in der Genexpression zwischen den einzelnen Haplotypen. Trotz der geringen Signifikanz der Unterschiede zeigte die nicht-überwachte Ballungsanalyse der Genexpression der Gene, die die größten Unterschiede über alle Haplotypen zeigten, die Gruppierung der Proben in die drei untersuchten Haplotypen

Ergebnisse

(Abbildung 23). Die Falschfarbendarstellung der Heatmap zeigt, dass sich Haplotyp 2 am stärksten von den anderen Haplotypen unterscheidet.

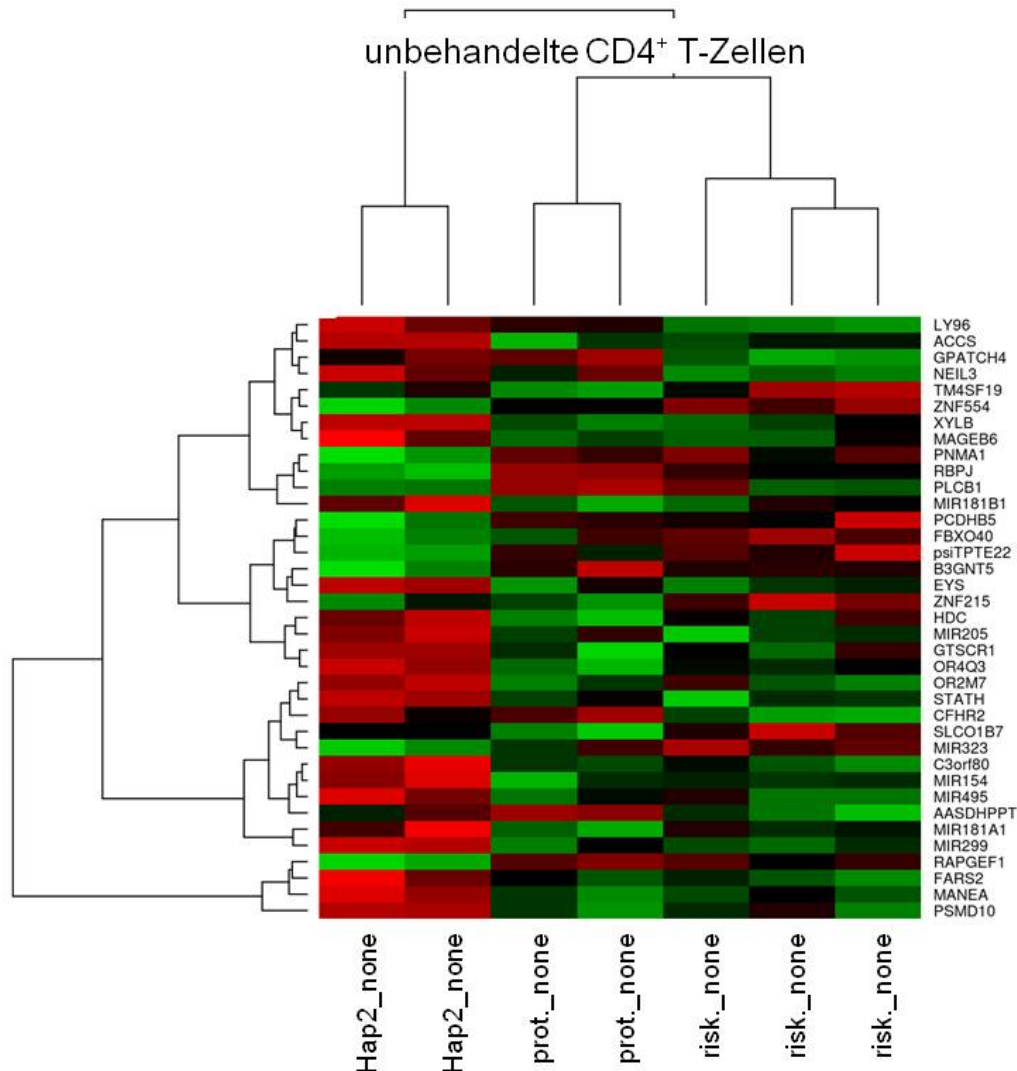


Abbildung 23. Mikroarray-Analyse der basalen Genexpression von CD4⁺ T-Lymphozyten mRNA von Trägern des protektiven Haplotypen, des Risikohaplotypen sowie des Haplotypen 2. Die Genexpression einer jeden Probe wurde mit der mittleren Genexpression über alle Proben verglichen. Die Transkripte die den größten Unterschied über alle Proben zeigten wurden für die nicht-überwachte Ballungsanalyse verwendet und sind in der Heatmap dargestellt. Stark exprimierte Gene sind in rot dargestellt, während schwächer exprimierte Gene grün hervorgehoben sind. Gene deren Expression zwischen den Proben keinen Unterschied zeigte sind in schwarz dargestellt.

4.5.4 Funktionelle Charakterisierung differentiell exprimierter Gene - „Gene Ontology Analyse“

Ausgehend von der Hypothese, dass sich die IL-7RA Haplotypen in ihrem Verhalten auf eine Stimulation mit IL-7 unterscheiden, wurden zur weiteren Analyse die Gene ausgewählt, die sowohl einen starken haplotypabhängigen Unterschied als auch eine

Ergebnisse

signifikante Antwort auf die IL-7 Stimulation zeigten (Abbildung 24 A). Die Hauptkomponentenanalyse (engl.: Principal Component Analysis; PCA) der 357 ausgewählten Gene zeigte eine deutliche Auftrennung zwischen den Trägern des Risikohaplotypen, des protektiven Haplotypen und des Haplotypen 2 (Abbildung 24 B). Dies zeigt, wie schon die nicht-überwachte Ballungsanalyse der basalen Genexpression, dass die Haplotypen eine spezifische Gensignatur besitzen.

Um zu überprüfen, ob diese Gene vermehrt in spezifischen Signalwegen vorkommen, wurde eine Gene Ontology (GO) Analyse für den Zweig „biological process“ durchgeführt. Zu diesem Zweck wurde eine Suchabfrage der 357 ausgewählten Gene in DAVID (135, 136) unternommen.

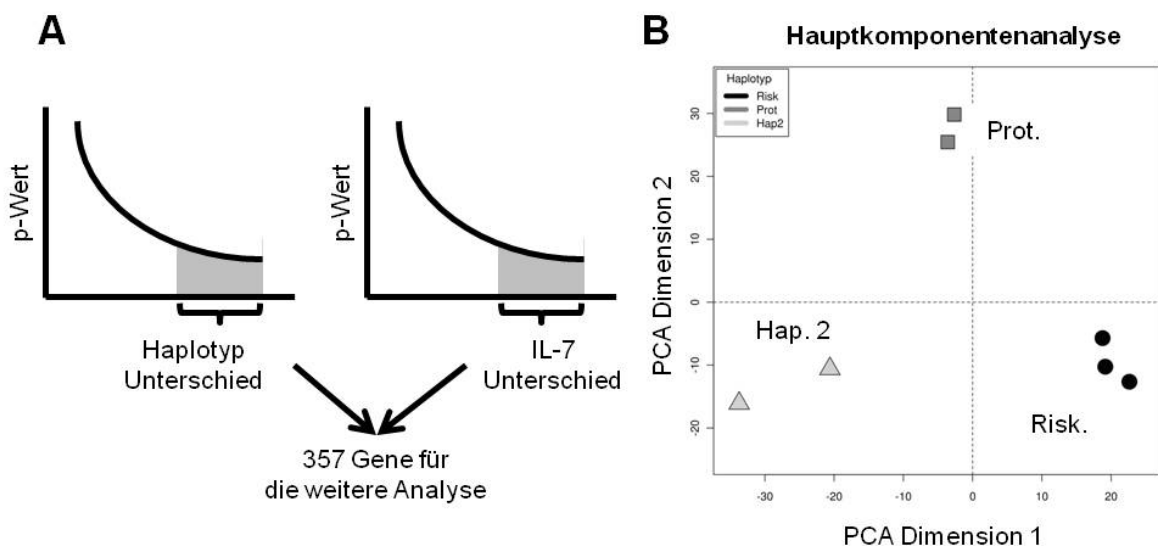


Abbildung 24. Um Unterschiede in den Genexpressionsprofilen zwischen den Haplotypen aufzuspüren, wurden die 357 Transkripte ausgewählt, die den größten Unterschied zeigten. (A) Modell zur Erstellung der Genliste der 357 Gene, die sowohl einen Unterschied zwischen den Haplotypen als auch eine starke Antwort auf die IL-7 Stimulation gaben. (B) Hauptkomponentenanalyse der Proben von Trägern des protektiven Haplotypen (Quadrate), des Risikohaplotypen (Kreise) sowie des Haplotypen 2 (Dreiecke).

Die GO-Analyse der 357 Gene ergab 890 unterschiedliche GO-Terms. Jedoch besaß nach Anlegen der Bonferroni-Korrektur keines einen signifikanten p-Wert. Daher wurden die GO-Terms nach ihrer Häufigkeit sortiert und nur die GO-Terms ausgewählt, die mindestens achtmal vorkamen (Tabelle 38). Interessanterweise gruppieren sich die meisten Gene in GO-Familien wie Signaltransduktion, Apoptose, Transkriptionsregulation oder Immunantwort. Es fand sich aber auch eine Gruppe von Genen in der GO-Familie „Virusantwort“.

Ergebnisse

Tabelle 38. GO-Analyse. Die Tabelle enthält GO-Terms die den 357 Genen mindestens achtmal zugeordnet werden konnten. Den GO-Terms folgt eine Reihe ausgewählter Gene. Die Veränderung der Genexpression über alle Proben sowie in den einzelnen Haplotypen nach IL-7 Stimulation wird durch den log Fold Change (●: herunterreguliert; ●: hochreguliert) zum Ausdruck gebracht.

Häufigkeit der GO- Terms	GO-Term	ausgewählte Gene	logFC	logFC		
				risk. Hap.	Hap2.	prot. Hap.
28	GO:7165_signal transduction	AK5	● -0,72	-0,75	-0,22	-1,17
		PHB	● 0,25	0,44	-0,10	0,32
		IL2RB	● 0,40	0,69	0,29	0,09
16	GO:681_transport	NDUFA2	● 0,23	0,60	-0,18	0,09
		NDUFB3	● 0,24	0,09	0,08	0,61
		ATP5G1	● 0,34	0,54	0,04	0,35
16	GO:6915_apoptosis	CHIA	● -0,05	-0,26	0,04	0,19
		SGK1	● 1,57	1,81	1,14	1,64
		TP53	● 0,43	0,64	0,21	0,34
16	GO:7155_cell adhesion	PCDHB16	● -0,14	0,02	-0,02	-0,51
		NR2C2AP	● 0,22	0,31	-0,09	0,38
		NEDD9	● 0,18	0,39	-0,13	0,16
16	GO:45892_negative regulation of transcription, DNA-	PHB	● 0,25	0,44	-0,10	0,32
		ZNF238	● -0,30	-0,52	0,01	-0,28
		MYB	● 1,21	1,60	0,87	0,95
13	GO:6355_regulation of transcription, DNA- dependent	PHB	● 0,25	0,44	-0,10	0,32
		LMO4	● 0,52	0,67	0,65	0,14
		MYB	● 1,21	1,60	0,87	0,95
13	GO:6811_ion transport	TPTE2	● 0,13	0,41	-0,55	0,39
		CLIC4	● -0,36	-0,13	-0,24	-0,82
		ATP5G1	● 0,34	0,54	0,04	0,35
13	GO:6955_immune response	CCRL1	● 0,23	0,11	-0,08	0,73
		IFI6	● 0,12	0,47	-0,17	-0,11
		P2RY14	● 0,68	0,85	0,22	0,90
13	GO:5896_response to stimulus	OR4C13	● -0,15	0,05	-0,11	-0,50
		TAS2R43	● 0,34	-0,02	0,44	0,79
		OR2AK2	● -0,09	0,03	0,11	-0,49
13	GO:5585_transmembra ne transport	TPTE2	● 0,13	0,41	-0,55	0,39
		TOMM22	● 0,43	0,69	0,19	0,30
		SLC16A10	● -0,69	-0,95	-0,53	-0,46
10	GO:122_negative regulation of transcription from RNA	PHB	● 0,25	0,44	-0,10	0,32
		ZNF238	● -0,30	-0,52	0,01	-0,28
		MYB	● 1,21	1,60	0,87	0,95
10	GO:7399_nervous system development	PDE5A	● 0,22	0,05	0,05	0,64
		AVIL	● -0,25	-0,47	-0,14	-0,03
		NOG	● -0,94	-1,29	-0,54	-0,81
10	GO:45893_positive regulation of transcription, DNA-	PHB	● 0,25	0,44	-0,10	0,32
		MYB	● 1,21	1,60	0,87	0,95
		PLCB1	● -0,64	-0,42	-0,68	-0,94
9	GO:6351_transcription, DNA-dependent	LMO4	● 0,52	0,67	0,65	0,14
		ZNF238	● -0,30	-0,52	0,01	-0,28
		ARHGAP35	● -0,20	-0,11	-0,06	-0,48
9	GO:19221_cytokine- mediated signaling pathway	IFI6	● 0,12	0,47	-0,17	-0,11
		IL2RB	● 0,40	0,69	0,29	0,09
		IFNGR2	● 1,35	1,52	0,98	1,48
9	GO:3154_cell differentiation	ZAK	● 0,87	1,13	0,39	0,96
		CLIC4	● -0,36	-0,13	-0,24	-0,82
		KRT6A	● -0,18	-0,37	0,05	-0,11
9	GO:4587_innate immune response	APOBEC3G	● -0,25	0,03	-0,62	-0,31
		IFITM3	● 0,20	0,43	-0,16	0,21
		TLR2	● 0,37	0,63	0,11	0,24
8	GO:658_proteolysis	PRSS35	● -0,20	-0,05	-0,01	-0,63
		ADAM23	● -1,08	-0,93	-0,88	-1,51
		PSMD8	● 0,17	0,34	-0,05	0,14

Ergebnisse

Häufigkeit der GO- Terms	GO-Term	ausgewählte Gene	logFC	logFC		
				risk. Hap.	Hap2.	prot. Hap.
8	GO:6916_anti-apoptosis	IFI6	● 0,12	0,47	-0,17	-0,11
		SOCS2	● 2,51	2,91	2,27	2,16
		ACAA2	● 0,47	0,61	0,15	0,59
8	GO:7186_G-protein coupled receptor protein signaling	CCRL1	● 0,23	0,11	-0,08	0,73
		P2RY14	● 0,68	0,85	0,22	0,90
		TAS2R43	● 0,34	-0,02	0,44	0,79
8	GO:7275_multicellular organismal development	ZNF238	● -0,30	-0,52	0,01	-0,28
		ID2	● 0,55	0,67	0,22	0,70
		TP53	● 0,43	0,64	0,21	0,34
8	GO:9615_response to virus	APOBEC3G	● -0,25	0,03	-0,62	-0,31
		IFNGR2	● 1,35	1,52	0,98	1,48
		IFITM3	● 0,20	0,43	-0,16	0,21

5 Diskussion

5.1 Der IL-7RA ist auch in der Hamburger Kohorte mit MS assoziiert

Seit der Erstbeschreibung der Assoziation des IL-7RA mit MS im Jahre 2007 (37, 55, 56) haben eine Vielzahl von Studien versucht diese zu bestätigen und die funktionellen Auswirkungen der IL-7RA Haplotypen zu analysieren. Jedoch ist es nicht allen gelungen, diese Assoziation zu bestätigen und auch die funktionellen Daten sind sehr heterogen. Ein großes Problem bei der Analyse des genetischen Einflusses auf die Ätiologie der MS ist die Heterogenität der Erkrankung. Wahrscheinlich liegen den phänotypischen Merkmalen von MS sowie dem damit verbundenen klinischen Verlauf unterschiedliche pathogenetische Mechanismen zugrunde. Daher gehen Gene, die nur bei einigen MS-Patienten verändert sind, häufig aufgrund der geringen statistischen Aussagekraft verloren, so dass die Assoziation nicht nachgewiesen werden kann.

Bemerkenswert ist daher, dass in dieser Arbeit, trotz der geringen Anzahl an Individuen, für den SNP rs6897932 die Assoziation mit MS bestätigt werden konnte. Dass dieser Nachweis nur auf Ebene des Genotypen und nicht auf Grundlage der Allelverteilung gelang, ist der geringen Probenanzahl und der daraus resultierenden geringen statistischen Aussagekraft zuzuschreiben. Hervorzuheben ist auch, dass die Haplotypfrequenz in der Hamburger Kohorte der von Gregory und Kollegen (56) beschriebenen entspricht. Dies zeigt, dass die in dieser Arbeit betrachtete Hamburger Kohorte, von der IL-7RA Haplotypverteilung her mit anderen Kohorten vergleichbar ist.

5.2 Phänotypische Unterschiede zwischen den IL-7RA Haplotypen

Schon Gregory und Kollegen zeigten, dass Träger des risikobehafteten „C“ Allels des SNPs rs6897932 eine verringerte Expression des Amplikons von Exon 6-7 aufweisen, wohingegen die Expression zweier Kontroll-Amplikons von Exon 4-5 und Exon 7-8 unverändert war. Sie schlossen daraus, dass die allelspezifische Genexpression Auswirkungen auf die Proteinexpression des IL-7RA hat. Demnach sollten Träger des „C“ Allels, verglichen mit Trägern des „T“ Allels, eine verringerte Expression des membranständigen IL-7RA und eine erhöhte Expression des löslichen IL-7RA aufweisen (56). Diese Vermutung wurde von Ergebnissen von McKay und Kollegen bekräftigt. Auch sie zeigten, dass Träger des Risikohaplotypen, verglichen mit Trägern des protektiven Haplotypen, eine erhöhte Genexpression des löslichen IL-7RA aufweisen (133). In dieser Arbeit wurden diese Befunde zum ersten Mal für eine europäische/deutsche Kohorte von MS Patienten bestätigt. Dass es anderen

Diskussion

europäischen Studien nicht gelang, den Einfluss des Haplotypen bzw. des SNPs rs6897932 auf die Genexpression zu demonstrieren, lag vermutlich an dem gewählten Vergleich. In den Publikationen von Akkad und Kollegen und Sombekke und Kollegen (137, 138) wurde nur das Verhältnis von membranständiger zu gesamt IL-7RA kodierender mRNA verglichen und nicht zwischen membranständiger und löslicher IL-7RA kodierender mRNA. Auch in dieser Arbeit wurde kein signifikanter Unterschied in der Genexpression der membranständigen Isoform (H20) zwischen dem protektiven und dem Risikohaplotypen gefunden. Wie schon von McKay (133) beschrieben, könnte ein Grund hierfür der mengenmäßige Unterschied in der Expression der löslichen sowie membranständigen IL-7RA kodierenden mRNAs sein. Die Genexpression der membranständigen Isoform übersteigt die Genexpression der löslichen Isoform um ein Vielfaches. Daher ist es schwierig, mit einer geringen Anzahl an Proben einen signifikanten Unterschied in der Genexpression der membranständigen Isoform zwischen den Haplotypen zu zeigen.

Die Genexpression der beiden IL-7RA Isoformen wurde in dieser Arbeit zunächst nur auf Basis von PBMCs zwischen den einzelnen Haplotypen verglichen. Bei MS spielen aber gerade einzelne Leukozytenpopulationen wie T-Lymphozyten (besonders T_H1) aber auch dendritische Zellen und NK-Zellen eine besondere Rolle. Daher wurde im Folgenden die Oberflächenexpression des IL-7RA auf unterschiedlichen Zellen des Immunsystems im Durchflusszytometer untersucht. Wie schon beim Vergleich der Genexpression der membranständigen IL-7RA Isoform zwischen dem protektiven und dem Risikohaplotypen wurde auch bei der Analyse der IL-7RA Oberflächenexpression kein signifikanter Unterschied gefunden. Dies passt zu den Daten von Broux und Kollegen und McKay und Kollegen (133, 139), die auch zwischen Trägern des risikobehafteten „C“ Allels und Trägern des „T“ Allels keinen Unterschied in der Oberflächenexpression des IL-7RA auf T-Zellen ($CD3^+$) sowie auf $CD4$ T-Lymphozyten und Tregs fanden. Obwohl in dieser Arbeit keine signifikanten Unterschiede in der IL-7RA Oberflächenexpression gefunden wurden, so war doch eine Tendenz in die Richtung zu erkennen, dass Träger des protektiven Haplotypen verglichen mit Trägern des Risikohaplotypen eine leicht erhöhte Oberflächenexpression des IL-7RA aufwiesen. Dieses Resultat passt zum einen zu den RT-PCR Ergebnissen, die auch diese Tendenz aufwiesen, und zum anderen zu den kürzlich erschienen Daten von Hoe und Kollegen (140). Auch sie zeigten beim Vergleich von MS-Patienten und HDs des protektiven Haplotypen mit Individuen, die nicht Träger des protektiven Haplotypen waren, dass Träger des protektiven Haplotypen auf $CD4^+$ T-Lymphozyten eine leicht erhöhte Expression des IL-7RA aufweisen.

Diskussion

Bemerkenswert ist auch, dass im Rahmen dieser Arbeit auf Tregs bzw. nicht-Tregs von Trägern des protektiven Haplotypen unterschiedliche Tendenzen in der Expression des IL-7RA gefunden wurden. Die leicht erhöhte Expression des IL-7RA auf Tregs und die leicht verringerte Expression des IL-7RA auf nicht-Tregs erscheint besonders im Kontext von MS bzw. Autoimmunkrankheiten schlüssig. Die verringerte Expression des IL-7RA auf Tregs bei Trägern des risikobehafteten Haplotypen könnte zu einer Dysfunktion der Tregs und somit zu einem schnelleren Zusammenbruch der Selbsttoleranz führen. Dieser Ansatz fügt sich sehr gut in frühere Erkenntnisse von Haas und Kollegen ein, die feststellten, dass Tregs von MS-Patienten in ihrer Funktion beeinträchtigt sind und ein verringertes suppressives Potential besitzen (141). Wie schon oben beschrieben, könnte ein Grund dafür, dass weder Haas und Kollegen noch Broux und Kollegen diese Tendenz sahen, die Heterogenität zwischen den verglichenen Kohorten sein. Wahrscheinlich ließen sich die gefundenen Unterschiede erst in einer deutlich größeren Kohorte reproduzierbar bestätigen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde auch eine Korrelation zwischen IL-7RA und HLA -DP, -DQ, -DR Oberflächenexpression gefunden. Guimond und Kollegen (131) zeigten bereits 2009, dass hohe systemische IL-7-Spiegel zur Herabregulation der Klasse II HLA auf plasmazytoiden dendritischen Zellen führt. Besonders interessant ist dieser Befund im Hinblick auf die gefundene Tendenz, dass Träger des protektiven Haplotypen eine höhere IL-7RA und eine niedrigere Klasse II HLA Expression aufwiesen als Träger des risikobehafteten Haplotypen. Die verringerte Expression der Klasse II HLA Moleküle könnte, wie bereits von Guimond postuliert, die Fähigkeit der plasmazytoiden DCs verringern, die homeostatische Proliferation in CD4⁺ T-Lymphozyten zu induzieren.

Der schon bekannte Unterschied im Verhältnis von membrangebundener zu löslicher IL-7RA Isoform, wurde in dieser Arbeit nicht nur auf mRNA-Ebene bestätigt, sondern es wurde auch gezeigt, dass dieser Auswirkungen auf die IL-7RA Serumkonzentration hat. Zeitgleich zu dem in dieser Arbeit beschriebenen ELISA wurden auch von vier weiteren Gruppen (96, 140, 142, 143) ein ELISA bzw. „Bead-Capture-Assay“ entwickelt, um die Konzentration des löslichen IL-7RA zu bestimmen. Passend zu den Ergebnissen der quantitativen PCR zeigten auch die ELISA-Ergebnisse, dass Träger des protektiven Haplotypen eine dreifach verringerte Expression des IL-7RA aufweisen als Träger des Risikohaplotypen oder des Haplotypen 2. In einer 2010 erschienen Studie wurden die ELISA-Ergebnisse von Hoe und Kollegen bestätigt (140). Auch sie zeigten, dass Träger des protektiven Haplotypen eine niedrigere IL-7RA Serumkonzentration aufweisen als Individuen, die nicht den protektiven Haplotypen

Diskussion

tragen. In der genannten Studie wurde zudem die IL-7RA Serumkonzentration von MS-Patienten und HDs mit den gleichen Haplotypen verglichen. Auf diese Weise wurde gezeigt, dass die IL-7RA Serumkonzentration nicht MS-spezifisch ist sondern nur vom Haplotypen abhängt. Sowohl die Ergebnisse der quantitativen PCR als auch die des IL-7RA ELISA zeigten, dass nur der protektive Haplotyp deutlich geringere Mengen an löslichem IL-7RA exprimiert, wohingegen der risikobehaftete Haplotyp als auch die Haplotypen 2 und 4 in etwa gleiche Mengen IL-7RA exprimieren. Dies erscheint zunächst schlüssig, da nur der protektive Haplotyp das „T“ Allel für den SNP rs6897932 trägt und die drei anderen Haplotypen das „C“ Allel tragen. Jedoch wirft die einheitlich hohe Expression des löslichen IL-7RA auch die Frage auf, warum Träger des Risikohaplotypen (Haplotyp 1) ein deutlich höheres Risiko besitzen an MS zu erkranken als Träger der Haplotypen 2 und 4.

Zwei kürzlich erschienene Studien zeigen, dass sich die vier Haplotypen in mehr als nur dem veränderten Splicing und der dadurch veränderten löslichen IL-7RA Serumkonzentration unterscheiden. Broux und Kollegen (139) zeigten, dass Träger des Haplotypen 2 eine erhöhte Frequenz an RTEs (vom engl.: Recent Thymic Emigrants) aufweisen. Daraus schlussfolgerten sie, dass der IL-7RA Haplotyp einen Einfluss auf die Entwicklung und Homeostase von T-Lymphozyten hat und so zu einer veränderten Immunregulation führt. Auch in einer Studie von Hoe und Kollegen (144) wurden Haplotyp 2 spezifische Unterschiede gefunden. Demnach führt die Stimulation von PBMCs mit Interferon-beta (IFN- β), einem häufig bei MS verwendeten immunmodulatorischen Medikament, bei Trägern aller Haplotypen außer bei Haplotyp 2 Trägern, zur Hochregulation des IL-7RA. IFN- β besitzt eine antivirale Aktivität und wird daher normalerweise von virusinfizierten Zellen sezerniert. Die haplotypabhängige Antwort auf die IFN- β Stimulation könnte daher einen Einfluss auf die Immunregulation sowie die antivirale Antwort des Immunsystems haben.

5.3 Die IL-7RA Haplotypen unterscheiden sich auch in ihren Genexpressionsprofilen

Die in dieser Arbeit durchgeführte Genexpressionsanalyse diente dem Zweck, Unterschiede im Genexpressionsprofil zwischen den IL-7RA Haplotypen ausfindig zu machen. Der Vergleich der IL-7-stimulierten Proben mit den unstimulierten Proben ergab keine signifikanten, haplotypabhängigen Unterschiede in der Genexpression. Jedoch wurde die Genexpression von einer Vielzahl von Genen, über alle drei analysierten Haplotypen hinweg, hoch- bzw. herunterreguliert. Die nicht-überwachte Ballungsanalyse der Gene, die die am stärksten divergierenden Signale zeigten, ergab

Diskussion

eine eindeutige Auftrennung der Proben in stimulierte und nicht stimulierte Proben. Gene wie BCL2 und IL7RA wurden, wie schon in der Literatur (104) beschrieben, hoch- bzw. herunterreguliert. Beides zeigt, dass die experimentelle Durchführung des Mikroarrays funktioniert hat. Die Tatsache, dass bei keinem der gewählten Vergleiche signifikante Unterschiede in der Genexpression gefunden wurden deutet darauf hin, dass die Unterschiede zwischen den Haplotypen sehr gering sind. Zudem unterlag auch diese, mit humanem Material durchgeführte Analyse, dem Problem der Heterogenität zwischen den Probanden.

Gerade deshalb ist es bemerkenswert, dass die Proben aufgrund ihrer basalen Genexpressionsmuster sowie den Genen, die sowohl einen starken haplotypabhängigen Unterschied als auch eine signifikante Antwort auf die IL-7 Stimulation zeigten, drei Gruppen bildeten, die die Haplotypen widerspiegeln. Dies zeigt, dass die Haplotypen eine, wenn auch nicht signifikante, individuelle Gensignatur besitzen.

Die 357 Gene, die sowohl einen starken haplotypabhängigen Unterschied als auch eine signifikante Antwort auf die IL-7 Stimulation zeigten, wurden noch einmal einem Selektionsprozess unterworfen, indem für die weitere Auswertung nur die Gene berücksichtigt wurden, deren GO Terms mindestens achtmal vorkamen. Unter diesen Genen waren z.B. SOCS2, CASP9, FLF1, LGALS3, IL2RB, TNFAIP8L2, APOBEC3G, IRF4 und MYB.

Das Protoonkogen MYB gehört zur Familie der Myb-Transkriptionsfaktoren. In T-Zell-Lymphom-Zellen wurde gezeigt, dass die Expression von MYB durch IL-7 und IL-15 reguliert wird (145). Dies ist besonders interessant, da MYB sowohl während der T-Zellentwicklung als auch bei der antigenabhängigen Proliferation von reifen T-Lymphozyten von Bedeutung ist (146). Es wird angenommen, dass die Dysregulation der MYB Expression einen Einfluss auf die Negativselektion hat und so an der Entstehung von Autoimmunerkrankungen beteiligt sein könnte. Auch die Genexpressionsanalyse zeigte, dass die Stimulation von CD4⁺ T-Zellen mit IL-7 eine Hochregulation von MYB zur Folge hat. Träger des Risikohaplotypen wiesen eine deutlich höhere MYB Expression auf als Träger des protektiven Haplotypen und des Haplotypen 2. Dies könnte, wie bereits oben beschrieben, Auswirkungen auf die Negativselektion und das Proliferationsverhalten von T-Zellen des Risikohaplotypen haben. Zudem ist zu betonen, dass MYB bei einer 2011 erschienenen GWAS als neues mit MS assoziiertes Gen beschrieben wurde (33). Somit könnten Interaktionen zwischen den Polymorphismen im IL7RA als auch in MYB das MS-Risiko entscheidend beeinflussen.

Diskussion

Die Haplotypen unterschieden sich auch in der Expression des beta-Galactosid-bindenden Proteins LGALS3. LGALS3 ist wichtig für die Regulation der TCR-Signaltransduktion, das Zellwachstum und wirkt anti-apoptotisch (147). GAL3- bzw. LGALS3-defiziente Mäuse weisen einen milderen EAE-Verlauf auf als Wildtyp-Mäuse. Dies geht einher mit einer geringeren Anzahl an ZNS-infiltrierenden DCs und Monozyten sowie der Reduktion von pro-inflammatorischen Zytokinen wie IL-17, IL-6 und IFN- γ und einer erhöhten Frequenz an FoxP3⁺ Tregs in der Leber und ZNS (148). Passend zu diesen Beobachtungen wiesen Träger des Risikohaplotypen die höchste LGALS3 Expression auf. Allerdings war die LGALS3 Expression bei Trägern des protektiven Haplotypen nur unwesentlich geringer. Die geringste LGALS3 Expression wiesen Träger des Haplotypen 2 auf. Dies könnte bei Haplotyp 2 Trägern zu einer erhöhten Frequenz an Tregs führen und somit den von McKay (149) und Broux (139) beschriebenen protektiven Charakter erklären. Broux und Kollegen (139) zeigten, dass Träger des Haplotypen 2, auch innerhalb der Treg-Population, eine erhöhte Frequenz an RTE aufweisen. Diese Subpopulation der Tregs trägt die Hauptverantwortung für immunregulatorische Eigenschaften der Tregs (141).

Diese Erkenntnisse deuten darauf hin, dass eine IL-7RA haplotypabhängige Expression von LGALS3 einen erheblichen Einfluss auf den Verlauf sowie das MS-Risiko haben könnte.

In den drei analysierten Haplotypen führte die Stimulation der CD4⁺ T-Zellen mit IL-7 zu einer Hochregulation des Transkriptionsfaktors IRF4 (engl.: interferon regulatory factor 4). In einer kürzlich erschienenen Studie von Cretney und Kollegen (150) zeigten diese, dass IRF4 wichtig für die Funktion und Homeostase von Tregs ist. Träger des Risikohaplotypen wiesen die höchste IRF4 Expression und Träger des protektiven Haplotypen die niedrigste IRF4 Expression auf. Dieser Widerspruch zeigt deutlich, dass nicht alle Gene den Erwartungen entsprechend exprimiert wurden. Tregs machen jedoch nur einen geringen Prozentsatz der gesamten CD4⁺ Population aus. Daher könnte es sein, dass IRF4 in Tregs von Trägern des protektiven Haplotypen schon stärker exprimiert wird als von Trägern des Risikohaplotypen, dieser Effekt jedoch durch die unterschiedliche Expression von IRF4 in z.B. naiven und Gedächtnis CD4⁺T-Lymphozyten überlagert wird.

Unabhängig von der nicht immer klaren Bedeutung der Richtung der Genexpression, bleibt aber zu betonen, dass die Haplotypen eine individuelle Gensignatur besitzen. Dies deutet darauf, dass sich die Haplotypen in weiteren Eigenschaften als bloß der löslichen IL-7RA Konzentration unterscheiden. Um zu klären, ob die hier ermittelten Gene wirklich haplotypspezifisch sind, müsste ein zweiter Mikroarray mit HDs

Diskussion

durchgeführt werden. Denn nur wenn auch dieser die gleichen Gensignaturen zeigt, kann davon ausgegangen werden, dass diese nicht MS- sondern haplotypspezifisch sind.

5.4 Der lösliche IL-7RA verringert die IL-7-vermittelte STAT5 Phosphorylierung und hemmt die Proliferation

Bereits bei der Erstbeschreibung des IL-7RA 1990 von Goodwin und Kollegen (95) wurden die unterschiedlichen Isoformen des IL-7RA sowie die Fähigkeit des löslichen IL-7RA, die Bindung von IL-7 an den membranständigen IL-7RA zu blockieren, beschrieben. Trotzdem ist bis heute wenig über die funktionelle sowie klinische Relevanz des löslichen IL-7RA bekannt. Neben MS wurden auch bei an HIV erkrankten Personen erhöhte lösliche IL-7RA Konzentrationen im Serum/Plasma gemessen.

Um den konzentrationsabhängigen Einfluss des löslichen IL-7RA auf die IL-7-induzierte Signalkaskade des IL-7R zu untersuchen, wurde in dieser Arbeit die STAT5 Phosphorylierung gemessen. Die Verwendung von rekombinantem, membranständigen IL-7RA führte in CD4⁺ T-Lymphozyten erst bei sehr hohen Konzentrationen (5 µg/mL) zu einer leichten Abschwächung der IL-7-vermittelten STAT5 Phosphorylierung. Demgegenüber wurde mit der gleichen IL-7 Konzentration und einer ähnlichen Konzentration an löslichem IL-7RA (aus HEK 293 Zellen gewonnen) eine 50%ige Verringerung der STAT5 Phosphorylierung erzielt. Obwohl sowohl die von R&D erworbene, rekombinante, membranständige IL-7RA Isoform als auch die selbstgenerierte, lösliche IL-7RA Isoform in eukaryotischen Zellen exprimiert wurde, ist es möglich, dass sich die Proteine aufgrund von posttranslationalen Modifikationen unterscheiden. Da dies jedoch ungewiss ist, bleiben die gefundenen Unterschiede in der Affinität der beiden Isoformen ungeklärt. Auch in einer zeitgleich zu dieser Arbeit veröffentlichten Studie zur funktionellen Relevanz des löslichen IL-7RA bei HIV wurde die Verminderung der STAT5 Phosphorylierung in Gegenwart des löslichen IL-7RA demonstriert (151). In der genannten Arbeit wurde auch rekombinanter, membranständiger IL-7RA von R&D zum Blockieren der STAT5 Phosphorylierung verwendet. Allerdings gelang es Crawley und Kollegen, mit deutlich geringeren Konzentrationen an rekombinantem IL-7RA (1 µg/mL) bei erheblich höheren IL-7 Konzentrationen (1000 pg/mL) eine Abschwächung der STAT5 Phosphorylierung zu zeigen. Eine Grund, warum in dieser Arbeit höhere IL-7RA Konzentrationen verwendet werden mussten, um ähnliche Effekte zu erzielen, könnten Unterschiede in der Bioaktivität des verwendeten IL-7 gewesen sein.

Diskussion

Im humanen System liegt zwischen IL-7 und dem löslichen IL-7R ein Konzentrationsunterschied von etwa 1 zu 10.000 vor. Da sowohl in dieser Arbeit als auch in der Arbeit von Crawley und Kollegen mit einem Konzentrationsunterschied zwischen IL-7 und dem IL-7RA von 1/1000 bis 1/50.000 eine 7-30%ige Verringerung der STAT5 Phosphorylierung erzielt wurde, ist davon auszugehen, dass der lösliche IL-7RA auch *in vivo* die IL-7-vermittelte STAT5 Phosphorylierung blockiert.

Um zu überprüfen, ob die verringerte STAT5 Phosphorylierung Auswirkungen auf die Homeostase bzw. Proliferation von PBMCs hat, wurde die Proliferation von PBMCs von Trägern unterschiedlicher Haplotypen in Gegenwart von autologem Serum gemessen. Dabei zeigte sich, dass PBMCs von Trägern des Risikohaplotypen eine geringere Proliferationsrate aufwiesen als PBMCs von Trägern des protektiven Haplotypen. Es ist anzunehmen, dass bei Trägern des Risikohaplotypen ein Großteil des IL-7 an den löslichen IL-7RA gebunden ist, sodass den PBMCs weniger IL-7 zur Verfügung steht und somit auch die Proliferation verringert ist. Auch Hartgring und Kollegen (152) gelang es in einem ähnlichen Experiment, einen Einfluss des löslichen IL-7RA auf die Proliferation zu zeigen. Sie stimulierten PBMCs von Patienten mit RA mit unterschiedlichen Dosen IL-7 (0-10 ng/mL) in Gegenwart verschiedener rekombinanter IL-7RA Konzentrationen (0-10 µg/mL). Sie zeigten, dass die Zugabe von rekombinantem IL-7RA eine deutliche Reduktion der IL-7-induzierten Proliferation bewirkte. Beide Ergebnisse zeigen, dass der lösliche IL-7RA und somit auch der IL-7RA Haplotyp einen Einfluss auf die IL-7-vermittelte Proliferation von T-Zellen hat.

5.5 Wie könnte der erhöhte lösliche IL-7RA Serumspiegel des Risikohaplotypen die Suszeptibilität für MS erhöhen?

IL-7 ist essentiell für das Überleben und die Homeostase von T-Lymphozyten. Klinische Studien haben gezeigt, dass die Gabe von subphysiologischen Dosen an IL-7 vor allem zur Expansion des naiven CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellkompartiments sowie von RTEs führt (153, 154). Demgegenüber bleibt die Frequenz der regulatorischen T-Zellen unverändert.

Bei Patienten mit RA ist bekannt, dass diese höhere IL-7 Serumkonzentrationen besitzen als HDs (155–157). Und auch in der Gelenkflüssigkeit ist die IL-7 Konzentration von Patienten mit RA gegenüber von Patienten mit Arthrose deutlich erhöht (158). Zudem zeigten van Roon und Kollegen, dass die IL-7 Serumkonzentration mit der Krankheitsaktivität korreliert (157). So korreliert die IL-7 Expression mit dem Tumornekrosefaktor- α (TNF α) –Level und der Frequenz an CD68⁺ Makrophagen. Interessanterweise korreliert bei Patienten mit RA auch die lösliche IL-

Diskussion

7RA Konzentration in der Gelenkflüssigkeit mit der Krankheitsaktivität (159). Badot und Kollegen (160) zeigten, dass der Großteil des löslichen IL-7RA nicht, wie bei MS vermutet, von CD4⁺ T-Lymphozyten sezerniert wird, sondern durch in den Gelenken ansässige Fibroblasten exprimiert wird. *In vitro* Experimente von IL-7-stimulierten PBMCs ergaben, dass der rekombinante IL-7RA die Interferon gamma Produktion um 64% senkt und somit die T_H1 Zell Aktivität verringert (152, 160). Moret und Kollegen (159) schlussfolgerten aus den bekannten Daten, dass die erhöhte lösliche IL-7RA Konzentration eine immunmodulatorische Funktion besitzt und als Biomarker genutzt werden könnte, da sie auf eine Erhöhung der IL-7 Konzentration hindeutet. Auch im Mausmodell der RA führte die Blockade des membranständigen IL-7RA zu einem abgeschwächten Verlauf der RA mit einer radiologisch nachweisbaren Reduktion der Gelenkentzündungen (161). Ein ähnlicher Effekt wurde im Mausmodell des SLE beschrieben. Auch hier bewirkte die Gabe eines Anti-IL-7RA Antikörpers, unabhängig vom Zeitpunkt der Verabreichung, eine Reduktion der T-Zell-Aktivierung (162). Die Erkenntnisse über die Rolle von IL-7 und des IL-7RA bei RA und SLE deuten darauf hin, dass erhöhte IL-7 Level zur Autoimmunität führen können.

Auch im EAE-Modell führt die Verabreichung subphysiologischer Dosen rekombinanten IL-7 zu einer Verschlechterung des Verlaufs, wohingegen die Gabe eines gegen den membranständigen IL-7RA gerichteten Antikörpers zu einem milderen Verlauf führt (163). Der Vergleich der IL-7 Plasmaspiegel zwischen MS-Patienten und HDs zeigte, dass dieser bei MS-Patienten leicht erhöht ist (164). Zudem zeigten Lee und Kollegen (163), dass hohe IL-7 Serumkonzentrationen unabhängig von Interleukin-12 (IL-12) die Differenzierung von naiven, humanen CD4⁺ T-Lymphozyten in T_H1-Zellen bewirken können. Da gemeinhin angenommen wird, dass CD4⁺ T-Lymphozyten des T_H1 Typs eine Schlüsselfunktion bei der MS spielen (11) deuten diese Erkenntnisse darauf hin, dass hohe IL-7 Serumkonzentrationen die Entstehung von MS begünstigen oder bzw. und die Schwere der MS beeinflussen.

Träger des Risikohaplotypen besitzen verglichen mit Trägern des protektiven Haplotypen erhöhte IL-7RA Serumspiegel und weisen eine verringerte Proliferation von PBMCs auf.

Dies steht im Widerspruch zu dem oben beschriebenen, regulatorischen Effekt von Anti-IL-7RA Antikörpern. Daher stellt sich die Frage, wie der erhöhte lösliche IL-7RA Spiegel sowie die blockierende Wirkung des löslichen IL-7RA und die verringerte Proliferation von PBMCs des Risikohaplotypen mit den oben beschriebenen Erkenntnissen über die Rolle von IL-7 bei RA, SLE sowie MS zu vereinbaren ist und zu einem erhöhten MS-Risiko führen kann.

Diskussion

Die Korrelation zwischen löslichem IL-7RA und IL-7RA Haplotyp wurde auch in HDs und HIV-Patienten gefunden (140, 165) und ist daher unabhängig von MS. Zudem scheinen erhöhte IL-7RA Serumkonzentrationen eher eine immunsupprimierende Funktion zu besitzen als eine immunaktivierende. Daher ist ein direkter Einfluss der löslichen IL-7RA Konzentration auf die Pathogenese bzw. Schwere der MS eher unwahrscheinlich.

Eine Möglichkeit für die erhöhte Suszeptibilität des Risikohaplotypen wäre, dass diese, wie schon anfangs diskutiert, ausschließlich auf eine leicht veränderte Oberflächenexpression des IL-7RA zurückzuführen ist. So könnte die leicht veränderte Expression des IL-7RA auf plasmazytoiden DC und Tregs zu einer Dysfunktion der Immunregulation bzw. der CD4⁺ T-Zell induzierten Proliferation führen und somit die Empfänglichkeit für MS beeinflussen.

Eine zweite Möglichkeit wäre, dass der lösliche IL-7RA die Bioverfügbarkeit des IL-7 verändert. So könnte es sein, dass der lösliche IL-7RA durch Bindung von IL-7 die IL-7 Konzentration in der Peripherie senkt und das gebundene IL-7 erst lokal, z.B. im Thymus oder in Entzündungsläsionen durch Veränderung des pH-Werts wieder freigibt. Diese hohen, lokalen IL-7 Konzentrationen könnten dann die T-Zellentwicklung beeinflussen und so die Generierung von autoreaktiven T-Zellen begünstigen. Zudem wäre es möglich, dass durch die Bindung des IL-7 an den löslichen IL-7RA die Halbwertszeit des IL-7 verlängert wird. Eine ähnliche Funktion wird auch der extrazellulären Matrix zugesprochen (166). Sie ist in der Lage, über Heparansulfat und Fibronectin große Mengen IL-7 zu binden. Eine negative Korrelation zwischen der IL-7 und der IL-7RA Konzentration konnte weder in dieser noch in anderen Arbeiten (96) gefunden werden, da die verfügbaren ELISA sowohl gebundenes als auch freies IL-7 messen.

Eine dritte Möglichkeit, wie der Risikohaplotyp die Suszeptibilität für MS erhöhen könnte, wurde schon 2007 von Gregory und Kollegen (56) angedacht. Die Verminderung der IL-7-vermittelten STAT5 Phosphorylierung sowie die damit einhergehende verringerte Proliferation von PBMCs könnte die Anfälligkeit von Trägern des Risikohaplotypen für virale und bakterielle Infekte erhöhen. Viruserkrankungen wie EBV stehen im Verdacht mit MS assoziiert zu sein. Daher könnte eine erhöhte Anfälligkeit für virale Infektionen die Suszeptibilität für MS erhöhen.

IL-7 spielt eine entscheidende Rolle bei der Beseitigung viraler Infekte. Mäuse, die mit dem Lymphozytären Choriomeningitis Virus (LCMV) Klon 13 infiziert sind, haben eine anhaltend hohe Virämie (167). Pellegrini und Kollegen (167) zeigten, dass eine dreiwöchige IL-7 Therapie zur Beseitigung des Virus aus chronisch befallenen

Diskussion

Organen wie Leber und Milz führte. Die IL-7 Therapie führte neben einem massiven Anstieg der T-Lymphozyten-Anzahl zu einer Veränderung des Zytokinprofils. So stieg das Serumlevel von proinflammatorischen Zytokinen wie IL-6, IL-17 und IFN- γ stark an. Gleichzeitig wurde aber die Gewebeschädigung (vor allem der Leber) durch den Anstieg der IL-22 Konzentration verhindert. Zudem zeigten die Autoren, dass die Gabe von IL-7 indirekt zur Repression von SOCS3 führte und so die Beseitigung des Virus ermöglichte.

Für eine erhöhte Prädisposition von Trägern bestimmter IL-7RA Haplotypen für chronische Virusinfektionen spricht auch, dass sich die Anzahl der CD4⁺ T-Lymphozyten bei HIV-Patienten des protektiven Haplotypen nach einer antiretroviralen Therapie schneller erholte als bei Patienten der anderen Haplotypen (165).

Die Summe der bisherigen Ergebnisse spricht also für den zuletzt diskutierten Mechanismus. Demnach würde eine hohe IL-7RA Serumkonzentration bei Trägern des Risikohaplotypen zu einer Verringerung des verfügbaren IL-7 führen und somit die Anfälligkeit für bestimmte Viruserkrankungen, die mit MS assoziiert sind, erhöhen. Jedoch ist zu betonen, dass diese virusbasierte Hypothese bisher nur auf voneinander unabhängigen Beobachtungen beruht. Zur Überprüfung, ob die gemachten Beobachtungen zusammenhängen und wie sie die Suszeptibilität für MS beeinflussen, ist daher noch eine Vielzahl weiterer Experimente nötig.

5.6 Schlussfolgerung

Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen der funktionellen Relevanz unterschiedlicher IL-7RA Haplotypen für die Pathogenese und Ätiologie der MS führten zur Entdeckung von erhöhten löslichen IL-7RA Konzentrationen im Serum von Trägern des Risikohaplotypen. Des Weiteren wurde ein direkter inhibitorischer Effekt der erhöhten löslichen IL-7RA Serumkonzentration auf die Phosphorylierung von STAT5 und die Proliferation von PBMCs nachgewiesen. Zusammen mit schon bekannten Daten, legen diese eine erhöhte Anfälligkeit von Trägern des Risikohaplotypen für virale Infekte und somit ein erhöhtes MS-Risiko nahe.

Des Weiteren wurden in dieser Arbeit leichte, nicht signifikante, Unterschiede in der Oberflächenexpression des IL-7RA auf verschiedenen T-Lymphozyten Subtypen sowie DCs gezeigt. Diese könnten zu einer veränderten Immunregulation führen.

Die Genexpressionsanalyse zeigte keine signifikanten haplotypabhängigen Unterschiede. Jedoch ergab die nicht-überwachte Ballungsanalyse der Gene, die sowohl einen starken haplotypabhängigen Unterschied als auch eine signifikante Antwort auf die IL-7 Stimulation zeigten eine erstaunlich klare, haplotypabhängige

Diskussion

Gensignatur. Daher ist davon auszugehen, dass sich die Haplotypen in vielen weiteren, bisher unbeschriebenen, funktionellen Aspekten unterscheiden.

6 Zusammenfassung – Summary

6.1 English summary

Multiple sclerosis (MS) is an autoimmune-mediated inflammatory and demyelinating disease of the central nervous system. The causes of MS are still poorly understood, but it is assumed that MS is mediated by factors that lead to the loss of immune tolerance and the dysregulation of immune homeostasis. The risk to develop MS depends on a complex interplay of genetic and environmental factors. Most of the genetic risk is covered in the human leukocyte antigen (HLA) class two region, namely by DRB1*15:01 and DRB5*01:01 genes. Genome wide association studies (GWAS) were able to demonstrate the association of different non HLA-genes with MS. One of them is the interleukin-7 receptor alpha (IL-7RA). The interleukin 7 receptor (IL-7R) is essential for the development and homeostasis of T cells in humans. Compelling evidence indicates an association between IL-7RA haplotypes and the ratio of membrane bound to soluble IL-7RA encoding mRNA-transcript.

The aim of this work was to investigate the functional role of the IL-7RA haplotypes on the pathogenesis of MS. Therefore 484 MS patients and 310 healthy donors from Hamburg were genotyped for four previously described single nucleotide polymorphisms (SNP). Thereby the association of SNP rs6897932 with MS was confirmed.

The phenotypic characterisation of the IL-7RA haplotypes revealed slight, haplotype-dependent differences in the IL-7RA surface expression on different immune cell subtypes. MS patients carrying the protective haplotype showed a non-significantly higher IL-7RA expression on T-cells, natural killer cells and dendritic cells, than carriers of the risk haplotype.

The gene expression analysis of different IL-7RA isoforms in homozygous MS patients showed a significantly higher expression of transcripts encoding the soluble IL-7RA for carriers of the risk haplotype. To confirm these results on the level of protein expression a specific IL-7RA ELISA was established. Soluble IL-7RA level was significantly higher in serum from MS patients with the risk haplotype compared to MS patients with the protective haplotype.

Soluble IL-7RA significantly reduces IL-7-mediated STAT5 phosphorylation in CD4⁺ T cells. In addition an inhibitory effect of soluble IL-7RA on the proliferation was demonstrated. Microarray analysis of three IL-7RA haplotypes revealed a non significant but clearly haplotype-dependent, individual gene signature.

Altogether these results indicate that the IL-7RA haplotypes have a strong impact on the IL-7RA serum levels and thereby influence IL-7-mediated signalling and T cell proliferation. The knowledge gained from this study emphasises the need for further functional studies to understand the role of the IL-7RA in the complex genetic architecture of MS.

Zusammenfassung - Summary

6.2 Deutsche Zusammenfassung

Multiple Sklerose ist eine autoimmunvermittelte, inflammatorische und demyelinisierende Erkrankung des zentralen Nervensystems. Die Ursachen für die Erkrankung sind bisher weitestgehend unbekannt, aber es wird vermutet, dass MS von Faktoren ausgelöst wird, die zum Versagen der Immuntoleranz und zur Dysregulation der Immunhomeostase führen. Das Risiko MS zu entwickeln wird durch ein komplexes Zusammenspiel von genetischen Faktoren und Umweltfaktoren vermittelt. Der größte Teil des genetischen Risikos wird von der HLA (Human Leukocyte Antigen) Klasse II Region, vor allem den DRB1*15:01 und DRB5*01:01 Genen getragen. Genomweite Assoziationsstudien (GWAS) waren in der Lage, die Assoziation von unterschiedlichen nicht-HLA-Genen mit MS nachzuweisen. Eines von ihnen ist der Interleukin-7 Rezeptor Alpha (IL-7RA). Der Interleukin-7 Rezeptor ist essentiell für die Entwicklung und die Homeostase von T-Zellen in Menschen. Eine Vielzahl von Anhaltspunkten weist auf eine Assoziation zwischen dem Verhältnis von membrangebundenem zu löslichem IL-7RA kodierenden mRNA-Transkript und dem IL-7RA Haplotypen hin.

Das Ziel dieser Arbeit war es, die funktionelle Rolle der IL-7RA Haplotypen für die Pathogenese der MS zu untersuchen. Dafür wurden 484 MS-Patienten und 310 gesunde Kontrollen aus Hamburg für vier vorher beschriebene SNPs (single nucleotide polymorphisms) genotypisiert. Dabei wurde die Assoziation für den SNP rs6897932 bestätigt.

Die phänotypische Charakterisierung der IL-7RA Haplotypen wies leichte, haplotypabhängige Unterschiede in der Oberflächenexpression des IL-7RA auf unterschiedlichen Immunzellsubtypen auf. MS-Patienten, die Träger des protektiven Haplotypen sind, zeigten eine nicht-signifikant höhere IL-7RA Expression auf T-Zellen, natürlichen Killerzellen und dendritischen Zellen als Träger des Risikohaplotypen.

Die Genexpressionsanalyse unterschiedlicher IL-7RA Isoformen in homozygoten MS-Patienten zeigte eine signifikant höhere Expression des löslichen IL-7RA kodierenden Transkripts bei Trägern des Risikohaplotypen. Um die Ergebnisse auf der Proteinebene zu bestätigen, wurde ein IL-7RA ELISA etabliert. Das lösliche IL-7RA Level war im Serum von Patienten des Risikohaplotypen, verglichen mit dem von MS-Patienten des protektiven Haplotypen, signifikant erhöht.

Der lösliche IL-7RA reduziert die IL-7-vermittelte STAT5 Phosphorylierung in CD4⁺ T-Zellen. Zudem wurde ein inhibitorischer Effekt des löslichen IL-7RA auf die Proliferation demonstriert. Die Mikroarray-Analyse von drei IL-7RA Haplotypen zeigte eine nicht-signifikante, aber deutliche, haplotypabhängige, individuelle Gensignatur.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass die IL-7RA Haplotypen einen starken Einfluss auf die IL-7RA Serumlevel haben und dadurch IL-7-vermittelte Signale sowie die Proliferation in T-Zellen beeinflussen. Die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse betonen aber auch den Bedarf an weiteren funktionellen Studien, um die Rolle des IL-7RA in der komplexen genetischen Architektur der MS zu verstehen.

7 Literaturverzeichnis

1. D. L. Jacobson, S. J. Gange, N. R. Rose, N. M. Graham, Epidemiology and estimated population burden of selected autoimmune diseases in the United States., *Clinical immunology and immunopathology* **84**, 223-43 (1997).
2. C. C. Goodnow, J. Sprent, B. Fazekas de St Groth, C. G. Vinuesa, Cellular and genetic mechanisms of self tolerance and autoimmunity., *Nature* **435**, 590-7 (2005).
3. P. Marrack, J. Kappler, B. L. Kotzin, Autoimmune disease: why and where it occurs., *Nature medicine* **7**, 899-905 (2001).
4. J. H. Noseworthy, C. Lucchinetti, M. Rodriguez, B. G. Weinshenker, Multiple sclerosis., *The New England journal of medicine* **343**, 938-52 (2000).
5. A. Compston, A. Coles, Multiple sclerosis, *The Lancet* **372**, 1502-1517 (2008).
6. D. E. McFarlin, H. F. McFarland, Multiple sclerosis (first of two parts)., *The New England journal of medicine* **307**, 1183-8 (1982).
7. D. E. McFarlin, H. F. McFarland, Multiple sclerosis (second of two parts)., *The New England journal of medicine* **307**, 1246-51 (1982).
8. B. D. Trapp, K.-A. Nave, Multiple sclerosis: an immune or neurodegenerative disorder?, *Annual review of neuroscience* **31**, 247-69 (2008).
9. S. L. Hauser, J. R. Oksenberg, The neurobiology of multiple sclerosis: genes, inflammation, and neurodegeneration., *Neuron* **52**, 61-76 (2006).
10. A. Compston, A. Coles, Multiple sclerosis., *Lancet* **359**, 1221-31 (2002).
11. M. Sospedra, R. Martin, Immunology of multiple sclerosis., *Annual review of immunology* **23**, 683-747 (2005).
12. C. M. Poser et al., New diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines for research protocols., *Annals of neurology* **13**, 227-31 (1983).
13. W. I. McDonald et al., Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the diagnosis of multiple sclerosis., *Annals of neurology* **50**, 121-7 (2001).
14. C. H. Polman et al., Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the McDonald criteria., *Annals of neurology* **69**, 292-302 (2011).
15. R. D. Davenport, D. F. Keren, Oligoclonal bands in cerebrospinal fluids: significance of corresponding bands in serum for diagnosis of multiple sclerosis., *Clinical chemistry* **34**, 764-5 (1988).
16. H. Link, Y.-M. Huang, Oligoclonal bands in multiple sclerosis cerebrospinal fluid: an update on methodology and clinical usefulness., *Journal of neuroimmunology* **180**, 17-28 (2006).

Literaturverzeichnis

17. J. F. Kurtzke, Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS)., *Neurology* **33**, 1444-52 (1983).
18. J.-M. Charcot, Histologie de la sclerose en plaques, *Gazette des hopitaux, Paris* **41: 554–55** (1886).
19. K. R. Gudmundsson, Clinical studies of multiple sclerosis in Iceland. A follow-up of previous survey and reappraisal., *Acta neurologica Scandinavica. Supplementum* **48**, 1-78 (1971).
20. G. C. Ebers, Genetic factors in multiple sclerosis., *Neurologic clinics* **1**, 645-54 (1983).
21. A. D. Sadovnick, P. A. Baird, R. H. Ward, Multiple sclerosis: updated risks for relatives., *American journal of medical genetics* **29**, 533-41 (1988).
22. C. J. Willer, D. a Dymont, N. J. Risch, a D. Sadovnick, G. C. Ebers, Twin concordance and sibling recurrence rates in multiple sclerosis., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 12877-82 (2003).
23. a D. Sadovnick et al., A population-based study of multiple sclerosis in twins: update., *Annals of neurology* **33**, 281-5 (1993).
24. S. Naito, N. Namerow, M. R. Mickey, P. I. Terasaki, Multiple sclerosis: association with HL-A3., *Tissue antigens* **2**, 1-4 (1972).
25. C. Jersild, A. Svejgaard, T. Fog, HL-A antigens and multiple sclerosis., *Lancet* **1**, 1240-1 (1972).
26. C. Jersild et al., Histocompatibility determinants in multiple sclerosis, with special reference to clinical course., *Lancet* **2**, 1221-5 (1973).
27. O. Olerup, J. Hillert, HLA class II-associated genetic susceptibility in multiple sclerosis: a critical evaluation., *Tissue antigens* **38**, 1-15 (1991).
28. T. Olsson, J. Hillert, The genetics of multiple sclerosis and its experimental models., *Current opinion in neurology* **21**, 255-60 (2008).
29. T. W. Yeo et al., A second major histocompatibility complex susceptibility locus for multiple sclerosis., *Annals of neurology* **61**, 228-36 (2007).
30. B. Brynedal et al., HLA-A confers an HLA-DRB1 independent influence on the risk of multiple sclerosis., *PloS one* **2**, e664 (2007).
31. J. L. Haines et al., Linkage of the MHC to familial multiple sclerosis suggests genetic heterogeneity. The Multiple Sclerosis Genetics Group., *Human molecular genetics* **7**, 1229-34 (1998).
32. S. Sawcer et al., A high-density screen for linkage in multiple sclerosis., *American journal of human genetics* **77**, 454-67 (2005).

Literaturverzeichnis

33. The International Multiple Sclerosis Genetics Consortium and the Wellcome Trust Case Control Consortium 2 et al., Genetic risk and a primary role for cell-mediated immune mechanisms in multiple sclerosis, *Nature* **476**, 214-219 (2011).
34. A. Kempainen, S. Sawcer, A. Compston, Genome-wide association studies in multiple sclerosis: lessons and future prospects., *Briefings in functional genomics* **10**, 61-70 (2011).
35. The Australia and New Zealand Multiple Sclerosis Genetics Consortium (ANZgene), Genome-wide association study identifies new multiple sclerosis susceptibility loci on chromosomes 12 and 20., *Nature genetics* **41**, 824-8 (2009).
36. P. R. Burton et al., Association scan of 14,500 nonsynonymous SNPs in four diseases identifies autoimmunity variants., *Nature genetics* **39**, 1329-37 (2007).
37. The International Multiple Sclerosis Genetics Consortium et al., Risk alleles for multiple sclerosis identified by a genomewide study., *The New England journal of medicine* **357**, 851-62 (2007).
38. M. Comabella et al., Identification of a novel risk locus for multiple sclerosis at 13q31.3 by a pooled genome-wide scan of 500,000 single nucleotide polymorphisms., *PLoS one* **3**, e3490 (2008).
39. Y. S. Aulchenko et al., Genetic variation in the KIF1B locus influences susceptibility to multiple sclerosis., *Nature genetics* **40**, 1402-3 (2008).
40. S. E. Baranzini et al., Genome-wide association analysis of susceptibility and clinical phenotype in multiple sclerosis., *Human molecular genetics* **18**, 767-78 (2009).
41. P. L. De Jager et al., Meta-analysis of genome scans and replication identify CD6, IRF8 and TNFRSF1A as new multiple sclerosis susceptibility loci., *Nature genetics* **41**, 776-82 (2009).
42. E. Jakkula et al., Genome-wide Association Study in a High-Risk Isolate for Multiple Sclerosis Reveals Associated Variants in STAT3 Gene, *The American Journal of Human Genetics* **86**, 285-291 (2010).
43. S. Nischwitz et al., Evidence for VAV2 and ZNF433 as susceptibility genes for multiple sclerosis., *Journal of neuroimmunology* **227**, 162-6 (2010).
44. S. Sanna et al., Variants within the immunoregulatory CBLB gene are associated with multiple sclerosis., *Nature genetics* **42**, 495-7 (2010).
45. N. Risch, K. Merikangas, The future of genetic studies of complex human diseases., *Science (New York, N.Y.)* **273**, 1516-7 (1996).
46. The International Multiple Sclerosis Genetics Consortium, The expanding genetic overlap between multiple sclerosis and type I diabetes., *Genes and immunity* **10**, 11-4 (2009).
47. Wellcome Trust Case Control Consortium & The Australo-Anglo-American Spondylitis Consortium, Association scan of 14,500 nonsynonymous SNPs in four diseases identifies autoimmunity variants., *Nature genetics* **39**, 1329-37 (2007).

Literaturverzeichnis

48. M. Ban et al., Replication analysis identifies TYK2 as a multiple sclerosis susceptibility factor., *European journal of human genetics*: *EJHG* **17**, 1309-13 (2009).
49. I.-L. Mero et al., A rare variant of the TYK2 gene is confirmed to be associated with multiple sclerosis., *European journal of human genetics*: *EJHG* **18**, 502-4 (2010).
50. The International Multiple Sclerosis Genetics Consortium, Refining genetic associations in multiple sclerosis., *Lancet neurology* **7**, 567-9 (2008).
51. The International Multiple Sclerosis Genetics Consortium, Comprehensive follow-up of the first genome-wide association study of multiple sclerosis identifies KIF21B and TMEM39A as susceptibility loci., *Human molecular genetics* **19**, 953-62 (2010).
52. P. L. De Jager et al., The role of the CD58 locus in multiple sclerosis., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**, 5264-9 (2009).
53. I. a Hoppenbrouwers et al., Replication of CD58 and CLEC16A as genome-wide significant risk genes for multiple sclerosis., *Journal of human genetics* **54**, 676-80 (2009).
54. The International Multiple Sclerosis Genetics Consortium, IL12A, MPHOSPH9/CDK2AP1 and RGS1 are novel multiple sclerosis susceptibility loci., *Genes and immunity* **11**, 397-405 (2010).
55. F. Lundmark et al., Variation in interleukin 7 receptor alpha chain (IL7R) influences risk of multiple sclerosis., *Nature genetics* **39**, 1108-13 (2007).
56. S. G. Gregory et al., Interleukin 7 receptor alpha chain (IL7R) shows allelic and functional association with multiple sclerosis., *Nature genetics* **39**, 1083-91 (2007).
57. M. J. D'Netto et al., Risk alleles for multiple sclerosis in multiplex families., *Neurology* **72**, 1984-8 (2009).
58. R. Milo, E. Kahana, Multiple sclerosis: geoepidemiology, genetics and the environment., *Autoimmunity reviews* **9**, A387-94 (2010).
59. G. Dean, J. F. Kurtzke, On the risk of multiple sclerosis according to age at immigration to South Africa., *British medical journal* **3**, 725-9 (1971).
60. J. Correale, M. Fiol, W. Gilmore, The risk of relapses in multiple sclerosis during systemic infections., *Neurology* **67**, 652-9 (2006).
61. S. S. Soldan, S. Jacobson, Role of viruses in etiology and pathogenesis of multiple sclerosis., *Advances in virus research* **56**, 517-55 (2001).
62. R. T. Johnson, The virology of demyelinating diseases., *Annals of neurology* **36 Suppl**, S54-60 (1994).
63. P. F. Bray, L. C. Bloomer, V. C. Salmon, M. H. Bagley, P. D. Larsen, Epstein-Barr virus infection and antibody synthesis in patients with multiple sclerosis., *Archives of neurology* **40**, 406-8 (1983).

Literaturverzeichnis

64. P. D. Larsen, L. C. Bloomer, P. F. Bray, Epstein-Barr nuclear antigen and viral capsid antigen antibody titers in multiple sclerosis, *Neurology* **35**, 435- (1985).
65. K. Wandinger et al., Association between clinical disease activity and Epstein-Barr virus reactivation in MS., *Neurology* **55**, 178-84 (2000).
66. E. L. Thacker, F. Mirzaei, A. Ascherio, Infectious mononucleosis and risk for multiple sclerosis: a meta-analysis., *Annals of neurology* **59**, 499-503 (2006).
67. H. Lassmann, G. Niedobitek, F. Aloisi, J. M. Middeldorp, Epstein-Barr virus in the multiple sclerosis brain: a controversial issue--report on a focused workshop held in the Centre for Brain Research of the Medical University of Vienna, Austria., *Brain: a journal of neurology* **134**, 2772-2786 (2011).
68. K. Ruprecht, [Multiple sclerosis and Epstein-Barr virus: new developments and perspectives]., *Der Nervenarzt* **79**, 399-407 (2008).
69. A. Ascherio, K. L. Munger, K. C. Simon, Vitamin D and multiple sclerosis., *Lancet neurology* **9**, 599-612 (2010).
70. A. K. Hedström, M. Bäärnhielm, T. Olsson, L. Alfredsson, Tobacco smoking, but not Swedish snuff use, increases the risk of multiple sclerosis., *Neurology* **73**, 696-701 (2009).
71. M. a Hernán et al., Cigarette smoking and the progression of multiple sclerosis., *Brain: a journal of neurology* **128**, 1461-5 (2005).
72. J. M. Goverman, Immune tolerance in multiple sclerosis., *Immunological reviews* **241**, 228-40 (2011).
73. W. Sibley, C. Bamford, K. Clark, CLINICAL VIRAL INFECTIONS AND MULTIPLE SCLEROSIS, *The Lancet* **325**, 1313-1315 (1985).
74. R. S. Fujinami, M. G. von Herrath, U. Christen, J. L. Whitton, Molecular mimicry, bystander activation, or viral persistence: infections and autoimmune disease., *Clinical microbiology reviews* **19**, 80-94 (2006).
75. C. Münz, J. D. Lünemann, M. T. Getts, S. D. Miller, Antiviral immune responses: triggers of or triggered by autoimmunity?, *Nature reviews. Immunology* **9**, 246-58 (2009).
76. J. Goverman, Autoimmune T cell responses in the central nervous system., *Nature reviews. Immunology* **9**, 393-407 (2009).
77. J. Burns, A. Rosenzweig, B. Zweiman, R. P. Lisak, Isolation of myelin basic protein-reactive T-cell lines from normal human blood., *Cellular immunology* **81**, 435-40 (1983).
78. J. R. Richert, D. E. McFarlin, J. W. Rose, H. F. McFarland, J. I. Greenstein, Expansion of antigen-specific T cells from cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis., *Journal of neuroimmunology* **5**, 317-24 (1983).

Literaturverzeichnis

79. R. Martin et al., Fine specificity and HLA restriction of myelin basic protein-specific cytotoxic T cell lines from multiple sclerosis patients and healthy individuals., *Journal of immunology (Baltimore, Md. □: 1950)* **145**, 540-8 (1990).
80. B. Bielekova et al., Encephalitogenic potential of the myelin basic protein peptide (amino acids 83-99) in multiple sclerosis: results of a phase II clinical trial with an altered peptide ligand., *Nature medicine* **6**, 1167-75 (2000).
81. C. B. Pettinelli, D. E. McFarlin, Adoptive transfer of experimental allergic encephalomyelitis in SJL/J mice after in vitro activation of lymph node cells by myelin basic protein: requirement for Lyt 1+ 2- T lymphocytes., *Journal of immunology (Baltimore, Md. □: 1950)* **127**, 1420-3 (1981).
82. L. S. Madsen et al., A humanized model for multiple sclerosis using HLA-DR2 and a human T-cell receptor., *Nature genetics* **23**, 343-7 (1999).
83. J. A. Quandt et al., Unique clinical and pathological features in HLA-DRB1*0401-restricted MBP 111-129-specific humanized TCR transgenic mice., *The Journal of experimental medicine* **200**, 223-34 (2004).
84. M. A. Friese et al., Opposing effects of HLA class I molecules in tuning autoreactive CD8+ T cells in multiple sclerosis., *Nature medicine* **14**, 1227-35 (2008).
85. M. J. McGeachy et al., The interleukin 23 receptor is essential for the terminal differentiation of interleukin 17-producing effector T helper cells in vivo., *Nature immunology* **10**, 314-24 (2009).
86. D. J. Cua et al., Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain., *Nature* **421**, 744-8 (2003).
87. M. Noguchi et al., Interleukin-2 receptor gamma chain: a functional component of the interleukin-7 receptor., *Science (New York, N.Y.)* **262**, 1877-80 (1993).
88. M. Kondo et al., Functional participation of the IL-2 receptor gamma chain in IL-7 receptor complexes., *Science (New York, N.Y.)* **263**, 1453-4 (1994).
89. R. He, R. S. Geha, Thymic stromal lymphopoietin., *Annals of the New York Academy of Sciences* **1183**, 13-24 (2010).
90. M. J. Palmer et al., Interleukin-7 receptor signaling network: an integrated systems perspective., *Cellular & molecular immunology* **5**, 79-89 (2008).
91. Y. Rochman, R. Spolski, W. J. Leonard, New insights into the regulation of T cells by gamma(c) family cytokines., *Nature reviews. Immunology* **9**, 480-90 (2009).
92. R. Mazzucchelli, S. K. Durum, Interleukin-7 receptor expression: intelligent design., *Nature reviews. Immunology* **7**, 144-54 (2007).
93. Q. Jiang et al., Cell biology of IL-7, a key lymphotrophin., *Cytokine & growth factor reviews* **16**, 513-33 (2005).

Literaturverzeichnis

94. G. Nunnari et al., Exogenous IL-7 induces Fas-mediated human neuronal apoptosis: potential effects during human immunodeficiency virus type 1 infection., *Journal of neurovirology* **11**, 319-28 (2005).
95. R. G. Goodwin et al., Cloning of the human and murine interleukin-7 receptors: demonstration of a soluble form and homology to a new receptor superfamily., *Cell* **60**, 941-51 (1990).
96. T. Rose, O. Lambotte, C. Pallier, J.-F. Delfraissy, J.-H. Colle, Identification and biochemical characterization of human plasma soluble IL-7R: lower concentrations in HIV-1-infected patients., *Journal of immunology (Baltimore, Md. □: 1950)* **182**, 7389-97 (2009).
97. F. Olosz, T. R. Malek, Three loops of the common gamma chain ectodomain required for the binding of interleukin-2 and interleukin-7., *The Journal of biological chemistry* **275**, 30100-5 (2000).
98. S. E. Ziegler et al., Reconstitution of a functional interleukin (IL)-7 receptor demonstrates that the IL-2 receptor gamma chain is required for IL-7 signal transduction., *European journal of immunology* **25**, 399-404 (1995).
99. W. W. Overwijk, K. S. Schluns, Functions of gammaC cytokines in immune homeostasis: current and potential clinical applications., *Clinical immunology (Orlando, Fla.)* **132**, 153-65 (2009).
100. C. Kittipatarin, A. R. Khaled, Interlinking interleukin-7., *Cytokine* **39**, 75-83 (2007).
101. S. E. Johnson, N. Shah, A. a Bajer, T. W. LeBien, IL-7 activates the phosphatidylinositol 3-kinase/AKT pathway in normal human thymocytes but not normal human B cell precursors., *Journal of immunology (Baltimore, Md. □: 1950)* **180**, 8109-17 (2008).
102. W. Q. Li et al., IL-7 promotes T cell proliferation through destabilization of p27Kip1., *The Journal of experimental medicine* **203**, 573-82 (2006).
103. C. M. Henriques, R. J. Nibbs, G. J. Graham, IL-7 induces rapid clathrin-mediated internalization and JAK3-dependent degradation of IL-7R α in T cells, *Meta* **115**, 3269-3277 (2010).
104. J.-H. Park et al., Suppression of IL7Ralpha transcription by IL-7 and other prosurvival cytokines: a novel mechanism for maximizing IL-7-dependent T cell survival., *Immunity* **21**, 289-302 (2004).
105. N. L. Alves, E. M. M. van Leeuwen, I. a M. Derks, R. a W. van Lier, Differential regulation of human IL-7 receptor alpha expression by IL-7 and TCR signaling., *Journal of immunology (Baltimore, Md. □: 1950)* **180**, 5201-10 (2008).
106. R. Starr, D. J. Hilton, SOCS: suppressors of cytokine signalling., *The international journal of biochemistry & cell biology* **30**, 1081-5 (1998).
107. A. Yoshimura, T. Naka, M. Kubo, SOCS proteins, cytokine signalling and immune regulation., *Nature reviews. Immunology* **7**, 454-65 (2007).

Literaturverzeichnis

108. A. E. Namen et al., Stimulation of B-cell progenitors by cloned murine interleukin-7., *Nature* **333**, 571-3 (1988).
109. M. A. Oosterwegel, M. C. Haks, U. Jeffry, R. Murray, A. M. Kruisbeek, Induction of TCR gene rearrangements in uncommitted stem cells by a subset of IL-7 producing, MHC class-II-expressing thymic stromal cells., *Immunity* **6**, 351-60 (1997).
110. W. Dc, Vascular cell adhesion molecule 1-positive reticular cells express interleukin-7 and stem cell factor in the bone marrow, , 2661-2671 (2011).
111. M. Watanabe et al., Interleukin 7 is produced by human intestinal epithelial cells and regulates the proliferation of intestinal mucosal lymphocytes., *The Journal of clinical investigation* **95**, 2945-53 (1995).
112. C. Heufler et al., Interleukin 7 is produced by murine and human keratinocytes., *The Journal of experimental medicine* **178**, 1109-14 (1993).
113. R. Kröncke, H. Loppnow, H. D. Flad, J. Gerdes, Human follicular dendritic cells and vascular cells produce interleukin-7: a potential role for interleukin-7 in the germinal center reaction., *European journal of immunology* **26**, 2541-4 (1996).
114. R. V. Sorg, A. D. McLellan, B. D. Hock, D. B. Fearnley, D. N. Hart, Human dendritic cells express functional interleukin-7., *Immunobiology* **198**, 514-26 (1998).
115. B. de Saint-Vis et al., The cytokine profile expressed by human dendritic cells is dependent on cell subtype and mode of activation., *Journal of immunology (Baltimore, Md. □: 1950)* **160**, 1666-76 (1998).
116. U. von Freeden-Jeffry et al., Lymphopenia in interleukin (IL)-7 gene-deleted mice identifies IL-7 as a nonredundant cytokine., *The Journal of experimental medicine* **181**, 1519-26 (1995).
117. J. J. Peschon et al., Early lymphocyte expansion is severely impaired in interleukin 7 receptor-deficient mice., *The Journal of experimental medicine* **180**, 1955-60 (1994).
118. W. J. Leonard, Cytokines and immunodeficiency diseases., *Nature reviews. Immunology* **1**, 200-8 (2001).
119. R. H. Buckley, Molecular defects in human severe combined immunodeficiency and approaches to immune reconstitution., *Annual review of immunology* **22**, 625-55 (2004).
120. Y. K. Parrish et al., IL-7 Dependence in human B lymphopoiesis increases during progression of ontogeny from cord blood to bone marrow., *Journal of immunology (Baltimore, Md. □: 1950)* **182**, 4255-66 (2009).
121. K. Johnson et al., Regulation of immunoglobulin light-chain recombination by the transcription factor IRF-4 and the attenuation of interleukin-7 signaling., *Immunity* **28**, 335-45 (2008).

Literaturverzeichnis

122. K. Kikuchi, A. Y. Lai, C.-L. Hsu, M. Kondo, IL-7 receptor signaling is necessary for stage transition in adult B cell development through up-regulation of EBF., *The Journal of experimental medicine* **201**, 1197-203 (2005).
123. A. E. Corcoran, A. Riddell, D. Kroshoop, A. R. Venkitaraman, Impaired immunoglobulin gene rearrangement in mice lacking the IL-7 receptor., *Nature* **391**, 904-7 (1998).
124. T. Sudo et al., Expression and function of the interleukin 7 receptor in murine lymphocytes., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**, 9125-9 (1993).
125. A. R. Khaled et al., Bax deficiency partially corrects interleukin-7 receptor alpha deficiency., *Immunity* **17**, 561-73 (2002).
126. M. Pellegrini et al., Loss of Bim increases T cell production and function in interleukin 7 receptor-deficient mice., *The Journal of experimental medicine* **200**, 1189-95 (2004).
127. K. Akashi, M. Kondo, U. von Freeden-Jeffry, R. Murray, I. L. Weissman, Bcl-2 rescues T lymphopoiesis in interleukin-7 receptor-deficient mice., *Cell* **89**, 1033-41 (1997).
128. S. Candéias, K. Muegge, S. K. Durum, IL-7 receptor and VDJ recombination: trophic versus mechanistic actions., *Immunity* **6**, 501-8 (1997).
129. K. S. Schluns, W. C. Kieper, S. C. Jameson, L. Lefrançois, Interleukin-7 mediates the homeostasis of naïve and memory CD8 T cells in vivo., *Nature immunology* **1**, 426-32 (2000).
130. A. W. Goldrath et al., Cytokine requirements for acute and Basal homeostatic proliferation of naive and memory CD8+ T cells., *The Journal of experimental medicine* **195**, 1515-22 (2002).
131. M. Guimond et al., Interleukin 7 signaling in dendritic cells regulates the homeostatic proliferation and niche size of CD4+ T cells., *Nature immunology* **10**, 149-57 (2009).
132. J.-H. Park et al., "Coreceptor tuning": cytokine signals transcriptionally tailor CD8 coreceptor expression to the self-specificity of the TCR., *Nature immunology* **8**, 1049-59 (2007).
133. F. C. McKay et al., Haplotypes of the interleukin 7 receptor alpha gene are correlated with altered expression in whole blood cells in multiple sclerosis., *Genes and immunity* **9**, 1-6 (2008).
134. F. E. Munschauer, L. A. Hartrich, C. C. Stewart, L. Jacobs, Circulating natural killer cells but not cytotoxic T lymphocytes are reduced in patients with active relapsing multiple sclerosis and little clinical disability as compared to controls., *Journal of neuroimmunology* **62**, 177-81 (1995).

Literaturverzeichnis

135. D. W. Huang, B. T. Sherman, R. A. Lempicki, Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources., *Nature protocols* **4**, 44-57 (2009).
136. D. W. Huang, B. T. Sherman, R. A. Lempicki, Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists., *Nucleic acids research* **37**, 1-13 (2009).
137. M. Sombekke et al., Relevance of IL7R genotype and mRNA expression in Dutch patients with multiple sclerosis., *Multiple sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)* (2011), doi:10.1177/1352458511402411.
138. D. a Akkad et al., Variation in the IL7RA and IL2RA genes in German multiple sclerosis patients., *Journal of autoimmunity* **32**, 110-5 (2009).
139. B. Broux et al., Haplotype 4 of the multiple sclerosis-associated interleukin-7 receptor alpha gene influences the frequency of recent thymic emigrants., *Genes and immunity* **11**, 326-33 (2010).
140. E. Hoe et al., Functionally significant differences in expression of disease-associated IL-7 receptor alpha haplotypes in CD4 T cells and dendritic cells., *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **184**, 2512-7 (2010).
141. J. Haas et al., Prevalence of newly generated naive regulatory T cells (Treg) is critical for Treg suppressive function and determines Treg dysfunction in multiple sclerosis., *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **179**, 1322-30 (2007).
142. M.-C. Blom-Potar, F. Bugault, O. Lambotte, J.-F. Delfraissy, J. Thèze, Soluble IL-7Ralpha (sCD127) and measurement of IL-7 in the plasma of HIV patients., *Journal of acquired immune deficiency syndromes (1999)* **51**, 104-5 (2009).
143. S. Faucher et al., Development of a quantitative bead capture assay for soluble IL-7 receptor alpha in human plasma., *PloS one* **4**, e6690 (2009).
144. E. Hoe et al., Interleukin 7 receptor alpha chain haplotypes vary in their influence on multiple sclerosis susceptibility and response to interferon Beta. *Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research* **30**, 291-8 (2010).
145. J. Z. Qin et al., Interleukin-7 and interleukin-15 regulate the expression of the bcl-2 and c-myb genes in cutaneous T-cell lymphoma cells., *Blood* **98**, 2778-83 (2001).
146. Y. K. Lieu, A. Kumar, A. G. Pajeroski, T. J. Rogers, E. P. Reddy, Requirement of c-myb in T cell development and in mature T cell function., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 14853-8 (2004).
147. D. K. Hsu, H.-Y. Chen, F.-T. Liu, Galectin-3 regulates T-cell functions., *Immunological reviews* **230**, 114-27 (2009).
148. H.-R. Jiang et al., Galectin-3 deficiency reduces the severity of experimental autoimmune encephalomyelitis., *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **182**, 1167-73 (2009).

Literaturverzeichnis

149. F. C. McKay et al., CD127 immunophenotyping suggests altered CD4+ T cell regulation in primary progressive multiple sclerosis., *Journal of autoimmunity* **31**, 52-8 (2008).
150. E. Cretney et al., The transcription factors Blimp-1 and IRF4 jointly control the differentiation and function of effector regulatory T cells., *Nature immunology* **12**, 304-11 (2011).
151. A. M. Crawley, S. Faucher, J. B. Angel, Soluble IL-7R alpha (sCD127) inhibits IL-7 activity and is increased in HIV infection., *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **184**, 4679-87 (2010).
152. S. a Y. Hartgring et al., Elevated expression of interleukin-7 receptor in inflamed joints mediates interleukin-7-induced immune activation in rheumatoid arthritis., *Arthritis and rheumatism* **60**, 2595-605 (2009).
153. I. Sereti et al., IL-7 administration drives T cell-cycle entry and expansion in HIV-1 infection., *Blood* **113**, 6304-14 (2009).
154. C. Sportès et al., Administration of rhIL-7 in humans increases in vivo TCR repertoire diversity by preferential expansion of naive T cell subsets., *The Journal of experimental medicine* **205**, 1701-14 (2008).
155. F. De Benedetti et al., Elevated circulating interleukin-7 levels in patients with systemic juvenile rheumatoid arthritis., *The Journal of rheumatology* **22**, 1581-5 (1995).
156. J. a G. van Roon et al., Persistence of interleukin 7 activity and levels on tumour necrosis factor alpha blockade in patients with rheumatoid arthritis., *Annals of the rheumatic diseases* **66**, 664-9 (2007).
157. J. a G. van Roon, K. a F. M. Glaudemans, J. W. J. Bijlsma, F. P. J. G. Lafeber, Interleukin 7 stimulates tumour necrosis factor alpha and Th1 cytokine production in joints of patients with rheumatoid arthritis., *Annals of the rheumatic diseases* **62**, 113-9 (2003).
158. J. a G. van Roon et al., Increased intraarticular interleukin-7 in rheumatoid arthritis patients stimulates cell contact-dependent activation of CD4(+) T cells and macrophages., *Arthritis and rheumatism* **52**, 1700-10 (2005).
159. F. M. Moret, V. Badot, B. R. Lauwerys, J. a G. van Roon, Characterization of IL-7 and IL-7R in the pathogenesis of rheumatoid arthritis: Comment on the article by Pickens et al., *Arthritis and rheumatism* , 7-10 (2011).
160. V. Badot et al., Rheumatoid arthritis synovial fibroblasts produce a soluble form of the interleukin-7 receptor in response to pro-inflammatory cytokines., *Journal of cellular and molecular medicine* **15**, 2335-42 (2011).
161. S. A. Y. Hartgring et al., Blockade of the interleukin-7 receptor inhibits collagen-induced arthritis and is associated with reduction of T cell activity and proinflammatory mediators., *Arthritis and rheumatism* **62**, 2716-25 (2010).

Literaturverzeichnis

162. R. Gonzalez-Quintal et al., Systemic Autoimmunity and Lymphoproliferation Are Associated with Excess IL-7 and Inhibited by IL-7R α Blockade., *PloS one* **6**, e27528 (2011).
163. L.-F. Lee et al., IL-7 Promotes TH1 Development and Serum IL-7 Predicts Clinical Response to Interferon- in Multiple Sclerosis, *Science Translational Medicine* **3**, 93ra68-93ra68 (2011).
164. J. Haas, M. Korporal, A. Schwarz, B. Balint, B. Wildemann, The interleukin-7 receptor α chain contributes to altered homeostasis of regulatory T cells in multiple sclerosis. *European journal of immunology* **41**, 845-53 (2011).
165. R. Rajasuriar et al., Biological determinants of immune reconstitution in HIV-infected patients receiving antiretroviral therapy: the role of interleukin 7 and interleukin 7 receptor α and microbial translocation., *The Journal of infectious diseases* **202**, 1254-64 (2010).
166. C. L. Mackall, T. J. Fry, R. E. Gress, Harnessing the biology of IL-7 for therapeutic application., *Nature reviews. Immunology* **11**, 330-42 (2011).
167. M. Pellegrini et al., IL-7 engages multiple mechanisms to overcome chronic viral infection and limit organ pathology., *Cell* **144**, 601-13 (2011).

8 Anhang

8.1 Abkürzungsverzeichnis

AKT	Proteinkinase B
APC	antigenpräsentierende Zelle
APOBEC3G	apolipoprotein B mRNA-editing enzyme-catalytic polypeptide 3G
AS	Aminosäure
BAD	Bcl-2-antagonist of cell death
Bcl-2 (BCL2)	B-cell lymphoma 2
BSA	Rinderserumalbumin
CD	Cluster of Differentiation (Oberflächen-Differenzierungsantigen)
Cdc25	Phosphatase (cell division cycle 25)
Cdk	Cyclin-abhängige Kinasen
cDNA	komplementäre DNA
CIS	klinisch-isoliertes Syndrom
CLP	common lymphoid progenitor
DC	dendritische Zellen
DMSO	Dimethylsulfoxid
DN	doppelt negativ (T-Zelle)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DP	doppelt positiv (T-Zelle)
EAE	Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis
EBV	Epstein-Barr-Virus
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
FACS	fluorescence activated cell sorter
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FoxP3	Forkhead-Box-Protein P3
GLUT	Glukosetransporter
HD	gesunder Donor
HEK-cells	Human Embryonic Kidney-Zellen
HLA	Human Leukocyte Antigen
HWE	Hardy-Weinberg Gleichgewicht
IFN	Interferon
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
IL-2R	Interleukin-2 Rezeptor
IL-7R	Interleukin-7 Rezeptor

Anhang

IL-7RA (IL7RA)	Interleukin-7 Rezeptor Alpha
IM	Infektiöse Mononukleose
IMSGC	International Multiple Sclerosis Genetic Consortium
IRF4	Interferon regulierender Faktor 4
JAK	Januskinase
LD	Kopplungs-Ungleichgewicht
LGALS3	lösliches-Galactosid-bindendes Protein 3
MAF	Minor Allele Frequency
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MBP	Myelin-Basisches Protein
Mcl-1	myeloid-cell leukemia sequence 1
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
mRNA	messenger RNA
MRT	Magnetresonanztomographie
MS	Multiple Sklerose
MYB	Transkriptionsfaktor (Myeloblastose-Protein)
NKT-Zelle	natürliche Killer T-Zelle
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
OR	Odd Ratio (Quotenverhältnis)
P27 ^{kip1}	Cyclin abhängiger Kinasen-Inhibitor
PB	Pacific Blue
PBMC	mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PBS	phosphate buffered saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PE	Phycoerythrin
PE-Cy5.5	Phycoerythrin cyanine 5.5
PE-Cy7	Phycoerythrin cyanine 7
PerCP-Cy5.5	Peridinin chlorophyll protein complex cyanine 5.5
PFA	Paraformaldehyd
PHA	Polyhydroxyalkanoate
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PP-MS	primär-chronisch-progrediente MS
RA	Rheumatoide Arthritis
RNA	Ribonukleinsäure
RR-MS	schubförmig-remittierende MS
RT	Raumtemperatur

Anhang

RTE	Recent Thymic Emigrant
RT-PCR	real time PCR
SCID	severe combined immunodeficiency
SDS	Natriumdodecylsulfat
SH2	Src-homology 2
SLE	systemischer Lupus erythematodes
SNP	single nucleotide polymorphism
SOCS	suppressor of cytokine signalling
SP	einfach positiv (T-Zelle)
SP-MS	sekundär chronisch-progrediente MS
STAT	Signal Transducers and Activators of Transcription
TBE	TRIS-Borat-EDTA-Puffer
TCR	T-Zell-Antigenrezeptor
T _H	T-Helferzelle
TNF	Tumornekrosefaktor
Treg	regulatorische T-Zelle
TSLP	Thymus-Stroma-Lymphopoietin
VCAM-1	vascular cell adhesion molecule 1
ZNS	zentrales Nervensystem

8.1.1 Abkürzungen für Aminosäuren

Tabelle 39: Abkürzungen für Aminosäuren

Aminosäure	Abkürzung	Buchstabensymbol
Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Asparaginsäure	Asp	D
Cystein	Cys	C
Glutamin	Gln	Q
Glutaminsäure	Glu	E
Glycin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleuzin	Ile	I
Leuzin	Leu	L
Lysin	Lys	K
Methionin	Met	M
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S

Anhang

Aminosäure	Abkürzung	Buchstabensymbol
Threonin	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	V

8.1.2 Symbole für Nukleotide

Tabelle 40: Symbole für Nukleotide

Nukleotid	Abkürzung
Desoxyadenin	A
Desoxycytosin	C
Desoxyguanin	G
Desoxythymine	T

8.2 Vektorkarte

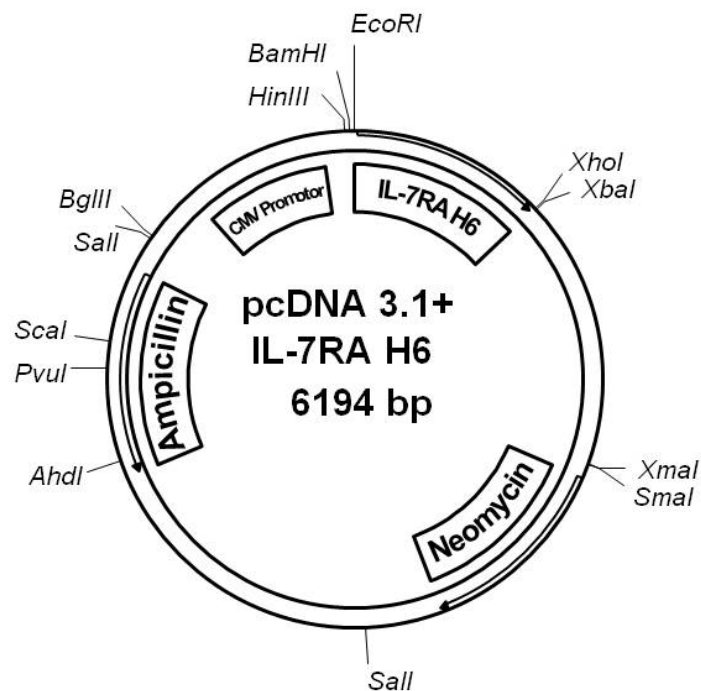


Abbildung 25 Das Plasmid pcDNA3.1/IL-7RA/H6 basiert auf dem Expressionsvektor pcDNA3.1+ (Invitrogen). Es ermöglicht die Expression des löslichen IL-7RA in eukaryotischen Zellen unter der Kontrolle des CMV-Promotors.

Anhang

Patienten (Pseudonym)	Haplotyp	Alter	Ge- schlecht	Verlaufs- form	EDSS	T- Zellen	FACS Analysis						IL-7 ELISA	RT- PCR
							Tregs	CD1c	CD141	CD303	NK-Zellen	IL-7RA ELISA		
BIVCO	Hap.2	47	f	PP-MS	4	-	-	-	-	-	-	●	-	●
BVPDLO	Hap.4	50	f	SP-MS	2	-	-	-	-	-	-	●	-	●
DWODUN	Hap.2	35	m	RR-MS	2,5	-	-	-	-	-	-	●	-	-
EQGNIK	Hap.2	61	m	RR-MS	6,5	-	-	-	-	-	-	●	-	-
ETOHTM	hetero.	59	f	PP-MS	7	-	-	-	-	-	-	●	-	-
FEVSTX	hetero.	58	m	RR-MS	6,5	-	-	-	-	-	-	●	-	-
FKGCFF	hetero.	55	f	PP-MS	7	-	-	-	-	-	-	●	-	-
FMGNKI	risk.	41	f	RR-MS	1	-	-	-	-	-	-	●	-	-
FOKKKM	prot.	70	m	PP-MS	4	-	-	-	-	-	-	●	●	-
FTPKPO	hetero.	66	m	SP-MS	4,5	-	-	-	-	-	-	●	-	-
GHYFLR	Hap.2	30	m	CIS	3	-	-	-	-	-	-	●	-	-
GPOPHB	hetero.	53	m	CIS	5,5	-	-	-	-	-	-	●	-	-
GQORMO	Hap.4	68	f	RR-MS	6	-	-	-	-	-	-	●	-	●
GQTKOO	Hap.2	44	f	PP-MS	0	-	-	-	-	-	-	●	-	-
GRHKMK	hetero.	48	f	RR-MS	4,5	-	-	-	-	-	-	●	-	-
GTDHUC	hetero.	52	f	SP-MS	5	-	-	-	-	-	-	●	-	-
GWOEQL	hetero.	37	m	RR-MS	0	-	-	-	-	-	-	●	-	-
GYTRQJ	prot.	36	f	SP-MS	5,5	-	-	-	-	-	-	●	●	●
HGNQLQ	Hap.2	32	f	PP-MS	0	-	-	-	-	-	-	●	-	●
HGTVRJ	prot.	51	f	RR-MS	5	-	-	-	-	-	-	●	-	-
HHBNMR	Hap.2	37	f	RR-MS	1,5	-	-	-	-	-	-	●	-	-
HIMSJM	hetero.	49	f	PP-MS	5	-	-	-	-	-	-	●	-	-
HMIEKL	Hap.2	51	f	RR-MS	0	-	-	-	-	-	-	●	-	-
HMNKHL	risk.	37	f	RR-MS	2	-	-	-	-	-	-	●	-	-
HNLGTD	Hap.2	30	f	PP-MS	1	-	-	-	-	-	-	●	-	●
HXGHJG	Hap.2	62	f	SP-MS	3	-	-	-	-	-	-	●	-	●

Anhang

Patienten (Pseudonym)	Haplotyp	Alter	Ge- schlecht	Verlaufs- form	EDSS	T- Zellen	Tregs	FACS Analysis				NK- Zellen	IL-7RA ELISA	IL-7 ELISA	RT- PCR
								CD141	CD303	CD1c	CD303				
IBTGMR	prot.	42	f	CIS	0	-	-	-	-	-	-	●	●	-	●
IDUSQN	hetero.	47	f	SP-MS	3	-	-	-	-	-	-	●	●	-	-
IGLMHO	hetero.	38	m	RR-MS	6,5	-	-	-	-	-	-	●	●	-	-
ITJWMM	hetero.	30	m	RR-MS	1	-	-	-	-	-	-	●	●	-	-
YRLTO	Hap.2	43	f	RR-MS	1	-	-	-	-	-	-	●	●	-	●
JCHXHB	prot.	45	m	PP-MS	3,5	-	-	-	-	-	-	●	●	-	-
JIFGPC	hetero.	57	m	SP-MS	6,5	-	-	-	-	-	-	●	●	-	-
JIKFHN	risk.	50	f	PP-MS	0	-	-	-	-	-	-	●	●	-	●
JIXNGT	risk.	48	f	SP-MS	3,5	-	-	-	-	-	-	●	●	-	-
JMSYPG	hetero.	50	f	RR-MS	2	-	-	-	-	-	-	●	●	-	-
JSBEEN	risk.	39	f	RR-MS	2	-	-	-	-	-	-	●	●	-	-
JSMHIJ	risk.	35	f	PP-MS	2	-	-	-	-	-	-	●	●	-	-
KISQRH	hetero.	76	f	RR-MS	4	-	-	-	-	-	-	●	●	-	-
KNRJJP	hetero.	55	f	PP-MS	4	-	-	-	-	-	-	●	●	-	-
KOLQLG	hetero.	48	f	SP-MS	7,5	-	-	-	-	-	-	●	●	-	-
LCSOPU	prot.	53	f	RR-MS	8	-	-	-	-	-	-	●	●	-	-
LGNVMW	hetero.	55	m	PP-MS	3,5	-	-	-	-	-	-	●	●	-	-
LHTIKP	hetero.	63	f	CIS	6,5	-	-	-	-	-	-	●	●	-	-
LJMGP	hetero.	40	m	SP-MS	1	-	-	-	-	-	-	●	●	-	-
LKSKJP	prot.	33	m	CIS	5,5	-	-	-	-	-	-	●	●	-	-
LLGPFV	hetero.	49	f	CIS	1,5	-	-	-	-	-	-	●	●	-	-
LNPTSM	hetero.	43	m	RR-MS	2	-	-	-	-	-	-	●	●	-	-
LOMTUN	hetero.	34	m	PP-MS	0	-	-	-	-	-	-	●	●	-	-
LOPOTK	hetero.	43	m	RR-MS	0	-	-	-	-	-	-	●	●	-	-
LPBILQ	Hap.4	36	m	SP-MS	1	-	-	-	-	-	-	●	●	-	●
MGMSNM	hetero.	49	f	RR-MS	2	-	-	-	-	-	-	●	●	-	-

Anhang

Patienten (Pseudonym)	Haplotyp	Alter	Ge- schlecht	Verlaufs- form	EDSS	T- Zellen	FACS Analysis					IL-7 ELISA	RT- PCR
							Tregs	CD141	CD303	NK-Zellen	IL-7RA ELISA		
MJMFG	hetero.	33	f	SP-MS	1	-	-	-	-	-	●	-	-
MJMLQL	hetero.	57	m	PP-MS	5	-	-	-	-	-	●	-	-
MMNRQF	Hap.2	45	m	RR-MS	2	-	-	-	-	-	●	-	●
MQFTB	hetero.	39	f	RR-MS	7	-	-	-	-	-	●	-	-
MRRMJM	hetero.	42	f	PP-MS	6	-	-	-	-	-	●	-	-
MUMLKR	hetero.	49	f	RR-MS	3	-	-	-	-	-	●	-	-
NDPFRN	Hap.4	57	f	RR-MS	8,5	-	-	-	-	-	●	-	●
NGKWNJ	hetero.	57	m	PP-MS	3	-	-	-	-	-	●	-	-
NHRXDQ	Hap.2	31	f	SP-MS	4	-	-	-	-	-	●	-	●
NMHMCM	Hap.2	54	m	CIS	3,5	-	-	-	-	-	●	-	-
NOIJK	hetero.	51	m	SP-MS	6	-	-	-	-	-	●	-	-
NWMFKK	hetero.	57	m	RR-MS	4	-	-	-	-	-	●	-	-
OKVSRO	hetero.	51	f	RR-MS	2,5	-	-	-	-	-	●	-	-
OLDEQQ	hetero.	43	f	RR-MS	2,5	-	-	-	-	-	●	-	-
OLGNSK	risk.	42	m	PP-MS	0	-	-	-	-	-	●	-	-
ONLFOO	hetero.	28	f	SP-MS	2	-	-	-	-	-	●	-	-
OOSVQM	Hap.2	44	f	PP-MS	0	-	-	-	-	-	●	-	-
OQPHMO	risk.	53	f	SP-MS	7	-	-	-	-	-	●	-	-
PGHJIL	Hap.2	29	f	RR-MS	1	-	-	-	-	-	●	-	-
PGJDDI	risk.	61	f	RR-MS	3	-	-	-	-	-	●	-	-
PHKIFR	hetero.	31	f	PP-MS	2	-	-	-	-	-	●	-	-
PHSPIG	Hap.2	34	f	RR-MS	2,5	-	-	-	-	-	●	-	-
PIILJM	hetero.	44	f	PP-MS	4	-	-	-	-	-	●	-	-
PIQNPJ	hetero.	23	f	SP-MS	0	-	-	-	-	-	●	-	-
PLIYSR	risk.	42	f	RR-MS	7	-	-	-	-	-	●	-	-
PPPVCJ	Hap.2	52	m	PP-MS	1	-	-	-	-	-	●	-	-

Anhang

Patienten (Pseudonym)	Haplotyp	Alter	Ge- schlecht	Verlaufs- form	EDSS	T- Zellen	FACS Analysis					NK- Zellen	IL-7RA ELISA	IL-7 ELISA	RT- PCR
							Tregs	CD1c	CD141	CD303					
PXQVPF	hetero.	47	f	CIS	3,5	-	-	-	-	-	-	●	-	-	-
QBVRIV	hetero.	48	f	SP-MS	3,5	-	-	-	-	-	-	●	-	-	-
QDQKLC	risk.	46	f	CIS	0	-	-	-	-	-	-	●	-	-	-
QJQEWJ	Hap.2	46	m	CIS	2	-	-	-	-	-	-	●	-	-	-
QKQEJI	Hap.2	44	f	RR-MS	2,5	-	-	-	-	-	-	●	-	-	●
QLGIRO	risk.	48	f	PP-MS	4,5	-	-	-	-	-	-	●	-	-	-
QLIJUN	risk.	44	m	RR-MS	1	-	-	-	-	-	-	●	●	-	-
QUHKXJ	hetero.	30	f	SP-MS	1	-	-	-	-	-	-	●	-	-	-
RGLQKF	risk.	36	f	RR-MS	2	-	-	-	-	-	-	●	●	-	-
RINOOM	hetero.	62	f	SP-MS	2,5	-	-	-	-	-	-	●	-	-	-
RNLPIJ	Hap.2	28	m	PP-MS	2,5	-	-	-	-	-	-	●	-	-	-
RNQPDN	prot.	67	f	RR-MS	6	-	-	-	-	-	-	●	●	-	-
SNFTMJ	prot.	48	m	RR-MS	5,5	-	-	-	-	-	-	●	-	-	-
SUTOSN	hetero.	24	f	PP-MS	1	-	-	-	-	-	-	●	-	-	-
THMROJ	hetero.	61	m	RR-MS	5	-	-	-	-	-	-	●	-	-	-
TIDJOM	hetero.	40	f	RR-MS	1	-	-	-	-	-	-	●	-	-	-
TIIRDG	hetero.	46	f	PP-MS	4	-	-	-	-	-	-	●	-	-	-
TILJXW	hetero.	43	f	SP-MS	6	-	-	-	-	-	-	●	-	-	-
TKSUIV	hetero.	48	f	CIS	2	-	-	-	-	-	-	●	-	-	-
TQMKRP	Hap.2	50	f	SP-MS	2,5	-	-	-	-	-	-	●	-	-	●
TSNTRS	hetero.	51	f	RR-MS	5	-	-	-	-	-	-	●	-	-	-
UENOSU	hetero.	53	f	RR-MS	2,5	-	-	-	-	-	-	●	-	-	-
UGDNIL	hetero.	53	f	RR-MS	3	-	-	-	-	-	-	●	-	-	-
UGOLLK	prot.	45	f	PP-MS	0	-	-	-	-	-	-	●	-	-	-
UJMHMS	hetero.	57	f	SP-MS	6,5	-	-	-	-	-	-	●	-	-	-
UHRKMN	hetero.	32	f	PP-MS	4	-	-	-	-	-	-	●	-	-	-

Anhang

8.4 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater und Betreuer Prof. Dr. Roland Martin für die Bereitstellung des interessanten Themas sowie die stetige Diskussionsbereitschaft. Er hat diese Arbeit mit seiner Erfahrung und seinen Ideen mit geformt und mich auch in schwierigen Situationen unterstützt.

Bedanken möchte ich mich auch bei PD Dr. Minka Breloer für das Übernehmen der Funktion des Zweitgutachters.

Bei Dr. Christian Schulze sowie Dr. Sabine Rösner möchte ich mich für die Hilfe bei der Auswertung des Mikroarrays sowie die Rekrutierung der Patienten und die moralische und fachliche Unterstützung während der letzten Jahre bedanken.

Bei Dr. Sabine Fleischer und Katja Husen möchte ich mich für ihr persönliches Engagement, besonders während des letzten Jahres, bedanken.

Ein großer Dank geht an das gesamte Team des „Inims“ für die nette, freundschaftliche Arbeitsatmosphäre, die gegenseitige Hilfe sowie die schönen letzten Jahre.

Darüber hinaus gilt ein großes Dankeschön meinen Freunden. Ihr habt in Zeiten, in denen nicht alles glatt lief, dafür gesorgt, dass ich den Kopf frei bekam und die wesentlichen Dinge im Auge behielt.

Des Weiteren möchte ich mich bei meinen Eltern und meiner Schwester für die Unterstützung sowie das Vertrauen in mich und den familiären Rückhalt bedanken. Ich bin froh, dass ich euch habe!

Ganz besonders möchte ich mich auch bei meiner Freundin Carmen bedanken, die immer an mich geglaubt und zu mir gehalten hat. Sie hat mich, wenn es einmal nicht so gut lief und ich das Vertrauen in mich verloren hatte, wieder aufgebaut, sich aber auch in schönen Zeiten zusammen mit mir gefreut.

Zuletzt möchte ich allen MS-Patienten und gesunden Spendern für die aufgewendete Zeit und die Blutspenden danken, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.