

Mechanismen der Immunmodulation durch Natalizumab



Dissertation zur Erlangung des
naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Thomas Benkert
aus Schweinfurt

Würzburg, 2011

Eingereicht am:

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr. Thomas Dandekar

Gutachter : Prof. Dr. Dr. Edgar Serfling

Gutachter: Prof. Dr. Thomas Raabe

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Meinen Eltern: Vielen Dank für Alles

Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand während meiner Tätigkeit als wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Pathologie der Julius-Maximilians-Universität Würzburg.

An erster Stelle möchte ich Frau Dr. Friederike Berberich-Siebelt für die Möglichkeit danken, meine Doktorarbeit unter Ihrer Betreuung durchführen zu dürfen. Die von Ihr stets geforderte und geförderte Eigeninitiative, Kreativität und Selbstständigkeit haben sehr zu meiner fachlichen und persönlichen Weiterentwicklung beigetragen. Auch bin ich Ihr dafür zu Dank verpflichtet, dass Sie mir während meiner gesamten Promotionsphase mit Rat und Tat zur Seite stand. Weiterhin möchte ich Frau Dr. Berberich-Siebelt für die Möglichkeiten danken, sowohl fachlich als auch methodisch meine bestehenden Kenntnisse stetig erweitern und ausbauen zu dürfen. Mein Dank gilt ebenfalls Herrn Dr. Mathias Buttmann, aus der Neurologie des Universitätsklinikums Würzburg, der mir vor allem hinsichtlich medizinisch bezogener Fragestellungen stets hilfreich zur Seite stand.

Besonders danken möchte ich meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Dr. Edgar Serfling, der es mir ermöglichte meine Forschungsarbeiten in der von ihm geleiteten Abteilung für molekulare Pathologie durchführen zu können. Seine Begeisterung und Leidenschaft für die Naturwissenschaften haben mich stets motiviert, mein wissenschaftliches Interesse zu fördern, zu erweitern und über die Grenzen meines Fachgebiets hinauszusehen.

Bei Herrn Prof. Dr. Thomas Raabe, aus dem Institut für medizinische Strahlenkunde und Zellforschung der Universität Würzburg, möchte ich mich für die Übernahme der Zweitbegutachtung bedanken.

Herrn Prof. Dr. Andreas Rosenwald danke ich vielmals für seine Unterstützung hinsichtlich der durchgeführten Genexpressionsanalysen. Seine fachliche Beratung und die Bereitstellung von technischen Ressourcen haben sehr zum positiven Gelingen dieser Promotionsarbeit beigetragen. In diesem Zusammenhang möchte ich Frau Dr. Ellen Leich sowie Frau Dr. Dr. Elena Hartmann für die Durchführung der Microarrays und die primäre Datenanalyse danken.

Weiterhin gilt mein Dank den Kollegen/innen meiner Arbeitsgruppe. Besonders erwähnen möchte ich an dieser Stelle Herrn Martin Väth und Herrn Dr. Amiya Patra, die durch anregende Diskussionen und durch ihre permanente Hilfsbereitschaft sehr zur

meiner fachlichen Weiterentwicklung beitragen. Gleichfalls gilt mein Dank den Herren Drs. Andris Avots und Stefan Klein-Heßling für Ihre stete Bereitschaft mich methodisch anzuleiten und zu unterstützen. Ronald Rudolf und Lena Dietz sowie den allen Mitarbeitern/innen des Instituts für Pathologie möchte ich für das kollegiale und angenehme Arbeitsklima danken.

Nicht zuletzt danke ich ganz herzlich meinen Eltern, ohne die mein Studium nicht möglich gewesen wäre und die mich in allen meinen Lebenslagen nach besten Kräften unterstützten.

Würzburg, Juli 2011

Thomas Benkert

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung	1
2. Summary	3
3. Einleitung	5
3.1 Integrine	5
3.1.1 Allgemeines	5
3.1.2 Struktur	6
3.1.2.2 Transmembrandomänen.....	7
3.1.2.3 Zytoplasmadomänen	7
3.1.3 Bidirektionale Signaltransduktion der Integrine	7
3.1.4 α 4-Integrin-Heterodimere	9
3.2 Extravasation von Leukozyten	11
3.2.1 Die Extravasationskaskade	11
3.2.2 Die Rolle von α 4-Integrin-Heterodimeren im Immunsystem.....	13
3.2.2.1 Die Aufgabe von α 4-Integrin-Heterodimeren bei der immunologischen Synapse	13
3.2.2.2 Die antigenabhängige Aktivierung von CD4 ⁺ T-Zellen	14
3.2.2.3 Kostimulation humaner T-Zellen mittels α 4-Integrin-Heterdimeren.....	16
3.3 Multiple Sklerose	17
3.3.1 Allgemeines	17
3.3.2 Verlaufsformen der Multiplen Sklerose	18
3.3.3 Pathogenese der Multiplen Sklerose	18
3.3.3.1 Die Blut-Hirn-Schranke	19
3.3.3.2 Extravasation von Leukozyten in das ZNS	19
3.4 Die Rolle des Immunsystems bei der Pathogenese der Multiplen Sklerose	20
3.4.1 Beteiligte CD4 ⁺ T-Zell-Subpopulationen.....	20
3.4.1.1 Typ1-T-Helferzellen (Th1-Zellen).....	21
3.4.1.2 Typ17-T-Helferzellen (Th17-Zellen).....	23
3.4.2 Multiple Sklerose aus immunologischer Sicht	24
3.5 Therapie der Multiplen Sklerose	27
3.5.1 Medikamentöse Therapie	27
3.5.2 Therapie der Multiplen Sklerose mit Natalizumab	28
3.6 Progressive multifokale Leukenzephalopathie (PML)	30
3.7 Beeinflussung des Immunsystems durch Natalizumab	30

3.8 Zielsetzungen der Arbeit.....	32
4 Material und Methoden.....	34
4.1 Verwendete Materialien.....	34
4.1.1 Geräte.....	34
4.1.2 Chemikalien und Lösungen	35
4.1.3 Medien und Puffer	35
4.1.4 Antikörper	39
4.1.5 Sonstige Materialien	40
4.1.6 Computerprogramme	41
4.2 Zellkultur	41
4.2.1 Zellen und Zelllinien	41
4.2.1.1 Humane Zellen	41
4.2.1.2 Zelllinien	42
4.2.2 Blutentnahme	42
4.2.3 Isolierung von PBMCs mittels Ficoll-Dichtegradienten aus Vollblut.....	42
4.2.4 Bestimmung der Zellzahl	43
4.2.5 Magnetische Zellseparation.....	44
4.2.6 Kultivierung von CD4 ⁺ T-Zellen für die Genexpressionsanalysen	45
4.2.7 Kultivierung von humanen Zellen für die Durchflusszytometrie.....	46
4.2.7.1 Kultivierung von CD4 ⁺ T-Zellen für Langzeitversuche (10 Tage)	46
4.2.7.2. Kultivierung von PBMCs für 72 Stunden.....	47
4.2.7.3 Stimulation von humanen PBMCs mit SEB	47
4.2.7.4 Stimulation von humaner Leukozyten mit α -CD3/28- <i>Beads</i>	47
4.2.7.5 Stimulation humaner Leukozyten mit an Platten gebundenem α -CD3/28.....	48
4.2.8 Kultivierung von Jurkat-Zellen für die Durchflusszytometrie.....	49
4.3 Molekularbiologische Methoden	49
4.3.1 Gesamt-RNA-Isolation mit Trizol	49
4.3.2 Genexpressionsanalyse und statistische Evaluation	51
4.3.3 Synthese der komplementären Desoxyribonucleinsäure mittels RT-PCR.....	52
4.3.4 Genexpressionsanalyse auf mRNA-Ebene mittels qRT-PCR	53
4.3.4.1 Durchführung.....	53
4.3.4.2 Auswertung der PCR-Ergebnisse mittels relativer Quantifizierung	55
4.3.5 Durchflusszytometrie.....	57
4.3.5.1 Färbungen von Oberflächenmarkern	58
4.3.5.2 Intrazelluläre Färbung der Zytokine IL2, IL17 und IFN γ	59
4.3.5.3 Messungen am Durchflusszytometer.....	60
4.3.5.4 Auswertungen der Daten mittels FlowJo.....	60

4.3.5.5 Normalisierung.....	61
4.3.6 <i>Bead Arrays</i>	61
4.3.7 Western-Blot-Analyse.....	62
5. Ergebnisse	64
5.1. Natalizumab beeinflusst das Genexpressionsprofil humaner CD4⁺ T-Zellen	64
5.1.1 Erhöhte IL2-Expression bedingt durch Natalizumab.....	64
5.1.2 Natalizumab verändert das Expressionsprofil immunologisch relevanter Gene	66
5.1.3 Natalizumab verstärkt die Expression von Zytokinen, Chemokinen und Chemokinrezeptoren .	72
5.1.4. Natalizumab verstärkt proinflammatorische Signalwege.....	75
5.1.5. Validierung mittels qRT-PCR bestätigt einen Anstieg der IL2-mRNA-Menge.....	77
5.1.6. Validierung verschiedener Transkriptionsfaktoren mittels qRT-PCR.....	78
5.2 Erhöhte Interleukinproduktion durch Natalizumab auf Proteinebene	79
5.2.1 Die IL2-Produktion durch Natalizumab ist abhängig von der Stimulationsstärke	79
5.2.2 Der Einfluss von Natalizumab auf die IL2-Produktion ist zeitlich begrenzt	81
5.2.3 Die IL2-Erhöhung unter Natalizumab-Einfluss ist limitiert	82
5.2.4 IL2-Erhöhung ist ein direkter Effekt von Natalizumab	83
5.2.5 Natalizumab erhöht kurzfristig die IL2-, IL17-, und IFN γ -Produktion humaner CD4 ⁺ T-Zellen...	85
5.3 Die Bindung von Natalizumab reduziert die CD49d-Oberflächenexpression auf humanen Leukozyten.....	87
5.3.1 Natalizumab verringert die CD4 ⁺ CD49d ^{high} -Population <i>in vitro</i>	87
5.3.2 Die CD49d-Reduktion auf humanen CD4 ⁺ T-Zellen <i>in vitro</i> ist ein direkter, stimulationsabhängiger-Natalizumab-Effekt.....	88
5.3.3 Natalizumab beeinflusst die CD49d-Oberflächenexpression humaner CD4 ⁺ Effektorzellen.....	90
5.4 Natalizumab induziert ein direktes MAPK-Signal.....	92
5.4.1 Jurkat-Zellen zeigen eine erhöhte IL2-Produktion durch Natalizumab	93
5.4.2 Jurkat-Zellen zeigen eine reduzierte CD49d-Expression durch Natalizumab	94
5.4.3 Natalizumab induziert die Phosphorylierung von ERK und JNK in Jurkat-Zellen.....	95
5.4.4 Natalizumab induziert ein kostimulatorisches Signal in humanen CD4 ⁺ T-Zellen	96
5.5 Validierung der Ergebnisse <i>in vivo</i>.....	97
5.5.1. Natalizumab erhöht die Produktion von IL2, IL17 und IFN γ <i>in vivo</i>	98
5.5.2. Natalizumab reduziert die CD49d-Expression auf humanen CD4 ⁺ T-Zellen <i>in vivo</i>	99
5.5.3. Natalizumab erhöht die Zytokin-Produktion <i>in vivo</i>	100
6. Diskussion	102
6.1 Natalizumab besitzt kostimulatorische Eigenschaften.....	102

6.2 Die Reduktion von VLA-4 an der Zelloberfläche ist ein direkter Effekt von Natalizumab.....	104
6.3 Natalizumab als Therapeutikum?.....	106
7. Literaturverzeichnis	110
8. Abkürzungsverzeichnis	117
9. Publikationen	119
10. Verfassererklärung.....	120

1. Zusammenfassung

Natalizumab ist ein monoklonaler gegen α 4-Integrine (CD49d) gerichteter Antikörper, der zur Therapie der schubförmigen Multiplen Sklerose zugelassen ist. Sein Hauptwirkmechanismus beruht auf einer Blockade von VLA-4 (CD49d/CD29) auf Leukozyten, deren Extravasation an der Blut-Hirn-Schranke hierdurch gehemmt wird. Gemäß seiner Konzeption sollte Natalizumab neben seiner blockierenden Eigenschaft keinen weiteren Einfluss auf seine Zielzellen ausüben. Der hohen therapeutischen Effektivität stehen jedoch Begleiterscheinungen gegenüber, die auf direkte oder indirekte immunmodulatorische Kapazitäten von Natalizumab hindeuten. In verschiedenen Studien konnten VLA-4, sowohl durch Antikörper- als auch durch Liganden-vermittelte Aktivierung, Eigenschaften als kostimulatorisches Molekül humaner T-Zellen zugewiesen werden. Ob der Antikörper Natalizumab auf VLA-4 rein blockierend wirkt oder ob er (ko-)stimulatorische Signale in T-Zellen induziert, ist bis heute unbekannt.

Vor diesem Hintergrund wurden RNA-Expressionsanalysen von humanen CD4⁺ T-Zellen mittels Microarrays durchgeführt. Tatsächlich konnte eine erhöhte Expression der Gene *IL2* und *IFNG* sowie der Th17-Effektorzytokine *IL17A*, *IL17F* und *IL21* durch Anwesenheit von Natalizumab festgestellt werden. Ebenfalls wurde eine gesteigerte Genexpression der Transkriptionsfaktoren *FOXP3*, *TBX21* und *RORC* beobachtet. Die erhöhte Genexpression von *IL2*, *FOXP3*, *TBX21* und *RORC* wurde mittels qRT-PCR validiert. Aufgrund dieser Ergebnisse wurden verschiedene Effektorzytokine durchflusszytometrisch untersucht. Hierbei zeigten neben IL2 die Interleukine IL17 und IFN γ eine erhöhte Syntheserate unter dem Einfluss des therapeutischen Antikörpers. Die Allgemeingültigkeit des kostimulatorischen Effekts wurde anhand der Fähigkeit von Natalizumab verschiedene T-Zellstimuli zu verstärken verdeutlicht. Die Ergebnisse belegen eine direkte Korrelation zwischen der Anwesenheit von Natalizumab und der Ausbildung proinflammatorischer IL2⁺, IL17⁺ und IFN γ ⁺ CD4⁺ T-Zellen *in vitro* und deuten u.a. auf eine verstärkte Polarisierung naiver CD4⁺ T-Zellen in Richtung Th1- und Th17-Zellen hin. Übereinstimmend mit direkten immunmodulatorischen Eigenschaften über Bindung und Aktivierung von VLA-4 resultierte die Anwesenheit von Natalizumab nicht

nur bei Jurkat-Zellen sondern auch in primären humanen CD4⁺ T-Zellen in einer erhöhten ERK-Phosphorylierung.

Weiterhin konnte ein direkter Zusammenhang zwischen der Gabe des Therapeutikums und der CD49d-Reduktion auf humanen CD4⁺ Effektorzellen bzw. CD4⁺ Gedächtnis-T-Zellen *in vitro* hergestellt werden. Dieses Resultat erhärtet den Verdacht, dass es sich bei dem Verlust an VLA-4 auf verschiedenen Leukozytenpopulationen, der bereits in mehreren Studien *in vivo* beobachtet werden konnte, um eine direkte Auswirkung von Natalizumab handelt.

Die *in vitro* an isolierten T-Zellen von gesunden Spendern gewonnenen Resultate konnten anhand von Zellen aus MS-Patienten reproduziert werden. Bereits 24h nach Natalizumab-Erstgabe wurde sowohl eine deutliche Reduktion an CD49d als auch eine erhöhte IL2-, IL17-, IFN γ - und IL12/IL23p40-Sekretion nachgewiesen. Das unterstreicht die klinische Relevanz dieser Ergebnisse und lässt vermuten, dass Natalizumab neben der Hemmung der Leukozyten-Transmigration ins ZNS Signal-gebende Eigenschaften besitzt, die zu ungewünschten Nebenwirkungen führen können.

2. Summary

Natalizumab, a monoclonal antibody directed against α 4-integrins (CD49d), has been approved for the treatment of relapsing remitting multiple sclerosis. Its main mechanism of action is the blockade of VLA-4 (CD49d/CD29) on leukocytes, thereby inhibiting their extravasations through the blood brain barrier. According to its conception natalizumab should specifically block VLA-4 functions on target cells. Nevertheless, the high immunotherapeutic potency of natalizumab is accompanied by side effects attributed to direct or indirect immunomodulatory capacities. By the use of antibody- or ligand-induced activation, VLA-4 was identified as a costimulatory molecule for human T cells. However, whether the antibody natalizumab provides (co)-stimulatory signals to T cells has up to now remained unknown.

To address this, mRNA expression of human CD4⁺ T cells was analyzed by genome-wide expression profiling. Natalizumab was found to increase gene expression of *IL2* and *IFNG* as well as the Th17 effector cytokines *IL17A*, *IL17F* and *IL21*. Furthermore, transcription factors *FOXP3*, *TBX21* and *RORC* were also upregulated. The increased gene expression levels of *IL2*, *FOXP3*, *TBX21* and *RORC* were also verified by qRT-PCR. In this line, flow cytometry revealed an increased synthesis rate of IL2, IL17 and IFN γ under the influence of this therapeutic antibody. The generality of the costimulatory attribute of natalizumab was proved by its ability to amplify different T cell stimuli. A direct correlation between the presence of natalizumab and the development of proinflammatory IL2⁺, IL17⁺ and IFN γ ⁺ CD4⁺ T cells *in vitro* turned out to be very likely. Therefore, natalizumab might enhance polarisation of naïve CD4⁺ T cells towards Th1 and Th17 cells. In line with known direct immunomodulatory capacities of VLA-4, treatment with natalizumab causes increased ERK phosphorylation not only in Jurkat cells, but also in primary human CD4⁺ T cells. Moreover, the immunotherapeutic antibody was directly responsible for decreased CD49d on human CD4⁺ effector and memory T cells *in vitro*.

This observation reinforces suspicion initially raised by different *in vivo* studies that the loss of VLA-4 on different leukocyte subpopulations is a direct consequence of natalizumab treatment. The data obtained from PBMCs of MS patients were comparable to that of T cells of healthy donors. Notably, the significant reduction of CD49d and an

increased secretion of IL2, IL17, IFN γ and IL12/IL23p40 in MS patients 24 hours after the very first application of natalizumab underline, the clinical relevance of these correlations. These results suggest that natalizumab action is not exclusively inhibitory by preventing leukocyte transmigration into the CNS, but additionally triggering pro-inflammatory immune reactions. This might be responsible for the severe side effects in Natalizumab-treated patients.

3. Einleitung

3.1 Integrine

3.1.1 Allgemeines

Integrine stellen neben Selektinen, Mitgliedern der Immunglobulin-Superfamilie, Cadherinen und Proteoglykanen eine der Hauptfamilien der Adhäsionsrezeptoren dar (Humphries, Byron et al. 2006). Die Integrin-Superfamilie umfasst eine Vielzahl von heterodimeren Zelladhäsions-Rezeptorproteinen, die in verschiedene Entwicklungs- und Homöostaseprozesse eingebunden sind. Integrine treten vor allem in Prozessen wie Proliferation, Differenzierung, Apoptose, Aufrechterhaltung der Zellform, Zellpolarität und Zellbeweglichkeit in Erscheinung. Das humane Genom kodiert 18 α - und 8 β -Untereinheiten, die gemeinsam 24 Integrin-Heterodimere mit unterschiedlichen Bindungs- und Signaleigenschaften ausbilden. Die Spezifität der Integrin-Ligandenbindung wird durch die dimerisierenden Monomere variiert (Humphries, Byron et al. 2006). Durch diese Variabilität können Integrin-Heterodimere mit einer Vielzahl von verschiedenen Oberflächenmolekülen und Rezeptoren wechselwirken und sind sowohl in die Interaktion zwischen Zellen und extrazellulärer Matrix (ECM) als auch in Zell-Zell-Wechselwirkungen bzw. in die Transduktion extrazellulärer Signale an Komponenten des Zytoskeletts eingebunden (Abram and Lowell 2009). Die Signaltransduktion verläuft über die zytoplasmatischen Integrin-Domänen, die wiederum über verschiedene Anker- und Adapterproteine mit dem Aktinzytoskelett verbunden sind und als Binde- und Interaktionspartner für verschiedene Signalproteine dienen (Brakebusch and Fassler 2003). Integrine stellen somit für Zellen die molekularen Schnittstellen zwischen dem Zytoskelett und der extrazellulären Umwelt dar.

3.1.2 Struktur

Integrine sind heterodimere Typ-I-*Singlepass*-Transmembranglykoproteine, deren α - und β -Untereinheiten nicht kovalent miteinander verbunden sind (Arnaout, Mahalingam et al. 2005). Die extrazellulären Kopfdomänen tragen die Ligandenbindungsstellen, die verschiedene Bindungsmotive erkennen können. In der Regel tragen Integrin-Liganden RGD- oder LDV-Bindungsmotive. RGD-Motive kommen z.B. in Fibronectin (Fn) vor, LDV-Motive bei zellulären Adhäsionsmolekülen (ICAMs) oder bei ECM-Proteinen wie Collagen und Lamin (Ruoslahti 1996). α - und β -Integrin-Monomere besitzen eine Größe von ca. 90 - 160 kDa und werden in eine zytoplasmatische, extrazelluläre und Transmembrandomäne unterteilt.

3.1.2.1 Ektodomänen

Die α -Ketten der Ektodomänen können in zwei Gruppen untergliedert werden. Die eine Gruppe besitzt eine α I- die andere eine β I-Domäne. Für die α I-Domäne bilden die N-Termini sieben homologe β -Faltblattstrukturen aus, die sich zu einer β -Propeller-Domäne zusammenfügen. Zwischen dem zweiten und dritten Faltblatt befindet sich die α I-Domäne. Die Substratspezifität der α I-Domäne wird durch eine Rossmann-Faltung gewährleistet, bei der die hydrophilen α -Helices ein zentrales, hydrophobes β -Faltblatt umspannen, wodurch die Substratbindungsstelle gebildet wird (Takagi and Springer 2002). Die α I-Domäne beinhaltet die MIDAS (*Metal ion dependent adhesion site*), eine Bindungsstelle für zweiwertige Kationen, deren Anwesenheit sich aktivierend auf die Adhäsionsspezifität und die Affinität auswirkt. Die andere Gruppe besitzt am distalen Ende der β -Ektodomäne eine β I-Domäne. Der N-terminale Teil der β I-Domäne ist homolog und analog zur α I-Domäne und gewährleistet ebenfalls die Substratspezifität. Die α - und β -Ektodomänen bilden zusammen eine dreidimensionale globuläre Kopfdomäne, diese beinhaltet die Ligandenbindungsstelle (Shimaoka, Takagi et al. 2002). Das α 4 β 1-Integrin, das im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit steht, gehört zur Gruppe der Integrine mit einer β I-Domäne (Arnaout, Goodman et al. 2007).

3.1.2.2 Transmembrandomänen

Die Transmembrandomänen der α - und β -Untereinheiten bestehen aus einer langen geneigten Transmembranhelix. Im gebeugten, inaktiven Stadium des Proteins liegt die Helix, bedingt durch elektrostatische und hydrophobe Wechselwirkungen, als dicht gepackte *Coiled-coiled*-Struktur vor (Gottschalk and Kessler 2004). Im entspannten Stadium werden die α - und β -Transmembrandomänen räumlich voneinander getrennt. Diese Trennung ist essentiell für die Funktionalität der Integrine, da nur hierdurch eine Signaltransduktion initiiert werden kann (Takagi and Springer 2002; Kim, Carman et al. 2003; Luo, Carman et al. 2005).

3.1.2.3 Zytoplasmadomänen

Im gebeugten, inaktiven Stadium sind die beiden zytoplasmatischen proximalen Membranregionen der α - und β -Untereinheiten durch hydrophobe und elektrostatische Wechselwirkungen miteinander verbunden. Integrine besitzen in diesem Stadium einen gering affinen Zustand. Bei Trennung der beiden proximalen Bereiche gehen die Integrine in einen gestreckten, intermediär bzw. hoch affinen Zustand über (Kinashi 2005). Dieser Übergang wird durch intrazelluläre Aktivierungssignale induziert, die die Integrin-Aktivität und -Affinität regulieren (Abbildung 1 A und B). Die Zytoplasmadomänen dienen hierbei als eine Art Verschaltungsstelle für intrazelluläre und extrazelluläre Signale. Durch die Bindung von Signalmolekülen an die zytoplasmatischen Anker- und Adapterproteine werden die Integrine in verschiedene Signaltransduktionsprozesse eingebunden. Weiterhin gewährleisten Anker- und Adapterproteine die mechanische Verankerung an die Komponenten des Aktinzytoskeletts (Wiesner, Legate et al. 2005).

3.1.3 Bidirektionale Signaltransduktion der Integrine

Integrine besitzen die Fähigkeit Information vom Extrazellulärraum zur zytosolischen Seite der Zelle zu übertragen. Dieser Vorgang verläuft bidirektional und wird als *Inside-*

out signaling und *Outside-in signaling* der Integrine bezeichnet. Beim *Inside-out signaling* werden intrazelluläre Signale in extrazelluläre Integrin-Konformationsänderungen umgewandelt. Das intrazelluläre Signal wird hierbei über Anker- und Adapterproteine an die Zytoplasmadomänen und von dort aus an die extrazellulären Ektodomänen weitergeleitet. Dies resultiert in einer Konformationsänderung und letztendlich in einer Integrin-Aktivierung. (Hughes, Diaz-Gonzalez et al. 1996; Liu, Calderwood et al. 2000). Bei Bindung von extrazellulären Liganden agieren Integrin-Heterodimere als klassische Signaltransduktionsrezeptoren, die extrazelluläre Signale zur zytoplasmatischen Seite translozieren. Diesen Vorgang nennt man *Outside-in signaling*. Beide Signalwege laufen simultan ab und ermöglichen der Zelle kontinuierlich mit ihrer extrazellulären Umgebung in Verbindung zu stehen (May, Neumann et al. 2000). Ein weiterer Prozess mit dem die Integrin-Aktivität und Avidität variiert werden kann, ist das *Integrin-Clustering*. Die extrazelluläre Ligandenbindung einzelner Integrine initiiert hierbei eine verstärkte Rekrutierung zytoplasmatischer Signal- und Adapterproteine und resultiert in der Akkumulation weiterer Integrine. Dies führt zur gegenseitigen Erhöhung der Aktivität und Avidität und ermöglicht eine multivalente Interaktion mit den Bindungsliganden (Abbildung 1. B) (Grashoff, Thievessen et al. 2004; Kinashi 2005).

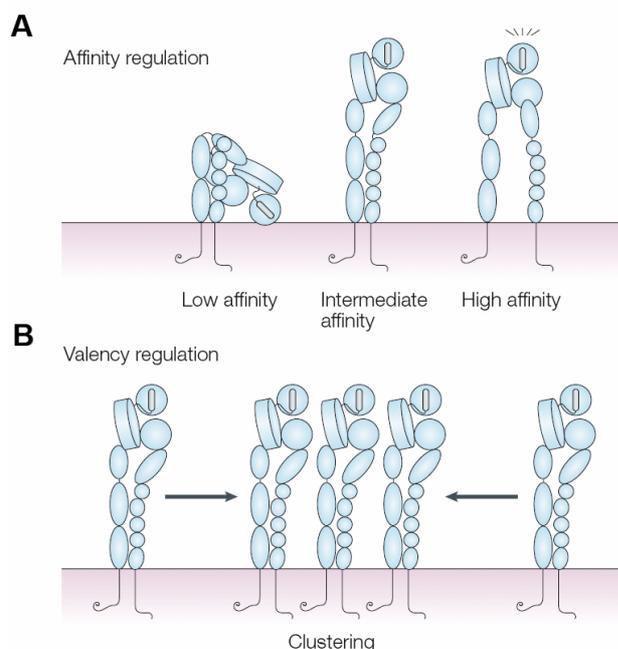


Abbildung 1. Integrin-Affinität, -Avidität und Clustering.

Bild (A) zeigt die verschiedenen Konformationen eines Integrins. Durch intrazelluläre Aktivierungssignale gehen Integrin-Heterodimere vom gebeugten (gering affin) zu den beiden gestreckten Konformationen (intermediär affin bzw. hoch affin) über. Das untere Bild (B) zeigt den Vorgang des *Integrin-Clustering*, der eine gegenseitige Erhöhung der Aktivität bzw. Avidität und multivalente Interaktion mit Bindungsliganden ermöglicht. (Darstellung nach Kinashi 2005).

3.1.4 α 4-Integrin-Heterodimere

α 4-Integrin-Heterodimere werden auf Lymphozyten (Hemler 1990), hämatopoetischen Stammzellen (HSC) (Hynes 1992), Monozyten (Carlos, Kovach et al. 1991), Eosinophilen, Basophilen (Bochner, Luscinskas et al. 1991) und natürlichen Killer-Zellen (NK-Zellen) exprimiert (Allavena, Paganin et al. 1991). Neutrophile zeigen im Gegensatz hierzu nur wenig α 4-Integrinexpression (Johnston and Kubes 1999). α 4-Monomere dimerisieren sowohl mit der β 1- (α 4 β 1) als auch der β 7- (α 4 β 7) Untereinheit. α 4 β 1- und α 4 β 7-Heterodimere besitzen ein variables LDV-Erkennungsmotiv und erkennen hierdurch das LDVP-Motiv des Fibronektins, das IDSP-Motiv von VCAM (*Vascular cell adhesion molecule*) und das LDTs-Motiv des MAdCAM-1 (*Mucosal addressin cell adhesion molecule-1*) (Ruoslahti 1996). Die hauptsächlichen Bindungsliganden der beiden genannten Integrin-Heterodimere sind somit VCAM-1 (*Vascular cell adhesion molecule-1*), das Produkt mit alternativ gespleißter CS-1-Region (*Connecting segment-1*) des Fibronektins und Selektine (Lobb and Hemler 1994). Nur α 4 β 7-Integrin kann weiterhin mit MAdCAM-1 interagieren. Die wichtigsten zellbiologischen Prozesse, an denen α 4-Integrin-Heterodimere beteiligt sind, sind die Hämatopoese, Leukozyten-Extravasation bzw. -Migration, Immunüberwachung, das *Homing* von Leukozyten und die T-Zell-Aktivierung. Nach der CD-Nomenklatur bezeichnet man das α 4-Integrin als CD49d und das β 1-Integrin als CD29, das Heterodimer (α 4 β 1) wird *Very late antigen-4* (VLA-4) genannt (Holzmann and Weissman 1989). Im Gegensatz zu anderen Integrinen ist die Interaktion mit Paxillin und Talin für eine Anbindung von α 4-Heterodimeren an das Aktinzytoskelett essentiell (Liu, Kiosses et al. 2002). Hierbei bindet Paxillin an Talin, das wiederum direkt mit der zytoplasmatischen α 4-Integrindomäne interagiert (Rose 2006). Die Regulierung der Adhäsionsdynamik ist ebenfalls von der α 4-Integrin-Paxillin-Interaktion abhängig, für die weitere Proteine wie FAK (*Focal adhesion kinase*) und die kleinen GTPasen Rac (*Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1*), CDC42 (*Cell division control protein 42 homolog*) und Rho (*Ras homolog gene family*) aktiviert werden. Durch die Rekrutierung dieser Proteine wird die Affinität von β 1-Integrin zu seinen Bindungsliganden signifikant erhöht (Han, Liu et al. 2001). Die Einbindung der α 4-Heterodimere in verschiedene Signalwege erfolgt über die FAK. Durch die Interaktion der FAK mit Grb2 (*Growth factor receptor-bound protein 2*) sind die α 4-

3.2 Extravasation von Leukozyten

Eine der Hauptaufgaben des $\alpha 4\beta 1$ -Integrins ist, die Extravasation von Leukozyten in entzündeten Geweben zu gewährleisten. Im Zuge der Immunüberwachung patrouillieren Leukozyten durch alle Gewebebereiche des Körpers (Lammermann and Sixt 2008). In der Nähe von verletzten Gewebebereichen oder von Entzündungsreaktionen wechseln Leukozyten vom passiven Treiben im peripheren Blut hin zu einer gerichteten Migration und dringen anschließend über das Endothel in die entzündlichen Bereiche vor. Dieser Vorgang wird Extravasation genannt (Ransohoff, Kivisakk et al. 2003). Die Ausbildung einer verstärkten Adhäsion an die aktivierten Endothelzellen ist hierbei ein essentieller Schritt (Lee and Benveniste 1999). Die Fähigkeit verschiedene Gewebetypen zu infiltrieren wird durch verschiedene Integrin-Heterodimere wie $\alpha L\beta 2$, $\alpha 4\beta 1$ und $\alpha 4\beta 7$ vermittelt.

3.2.1 Die Extravasationskaskade

Gewebeverletzungen und Entzündungsreaktionen gehen mit einer Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen durch Makrophagen und dendritische Zellen (DC) einher, die eine verstärkte Expression von Selektinen, PECAMs (*Platelet endothelial cell adhesion molecule*), ICAMs und VCAMs auf der Oberfläche der aktivierten Endothelzellen induzieren. Bedingt durch die freigesetzten Chemokine der Endothelzellen wechseln $\alpha 4$ -Integrin-Heterodimere innerhalb von Millisekunden vom inaktiven in den aktiven Zustand, um mit den Adhäsionsmolekülen des Endothels wechselwirken zu können. Bei Kontakt zwischen den zirkulierenden Leukozyten und aktivierten Endothelzellen treten auf der Seite der Leukozyten Karbohydrat-Adhäsionsmoleküle mit den Selektin-Bindungsliganden auf den Endothelzellen in Wechselwirkung, wodurch eine lockere Adhäsion zwischen den beiden Zelltypen ausgebildet wird (Luster, Alon et al. 2005). Diese verringert die Geschwindigkeit der Immunzellen, mit der sie über das Endothelium gleiten. Es werden dann weitere Selektin-vermittelte Bindungen ausgebildet, die Adhäsionskräfte nehmen zu, die Zelle

verlangsamt ihre Geschwindigkeit weiter und beginnt auf der Gefäßwandung zu „rollen“. Bei der rollenden Bewegung der Zellen auf dem Endothel, dem sog. *Rolling*, werden Chemokin-induzierte, G-Protein-gekoppelte Tyrosinkinase-Rezeptoren durch die endothelial sezernierten Chemokine aktiviert (Laudanna, Kim et al. 2002). Dies verstärkt die transiente α_4 -Integrin-vermittelte Zelladhäsion, induziert eine erhöhte Integrin-Bindungsaffinität durch *Inside-out signaling* (Carr, Alon et al. 1996; Grabovsky, Feigelson et al. 2000) und reduziert weiter die Geschwindigkeit der Leukozyten, bis diese letztendlich auf dem Endothel fest adhären. Für die vollständige Adhäsion an die Endothelwandung sind α_4 -Integrin-Heterodimere essentiell (Berlin, Bargatze et al. 1995). Bei der folgenden Diapedese schiebt sich die Zelle entweder zwischen den Zellwänden benachbarter Endothelzellen hindurch (parazelluläre Route) oder penetriert Endothelzellen bei der Transmigration (transzelluläre Route) und dringt so in entzündliche Gewebereiche vor (Abbildung 3) (Ransohoff, Kivisakk et al. 2003). Die spezifische Rekrutierung der verschiedenen Leukozytensubpopulationen wird durch Variation der Art und Anzahl der endothelial exprimierten Zytokine, Chemokine und Bindungsliganden reguliert (Luster, Alon et al. 2005).

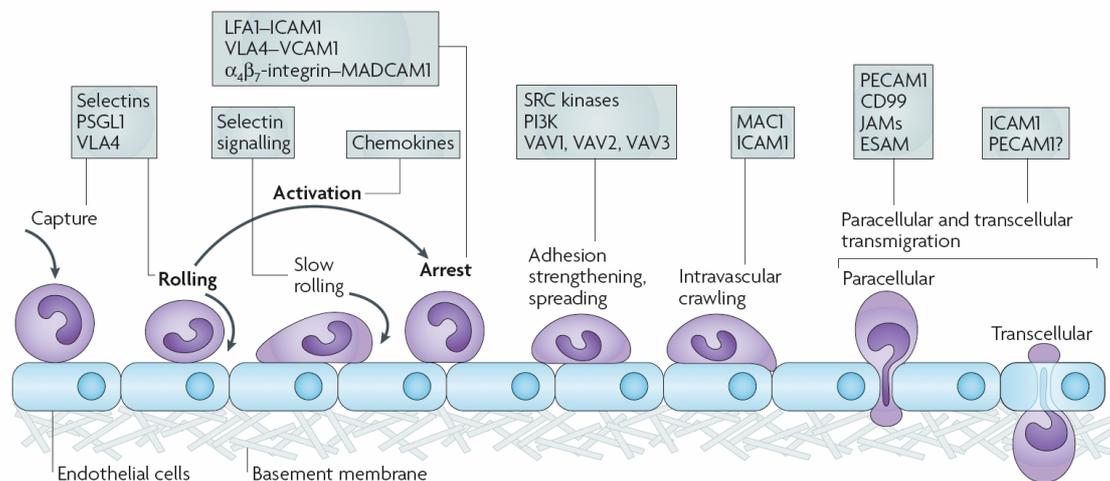


Abbildung 3. Extravasation von Leukozyten.

Der initiale Zell-Zell-Kontakt wird durch Kohlenhydrat-Selektin-vermittelte Bindung hergestellt, wodurch sich eine lockere Adhäsion zwischen den Immunzellen und dem Endothel ausgebildet. Durch weitere Selektin-vermittelte Bindungen beginnt die Zelle auf dem Endothel zu „rollen“. Hierbei werden Chemokin-induzierte G-Proteine aktiviert und die Geschwindigkeit weiter reduziert, bis die Zelle vollständig auf dem Endothel adhärert. Anschließend erfolgt die parazelluläre oder transzelluläre Diapedese der Immunzellen durch die Endothelschicht, um in die dahinter liegenden entzündlichen Gewebereiche vorzudringen zu können. (Darstellung nach Ley, Laudanna et al. 2007).

3.2.2 Die Rolle von α 4-Integrin-Heterodimeren im Immunsystem

3.2.2.1 Die Aufgabe von α 4-Integrin-Heterodimeren bei der immunologischen Synapse

Ein Schlüsselvorgang der adaptiven Immunantwort ist die Stimulation bzw. Aktivierung von T-Zellen initiiert durch das Ausbilden der immunologischen Synapse. Die immunologische Synapse, auch supramolekularer Aktivierungskomplex bzw. SMAC (*Supramolecular activation complex*) genannt, bildet die Kontaktstelle, an der APCs (*Antigen presenting cells*) und T-Zellen miteinander in Wechselwirkung treten. Der SMAC wird in zwei Bereiche unterteilt (Abbildung 4 A). Der pSMAC (*Peripheral supramolecular activation complex*) stellt den äußeren Bereich dar, in dem sich vor allem die interzellulären Adhäsionsmoleküle wie ICAMs und Integrine akkumulieren (Monks, Freiberg et al. 1998). Die Integrine LFA-1 (*Lymphocyte function-associated antigen 1*) (α L β 2) und VLA-4 und deren Bindungsliganden ICAM-1 und VCAM-1 gewährleisten die mechanische Stabilisierung der Zellinteraktion sowie der Synapse. Dadurch wird außerdem sichergestellt, dass beide interagierenden Zellen zeitlich lange genug miteinander verbunden bleiben, um die Aktivierung der T-Zellen und die nötigen Signaltransduktionen zu initiieren. Die räumliche Anordnung der Integrine innerhalb der SMAC ist nicht statisch, was z.B. anhand Antikörper-vermittelter Aktivierung der α 4-Integrin-Epitope B1 bzw. B2 und der Verschiebung der VLA-4-Moleküle von der pSMAC zur cSMAC gezeigt wurde. Allerdings führt die selektive Aktivierung einzelner Epitope zu unterschiedlichen Aktivierungs- und Differenzierungsprozessen, denn nur durch Kreuzvernetzung des Epitops B1 kommt es beim *Priming* von naiven CD4⁺ (s.u.) T-Zellen durch DCs zu einer gerichteten Immunantwort (in Th1; s.u.). Dieser Effekt kann sowohl *in vitro* als auch *in vivo* beobachtet werden. Wird das B2-Epitop aktiviert, wird *in vivo* keine Th1-Immunantwort ausgelöst (Mittelbrunn, Molina et al. 2004).

In der zentralen cSMAC-Region (*Central supramolecular activation complex*) befinden sich auf der T-Zellseite hauptsächlich die Oberflächenrezeptorproteine CD2, CD3, CD4, CD8, CD28, und intrazelluläre Proteine wie Lck (*Lymphocyte-specific protein tyrosine kinase*), und Fyn (*Proto-oncogene tyrosine protein kinase Fyn*). Integrine bleiben in der Peripherie der Synapse. Die Aktivierung humaner CD4⁺ T-Zellen erfolgt über die

Stimulation des T-Zell-Rezeptors (TCR) und ist abhängig von Kostimuli wie CD28. Die beiden zentralen Komponenten der immunologischen Synapse sind der TCR und dessen Pendant, der Antigen-präsentierende MHC-Komplex (*Major histocompatibility complex*). Der TCR-MHC-Komplex vermittelt die Aktivierung der Zellen und bestimmt vor allem die Spezifität der Immunantwort.

3.2.2.2 Die antigenabhängige Aktivierung von CD4⁺ T-Zellen

Mittels TCR-Aktivierung durch das von der APC präsentierte Antigen werden essentielle Signaltransduktionsprozesse initiiert (Lee, Holdorf et al. 2002). Der TCR ist ein Heterodimer, bestehend aus je einer hochvariablen α - und β -Kette, das im Komplex mit je einer γ -, δ - und ϵ -CD3-Kette in die Zytoplasmamembran eingelagert ist. Der Rezeptorkomplex wird zusammen mit einem über Disulfidbrücken-gebundenen ζ -Homodimer exprimiert. Wenn der TCR den Peptid-MHC-Komplex erkennt, bindet CD4 extrazellulär an nicht polymorphe Regionen des MHCII, was die gebundene Tyrosinkinase Lck auf der zytosolischen Seite aktiviert. Phosphorylierung der ITAMs (*Immunoreceptor tyrosine-based activation motifs*) innerhalb der CD3- und ζ -Ketten führt zur Assoziation und Aktivierung von Fyn. Der Aktivierung der CD4-gebundenen Lck-Kinase folgen die Phosphorylierung der TCR-assoziierten ζ -Kette und hierdurch die Rekrutierung von ZAP-70 (*Zeta-chain (TCR) associated protein kinase 70kDa*) zu dem Proteinkomplex. Dies ermöglicht die Aktivierung von ZAP-70 und die anschließende Phosphorylierung von LAT (*Linker of activated T cells*) (Zhang, Triple et al. 1998). Das phosphorylierte Gerüstprotein LAT dient als Bindungsstelle für verschiedene Signalmoleküle wie Grb2, PLC γ (*Phosphoinositide phospholipase C*), die regulatorische p85-Phosphatidylinositol-3'-Kinase-Untereinheit und, indirekt, von SLP-76 (*SH2 domain containing leukocyte protein of 76kDa*) (Abbildung 4 B). Durch SLP-76 wird die Aktivierung von PLC γ und Ras (*Rat Sarcoma*) ermöglicht. PLC γ spaltet Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat (PIP₂) in Diacylglycerol (DAG) und Inositol-1,4,5-Trisphosphat (IP₃). Das freigesetzte IP₃ erhöht den zytosomatischen Ca²⁺-Spiegel (Meldolesi and Pozzan 1998) und führt letztendlich zur Aktivierung des

Transkriptionsfaktors NFAT (*Nuclear factor of activated T-cells*) (Shaw, Ho et al. 1995; Okamura, Aramburu et al. 2000; Porter, Havens et al. 2000; Neal and Clipstone 2001). Die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B (*Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) erfolgt durch DAG, das in Kombination mit Ca^{2+} -Ionen das Enzym PKC (*Protein kinase C*) aktiviert (Berridge 1997; Berridge, Lipp et al. 1999). Der Transkriptionsfaktor AP-1 (*Activator protein 1*) wird hingegen über die Ras-induzierte MAPK-Kaskade aktiviert (Karin, Liu et al. 1997). NFAT, NF- κ B und AP-1 induzieren die Transkription spezifischer Gene, die essentiell für Proliferations- und Differenzierungsprozesse sind. Die Phosphorylierung des Transmembranadapters LAT erlaubt die Rekrutierung zytoplasmatischer Adapter-Proteine und reguliert unter anderem die LFA-1-Aktivierung sowie das LFA-1-*Clustering* und trägt somit zur Ausbildung der SMAC bei (Horejsi 2004). Die Signaltransduktion der CD28-Kostimulation verläuft hauptsächlich über AKT (*RAC-alpha serine/threonine protein kinase*) und aktiviert die Transkription von NF- κ B (Shapiro, Truitt et al. 1997). Hierdurch wird die IL2-Produktion erhöht (Weiss, Manger et al. 1986), aber auch Anergie (Harding, McArthur et al. 1992) bzw. Apoptose verhindert (Boise, Minn et al. 1995; Noel, Boise et al. 1996; Radvanyi, Shi et al. 1996). Die Stimulation von CD28 führt zu dessen Tyrosin-Phosphorylierung und hiermit zur Anbindung von SH2-Proteinen wie der p85 Phosphatidylinositol 3'-Kinase-Untereinheit. Die Bindung von SH3-Proteinen wie Grb2 ist hingegen unabhängig von Tyrosin-Phosphorylierungen und stellt einen PI3K-unabhängigen Signalweg dar (Okkenhaug and Rottapel 1998).

Die T-Zellstimulation kann auch auf artifizielle Weise durch pharmakologische Aktivierung des CD3- und CD28-Signalweges simuliert werden. Hierbei induziert Ionomycin, über den Influx von Ca^{2+} -Ionen, das CD3-Signal und TPA (12-O-Tetradecanoylphorbol-13-Acetat), durch Aktivierung der PKC, Teile des CD3- und des CD28-Signalweges. Durch die strukturelle Ähnlichkeit von TPA mit Diacylglycerol, dem natürlichen Aktivator der PKC, wird das Enzym aktiviert, aber im Gegensatz zur physiologischen Aktivierung irreversibel an der Zellmembran gebunden (Brocklehurst and Pollard 1986).

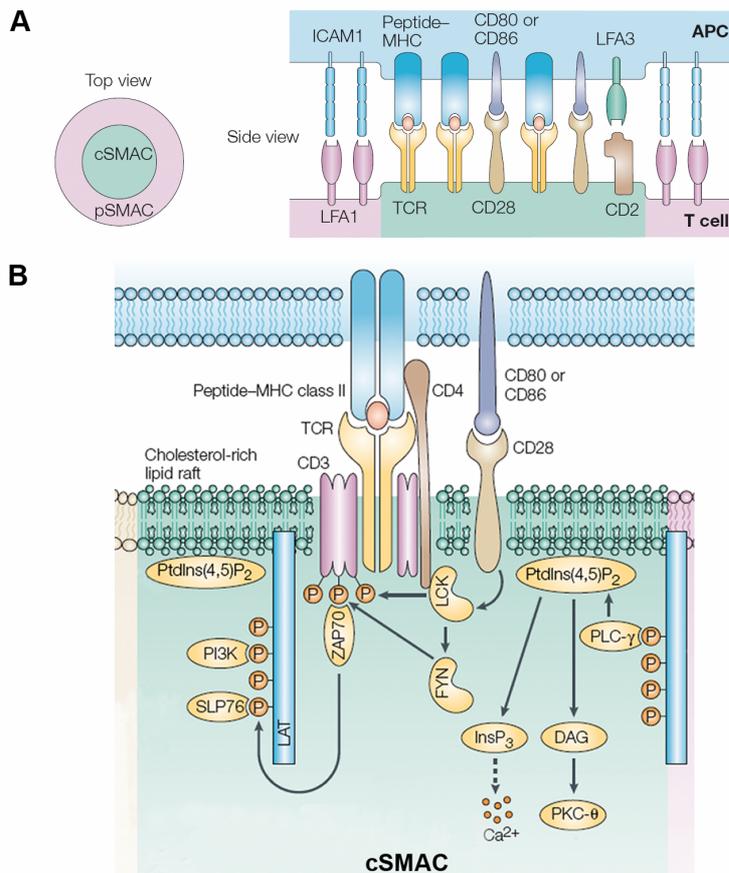


Abbildung 4. Beteiligung der Integrine an der immunologischen Synapse und die Aktivierung von CD4⁺ T-Zellen

(A) Schematische Darstellung der pSMAC- und cSMAC-Region. In der pSMAC befinden sich Adhäsionsmoleküle wie LFA-1 und VLA-4 (VLA-4 ist nicht dargestellt), die zur mechanischen Stabilität der Synapse beitragen. In der cSMAC-Region akkumulieren Oberflächenrezeptorproteine wie CD3, CD4, CD28, und intrazelluläre Proteine.

(B) Darstellung der TCR-Stimulation und Aktivierung von T-Zellen. Der TCR-Komplex ist mit den Proteinen Lck und Fyn assoziiert. Die Dephosphorylierung ermöglicht das Anbinden von ZAP-70 und führt zur Phosphorylierung von LAT, das wiederum als Bindungsstelle für verschiedene Signalmoleküle dient. (Modifiziert nach Friedel et al. 2005).

3.2.2.3 Kostimulation humaner T-Zellen mittels α4-Integrin-Heterdimeren

Eine stark erhöhte CD49d-Expression (CD49d^{high}) auf humanen Leukozyten dient als Oberflächenmarker für proinflammatorische Effektor-T-Zellen (Kleinewietfeld et al. 2008) und geht mit einem gesteigerten enzephalitogenen Potential einher (Barrau et al. 2000; Hohlfeld and Wekerle 2005). Breits in mehreren Studien konnten kostimulatorische Eigenschaften von VLA-4 in humanen T-Zellen nachgewiesen werden. Die kostimulatorischen Signale von VLA-4 resultieren in der Phosphorylierung der Proteine FAK, Phospholipase C_γ, Paxillin, Fyn, Lck, der p45 MAPK (Sato, Tachibana et al. 1995) und ERK1/2 (*Extracellular signal-regulated kinase*) (Kim, Billard et al. 2010). Direkte Auswirkungen einer α-CD3/49d-vermittelten Aktivierung humaner CD4⁺ T-Zellen sind die gesteigerte Produktion von Interleukin-2 (IL2), Tumor Nekrose Faktor-α (TNFα) Interferon-γ (IFNγ), GM-SCF (*Granulocyte macrophage colony-stimulating factor*), eine beschleunigte Proliferationsrate und eine erhöhte IL2R-Expression. In diesem

Zusammenhang konnte auch eine verstärkte Induktion der Transkriptionsfaktoren NFAT, AP-1 und NF κ B beobachtet werden (Udagawa and McIntyre 1992; Udagawa, Woodside et al. 1996). Von biologischer Relevanz sind die kostimulatorischen Eigenschaften von VLA-4 ebenfalls für die Stimulation von humanen T-Zellen. Neben der Anwesenheit von CD3/CD28/CD4 ist ebenfalls die Gegenwart von VLA-4 essentiell um eine vollständige Aktivierung der Zellen zu erreichen (Kim, Billard et al. 2010). Im Laufe des Aktivierungsprozesses reduziert sich die Menge an CD49d auf der Zelloberfläche humaner CD4⁺ T-Zellen (Hernandez-Caselles, Martinez-Esparza et al. 1996).

3.3 Multiple Sklerose

3.3.1 Allgemeines

Multiple Sklerose (MS), auch *Encephalomyelitis disseminata* genannt, ist eine neurodegenerative, chronisch-entzündliche Erkrankung des zentralen Nervensystems (ZNS) (Trapp, Peterson et al. 1998; McDonald and Ron 1999; Perry and Anthony 1999). Die Pathogenese der MS zeichnet sich durch das Auftreten von vielfach verstreuten (multiplen) Entzündungsherden, auch Entmarkungsherde oder Plaques genannt, aus, die sich in der weißen Substanz (*Substantia alba*) von Gehirn und Rückenmark ausbilden. Akute MS-Plaques entstehen durch ZNS-infiltrierende, Myelin-spezifische, autoreaktive Immunzellen. Die ausgelöste Immunreaktion führt zur Demyelinisierung, ein Prozess in dem die Myelinscheiden durch Myelin-spezifische Leukozyten und unspezifische Entzündungsmechanismen zerstört werden. Bereits früh im Erkrankungsverlauf kommt es allerdings auch zu axonalem Schaden (Trapp, Peterson et al. 1998). Die Demyelinisierung resultiert in einer Störung der saltatorischen Erregungsleitung und führt zu neurologischen Dysfunktionen (Steinman 1996). Die Entmarkungsherde treten im gesamten ZNS auf und können alle zentralnervösen Strukturen betreffen. Trotz intensiver Forschungsbemühungen konnte die Ätiologie der MS bisher nicht aufgeklärt werden. Die Erstmanifestation der MS ereignet sich meist

zwischen dem 20. und 40. Lebensjahr. Die Erkrankung betrifft etwa 2,5 Millionen Menschen weltweit und stellt in industrialisierten Ländern die häufigste Ursache einer nicht traumatisch erworbenen bleibenden Behinderung im jungen Erwachsenenalter dar (Trapp, Peterson et al. 1998).

3.3.2 Verlaufsformen der Multiplen Sklerose

Die schubförmig-remittierende MS (engl. *relapsing remitting MS* [RRMS]) geht in über der Hälfte der Fälle nach 10 bis 15 Jahren in die sekundär-progrediente Verlaufsform (engl. *secondary progressive MS* [SPMS]) über (Lublin and Reingold 1996). Bei der RRMS können einzelne Schübe abgrenzt werden, wohingegen die SPMS durch eine fortschreitende, langsame Zunahme von neurologischen Dysfunktionen gekennzeichnet ist. Im Gegensatz hierzu setzt bei der primär-progredienten MS (engl. *primary progressive MS* [PPMS]) von Beginn an eine schleichende Progression der neurologischen Dysfunktionen ohne Regeneration ein (Lublin and Reingold 1996).

3.3.3 Pathogenese der Multiplen Sklerose

Die MS ist eine multifaktorielle Erkrankung, auf deren Entstehung und Verlauf eine Reihe von genetischen und Umweltfaktoren Einfluss nehmen (Munger, Levin et al. 2006; Banwell, Krupp et al. 2007; Sawcer 2008). Im Zentrum ihrer Pathogenese steht eine Autoimmunreaktion in der Immunperipherie aktivierter T-Lymphozyten gegen Myelinproteine des zentralen Nervensystems. Die hierdurch ausgelöste Entzündungskaskade wird durch einen Zusammenbruch der sog. Blut-Hirn-Schranke (BHS) ermöglicht, die den Austausch von humoralen Faktoren und Immunzellen zwischen Blut und ZNS-Gewebe streng reguliert. Entsprechend ergibt sich an der BHS ein wichtiger therapeutischer Ansatzpunkt.

3.3.3.1 Die Blut-Hirn-Schranke

Im menschlichen Organismus gibt es drei physiologische Barrieren, die das ZNS vom Blutkreislauf trennen, aber als potentielle Übertrittsmöglichkeiten für immunkompetente Zellen angesehen werden (Abbott 2004). Diese sind der *Plexus choroideus*, das arachnoidale Epithel und die Blut-Hirn-Schranke. Die BHS wird von zerebrovaskulären Endothelzellen gebildet, die eine hochselektive Versorgung des Gehirns mit Nährstoffen aus dem Blut und die Entsorgung von Stoffwechselmetaboliten in den Blutkreislauf ermöglichen. Diese Selektivität beruht auf den Eigenschaften der zerebrovaskulären Endothelzellen, die über *Tight junctions* miteinander verbunden sind und somit einen unkontrollierten Influx von niedermolekularen hydrophilen Stoffen und Immunzellen verhindern. Der selektive Transport von großen hydrophilen Molekülen, wie Peptiden und Proteinen, wird durch Rezeptor-, Transporter- oder Adsorptions-vermittelte Transzytose bewerkstelligt (de Boer and Gaillard 2007; Pardridge 2007). Die Endothelzellen der BHS wechselwirken weiterhin mit verschiedenen Zelltypen wie Mikroglia, Perizyten, und Astrozyten. Durch die Freisetzung von Zytokinen, Wachstumsfaktoren und Steroiden halten Astrozyten die Barrierefunktion der BHS aufrecht und unterstützen deren selektive Permeabilität (Abbott 2002).

3.3.3.2 Extravasation von Leukozyten in das ZNS

Im gesunden Menschen ist, bedingt durch die Architektur des zerebrovaskulären Endothels mit nur geringer Expression von Oberflächenadhäsionsrezeptoren, die BHS für Immunzellen nur gering permeabel. Leukozyten, die für die Immunüberwachung des ZNS benötigt werden können diese Barriere überschreiten, der Übertritt ist jedoch wenigen, privilegierten Zellen vorbehalten und wird durch die Endothelzellen strikt reguliert (Weckerle et al. 1986). Unter inflammatorischen Bedingungen exprimieren die mikrovaskulären Endothelzellen im verstärkten Maße Integrin-Bindungsliganden und ermöglichen hierdurch die Extravasation von immunkompetenten Zellen in das ZNS. Nach der Diapedese durch die zerebrovaskuläre Endothelschicht treffen die transmigrierenden Zellen auf die dahinter liegende Basalmembran, die hauptsächlich

aus Typ-IV-Kollagen gebildet wird. Das Kollagen wird durch die Sekretion von Matrix-Metalloproteinasen (v.a. MMP-2 und MMP-9) proteolytisch gespalten, was die Migration durch die Basalmembran erlaubt (Graesser, Mahooti et al. 2000; Brundula, Rewcastle et al. 2002). Im Anschluss durchdringen die infiltrierenden Zellen eine dünne Schicht von leptomeningealen Zellen und die pial-gliale Membran, um in das dahinter liegende ZNS zu gelangen (Sixt, Engelhardt et al. 2001).

3.4 Die Rolle des Immunsystems bei der Pathogenese der Multiplen Sklerose

3.4.1 Beteiligte CD4⁺ T-Zell-Subpopulationen

CD4⁺ T-Helferzellen stellen eine Untergruppe der T-Lymphozyten dar, die durch ihre „Helferfunktion“ essentiell für die adaptive Immunantwort sind. Ihre „Helferfunktion“ üben CD4⁺ T-Zellen durch Zell-Zell-Interaktion und Sekretion von Zytokinen aus, die weitere Immunzellen aktivieren und rekrutieren. Anhand ihrer sezernierten Zytokinprofile wurden CD4⁺ T-Helferzellen bislang in die funktionell unterschiedlichen Th1- und Th2-Gruppen unterteilt (Mosmann, Bond et al. 1986) und als stabile und klar abgegrenzte Subpopulationen betrachtet. Die Entdeckung von Th17-Zellen und von induzierten regulatorischen T-Zellen (iTregs) erweiterte die Anzahl der Subpopulationen. Weiterhin wurde klar, dass die verschiedenen Untergruppen der T-Helferzellen keine irreversiblen Differenzierungsstadien darstellen, sondern CD4⁺ T-Zellen über mehr Plastizität verfügen als bisher angenommen. Unterstrichen wird diese These durch die Identifikation von weiteren T-Zell-Populationen wie Tfh-, Tr1-, Th3-, Th9- und Th22-Zellen, die wiederum als weitere Subpopulationen oder aber als Untergruppen der Th1-, Th2-, Th17- und Treg-Zellen angesehen werden. Hierbei können CD4⁺ T-Zell-Sublinien durch Interkonvertierung ineinander übergehen, wenn sie einem anderen Zytokinmilieu ausgesetzt werden. In diesem Zusammenhang wurden CD4⁺IFN γ ⁺IL17⁺ T-Zellen identifiziert, die demnach sowohl Th1- als auch Th17-Charakter besitzen (Zhu and Paul 2010). Insgesamt verdeutlichen immer mehr Hinweise, dass die Plastizität der

Effektorzellen den jeweiligen Bedingungen und dem Mikromilieu hervorragend anpasst sind und hierdurch die Effektivität der adaptiven Immunantwort enorm erhöht wird.

3.4.1.1 Typ1-T-Helferzellen (Th1-Zellen)

Die Typ1-T-Helferzellen sind Bestandteil der zellulären Immunantwort und zuständig für die Abwehr pathogener Viren und intrazellulärer Bakterien. Th1-Zellen definieren sich vor allem durch Sekretion der Zytokine IFN γ , IL2, TNF α und Lymphotoxine (Lassmann and Ransohoff 2004). Durch die sezernierten Zytokine erfolgt die Aktivierung, Differenzierung und Proliferation von Makrophagen bzw. zytotoxischen CD8⁺ T-Zellen. Das Heterodimer IFN γ führt bei Makrophagen zur Aktivierung antimikrobieller Mechanismen wie einer erhöhten Phagozytoseaktivität. Im Zuge der zellvermittelten Immunantwort erhöht IFN γ die Effektorfunktionen von NK-Zellen und die vermehrte Epitop-MHC-Klasse-I-Präsentation körpereigener Zellen für die Erkennung durch CD8⁺ T-Zellen. In einer autokrinen Schleife fördert es die Proliferation und Differenzierung naiver T-Zellen, indem es die Genexpression des - Th1-entscheidenden - Transkriptionsfaktors TBX21 erhöht. Umgekehrt unterdrückt IFN γ die Aktivität von Th2-Zellen. Es steigert die Genexpression der Zelladhäsionsmoleküle ICAM-1 und VCAM-1, wodurch lymphoide Zellen zu entzündlichen Bereichen dirigiert werden (Schroder, Hertzog et al. 2004; Schoenborn and Wilson 2007).

In Th1-Zellen stimuliert die Bindung des Antigens an den TCR die IL2-Sezernierung und die Expression des IL2-Rezeptors (IL2R). Das durch die enzymatische Hydrolyse von PLC γ freigesetzte IP₃ bindet an die IP3-Rezeptoren (IP3R) des Endoplasmatischen Retikulums, wodurch dessen Ca²⁺-Speicher entleert und der intrazelluläre Ca²⁺-Spiegel kurzfristig erhöht wird (Meldolesi and Pozzan 1998). Die Ca²⁺/Calmodulin-abhängige Phosphatase Calcineurin dephosphoryliert vor allem verschiedene Serin-Reste der NFAT-Transkriptionsfaktoren, wodurch es zur Freilegung deren Kernlokalisierungssignals und deshalb zur Kerntranslokation und DNA-Bindung kommt (Aramburu, Garcia-Cozar et al. 1998; Aramburu, Yaffe et al. 1999; Chow, Rincon et al. 1999; Liu, Cseresnyes et al. 2001). Das zweite Spaltprodukt der PLC γ -Hydrolyse, DAG, aktiviert RasGRP (*RAS guanyl-releasing protein*), PKC und verschiedene MAP-Kinasen, deren

Aktivierung in der Synthese und Aktivierung von Fos und Jun bzw. deren jeweiligen Familienmitgliedern resultiert. Daraus setzt sich der heterodimere Transkriptionsfaktor AP-1 zusammen. Durch Bindung an die DNA und Interaktion mit NFAT werden NFAT-Zielgene transaktiviert (Abbildung 5) (Chen, Glover et al. 1998; Macian, Lopez-Rodriguez et al. 2001). So erhöht das NFAT:AP-1 Heterodimer die Genexpression von *IL2* und weiteren Zytokinen und ist maßgeblich an deren Regulation beteiligt (Serfling, Berberich-Siebelt et al. 2000).

Der IL2-Rezeptor setzt sich aus drei Untereinheiten (α , β und γ) zusammen. Die β - (CD122) und die γ -Untereinheit (CD132) werden konstitutiv exprimiert und sind permanent auf der Zellmembran von T-Zellen vorhanden. Die Expression der α -Untereinheit (CD25) erfolgt in T-Zellen nach Antigen-Aktivierung der Zelle. Erst die Akkumulation aller drei Untereinheiten erhöht die Rezeptoraffinität in dem Maße, dass eine Bindung von IL2 möglich ist. Die IL2/IL2R-Interaktion fördert die Proliferation und das Überleben von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen, (Stern and Smith 1986; Beadling and Smith 1993; Beadling and Smith 2002) und erhöht die Zytotoxizität aktivierter Makrophagen (Han, Wilbanks et al. 1999). Weiterhin ist die Homöostase von Tregs essentiell abhängig von IL2, weshalb sie CD25 konstitutiv exprimieren (Sakaguchi et al. 1995; Thornton and Shevach 1998; Thornton, Donovan et al. 2004). Aufgrund der Strukturhomologie von IL2 und IL15 besitzen beide überlappende Funktionalität und begünstigen die Immunglobulin-Produktion von B-Zellen bzw. regen die Differenzierung und Proliferation von NK-Zellen an (Waldmann 2006).

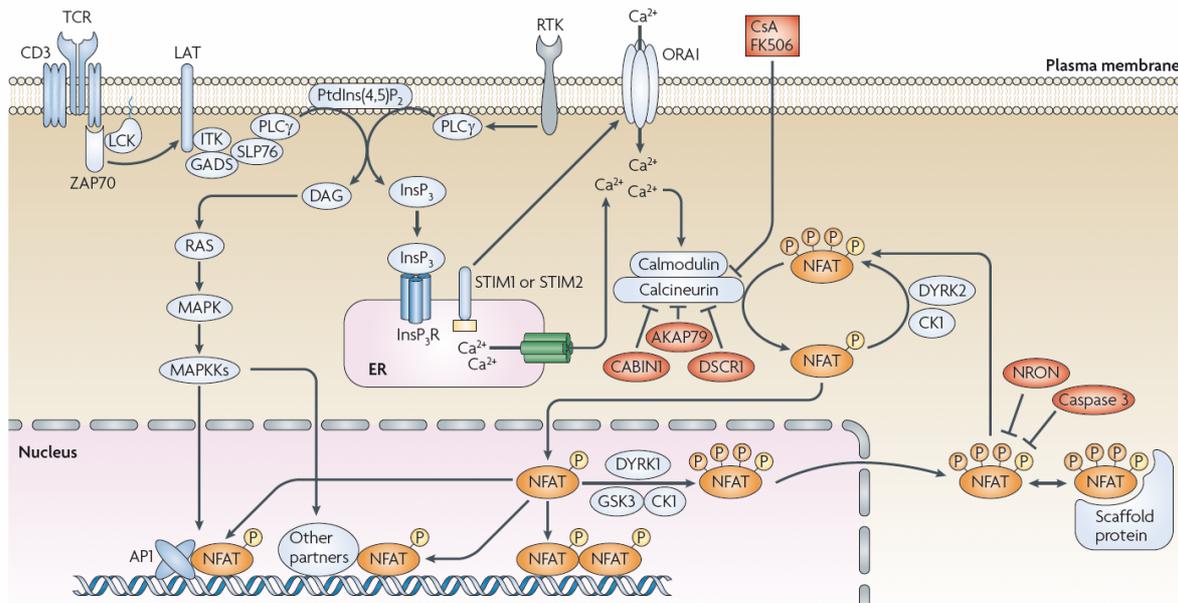


Abbildung 5. Aktivierung der *IL2*-Expression in CD4⁺ T-Zellen

Der Signaltransduktionsweg zur Aktivierung der *IL2*-Expression verläuft nach TCR-Stimulation über Lck bzw. ZAP-70 zu LAT und PLC γ . PIP₂ wird von PLC γ in DAG und IP₃ hydrolysiert. Die Bindung von IP₃ an IP₃R resultiert in einer kurzfristigen Erhöhung des intrazellulären Ca²⁺-Spiegels. Dies ermöglicht die Dephosphorylierung der NFAT-Transkriptionsfaktoren durch die Ca²⁺/Calmodulin-abhängige Phosphatase Calcineurin. Hierdurch wird deren Kernlokalisierungssignal freigelegt. DAG aktiviert RasGRP, PKC und verschiedene MAP-Kinasen. Die Aktivierung der MAP-Kinasen resultiert in der Synthese und Aktivierung von Fos und Jun, die synergetisch den heterodimeren Transkriptionsfaktor AP-1 bilden. Durch Bindung von AP-1 an die DNA und Interaktion mit NFAT werden NFAT-Zielgene - unter anderem auch *IL2* - transkribiert. (Modifiziert nach Mueller and Rao 2010).

3.4.1.2 Typ17-T-Helferzellen (Th17-Zellen)

Th17-Zellen stellen eine eigenständige Population dar, die sich durch das Zytokinprofil IL17A, IL17F, IL21, und IL22 charakterisiert. Th17-Zellen sind essentiell für die Abwehr extrazellulärer bakterieller Infektionen und Mykosen, besitzen aber auch eine Schlüsselfunktion bei der Entstehung verschiedener Autoimmunerkrankungen wie MS, Arthritis, Psoriasis und chronisch-entzündliche Darmerkrankungen (Ouyang, Kolls et al. 2008). Namensgebend für Th17-Zellen ist die IL17-Sekretion, wobei aufgrund ihrer Homologie hinsichtlich Funktion und Sequenz IL17A und IL17F unter dem Begriff IL17 zusammengefasst werden.

In humanen, aus dem peripheren Blut isolierten CD4⁺ T-Zellen konnte gezeigt werden, dass die Zytokine IL1 β , IL6 und IL23 in der Lage sind, die IL17-Sezernierung kurzfristig zu erhöhen (Yang, Anderson et al. 2008). Für die *in vitro*-Polarisierung humaner naiver CD4⁺ T-Zellen wird zum einen eine Kombination von IL1 β und IL6 (Acosta-Rodriguez,

Napolitani et al. 2007), zum anderen eine Kombination von TGF β und IL21 vorgeschlagen (Yang, Anderson et al. 2008). IL23 wird für die Aufrechterhaltung des Th17-Charakters, die Proliferation und die terminale Differenzierung benötigt (Iwakura and Ishigame 2006). Für den Differenzierungsprozess sind die Transkriptionsfaktoren STAT3 und RORC2 von entscheidender Bedeutung.

IL17 ist ein proinflammatorisches Zytokin, das neben der erhöhten Sezernierung von IL1, IL6, G-CSF, GM-CSF und TNF α vor allem die Aktivierung und Migration von Neutrophilen stimuliert (Stockinger and Veldhoen 2007). IL21 fördert Proliferation und Reifung von NK-Zellen und CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen (Parrish-Novak, Foster et al. 2002), wohingegen IL22 die epitheliale Produktion anti-mikrobieller Proteine induziert (Sanjabi, Zenewicz et al. 2009). IL17A und IL17F werden von aktivierten humanen CD4⁺CD45RO⁺ (Yao, Painter et al. 1995) oder CD8⁺CD45RO⁺ Gedächtnis-T-Zellen (Shin, Benbernou et al. 1999), aber auch von Neutrophilen (Ferretti, Bonneau et al. 2003) sezerniert.

3.4.2 Multiple Sklerose aus immunologischer Sicht

In aktiven MS-Läsionen befinden sich CD4⁺ bzw. CD8⁺ T-Zellen, Makrophagen, aktivierte Mikrogliazellen, CD19⁺ B-Zellen und CD138⁺ Plasmazellen (Lucchinetti, Bruck et al. 2001). Der Influx von autoreaktiven CD4⁺ T-Helferzellen in das Gehirnparenchym stellt den entscheidenden Schritt für die Pathogenese der MS dar. Diese Zellen lösen eine inflammatorische Kaskade mit Zusammenbruch der BHS aus. Bei zerebralen Entzündungsprozessen ist die Expression von Bindungsliganden wie VCAM-1 und dessen lösliche Form, sVCAM-1, durch die Endothelzellen der BHS stark erhöht (Millonig, Hegen et al. 2010). Dies resultiert in einer verstärkten VCAM-1/ α 4 β 1-Integrin-Interaktion und führt zur Extravasation und somit zur Infiltration von – im Falle von MS – wahrscheinlich Myelin-spezifischen - CD4⁺ T-Zellen in das ZNS.

Im Gehirnparenchym findet die Reaktivierung der peripheren infiltrierenden CD4⁺ T-Effektorzellen durch perivaskuläre Astrozyten und Mikroglia, aber auch durch periphere myeloide DCs (CD11b⁺CD11c⁺CD45^{high}) statt (McFarland and Martin 2007). Für die Fähigkeit der Antigenpräsentation müssen perivaskuläre APCs, wie Astrozyten und

Mikrogliazellen, jedoch selbst durch Stimulation mit IFN γ und GM-CSF aktiviert werden. Die APCs präsentieren Myelinscheiden-spezifische Antigene. Vor allem auf Basis von Daten aus dem Tiermodell der MS, der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE), werden verschiedene Myelin- und nicht-Myelin Proteine wie das Myelin-Basische-Protein (MBP), Proteolipid-Protein 1 (PLP1) und Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein (MOG) als Autoantigene diskutiert (Hafler and Weiner 1995; Steinman 1996). Antigen-spezifische Reaktivierung führt neben der Ausschüttung von Th17-Lymphokinen zur Freisetzung von weiteren proinflammatorischen Zytokinen durch verschiedene Leukozyten wie IFN γ , TNF α , Lymphotoxine, IL1 α , IL2, IL6 und IL12 (Balashov, Smith et al. 1997; Lassmann and Ransohoff 2004). Sie reduzieren u.a. die selektive Permeabilität der zerebrovaskulären Endothelzellen, was im vermehrten Einstrom von peripheren Lymphozyten in das ZNS resultiert. Dieser Prozess stellt das frühe Stadium der MS dar.

Nach der Reaktivierung beginnen CD4⁺ T-Zellen in erhöhtem Maße IL2 zu produzieren, das die Antigen-vermittelte klonale Expansion von weiteren Immunzellen ermöglicht (Morgan, Ruscetti et al. 1976; Gillis and Smith 1977). Insbesondere die erhöhte Konzentration von IL2 - in Kombination mit IL15 - (Cho, Boyman et al. 2007) weitet die entzündlichen Prozesse im ZNS aus (Ransohoff, Kivisakk et al. 2003; Greter, Heppner et al. 2005). Durch den Nachweis erhöhter Zellzahlen Myelin-reaktiver CD4⁺ Effektorzellen im Liquor von MS-Patienten gilt die zentrale Beteiligung von CD4⁺ T-Zellen an der Pathogenese als belegt, auch wenn die relevanten Autoantigene letztlich noch nicht identifiziert sind (Chou, Bourdette et al. 1992; Zhang, Markovic-Plese et al. 1994). Unterstrichen wird dies noch durch die essentielle Rolle bestimmter MHC-Klasse-II-Haplotypen für die Myelinpeptid-Antigen-Präsentation und damit verbunden für die Reaktivierung der CD4⁺ T-Zellen im ZNS (Steinman 1996; Noseworthy 1999).

Lange Zeit wurden Th1-Zellen als wichtigste ZNS infiltrierende Immunzellen angesehen, u.a. weil in aktiven Läsionen eine hohe Anzahl IFN γ -sezernierender Zellen nachgewiesen werden konnten. Neue EAE-Studien zeigen jedoch, dass die Sekretion von IL17 für das frühe Stadium von Läsionen charakteristisch ist und Th17-Zellen zumindest im Tiermodell als Initiator der Plaque-Entstehung anzusehen sind (Iwakura and Ishigame 2006; McKenzie, Kastelein et al. 2006). Weitere Gründe hierfür sind die Anwesenheit von CD4⁺IL17⁺ bzw. CD4⁺IFN γ ⁺IL17⁺ T-Zellen im ZNS vor Ausbildung der

ersten klinischen Symptome und eine IFN γ ⁺IL17⁺-induzierte Produktion an IL1 β , TNF α und IL6 durch Mikrogliazellen bzw. Makrophagen (Abbildung 6). Diese Zytokinkombination induziert wiederum die Polarisierung von humanen naiven T-Zellen in Richtung Th17-Zellen, was demnach einen autokrinen Verstärkermechanismus darstellt (Acosta-Rodriguez, Napolitani et al. 2007; Murphy, Lalor et al. 2010).

Die Kombination der Zytokine IL17 und IL22 resultiert in einer erhöhten CCL2 (*Chemokine (C-C motif) ligand 2*)-Expression der endothelialen Zellen und führt zu einem verstärkten Einstrom von Leukozyten in das ZNS (Lucchinetti et al., 1996; Kebir, Kreymborg et al. 2007). Verschiedene Komponenten der humoralen Abwehr sind ebenfalls an der Entstehung von aktiven MS-Plaques beteiligt. Die Beteiligung von Myelin-autoreaktiven Antikörpern an Demyelinisierungsprozessen konnte in mehreren Studien nachgewiesen werden (Honegger, Matthieu et al. 1989), wobei nicht eindeutig geklärt werden konnte, an welche Epitope die Bindung der Myelin-spezifischen Antikörper erfolgt (Gold, Linington et al. 2006). Auf eine Demyelinisierungsphase folgt oftmals eine Regenerationsphase, bei der die zerstörten Myelinscheiden wieder hergestellt werden. Diese Remyelinisierung läuft individuell sehr unterschiedlich und meist unvollständig ab (Chang, Tourtellotte et al. 2002). Auf lange Sicht werden mehr Myelinscheiden und Axone irreversibel zerstört, als im Rahmen von Reparaturvorgängen wieder hergestellt werden können, dies führt zur weiteren Progression der neurologischen Dysfunktionen in MS-Patienten.

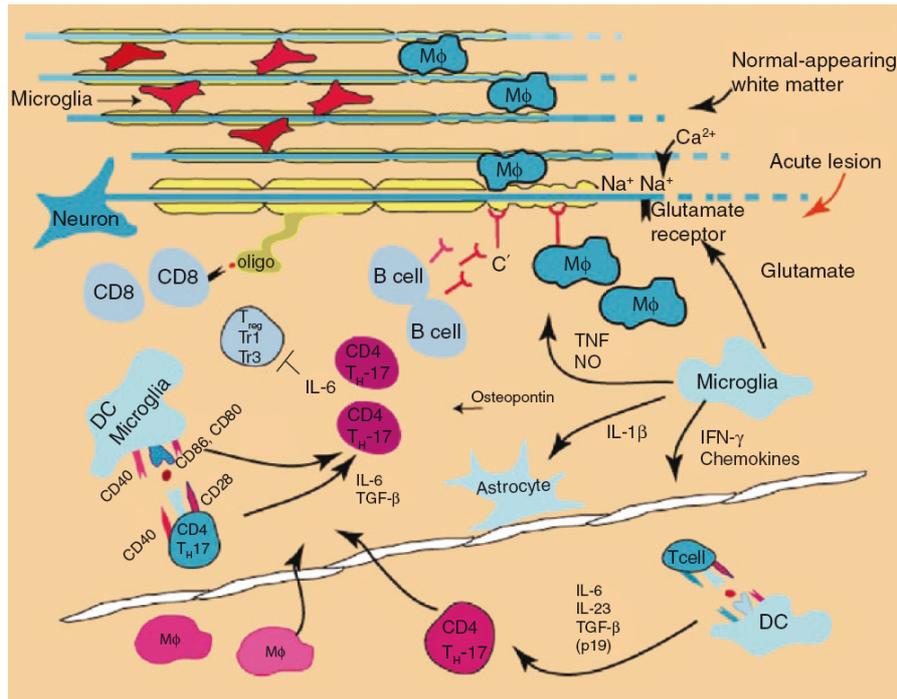


Abbildung 6. Mechanismen der Demyelinisierung in der MS-Pathogenese.

Autoreaktive, Myelin-spezifische CD4⁺IL17⁺ T-Zellen gelten als Initiator des Demyelinisierungsprozesses. Nach der erfolgreichen Transmigration von IL17⁺ T-Zellen in das Gehirnparenchym werden diese durch APCs wie Astrozyten und Mikrogliazellen reaktiviert. Hierdurch werden Makrophagen (MΦ) aus dem peripheren Blut rekrutiert bzw. weitere Mikrogliazellen aktiviert und die Zerstörung von Myelinscheiden und Axonen vorangetrieben. Neben der Bildung freier Radikale und der Glutamat-vermittelten Exzitotoxizität sind ebenfalls B-Zellen und CD8⁺ zytotoxische-T-Zellen an den geschilderten Vorgängen beteiligt. (Darstellung nach McFarland and Martin 2007).

3.5 Therapie der Multiplen Sklerose

3.5.1 Medikamentöse Therapie

Die medikamentöse Langzeittherapie beruht auf einer immunmodulatorischen bzw. immunsuppressiven Dauertherapie mit dem Ziel, eine Demyelinisierung und axonalen Schaden durch Abmilderung der inflammatorischen Prozesse zu mindern. Zu den bevorzugten Therapeutika zählt β-Interferon (IFNβ). IFNβ reduziert die Zahl der präsentierten MHC-Klasse-II Komplexe auf den APCs, inhibiert Metalloproteinasen und induziert immunmodulatorische Zytokine wie IL10 und TGFβ bzw. hemmt die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen wie TNFα und IFNγ (Muraro, Liberati et al. 2004). IFNβ reduziert ebenfalls die CD49d-Expression auf der Zelloberfläche von

enzephalitogenen Leukozyten (Muraro, Leist et al. 2000) und erschwert hierdurch den Übertritt in das ZNS. Eine Alternative zu IFN β ist die Therapie mit Glatirameracetat (Flechter, Vardi et al. 2002), einem synthetischen Polypeptidgemisch, das ursprünglich als Analogon zum basischen Myelinprotein entwickelt wurde (Neuhaus, Farina et al. 2001). Für die Wirkweise wird eine kompetitive Hemmung auf den MHC-Komplexen und eine Toleranzinduktion hinsichtlich MBP-spezifischer Leukozyten postuliert (Johnson, Brooks et al. 2001). Als weitere Therapiestrategien stehen Immunsuppressiva und Zytostatika wie z.B. Mitoxantron (Hartung, Gonsette et al. 2002), zur Verfügung, außerdem die Antikörper-vermittelte Blockierung von α 4-Integrin. Die meisten der genannten Therapeutika sind nur für die Behandlung der MS mit Schüben zugelassen, so auch der α 4-Integrin blockierende Antikörper Natalizumab (Tysabri®), der nur für die rein schubförmige Verlaufsform getestet wurde und zugelassen ist (Cragg, Walshe et al. 2005).

3.5.2 Therapie der Multiplen Sklerose mit Natalizumab

Natalizumab stellt eine Weiterentwicklung eines ursprünglich murinen monoklonalen Antikörpers dar. Die Bildung neutralisierender Antikörper im humanen System wurde durch „Humanisierung“ unterbunden, bei der die ursprünglich murinen konstanten Abschnitte des Immunglobulins durch analoge humane Abschnitte ersetzt wurden. Beim Design wurde Natalizumab als ein IgG4-Immunglobulin konzipiert, da es hier zu keiner Aktivierung des Komplementsystems kommt und die Serumhalbwertszeit dieser IgG-Klasse im Vergleich zu anderen Immunglobulin-Isotypen deutlich erhöht ist (Mountain and Adair 1992). α 4-Integrin-Heterodimere befinden sich vornehmlich auf der Oberfläche von proinflammatorischen, enzephalitogenen Zellen (Hohlfeld and Wekerle 2005). Durch die Blockade von CD49d des α 4 β 1-Heterodimers wird die Interaktion mit VCAM-1 inhibiert, die Adhäsion von Leukozyten auf aktivierten zerebrovaskulären Endothelzellen beeinträchtigt und die Extravasation von Leukozyten in das ZNS reduziert. Die daraus resultierende eingeschränkte Migration infiltrierender Immunzellen

führt zur Eindämmung der Entzündungsreaktionen und dies wiederum zu einer Abschwächung der klinischen Symptome (Rice, Hartung et al. 2005).

Nach Abschluss der Entwicklung von Natalizumab wurden zwei klinische zulassungsrelevante, randomisierte, placebokontrollierte, doppelblinde, multizentrische Phase-III-Studien zur Therapie der RRMS mit circa 2000 Patienten initiiert (Miller, Khan et al. 2003; O'Connor, Goodman et al. 2004), in denen Natalizumab entweder als Monotherapie (AFFIRM-Studie) oder in Kombination mit IFN β (SENTINEL-Studie) verabreicht wurde (Polman, O'Connor et al. 2006). In der Monotherapie reduzierte Natalizumab als primäres Zielkriterium in 12 Monaten das Schubrisiko um 68% und verringerte als ko-primäres Zielkriterium in 24 Monaten die Gefahr des Eintretens einer bleibenden Behinderung um 42%. Eine Reihe kernspintomographischer sekundärer Zielparameter wurde von Natalizumab gegenüber Placebo hochsignifikant günstig beeinflusst (Polman, O'Connor et al. 2006). In der SENTINEL-Patientengruppe reduzierte Natalizumab als Add-on-Therapie zu IFN β gegenüber Placebo als primäre Zielkriterien die Schubrate über 12 Monate auf 0,34 (vs. 0,75 unter Placebo) und verringerte das Risiko einer bleibenden Behinderung über zwei Jahre um 24%. Die durchschnittliche Zahl der Gadolinium-aufnehmenden Läsionen ging um 89% zurück (Rudick, Stuart et al. 2006). Natalizumab wurde von der amerikanischen Gesundheitsbehörde FDA im November 2004 zugelassen und in den Handel gebracht. Bereits im Februar 2005 wurde Natalizumab nach dem Bekanntwerden dreier Fälle von progressiver multifokaler Leukenzephalopathie (PML) im Rahmen des klinischen Studienprogramms freiwillig von den Herstellern vom Markt genommen. Bei der PML handelt es sich um eine opportunistische Virusinfektion des ZNS, die häufig zu einer schweren bleibenden Behinderung oder zum Tod führt (Koralnik 2006). Zwei der Patienten stammten aus der SENTINEL-Gruppe, ein weiterer zuvor immunsupprimierter Patient nahm an einer Studie zur Therapie von des Morbus Crohn mit Natalizumab teil (Langer-Gould, Atlas et al. 2005; Van Assche, Van Ranst et al. 2005; Bartt 2006). Aufgrund seiner hohen Wirksamkeit und nach weiteren Überprüfungen der Sicherheit wurde Natalizumab 2006 in den USA und Europa als Monotherapie der hochaktiven RRMS zugelassen. Bislang erkrankten unter Natalizumab-Monotherapie bei über 80.000 exponierten Patienten 105 an PML, 21% verstarben daran; das Postmarketing-PML-Risiko liegt derzeit bei 1:800 (Stand April 2011).

3.6 Progressive multifokale Leukenzephalopathie (PML)

Die PML ist eine schwerwiegende, opportunistische, durch das JC-Virus ausgelöste, teils tödlich verlaufende Virusinfektion des Gehirns. Das JC-Virus gehört zur Gattung Polyomavirus und zur Familie der Polyomaviridae. Der Durchseuchungsgrad in der Bevölkerung beläuft sich auf 48 - 61%, die primäre, asymptomatische Infektion mit dem JCV ereignet sich meist bereits in der Kindheit (Weber, Trebst et al. 1997). Im gesunden Menschen wird das latente JC-Virus hauptsächlich durch CD8⁺ T-Zellen supprimiert. In der Vergangenheit traten PML-Fälle fast nur bei immunsupprimierten Transplantations-, Leukämie- und AIDS-Patienten auf, ein Zusammenhang zwischen PML und MS war vor den Natalizumab-bedingten Fällen nicht bekannt. Die Ursachen für die Reaktivierung des latent vorhandenen JC-Virus sind weitestgehend unbekannt. Nach Reaktivierung setzt ein subakut, progredienter Verlauf der Infektion ein, der durch virale Lyse zur demyelinisierenden ZNS-Erkrankung führt (Padgett, Walker et al. 1976). Es gibt bislang keine geprüfte Behandlung der PML (Koralnik 2006).

3.7 Beeinflussung des Immunsystems durch Natalizumab

Die Zahl der CD49d-Moleküle auf der Zelloberfläche wird vermutlich durch Genexpression (Muraro, Liberati et al. 2004), durch proteolytische Spaltung, dem sog. *Ectodomain shedding*, (Bridges, Tani et al. 2002; Bridges, Sheppard et al. 2005) und durch Antikörper-vermittelte Internalisierung beeinflusst (Fleming, Bao et al. 2010). Interessanterweise reduziert Natalizumab die Menge an VLA-4 auf der Zelloberfläche von Immunzellen *in vivo*, wodurch mit zunehmender Therapiedauer die Zahl der zirkulierenden Monozyten, Eosinophilen, Basophilen und der Erythrozyten (Miller, Khan et al. 2003; Rudick, Stuart et al. 2006; Neumann, Zohren et al. 2009) ansteigt. CD19⁺ B-Zellen, CD4⁺ T-Zellen, NK-Zellen und CD34⁺ HSCs zeigen ebenfalls eine VLA-4-Reduktion und erhöhte Zellzahlen im peripheren Blut (Bonig, Wundes et al. 2008). Die erhöhte Zellzahl resultiert aus einer unkontrollierten Migration von HSCs aus dem Knochenmark in den Blutkreislauf. Durch Natalizumab-vermittelte Blockade von CD49d

bzw. VLA-4-Reduktion auf den HSCs wird die Interaktion von CD49d und den Stromazellen des Knochenmarks, die VCAM-1 bzw. Fibronectin exprimieren (Oostendorp and Dormer 1997), reduziert und hierdurch vermehrt HSCs in den Blutkreislauf entlassen. Im Gegensatz dazu verringert die Gabe von Natalizumab die Zahl an zirkulierenden CD4⁺CD25⁺ regulatorischen T-Zellen. Die Ursache für diese Reduktion ist bisher nicht eindeutig geklärt. Es wird vermutet, dass durch die entzündlichen Prozesse vermehrt Tregs in das ZNS rekrutiert werden, um im Zuge der Immunüberwachung die Effektorzellfunktionen zu modulieren (Putzki, Baranwal et al. 2010). Unter dem Einfluss von Natalizumab zeigen humane periphere mononukleäre Zellen (PBMC) ein stark eingeschränktes transmigratorisches Potential (Niino, Bodner et al. 2006), das zum einen auf die reduzierte VLA-4-Oberflächenexpression und zum anderen auf eine durch Natalizumab-reduzierte VCAM-1- und sVCAM-1-Expression vaskulärer Endothelzellen zurückzuführen ist (Millonig, Hegen et al. 2010). Als Folge der eingeschränkten Migrationsfähigkeit zeigt sich 6 Monate nach Natalizumab-Therapiebeginn eine Reduktion von CD4⁺ bzw. CD8⁺ T-Zellen, CD19⁺ B-Zellen und CD138⁺ Plasmazellen im *Liquor cerebrospinalis* (Stuve, Marra et al. 2006). Eine Langzeitstudie von Lindberg, Achtnichts et al. 2008 belegt, dass Natalizumab außerdem die Genexpression von T-Zellen, B-Zellen, und Neutrophilen beeinflusst. Hierbei konnten für Gene aus den Bereichen Immunantwort, Signaltransduktion, Adhäsion und Stoffwechsel Genexpressionsunterschiede ermittelt werden. Weiterhin wird die Zahl der proinflammatorischen Zellen durch Natalizumab erhöht. Sechs Monate nach Natalizumab-Therapiebeginn konnte in MS-Patienten eine erhöhte Frequenz an IFN γ -, TNF α -, IL17- und IL2-produzierenden CD4⁺ T-Zellen *in vivo* nachgewiesen werden (Khademi, Stol et al. 2008; Khademi, Bornsen et al. 2009; Kivisakk, Healy et al. 2009).

3.8 Zielsetzungen der Arbeit

Inwiefern die Auswirkungen von Natalizumab auf die funktionellen Eigenschaften verschiedener Immunzell-Populationen ausschließlich *in vivo*-Langzeiteffekte sind und ob diese Beeinflussung direkt oder indirekt von Natalizumab ausgeübt wird, ist nach heutigem Wissensstand nicht geklärt. Einige Indizien scheinen dafür zu sprechen, dass Natalizumab neben seiner blockierenden Funktion die Fähigkeit besitzt, intrazelluläre Signale zu induzieren. Allerdings könnte schon allein der deutlich erhöhte Anteil an Leukozyten im Blut langfristig Auswirkungen auf die Genexpression einzelner Subpopulationen haben. Während die CD49d-Reduktion lymphoider Zellen mit einer mechanischen Blockade und daraus resultierend mit dem Ausbleiben von extrazellulären Signalen erklärt werden kann, deuten aber gerade die – bislang erst nach Monaten nachgewiesenen – Veränderungen des Genexpressionsmusters humaner peripherer Bluteukozyten auf potentielle Signalinduktionskapazitäten von Natalizumab hin. Für diese Annahme spricht ebenfalls die mit der Therapiedauer zunehmende Beeinflussung von sowohl CD4⁺ als auch CD8⁺ T-Zellen hin zu einem proinflammatorischen Phänotyp, der auf potentiell aktivierende Eigenschaften von Natalizumab schließen lässt.

So zeigen bisher veröffentlichte Arbeiten, dass die Gabe von Natalizumab das funktionelle Verhalten einer Vielzahl verschiedener Zelltypen beeinflusst. Darüber hinaus könnten eine Aktivierung der von Natalizumab erkannten Zellen und eine hierdurch verursachte Reaktivierung von JC-Viren auch für die PML-Pathogenese wichtig sein.

Vor diesem Hintergrund sollten in der vorliegenden Arbeit die direkten Signaltransduktionskapazitäten von Natalizumab auf humane periphere CD4⁺ T-Zellen untersucht werden. Hierzu wurden *ex vivo*-Versuche unternommen, die den Einfluss anderer Zellen und Parameter ausschlossen. Zudem wurden die Versuche nur über Tage, wenn nicht Stunden durchgeführt, um wirklich direkte Effekte aufzuspüren. Am Ende wurden MS-Patienten bei ihrer ersten Natalizumab-Infusion in die Untersuchungen eingeschlossen.

Folgende Punkte wurden näher beleuchtet:

1. Besitzt Natalizumab Signaltransduktionskapazitäten?
2. Wenn, welche Gene werden von Natalizumab beeinflusst?
3. Und welche funktionellen und phänotypischen Auswirkungen für primäre humane CD4⁺ T-Zellen könnte solch eine Signaltransduktion nach sich ziehen?

4 Material und Methoden

4.1 Verwendete Materialien

4.1.1 Geräte

Autoklav	Stiefenhoefer
Waage	Hartenstein
ABI Prism 7000 <i>Real-Time</i> -PCR	Applied Biosystems
CO ₂ Brutschrank	Heraeus Instruments
MACS-Magnethalterung	Miltenyi Biotec
Heizblock	Hartenstein
Nanodrop UV/Vis-Spektrophotometer	PEQLAB
Mikrozentrifuge	Hartenstein
Thermo- <i>Cycler</i>	MWG Biotech
pH-Meter	Hartenstein
Eppendorf-Zentrifuge 5417R	Eppendorf
Spektralphotometer	Pharmacia Biotech
Western-Blot-Apparatur	Hoefer
Kühlschrank	Bauknecht
Gefrierschrank	Bauknecht
Vortex-Schüttler	CLW
Durchflusszytometer LSR II	Becton Dickinson
Durchflusszytometer FACSCanto II	Becton Dickinson
Zentrifuge	Thermo Scientific
Elektrotransfer-Apparatur	Hoefer

4.1.2 Chemikalien und Lösungen

Trypanblau	Sigma-Aldrich
Ethanol	Roth
BSA	Sigma-Aldrich
Isopropanol	Roth
Trizol	Invitrogen
Chloroform	Roth
Ficoll-Dichtegradient	Biochrom
BD-GolgiPlug™	Becton Dickinson
BD-GolgiStop™	Becton Dickinson
FCS	GIBCO
Humanes-AB-Serum	Sigma-Aldrich
Saponin	Sigma-Aldrich
TPA	Sigma-Aldrich
Ionomycin/CaCl ₂	Invitrogen
Paraformaldehyd	Roth

4.1.3 Medien und Puffer

PBS:

8,0 g NaCl

0,2 g KCl

1,44 g Na₂HPO₄

0,24 g KH₂PO₄

Salze in 800 ml destilliertem H₂O lösen, auf pH 7,4 mittels HCl einstellen und auf ein Volumen von 1000 ml auffüllen.

TBS-Puffer (20x):

500 ml 2 M Tris-HCl pH 7.4

300 ml of 10 M NaCl

Mit destilliertem H₂O auf ein Volumen von 1000 ml auffüllen.

TBS/Tween-Puffer:

40 ml TBS-Puffer

1 ml Tween

Mit destilliertem H₂O auf ein Volumen von 1000 ml auffüllen.

FACS-Puffer:

PBS + 0,1% BSA

MACS-Puffer:

PBS + 0,1% BSA
+ 2mM EDTA

Permabilisierungspuffer:

PBS + 0,1% BSA
+ 0,1% Saponin

SDS-PAGE

Zusammensetzung eines 12% SDS-Polyacrylamidgels

Komponenten (Volumen in ml) für 10 ml Gel-Ansatz:

Trenngel:

H ₂ O	3.3 ml
30% Acrylamid-Mix	4.0 ml
1.5 M Tris (pH 8.8)	2.5 ml
10% SDS	0.1 ml
10% Ammoniumpersulfat	0.1 ml
TEMED	0.004 ml

Sammelgel:

Komponenten (Volumen in ml) für 3 ml Gel-Ansatz

H ₂ O	2.1 ml
30% Acrylamid-Mix	0.5 ml
1.0 M Tris (pH 6.8)	0.38 ml
10% SDS	0.03 ml
10% Ammoniumpersulfat	0.03 ml
TEMED	0.003 ml

Protein-Ladepuffer (1X SDS Gel-Ladepuffer):

50 mM Tris-HCl (pH 6.8)

100 mM Dithiothreitol

2% SDS

0.1% Bromophenolblau

10% Glycerol

Lagerung bei -20°C

Gel-Laufpuffer: (10X)

144.13 g Glycin

30.3 g Tris

100 ml 10% SDS

Salze in destilliertem H₂O lösen und auf ein Volumen von 1000 ml auffüllen.

Lagerung bei RT

RIPA-Puffer:

50 mM Tris-HCl pH 7.4

150 mM NaCl

1% Triton x-100

1% Natriumdeoxycholat

0.1% SDS

1 mM EDTA

+Protease-Inhibitoren

Lämmli Puffer (5x):

30 ml 1M Tris-HCl pH 6.8

10 g SDS

50 ml Glycerol

20 ml β -Mercaptoethanol

250 mg Bromophenolblau

Salze in destilliertem H₂O lösen und auf ein Volumen von 100 ml auffüllen.

Protein Transferpuffer: (10X)

145 g Glycin

29 g Tris

Salze in destilliertem H₂O lösen und auf ein Volumen von 1000 ml auffüllen.

Lagerung bei RT

Für die Anwendung erfolgte eine Verdünnung von 10X Transferpuffer in Methanol und destilliertem H₂O im Verhältnis von 1:2:7

Blockierungslösung:

5% (w/v) fettfreies, getrocknetes Milchpulver in PBS + 0.1% Tween

CTL-Medium:

RPMI 1640 Medium

+ 10% humanes-AB-Serum (Hitze inaktiviert bei 56°C für 45 Minuten) (Sigma-Aldrich)

+ 100 IU/mL Penicillin G (GIBCO)

+ 100 g/mL Streptomycin (GIBCO)

X-VIVO 15 Medium: Lonza, Basel

+ L-Glutamin (2 mM) (GIBCO)

+ Na-Pyruvat (1 mM) (GIBCO)

+ NEM (Non Essential Amino Acids) (1 mM) (GIBCO)

+ Penicillin (100 U/ml), (GIBCO)

+ Streptomycin (100 U/ml) (GIBCO)

+ 5% humanes-AB-Serum (Hitze inaktiviert bei 56°C für 45 Minuten) (Sigma-Aldrich)

RPMI 1640 Medium: Invitrogen, Karlsruhe

- + L-Glutamin (2 mM) (GIBCO)
- + Na-Pyruvat (1 mM) (GIBCO)
- + NEM (*Non Essential Amino Acids*) (1 mM) (GIBCO)
- + Penicillin (100 U/ml), (GIBCO)
- + Streptomycin (100 U/ml) (GIBCO)
- + FCS (5%) (Hitze inaktiviert bei 56°C für 45 Minuten) (Sigma-Aldrich)

4.1.4 Antikörper

Zellkultur:

OKT-3	Janssen-Cilag
Maus α -human CD3	BD Pharmingen
Maus α -human CD28	BD Pharmingen
FastImmune™ CD28/CD49d <i>costimulatory reagent</i>	BD Pharmingen
Maus α -human CD49d (Klon HP 2/1)	Abcam
α -IgG4 Isotypkontrolle	BD Pharmingen
Natalizumab	Biogen Idec

Durchflusszytometrie:

Maus α -human IL2-APC	Miltenyi Biotec
Maus α -human IL17-APC	Miltenyi Biotec
Maus α -human IFN γ -FITC	Miltenyi Biotec
Maus α -human CD4-FITC	BD Pharmingen
Maus α -human CD4-APC	Miltenyi Biotec
Maus α -human CD49d-APC	Miltenyi Biotec
Maus α -human CD49d-PE	BD Pharmingen
Maus α -human CD11a-FITC	Immuno Tools
Maus α -human CD45RO-FITC	Immuno Tools
Maus α -human CD62L-APC	Immuno Tools

Maus α -human CD25-APC	Immuno Tools
Maus α -human CD19-APC	Immuno Tools
Maus α -human CD45RA-PE	Miltenyi Biotec

Western-Blot:

Maus α -human pJNK	Santa Cruz
Maus α -human JNK	Santa Cruz
Maus α -human pERK	Santa Cruz
Maus α -human ERK	Santa Cruz

4.1.5 Sonstige Materialien

MACS® CD4 <i>Microbeads</i> human	Miltenyi Biotec
MACS® LS-Separationssäulen	Miltenyi Biotec
TaqMan® qPCR <i>MasterMix</i>	Applied Biosystems
TaqMan® <i>Genexpression Assays</i>	Applied Biosystems
21-Gauge-Butterfly-Nadel	Sarstedt
Zentrifugenröhrchen	Greiner
EDTA-Röhrchen	Sarstedt
Zellkulturplatten	Greiner
rhIL2	R&D Systems
Neubauer-Zählkammer	Hartenstein
50 ml-Zellkulturflaschen	Greiner
15 ml-Zentrifugenröhrchen	Greiner
50 ml-Zentrifugenröhrchen	Greiner
Magnetische Halterung	Hartenstein
Fc-Rezeptor-Block	BD Pharmingen
iScript™cDNA <i>Synthesis Kit</i>	Biorad
SuperSignal West Pico <i>Chemiluminescent Substrate</i>	Pierce

4.1.6 Computerprogramme

FACSDiva	Becton Dickinson
FlowJo	Tristar
<i>Sequence Detection Software</i> ABI Prism 7000	Applied Biosystems
GSEA	Broad Institute, U.S.A
<i>Cluster</i>	M. Eisen, U.S.A
<i>TreeView</i>	M. Eisen, U.S.A

4.2 Zellkultur

Die Zellkultivierung fand unter sterilen Bedingungen in einem entsprechend ausgestatteten Zellkulturlabor statt. Alle Verbrauchsmaterialien wurden vor Verwendung bei 120°C für 20 Minuten autoklaviert. Geräte und Verbrauchsmaterialien, die nicht autoklaviert werden konnten, wurden zu Beginn der Arbeiten mit 70%igem Ethanol eingesprüht und hierdurch desinfiziert. Die Arbeiten fanden unter einer Sterilbank mit laminarer Luftführung statt. Die Werkbank wurde ebenfalls zu Beginn und am Ende der Versuche mit 70%igem Ethanol desinfiziert. Die Lagerung der Nährmedien und aller weiterer Lösungen und Puffer erfolgte bei 4 - 8°C. Zu Beginn der Arbeiten wurden diese in einem Wasserbad auf 37°C erwärmt. Die Zellkultivierung fand in einem Wassermantel-Inkubator bei 37°C und einem CO₂-Gehalt von 5% statt.

4.2.1 Zellen und Zelllinien

4.2.1.1 Humane Zellen

Für die in der vorliegenden Arbeit verwendeten humanen Blutproben und den daraus isolierten Zellen wurde die jeweils benötigte schriftliche Einwilligung der zuständigen Ethikkommission vor der ersten Blutentnahme eingeholt.

Blutproben von gesunden Spendern und von Multiple Sklerose-Patienten wurden mit deren Einwilligung, in Übereinstimmung mit der Deklaration von Helsinki und unter den entsprechenden Sicherheitsanforderungen des Universitätsklinikums Würzburg entnommen.

Die Blutproben aus der Thrombopherese stellte das Institut für Transfusionsmedizin der Universitätsklinik Würzburg freundlicherweise zur Verfügung.

4.2.1.2 Zelllinien

Für die vorliegende Arbeit wurden Jurkat-Zellen (humane T-Zell-Leukämie-Zelllinie) und T2-Zellen (humane T-Zell-Leukämie-Hybridom-Zelllinie) verwendet.

4.2.2 Blutentnahme

Die Blutabnahme erfolgte unter Verwendung von EDTA-Röhrchen. EDTA besitzt die Fähigkeit zweiwertige Metallkationen zu binden und inhibiert dadurch die Integrin-Aktivierung. Nach Punktion einer gestauten Vene des Spenders mit einer 21-Gauge-Butterfly-Nadel wurde der Stauschlauch gelöst und die gewünschte Menge an EDTA-Röhrchen für Monozytenaufreinigungen mit Blut befüllt. Der Transport der *Buffy coats* aus der Thrombopherese erfolgte auf Eis und die Blutproben wurden schnellstmöglich aufbereitet.

4.2.3 Isolierung von PBMCs mittels Ficoll-Dichtegradienten aus Vollblut

Für die Isolierung der PBMCs mittels Ficoll-Dichtegradient (Biochrom, Deutschland) wurde das Vollblut bzw. die *Buffy coats* 1:2 mit PBS verdünnt. In einem 50 ml-Zentrifugenröhrchen wurden 15 ml Ficoll (Dichte 1,077) vorgelegt und dieses vorsichtig

mit ca. 20 ml des verdünnten Blutes überschichtet. Die Zentrifugation erfolgte bei 400 g, einer Temperatur von 4°C für 20 Minuten, ohne Brems e. Vorsichtig und in kreisenden Bewegungen wurden die mononukleären Zellen (Monozyten und Lymphozyten) an der Phasengrenze mittels 10 ml Plastik-Pasteurpipette abgenommen, in ein neues 50 ml-Zentrifugenröhrchen überführt, das Zentrifugenröhrchen mit PBS auf ein Volumen von 50 ml aufgefüllt und anschließend bei 300 g, 4°C für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, das Zellpellet in 50 ml PBS resuspendiert und erneut bei 275 g, einer Temperatur von 4°C für 15 Minuten zentrifugiert. Nach dem Waschen der Zellen mit 50 ml PBS fand der abschließende Zentrifugationsschritt bei 250 g, bei 4°C für 15 Minuten statt. Das PBS wurde verworfen, das Zellpellet in 1 ml Zellkulturmedium aufgenommen und die Zellzahl bestimmt.

4.2.4 Bestimmung der Zellzahl

Entsprechend der zu erwartenden Zellzahl wurde eine Verdünnung von 1:100, 1:500 oder 1:1000 gewählt. Die Herstellung der Verdünnungsreihen erfolgte in Zehnerschritten, die Zellsuspension wurde für die einzelnen Verdünnungsschritte mit Trypanblau (Sigma Aldrich, Deutschland) versetzt. Die Bestimmung der Zellzahl fand unter Verwendung einer Neubauer-Zählkammer statt, bei Proben mit weniger als 150 Zellen wurden 4 Quadrate, bei Proben mit mehr als 150 Zellen die beiden diagonalen Quadrate ausgezählt. Die Berechnung der Zellzahl pro Milliliter erfolgte nach folgender Gleichung:

$$Zz / ml = Zz_g / nQ \times 10^4 \times VF$$

Zz = Zellzahl

Zz_g = gezählte Zellzahl

nQ = Zahl der ausgezählten Quadrate

VF = Verdünnungsfaktor

4.2.5 Magnetische Zellseparation

Die Isolation der humanen CD4⁺ T-Zellen fand unter Verwendung des MACS® human CD4 *Microbeads Kits* und von MACS® LS-Separationssäulen (beides Miltenyi-Biotech, Deutschland) statt. Für die Isolierung der humanen CD4⁺ T-Zellen wurden, je nach Ergiebigkeit der Blutprobe, 5×10^7 bis 1×10^8 PBMCs eingesetzt. Alle Arbeitsschritte fanden soweit möglich auf Eis und unter Verwendung von gekühlten Lösungen statt. Nach Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen in einem 15 ml-Zentrifugenröhrchen mit 10 ml MACS-Puffer gewaschen. Alle Zentrifugationsschritte erfolgten bei 300 g, für 10 Minuten bei einer Temperatur von 4°C. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand verworfen, die Zellen in 80 µl (je 1×10^7 Zellen) MACS-Puffer aufgenommen, 20 µl (je 1×10^7 Zellen) der CD4 *Microbeads*-Suspension zugegeben und für 15 Minuten bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Für den darauf folgenden Waschschrift wurden für je 1×10^7 Zellen 2 ml MACS-Puffer zugegeben, die Zellsuspension anschließend zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in einem Endvolumen von 500 µl MACS-Puffer aufgenommen. Für die Äquilibration wurde die LS-Separationssäule in eine magnetische Halterung (Miltenyi-Biotech, Deutschland) eingespannt und dreimal mit je 3 ml MACS-Puffer gewaschen. Im nächsten Schritt erfolgte die Beladung der Säule mit der *Microbead*-Zellsuspension. Die ungebundene Fraktion konnte die Säule ungehindert durchlaufen, die an *Microbeads*-gebundenen Zellen blieben an der magnetischen Wandung der Säule haften. Die Säule wurde dreimal mit je 3 ml MACS-Puffer gewaschen um eventuell ungebundene, anhaftende Zellen auszuspülen. Der Durchfluss wurde verworfen, ein neues 15 ml-Röhrchen unter die Säule gestellt und die Säule mit 5 ml MACS-Puffer beschickt.

Zur Elution der CD4⁺ Fraktion wurde ein Stempel, gleich bei einer Spritze, auf die Säule gesteckt und unter kräftigem Herunterdrücken die Zellen von der Wandung gelöst und somit aus der Säule gewaschen. Die isolierten Zellen wurden anschließend zentrifugiert, der Überstand verworfen und das erhaltene Zellpellet in 2 ml entsprechendem Zellkulturmedium aufgenommen. Nach Bestimmung der Zellzahl erfolgte das Aussäen der Zellen in Zellkulturplatten. Die durchflusszytometrische Analyse der CD4⁺ positiven Fraktion ergab eine durchschnittliche Reinheit von 85 - 95%.

4.2.6 Kultivierung von CD4⁺ T-Zellen für die Genexpressionsanalysen

Um die direkten Auswirkungen von Natalizumab studieren zu können wurden die Experimente *in vitro* durchgeführt. Da angenommen wurde, dass die Auswirkungen von Natalizumab auf humane T-Zellen nicht besonders stark ausfallen, sollte im ersten Schritt der Aktivierungsstatus der Zellen nach der Blutentnahme auf ein einheitliches Niveau angeglichen werden. Hierfür wurden die Zellen zuerst mit OKT-3 für drei Tage stimuliert und dann für weitere neun Tage zur Ruhe kommen gelassen. Nach dieser Ruhephase sollten alle Zellen den gleichen Aktivierungsstatus besitzen. Für die Analyse der Genexpressionsprofile humaner CD4⁺ T-Helferzellen wurden Zellen von drei gesunden Spendern beliebigen Alters und Geschlechts verwendet. Für die Kultivierung wurden $3,0 \times 10^5$ isolierte humane CD4⁺ T-Zellen zusammen mit $5,0 \times 10^6$ T2-Feederzellen (60 Gy-bestrahlt) und $2,5 \times 10^7$ Feeder-PBMCs (30 Gy-bestrahlt) in 25 ml CTL-Medium ausgesät und in 50 ml-Gewebekulturflaschen kultiviert. Die Stimulation der Zellen erfolgte unter Zugabe von 30 ng/ml OKT-3. An Tag 1 wurde 50 U/ml rhIL2 in das Medium hinzu gegeben, an Tag 3 wurden die Zellen gewaschen, um die Stimulation mit OKT-3 zu beenden. Hierfür wurden die Zellen resuspendiert, in ein 50 ml-Zentrifugenröhrchen überführt und mit 300 g, bei 4°C für eine Dauer von 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in 25 ml frischem CTL-Medium aufgenommen und erneut 50 U/ml rhIL2 dem Medium zugegeben. An Tag 7 und an Tag 10 erfolgte die erneute Zugabe von 50 U/ml rhIL2 in das Kulturmedium. An Tag 13 wurden $3,0 \times 10^5$ der bereits kultivierten Zellen erneut zusammen mit frischen T2-Feederzellen bzw. Feeder-PBMCs in An- bzw. Abwesenheit von 30 µg/ml Natalizumab ausgesät und das bereits beschriebene Kultivierungsprotokoll wiederholt. An Tag 10 endete das Experiment. Die Zellen wurden resuspendiert, 50% der Zellsuspension der in An- bzw. Abwesenheit von Natalizumab kultivierten Zellen abgenommen und jeweils in neue 50 ml-Gewebekulturflasche gegeben. Diejenigen Zellen, die in Anwesenheit von Natalizumab inkubiert wurden erhielten erneut 30 µg/ml Natalizumab. Diese beiden Ansätze stellen die Proben ohne Restimulation dar (-T/I -N bzw. -T/I +N). Die verbleibenden 50% der Zellen wurden mit 10 ng/ml Diacyl-Analagon TPA (T) und dem Calciumionophor Ionomycin 2 µM (I) restimuliert. Die Zellen, die bereits in Anwesenheit von Natalizumab inkubiert worden waren, erhielten erneut 30 µg/ml Natalizumab. Die

Stimulationsdauer betrug insgesamt 8 Stunden. Diese Ansätze stellen die restimulierten Proben (+T/I -N bzw. +T/I +N) dar. Abschließend wurden die Zellen resuspendiert, mit PBS gewaschen und das Zellpellet in 1 ml Trizol (Invitrogen, Deutschland) aufgenommen.

4.2.7 Kultivierung von humanen Zellen für die Durchflusszytometrie

Für alle Experimente mit primären humanen Zellen wurde X-VIVO 15 mit 10% Hitze inaktiviertem humanen-AB-Serum, für alle Experimente mit Jurkat-Zellen RPMI 1640 mit 5% Hitze-inaktiviertem FCS als Kulturmedium verwendet. Die T/I-Stimulation der Zellen erfolgte - falls nicht anders angegeben - mit 10 ng/ml TPA und 2 μ M Ionomycin.

4.2.7.1 Kultivierung von CD4⁺ T-Zellen für Langzeitversuche (10 Tage)

Frisch isolierte CD4⁺ T-Zellen wurden in einer Dichte von 1×10^6 in 24-well-Gewebekulturplatten ausgesät. Die Stimulation erfolgte mit 25 μ l α -CD3/28-*Beads* (je 1×10^6 Zellen), in Gegenwart von 50 U/ml rhIL2 bzw. in An- und Abwesenheit von 30 μ g/ml Natalizumab für drei Tage. Am Tag 3 wurden die Zellen resuspendiert, in ein 1,5 ml-Schnappdeckelgefäß überführt und dieses anschließend in eine magnetische Halterung (Hartenstein, Deutschland) eingespannt. Die ferromagnetischen-*Beads* wurden durch das anliegende Magnetfeld an die Wandung des Schnappdeckelgefäßes gezogen und auf diese Art und Weise weitgehend aus der Zellsuspension entfernt. Die Zellen wurden ohne Mitnahme der *Beads* aufgenommen, anschließend mit 1ml Medium gewaschen, erneut in eine 24-well-Gewebekulturplatte ausgesät und für weitere 7 Tage im Vorhandensein von rhIL2 und wo vorgesehen in Anwesenheit von 30 μ g/ml Natalizumab ruhen gelassen. Am Tag 10 erfolgte die Stimulation der CD4⁺ T-Zellen mit T/I bzw. alternativ mit 25 μ l α -CD3/28-*Beads* (je 1×10^6 Zellen). Die Stimulationsdauer mit T/I betrug insgesamt 8 Stunden, die Stimulation mit α -CD3/28-*Beads* 3 Stunden bzw. 6 Stunden. Die IL2-Akkumulation im Endoplasmatischen Retikulum wurde durch

Zugabe von 1 µg/ml Brefeldin A zwei Stunden nach Stimulationsbeginn gewährleistet. Nach dem Beenden der Stimulation wurden die Zellen resuspendiert, in ein 1,5 ml-Schnappdeckelgefäß überführt und für die durchflusszytometrische-Analyse eingesetzt.

4.2.7.2. Kultivierung von PBMCs für 72 Stunden

Frisch isolierte PBMCs wurden in einer Dichte von 1×10^6 in 24-*well*-Gewebekulturplatten ausgesät und in An- bzw. Abwesenheit von 30 µg/ml Natalizumab kultiviert. Nach einer Inkubationszeit von 16 Stunden, 40 Stunden und 64 Stunden erfolgte die T/I-Stimulation der PBMCs. Die Stimulationsdauer betrug insgesamt 8 Stunden, die Zytokinfreisetzung wurde 2 Stunden nach Stimulationsbeginn durch Zugabe von 1 µg/ml Brefeldin A unterbunden. Am Ende der Stimulation wurden die Zellen resuspendiert, in ein 1,5 ml-Schnappdeckelgefäß überführt und für die durchflusszytometrische-Analyse eingesetzt.

4.2.7.3 Stimulation von humanen PBMCs mit SEB

Humane PBMCs wurden in einer Dichte von 5×10^6 /ml ausgesät und durch Zugabe von 1 µg/ml bzw. 2 µg/ml SEB in An- bzw. Abwesenheit von 30 µg/ml Natalizumab für eine Dauer von 24 Stunden stimuliert. Zwölf Stunden nach Beginn der Stimulation wurde die Zytokinfreisetzung durch Zugabe von 1 µg/ml Brefeldin A unterbunden. Am Ende der Stimulationsdauer wurden die Zellen resuspendiert, in ein 1,5 ml-Schnappdeckelgefäß überführt und für die durchflusszytometrische-Analyse eingesetzt.

4.2.7.4 Stimulation von humaner Leukozyten mit α -CD3/28-*Beads*

In den verschiedenen Experimenten wurden sowohl humane PBMCs als auch isolierte humane CD4⁺ T-Zellen mit α -CD3/28-*Beads* stimuliert. In beiden Fällen wurden die Zellen in einer Dichte von 5×10^6 /ml ausgesät und in An- bzw. Abwesenheit von 30 µg/ml Natalizumab inkubiert. Die Aktivierung der Zellen erfolgte mit 25 µl α -CD3/28-*Beads* pro

1×10^6 Zellen. Das Unterbinden der Zytokinfreisetzung erfolgte 16 Stunden nach Beginn der Stimulation durch Zugabe von $1 \mu\text{g/ml}$ Brefeldin A. Am Ende des Experimentes wurden die Zellen resuspendiert, in ein $1,5 \text{ ml}$ -Schnappdeckelgefäß überführt, die ferromagnetischen-*Beads* entfernt und die Zellen für die durchflusszytometrische Analyse eingesetzt.

4.2.7.5 Stimulation humaner Leukozyten mit an Platten gebundenem α -CD3/28

Die benötigten 24-*well*-Gewebekulturplatten wurden mit $5,0 \mu\text{g/ml}$ α -CD3 (BD Pharmingen, U.S.A) und $5,0 \mu\text{g/ml}$ α -CD28 (BD Pharmingen, U.S.A) beschichtet. Um eine gleichmäßige Beschickung der Gewebekulturplatten mit Antikörper zu gewährleisten, wurde ein α -CD3/CD28-*Mastermix* hergestellt. Die benötigte Menge an Antikörper wurden in einem entsprechenden Volumen TRIS-HCl-Puffer (pH 9,0) suspendiert und hiervon $300 \mu\text{l}$ in jeden einzelnen Napf gegeben. Um ein Verdunsten des Puffers während der Inkubationsdauer zu vermeiden, wurden die 24-*well*-Platten am Deckelrand mit Parafilm verschlossen. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4°C und unter leichtem Schütteln. Ungebundene Antikörper wurden vor Aussaat der Zellen durch dreimaliges Waschen mit 1 ml PBS entfernt. In den verschiedenen Experimenten wurden sowohl humane PBMCs als auch isolierte humane CD4^+ T-Zellen mit an Platten gebundenen α -CD3/28 stimuliert. In beiden Fällen wurden die Zellen in einer Dichte von $5 \times 10^6/\text{ml}$ ausgesät und in An- bzw. Abwesenheit von $30 \mu\text{g/ml}$ Natalizumab inkubiert. Für die durchflusszytometrische Analyse von IL2 wurde 16 Stunden nach Beginn der Stimulation die Zytokinfreisetzung durch Zugabe von $1 \mu\text{g/ml}$ Brefeldin A, für die Analyse der Interleukine IL17 und $\text{IFN}\gamma$ durch Zugabe von $1 \mu\text{g/ml}$ Brefeldin A und $1,34 \mu\text{g/ml}$ Monensin blockiert.

4.2.8 Kultivierung von Jurkat-Zellen für die Durchflusszytometrie

Für die Bestimmung der Oberflächenexpression von CD49d unter Einwirkung von Natalizumab wurden 1 ml Jurkat-Zellsuspension mit einer Zelldichte von 2×10^6 /ml in eine 24-*well*-Platte ausgesät und in An- bzw. Abwesenheit von 30 µg/ml Natalizumab 24 Stunden inkubiert. Eine Stimulation der Zellen mit T/I fand bei diesem Versuch nicht statt. Um die Auswirkung der Stimulationsstärke auf die IL2-Freisetzung von Jurkat-Zellen unter Natalizumab-Einwirkung zu untersuchen, wurden die Jurkat-Zellen mit zwei verschiedenen Konzentrationen von TPA und Ionomycin stimuliert. Der Zeitraum des Experiments wurde auf 24 Stunden festgelegt. Zu Beginn erfolgte die Aussaat von 1 ml Zellsuspension mit einer Zelldichte von 5×10^6 /ml in eine 24-*well*-Platte. Den Zellen, die in Anwesenheit von Natalizumab kultiviert werden sollten, wurde 30 µg/ml Natalizumab zugegeben. Zwölf Stunden nach der Natalizumab-Zugabe erfolgte, je nach Ansatz, die Zugabe von entweder 10ng/ml TPA und 2µM Ionomycin oder 20ng/ml TPA und 4µM Ionomycin. Vier Stunden nach Beginn der Stimulation wurde die Sekretion von IL2 durch Zugabe von 1 µg/ml Brefeldin A unterbunden. Nach weiteren 8 Stunden wurden die Zellen resuspendiert, in ein 1,5 ml-Schnappdeckelgefäß überführt und für die durchflusszytometrische-Analyse eingesetzt.

4.3 Molekularbiologische Methoden

4.3.1 Gesamt-RNA-Isolation mit Trizol

Für die Isolation der Gesamt-RNA wurden je nach Ergiebigkeit der Blutproben zwischen 1×10^7 und 5×10^7 Zellen eingesetzt. Im ersten Schritt wurden die Zellen mit 1 ml PBS gewaschen, zentrifugiert und das PBS abgenommen. Die Lyse der pelletierten Zellen erfolgt durch auf- und abpipettieren mit 1000 µl Trizol-Reagenz (Invitrogen, U.S.A). Um eine vollständige Dissoziation der Nukleinsäure-Proteinkomplexe zu erreichen, wurden die Proben 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend über Nacht bei -20°C eingefroren. Nach dem Auftauen wurden die Proben ca. 30 Sekunden auf einem

Vortex-Schüttler homogenisiert, mit 200 µl Chloroform (Roth, Deutschland) versetzt, erneut 30 Sekunden mittels Vortex-Schüttler durchmischt und anschließend für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Proben für 15 Minuten bei 12000 g (Eppendorf Zentrifuge 5417R) bei 2 - 4°C zentrifugiert.

Für die RNA-Fällung wurde die wässrige Phase abgenommen und in ein neues 1,5 ml-Schnappdeckelgefäß überführt. Anschließend wurden 500 µl Isopropanol (Roth, Deutschland) zugegeben, 10 Minuten bei -20°C inkubiert und für 20 Minuten mit 12000 g bei 4°C zentrifugiert. Das dabei entstandene RNA-Präzipitat liegt als weißes Pellet vor. Der Isopropanolüberstand wurde abgesaugt, das RNA-Pellet mit 1000 µl 75% Ethanol versetzt, leicht geschüttelt und anschließend für 5 Minuten mit 7500 g bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut verworfen und das RNA-Pellet luftgetrocknet, bis die schneeweiße Färbung komplett verschwunden war. Anschließend wurde das Pellet, je nach Größe, in 20 - 50 µl nukleasefreiem Wasser gelöst, 5 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen und anschließend auf 65°C für 10 Minuten erhitzt. Nachdem die Proben auf Eis abgekühlt waren, erfolgte die photometrische Bestimmung der RNA-Konzentration mittels UV/Vis Spektralphotometrie. Hierzu wurde die Probe im Verhältnis 1:80 mit TRIS-HCl (pH 7,0) Puffer verdünnt und die Absorption bei 260 nm und 280 nm detektiert.

Die Berechnung der RNA-Konzentration erfolgte unter Zuhilfenahme folgender Gleichung:

$$\text{Konzentration}_{\text{RNA}} = \text{OD}_{260} \times V \times n \text{ (mg/dl)}$$

OD = Optische Dichte

V = Verdünnungsfaktor

n = 40 mg/dl für RNA

Über das OD₂₆₀/OD₂₈₀ Verhältnis wurde die Reinheit der isolierten RNA bestimmt.

4.3.2 Genexpressionsanalyse und statistische Evaluation

Die Genexpressionsanalyse wurde mit HG U133 A *Genexpression-Arrays* der Firma Affymetrix (Affymetrix, U.S.A) durchgeführt. Die extrahierte RNA wurde zunächst in cDNA umgeschrieben, mittels *in vitro*-Transkription in Anwesenheit von Biotin-gelabelten dUTP in cRNA umgeschrieben, anschließend gemäß dem Protokoll des Herstellers fragmentiert, und auf die entsprechenden Microarrays hybridisiert. Die Normalisierung der Daten erfolgte mit Zuhilfenahme der *Gene Chip Operating Software* (GCOS) von Affymetrix und unter Verwendung des MAS5 Algorithmus. Die Intensitätswerte der einzelnen Spender derselben Gruppe wurden gemittelt und die Mittelwerte der in Anwesenheit von Natalizumab kultivierten Proben von den Mittelwerten der in Abwesenheit von Natalizumab kultivierten Proben subtrahiert. Um die Gene zu ermitteln, die zwischen Natalizumab behandelten und Natalizumab unbehandelten Proben am stärksten differentiell exprimiert sind, wurden die Expressionswerte sowohl für die restimulierten als auch bei den nicht stimulierten Proben in Excel aufsteigend bzw. absteigend sortiert und ausgewertet. Zur Identifikation weiterer durch Natalizumab veränderten Gene wurden im nächsten Schritt die Gene mit einer mindestens 2-fach erhöhten bzw. 2-fach verringerten Genexpression in die Analyse mit einbezogen und hinsichtlich ihres veränderten Genexpressionsniveaus sortiert. Um die Genexpressionsmuster miteinander vergleichen zu können wurde ein zweiseitiger T-Test und weiterhin eine *Pathway*-Analyse mit dem Programm GSEA (*Gene Set Enrichment Analysis* (<http://www.broad.mit.edu/gsea>)) durchgeführt. Die GSEA Analyse ermöglicht die Zuordnung von Genen zwischen zwei Phänotypen, die auf den Unterschieden in deren Expression basiert.

Je mehr Gene eines gegebenen Gensatzes im oberen oder unteren Bereich der klassifizierten Genexpressionsunterschiede akkumulieren, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit, dass dieser Gensatz signifikant für den einen Phänotyp angereichert ist. Anhand dieser Daten erstellt GSEA eine Rangliste an deren beiden Enden jeweils ein Phänotyp steht. Umso mehr Gene einer Signatur oben oder unten in der geordneten Genliste auftauchen desto höher ist die Wahrscheinlichkeit dass diese Signatur signifikant mit einem der beiden Phänotypen assoziiert ist. Nimmt der nominale p-Wert und der tail-FDR- (*tail-false discovery rate*)-Wert 0,05 bzw. 0,25 oder kleiner an,

wird das dazugehörige Genset für den vorgegeben Phänotyp als signifikant angereichert angesehen. Alle Gene, die mindestens eine 0.5-fach [log2] unterschiedliche Expression zwischen den Gruppen aufweisen wurden in das GSEA Softwaretool eingespeist und nach *Pathways* (C2) annotiert. Zur *Cluster*-Analyse und Visualisierung der Daten wurden die Programme *Cluster* und *TreeView* von M. Eisen (<http://rana.lbl.gov/EisenSoftware.htm>, M. Eisen, Berkeley, CA, U.S.A) verwendet.

4.3.3 Synthese der komplementären Desoxyribonucleinsäure mittels RT-PCR

Aus 1 µg Gesamt-RNA wurde unter Verwendung des iScript™cDNA *Synthesis Kit* (Biorad, U.S.A) die komplementäre DNA (cDNA) synthetisiert. In dem Reaktionsansatz sind dNTPs, die Reverse Transkriptase (RT) und *random*-Primer enthalten, mit deren Hilfe die Gesamt-RNA umgeschrieben wird. Pro Reaktion wurde folgendes Reaktionsgemisch in einem 200 µl Reaktionsgefäß auf Eis angesetzt:

Komponenten pro Reaktion (20 µl)

5x iScript Reaktion-Mix	4µl
iScript Reverse Transkriptase	1µl
Nukleasefreies Wasser	(Volumen abhängig von der mRNA-Konz.)
Gesamt-RNA (1µg Gesamt-RNA)	(Volumen abhängig von der mRNA-Konz.)
Gesamtvolumen	20 µl

Für die Primerbindung wurde das Reaktionsgemisch in einen *Thermo-Cycler* für 5 Minuten bei 25°C erwärmt. Für die cDNA-Synthesephase erfolgte die Erhöhung der Temperatur auf 42°C für 30 Minuten. Die Denaturierung fand bei 85°C für 5 Minuten statt und anschließend wurde das Reaktionsgemisch auf 4°C abkühlt (Lagerungstemperatur im Gerät). Das cDNA-Syntheseprodukt wurde entweder direkt für Experimente eingesetzt oder bei -20°C eingefroren.

4.3.4 Genexpressionsanalyse auf mRNA-Ebene mittels qRT-PCR

Mit Hilfe der quantitativen *real-time*-PCR (qRT-PCR) wurden in der vorliegenden Arbeit die Expressionsniveaus der Gene *IL2*, *RORC*, *TBX21* und *FOXP3* bestimmt. Als Detektionsmethode diente die qRT-TaqMan-Technologie (Applied Biosystems, U.S.A.). Bei der TaqMan-qRT-PCR wird für die Amplifikation neben den beiden Primerpaaren ein weiteres kurzes Oligonukleotid benötigt, das als Gensonde fungiert. Auf der Gensonde befinden sich ein Reporter-Fluoreszenzfarbstoff und ein Quencher-Molekül, die in räumlicher Nähe zueinander stehen. TaqMan-Sonden besitzen somit keine Eigenfluoreszenz, da die Reporter-Fluoreszenz durch das nahe liegende Quenching-Molekül ausgelöscht wird. Bei der Elongation im PCR-Prozess wird ausgehend von den spezifisch gebundenen Primern der komplementäre Strang der cDNA durch die Taq-Polymerase synthetisiert und verlängert. Bei diesem Vorgang trifft die Taq-Polymerase auf die ebenfalls sequenzspezifisch gebundene TaqMan-Gensonde. Durch die 5'-3'-Nuklease-Aktivität der Taq-Polymerase wird das Oligonukleotid abgebaut und der Reporter-Fluoreszenzfarbstoff von dem Quencher-Molekül getrennt. Durch die entstehende räumliche Trennung von Reporter-Fluoreszenzfarbstoff und Quencher-Molekül wird das Fluoreszenzsignal generiert. Die Stärke dieses Signals ist direkt proportional zu der entstehenden Menge an PCR-Produkt und ermöglicht so die Quantifizierung des Zielgens.

4.3.4.1 Durchführung

In der vorliegenden Arbeit wurde eine *Two-Step* qRT-PCR angewandt. Hierbei werden die cDNA-Synthese und die anschließende qRT-PCR in zwei voneinander getrennten Arbeitsschritten durchgeführt. Für Genexpressionsanalysen auf RNA-Ebene musste die eingesetzte RNA zunächst mit Hilfe der Reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben werden. Die Arbeiten für die RNA-Isolation und die qRT-PCR fand in verschiedenen Räumlichkeiten statt um Kontaminationen zu vermeiden. Alle cDNA Proben und TaqMan® *Genexpression Assays* wurden in Aliquots bei -20°C, der TaqMan® qPCR-*MasterMix*-Puffer bei 4°C gelagert. Alle Arbeitsschritte erfolgten soweit

möglich auf Eis. Um Ungenauigkeiten durch Pipettierfehler zu vermeiden wurde für die Zahl der entsprechenden qRT-PCR-Reaktionen eines Ansatzes ein *Mastermix* unter Verwendung des TaqMan® qPCR-*MasterMix*-Puffers (Applied Biosystems, U.S.A) und des entsprechenden TaqMan® *Genexpression Assays* (Applied Biosystems, U.S.A) hergestellt.

Herstellung des qRT-PCR-*Mastermix*:

Komponenten pro 25 µl-Reaktion:

TaqMan® qPCR- <i>MasterMix</i> (2x)	12,5 µl
TaqMan®-Assay	1,25 µl
DEPC-Wasser	9,25 µl
cDNA (10 ng)	2,0 µl
Gesamtvolumen	25,0 µl

Die Messung der Probe wurde in Triplikate durchgeführt und dementsprechend 69 µl des *Mastermix* in ein neues frisches Schnappdeckelgefäß gegeben, mit 6 µl der entsprechenden cDNA versetzt, 10 Sekunden mittels Vortex-Schüttler durchmischt und dann 25 µl des Ansatzes in jeden Napf der optischen 96-*well*-Analyseplatte (Applied Biosystems, U.S.A) gegeben. Um die Spezifität der Reaktionen zu überprüfen wurden für jeden qRT-PCR-Lauf Negativkontrollen mitgeführt und hierfür in die entsprechenden Näpfe anstelle der Probe 2 µl RNase-freies Wasser gegeben. Nachdem die 96-*well*-Analyseplatte beschickt worden war, wurde diese mittels Folie verschlossen und zum Absenken eventueller Tropfen an der Wandung kurz zentrifugiert. Die *real-time*-PCR-Reaktionen wurden in dem automatischen Fluorometer ABI PRISM (7000 *Sequence Detection System*, Applied Biosystems, U.S.A) durchgeführt. Für die Amplifikation galten folgenden Reaktionsbedingungen:

Programmschritte (ABI Prism 7000): Zyklen, Temperatur und Dauer

Programmschritt 1: Vorinkubation	(Zyklen: 1)	95°C	2 Minuten
Programmschritt 2: Denaturierung	(Zyklen: 1)	95°C	10 Minuten
Programmschritt 3: <i>Annealing</i>	(Zyklen: 40)	95°C	15 Sekunden
Programmschritt 4: Elongation	(Zyklen: 40)	60°C	1 Minuten

4.3.4.2 Auswertung der PCR-Ergebnisse mittels relativer Quantifizierung

Zur Bestimmung der Genexpression wurde die relative Quantifizierung nach der $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode angewandt:

Bei der $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode wird die Expression des Zielgens auf ein nicht reguliertes, endogenes Referenz-Gen (endogene Kontrolle) bezogen. In der Regel verwendet man hierfür sog. *Housekeeping*-Gene, also nicht-regulierte, konstitutiv exprimierte Gene. Durch die Normalisierung mit Hilfe der endogenen Kontrolle kann der Anstieg bzw. Abfall des Expressionsniveaus eines Zielgens in verschiedenen Proben ermittelt werden.

Auch *Housekeeping*-Gene unterscheiden sich in verschiedenen Zelltypen bezüglich ihres Genexpressionsprofils. Es empfiehlt sich somit für jeden zu untersuchenden Zelltyp das jeweils am besten exprimierte *Housekeeping*-Gen mittels Genexpression-*Screening* zu ermitteln. In der vorliegenden Arbeit wurde im Vorfeld ein solches *Screening* für humane CD4^+ T-Zellen durchgeführt. Das *Screening*-Verfahren fand unter Verwendung einer entsprechenden 96-well-qRT-PCR Platte statt, die bereits vom Hersteller (Applied Biosystems, U.S.A) mit der DNA verschiedener prominenter *Housekeeping*-Gene beschickt worden war. Nach der Datenanalyse stellte sich *B2M* (β 2-Microglobulin) als geeignetes *Housekeeping*-Gen mit dem besten Genexpressionsprofil heraus und wurde als Referenz-Gen herangezogen. Eine weitere Voraussetzung für die Anwendung der relativen Quantifizierung ist, dass die verwendeten Genexpression-Assays vergleichbare PCR-Reaktionseffizienzen besitzen. Die Effizienzen der jeweiligen PCR-Reaktionen können sich aufgrund von Abweichungen des Primer-*Annealings*, des Guanin-Cytosin-Gehalts und der Länge des

PCR-Produktes unterscheiden. Um bei der späteren Normalisierung auf das Referenz-Gen potentielle Fehler bedingt durch unterschiedliche PCR-Reaktionseffizienzen ausschließen zu können, sollte der Effizienzunterschied der verwendeten Genexpression-Assays kleiner 5% sein. Zur Ermittlung der Effizienzunterschiede wird für jedes zu untersuchende Gen eine Standardkurve mit unterschiedlichen cDNA-Verdünnungsstufen erstellt und aus der resultierenden Steigung die jeweilige PCR-Effizienz berechnet.

Für die Standardkurve wurde die cDNA unverdünnt bzw. jeweils 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000 mit RNase-freiem Wasser verdünnt und in Triplikaten analysiert. Nach dem qRT-PCR-Lauf wurden von der Software die CT-Werte der einzelnen Verdünnungen berechnet und in einer logarithmischen Funktion graphisch gegen die entsprechende cDNA-Konzentration dargestellt. Die Steigung der Standardkurve stellt der *slope*-Wert dar, der direkt aus der Software des ABI PRISM Gerätes abgelesen werden kann. Die Effizienz (E) der Reaktion lässt sich dann nach folgender Gleichung berechnen:

$$E = (10^{-1/\text{slope}}) - 1$$

Eine Effizienz von 100% bedeutet, dass es bei jedem Amplifikationsschritt zu einer Verdopplung der Amplifikate und daraus resultierend zu einer Verdopplung des Fluoreszenzsignals kommt. Die Effizienzen von Referenz- und Ziel-Gen sollten im Idealfall in einem Bereich von 90 - 100% liegen. Aus diesem Grund wurden Standardkurven für die Zielgene *IL2*, *TBX21*, *FOXP3*, *RORC* sowie für das Referenzgen *B2M* erstellt und daraus die einzelnen Effizienzen berechnet. Alle verwendeten Genexpression-Assays zeigten eine Effizienz > 90% und die Differenz zwischen den einzelnen Assays in Bezug auf das Referenz-Gen *B2M* war in allen Fällen < 5%.

Die Bestimmung der relativen Expression:

Zu Beginn wird ein Kalibrator definiert, der diejenige Probe darstellt, die unter Normalbedingungen des jeweiligen Experiments kultiviert wurde.

Im ersten Schritt (1) erfolgt die Normalisierung auf das *Housekeeping*-Gen *B2M*. Hierbei wird der Unterschied an Schwellenwertzyklen für das Zielgen und das Referenzgen errechnet.

$$(1) \Delta CT = \Delta CT \text{ Zielgen} - \Delta CT \text{ B2M}$$

Im zweiten Schritt (2), wird $\Delta\Delta CT$ bestimmt. Der ΔCT -Wert des Kalibrators wird von den ΔCT -Werten der jeweiligen Proben subtrahiert.

$$(2) \Delta\Delta CT = \Delta CT \text{ Probe} - \Delta CT \text{ Kalibrator} -$$

Im dritten Schritt (3) wird die relative Genexpression (RG) errechnet.

$$(3) RG = 2^{(-\Delta\Delta CT)}$$

Die RG gibt die n-fache Überexpression eines Gens im Vergleich zum Kalibrator wieder.

Die Kalkulation der RG, die statistische Auswertung und die Ermittlung der Standardabweichung erfolgten mit Hilfe des Programms MS Excel (Microsoft).

4.3.5 Durchflusszytometrie

Die Durchführung der durchflusszytometrische Analysen, auch FACS (*Fluorescence-Activated Cell Sorting*)-Analysen genannt, erfolgte mit den Durchflusszytometern FACSCanto II und FACSLSR II (Becton Dickinson, U.S.A).

4.3.5.1 Färbungen von Oberflächenmarkern

Für die Färbung von Oberflächenmarkern wurden die Zellen vor der Kultivierung auf eine Zellzahl von 1×10^6 eingestellt. Nach entsprechender Inkubationsdauer wurden die Zellen resuspendiert und in ein Schnappdeckelgefäß überführt. Alle Zentrifugationsschritte für die FACS-Färbungen erfolgte bei 300 g, bei Raumtemperatur und für 10 Minuten. Nach der Zentrifugation wurde das überstehende Medium abgesaugt und die Zellen in 1 ml PBS gewaschen. Verschiedene Immunzellen wie NK-Zellen, Makrophagen und Neutrophile besitzen Fc-Rezeptoren auf der Zelloberfläche. Um unspezifische Bindungen der Detektionsantikörper und somit falsch-positive Signale zu vermeiden, wurde bei der Färbung von PBMCs 10 μ l Fc-Rezeptor-Block (BD Pharmingen, U.S.A) hinzugegeben und für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 1 ml FACS-Puffer, um überschüssigen Fc-Rezeptor-Block mittels Waschschrift abzutrennen. Für die Anfärbung der Zellen wurden folgende Antikörper verwendet und die Proben gemäß den Angaben der Hersteller mit der entsprechenden Menge an Antikörper versetzt.

Maus α -human CD49d-PE	(BD Pharmingen, U.S.A)
Maus α -human CD4-FITC	(BD Pharmingen, U.S.A)
Maus α -human CD45RA-PE	(Miltenyi Biotec, Deutschland)
Maus α -human CD4-APC	(Miltenyi Biotec, Deutschland)
Maus α -human CD49d-APC	(Miltenyi Biotec, Deutschland)
Maus α -human CD11a-FITC	(Immuno Tools, Deutschland)
Maus α -human CD45RO-FITC	(Immuno Tools, Deutschland)
Maus α -human CD62L-APC	(Immuno Tools, Deutschland)
Maus α -human CD25-APC	(Immuno Tools, Deutschland)
Maus α -human CD19-APC	(Immuno Tools, Deutschland)

Die anschließende Inkubation fand bei Raumtemperatur im Dunkeln und für eine Dauer von 30 Minuten statt. Um die ungebundenen Detektionsantikörper abzutrennen, erfolgten zwei Waschschrift mit jeweils 1 ml FACS-Puffer. Im letzten Schritt wurden die

Zellen durch Zugabe von 200 µl 2% Paraformaldehyd für 20 Minuten bei Raumtemperatur fixiert und im Anschluss mittels Durchflusszytometer analysiert.

4.3.5.2 Intrazelluläre Färbung der Zytokine IL2, IL17 und IFN γ

In der vorliegenden Arbeit wurden neben der Färbung von Oberflächenmarkern ebenfalls intrazelluläre Zytokinfärbung durchgeführt. Das Protokoll der intrazellulären Färbung schließt sich somit an das vorangegangene Protokoll für die Anfärbung der Oberflächenmarker an. Nach der Fixierung der Zellen mittels 2%-igem Paraformaldehyd erfolgte die Zugabe von 1 ml Permeabilisierungspuffer um überschüssiges Paraformaldehyd auszuwaschen. Nach dem Pelletieren der Zellen wurde erneut 1 ml Permeabilisierungspuffer zugegeben und für 10 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zentrifugiert und der Überstand verworfen. Für die Detektion der Zytokine wurden folgende Antikörper verwendet und die Proben gemäß den Angaben der Hersteller mit der entsprechenden Menge an Antikörper versetzt.

Maus α -human IL2-APC	(Miltenyi Biotec, Deutschland)
Maus α -human IL17-APC	(Miltenyi Biotec, Deutschland)
Maus α -human IFN γ -FITC	(Miltenyi Biotec, Deutschland)

Die Inkubation erfolgte bei 4°C für 90 Minuten im Dunklen. Nach Ablauf der Inkubationsdauer wurden die Zellen unter Zugabe von 1 ml Permeabilisierungspuffer gewaschen, der Überstand verworfen und die Zellen erneut in 200 µl Permeabilisierungspuffer aufgenommen. Im Anschluss fand die durchflusszytometrische -Messung statt.

4.3.5.3 Messungen am Durchflusszytometer

Vor der Messung wurden die Zellen mittels Vortex-Schüttler resuspendiert. Die Einstellung der Geräteparameter erfolgte anhand ungefärbter bzw. mit entsprechenden Fluorophor-positiven-Kontrollzellen. Die hierdurch eingestellten Parameter für die FACS-Messung wurden nach Beginn der Probenmessung nicht mehr verändert bzw. konnten gespeichert und für jede weitere Messung mit derselben Zellpopulation erneut genutzt werden. Um Zelltrümmer aus der Messung auszuschließen, wurde mit Hilfe der Parameter Zellgröße (FSC) und Granularität (SSC) bestimmte Populationen definiert. Von jeder Probe wurden, je nach Experiment, 20.000 - 30.000 Ereignisse der entsprechenden Population gemessen und aufgenommen.

4.3.5.4 Auswertungen der Daten mittels FlowJo

Die gewonnenen Daten wurden mit Hilfe der FlowJo-Software Version 4.1.2 (Tri Star, U.S.A) ausgewertet und als Dot-Plot-Diagramm oder als Histogramm dargestellt. Beim Dot-Plot werden die gemessenen Parameter als zweidimensionales Diagramm gegeneinander aufgetragen und jede Zelle entsprechend ihrer Größe, Granularität bzw. Fluoreszenz als Punkt dargestellt. Dies eignet sich vor allem zur graphischen Darstellung von Zellpopulationen, die sich anhand ihrer Größe und/oder Granularität besonders gut abgrenzen. Bei der Auswertung des Dot-Plots können bestimmte Regionen des Diagramms definiert und zur Differenzierung weiterer Zellpopulationen in Abhängigkeit von ihrer Zelleigenschaften bzw. ihrer relativen Fluoreszenz herangezogen werden. In einem Histogramm wird die Häufigkeitsverteilung in der jeweiligen Probe dargestellt. Die Zellzahl wird auf der Y-Achse gegen die Intensität der Fluoreszenz auf der X-Achse aufgetragen. Dabei werden oftmals die Parameter Zellgröße und Granularität linear und die Fluoreszenzen logarithmisch dargestellt.

4.3.5.5 Normalisierung

Zur Normalisierung der Daten wurden im ersten Schritt die Mittelwerte aller Spender der unstimulierten und/oder der unbehandelten Proben bzw. der Proben zum Zeitpunkt 0 ermittelt und diesen der Wert 1 bzw. 100% zugewiesen. Im nächsten Schritt erfolgte die Berechnung der Mittelwerte aller Spender für die jeweiligen Versuchsbedingungen. Anschließend wurden die Mittelwerte der in Anwesenheit durch die Mittelwerte der in Abwesenheit von Natalizumab inkubierten Proben dividiert und hinsichtlich der unstimulierten und/oder der unbehandelten Proben normalisiert.

4.3.6 Bead Arrays

Die Aktivierung der Zellen erfolgte mittels an Platten gebundenen α -CD3 und α -CD28 (s. Punkt 4.2.7.5). Die peripheren Blutlymphozyten der MS-Patienten wurden mittels Ficoll-Dichtegradient aufgereinigt und in einer Dichte von 2×10^6 /well ausgesät. Als Kulturmedium diente X-VIVO 15 mit 10% Hitze-inaktiviertem humanen-AB-Serum. Nach 24 Stunden bzw. 48 Stunden erfolgte die Abnahme des Überstandes. Die Zytokinmessung fand unter Verwendung des *Cytometric Bead Arrays* (Becton Dickinson, U.S.A) statt. Die Detektion der Interleukine IFN γ , IL2, IL4, IL10, IL12/IL23p40, IL17A und IL21 wurde mit den entsprechenden *CBA Flex Sets* (Becton Dickinson, U.S.A) durchgeführt. Im Vorfeld wurde das Durchflusszytometer für die Messung der *CBA Flex Sets* kalibriert. Unter Verwendung von PE-gekoppelten Kalibrierung-*Beads*, die in ihrer Größe den verschiedenen Detektion-*Beads* entsprechen, wurden die *Gates* um die verschiedenen *Bead*-Populationen definiert und die Laserintensität für die PE-Detektion justiert. Die festgelegten Einstellungen wurden gespeichert und für alle weiteren Messungen verwendet. Für die Zytokinmessung wurde zu Beginn eine Protein-Standardkurve (0–5000 pg/ml) erstellt, die folgende Verdünnungsstufen umfasste: Unverdünnt, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256 und eine Negativkontrolle. Der Proteinstandard wurde vom Hersteller bezogen. Die Herstellung der einzelnen Verdünnungsschritte erfolgte unter Verwendung des *Assay Diluent*-Puffers. Im nächsten Schritt erfolgte die Herstellung eines *CBA Flex Set Mastermix*, für den je 1 μ l des

entsprechenden *Flex Sets* pro Interleukin und pro Probe in *Capture Bead Diluent* suspendiert wurde. Das Volumen des *Capture Bead Diluent* ist variabel und abhängig von der Anzahl der Proben und der zu untersuchenden Interleukine. Im nächsten Schritt wurden 10 μl des *CBA Flex Set Mastermix* in 1 ml-Mikrotiter-Röhrchen vorgelegt, anschließend weitere 10 μl der jeweiligen Probe hinzugegeben und für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. In der Zwischenzeit erfolgte der Ansatz des PE-Detektions-Reagenz-*Mastermix*, für den 1 μl des entsprechenden PE-Reagenz pro Interleukin und pro Probe in *Detection Reagent Diluent* resuspendiert wurde. Das Volumen des *Detection Reagent Diluent* ist ebenfalls variabel und abhängig von der Anzahl der Proben und der verwendeten Interleukin-Sets. Nach 1 Stunde wurde jeweils 10 μl des Detektions-Reagenz-*Mastermix* zu den einzelnen Proben hinzugegeben. Die anschließende Inkubationszeit betrug 2 Stunden im Dunkeln. Im nächsten Schritt wurden 200 μl Wasch-Puffer zugegeben, bei 200 g für 5 Minuten zentrifugiert und der Überstand abgekippt. Anschließend erfolgte die Messung am Durchflusszytometer, die Auswertung fand unter Verwendung des Programms MS-Excel statt.

4.3.7 Western-Blot-Analyse

Die Stimulation der Jurkat-Zellen erfolgte mit TPA, Ionomycin und in einer Kombination aus beiden Stimuli, jeweils in An- und Abwesenheit von Natalizumab. Für die Stimulation der primären humanen CD4⁺ T-Helferzellen wurden folgende Antikörper-Kombinationen verwendet: α -CD3/28, α -CD3/28/49d, bzw. α -CD28/49d, alternativ wurde α -CD49d durch Natalizumab ersetzt. Für die Western-Blots wurden jeweils 2×10^7 Zellen verwendet, die Stimulationsdauer betrug 2 Stunden. Die Lyse der geernteten Zellen erfolgte unter Zugabe von 100 μl RIPA-Puffer. Anschließend wurden die Zellen bei 4°C für 10 Minuten geschüttelt, dann pelletiert und der Überstand in ein neues Schnappdeckelgefäß gegeben. Hierzu wurden 25 μl Lämmli-Puffer (5x) gegeben und die Proben bei 95°C für 10 Minuten gekocht. Im nächsten Schritt erfolgte elektrophoretische Auftrennung der Proteine mittels SDS-PAGE und der Transfer per Elektrobplot auf eine Nitrozellulosemembran. Die Detektion der Proteine erfolgte unter

Verwendung der Antikörper α -JNK, α -pJNK, α -ERK, α -pERK (alle von Santa Cruz Biotechnology, USA), die Inkubation wurde über Nacht bei 4°C durchgeführt. Anschließend wurde die Nitrozellulosemembran dreimal mit TBS/Tween-Puffer gewaschen und ein sekundärer Peroxidase-gekoppelter Detektionsantikörper für eine Dauer von 1 Stunde zugegeben. Die Nitrozellulosemembran wurde erneut dreimal mit TBS/Tween-Puffer gewaschen, die Generierung des Signals erfolgte unter Verwendung eines Chemolumineszenzsystems (Pierce, U.S.A).

5. Ergebnisse

5.1. Natalizumab beeinflusst das Genexpressionsprofil humaner CD4⁺ T-Zellen

Obwohl Natalizumab als blockierender und nicht als Signal-induzierender Antikörper beschrieben ist, ergaben publizierte Microarray-Analysen ein verändertes Genexpressionsmuster humaner T-Lymphozyten, Neutrophiler und B-Zellen durch Natalizumab. In dieser Studie wurde peripheres Blut von Patienten in einem Zeitraum von bis zu 24 Monaten nach Therapiebeginn analysiert (Lindberg et al. 2008). Die Microarray-Experimente der vorliegenden Arbeit zielten darauf ab, eine mögliche direkte Beeinflussung des Genexpressionsprofils humaner CD4⁺ T-Zellen, die maßgeblich an der Progression der MS beteiligt sind, durch Natalizumab zu untersuchen. Deshalb wurden CD4⁺ T-Zellen *in vitro* und nur über den kürzeren Zeitraum von 10 Tagen in Anwesenheit von Natalizumab kultiviert. Durch Restimulation der humanen CD4⁺ T-Zellen wurden die Auswirkungen von Natalizumab unter inflammatorischen Bedingungen nachgeahmt.

5.1.1 Erhöhte IL2-Expression bedingt durch Natalizumab

Humane CD4⁺ T-Zellen wurden auf T2-Zellen und bestrahlten PBMCs als funktionell eingeschränkten Feederzellen in An- und Abwesenheit von Natalizumab kultiviert. Nach 10 Tagen wurde ein Teil der Zellen pharmakologisch mit T/I ohne erneute IL2-Zugabe für 8 Stunden restimuliert. So können die Signalkaskaden, die natürlicherweise über TCR- und Kostimulation induziert werden, effizient und polyklonal abgerufen werden. Zu Beginn wurden jeweils 10 Gene mit dem stärksten erhöhten bzw. reduzierten Genexpressionsunterschieden [\log_2] ermittelt. Von den Genen der restimulierten CD4⁺ T-Zellen mit der am stärksten erhöhten Expression konnten 5 Gene immunologischen Prozessen zugeordnet werden (Abbildung 7 A). *IL2*, *IL3* und *CCL1*

(*Chemokine (C-C motif) ligand 1*), gehören zur Familie der Zytokine bzw. Chemokine. Weitere Gene sind ist der Transkriptionsfaktor *ATF3* (*Cyclic AMP-dependent transcription factor-3*), dessen ektopische Expression mit einer erhöhten $\text{IFN}\gamma$ -Produktion in CD4^+ T-Zellen einhergeht (Filén et al. 2010) und *HPX* (*Hemopexin*), ein Mitglied der Akute-Phase-Proteine (Tolosano and Altruda 2002). Mit einer fast 1,8-fachen [\log_2] Verstärkung ist *IL2* das am deutlichsten durch Anwesenheit von Natalizumab beeinflusste Gen. Im Gegensatz dazu konnte den 10 „Top“-Genen der restimulierten Proben mit reduzierter Expression kein eindeutiger biologischer Prozess zugeordnet werden. Bei den 10 Genen mit der stärksten Expressionserhöhung der nicht restimulierten CD4^+ T-Zellen sind *GPR137* (*G protein-coupled receptor 137*), *IRF2BP1* (*Interferon regulatory factor 2 binding protein 1*) und *ANKRD52* (*Ankyrin repeat domain 52*) an Signalisierungsprozessen beteiligt, ein gemeinsamer Signalweg, der allen 3 Genen zu Grunde liegt, konnte nicht identifiziert werden (Abbildung 7 B). Bei den 10 Genen mit der stärksten reduzierten Expression der nicht restimulierten Proben konnte ebenfalls kein eindeutiger biologischer Prozess zugeordnet werden.

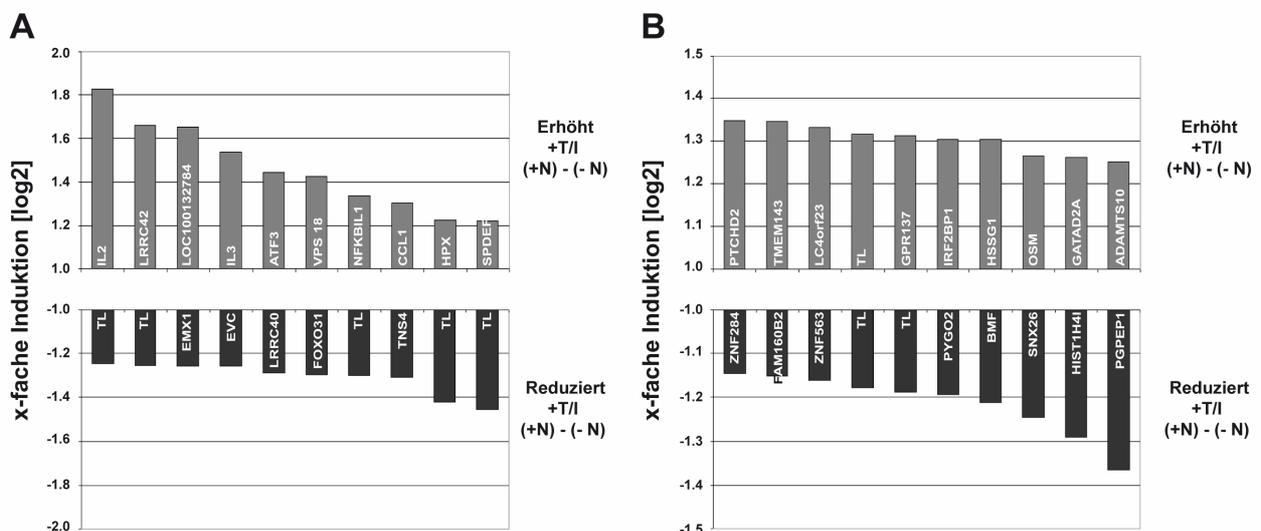


Abbildung 7. Natalizumab beeinflusst immunologisch relevante Gene.

Expressionsunterschiede der „TOP 10“ Gene bedingt durch Natalizumab. (A) Gene mit der stärksten Expressionserhöhung in restimulierten CD4^+ T-Zellen (oben) und der am stärksten reduzierten Expression (unten). (B) Gene mit der stärksten Expressionserhöhung in nicht restimulierten CD4^+ T-Zellen (oben) und der am stärksten reduzierten Expression (unten). TL steht für *transcribed locus*, eine, vom Hersteller nicht näher spezifizierte Gensequenz.

5.1.2 Natalizumab verändert das Expressionsprofil immunologisch relevanter Gene

Um einen umfassenderen Eindruck über Veränderungen des Expressionsprofils durch Natalizumab zu gewinnen, wurden im nächsten Schritt Gene ab einem linear mindestens 2-fach erhöhten bzw. reduzierten Genexpressionsunterschied in die Auswertung mit einbezogen. Bei den T/I-restimulierten CD4⁺ T-Zellen konnten weitere Gene mit einem erhöhten Expressionsprofil immunologischen Prozessen zugeordnet werden (Tabelle 1). *FLT3LG* (*Fms-related tyrosine kinase 3 ligand*) ist ein hämatopoetisches Zytokin, das strukturelle Homologien mit dem *SCF* (*Stem cell factor*) und dem *CSF-1* (*Colony stimulating factor 1*) aufweist. In Synergie mit weiteren Wachstumsfaktoren stimuliert FLT3LG die Proliferation und Differenzierung von verschiedenen hämatopoetischen Progenitorzellen (Guimond, Freud et al. 2010). Der Flt3-Ligand wurde auch im Zusammenhang mit der Homöostase von DCs und NK-Zellen beschrieben. Das Gen *FOXP3*, ein Mitglied der forkhead/winged-Helix-Transkriptionsregulatoren, nimmt eine Schlüsselrolle bei der Entwicklung und der Funktion von regulatorischen T-Zellen ein, wird aber auch in humanen Effektor-T-Zellen nach Aktivierung induziert. Bei den Genen mit reduziertem Expressionsniveau fielen vor allem Gene auf, die in Stoffwechselprozesse involviert sind (Tabelle 2). Die Produkte der *Glycerate Kinase* (*GLYCTK*) und der *Serine Dehydratase* (*SDS*) sind am Glycin-, Serin- und Threonin-Stoffwechselweg beteiligt. Weiterhin konnte *RORC*, ein Transkriptionsfaktor, der eine zentrale Schlüsselrolle bei der Differenzierung von Th17-Zellen einnimmt, identifiziert werden. Da im Falle von *RORC* die Daten der Microarray-Experimente sowohl eine Erhöhung als auch eine Reduktion des Genexpressionsniveaus aufzeigten (siehe Abbildung 8) wurde im weiteren Verlauf dieser Arbeit die *RORC*-Expression mittels qRT-PCR überprüft (Abbildung 10).

Tabelle 1. Auflistung aller Gene mit einer mindestens 2-fach erhöhten Expression

Gen	Protein	Funktion
IL2	Interleukin 2	Zytokin
LRRC43	Leucine rich repeat containing 43, transcript variant 2	Unbekannt
LOC100132784	PREDICTED: similar to hCG1795400	Unbekannt
IL3	Interleukin 3 (colony-stimulating factor, multiple)	Zytokin
ATF3	Activating transcription factor 3, transcript variant 4	Transkriptionsfaktor
VPS18	Vacuolar protein sorting 18 homolog (S. cerevisiae)	Stoffwechsel
NFKBIL1	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor-like	Unbekannt
CCL1	Chemokine (C-C motif) ligand 1	Chemokin
HPX	Hemopexin	Immunantwort
SPDEF	SAM pointed domain containing ets transcription factor	Transkriptionsfaktor
LOC650392	Hypothetical protein LOC650392	Unbekannt
LOC100131941	Hypothetical protein LOC100131941	Unbekannt
TPP1	Tripeptidyl peptidase I	Protease
LMF1	Lipase maturation factor 1	Stoffwechsel
FLT3LG	Fms-related tyrosine kinase 3 ligand	Immunantwort
SFRS12	Splicing factor, arginine/serine-rich 12	Transkription
PQLC2	PQ loop repeat containing 2, transcript variant 3	Unbekannt
WNT9A	Wingless-type MMTV integration site family, member 9A	Signaltransduktion
Transcribed locus	Transcribed locus	Unbekannt
HECW1	HECT, C2 and WW domain containing E3 ubiquitin protein ligase 1	Unbekannt
LOC100129722	PREDICTED: hypothetical protein LOC100129722	Unbekannt
ITGB2	Integrin, beta 2 (complement component 3 receptor 3 and 4 subunit), transcript variant 1	Migration / Signaltransduktion

MED16	Mediator complex subunit 16	Transkription
MIPEP	Mitochondrial intermediate peptidase, nuclear gene encoding mitochondrial protein	Mitochondrial
ERCC6L	Excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 6-like	Transkription
CDC25A	Cell division cycle 25 homolog A (<i>S. pombe</i>), transcript variant 2	Proliferation
Unknown	Unknown	Unbekannt
SOX2	SRY (sex determining region Y)-box 2	Transkriptionsfaktor
FOXP3	Forkhead box P3, transcript variant 2	Transkriptionsfaktor
INSM1	Insulinoma-associated 1	Entwicklung
MED20	Mediator complex subunit 20	Transkription
PTPDC1	Protein tyrosine phosphatase domain containing 1, transcript variant 1	Signaltransduktion
C16orf70	Chromosome 16 open reading frame 70	Unbekannt
C7orf44	Chromosome 7 open reading frame 44	Unbekannt
Unknown	C33.6 unnamed HERV-H protein	Unbekannt
Unknown	CDNA FLJ12366 fis, clone MAMMA1002411	Unbekannt
GNAO1	Guanine nucleotide binding protein, alpha activating activity polypeptide O, transcript variant 2	Unbekannt
DPP9	Dipeptidyl-peptidase 9	Protease
FAM92A1	Family with sequence similarity 92, member A1	Proliferation / Onkogen
ZNF827	Zinc finger protein 827	Unbekannt
RRAD	Ras-related associated with diabetes, transcript variant 2	Unbekannt

Tabelle 1. Gene von stimulierten humanen CD4⁺ T-Zellen, die in Anwesenheit von Natalizumab eine mindestens 2-fach erhöhte Expression zeigen als in stimulierten humanen CD4⁺ T-Zellen, die in Abwesenheit von Natalizumab inkubiert wurden. Die Ergebnisse repräsentieren den Mittelwert aus drei unabhängigen biologischen Replikaten. Gen- und Protein-Bezeichnungen sind PubMed (*Gene*) entnommen worden.

Tabelle 2: Auflistung aller Gene mit einer mindestens 2-fach reduzierten Expression

Gen	Protein	Funktion
MAP2K5	Mitogen-activated protein kinase kinase 5, transcript variant B	Signaltransduktion
Transcribed locus	Transcribed locus	Unbekannt
CLCN7	Chloride channel 7, transcript variant 2	Stoffwechsel
Transcribed locus	Transcribed locus	Unbekannt
GLYCTK	Glycerate kinase	Stoffwechsel
MICAL3	Microtubule associated monooxygenase, calponin and LIM domain containing 3	Migration
Transcribed locus	Transcribed locus	Unbekannt
DRP2	Dystrophin related protein 2	Migration
CDX1	Caudal type homeobox 1	Entwicklung
FUT2	Fucosyltransferase 2 (secretor status included), transcript variant 2	Immunantwort
PIK3R2	Phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit 2 (beta)	Signaltransduktion
LOC402573	Hypothetical LOC402573	Unbekannt
MCOLN3	Mucolipin 3	Stoffwechsel
SNCA	Synuclein, alpha (non A4 component of amyloid precursor)	ZNS
ZBTB10	Zinc finger and BTB domain containing 10	Onkogen
FECH	Ferrochelatase, nuclear gene encoding mitochondrial protein, transcript variant 2	Mitochondrial
LOC91431	Prematurely terminated mRNA decay factor-like	Unbekannt
ZNF219	Zinc finger protein 219, transcript variant 3	Transkription
Unknown	CDNA FLJ20846 fis, clone ADKA01802	Unbekannt
FANCE	Fanconi anemia, complementation group E	Signaltransduktion
EPB41L4B	Erythrocyte membrane protein band 4.1 like 4B , transcript variant 1	Signaltransduktion
FLJ10043	Hypothetical protein FLJ10043	Unbekannt

Unknown	MRNA; cDNA DKFZp761G0924 (from clone DKFZp761G0924)	Unbekannt
SPTBN5	Spectrin, beta, non-erythrocytic 5	ZNS
BTBD14B	BTB (POZ) domain containing 14B	Transkription
CTNNBIP1	Catenin, beta interacting protein 1, transcript variant 2	Signaltransduktion
Unknown	ESTs	Unbekannt
NLE1	Notchless homolog 1 (Drosophila), transcript variant 1	ZNS
FLJ23569	BC040926 (FLJ23569) on chromosome 19.	Unbekannt
Unknown	Homo sapiens, clone IMAGE:3640982	Unbekannt
HES4	Hairy and enhancer of split 4 (Drosophila)	Entwicklung
Transcribed locus	Transcribed locus	Unbekannt
SEMA5B	Sema domain, seven thrombospondin repeats (type 1 and type 1-like), Transmembrane domain (TM) and short cytoplasmic domain, (semaphorin) 5B, transcript variant 1	ZNS
SNTA1	Syntrophin, alpha 1 (dystrophin-associated protein A1, 59kDa, acidic component)	Entwicklung
STXBP2	Syntaxin binding protein 2	Stoffwechsel
C19orf12	Chromosome 19 open reading frame 12 , transcript variant 1	Unbekannt
C6orf134	Chromosome 6 open reading frame 134	Unbekannt
TTC12	Tetratricopeptide repeat domain 12	Stoffwechsel
LOC100130089	Similar to FBXL17 protein	Unbekannt
CYBA	Cytochrome b-245, alpha polypeptide	Mitochondrial
SH2B2	SH2B adaptor protein 2	Immunantwort
MGC5370	Hypothetical protein MGC5370	Signaltransduktion
C11orf84	Chromosome 11 open reading frame 84	Unbekannt
SLC22A14	Solute carrier family 22, member 14	Unbekannt

SDS	Serine dehydratase	Stoffwechsel
TARSL2	Threonyl-tRNA synthetase-like 2	Unbekannt
C15orf55	Chromosome 15 open reading frame 55	Unbekannt
KLF12	Kruppel-like factor 12	Transkription
AQP11	Aquaporin 11	Stoffwechsel
BMP7	Bone morphogenetic protein 7	Signaltransduktion
ANTXR1	Anthrax toxin receptor 1 , transcript variant 3	Onkogen
RORC	RAR-related orphan receptor C, transcript variant 2	Transkriptionsfaktor
FAM63A	Family with sequence similarity 63, member A, transcript variant 2	Unbekannt
Transcribed locus	Transcribed locus	Unbekannt
Transcribed locus	Transcribed locus	Unbekannt
EMX1	Empty spiracles homeobox 1	Entwicklung
EVC	Ellis van Creveld syndrome	EVC-Syndrom
LRRC40	Leucine rich repeat containing 40	Unbekannt
FBXO31	F-box protein 31	Transkription
Transcribed locus	Transcribed locus	Unbekannt
TNS4	Tensin 4	Onkogen
Transcribed locus	Transcribed locus	Unbekannt
Transcribed locus	Transcribed locus	Unbekannt

Tabelle 2: Auflistung aller Gene von stimulierten humanen CD4⁺ T-Zellen, die in Anwesenheit von Natalizumab eine mindestens 2-fach reduzierte Expression zeigen als in stimulierten humanen CD4⁺ T-Zellen, die in Abwesenheit von Natalizumab inkubiert wurden. Die Ergebnisse repräsentieren den Mittelwert aus drei unabhängigen biologischen Replikaten. Gen- und Protein-Bezeichnungen sind PubMed (*Gene*) entnommen worden.

5.1.3 Natalizumab verstärkt die Expression von Zytokinen, Chemokinen und Chemokinrezeptoren

Basierend auf deren Genexpressionsunterschiede wurden Gene und Signalwege der in An- bzw. Abwesenheit von Natalizumab inkubierten Proben mit dem Programm GSEA klassifiziert. Übereinstimmend mit der ursprünglichen Beschreibung als blockierender Antikörper war die Expression bei der überwiegenden Mehrzahl der Gene durch Natalizumab nur gering verändert. Um aber therapeutisch relevante Nebeneffekte zu erkennen, die sich doch auf eine eventuelle Signalgebung durch Natalizumab zurückführen lassen, wurde für die GSEA-Analyse das Ausschlusskriterium auf einen mindestens 0,5-fachen Genexpressionsunterschied bei allen drei Spendern abgesenkt. Die durchgeführte *Pathway Annotation* lieferte insgesamt zehn signifikant angereicherte Signalwege (Tabelle 3)

Dem Gensatz HSA04060_CYTOKINE_CYTOKINE_RECEPTOR_INTERACTION wurde besondere Aufmerksamkeit geschenkt (Tabelle 4), da dieser vor allem immunologisch relevante Gene zusammenfasst. Er beinhaltet insgesamt 257 Gene, denen bei der Analyse der restimulierten CD4⁺ T-Zellen durch GSEA immerhin 24, also knapp 10%, stärker exprimierte Gene zugeordnet werden konnten. Als signifikant angereichert wurden folgende Zytokingene eingestuft: *IL2*, *IL3*, *IL4*, *IL9*, *IL17A*, *IL22*, *LTA* (*Lymphotoxin-alpha*), *LTB* (*Lymphotoxin-beta*) und *OSM* (*Oncostatin M*). *IL4* spielt eine zentrale Rolle bei der Differenzierung von naiven T-Helferzellen (Th0) zu Th2-Zellen. *IL9* ist das Leitzytokin der Th9-Effektorzellen. *Oncostatin M* wird von aktivierten Leukozyten als direkte Antwort auf *IL2* und *IL3* erzeugt und stimuliert das Wachstum von Endothelzellen, sowie deren Produktion von Plasminogen-Aktivator, G-CSF, GM-CSF, P-Selectin und *IL6*. Weiterhin wurden verschiedene Chemokine als angereichert klassifiziert. *CCL1* (*Chemokine (C-C motif) ligand 1*), ist ein Glycoprotein das von aktivierten T-Zellen sezerniert wird und durch Interaktion mit *CCR8* (*CC chemokine receptor 8*) Monozyten, NK-Zellen, unreife B-Zellen und DCs in entzündliche Bereiche dirigiert (Miller and Krangel 1992). *CCL4* (*Chemokine (C-C motif) ligand 4*) ist beteiligt an der Chemotaxis von Makrophagen und NK-Zellen (Bystry, Aluvihare et al. 2001), *CCL28* (*Chemokine (C-C motif) ligand 28*) fördert das mukosale *Homing* von T- und B-Lymphozyten und die Migration von Eosinophilen (Kunkel, Kim et al. 2003; Rodriguez,

Paquet et al. 2004; John, Thomas et al. 2005). CXCL5 (*C-X-C motif chemokine 5*) wird nach Sezernierung von proinflammatorischen Zytokinen wie IL1 und TNF α produziert. XCL2 (*Chemokine (C motif) ligand 2*) (Yoshida, Imai et al. 1998) und CXCR3 (*Chemokine receptor CXCR3*) werden hauptsächlich auf aktivierten T-Lymphozyten und NK-Zellen exprimiert (Qin, Rottman et al. 1998). Weiterhin erhöht die Bindung von CXCL-Liganden an CXCR3 die intrazelluläre Ca²⁺-Menge, aktiviert die Phosphoinositid-3-Kinase, den MAPK-Signalweg (Smit, Verdijk et al. 2003) und reguliert die Migration durch Aktivierung von Integrinen und Komponenten des Zytoskeletts (Wang, Fu et al. 2010). Weiterhin konnten pro-proliferative Gene wie *TNFSF14 (Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 14)* (Mauri, Ebner et al. 1998) und *FLT1 (Fms-related tyrosine kinase 1)* (Cunningham, Arrate et al. 1997) als angereichert klassifiziert werden. Hervorzuheben ist, dass, da humane Th17-Effektorzellen anhand ihres Zytokinprofils bestehend aus IL17A, IL17F, IL21 und IL22 charakterisiert werden, zwei der vier wichtigsten Th17-Effektorzellen-assoziierten Interleukine, IL17A und IL22, einen signifikanten Expressionsanstieg bedingt durch Natalizumab zeigen.

Tabelle 3. Pathway Annotation (x-fache Veränderung [log 0.5])

+T/I + Nat vs. +T/I - Nat (erhöhte Genexpression)

Genesatz Name	# Gene im Gesatz (K)	# Gene in Überlappung (k)	k/K	p Wert
LEE_TCELLS3_UP	106	16	0.159	7,76E-06
MOREAUX_TACI_HI_VS_LOW_UP	422	37	0.0877	1,52E-05
GOLDRATH_CELLCYCLE	34	8	0.2353	6,11E-05
HSA04060_CYTOKINE_CYTOKINE_RECEPTOR_INTERACTION	257	24	0,0934	1,61E-04
NUCLEAR_RECEPTORS	40	8	0,2	2,00E-04
STEMPATHWAY	15	5	0,3333	2,68E-04
IDX_TSA_UP_CLUSTER3	90	12	0,1333	3,10E-04
CDC25PATHWAY	9	4	0,4444	3,29E-04
DOX_RESIST_GASTRIC_UP	44	8	0,1818	3,88E-04
GAMMA-UV_FIBRO_UP	35	7	0,2	4,92E-04

Tabelle 3. Pathway Annotation mit GSEA. Für die Annotation wurden Gene in die Software eingespeist, die in den Natalizumab-behandelten CD4⁺ T-Zellen im Vergleich zu den Natalizumab-unbehandelten Zellen stärker exprimiert wurden. Die Ergebnisse repräsentieren den Mittelwert aus 3 unabhängigen biologischen Replikaten (Die GSEA-Analyse wurde durchgeführt von Fr. Dr. Ellen Leich).

Tabelle 4. HSA04060_CYTOKINE_CYTOKINE_RECEPTOR_INTERACTION

IL3	Interleukin 3 (colony-stimulating factor, multiple)
IL2	Interleukin 2
IL4	Interleukin 4
IL9	Interleukin 9
CSF1	Colony stimulating factor 1 (macrophage)
LTB	Lymphotoxin beta (TNF superfamily, member 3)
LTA	Lymphotoxin alpha (TNF superfamily, member 1)
CXCL5	Chemokine (C-X-C motif) ligand 5
CCL4	Chemokine (C-C motif) ligand 4
CCL1	Chemokine (C-C motif) ligand 1
CXCR3	Chemokine (C-X-C motif) receptor 3
IL17A	Interleukin 17A
ACVR1B	Activin A receptor, type IB
FLT1	Fms-related tyrosine kinase 1
TNFRSF13C	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 13C
BMPR2	Bone morphogenetic protein receptor, type II
IL22	Interleukin 22
OSM	Oncostatin M
IL21	Interleukin 21
XCL1	Chemokine (C motif) ligand 1
FLT3LG	Fms-related tyrosine kinase 3 ligand
CCL28	Chemokine (C-C motif) ligand 28
XCL2	Chemokine (C motif) ligand 2
TNFSF14	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 14

Tabelle 4. Gene, die in Natalizumab-behandelten Zellen 0,5-fach höher exprimiert wurden als in Natalizumab-unbehandelten Zellen und die im Zuge der GSEA *Pathway Annotation* zu einer Anreicherung des Pathways HA04060_CYTOKINE_CYTOKINE_RECEPTOR_INTERACTION führten.

5.1.4. Natalizumab verstärkt proinflammatorische Signalwege

Wenn Natalizumab die Expression von Zytokinen und Chemokinen bzw. deren Rezeptoren durch eine Signalgebung über CD49d beeinflusst, könnten auch einige der T-Zellsubtypen-spezifischen Transkriptionsfaktoren in ihrer Expressionsstärke beeinflusst sein. Deshalb wurden die Expressionsprofile der wichtigsten Transkriptionsfaktoren und Zytokine mittels *Heatmap* graphisch dargestellt (Abbildung 8). Restimulation von CD4⁺ T-Zellen hat naturgemäß einen starken Einfluss auf die Genexpression. Um die normale Reaktionsfähigkeit der Zellen zu dokumentieren, wurden stimulierte und unstimulierte CD4⁺ T-Zellen über einen Bereich von 0,05 bis 19,6 der relativen Expression dargestellt. Wie in der *Heatmap* (links) ersichtlich ist, erzielte die Restimulation mit T/I deutliche Expressionsunterschiede. Die Gene *IL2*, *IL17F* und *IL22* zeigen darüber hinaus

einen weiteren deutlichen Expressionsanstieg durch die Anwesenheit von Natalizumab. In den unstimulierten Zellen weisen die Gene *IL5*, *IL6* und *IL23A* einen Rückgang der Expression bei Anwesenheit von Natalizumab auf. Zur besseren Veranschaulichung der Genexpressionsunterschiede in den T/I-restimulierten CD4⁺ T-Zellen wurde ein engerer Bereich (0,7 bis 1,4) für die Darstellung der relativen Expression verwendet (rechts). Einige entscheidende Transkriptionsfaktoren verschiedener T-Zellsubpopulationen, nämlich *TBX21* (Th1), *RORC* (Th17), *FOXP3* (Tregs, aber auch aktivierte Effektorzellen) reagierten auf Anwesenheit von Natalizumab mit einer erhöhten Genexpression. Im Gegensatz dazu tritt bei *GATA3*, einem Transkriptionsfaktor, der für die Th2-Zytokinsekretion von Bedeutung ist, ein reduziertes Expressionsniveau auf. Oberflächenmoleküle, die mit Aktivierung assoziiert sind, wie *IL2RA* (CD25) und *CD69*, zeigen ein erhöhtes, während *CD44* (Effektor-Gedächtnis-T-Zellen) und *SELL* (CD62L, naive T-Zellen und zentrale Gedächtnis-T-Zellen) (Fiuza, Fujiwara et al. 2009) ein nahezu unverändertes Expressionsniveau aufzeigten. Der deutlichste Einfluss von Natalizumab trat bei der Zytokingenexpression auf: *IL2*, *IL4*, *IL5*, *IL6*, *IL9*, *IL13*, *IL17A*, *IL17F*, *IL21*, *IL22* und *IFNG* präsentierten ein erhöhtes und *IL10*, als einzige Ausnahme, ein verringertes Expressionsniveau. Die Genexpression von *IL23A* blieb nahezu unverändert. Zusammenfassend betrachtet erhöhte Natalizumab die Genexpression von sowohl proinflammatorischen Zytokinen als auch von Transkriptionsfaktoren, die für Differenzierungsprozesse von Th0-Zellen hin zu Th1- und Th17-Effektor-T- und evt. zu Treg-Zellen benötigt werden. Die gesteigerte Genexpression von *IL2RA* und *CD69* deutete auf einen erhöhten Aktivierungsstatus der CD4⁺ T-Zellen hin. Der gleichzeitige Anstieg der Genexpression aller Th17-Effektorzytokine *IL17A*, *IL17F*, *IL21* und *IL22* deutet erneut auf aktivierende Eigenschaften von Natalizumab hinsichtlich Th17-Effektorzellen hin.

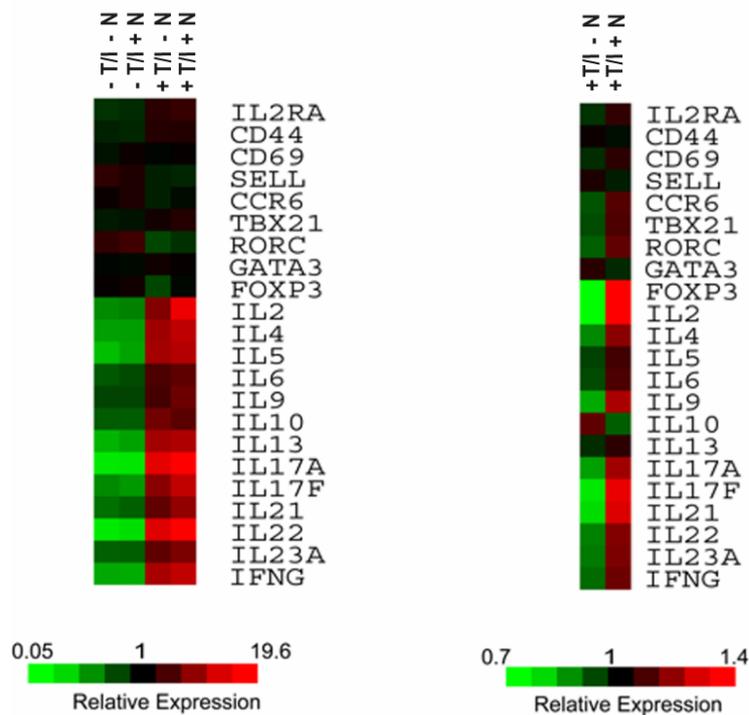


Abbildung 8. Gesteigerte Genexpression von proinflammatorischen-Genen durch Natalizumab.

Graphische Darstellung der Genexpression mittels *Heatmap*. Die Ergebnisse repräsentieren den Mittelwert aus 3 unabhängigen biologischen Replikaten. Links: Vergleich zwischen stimulierten vs. unstimulierte CD4⁺ T-Zellen in An- und Abwesenheit von Natalizumab. Der Bereich der relativen Expression wurde von 0,05 bis 19,6 gewählt. Rechts: Vergleich zwischen stimulierten CD4⁺ T-Zellen in An- und Abwesenheit von Natalizumab. Dargestellt wird ein Bereich für die relative Expression von 0,7 bis 1,4 (rechts). (Die *Heatmap* wurde in Zusammenarbeit mit Fr. Dr. Dr. Elena Hartmann erstellt)

5.1.5. Validierung mittels qRT-PCR bestätigt einen Anstieg der IL2-mRNA-Menge

Die IL2-Expressionsunterschiede aus den Microarray-Experimenten wurden auf mRNA-Ebene mittels qRT-PCR in drei biologischen Replikaten validiert. Schon die unstimulierten CD4⁺ T-Zellen reagierten auf die Gabe von Natalizumab mit einem marginalen Anstieg der IL2-mRNA-Menge. Bei Restimulation, also Interleukinexpression-favorisierenden Bedingungen, verursachte die Anwesenheit von Natalizumab einen deutlich steigernden Effekt auf die IL2-Genexpression. Die IL2-mRNA-Menge wurde durch Natalizumab nochmals um fast das 2-fache erhöht (Abbildung 9).

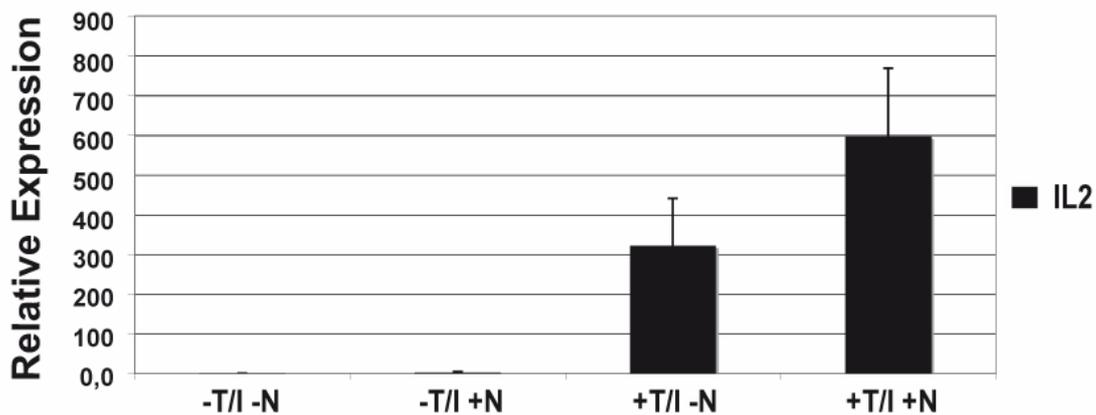


Abbildung 9. qRT-PCR Validierung der IL2-mRNA-Menge.

Überprüfung des IL2-Expressionsunterschieds durch Natalizumab anhand von drei unterschiedlichen biologischen Replikaten. Mittels qRT-PCR wurde die relative IL2-Expression in stimulierten und unstimulierten CD4⁺ T-Zellen in An- und Abwesenheit von Natalizumab bestimmt.

5.1.6. Validierung verschiedener Transkriptionsfaktoren mittels qRT-PCR

Die in den Microarray-Experimenten ermittelten Expressionsunterschiede der Transkriptionsfaktoren *TBX21* (Th1), *RORC* (Th17), *FOXP3* (Tregs, aktivierte Effektorzellen) wurden auf mRNA-Ebene mittels qRT-PCR in drei biologischen Replikaten validiert. Die Zugabe von Natalizumab erhöhte die Genexpression von *RORC* bei unstimulierten Zellen um das 0,25-fache, bei T/I-stimulierten CD4⁺ T-Zellen um das 0,5-fache (Abbildung 10). Dieses Ergebnis ist kongruent zu den Daten aus den Microarray-Experimenten. Im Gegensatz zu den bisherigen Daten zeigte die Stimulation mit T/I einen deutlichen Anstieg der *RORC*-Expression. Die Transkriptionsfaktoren *TBX21* und *FOXP3* wurden durch die Gabe von Natalizumab in unstimulierten Zellen nicht beeinflusst, durch T/I-Stimulation erhöhte sich die Genexpression von *TBX21* durch Natalizumab um den Faktor 0,15, von *FOXP3* um den Faktor 0,4. Der Anstieg der beiden Transkriptionsfaktoren spiegelte die bisherige Tendenz aus den Microarray-Daten wieder.

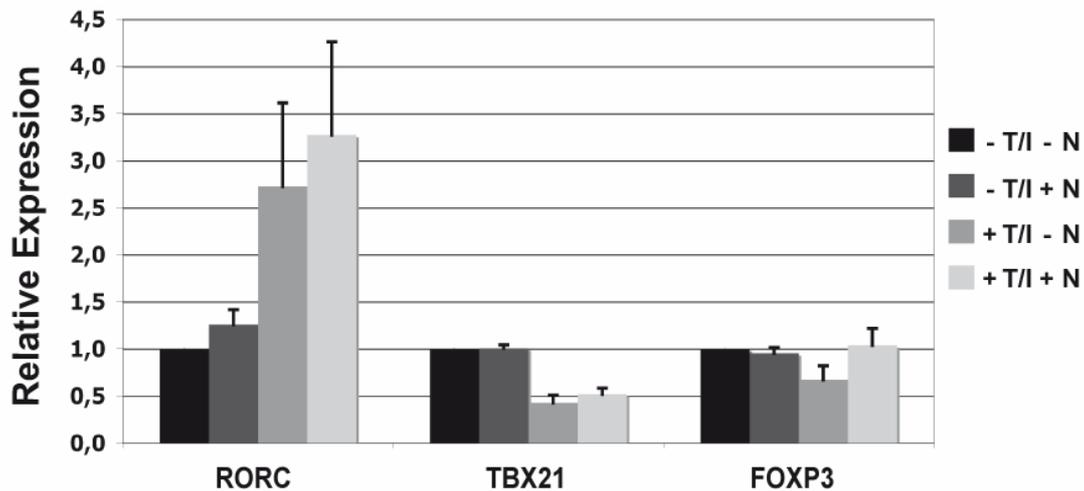


Abbildung 10. qRT-PCR Validierung der mRNA-Expression von Transkriptionsfaktoren.

Überprüfung der Expressionsunterschiede der Transkriptionsfaktoren *RORC*, *TBX21* und *FOXP3* bedingt durch Natalizumab anhand von drei unterschiedlichen biologischen Replikaten. Mittels qRT-PCR wurde die relative Expression in stimulierten und unstimulierten CD4⁺ T-Zellen in An- und Abwesenheit von Natalizumab bestimmt.

5.2 Erhöhte Interleukinproduktion durch Natalizumab auf Proteinebene

5.2.1 Die IL2-Produktion durch Natalizumab ist abhängig von der Stimulationsstärke

Im nächsten Schritt wurden die direkten Auswirkungen von Natalizumab auf die Proteinmenge an IL2 in humanen CD4⁺ T-Helferzellen untersucht. Die Stimulation der frisch isolierten CD4⁺ T-Zellen erfolgte mit α -CD3/28-*Beads*, in Gegenwart von rhIL2 und in An- bzw. Abwesenheit von Natalizumab für drei Tage. Nach dem Beenden der Stimulation wurden die Zellen für weitere 7 Tage im Vorhandensein von rhIL2 und, wo vorgesehen, in Anwesenheit von Natalizumab ruhen gelassen. Nach der Restimulation mit T/I für 8 Stunden zeigte die Analyse der Zellen statt einer Erhöhung eine Reduktion der IL2-Produktion um circa den Faktor 0,2 auf ca. 80% (Abbildung 11). Um zu klären, inwieweit die Art der Stimulation und die Stimulationsdauer einen Einfluss auf die IL2-Produktion besitzen, wurden sowohl erneut isolierte CD4⁺ T-Zellen in Monokultur als auch PBMCs für 10 Tage nach dem vorangegangenen Protokoll kultiviert. Letzteres ähnelte den Bedingungen, die für die Microarrays gewählt worden waren, insofern, als damals die CD4⁺ T-Zellen mit Feederzellen, jetzt gemeinsam mit allen CD4⁺ Zellen der humanen PBMCs kultiviert

wurden. Durch die anfängliche Stimulation mit α -CD3/28 sollten die aktivierten CD4⁺ Zellen im Laufe der Zeit die CD4⁻ Fraktion überwachsen und am Ende der Inkubationsdauer in der Zellkultur dominieren. Als Restimulation wurden α -CD3/28-*Beads* verwendet. Für eine Variation der Restimulationsdauer wurden die Zeitpunkte 3 Stunden bzw. 6 Stunden angesetzt. Die anschließende Analyse der Zellen zeigte in der CD4⁺ Monokultur nach 3 Stunden eine Reduktion der IL2⁺ Zellen um circa das 0,10-fache bzw. nach 6 Stunden um circa 0,15-fache. Im Gegensatz dazu stieg die Zahl der CD4⁺IL2⁺ Zellen in der PBMC-Kultur nach 3 Stunden zuerst auf das 0,1-fache an, um darauf folgend nach einer Stimulationsdauer von 6 Stunden um circa den Faktor 0,1 abzusinken. Dieses Ergebnis zeigte, dass eine optimal aktivierte CD4⁺ T-Zell-Monokultur, auf einen längeren Zeitraum betrachtet, keine durch Natalizumab bedingte Erhöhung der IL2-Produktion ausbildet. Dies war unabhängig davon, ob pharmakologisch oder mittels Antikörper restimuliert wurde. Humane T-Zellen, die mit allen übrigen Leukozyten, aber sonst unter vergleichbaren Bedingungen kokultiviert wurden, erhielten durch Natalizumab zumindest kurzfristig ein additives Signal für die IL2-Produktion.

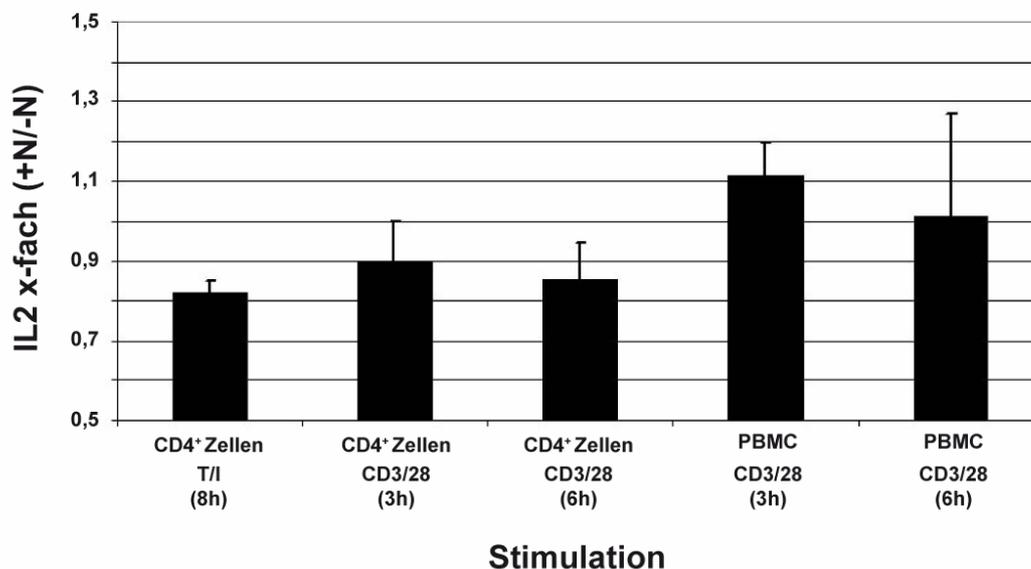


Abbildung 11. Die IL2-Produktion unter Natalizumab-Einfluss ist abhängig von der Stimulationsstärke.

Bestimmung des Einflusses von Natalizumab auf die IL2-Produktion von CD4⁺ T-Zellen in Monokultur und einer PBMC-Population in einem Langzeitversuch von 10 Tagen. Die Zellkulturen verschiedener Spender (n=2) wurden mit verschiedenen Stimulanzen (T/I vs. α -CD3/28) reaktiviert und hierdurch die Stimulationsstärke und Stimulationsdauer variiert.

5.2.2 Der Einfluss von Natalizumab auf die IL2-Produktion ist zeitlich begrenzt

Inwieweit die IL2-Produktion von der Inkubationsdauer mit Natalizumab abhängig ist, sollte durch Auswahl eines kurzen Versuchszeitraumes näher beleuchtet werden. Jetzt wurden Zellen nur nach Primärstimulation analysiert. Die Möglichkeit der Zell-Zell-Interaktionen wurde durch Verwendung von frisch isolierten PBMCs gewährleistet. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in einen Zeitraum von 72 Stunden ohne Stimulation in An- bzw. Abwesenheit von Natalizumab. Nach 16 Stunden, 40 Stunden und 64 Stunden wurden die Zellen für die jeweils letzten 8 Stunden zusätzlich mit T/I aktiviert. Zur Detektion der CD4⁺ T-Zellen wurde α -human CD4-FITC für die FACS-Messung verwendet. Die FACS-Analyse der PBMCs zeigte nach 24 Stunden einen Anstieg der CD4⁺IL2⁺ doppelpositiven-Zellen auf das 1,10-fache. Im weiteren Verlauf des Experiments kam es zu einer kontinuierlichen Verringerung der IL2-Produktion (Abbildung 12). Nach 48 Stunden konnte ein Rückgang auf das 1,05-fache und nach 72 Stunden eine weitere Reduktion der CD4⁺IL2⁺ Zellen auf das 0,9-fache beobachtet werden. Grundsätzlich sollte die Vorinkubation der Zellen ohne TCR-Stimulation nicht von Nachteil gewesen sein, da die in Abwesenheit von Natalizumab kultivierten Zellen im Laufe der 72 Stunden nur eine vernachlässigbar geringere IL2-Produktion aufwiesen. Innerhalb eines kurzen Zeitraums von 24 - 48 Stunden konnte eine erhöhte IL2-Produktion durch Natalizumab in humanen T/I-stimulierten CD4⁺ T-Zellen nachgewiesen werden. Dieser Effekt schwächt sich mit anhaltender Natalizumab-Inkubationsdauer zunehmend ab und kehrt sich nach 72 Stunden ins Negative um. Dies zeigt, dass Natalizumab einen kurzfristigen (24 - 48 Stunden) positiven Einfluss auf die IL2-Produktion humaner T-Zellen besitzt, der sich kontinuierlich abschwächt bzw. nach 72 Stunden ins Negative umkehrt.

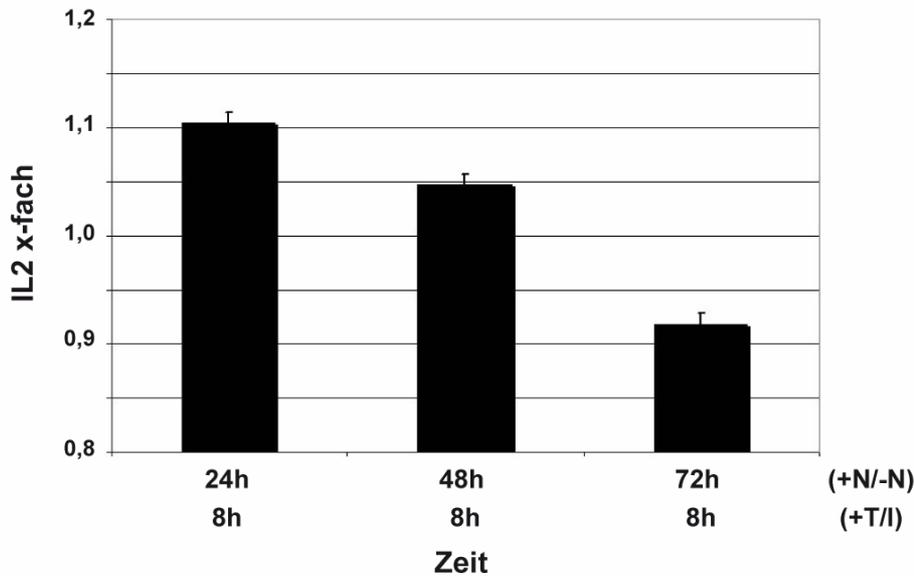


Abbildung 12. Die IL2-Sekretion von CD4⁺ T-Zellen wird durch Natalizumab in einem Zeitraum von 24 - 48 Stunden erhöht.

Bestimmung des Einflusses von Natalizumab auf die IL2-Produktion von humanen CD4⁺ T-Zellen einer PBMC-Kultur in einem Versuchszeitraum von 24 - 72 Stunden. Die Leukozyten verschiedener Spender (n=2) wurden mittels T/I nach 16 Stunden, 40 Stunden und 64 Stunden für jeweils 8 Stunden stimuliert. Die Detektion der CD4⁺ T-Zellen innerhalb der Leukozyten-Population erfolgte mittels α -human CD4-FITC. Die Werte wurden auf die stimulierten Proben in Abwesenheit von Natalizumab normalisiert.

5.2.3 Die IL2-Erhöhung unter Natalizumab-Einfluss ist limitiert

In einem Zeitraum von 24 Stunden Primärstimulation zeigten die analysierten PBMC-Kulturen bei Anwesenheit von Natalizumab den deutlichsten IL2-Anstieg. Inwieweit der Effekt einer erhöhten IL2-Produktion nach Primärstimulation abhängig von verschiedenen Stimulationsstärken ist, sollte im nächsten Schritt geklärt werden. Hierfür wurden PBMCs mit 1 μ g und 2 μ g SEB (Staphylokokken-Enterotoxin B) bzw. mit α -CD3/28-Beads für einen Zeitraum von 24 Stunden aktiviert und der Einfluss von Natalizumab auf die Erhöhung von CD4⁺IL2⁺ T-Zellen untersucht. SEB gehört zu den Superantigenen, deren Wirkweise auf einer Vernetzung der MHC-Klasse-II-Komplexe auf den APCs mit den V β -Elementen des T-Zellrezeptors beruht. Durch Ausbildung eines MHC-II-SEB-TCR-Trimers erfolgt die Antigen-unabhängige Aktivierung der T-Zellen und führt zur Proliferation und Zytokinfreisetzung. Zur durchflusszytometrischen-Detektion der CD4⁺ T-Zellen innerhalb der PBMC-Population wurden die Zellen mit α -human CD4-FITC markiert. Die Stimulation der Zellen zur IL2-Expression mittels SEB war im Gegensatz zu der mit α -CD3/28-Beads

wesentlich schwächer (Abbildung 13). Unter Stimulation mit 1 μg oder 2 μg SEB ergab die Anwesenheit von Natalizumab eine ca. 1,2-fache Zunahme der $\text{CD4}^+\text{IL2}^+$ doppelpositiven Zellen, während durch Stimulation mit $\alpha\text{-CD3/28-Beads}$ die IL2-Produktion humaner CD4^+ T-Helferzellen kaum - nur um den Faktor 1,12 - erhöht wurde. Der Effekt von Natalizumab, die IL2-Produktion der CD4^+ T-Zellen zu verstärken, ist somit limitiert und nicht beliebig steigerbar bzw. wird durch einen stärkeren TCR-Stimulus eher abgeschwächt. So haben die Art der Stimulation sowie die Stimmulationsstärke einen Einfluss auf die durch Natalizumab-induzierte Erhöhung an IL2.

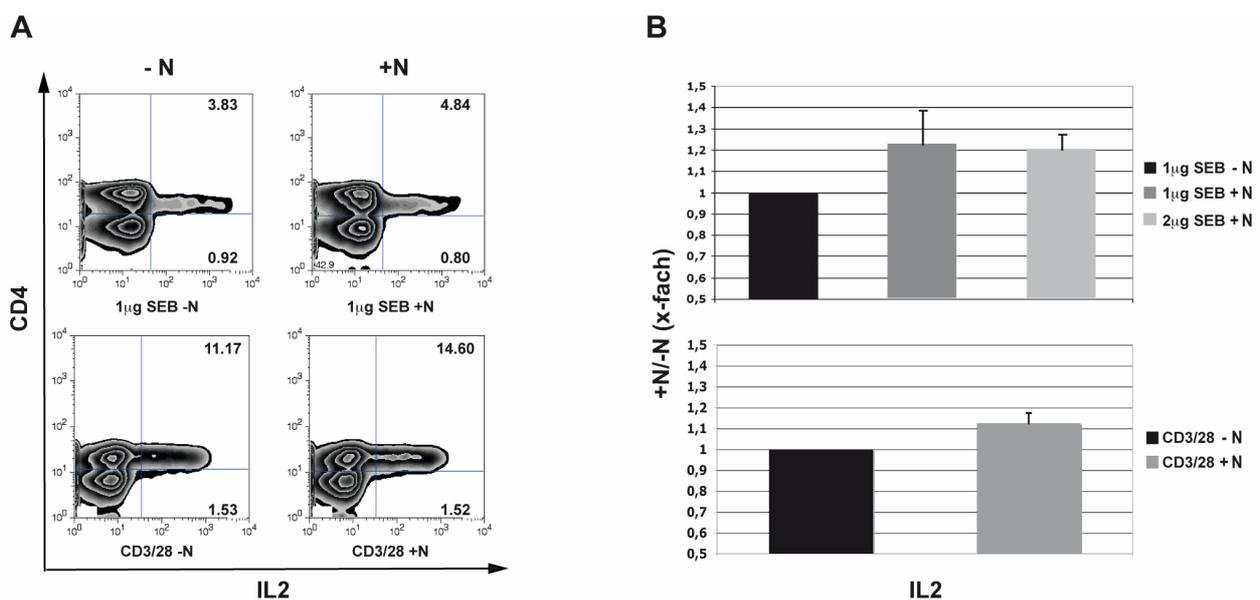


Abbildung 13. Eine Erhöhung der Stimmulationsstärke reduziert die IL2-Produktion unter Natalizumab-Einfluss.

Darstellung der IL2-Produktion humaner CD4^+ T-Zellen einer PBMC-Kultur unter Gabe von Natalizumab in Abhängigkeit von verschiedenen Stimmulationsarten. (A) Dot-Plot, bei dem CD4^+ gegen IL2^+ Zellen aufgetragen wurden. Analysiert wurden humane PBMCs, die mit 1 μg SEB in Abwesenheit von Natalizumab 24 Stunden stimuliert wurden. (B) Erhöhung der IL2-Produktion durch Natalizumab in Abhängigkeit von verschiedenen Stimmulationsstärken. Die Normalisierung der Daten erfolgte unter Verwendung der Proben, die ohne Stimulation und in Abwesenheit von Natalizumab kultiviert wurden. Gezeigt sind die Werte von verschiedenen Spendern (SEB (1 μg) n=5, SEB (2 μg) n=6, $\alpha\text{-CD3/28}$ n=3).

5.2.4 IL2-Erhöhung ist ein direkter Effekt von Natalizumab

Die Antikörper-vermittelte Aktivierung verschiedener $\alpha 4$ -Integrin-Epitope beeinflusst das Zytokinprofil von humanen T-Zellen sowohl in *in vivo* als auch *in vitro* (Mittelbrunn, Molina et al. 2004). Aus diesem Grund wurde vergleichend der aktivierende Einfluss des $\alpha 4$ -Integrin-Epitopes B1 auf die IL2-Freisetzung untersucht.

Die Epitop B1 Aktivierung erfolgte mittels monoklonalem α -human α 4-Integrin (Klon: HP2/1). Um außerdem auszuschließen, dass die Erhöhung der IL2-Menge durch Bindung von IgG4-Immunglobulinen bedingt sein könnte, wurde neben Natalizumab eine entsprechende IgG4-Isotypkontrolle verwendet. Die Stimulation der PBMC-Kultur mit 1 μ g SEB und die Inkubation mit den verschiedenen Antikörpern betragen 24 Stunden. Die IL2-Synthese der unstimulierten Zellen zeigte nach 24 Stunden einen Faktor von 0,10 an CD4⁺IL2⁺ doppelpositiven-Zellen (Abbildung 14), die Stimulation mit SEB in Gegenwart von Natalizumab erhöhte die Zahl der IL2-positiven Zellen auf den Faktor 1,25, während bei der IgG4-Isotypkontrolle sogar eine Reduktion der IL2-positiven Zellen auf 0,75 beobachtet wurde. Überraschenderweise aber wurde bei dem Epitop B1-aktivierenden Antikörper HP 2.1 auch eine Reduktion um 50% detektiert. Die Erhöhung der IL2-Expression durch Natalizumab ist somit kein Effekt von IgG4-Immunglobulinen, sondern wahrscheinlich eine direkte Auswirkung der Bindung an CD49d. Diese unterscheidet sich in der Qualität von aktivierenden Antikörpern, die gegen das B1-Epitop gerichtet sind.

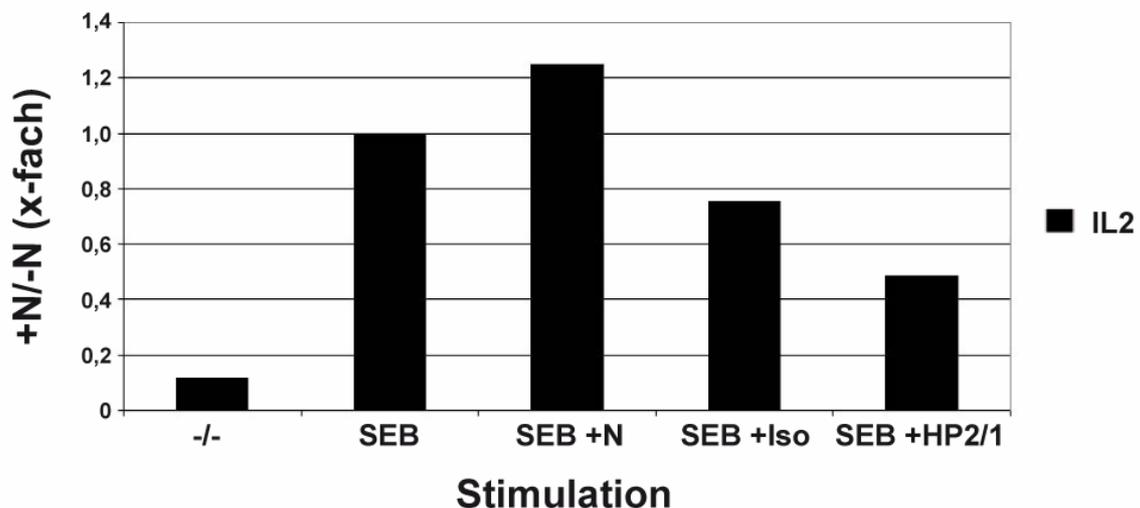


Abbildung 14. Die erhöhte IL2-Produktion humaner CD4⁺ T-Zellen ist ein direkter Effekt der Bindung an α 4-Integrine.

Durchflusszytometrische IL2-Analyse einer PBMC-Population. Die Stimulation der Zellen mit 1 μ g SEB bzw. die Inkubation mit Natalizumab, einer IgG4-Isotypkontrolle und eines Epitop B1-aktivierenden Antikörpers (HP 2/1) erfolgte 24 Stunden. Für die Detektion der CD4⁺ T-Zellen innerhalb der Leukozyten-Population wurde α -human CD4-FITC verwendet. Die Werte der IL2-Freisetzung wurden auf die SEB-stimulierte Probe normalisiert.

5.2.5 Natalizumab erhöht kurzfristig die IL2-, IL17-, und IFN γ -Produktion humaner CD4⁺ T-Zellen

Die ursprünglichen Microarray-Analysen hatten ergeben, dass Natalizumab neben IL2 auch die Produktion proinflammatorischer Interleukine wie IL17A und IFN γ verstärkt. Um das zu überprüfen wurden frisch isolierte CD4⁺ T-Zellen über einen Zeitraum von 24 Stunden mit Natalizumab inkubiert, während die Stimulation der Zellen nur in den letzten 8 Stunden erfolgte. Abbildung 15 A stellt dar, dass bei allen drei Interleukinen eine Erhöhung der Expression durch Natalizumab hervorgerufen wird. In den vorherigen Experimenten war aufgefallen, dass Natalizumab keinen synergistischen, sondern eher einen additiven Effekt zur TCR-/Kostimulation ausübt. Möglicherweise schaltet Natalizumab über CD49d Teile desselben Signalweges an. Um zu untersuchen, ob Natalizumab Aspekte der TPA-, also PKC-Aktivierung ersetzen kann, wurde nicht nur T/I, sondern auch Ionomycin alleine verwendet. Tatsächlich kann Natalizumab auch die Interleukinmengen von IL2, IFN γ und IL17A verstärken, wenn CD4⁺ T-Zellen allein über ein Ca²⁺-Signal induziert wird (Abbildung 15 B). Bei T/I-Stimulation zeigten CD4⁺ T-Zellen eine Erhöhung der IL2⁺ Zellen bzw. der IL17⁺-Zellen auf das 1,3-fache und der IFN γ ⁺ Zellen auf das 1,2-fache. Die Stimulation mit Ionomycin erhöhte ebenfalls die Menge aller drei Interleukine, IL2 um das 1,35-fache, IL17 und IFN γ , jeweils um das 1,2-fache. Beide Stimulationsvarianten – auch wenn Ionomycin alleine grundsätzlich nur eine schwache Aktivierung ausübt - zeigen eine nahezu identische relative Zunahme der Interleukinproduktion durch Natalizumab (Tabelle 5). Bei Ionomycinbehandlung, also selektiver Induktion des Ca²⁺-Weges und gleichzeitig sehr schwacher Stimulation, wurde auch noch nach 48 Stunden ein positiver Natalizumab-Effekt detektiert.

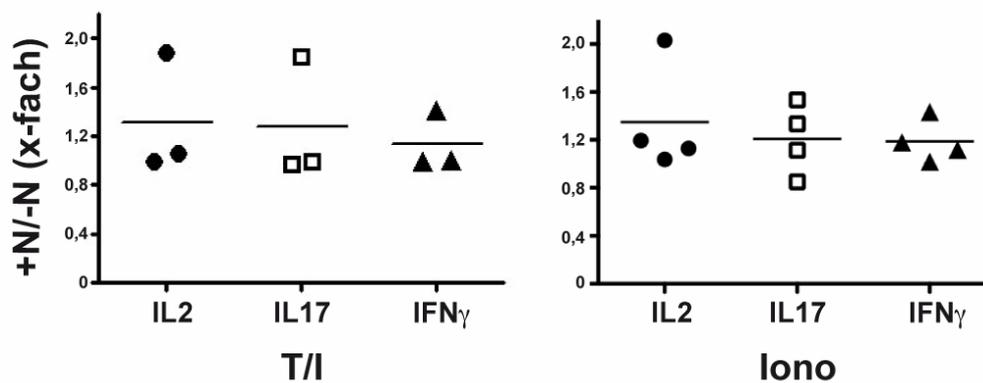


Abbildung 15. Erhöhte IL2-, IL17- und IFN γ -Produktion durch Natalizumab bei Stimulation mit T/I und Ionomycin.

Durchflusszytometrische Bestimmung der Interleukine IL2, IL17 und IFN γ isolierter humaner CD4⁺ T-Zellen. Die Zellen wurden für eine Zeitspanne für 24 Stunden in An- und Abwesenheit von Natalizumab inkubiert. Die Stimulation erfolgte entweder mit T/I (Spender n=3) oder mit Ionomycin (Spender n=4) für 8 Stunden. Die Werte wurden auf die jeweils stimulierten in Abwesenheit von Natalizumab inkubierten Proben normalisiert, die Querbalken stellen die Mittelwerte der jeweiligen Spender dar.

Zytokin	(24h) T/I +N	(24h) I +N	(48h) T/I +N	(48h) I +N
IL2	1,31	1,35	0,92	1,13
IL17	1,27	1,20	0,86	1,02
IFN γ	1,13	1,18	0,95	1,21

Tabelle 5. Identische relative Zunahme der Interleukinproduktion in An- und Abwesenheit von TPA.

Tabellarische Übersicht der Zunahme der IL2-, IL17- und IFN γ -Produktion humaner CD4⁺ T-Zellen bei Stimulation mit T/I (Spender n=3) und nur Ionomycin (Spender n=4) in einem Zeitraum von 24 - 48 Stunden. Die Werte wurden auf die jeweils stimulierten, in Abwesenheit von Natalizumab inkubierten Proben normalisiert.

5.3 Die Bindung von Natalizumab reduziert die CD49d-Oberflächenexpression auf humanen Leukozyten

5.3.1 Natalizumab verringert die CD4⁺CD49d^{high}-Population *in vitro*

Während der Analysen zu dieser Arbeit war aufgefallen, dass sich bei Behandlung der Zellen mit Natalizumab die CD49d-Oberflächenexpression reduziert. Übereinstimmend wurde die Kapazität von Natalizumab zur Reduktion der CD49d-Expression verschiedener Leukozyten-Subpopulationen *in vivo* beschrieben (Bonig, Wundes et al. 2008; Millionig, Hegen et al 2010). Um zu verstehen, ob dies einen direkten Effekt der Bindung von Natalizumab an CD49d humaner peripherer Blutleukozyten darstellt, wurden genauere *in vitro*-Untersuchungen durchgeführt. Als erstes musste aber überprüft werden, inwiefern Natalizumab die Bindung des CD49d-Detektionsantikörpers beeinflussen und die durchflusszytometrische Detektion verfälschen könnte. Wie das Histogramm (Abbildung 16 A) zeigt, wird die CD49d-Messung durch Natalizumab nicht beeinflusst; die beobachtete Oberflächenreduktion stellt daher ein biologisches Phänomen dar.

Um eine Korrelation zwischen der CD49d- und der IL2-Expression herstellen zu können, wurde die PBMC-Kultur analog dem Experiment, das unter Punkt 5.2.3 beschrieben wurde, mit 1 µg SEB für 24 Stunden aktiviert. Die Stimulation mit SEB zeigte keine Auswirkung auf die VLA-4-Menge, aber solche CD4⁺ T-Zellen, die CD49d am stärksten auf der Oberfläche exprimieren (CD49d^{high}), fanden sich nach Bindung von Natalizumab in einer niedriger exprimierenden Population wieder (Abbildung 16 C). Mittels IgG4-Isotypkontrolle wurde ausgeschlossen, dass IgG4-Immunglobuline über eine mögliche Bindung ihres Fc-Teils die CD49d-Expression regulieren. Durch Verwendung des α -human α 4-Integrin-HP2/1 wurde die uneingeschränkte Aktivierung des α 4-Integrin-Epitops B1 gemessen. Tatsächlich reduzierte die Aktivierung des α 4-Integrin-Epitops B1 die CD49d^{high}-Population auf 40%, wobei die Gabe von Natalizumab noch drastischere Auswirkungen (auf 20%) hatte (Abbildung 16 B/C). Die CD49d-Reduktion humaner CD4⁺ T-Zellen durch Natalizumab konnte somit auch *in vitro* und deshalb als direkter Effekt nachgewiesen werden. Die Korrelation zwischen der reduzierten CD49d-Expression und einer

erhöhten IL2-Produktion (Abbildung 13) lässt auf kostimulatorische Eigenschaften von Natalizumab schließen.

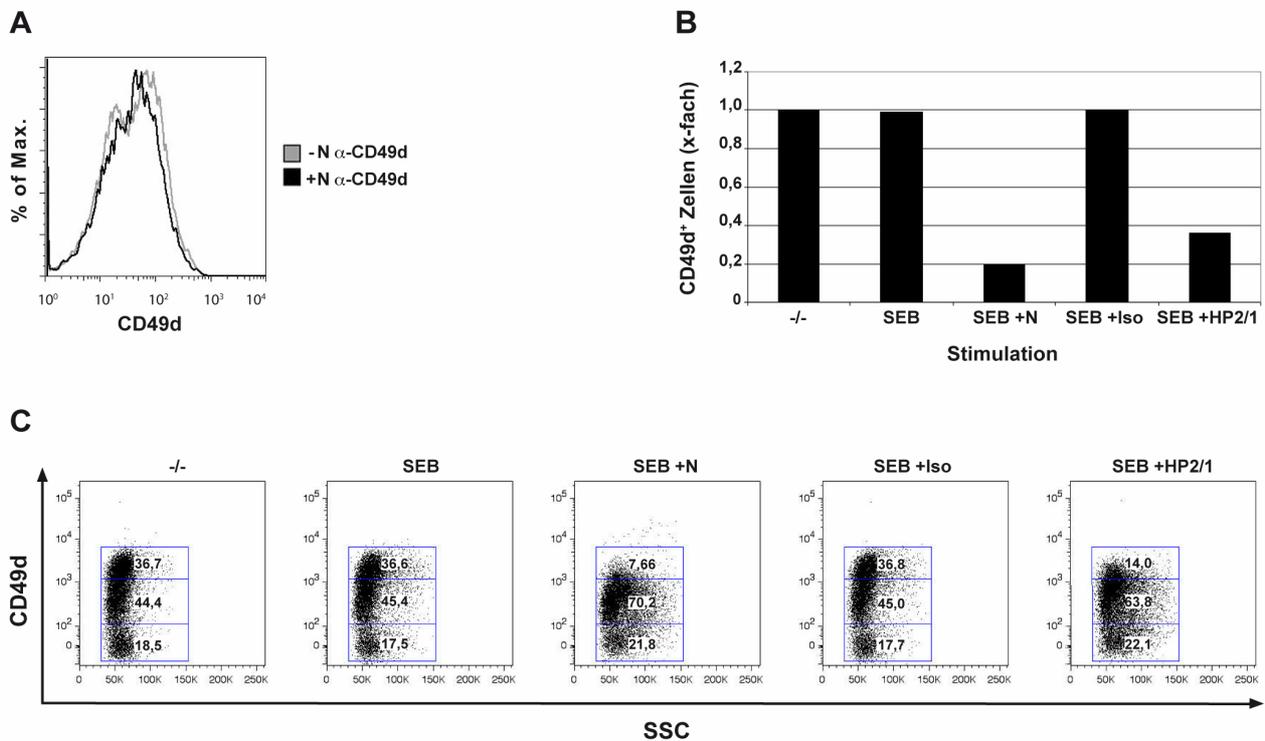


Abbildung 16. Natalizumab reduziert CD49d auf der Zelloberfläche humaner CD4⁺ T-Zellen *in vitro*.

(A) Histogramm zur Überprüfung möglicher Beeinträchtigungen des CD49d-FACS-Detektionsantikörpers durch Natalizumab. Frisch isolierte PBMCs wurden für 1 Stunde in An- und Abwesenheit von Natalizumab inkubiert und anschließend mit dem CD49d-PE-Detektionsantikörper gefärbt. (B) Bestimmung der CD49d-Oberflächenexpression humaner CD4⁺ T-Zellen einer PBMC-Kultur (Spender n=1) in Anwesenheit von Natalizumab, einer IgG4-Isotypkontrolle und eines B1 Epitop-aktivierenden Antikörpers (HP2/1). Die Stimulation der Zellen mit 1 μ g SEB bzw. die Kultivierung mit den verschiedenen Antikörpern erfolgte 24 Stunden. Die Detektion der CD4⁺ T-Zellen innerhalb der Leukozyten-Population wurde mit α -human CD4-FITC bewerkstelligt. Für die Normalisierung der CD49d-Expression wurde die unstimulierte Probe ohne Natalizumab-Gabe herangezogen. (C) Dot-Plot der FACS-Analyse von Abbildung B, aufgetragen wurden CD49d gegen SSC. Die drei Populationen (CD49d^{low}, CD49d^{med}, CD49d^{high}) können aufgrund ihres unterschiedlichen CD49d-Expressionsniveaus unterschieden werden.

5.3.2 Die CD49d-Reduktion auf humanen CD4⁺ T-Zellen *in vitro* ist ein direkter, stimulationsabhängiger-Natalizumab-Effekt

Welchen Einfluss Kulturbedingungen bzw. verschiedene Stimuli auf die Kinetik der Natalizumab-bedingten CD49d-Reduktion besitzen, sollte im Folgenden betrachtet werden. Nach der initialen Analyse mit SEB-stimulierten PBMCs sollten auch isolierte CD4⁺ T-Zellen wie auch verschiedene Stimulationsarten bzw. -stärken untersucht

werden. Es wurde zwischen T/I, nur Ionomycin und α -CD3/28-*Beads* variiert. Wie in Abbildung 17 veranschaulicht ist, wird CD49d unter allen Stimulationsarten und unabhängig von der Präsenz anderer Lymphozyten auf den hochexprimierenden CD4⁺ T-Zellen deutlich reduziert. Bei den Ionomycin-stimulierten Zellen verringerte die Zugabe von Natalizumab die CD49d^{high}-Population nach 24 Stunden um circa 15% bzw. nach 48 Stunden um circa 50%. Eine Kombination aus TPA und Ionomycin zeigte nach 24 Stunden eine Reduktion um knapp 30%, nach 48 Stunden um 60%. Die physiologischere Stimulation mit α -CD3/28-*Beads* reduzierte die CD49d^{high}-Population nach 24 Stunden sogar um circa 65%, was sich nach weiteren 24 Stunden aber nicht fortsetzte (Abbildung 17 A). Die CD49d-Reduktion durch Natalizumab ist damit ein Prozess, der in Mono- oder PBMC-Kultur schon nach 24 Stunden gut detektierbar war, jedoch in seinem Ausmaß durch die Art und Stärke der Stimulation beeinflussbar ist.

Die Frage, ob die CD49d-Reduktion unmittelbar nach Natalizumab-Zugabe einsetzt bzw. inwiefern eine Stimulation hierfür von Nöten ist, sollte im nächsten Schritt geklärt werden. Hierfür wurden unstimulierte bzw. T/I-stimulierte CD4⁺ T-Zellen in An- und Abwesenheit von Natalizumab für einen Zeitraum von insgesamt 8 Stunden inkubiert und alle 2 Stunden hinsichtlich ihrer CD49d-Expression durchflusszytometrisch untersucht. Sowohl bei den unstimulierten als auch bei den T/I-stimulierten Zellen setzte innerhalb von 2 Stunden nach Natalizumab-Zugabe eine Reduktion der CD49d^{high}-Population ein. Bei unstimulierten CD4⁺ T-Zellen reduzierte sich binnen 2 Stunden die CD49d-Menge um knapp 30%, binnen 6 Stunden um 53% und nach 8 Stunden auf 56% (Abbildung 17 B). Die Stimulation mit T/I verlangsamte die Kinetik der Reduktion, innerhalb von 2 Stunden verringerte sich die CD49d^{high}-Population auf 83%, innerhalb von 6 Stunden auf 81% und nach 8 Stunden konnte ein leichter Anstieg auf 86% detektiert werden. Die CD49d-Reduktion durch Natalizumab kann somit als direkter, stimulationsunabhängiger-Effekt angesehen werden, der aber durch eine Aktivierung der Zellen abmildert wird.

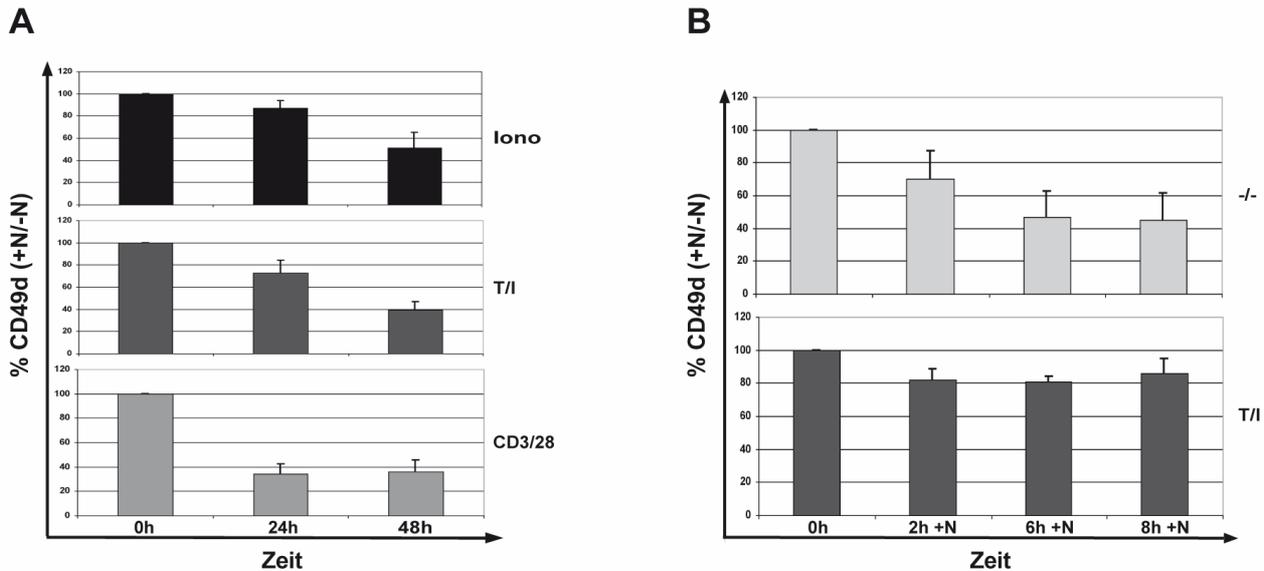


Abbildung 17. Die CD49d-Reduktion ist ein direkter, von der Art der Stimulation abhängiger Natalizumab-Effekt.

(A) Darstellung der CD49d^{high}-Population verschiedener Spender in einem Zeitraum von 0–48 Stunden in Abhängigkeit von verschiedenen Stimuli. Isolierte humane CD4⁺ T-Zellen wurden für insgesamt 24 Stunden bzw. 48 Stunden mit Natalizumab inkubiert und für 8 Stunden mit Ionomycin (Spender n=4), T/I (Spender n=3) und α -CD3/28-Beads (Spender n=3) aktiviert. (B) Reduktion von CD49d auf der Oberfläche der CD49d^{high}-Population verschiedener Spender (n=3) in einem Zeitraum von 0–8 Stunden bei unstimulierten und T/I-stimulierten Zellen. Isolierte humane CD4⁺ T-Zellen wurden vom Zeitpunkt 0 Stunden an mit Natalizumab inkubiert und - wo vorgesehen - gleichzeitig T/I-stimuliert. Die Messung von CD49d erfolgte alle 2 Stunden. Die Daten wurden die Werte zum Zeitpunkt 0 Stunden normalisiert.

5.3.3 Natalizumab beeinflusst die CD49d-Oberflächenexpression humaner CD4⁺ Effektorzellen

Als nächstes sollte eine mögliche Korrelation zwischen erhöhter Zytokin-Produktion und erniedrigter CD49d-Oberflächenexpression - bedingt durch Natalizumab - untersucht werden. Hierfür wurden PBMCs für 24 Stunden in An- und Abwesenheit von Natalizumab inkubiert und für 8 Stunden mit T/I stimuliert. Wie in Abbildung 18 A dargestellt, ist ein Großteil der IL2⁺ Zellen in der CD49d^{high}-Population vertreten. Durch die Natalizumab-bedingte Reduktion an CD49d akkumulieren die IL2⁺ T-Zellen in der CD49d^{med}-Population, wodurch der prozentuale Anteil der CD49d^{med}IL2⁺ T-Zellen erhöht wird. Gleichzeitig geht mit der CD49d-Reduktion eine IL2-Erhöhung einher.

Aktivierte Gedächtnis- und Effektorzellen zeichnen sich durch die Produktion ihrer Effektorzytokine aus, was *ex vivo* durch Restimulation induziert werden kann. Um

den Anteil an Effektorzellen in der CD49d^{high}-Population nachzuweisen, wurden T/I-stimulierte CD4⁺ T-Zellen hinsichtlich ihrer – MS relevanten – Interleukine IL17 und IFN γ untersucht ob diese mit der CD49d-Oberflächenexpression korreliert. Wie der dargestellte Dot-Plot (Abbildung 18 B) zeigt, werden IL17 und IFN γ hauptsächlich von CD4⁺ T-Zellen sezerniert, die ebenfalls CD49d^{high}-positiv sind. Natalizumab reduziert somit vornehmlich die CD49d-Expression auf CD4⁺ Gedächtnis- und Effektorzellen.

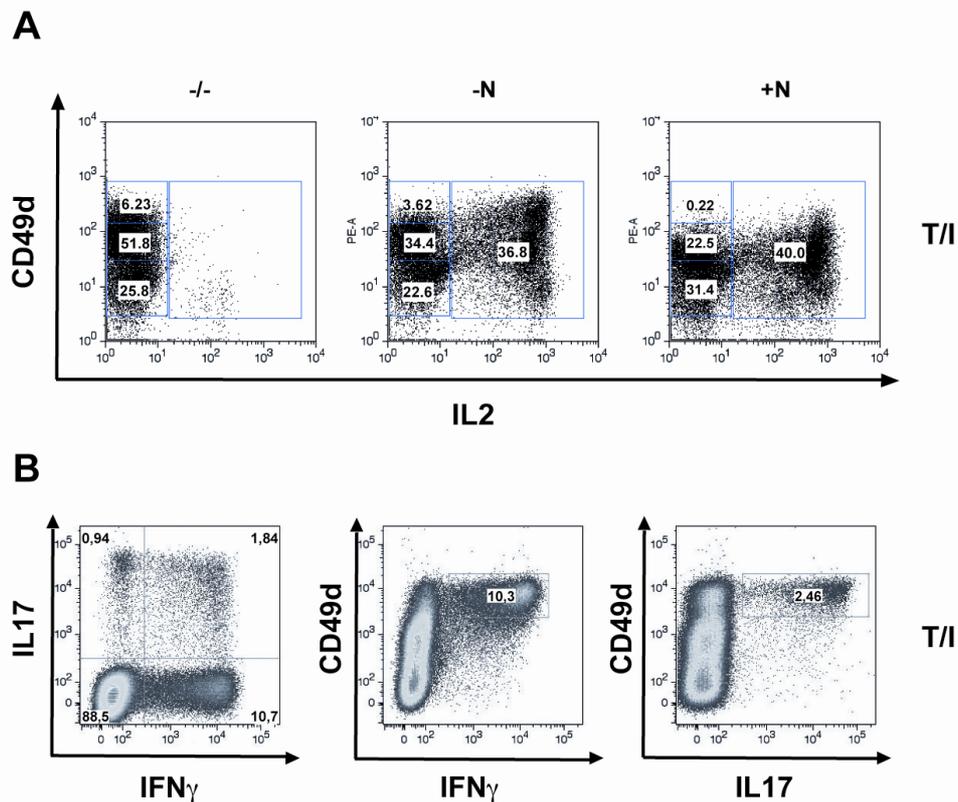


Abbildung 18. CD4⁺CD49d^{high}-T-Zellen sezernieren Effektorzytokine.

(A) Dot-Plot der FACS Analyse, aufgetragen wurden CD49d gegen IL2. Die humanen PBMCs wurden insgesamt 24 Stunden in An- und Abwesenheit von Natalizumab inkubiert und 8 Stunden mit T/I stimuliert. Die drei Populationen (CD49d^{low}, CD49d^{med}, CD49d^{high}) können aufgrund ihres unterschiedlichen CD49d-Expressionsniveaus charakterisiert werden. (B) Dot-Plot humaner CD4⁺ T-Zellen, die Stimulation der Zellen erfolgte 8 Stunden mit T/I. Aufgetragen wurden IL17 gegen IFN γ . Im nächsten Schritt wurde IL17⁺ bzw. IFN γ ⁺ gegen CD49d⁺ dargestellt.

Um festzustellen, in wie weit auch naive T-Zellen in der CD49d^{high}-Population vertreten sind, wurde diese hinsichtlich typischer Aktivierungsmarker überprüft. Naive T-Zellen werden durch Oberflächenexpression von CD45RA⁺CD45RO⁻CD62L⁺, Gedächtnis-T-Lymphozyten von CD45RA⁻CD45RO⁺CD62L⁻ charakterisiert. Um Aufschluss über den Aktivierungsstatus der CD49d^{high}-Population zu erhalten, wurde ebenfalls die Expression der Aktivierungsmarker CD25 und CD11a ermittelt. Als Negativkontrolle fand das B-Zell-spezifische-Phosphoglykoprotein CD19

Verwendung. Wie aus Tabelle 6 hervorgeht sind die MFI-Werte der CD49d^{low}-Population für CD45RA und CD62L (rot) erhöht, der Wert für CD45RO ist im Gegensatz hierzu (grün) geringer exprimiert. Daraus ergibt sich für die CD49d^{low}-Population eine Oberflächenmarkerkombination von CD45RA⁺CD45RO⁻CD62L⁺. Die CD49d^{high}-Population besitzt einen erhöhten MFI-Wert für CD45RO, die Werte für CD45RA und CD62L sind hier im Gegensatz zu der CD49d^{low}-Population reduziert. Somit ergibt sich für die CD49d^{high}-Population ein Oberflächenmarkerprofil von CD45RA⁻CD45RO⁺CD62L⁻. Bei der CD49d^{high}-Population können ebenfalls erhöhte Werte für die Aktivierungsmarker CD25 und CD11a detektiert werden. Somit sind in der CD49d^{low}-Population vor allem naive T-Zellen, wohingegen in der CD49d^{high}-Population hauptsächlich aktivierte CD4⁺ T-Effektorzellen und CD4⁺ Gedächtnis-T-Zellen vertreten sind.

Oberflächenmarker (MFI)	CD49d ^{low}	CD49d ^{high}
CD19	1,88	2,06
CD45RA	13,3	5,6
CD45RO	2,18	3,88
CD62L	43,4	27,8
CD25	3,45	4,73
CD11a	13,3	27,6

Tabelle 6. Akkumulation von naiven T-Zellen in der CD49d^{low}-Population und von aktivierten T-Effektor- und Gedächtnis-T-Zellen in der CD49d^{high}-Population.

Tabellarische Darstellung der MFI-Werte spezifischer Oberflächen- und Aktivierungsmarker. Eine Erhöhung der Expression des jeweiligen Markers ist in Rot, eine Reduktion der Expression des jeweiligen Markers ist in Grün dargestellt.

5.4 Natalizumab induziert ein direktes MAPK-Signal

Die Beeinflussung des Genexpressionsmusters, der Zytokinexpression und der CD49d-Oberflächenreduktion auf humanen CD4⁺ T-Zellen sind Indizien für eine Signalinduktion durch die Bindung von Natalizumab an VLA-4. Früher Nachweis einer möglichen Signaltransduktion sind Phosphorylierungsereignisse. Die Signaltransduktion der α 4-Integrine verläuft im allgemeinen über die FAK und ist durch die GTPase Rap1 sowohl mit dem klassischen MAPK-Singalweg als auch mit

dem JNK/p38 MAPK-Signalweg verbunden. Aus diesem Grund wurde die Phosphorylierung von ERK und JNK untersucht.

5.4.1 Jurkat-Zellen zeigen eine erhöhte IL2-Produktion durch Natalizumab

Die Experimente sollten in Jurkat-Zellen durchgeführt werden. Hierfür wurde überprüft, ob diese ähnlich wie primäre humane T-Zellen durch Natalizumab beeinflusst werden. Zu Beginn wurde die verwendete Jurkat-Sublinie mittels Durchflusszytometrie hinsichtlich ihrer CD49d-Expression überprüft. Wie Abbildung 19 A bestätigt, exprimiert die verwendete Jurkat-Zelllinie CD49d und gewährleistete somit die Bindung von Natalizumab an α 4-Integrin-Heterodimere. Um die IL2-Expression zu induzieren, wurden die Jurkat-Zellen analog zu den humanen CD4⁺ T-Zellen mit zwei verschiedenen Konzentrationen an T/I stimuliert. Bei 10 ng/ml TPA und 2 μ M Ionomycin erhöhte sich die Zahl der IL2⁺ Zellen unter zusätzlicher Gabe von Natalizumab von 7,1% auf 8,5% (Abbildung 19 B). Dies entspricht einem prozentualen Anstieg von circa 20%. Eine Verdopplung der T/I-Konzentration resultierte in einem Anstieg der IL2⁺ Zellen von 15,4% auf 16,6% in Anwesenheit von Natalizumab. Dies entspricht einem prozentualen Anstieg von circa 8%. Die Jurkat-Zellen zeigten, gleich den humanen CD4⁺ T-Zellen, eine erhöhte IL2-Syntheserate in Anwesenheit von Natalizumab. Eine Erhöhung der Stimulationsstärke resultierte hier ebenfalls in einem prozentual geringeren stimulierenden Effekt auf IL2.

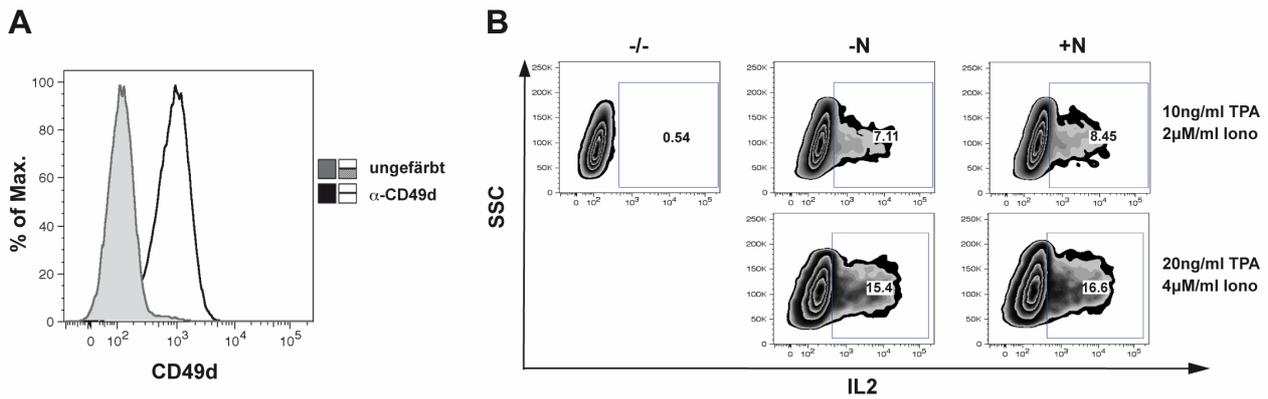


Abbildung 19. Natalizumab-Gabe erhöht die IL2-Expression in Jurkat-Zellen.

(A) Durchflusszytometrische Überprüfung der verwendeten Jurkat-Zellen hinsichtlich CD49d-Expression. (B) Dot-Plot der FACS-Analyse von Jurkat-Zellen, aufgetragen wurden SSC gegen IL2. Die Jurkat-Zellen wurden insgesamt für 24 Stunden in An- und Abwesenheit von Natalizumab inkubiert. Zur Variation der Stimulationsstärke erfolgte die Aktivierung der Zellen mit zwei verschiedenen T/I-Konzentrationen für 8 Stunden.

5.4.2 Jurkat-Zellen zeigen eine reduzierte CD49d-Expression durch Natalizumab

Als nächstes sollten auch Jurkat-Zellen in Bezug auf eine Reduktion von CD49d durch Natalizumab analysiert werden. Um eine stimulationsbedingte Veränderung der CD49d-Oberflächenexpression auszuschließen und die direkten Auswirkungen von Natalizumab untersuchen zu können, wurde in diesem Experiment auf eine Stimulation der Zellen verzichtet. Wie Abbildung 20 zeigt, reduziert die Anwesenheit von Natalizumab die Menge an CD49d ebenfalls auf den Jurkat-Zellen.

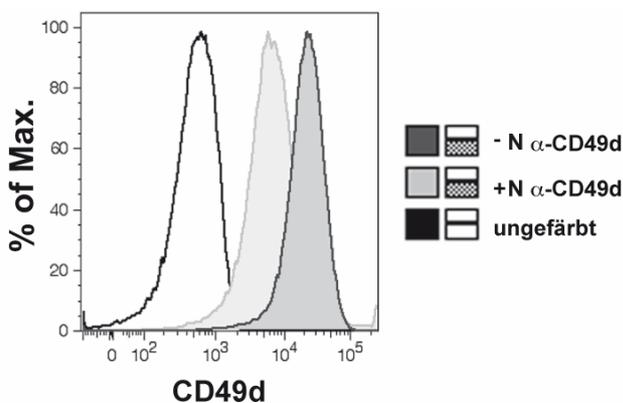


Abbildung 20. Natalizumab-Gabe reduziert CD49d auf Jurkat-Zellen.

Histogramm der durchfluss-zytometrischen Bestimmung von CD49d auf der Zelloberfläche von Jurkat-Zellen nach einer Inkubation von 24 Stunden mit Natalizumab ohne Stimulation.

5.4.3 Natalizumab induziert die Phosphorylierung von ERK und JNK in Jurkat-Zellen

Da primäre humane CD4⁺ T-Zellen und Jurkat-Zellen unter Einfluss von Natalizumab gleichermaßen und analog zu stimulierenden α 4-Integrin-Signalen mit einer Verringerung an CD49d auf der Zelloberfläche und vor allem einer Verstärkung der IL2-Expression reagierten, wurde schließlich die Phosphorylierung von ERK und JNK untersucht. Die Stimulation der Jurkat-Zellen erfolgte mit TPA, Ionomycin oder einer Kombination aus beiden in An- und Abwesenheit von Natalizumab für eine Dauer von 2 Stunden. Wie in Abbildung 21 A erkennbar, führte die Gabe von Natalizumab bei unstimulierten Zellen bereits zu einer leicht erhöhten ERK-Phosphorylierung. Die Stimulation der Zellen mit TPA, Ionomycin oder einer Kombination aus beiden erhöhte die Menge an pERK deutlich. Entscheidend aber ist, dass die ERK-Phosphorylierung in allen Fällen durch Gabe von Natalizumab nochmals verstärkt werden konnte. Ein analoges Verhalten zeigte Natalizumab in Bezug auf JNK. Hier führte die Gabe von Natalizumab zu unstimulierten Jurkat-Zellen bereits zu einer Phosphorylierung von JNK, die Aktivierung der Zellen mit den jeweiligen Stimuli erhöhte die Menge an pJNK, die durch Gabe von Natalizumab nochmals gesteigert werden konnte. Daraus lässt sich schließen, dass die Bindung von Natalizumab an α 4-Integrin-Heterodimere Signale induziert, die sowohl über den klassischen MAPK-Signalweg als auch über den SAPK/JNK-Signalweg verlaufen.

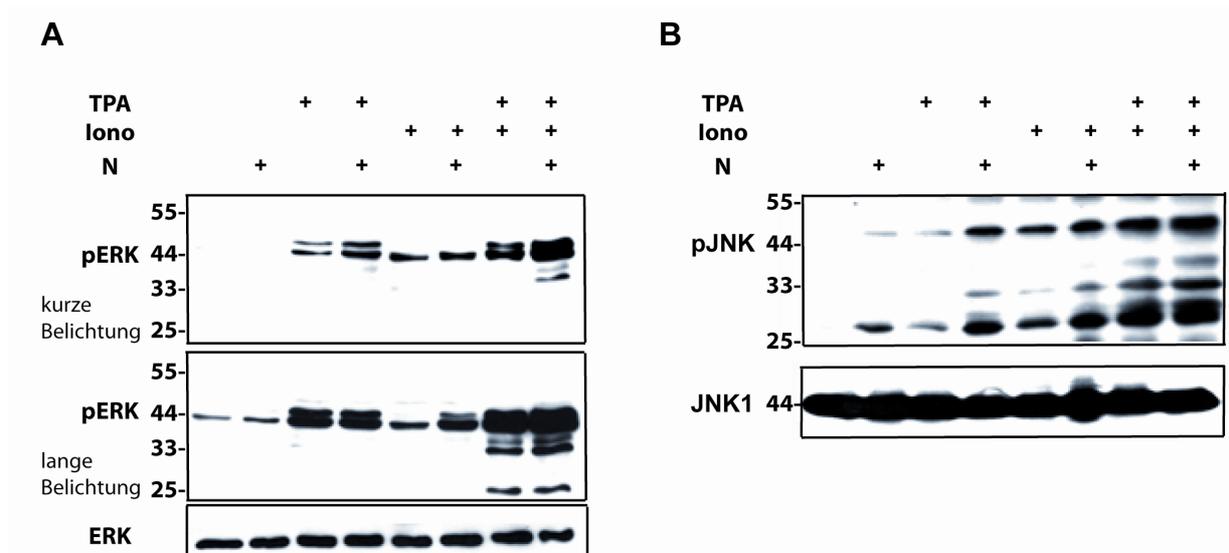


Abbildung 21. Natalizumab induziert die Phosphorylierung von ERK und JNK in Jurkat-Zellen.

Western-Blot-Analyse der ERK- und JNK-Phosphorylierung in unstimulierten Jurkat-Zellen und in Abhängigkeit von der Stimulation mit TPA, Ionomycin und einer Kombination aus TPA/Ionomycin in An- und Abwesenheit von Natalizumab. Die Stimulationsdauer bzw. die Anwesenheit von Natalizumab betrug 2 Stunden (Die Western-Blot-Analyse wurde durchgeführt von Fr. Dr. Friederike Berberich-Siebelt).

5.4.4 Natalizumab induziert ein kostimulatorisches Signal in humanen CD4⁺ T-Zellen

Das Engagement von $\alpha 4$ -Integrin kann kostimulatorische Eigenschaften haben. So sollte im nächsten Schritt untersucht werden, ob Natalizumab solch ein Signal in primären T-Zellen induzieren kann. Hierfür wurden humane CD4⁺ T-Zellen mit α -CD3, α -CD28 und mit einem aktivierenden α -CD49d für die Dauer von 2 Stunden stimuliert. Alternativ wurde bei den verschiedenen Bedingungen der aktivierende α -CD49d durch Natalizumab ersetzt. Als Nachweis wurde die Phosphorylierung von ERK (und JNK) bestimmt. Wie in Abbildung 22 zu erkennen ist resultierte die Stimulation mit α -CD3 und α -CD28 in einer Phosphorylierung von ERK, die durch zusätzliche Gabe von α -CD49d nochmals gesteigert werden konnte. Der Austausch des aktivierenden α -CD49d durch Natalizumab führte zu einer mindestens eben so starken Erhöhung der pERK-Menge. Die Stimulation der T-Zellen mit einer Kombination bestehend aus α -CD28 und α -CD49d hatte nur eine moderate ERK-Phosphorylierung zur Folge; wurde aber der aktivierende α -CD49d durch Natalizumab substituiert, resultierte dies wiederum in einer deutlichen Zunahme an

pERK. Unter gleichen experimentellen Bedingungen zeigte sich im Falle von JNK nur eine geringe Zunahme der Phosphorylierung bedingt durch Natalizumab (Daten nicht gezeigt). Aus diesen Ergebnissen kann Natalizumab die Fähigkeit zur Generierung eines kostimulatorischen Signals in primären humanen CD4⁺ T-Zellen zugeschrieben werden, das vornehmlich über den klassischen MAPK-Signalweg transloziert wird.

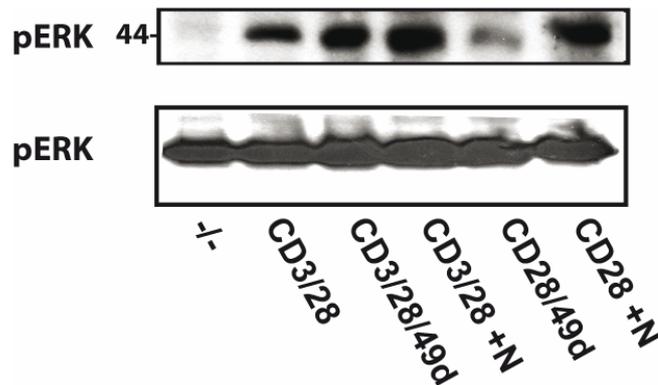


Abbildung 22. Das Natalizumab-induzierte Signal besitzt kostimulatorische und aktivierende Eigenschaften.

Western-Blot-Analyse der ERK-Phosphorylierung humaner CD4⁺ T-Zellen in Abhängigkeit von verschiedenen Stimuli. Die Aktivierung mit α -CD3/28 und einem aktivierenden α -CD49d betrug 2 Stunden. Zur Bestimmung ko-stimulatorischer Eigenschaften von Natalizumab wurde α -CD49d durch Natalizumab ersetzt (Die Western-Blot-Analyse wurde durchgeführt von Fr. Dr. Friederike Berberich-Siebelt).

5.5 Validierung der Ergebnisse *in vivo*

Bisher konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass Natalizumab einen direkten stimulatorischen-Effekt auf primäre humane CD4⁺ T-Zellen ausübt. Aus der Literatur ist bekannt, dass die monatelange Behandlung von MS-Patienten mit Natalizumab Genexpressionsunterschiede nach sich zieht. Ob dies aber auf die Vermittlung eines kostimulatorischen Signals zurückgeführt werden kann, ist bisher nicht untersucht worden. Deshalb wurde für die Validierung der *in vitro*-Daten MS-Patienten ausgewählt, die im Begriff waren eine Natalizumab-Therapie zu beginnen. Basierend auf den bisherigen Ergebnissen wurde ein Zeitfenster von 24 Stunden gewählt. Die erste Blutentnahme fand kurz vor der Natalizumab-Erstinfusion, die zweite Blutentnahme 24 Stunden *post infusionem* statt.

5.5.1. Natalizumab erhöht die Produktion von IL2, IL17 und IFN γ *in vivo*

Für die Experimente wurden PBMC-Populationen verwendet, um jedwede Beeinflussung der Zellen durch die magnetischer Zellseparation auszuschließen und um die Zellen unter möglichst physiologischen Bedingungen kultivieren zu können. Die Stimulation erfolgte an Platten gebundenen α -CD3/28 für eine Dauer von 24 Stunden. Bereits nach der ersten Gabe von Natalizumab ist die Produktion von IL2 um den Faktor 1,83, von IL17 um den Faktor 2,51 und von IFN γ um den Faktor 1,74 erhöht (Abbildung 23). Damit bestätigt sich der kostimulatorische Effekt des blockierenden Antikörpers Natalizumab *in vivo* und im Patienten. Bemerkenswert ist, dass - während die Menge an IL2 und IFN γ knapp verdoppelt wird - die Expression von IL17 mit einer 2,5-fachen Zunahme am meisten beeinflusst wird. Dies mag die Zusammensetzung der CD4⁺ T-Effektorsubpopulationen von MS-Patienten widerspiegeln.

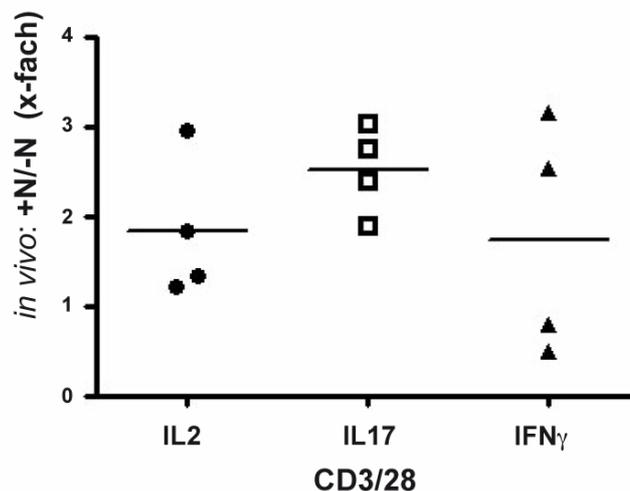


Abbildung 23. 24 Stunden nach der Gabe von Natalizumab ist die Expression der Interleukine IL2, IL17 und IFN γ *in vivo* erhöht.

Durchflusszytometrische Bestimmung der Zytokine IL2, IL17 und IFN γ humaner CD4⁺ T-Zellen von MS-Patienten (n=4). Zur Isolierung der PBMC-Populationen wurden Blutproben verwendet, die unmittelbar vor und 24 Stunden nach der Natalizumab-Erstinfusion abgenommen wurden. Die Stimulation der Zellen erfolgte mit an Platten gebundenen α -CD3/28 für eine Dauer von 24 Stunden. Die CD4⁺ T-Zellen wurden mit α -human CD4-FITC detektiert, die Werte auf die stimulierten Proben vor Natalizumab-Gabe normalisiert, die Querbalken stellen die Mittelwerte der jeweiligen Spender dar.

5.5.2. Natalizumab reduziert die CD49d-Expression auf humanen CD4⁺ T-Zellen *in vivo*

Neben der durchflusszytometrischen-Bestimmung der Zytokine erfolgte gleichzeitig die Detektion von CD49d. Somit gelten für diesen Versuch die gleichen Bedingungen wie unter Punkt 5.5.1 beschrieben. Durch die Anwesenheit von Natalizumab wird die Menge an CD49d auf der Zelloberfläche unstimulierter CD4⁺ T-Zellen um den Faktor 0,5 reduziert (Abbildung 24). Durch Stimulation der T-Zellen mit α -CD3/28 setzt eine leicht abgeschwächte Reduktion der CD49d^{high}-Population um den Faktor 0,4 ein, dieser Effekt wird durch Anwesenheit von Natalizumab auf den Faktor 0,75 erhöht. Im Einklang mit den *in vitro*-Daten resultiert die Gabe von Natalizumab binnen 24 Stunden in einer deutlichen Reduktion der CD49d^{high}-Population. Ebenfalls ist hier der direkte Effekt von Natalizumab zu erkennen.

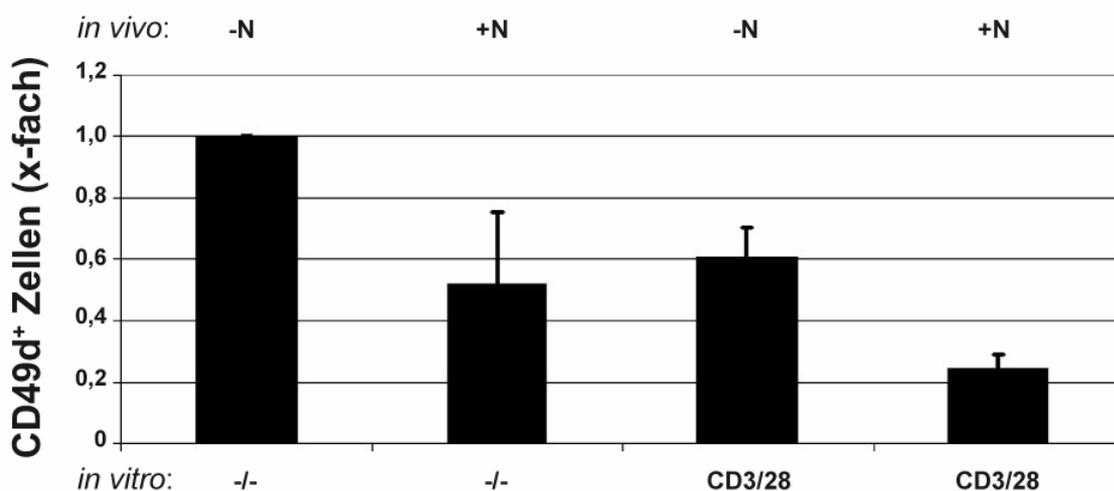


Abbildung 24. 24 Stunden nach der ersten Natalizumab-Gabe ist CD49d auf der Zelloberfläche reduziert.

Durchflusszytometrische Bestimmung von CD49d humaner CD4⁺ T-Zellen aus MS-Patienten (n=4). Für die Isolierung der PBMC-Populationen wurden Blutproben verwendet, die unmittelbar vor und 24 Stunden nach der Natalizumab-Erstinfusion abgenommen wurden. Die Stimulation der Zellen erfolgte mit an Platten gebundenen α -CD3/28 für eine Dauer von 24 Stunden. Die CD4⁺ T-Zellen wurden mit α -human CD4-FITC Antikörper detektiert und die Werte auf die unstimulierten Proben ohne Natalizumab-Gabe normalisiert.

5.5.3. Natalizumab erhöht die Zytokin-Produktion *in vivo*

In den ursprünglichen Microarray-Experimenten war die mRNA-Menge mehrerer Zytokine vermehrt, so dass im abschließenden Schritt die Sezernierung der Interleukine IL2, IL4, IL10, IL12/IL23p40, IL17, IL21 und IFN γ mittels *Cytometric Bead Array* aus dem Blut der MS-Patienten untersucht werden sollte. Die Stimulation der peripheren Blutleukozyten erfolgte ebenfalls unter möglichst physiologischen Bedingungen mit plattengebundenen α -CD3/28. Der Mediumsüberstand wurde nach einer Stimulationsdauer von 24 Stunden bzw. 48 Stunden abgenommen, um die Konzentration der Interleukine zu messen. Nach 24 Stunden befanden sich die Zytokinkonzentrationen an der untersten Detektionsgrenze, jedoch zeichnete sich hier bereits in Gegenwart von Natalizumab eine Erhöhung der Menge an IL2 und IFN γ ab. Nach 48 Stunden konnte im Durchschnitt eine knapp 2-fach erhöhte IL2-Menge gemessen werden. Die Menge an IFN γ erhöhte sich um den Faktor 3, die Menge an IL12/IL23 p40 um den Faktor 4 (Abbildung 25). Auf die Sekretion der Zytokine IL4 und IL10 hatte Natalizumab keine Auswirkung, diese zeigten eine nahezu unveränderte Konzentration im Medium, waren aber auch fast nicht nachweisbar. Nach 48 Stunden lagen die Konzentrationen der Interleukine IL17 und IL21 sogar noch unterhalb der Detektionsgrenze des *Cytometric Bead Arrays* und konnten somit nicht bestimmt werden. So konnte die Allgemeingültigkeit des stimulierenden Natalizumab-Effekts nicht für alle Zytokine überprüft werden, aber immerhin wurden die anfänglichen mRNA-Daten gesunder Spender bis zur Zytokinsekretion in MS-Patienten validiert. Damit muss der blockierende Antikörper Natalizumab auch als stimulierendes Agens angesehen werden.

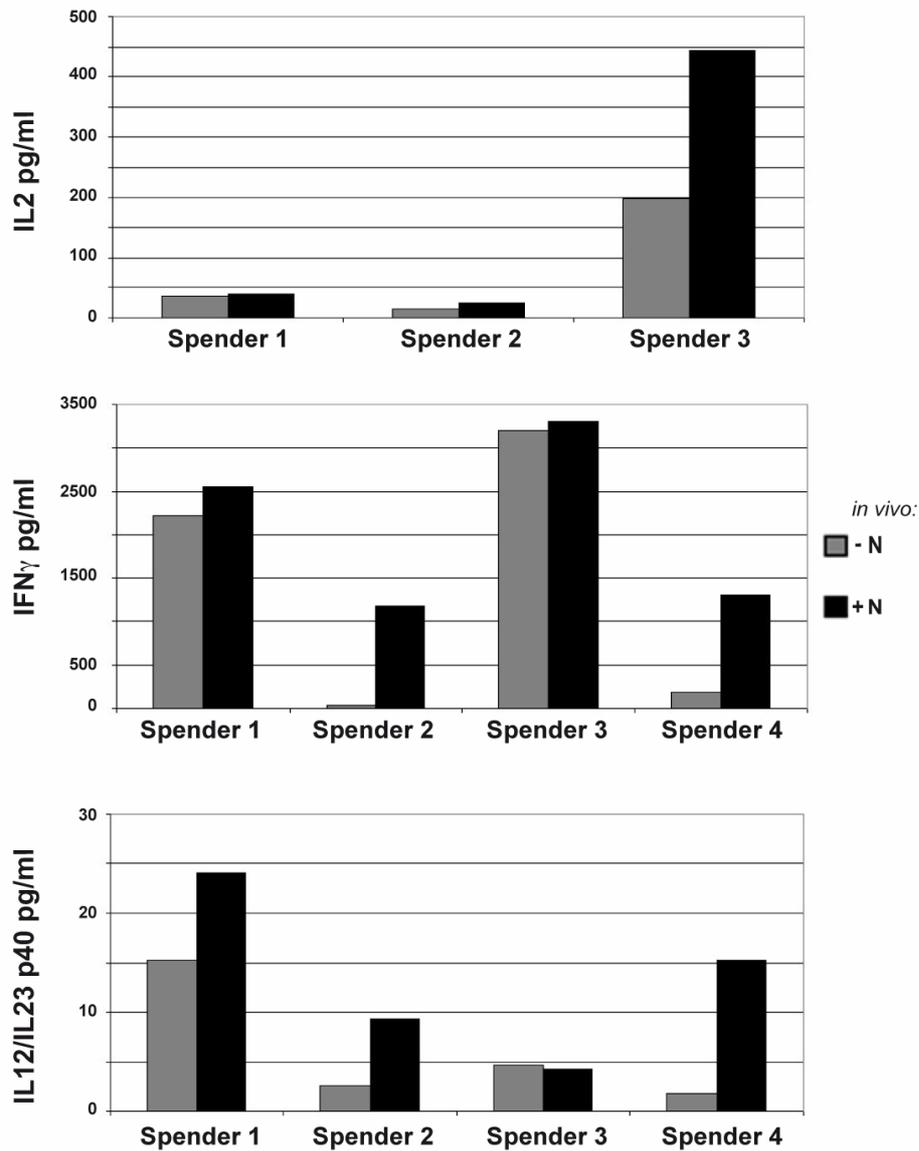


Abbildung 25. Erhöhte Mengen an IL2, IFN γ und IL12/IL23p40 durch Natalizumab-Gabe.

Validierung der Interleukin-Sekretion mittels *Cytometric Bead Array*. Die Blutabnahme von den MS-Patienten erfolgte vor und 24 Stunden nach der Natalizumab-Erstinfusion. Die Zellen der isolierten PBMC-Kulturen wurden mit plattengebundenen α -CD3/28 stimuliert, der Mediumsüberstand nach 48 Stunden abgenommen und die Interleukin-Sezernierung gemessen.

6. Diskussion

Die Multiple Sklerose ist eine neurodegenerative Erkrankung, deren Beginn und Fortschreiten durch den Zusammenbruch der Blut-Hirn-Schranke bzw. den Übertritt von proinflammatorischen Immunzellen ins Gehirn gekennzeichnet ist. Um dem entgegen zu wirken, hat man einen monoklonalen Antikörper, Natalizumab, entwickelt, der über Bindung von VLA-4 die Extravasation von Lymphozyten blockiert. Der hohen Effektivität dieses Therapeutikums stehen aber seltene, doch schwerwiegende Nebenwirkungen entgegen, von denen man annehmen kann, dass sie auf einen direkten signalisierenden Einfluss von Natalizumab auf die Lymphozyten zurückzuführen sind.

6.1 Natalizumab besitzt kostimulatorische Eigenschaften

Integrine wie VLA-4 besitzen (ko-)stimulatorische Eigenschaften, was u.a. durch Antikörper- oder Liganden-vermittelte VLA-4-Aktivierung von humanen CD4⁺ T-Zellen gezeigt wurde. Dies resultierte in gesteigerter IL2- bzw. IFN γ -Synthese, erhöhter CD25-Expression sowie beschleunigter Proliferation und verstärkter ERK-Phosphorylierung (Udagawa and McIntyre 1992; Udagawa, Woodside et al. 1996; Kim, Billard et al. 2010). Im Gegensatz dazu beruht die gewünschte Wirkweise von Natalizumab auf der mechanischen Blockade von VLA-4 und der daraus resultierenden eingeschränkten Migrationsfähigkeit von Immunzellen. Im Unterschied zu anderen therapeutischen Antikörpern wurde Natalizumab dahingehend konzipiert, dass keine weiteren biologischen Effekte auf die Zielzellen ausgeübt werden sollten. So können viele weitere biologische Effekte des Medikaments, wie die eingeschränkte Migrationsfähigkeit von Immunzellen, die erhöhten Zellzahlen zirkulierender Leukozyten (Niino, Bodner et al. 2006) oder die verstärkte Migration von hämatopoetischen CD34⁺ Progenitorzellen aus dem Knochenmark in den Blutkreislauf (Bonig, Wundes et al. 2008) mit der Blockade von VLA-4 erklärt werden. In verschiedenen Langzeitstudien fanden sich jedoch Begleiterscheinungen wie das veränderte Genexpressionsprofil humaner PBMCs (Lindberg, Achtnichts et al. 2008), die stetige Zunahme proinflammatorischer T-Zellen oder ein verändertes

Proliferationsverhalten (Kivisakk, Healy et al. 2009), die auf direkte oder indirekte immunmodulatorische Kapazitäten von Natalizumab hindeuten könnten.

Dadurch, dass die hier gezeigten Daten *in vitro* und in Kurzzeitexperimenten gewonnen wurden, belegen sie - beginnend mit den Microarray-Experimenten - erstmals eine direkte Beeinflussung der Genexpression humaner CD4⁺ T-Zellen durch Natalizumab. Die erhöhte Expression von *IL2* (Abbildung 7 A), der Aktivierungsmarker IL2RA (CD25) und CD69 (Abbildung 8) sowie weiterer pro-proliferativer Gene und verschiedener Transkriptionsfaktoren (Tabelle 1, Tabelle 4) deutet auf einen Natalizumab-vermittelten erhöhten Aktivierungsstatus humaner CD4⁺ T-Zellen hin. Der gleichzeitige Genexpressionsanstieg der Effektorzytokine *IL2*, *IL17*, und *IFNG* sowie verschiedener Chemokine bzw. Chemokinrezeptoren (Tabelle 4) lassen auf die Ausbildung eines erhöhten proinflammatorischen Phänotyps schließen. Die gesteigerte Genexpression der Schlüssel-Transkriptionsfaktoren *TBX21* (Th1) und *RORC* (Th17) gibt Hinweise auf eine verstärkte Polarisation naiver T-Zellen in Richtung Th1- bzw. Th17-Effektorzellen. Im Gegensatz hierzu konnte bei *GATA3*, einem Transkriptionsfaktor, der für die Th2-Zytokinsekretion von Bedeutung ist, ein reduziertes Expressionsniveau beobachtet werden. Die in mehreren Studien beobachtete Akkumulation zirkulierender proinflammatorischer Effektorzellen (Khademi, Stol et al. 2008; Khademi, Bornsen et al. 2009; Kivisakk, Healy et al. 2009) kann somit nicht nur mit einer VLA-4-Blockade begründet, sondern auch mit einer verstärkten Polarisation in Richtung T-Effektorzellen in Zusammenhang gebracht werden. Dieses Resultat entspricht darüber hinaus einer Arbeit, in der zum ersten Mal gezeigt wurde, dass $\alpha4\beta1$ -Integrin-Heterodimere am sog. *Priming* von naiven T-Zellen beteiligt ist, wobei sich $\alpha4\beta1$ -Integrin an der immunologischen Synapse befindet und unter Umständen (bestimmte Antikörper) Th1-Polarisierung verursacht (Mittelbrunn et al. 2004).

Im Zuge dieser Arbeit gelang es weiterhin, die Induktion direkt aktivierender bzw. kostimulatorischer Signale durch Natalizumab auf Proteinebene nachzuweisen. In Jurkat-Zellen konnte ein direktes, Natalizumab-vermitteltes MAPK-Signaling gezeigt werden, das in einer erhöhten ERK- und JNK-Phosphorylierung (Abbildung 21) resultiert. Der Nachweis direkter kostimulatorischer Eigenschaften von Natalizumab gelang darüber hinaus auch in primären humanen CD4⁺ T-Zellen: Nicht nur ein bekanntermaßen kostimulatorisch wirkender CD49d-Antikörper, sondern besonders Natalizumab resultierten in einer erhöhten Menge an pERK (Abbildung 22). Dies

demonstriert eine Signal-gebende Wirkung von Natalizumab, wie sie für Kostimulation über VLA-4 beschrieben worden ist (Kim, Billard et al. 2010). Die Interleukine IL2, IFN γ und CD25 sind direkte Zielgene des NFAT:AP1-Heterodimers (Macian, Lopez-Rodriguez et al. 2001); zudem konnte eine Beteiligung von NFAT an der Regulation der IL17-Produktion (Liu, Lin et al. 2004; Ghosh, Koralov et al. 2010) nachgewiesen werden. Die Daten zu der vorliegenden Arbeit wiesen nicht auf eine direkte Beeinflussung von NFAT durch Natalizumab hin, aber die verstärkte Aktivierung des Dimerisierungspartners durch erhöhte ERK-Phosphorylierung in humanen T-Zellen lässt sich gut mit der Expressionserhöhung von NFAT-Zielgenen in Einklang bringen. Die Tatsache, dass unterschiedliche Arten der T-Zellaktivierung - α -CD3/28, SEB oder TPA/Ionomycin - immer und qualitativ gleich durch Natalizumab kostimulierbar waren, spricht für eine physiologisch normale Verknüpfung der Signaltransduktionskaskaden. Zusammenfassend wurden wichtige Hinweise dafür gewonnen, dass Natalizumab eine direkte Beeinflussung des VLA-4-Signalwegs ausübt und somit als physiologischer Kostimulus angesehen werden muss. Die Bedeutung dieser Ergebnisse wurde anhand von Blutproben von MS-Patienten unterstrichen, denn bei Therapiebeginn mit Natalizumab reagierten deren periphere CD4⁺ T-Zellen nach nur 24 Stunden mit erhöhter proinflammatorischer Interleukinproduktion.

6.2 Die Reduktion von VLA-4 an der Zelloberfläche ist ein direkter Effekt von Natalizumab

Interessanterweise beruht die Wirkweise von IFN β als MS-Therapeutikum neben seinen immunmodulatorischen Eigenschaften wahrscheinlich auch auf seiner Fähigkeit, VLA-4 auf der Zelloberfläche von Leukozyten zu reduzieren. Hierdurch wird die Migrationsfähigkeit von autoreaktiven Immunzellen in das ZNS verringert und die entzündlichen Prozesse im ZNS werden gemildert (Muraro, Leist et al. 2000; Muraro, Liberati et al. 2004). Im Falle von Natalizumab soll eine eingeschränkte Transmigrationsfähigkeit immunkompetenter Zellen in das ZNS durch Antikörpervermittelte Blockade von VLA-4 erreicht werden. Bei langfristiger Gabe von Natalizumab konnte außerdem eine Verringerung an VLA-4 auf humanen B-Zellen,

T-Zellen und Monozyten beobachtet werden (Niino, Bodner et al. 2006), die das Migrationspotential weiter einschränkt. Wie kürzlich publizierte Daten belegen, war die CD49d-Reduktion bereits relativ kurzfristig nach Natalizumab-Therapiebeginn beobachtet worden. Als vier Wochen nach der ersten Gabe von Natalizumab Blut von Patienten untersucht wurde, konnte auf humanen T-Zellen, B-Zellen, NK-Zellen und Monozyten bereits eine deutliche Abnahme an VLA-4 *in vivo* festgestellt werden (Millonig, Hegen et al. 2010). Inwieweit es sich in diesem Zeitfenster, das für Signaltransduktionsvorgänge wiederum sehr groß ist, um eine direkte oder indirekte Auswirkung von Natalizumab handelt, wurde nicht analysiert. Die vorgelegten Ergebnisse belegen, dass es sich bei der VLA-4-Reduktion auf humanen CD4⁺ T-Zellen um einen direkten, unmittelbar nach Natalizumab-Gabe einsetzenden Effekt handelt, der sowohl *in vitro* (Abbildung 17) als auch *in vivo* (Abbildung 24) beobachtet werden kann. Als Ursache für die beobachtete CD49d-Reduktion sind sowohl α -VLA-4-vermittelte Rezeptor-Internalisierung (Fleming, Bao et al. 2010) als auch eine Antikörper-vermittelte Herabregulation, wie sie bei therapeutischen erbB-Antikörpern beobachtet werden konnte (Hurwitz et al. 1995; Rowinsky 2004), denkbar. Ein Analyse-Artefakt bedingt durch eine Natalizumab-vermittelte Blockade der Detektionsantikörper-Bindungsstelle konnte in den Versuchen ausgeschlossen werden (Abbildung 16 A). Die therapeutische Wirkung von Natalizumab beruht demnach wahrscheinlich nicht nur auf einer Blockade von VLA-4, sondern auch auf einer direkten Antikörper-vermittelten VLA-4-Reduktion. Sie wird augenfällig anhand beobachteter VLA-4-Reduktion auf verschiedenen Leukozytensubpopulationen wie CD19⁺ B-Zellen, CD4⁺ T-Zellen, NK-Zellen und CD34⁺ hämatopoetischen Stammzellen (Bonig, Wundes et al. 2008) und einem Anstieg zirkulierender Monozyten, Eosinophilen, Basophilen (Miller, Khan et al. 2003; Rudick, Stuart et al. 2006; Neumann, Zohren et al. 2009).

Der Verlust von VLA-4 an der Oberfläche von CD4⁺ T-Zellen wirkt damit der kostimulatorischen Kapazität von Natalizumab entgegen, was im Einklang mit der beobachteten limitierten (Tabelle 5) bzw. zeitlich begrenzten Erhöhung der Zytokin-Produktion von humanen CD4⁺ T-Zellen *in vitro* steht (Abbildung 11, Abbildung 12). Da eine pharmakologisch relevante Konzentration von Natalizumab, wie sie im Blut von MS-Patienten zu messen ist, verwendet wurde, ist davon auszugehen, dass die meisten extrazellulären VLA-4-Moleküle humaner CD4⁺ T-Zellen gebunden wurden. Allerdings scheint Natalizumab vor allem VLA-4 auf der Oberfläche von CD49d-hoch-

positiven (CD49d^{high}) Zellen zu reduzieren (Abbildung 18). Diese Population setzt sich größtenteils aus CD4⁺ Effektorzellen bzw. CD4⁺ Gedächtnis-T-Zellen zusammen (Tabelle 6). Der Anstieg peripherer IFN γ ⁺ und IL17⁺ Effektorzellen wird somit auch durch Verschiebung des Verhältnisses naiver zu aktivierten T-Zellen zugunsten letzterer begünstigt. Interessanterweise wurde bei humanen Th17-Effektorzellen eine besonders hohe CD49d-Expression auf deren Zelloberfläche nachgewiesen (Abbildung 18 B), wodurch sie einerseits hervorragende Zielzellen für den therapeutischen Effekt von Natalizumab sind, sich andererseits aber in der Peripherie besonders stark anreichern. In Anbetracht der Tatsache, dass sich schon CD19⁺ B-Zellen, CD14⁺ Monozyten und CD3⁺ T-Zellen hinsichtlich ihrer Menge an VLA-4 deutlich unterscheiden (Niino, Bodner et al. 2006; Millonig, Hegen et al. 2010) muss davon ausgegangen werden, dass sich das Verhältnis der einzelnen Lymphozytenpopulationen zueinander durch Natalizumab-Therapie entscheidend verschiebt. Die mit zunehmender Therapiedauer ansteigende Zahl zirkulierender TNF α ⁺, IFN γ ⁺ und IL17⁺ Zellen in MS-Patienten (Khademi, Stol et al. 2008; Khademi, Bornsen et al. 2009; Kivisakk, Healy et al. 2009) wurde bisher ausschließlich mit der Natalizumab-vermittelten VLA-4-Blockade erklärt, dürfte aber auch der Tatsache geschuldet sein, dass Natalizumab erst ein kostimulatorisches Signal ausübt, um dann gerade bei proinflammatorische Zellen zum Verlust von VLA-4 zu führen.

6.3 Natalizumab als Therapeutikum?

Im Zusammenhang mit der Pathogenese der MS ist die hier beobachtete, durch Natalizumab vermittelte Zunahme von IL2⁺, IL17⁺ und IFN γ ⁺ CD4⁺ T-Zellen auf den ersten Blick besorgniserregend. Eine erhöhte IL2-Produktion vermittelt die klonale Expansion von weiteren Immunzellen (Morgan, Ruscetti et al. 1976; Gillis and Smith 1977) und in Kombination mit IL15 findet eine Ausweitung der entzündlichen Prozesse im ZNS statt (Cho, Boyman et al. 2007). Weiterhin konnten CD4⁺IL17⁺IFN γ ⁺ T-Zellen maßgeblich mit der Entstehung und Ausbreitung von aktiven Läsionen in MS-Patienten in Zusammenhang gebracht werden (Kebir, Ifergan et al. 2009). Vor diesem Hintergrund scheint sich eine Therapie mit Natalizumab und der damit verbundenen verstärkten Ausbildung eines proinflammatorischen T-Zell-Phänotyps nachteilig auf die MS-Progression auszuwirken. Dem widerspricht jedoch

die erwiesene therapeutische Wirkung von Natalizumab, die sich in einer Abmilderung der neurologischen Symptome und einer Reduktion aktiver Läsionen widerspiegelt. Dieser Widerspruch lässt sich mit einer effektiven Blockade an der Blut-Hirn-Schranke und darüber hinaus mit der in der vorliegenden Arbeit sowohl *in vitro* als auch *in vivo* gezeigten VLA-4-Reduktion in Einklang bringen. Da die vorgelegten Daten zeigen, dass Natalizumab vornehmlich VLA-4 auf Zellen der CD49d^{high}-Population (Abbildung 18), in der sich hauptsächlich Effektorzellen bzw. Gedächtnis-T-Zellen befinden (Tabelle 6) reduziert, werden IL2⁺, IL17⁺ und IFN γ ⁺ CD4⁺ T-Zellen durch Natalizumab in der Peripherie zurückgehalten. Die mit zunehmender Therapiedauer steigende Zellzahl von peripheren TNF α ⁺, IFN γ ⁺, und IL17⁺ Effektorzellen (Khademi, Stol et al. 2008; Khademi, Bornsen et al. 2009; Kivisakk, Healy et al. 2009) kann somit auch als therapeutischer Erfolg interpretiert werden und ist nicht nur auf die VLA-4-Blockade, sondern ebenfalls auf einen erhöhten Verlust an VLA-4 auf Effektorzellen zurückzuführen.

Andererseits schränkt Natalizumab auch die Immunüberwachung im Gehirn ein, was eine Gefahr für den MS-Patienten bedeuten kann. Normalerweise befindet sich im Vergleich zum peripheren Blut im Liquor des Menschen ein deutlich höherer Prozentsatz an Gedächtnis- bzw. Antigen-erfahrenen CD4⁺ T-Zellen (Kivisakk, Tucky et al. 2006). Für die Immunüberwachung des ZNS sind CD4⁺ Gedächtnis-T-Zellen von zentraler Bedeutung und es wird vermutet, dass sich eine Beeinträchtigung der Immunüberwachung begünstigend auf opportunistische Infektionen, wie z.B. mit dem JC-Virus, auswirkt (Callahan, Williams et al. 2004; Stuve, Marra et al. 2006). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass CD4⁺CD45RO⁺CD62L⁻ Gedächtnis-T-Zellen ebenfalls von der VLA-4-Reduktion durch Natalizumab betroffen sind (Tabelle 6). Hieraus lässt sich ein beeinträchtigtes migratorisches Potential und somit eine reduzierte Beteiligung dieser Zellen an der Immunüberwachung des ZNS ableiten, vor allem weil eine deutliche VLA-4-Reduktion auch auf CD4⁺ T-Zellen in MS-Patienten nach Gabe von Natalizumab bestätigt werden konnte (Abbildung 24). Im Zusammenhang mit der Entstehung der PML ist zu vermuten, dass die Blockade/Herunterregulation von VLA-4 durch Natalizumab bei B-Zellen und hämatopoetischen Progenitorzellen weniger effektiv ist. Wie bereits erwähnt, wurde auf CD14⁺ Monozyten und CD19⁺ B-Zellen eine höhere Menge an CD49d als auf CD3⁺ T-Zellen festgestellt (Niino, Bodner et al. 2006). Sowohl CD19⁺ B-Zellen als auch CD34⁺ Progenitorzellen stehen aber im Verdacht, das latente JC-Virus zu

tragen und das reaktivierte Virus über die BHS in das ZNS zu transportieren, auch wenn sich hierfür bislang kein Beleg fand (Warnke 2011). Beim Fehlen von Gedächtnis-T-Zellen im Gehirn hat das fatale Auswirkungen für den Patienten. Nicht auszuschließen ist zudem, dass JCV-tragende CD34⁺ Progenitor- und CD19⁺ B-Zellen, die durch Natalizumab aus dem Knochenmark gelöst werden, das JCV im Blut freisetzen, wo es andere Zellen infiziert, die wiederum über die BHS migrieren können.

Welche allgemeinen Auswirkungen ein voraktiviertes Immunsystem in der Peripherie für den MS-Patienten hat, ist schwer einzuschätzen. Die durch Natalizumab-vermittelte permanente Erhöhung inflammatorischer Prozesse stellt eventuell den Ausgangspunkt für eine chronisch gesteigerte, persistierende Aktivierung des humanen Immunsystems dar. Dies könnte ähnlich wie bei chronischen Entzündungen zu einem immunologischen „Burnout“, einer erhöhten Apoptoserate bzw. einer verstärkten Seneszenz der T-Zellen führen und in einer Dysfunktion der Immunabwehr resultieren (Vallejo, Weyand et al. 2004; Kaszubowska 2008; Aoshiba and Nagai 2009). Hierdurch würde sich die mit zunehmender Therapiedauer erhöhte Prädisposition von Natalizumab-Patienten hinsichtlich opportunistischer Infektionen bzw. bestimmter Nebenwirkungen, wie Fieber, Müdigkeit, Glieder- und Gelenkschmerzen, erklären lassen. Weiterhin ist inzwischen bekannt, dass dauerhafte unspezifische Aktivierungen des Immunsystems, wie sie etwa durch Rauchen, Übergewicht u.ä. verursacht werden, zu chronisch-degenerativen Erkrankungen führen. Ob dies auch für eine Natalizumab-Therapie zutrifft, bei der kein Antigen geboten, also der TCR nicht aktiviert ist, sollte von den jeweiligen zusätzlichen Infektionen des Patienten abhängen. Zumindest wäre das Immunsystem Richtung Th1 und Th17 vorgeprägt und würde somit nicht immer „normal“ reagieren.

Der erhöhte Aktivierungsstatus des Immunsystems und die verstärkte Akkumulation von proinflammatorischen Effektorzellen im peripheren Blut kann auch direkt mit dem *Immune Reconstitution Inflammatory Syndrome* (IRIS) und auftretenden *Rebound*-Effekten bei Natalizumab-Entzug in Verbindung gebracht werden. Im Zuge einer PML-Infektion, also Reaktivierung des JC-Virus unter Natalizumab-Therapie, wird durch Anwendung eines Plasmaaustausches bzw. einer Immunadsorption Natalizumab aus dem Blutkreislauf des Patienten entfernt. Hierbei kommt es in den folgenden Tagen bis Wochen zu einer überschießenden Immunantwort (IRIS), was

ein präaktiviertes Immunsystem widerspiegeln kann (Clifford, De Luca et al. 2010). Spekulationen hinsichtlich auftretender *Rebound*-Effekte, die durch zügige CD49d-Reexpression einen verstärkten Einstrom aktivierter enzephalitogener Effektorzellen in das ZNS nach Beendigung einer Natalizumab-Therapie ermöglichen würde, werden hiermit begründet. Während in zwei kleineren Studien tatsächlich eine verstärkte Krankheitsaktivität mit erhöhter Schubrate nach dem Absetzen von Natalizumab nachgewiesen werden konnte (Tubridy, Behan et al. 1999), lieferten im Gegensatz hierzu andere Studien keinen Beweis für eine erhöhte Krankheitsaktivität nach Beendigung der Therapie (O'Connor, Goodman et al. 2004; Miller, Soon et al. 2007; Stuve, Cravens et al. 2009). Letzteres ist im Einklang mit dem Verlust von Oberflächen-VLA-4, der noch lange nach Absetzen von Natalizumab anhält.

Grundsätzlich scheint Natalizumab ein Therapeutikum zu sein, das neben der vorhergesagten Transmigrationsblockade von Leukozyten über die BHS weitere positive Auswirkungen wie vor allem den Verlust von VLA-4 auf Effektor- und Gedächtnis-T-Zellen besitzt. Die dadurch bedingte fehlende Immunüberwachung im Gehirn - verbunden mit der erhöhten Zahl proinflammatorischer peripherer T-Lymphozyten in der Peripherie - mag u.a. die Reinfektion mit dem JC-Virus begünstigen. Daher bieten die hier gewonnen Erkenntnisse über die Signal-gebende Wirkung von Natalizumab neue Einblicke, die dazu beitragen können, den Therapieverlauf mit Natalizumab für Patienten besser zu verstehen und demzufolge sicherer zu gestalten.

7. Literaturverzeichnis

- Abbott, N. (2002). "Astrocyte-endothelial interactions and blood-brain barrier permeability." *J Anat* **200**(5): 527.
- Abbott, N. J. (2004). "Evidence for bulk flow of brain interstitial fluid: significance for physiology and pathology." *Neurochem Int* **45**(4): 545-52.
- Abram, C. L. and C. A. Lowell (2009). "The ins and outs of leukocyte integrin signaling." *Annu Rev Immunol* **27**: 339-62.
- Acosta-Rodriguez, E. V., G. Napolitani, et al. (2007). "Interleukins 1beta and 6 but not transforming growth factor-beta are essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells." *Nat Immunol* **8**(9): 942-9.
- Allavena, P., C. Paganin, et al. (1991). "Molecules and structures involved in the adhesion of natural killer cells to vascular endothelium." *J Exp Med* **173**(2): 439-48.
- Aoshiba, K. and A. Nagai (2009). "Senescence hypothesis for the pathogenetic mechanism of chronic obstructive pulmonary disease." *Proc Am Thorac Soc* **6**(7): 596-601.
- Aramburu, J., F. Garcia-Cozar, et al. (1998). "Selective inhibition of NFAT activation by a peptide spanning the calcineurin targeting site of NFAT." *Mol Cell* **1**(5): 627-37.
- Aramburu, J., M. B. Yaffe, et al. (1999). "Affinity-driven peptide selection of an NFAT inhibitor more selective than cyclosporin A." *Science* **285**(5436): 2129-33.
- Arnaout, M. A., S. L. Goodman, et al. (2007). "Structure and mechanics of integrin-based cell adhesion." *Curr Opin Cell Biol* **19**(5): 495-507.
- Arnaout, M. A., B. Mahalingam, et al. (2005). "Integrin structure, allostery, and bidirectional signaling." *Annu Rev Cell Dev Biol* **21**: 381-410.
- Balashov, K. E., D. R. Smith, et al. (1997). "Increased interleukin 12 production in progressive multiple sclerosis: induction by activated CD4+ T cells via CD40 ligand." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(2): 599-603.
- Banwell, B., L. Krupp, et al. (2007). "Clinical features and viral serologies in children with multiple sclerosis: a multinational observational study." *Lancet Neurol* **6**(9): 773-81.
- Bartt, R. E. (2006). "Multiple sclerosis, natalizumab therapy, and progressive multifocal leukoencephalopathy." *Curr Opin Neurol* **19**(4): 341-9.
- Barau, M. A. (2000). "CD4(+)/CD45RO(+)/CD49d(high) cells are involved in the pathogenesis of relapsing-remitting multiple sclerosis." *J Neuroimmunol* **111**(1-2):215-23.
- Beadling, C. and K. A. Smith (1993). "Tactics for the isolation of interleukin-2-induced immediate-early genes." *Semin Immunol* **5**(5): 365-73.
- Beadling, C. and K. A. Smith (2002). "DNA array analysis of interleukin-2-regulated immediate/early genes." *Med Immunol* **1**(1): 2.
- Berlin, C., R. F. Bargatze, et al. (1995). "alpha 4 integrins mediate lymphocyte attachment and rolling under physiologic flow." *Cell* **80**(3): 413-22.
- Berridge, M., P. Lipp, et al. (1999). "Calcium signalling." *Curr Biol* **9**(5): R157-9.
- Berridge, M. J. (1997). "Lymphocyte activation in health and disease." *Crit Rev Immunol* **17**(2): 155-78.
- Bochner, B. S., F. W. Luscinskas, et al. (1991). "Adhesion of human basophils, eosinophils, and neutrophils to interleukin 1-activated human vascular endothelial cells: contributions of endothelial cell adhesion molecules." *J Exp Med* **173**(6): 1553-7.
- Boise, L. H., A. J. Minn, et al. "CD28 costimulation can promote T cell survival by enhancing the expression of Bcl-xL. *Immunity*. 1995. 3: 87-98." *J Immunol* **155**(7): 3788-99.
- Bonig, H., A. Wundes, et al. (2008). "Increased numbers of circulating hematopoietic stem/progenitor cells are chronically maintained in patients treated with the CD49d blocking antibody natalizumab." *Blood* **111**(7): 3439-41.
- Brakebusch, C. and R. Fassler (2003). "The integrin-actin connection, an eternal love affair." *Embo J* **22**(10): 2324-33.
- Bridges, L. C., D. Sheppard, et al. (2005). "ADAM disintegrin-like domain recognition by the lymphocyte integrins alpha4beta1 and alpha4beta7." *Biochem J* **387**(Pt 1): 101-8.
- Bridges, L. C., P. H. Tani, et al. (2002). "The lymphocyte metalloprotease MDC-L (ADAM 28) is a ligand for the integrin alpha4beta1." *J Biol Chem* **277**(5): 3784-92.
- Brocklehurst, K. W. and H. B. Pollard (1986). "Synergistic actions of Ca²⁺ and the phorbol ester TPA on K⁺-induced catecholamine release from bovine adrenal chromaffin cells." *Biochem Biophys Res Commun* **140**(3): 990-8.
- Brundula, V., N. B. Rewcastle, et al. (2002). "Targeting leukocyte MMPs and transmigration: minocycline as a potential therapy for multiple sclerosis." *Brain* **125**(Pt 6): 1297-308.

- Bystry, R. S., V. Aluvihare, et al. (2001). "B cells and professional APCs recruit regulatory T cells via CCL4." *Nat Immunol* **2**(12): 1126-32.
- Callahan, M. K., K. A. Williams, et al. (2004). "CXCR3 marks CD4+ memory T lymphocytes that are competent to migrate across a human brain microvascular endothelial cell layer." *J Neuroimmunol* **153**(1-2): 150-7.
- Carlos, T., N. Kovach, et al. (1991). "Human monocytes bind to two cytokine-induced adhesive ligands on cultured human endothelial cells: endothelial-leukocyte adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1." *Blood* **77**(10): 2266-71.
- Carr, M. W., R. Alon, et al. (1996). "The C-C chemokine MCP-1 differentially modulates the avidity of beta 1 and beta 2 integrins on T lymphocytes." *Immunity* **4**(2): 179-87.
- Chang, A., W. W. Tourtellotte, et al. (2002). "Premyelinating oligodendrocytes in chronic lesions of multiple sclerosis." *N Engl J Med* **346**(3): 165-73.
- Chen, L., J. N. Glover, et al. (1998). "Structure of the DNA-binding domains from NFAT, Fos and Jun bound specifically to DNA." *Nature* **392**(6671): 42-8.
- Cho, J. H., O. Boyman, et al. (2007). "An intense form of homeostatic proliferation of naive CD8+ cells driven by IL-2." *J Exp Med* **204**(8): 1787-801.
- Chou, Y. K., D. N. Bourdette, et al. (1992). "Frequency of T cells specific for myelin basic protein and myelin proteolipid protein in blood and cerebrospinal fluid in multiple sclerosis." *J Neuroimmunol* **38**(1-2): 105-13.
- Chow, C. W., M. Rincon, et al. (1999). "Requirement for transcription factor NFAT in interleukin-2 expression." *Mol Cell Biol* **19**(3): 2300-7.
- Clifford, D. B., A. De Luca, et al. (2010) "Natalizumab-associated progressive multifocal leukoencephalopathy in patients with multiple sclerosis: lessons from 28 cases." *Lancet Neurol* **9**(4): 438-46.
- Cragg, M. S., C. A. Walshe, et al. (2005). "The biology of CD20 and its potential as a target for mAb therapy." *Curr Dir Autoimmun* **8**: 140-74.
- Cunningham, S. A., M. P. Arrate, et al. (1997). "Interactions of FLT-1 and KDR with phospholipase C gamma: identification of the phosphotyrosine binding sites." *Biochem Biophys Res Commun* **240**(3): 635-9.
- de Boer, A. G. and P. J. Gaillard (2007). "Drug targeting to the brain." *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **47**: 323-55.
- Ferretti, S., O. Bonneau, et al. (2003). "IL-17, produced by lymphocytes and neutrophils, is necessary for lipopolysaccharide-induced airway neutrophilia: IL-15 as a possible trigger." *J Immunol* **170**(4): 2106-12.
- Fiuza, J. A., R. T. Fujiwara, et al. (2009). "Profile of central and effector memory T cells in the progression of chronic human chagas disease." *PLoS Negl Trop Dis* **3**(9): e512.
- Flechter, S., J. Vardi, et al. (2002). "Comparison of glatiramer acetate (Copaxone) and interferon beta-1b (Betaferon) in multiple sclerosis patients: an open-label 2-year follow-up." *J Neurol Sci* **197**(1-2): 51-5.
- Fleming, J. C., F. Bao, et al. "Anti-alpha4beta1 integrin antibody induces receptor internalization and does not impair the function of circulating neutrophilic leukocytes." *Inflamm Res* **59**(8): 647-57.
- Friedl, P., et al. (2005) " Tuning immune responses: diversity and adaptation of the immunological synapse" *Nat Rev Immunol*. Jul;**5**(7):532-45.
- Ghosh, S., S. B. Koralov, et al. "Hyperactivation of nuclear factor of activated T cells 1 (NFAT1) in T cells attenuates severity of murine autoimmune encephalomyelitis." *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**(34): 15169-74.
- Gillis, S. and K. A. Smith (1977). "Long term culture of tumour-specific cytotoxic T cells." *Nature* **268**(5616): 154-6.
- Gold, R., C. Lington, et al. (2006). "Understanding pathogenesis and therapy of multiple sclerosis via animal models: 70 years of merits and culprits in experimental autoimmune encephalomyelitis research." *Brain* **129**(Pt 8): 1953-71.
- Gottschalk, K. E. and H. Kessler (2004). "Evidence for hetero-association of transmembrane helices of integrins." *FEBS Lett* **557**(1-3): 253-8.
- Grabovsky, V., S. Feigelson, et al. (2000). "Subsecond induction of alpha4 integrin clustering by immobilized chemokines stimulates leukocyte tethering and rolling on endothelial vascular cell adhesion molecule 1 under flow conditions." *J Exp Med* **192**(4): 495-506.
- Graesser, D., S. Mahooti, et al. (2000). "Distinct roles for matrix metalloproteinase-2 and alpha4 integrin in autoimmune T cell extravasation and residency in brain parenchyma during experimental autoimmune encephalomyelitis." *J Neuroimmunol* **109**(2): 121-31.
- Grashoff, C., I. Thievessen, et al. (2004). "Integrin-linked kinase: integrin's mysterious partner." *Curr Opin Cell Biol* **16**(5): 565-71.

- Greter, M., F. L. Heppner, et al. (2005). "Dendritic cells permit immune invasion of the CNS in an animal model of multiple sclerosis." *Nat Med* **11**(3): 328-34.
- Guimond, M., A. G. Freud, et al. "In vivo role of Flt3 ligand and dendritic cells in NK cell homeostasis." *J Immunol* **184**(6): 2769-75.
- Hafler, D. A. and H. L. Weiner (1995). "Immunologic mechanisms and therapy in multiple sclerosis." *Immunol Rev* **144**: 75-107.
- Han, J., S. Liu, et al. (2001). "Phosphorylation of the integrin alpha 4 cytoplasmic domain regulates paxillin binding." *J Biol Chem* **276**(44): 40903-9.
- Han, X., G. D. Wilbanks, et al. (1999). "IL-2 enhances standard IFNgamma/LPS activation of macrophage cytotoxicity to human ovarian carcinoma in vitro: a potential for adoptive cellular immunotherapy." *Gynecol Oncol* **75**(2): 198-210.
- Harding, F. A., J. G. McArthur, et al. (1992). "CD28-mediated signalling co-stimulates murine T cells and prevents induction of anergy in T-cell clones." *Nature* **356**(6370): 607-9.
- Hartung, H. P., R. Gonsette, et al. (2002). "Mitoxantrone in progressive multiple sclerosis: a placebo-controlled, double-blind, randomised, multicentre trial." *Lancet* **360**(9350): 2018-25.
- Hemler, M. E. (1990). "VLA proteins in the integrin family: structures, functions, and their role on leukocytes." *Annu Rev Immunol* **8**: 365-400.
- Hernandez-Caselles, T., M. Martinez-Esparza, et al. (1996). "Specific regulation of VLA-4 and alpha 4 beta 7 integrin expression on human activated T lymphocytes." *J Immunol* **156**(10): 3668-77.
- Hohlfeld, R. and H. Wekerle (2005). "Drug insight: using monoclonal antibodies to treat multiple sclerosis." *Nat Clin Pract Neurol* **1**(1): 34-44.
- Holzmann, B. and I. L. Weissman (1989). "Peyer's patch-specific lymphocyte homing receptors consist of a VLA-4-like alpha chain associated with either of two integrin beta chains, one of which is novel." *Embo J* **8**(6): 1735-41.
- Honegger, P., J. M. Matthieu, et al. (1989). "Demyelination in brain cell aggregate cultures, induced by a monoclonal antibody against the myelin/oligodendrocyte glycoprotein (MOG)." *Schweiz Arch Neurol Psychiatr* **140**(1): 10-3.
- Horejsi, V. (2004). "Transmembrane adaptor proteins in membrane microdomains: important regulators of immunoreceptor signaling." *Immunol Lett* **92**(1-2): 43-9.
- Hughes, P. E., F. Diaz-Gonzalez, et al. (1996). "Breaking the integrin hinge. A defined structural constraint regulates integrin signaling." *J Biol Chem* **271**(12): 6571-4.
- Humphries, J. D., A. Byron, et al. (2006). "Integrin ligands at a glance." *J Cell Sci* **119**(Pt 19): 3901-3.
- Hynes, R. O. (1992). "Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion." *Cell* **69**(1): 11-25.
- Iwakura, Y. and H. Ishigame (2006). "The IL-23/IL-17 axis in inflammation." *J Clin Invest* **116**(5): 1218-22.
- Johnson, K. P., B. R. Brooks, et al. (2001). "Copolymer 1 reduces relapse rate and improves disability in relapsing-remitting multiple sclerosis: results of a phase III multicenter, double-blind, placebo-controlled trial. 1995." *Neurology* **57**(12 Suppl 5): S16-24.
- John, A. E., M. S. Thomas, et al. (2005). "Temporal production of CCL28 corresponds to eosinophil accumulation and airway hyperreactivity in allergic airway inflammation." *Am J Pathol* **166**(2): 345-53.
- Johnston, B. and P. Kubes (1999). "The alpha4-integrin: an alternative pathway for neutrophil recruitment?" *Immunol Today* **20**(12): 545-50.
- Karin, M., Z. Liu, et al. (1997). "AP-1 function and regulation." *Curr Opin Cell Biol* **9**(2): 240-6.
- Kaszubowska, L. (2008). "Telomere shortening and ageing of the immune system." *J Physiol Pharmacol* **59 Suppl 9**: 169-86.
- Kebir, H., I. Ifergan, et al. (2009). "Preferential recruitment of interferon-gamma-expressing TH17 cells in multiple sclerosis." *Ann Neurol* **66**(3): 390-402.
- Kebir, H., K. Kreymborg, et al. (2007). "Human TH17 lymphocytes promote blood-brain barrier disruption and central nervous system inflammation." *Nat Med* **13**(10): 1173-5.
- Keegan, B. M. and J. H. Noseworthy (2002). "Multiple sclerosis." *Annu Rev Med* **53**: 285-302.
- Khademi, M., L. Bornsen, et al. (2009). "The effects of natalizumab on inflammatory mediators in multiple sclerosis: prospects for treatment-sensitive biomarkers." *Eur J Neurol* **16**(4): 528-36.
- Khademi, M., D. Stol, et al. (2008). "Induction of systemic TNFalpha in natalizumab-treated multiple sclerosis." *Eur J Neurol* **15**(3): 309-12.
- Kim, M., C. V. Carman, et al. (2003). "Bidirectional transmembrane signaling by cytoplasmic domain separation in integrins." *Science* **301**(5640): 1720-5.
- Kim, T. K., M. J. Billard, et al. (2010). "Co-engagement of alpha(4)beta(1) integrin (VLA-4) and CD4 or CD8 is necessary to induce maximal Erk1/2 phosphorylation and cytokine production in human T cells." *Hum Immunol* **71**(1): 23-8.

- Kinashi, T. (2005). "Intracellular signalling controlling integrin activation in lymphocytes." *Nat Rev Immunol* **5**(7): 546-59.
- Kivisakk, P., B. C. Healy, et al. (2009). "Natalizumab treatment is associated with peripheral sequestration of proinflammatory T cells." *Neurology* **72**(22): 1922-30.
- Kivisakk, P., B. Tucky, et al. (2006). "Human cerebrospinal fluid contains CD4+ memory T cells expressing gut- or skin-specific trafficking determinants: relevance for immunotherapy." *BMC Immunol* **7**: 14.
- Kleinewietfeld, M. Starke, et al. (2008). "CD49d provides access to "untouched" human Foxp3+ Treg free of contaminating effector cells." *Blood* **113**(4):827-36.
- Koralnik, I. J. (2006). "Progressive multifocal leukoencephalopathy revisited: Has the disease outgrown its name?" *Ann Neurol* **60**(2): 162-73.
- Kunkel, E. J., C. H. Kim, et al. (2003). "CCR10 expression is a common feature of circulating and mucosal epithelial tissue IgA Ab-secreting cells." *J Clin Invest* **111**(7): 1001-10.
- Lammermann, T. and M. Sixt (2008). "The microanatomy of T-cell responses." *Immunol Rev* **221**: 26-43.
- Langer-Gould, A., S. W. Atlas, et al. (2005). "Progressive multifocal leukoencephalopathy in a patient treated with natalizumab." *N Engl J Med* **353**(4): 375-81.
- Lassmann, H. and R. M. Ransohoff (2004). "The CD4-Th1 model for multiple sclerosis: a critical [correction of crucial] re-appraisal." *Trends Immunol* **25**(3): 132-7.
- Laudanna, C., J. Y. Kim, et al. (2002). "Rapid leukocyte integrin activation by chemokines." *Immunol Rev* **186**: 37-46.
- Lee, K. H., A. D. Holdorf, et al. (2002). "T cell receptor signaling precedes immunological synapse formation." *Science* **295**(5559): 1539-42.
- Lee, S. J. and E. N. Benveniste (1999). "Adhesion molecule expression and regulation on cells of the central nervous system." *J Neuroimmunol* **98**(2): 77-88.
- Ley, K., C. Laudanna, et al. (2007). "Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated." *Nat Rev Immunol* **7**(9): 678-89.
- Lindberg, R. L., L. Achtnichts, et al. (2008). "Natalizumab alters transcriptional expression profiles of blood cell subpopulations of multiple sclerosis patients." *J Neuroimmunol* **194**(1-2): 153-64.
- Liu, S., D. A. Calderwood, et al. (2000). "Integrin cytoplasmic domain-binding proteins." *J Cell Sci* **113** (Pt 20): 3563-71.
- Liu, S., W. B. Kiosses, et al. (2002). "A fragment of paxillin binds the alpha 4 integrin cytoplasmic domain (tail) and selectively inhibits alpha 4-mediated cell migration." *J Biol Chem* **277**(23): 20887-94.
- Liu, X. K., X. Lin, et al. (2004). "Crucial role for nuclear factor of activated T cells in T cell receptor-mediated regulation of human interleukin-17." *J Biol Chem* **279**(50): 52762-71.
- Liu, Y., Z. Cseresnyes, et al. (2001). "Activity-dependent nuclear translocation and intranuclear distribution of NFATc in adult skeletal muscle fibers." *J Cell Biol* **155**(1): 27-39.
- Lobb, R. R. and M. E. Hemler (1994). "The pathophysiologic role of alpha 4 integrins in vivo." *J Clin Invest* **94**(5): 1722-8.
- Lublin, F. D. and S. C. Reingold (1996). "Defining the clinical course of multiple sclerosis: results of an international survey. National Multiple Sclerosis Society (USA) Advisory Committee on Clinical Trials of New Agents in Multiple Sclerosis." *Neurology* **46**(4): 907-11.
- Lucchinetti, C., W. Bruck, et al. (2001). "Multiple sclerosis: recent developments in neuropathology, pathogenesis, magnetic resonance imaging studies and treatment." *Curr Opin Neurol* **14**(3): 259-69.
- Luo, B. H., C. V. Carman, et al. (2005). "Disrupting integrin transmembrane domain heterodimerization increases ligand binding affinity, not valency or clustering." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(10): 3679-84.
- Luster, A. D., R. Alon, et al. (2005). "Immune cell migration in inflammation: present and future therapeutic targets." *Nat Immunol* **6**(12): 1182-90.
- Macian, F., C. Lopez-Rodriguez, et al. (2001). "Partners in transcription: NFAT and AP-1." *Oncogene* **20**(19): 2476-89.
- Mauri, D. N., R. Ebner, et al. (1998). "LIGHT, a new member of the TNF superfamily, and lymphotoxin alpha are ligands for herpesvirus entry mediator." *Immunity* **8**(1): 21-30.
- May, A. E., F. J. Neumann, et al. (2000). "VLA-4 (alpha(4)beta(1)) engagement defines a novel activation pathway for beta(2) integrin-dependent leukocyte adhesion involving the urokinase receptor." *Blood* **96**(2): 506-13.
- McDonald, W. I. and M. A. Ron (1999). "Multiple sclerosis: the disease and its manifestations." *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **354**(1390): 1615-22.
- McFarland, H. F. and R. Martin (2007). "Multiple sclerosis: a complicated picture of autoimmunity." *Nat Immunol* **8**(9): 913-9.

- McKenzie, B. S., R. A. Kastelein, et al. (2006). "Understanding the IL-23-IL-17 immune pathway." Trends Immunol **27**(1): 17-23.
- Meldolesi, J. and T. Pozzan (1998). "The endoplasmic reticulum Ca²⁺ store: a view from the lumen." Trends Biochem Sci **23**(1): 10-4.
- Miller, D. H., O. A. Khan, et al. (2003). "A controlled trial of natalizumab for relapsing multiple sclerosis." N Engl J Med **348**(1): 15-23.
- Miller, D. H., D. Soon, et al. (2007). "MRI outcomes in a placebo-controlled trial of natalizumab in relapsing MS." Neurology **68**(17): 1390-401.
- Miller, M. D. and M. S. Krangel (1992). "The human cytokine I-309 is a monocyte chemoattractant." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(7): 2950-4.
- Millonig, A., H. Hegen, et al. (2010) "Natalizumab treatment reduces endothelial activity in MS patients." J Neuroimmunol **227**(1-2): 190-4.
- Mittelbrunn, M., A. Molina, et al. (2004). "VLA-4 integrin concentrates at the peripheral supramolecular activation complex of the immune synapse and drives T helper 1 responses." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(30): 11058-63.
- Monks, C. R., B. A. Freiberg, et al. (1998). "Three-dimensional segregation of supramolecular activation clusters in T cells." Nature **395**(6697): 82-6.
- Morgan, D. A., F. W. Ruscetti, et al. (1976). "Selective in vitro growth of T lymphocytes from normal human bone marrows." Science **193**(4257): 1007-8.
- Mosmann, T. R., M. W. Bond, et al. (1986). "T-cell and mast cell lines respond to B-cell stimulatory factor 1." Proc Natl Acad Sci U S A **83**(15): 5654-8.
- Mountain, A. and J. R. Adair (1992). "Engineering antibodies for therapy." Biotechnol Genet Eng Rev **10**: 1-142.
- Mueller, M. R and A. Rao (2010). "NFAT, immunity and cancer: a transcription factor comes of age" Nat Rev Immunol. **10**(9):645-56.
- Munger, K. L., L. I. Levin, et al. (2006). "Serum 25-hydroxyvitamin D levels and risk of multiple sclerosis." Jama **296**(23): 2832-8.
- Muraro, P. A., T. Leist, et al. (2000). "VLA-4/CD49d downregulated on primed T lymphocytes during interferon-beta therapy in multiple sclerosis." J Neuroimmunol **111**(1-2): 186-94.
- Muraro, P. A., L. Liberati, et al. (2004). "Decreased integrin gene expression in patients with MS responding to interferon-beta treatment." J Neuroimmunol **150**(1-2): 123-31.
- Murphy, A. C., S. J. Lalor, et al. "Infiltration of Th1 and Th17 cells and activation of microglia in the CNS during the course of experimental autoimmune encephalomyelitis." Brain Behav Immun **24**(4): 641-51.
- Neal, J. W. and N. A. Clipstone (2001). "Glycogen synthase kinase-3 inhibits the DNA binding activity of NFATc." J Biol Chem **276**(5): 3666-73.
- Neuhaus, O., C. Farina, et al. (2001). "Mechanisms of action of glatiramer acetate in multiple sclerosis." Neurology **56**(6): 702-8.
- Neumann, F., F. Zohren, et al. (2009). "The role of natalizumab in hematopoietic stem cell mobilization." Expert Opin Biol Ther **9**(8): 1099-106.
- Niino, M., C. Bodner, et al. (2006). "Natalizumab effects on immune cell responses in multiple sclerosis." Ann Neurol **59**(5): 748-54.
- Noel, P. J., L. H. Boise, et al. (1996). "CD28 costimulation prevents cell death during primary T cell activation." J Immunol **157**(2): 636-42.
- Noseworthy, J. H. (1999). "Progress in determining the causes and treatment of multiple sclerosis." Nature **399**(6738 Suppl): A40-7.
- O'Connor, P. W., A. Goodman, et al. (2004). "Randomized multicenter trial of natalizumab in acute MS relapses: clinical and MRI effects." Neurology **62**(11): 2038-43.
- Okamura, H., J. Aramburu, et al. (2000). "Concerted dephosphorylation of the transcription factor NFAT1 induces a conformational switch that regulates transcriptional activity." Mol Cell **6**(3): 539-50.
- Okkenhaug, K. and R. Rottapel (1998). "Grb2 forms an inducible protein complex with CD28 through a Src homology 3 domain-proline interaction." J Biol Chem **273**(33): 21194-202.
- Oostendorp, R. A. and P. Dormer (1997). "VLA-4-mediated interactions between normal human hematopoietic progenitors and stromal cells." Leuk Lymphoma **24**(5-6): 423-35.
- Ouyang, W., J. K. Kolls, et al. (2008). "The biological functions of T helper 17 cell effector cytokines in inflammation." Immunity **28**(4): 454-67.
- Padgett, B. L., D. L. Walker, et al. (1976). "JC Papovavirus in progressive multifocal leukoencephalopathy." J Infect Dis **133**(6): 686-90.
- Pardridge, W. M. (2007). "Blood-brain barrier delivery." Drug Discov Today **12**(1-2): 54-61.
- Parrish-Novak, J., D. C. Foster, et al. (2002). "Interleukin-21 and the IL-21 receptor: novel effectors of NK and T cell responses." J Leukoc Biol **72**(5): 856-63.

- Perez-Villar, J. J., G. S. Whitney, et al. (2002). "Phosphorylation of the linker for activation of T-cells by Itk promotes recruitment of Vav." *Biochemistry* **41**(34): 10732-40.
- Perry, V. H. and D. C. Anthony (1999). "Axon damage and repair in multiple sclerosis." *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **354**(1390): 1641-7.
- Polman, C. H., P. W. O'Connor, et al. (2006). "A randomized, placebo-controlled trial of natalizumab for relapsing multiple sclerosis." *N Engl J Med* **354**(9): 899-910.
- Porter, C. M., M. A. Havens, et al. (2000). "Identification of amino acid residues and protein kinases involved in the regulation of NFATc subcellular localization." *J Biol Chem* **275**(5): 3543-51.
- Putzki, N., M. K. Baranwal, et al. "Effects of natalizumab on circulating B cells, T regulatory cells and natural killer cells." *Eur Neurol* **63**(5): 311-7.
- Qin, S., J. B. Rottman, et al. (1998). "The chemokine receptors CXCR3 and CCR5 mark subsets of T cells associated with certain inflammatory reactions." *J Clin Invest* **101**(4): 746-54.
- Radvanyi, L. G., Y. Shi, et al. (1996). "CD28 costimulation inhibits TCR-induced apoptosis during a primary T cell response." *J Immunol* **156**(5): 1788-98.
- Ransohoff, R. M., P. Kivisakk, et al. (2003). "Three or more routes for leukocyte migration into the central nervous system." *Nat Rev Immunol* **3**(7): 569-81.
- Rice, G. P., H. P. Hartung, et al. (2005). "Anti-alpha4 integrin therapy for multiple sclerosis: mechanisms and rationale." *Neurology* **64**(8): 1336-42.
- Rodriguez, M. W., A. C. Paquet, et al. (2004). "Differential gene expression by integrin beta 7+ and beta 7- memory T helper cells." *BMC Immunol* **5**: 13.
- Rose, D. M. (2006). "The role of the alpha4 integrin-paxillin interaction in regulating leukocyte trafficking." *Exp Mol Med* **38**(3): 191-5.
- Rudick, R. A., W. H. Stuart, et al. (2006). "Natalizumab plus interferon beta-1a for relapsing multiple sclerosis." *N Engl J Med* **354**(9): 911-23.
- Ruoslahti, E. (1996). "RGD and other recognition sequences for integrins." *Annu Rev Cell Dev Biol* **12**: 697-715.
- Sakaguchi, S., N. Sakaguchi, et al. (1995). "Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases." *J Immunol* **155**(3): 1151-64.
- Sanjabi, S., L. A. Zenewicz, et al. (2009). "Anti-inflammatory and pro-inflammatory roles of TGF-beta, IL-10, and IL-22 in immunity and autoimmunity." *Curr Opin Pharmacol* **9**(4): 447-53.
- Sato, T., K. Tachibana, et al. (1995). "Role of the VLA-4 molecule in T cell costimulation. Identification of the tyrosine phosphorylation pattern induced by the ligation of VLA-4." *J Immunol* **155**(6): 2938-47.
- Schoenborn, J. R. and C. B. Wilson (2007). "Regulation of interferon-gamma during innate and adaptive immune responses." *Adv Immunol* **96**: 41-101.
- Schroder, K., P. J. Hertzog, et al. (2004). "Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions." *J Leukoc Biol* **75**(2): 163-89.
- Serfling, E., F. Berberich-Siebelt, et al. (2000). "The role of NF-AT transcription factors in T cell activation and differentiation." *Biochim Biophys Acta* **1498**(1): 1-18.
- Shapiro, V. S., K. E. Truitt, et al. (1997). "CD28 mediates transcriptional upregulation of the interleukin-2 (IL-2) promoter through a composite element containing the CD28RE and NF-IL-2B AP-1 sites." *Mol Cell Biol* **17**(7): 4051-8.
- Shaw, K. T., A. M. Ho, et al. (1995). "Immunosuppressive drugs prevent a rapid dephosphorylation of transcription factor NFAT1 in stimulated immune cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(24): 11205-9.
- Sheta, E. A., M. A. Harding, et al. (2000). "Focal adhesion kinase, Rap1, and transcriptional induction of vascular endothelial growth factor." *J Natl Cancer Inst* **92**(13): 1065-73.
- Shimaoka, M., J. Takagi, et al. (2002). "Conformational regulation of integrin structure and function." *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **31**: 485-516.
- Shin, H. C., N. Benbernou, et al. (1999). "Expression of IL-17 in human memory CD45RO+ T lymphocytes and its regulation by protein kinase A pathway." *Cytokine* **11**(4): 257-66.
- Sixt, M., B. Engelhardt, et al. (2001). "Endothelial cell laminin isoforms, laminins 8 and 10, play decisive roles in T cell recruitment across the blood-brain barrier in experimental autoimmune encephalomyelitis." *J Cell Biol* **153**(5): 933-46.
- Smit, M. J., P. Verdijk, et al. (2003). "CXCR3-mediated chemotaxis of human T cells is regulated by a Gi- and phospholipase C-dependent pathway and not via activation of MEK/p44/p42 MAPK nor Akt/PI-3 kinase." *Blood* **102**(6): 1959-65.
- Steinman, L. (1996). "Multiple sclerosis: a coordinated immunological attack against myelin in the central nervous system." *Cell* **85**(3): 299-302.
- Stern, J. B. and K. A. Smith (1986). "Interleukin-2 induction of T-cell G1 progression and c-myc expression." *Science* **233**(4760): 203-6.

- Stockinger, B. and M. Veldhoen (2007). "Differentiation and function of Th17 T cells." Curr Opin Immunol **19**(3): 281-6.
- Stuve, O., P. D. Cravens, et al. (2009). "Immunologic, clinical, and radiologic status 14 months after cessation of natalizumab therapy." Neurology **72**(5): 396-401.
- Stuve, O., C. M. Marra, et al. (2006). "Altered CD4+/CD8+ T-cell ratios in cerebrospinal fluid of natalizumab-treated patients with multiple sclerosis." Arch Neurol **63**(10): 1383-7.
- Stuve, O., C. M. Marra, et al. (2006). "Immune surveillance in multiple sclerosis patients treated with natalizumab." Ann Neurol **59**(5): 743-7.
- Takagi, J. and T. A. Springer (2002). "Integrin activation and structural rearrangement." Immunol Rev **186**: 141-63.
- Thornton, A. M., E. E. Donovan, et al. (2004). "Cutting edge: IL-2 is critically required for the in vitro activation of CD4+CD25+ T cell suppressor function." J Immunol **172**(11): 6519-23.
- Thornton, A. M. and E. M. Shevach (1998). "CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production." J Exp Med **188**(2): 287-96.
- Tolosano, E. and F. Altruda (2002). "Hemopexin: structure, function, and regulation." DNA Cell Biol **21**(4): 297-306.
- Trapp, B. D., J. Peterson, et al. (1998). "Axonal transection in the lesions of multiple sclerosis." N Engl J Med **338**(5): 278-85.
- Tubridy, N., P. O. Behan, et al. (1999). "The effect of anti-alpha4 integrin antibody on brain lesion activity in MS. The UK Antegren Study Group." Neurology **53**(3): 466-72.
- Udagawa, T. and B. W. McIntyre (1992). "A VLA-4 alpha-chain specific monoclonal antibody enhances CD3-induced IL-2/IL-2 receptor-dependent T-cell proliferation." Lymphokine Cytokine Res **11**(5): 193-9.
- Udagawa, T., D. G. Woodside, et al. (1996). "Alpha 4 beta 1 (CD49d/CD29) integrin costimulation of human T cells enhances transcription factor and cytokine induction in the absence of altered sensitivity to anti-CD3 stimulation." J Immunol **157**(5): 1965-72.
- Vallejo, A. N., C. M. Weyand, et al. (2004). "T-cell senescence: a culprit of immune abnormalities in chronic inflammation and persistent infection." Trends Mol Med **10**(3): 119-24.
- Van Assche, G., M. Van Ranst, et al. (2005). "Progressive multifocal leukoencephalopathy after natalizumab therapy for Crohn's disease." N Engl J Med **353**(4): 362-8.
- Waldmann, T. A. (2006). "The biology of interleukin-2 and interleukin-15: implications for cancer therapy and vaccine design." Nat Rev Immunol **6**(8): 595-601.
- Wang, Y., W. Fu, et al. (2010) "Common polymorphisms in ITGA2, PON1 and THBS2 are associated with coronary atherosclerosis in a candidate gene association study of the Chinese Han population." J Hum Genet **55**(8): 490-4.
- Warnke, C. "CD34+ progenitor cells mobilized by natalizumab are not a relevant reservoir for JC virus." Mult Scler **2011**, **17**:151.
- Weber, T., C. Trebst, et al. (1997). "Analysis of the systemic and intrathecal humoral immune response in progressive multifocal leukoencephalopathy." J Infect Dis **176**(1): 250-4.
- Weiss, A., B. Manger, et al. (1986). "Synergy between the T3/antigen receptor complex and Tp44 in the activation of human T cells." J Immunol **137**(3): 819-25.
- Wiesner, S., K. R. Legate, et al. (2005). "Integrin-actin interactions." Cell Mol Life Sci **62**(10): 1081-99.
- Yang, L., D. E. Anderson, et al. (2008). "IL-21 and TGF-beta are required for differentiation of human T(H)17 cells." Nature **454**(7202): 350-2.
- Yao, Z., S. L. Painter, et al. (1995). "Human IL-17: a novel cytokine derived from T cells." J Immunol **155**(12): 5483-6.
- Yoshida, T., T. Imai, et al. (1998). "Identification of single C motif-1/lymphotactin receptor XCR1." J Biol Chem **273**(26): 16551-4.
- Zhang, J., S. Markovic-Plese, et al. (1994). "Increased frequency of interleukin 2-responsive T cells specific for myelin basic protein and proteolipid protein in peripheral blood and cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis." J Exp Med **179**(3): 973-84.
- Zhang, W., R. P. Tribble, et al. (1998). "LAT palmitoylation: its essential role in membrane microdomain targeting and tyrosine phosphorylation during T cell activation." Immunity **9**(2): 239-46.
- Zhu, J. and W. E. Paul (2010) "Heterogeneity and plasticity of T helper cells." Cell Res **20**(1): 4-12.

8. Abkürzungsverzeichnis

AP-1	<i>Activator protein-1</i>
APC	Allophycocyanin
APCs	<i>Antigen presenting cells</i>
AS	Aminosäure
B2M	β 2-Microglobulin
BHS	Blut-Hirn-Schranke
CBA	<i>Cytometric bead array</i>
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CD29	β 1-Integrin
CD49d	α 4-Integrin
CSF	Cerebrospinalflüssigkeit
DC	<i>Dendritic cell</i>
ECM	<i>Extracellular matrix</i>
ED	<i>Encephalomyelitis disseminata</i>
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>
ERK	<i>Extracellular signal-regulated kinase</i>
FACS	<i>Fluorescence activated cell sorting</i>
FAK	<i>Focal adhesion kinase</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
Fn	Fibronectin
FOXP3	<i>Forkhead box P3</i>
FCS	<i>Fetal calf serum</i>
FSC	<i>Forward scatter</i>
GSEA	<i>Gene set enrichment analysis</i>
HSC	<i>Hematopoietic stem cell</i>
ICAM	<i>Inter cellular adhesion molecule</i>
IgG4	Immunglobulin G4
IFN γ	Interferon Gamma
IL2	Interleukin-2
IL17	Interleukin-17
IL21	Interleukin-21
JCV	JC-Virus

JNK	<i>Mitogen-activated protein kinase 8</i>
kDa	Kilodalton
LFA-1	<i>Lymphocyte function-associated antigen 1</i>
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>
MAdCAM-1	<i>Mucosal addressin cell adhesion molecule-1</i>
MAPK	<i>Mitogen activated protein kinase</i>
MS	Multiple Sklerose
NTP	<i>Nucleoside triphosphate</i>
NFAT	<i>Nuclear factor of activated T-cells</i>
NF- κ B	<i>Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
PBMC	<i>Peripheral blood mononuclear cell</i>
PE	Phycoerythrin
PML	Progressive multifokale Leukenzephalopathie
PPMS	Primär-progrediente MS
qRT-PCR	<i>Quantitative real-time-polymerase chain reaction</i>
RGE	relative Genexpression
RORC	<i>RAR-related orphan receptor C</i>
RRMS	Schubförmig-remittierende MS
RT	Reverse Transkriptase
SEB	Staphylokokken-Enterotoxin-B
SMAC	<i>Supramolecular activation complex</i>
SPMS	Sekundär-progrediente MS
SSC	<i>Side scatter</i>
TBX21	<i>T-Box 21</i>
TCR	<i>T cell receptor</i>
Th1	Typ 1 T-Helferzellen
Th2	Typ 2 T-Helferzellen
Th17	Typ 17 T-Helferzellen
TPA	12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate
Tregs	Regulatorische T-Zellen
VCAM-1	<i>Vascular cell adhesion molecule 1</i>
VLA-4	<i>Very late antigen 4</i>
ZNS	Zentrales Nervensystem

9. Publikationen

Im Rahmen dieser Dissertation wurde folgende Publikation erzielt:

Thomas F. Benkert, Elena M. Hartmann, Ellen Leich, Andreas Rosenwald, Edgar Serfling, Mathias Buttman, Friederike Berberich-Siebelt. **Natalizumab exerts direct signaling capacity in patients with multiple sclerosis** (Manuskript zur Publikation eingereicht bei *Annals of Neurology*).

10. Verfassererklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Diese Arbeit wurde in gleicher oder ähnlicher Form noch zu keinem anderen Prüfungsverfahren vorgelegt.

Ich erkläre, dass ich bisher keine akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht habe.

Würzburg, 04.07.2011

Thomas Benkert