

Die Bedeutung der N-Glykosylierung von T-Zell
Populationen in der Experimentellen Autoimmunen
Enzephalomyelitis

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

Mörike, Johannes

2015

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

Inhaltsverzeichnis

1	Abkürzungen.....	6
2	Einleitung.....	7
2.1	Ätiologie und Pathogenese	7
2.2	Das Immunsystem.....	9
2.2.1	Angeborenes Immunsystem	10
2.2.2	Erworbenes Immunsystem	10
2.3	Zelltypen in der MS und EAE	12
2.3.1	B-Zellen	12
2.3.2	CD8 ⁺ -Zellen	13
2.3.3	Dendritische Zellen	13
2.3.4	CD4 ⁺ -Zellen	14
2.3.5	Th1-Zellen	15
2.3.6	Th2-Zellen	16
2.3.7	Th17-Zellen	16
2.3.8	Regulatorische T-Zellen.....	17
2.4	Tiermodelle der MS	18
2.5	PHA-L und Glykosylierung	20
3	Fragestellung	21
4	Material und Methoden	21
4.1	Material	21
4.1.1	Verwendete Antikörper	21
4.1.2	Lectin	23
4.1.3	Verwendete Chemikalien.....	23
4.1.4	Laborgeräte	25
4.1.5	Einwegmaterialien	26

4.1.6	Verwendete Lösungen / Medien	27
4.1.7	Versuchstiere.....	28
4.1.8	Software	28
4.2	Immunisierung der Mäuse.....	28
4.2.1	Herstellung der Peptid-Wasser-in-Öl-Emulsion	28
4.2.2	Induktion der EAE an der Maus.....	29
4.2.3	Krankheitsscore.....	29
4.2.4	Milz- /Lymphknotenentnahme.....	29
4.3	Lymphozytenisolation aus Milz/Lymphknoten	30
4.4	Zellzahlbestimmung	30
4.5	Aktivierung von T-Lymphozyten in vitro.....	31
4.6	Hemmung der alpha-1,2-Mannosidase	31
4.7	Isolation von CD4 ⁺ CD25 ⁺ -Zellen regulatorischen T-Zellen mittels Magnetseparation (MACS).....	31
4.8	Proliferationsassay.....	32
4.9	Markieren von Zellen mit Fluoreszenzgekoppelten-Antikörpern.....	33
4.10	Messung mit dem Durchflusszytometer	34
4.11	Auswertung und Statistik.....	35
5	Ergebnisse.....	36
5.1	N-Glykosylierung muriner Immunzellen in Milz und Lymphknoten	36
5.1.1	N-Glykosylierung auf Immunzellen der Milz.....	36
5.1.2	N-Glykosylierung auf Immunzellen der Lymphknoten.....	38
5.1.3	Die Die Intensität der N-Oberflächenglykosylierung auf Immunzellen unterscheidet sich zwischen Milz und Lymphknoten aus naiven Tieren	40
5.2	N-Glykosylierung verschiedener T Helfer Subpopulationen	43

5.2.1	Die N-Oberflächenglykosylierung ist auf CD4 ⁺ FoxP3 ⁻ - Zellen geringer ausgeprägt als auf CD4 ⁺ FoxP3 ⁺ -Zellen	43
5.2.2	Die Intensität der N-Oberflächenglykosylierung auf naiven T-Zellen unterscheidet sich nach T-Zell-Subtyp.....	45
5.3	N-Glykosylierung verschiedener Subpopulationen dendritischer Zellen	48
5.4	Verlauf der PLP139-151 induzierten EAE in SJL-Mäusen	49
5.5	Änderung der N-Glykosylierung der Immunzellen während der Entstehung und im Verlauf der PLP139-151-induzierten EAE	51
5.6	Kifunensin hemmt die N-Glykosylierung regulatorischer T Zellen	53
5.7	Regulatorische T Zellen mit verminderter N-Glykosylierung haben eine reduzierte Fähigkeit zur Hemmung der Proliferation von Effektor T Lymphozyten.....	54
6	Diskussion	55
6.1	Ausblick.....	62
7	Zusammenfassung	63
8	Abbildungsverzeichnis	65
9	Tabellenverzeichnis	66
10	Literaturverzeichnis.....	67
11	Danksagung.....	79

1 Abkürzungen

APC	Allophycocyanin
CD	Cluster of differentiation
CFSE	Carboxyfluoresceinsuccinimidylester
DMSO	Dimethylsulfoxid
EAE	Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FCS	Fetal Calf Serum
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
FoxP3	Forkhead Box Protein 3
FSC	Foward scatter
GlcNAc	N-Acetylglukosamin
Ifn	Interferon
iGnT	β 1,3GlcNAc transferase
Il	Interleukin
IMDM	Iscove's Modified Dulbeco's Medium
Kif	Kifunensin
MACS	Magnetic activated cell sorting
MFI	Mean-Fluorescence-Intensity
Mgat	Monoacylglycerol-Acyltransferase
MHC	Major Histocompatibility Complex
MRT	Magnet-Resonanz-Tomographie
PBS	Phosphate buffered saline
PE	R-phycoerythrin
PLP	Proteolipid-Protein
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PPMS	Primär progressive MS
PTx	Pertussis-Toxin
rpm	Revolutions per minute
RRMS	Relapsing Remitting MS

SPMS	Sekundär progressive MS
SSC	Sideward scatter
TCR	T-Cell-Receptor
ZNS	Zentrales Nervensystem
APZ	Antigen präsentierende Zelle

2 Einleitung

Multiple Sklerose (MS) ist eine entzündliche, demyelinisierende Erkrankung des zentralen Nervensystems (ZNS) [1]. Mit einer Prävalenz von 30-80 pro 100.000 Einwohner in Mitteleuropa ist sie einer der häufigsten neurologischen Erkrankungen. Sie tritt bei Männern und Frauen im Verhältnis 1:1,5-2 besonders zwischen dem 20.-40. Lebensjahr erstmalig auf [1, 2]. Die Diagnose wird anhand der McDonald-Kriterien gestellt [3]. Dabei kann sie klinisch gestellt werden, wobei der Einsatz bildgebender Diagnostik zur Diagnosesicherung und -ergänzung häufiger wird [3]. Eine MS-Erkrankung gilt als gesichert, wenn eine entzündliche Erkrankung des ZNS nachgewiesen wird, die verschiedene Lokalisationen des ZNS betrifft und zu mindestens 2 verschiedenen Zeitpunkten aktiv ist (zeitliche und örtliche Dissemination). Andere Ursachen für die Beschwerden des Patienten müssen zuvor ausgeschlossen werden. Hier kann eine Liquoruntersuchung zusätzliche Informationen liefern [4].

Man unterscheidet 3 Verlaufsformen der MS [5, 6]. Am häufigsten (ca. 85% der Betroffenen) ist der schubförmige Verlauf (Relapsing Remitting MS; RRMS) mit einer kompletten klinischen Remission zwischen den Schüben, welcher in 50% der Fälle in eine sekundär progrediente Verlaufsform übergeht (SPMS). Bei der sekundär progredienten MS kommt es zwischen den Schüben zu einer langsamen Zunahme der Beschwerden. 10-15% der Patienten weisen keine Schübe auf, sondern zeigen von Beginn an einen langsam fortschreitenden Verlauf. Diese Verlaufsform wird primär progrediente MS (PPMS) genannt.

2.1 Ätiologie und Pathogenese

Die Ätiologie der MS ist trotz intensiver Forschungsarbeiten nach wie vor ungeklärt. Eine Kombination aus genetischer Veranlagung und dem Einfluss

von Umweltfaktoren wird vermutet. In einem groß angelegten genetischen Screening von Patienten, ihren Eltern sowie gesunden Kontrollen, konnten bestimmte Risikoallele für eine MS-Erkrankung identifiziert werden [7]. Besondere Aufmerksamkeit kommt dabei den Gensequenzen für das Major-Histocompatibility-Complex-(MHC)-Molekül zu [7, 8]. Allerdings erscheint am ehesten ein polygenetischer Einfluss auf die Empfänglichkeit für die MS-Erkrankung wahrscheinlich [9]. In neueren Untersuchungen (Genome-wide association studies) aus 2010-2012 konnten 124 assoziierte Gene identifiziert werden [10, 11]. Auch in epigenetische Untersuchungen konnten bisher keine eindeutigen Risikokonstellationen identifiziert werden [12].

Da die geographische Prävalenz und Inzidenz der Erkrankung mit dem Abstand zum Äquator zunimmt, wurde bei der Untersuchung möglicher MS-begünstigender Umweltfaktoren ein Schwerpunkt auf die Exposition gegenüber UV-Strahlung gelegt. Eine höhere Exposition scheint dabei protektiv zu sein [13, 14]. Diskutiert wird in diesem Kontext derzeit auch eine protektive Rolle des Vitamin D, dessen Blutspiegel bei MS-Patienten niedriger sind [14, 15].

Neurodegenerative Prozesse, wie mitochondriale Dysfunktion oder der Verlust von Axonen spielen vor allem in fortgeschrittenen Erkrankungsstadien eine große Rolle und erklären den Grad der erkrankungsbedingten Behinderung oftmals besser, als Anzahl und Lokalisation der Läsionen [16, 17]. In älteren Läsionen finden sich dabei aktive neurodegenerative Prozesse auch ohne umgebende Entzündung [18]. Am MS-typisch geschädigten Myelin mancher erkrankter Personen fehlen entzündliche Prozesse sogar ganz [19], weshalb manche Arbeitsgruppen den Untergang von Hirngewebe als primäres pathologisches Ereignis in der Entstehung der MS noch vor der Inflammation betrachten [20]. Vor kurzem konnte jedoch im Mausmodell gezeigt werden, dass zumindest der primäre Untergang myelinbildender Zellen und die damit verbundene Triggerung des Immunsystems mit ZNS-Antigenen wahrscheinlich nicht ursächlich für die Entstehung der Autoimmunität sind [21]. Dennoch ist vor allem im Stadium der irreversiblen neuronalen Schädigung die zentrale Rolle

neurodegenerativer Prozesse unumstritten und wird zunehmend auch als therapeutischer Ansatz gesehen [22-24].

Sucht man die primäre Ursache der Erkrankung im Immunsystem, wird vor allem nach dem Antigen oder den Antigenen geforscht, gegen die sich die Immunantwort richtet und wie diese ZNS- bzw. ZNS-ähnlichen Antigene mit dem Immunsystem in Kontakt kommen.

Neben dem oben genannten primären Untergang von ZNS-Gewebe wird ein molekulares Mimikri z.B. nach einer Virusinfektion etwa mit Epstein-Barr-Virus diskutiert [25, 26]. Die Suche nach Zielantigenen ist Gegenstand intensiver Forschungsarbeiten [27]. Während manche Gruppen vorrangig die Immunantwort auf bekannte ZNS-Antigene wie z.B. dem Myelin Oligodendrocyte Protein (MOG) oder Myelin-basischen Protein (MBP) untersuchen [28], versuchen andere Forscher die Antigenrezeptoren auf Abwehrzellen zu identifizieren, auf eine mögliche Bedeutung für die MS-Erkrankung hin zu untersuchen und so auf das verursachende Antigen zu stoßen[29].

Ein anderer Ansatz geht von einer Störung der Selbsttoleranzmechanismen des Immunsystems aus, bei welcher physiologisch auftretende, autoreaktive Zellen den Mechanismen zur Entwicklung und Aufrechterhaltung Toleranz entgehen [30].

2.2 Das Immunsystem

Das Immunsystem hat die Aufgabe, den Organismus vor schädlichen Einflüssen sowohl von außen als auch von innen zu schützen. Es soll dabei sowohl „Fremdkörper“ wie Bakterien, Viren oder Toxine beseitigen, als auch bei Bedarf körpereigene, für den Gesamtorganismus schädliche Stoffe/Zellen, wie z.B. entartete oder gealterte Zellen. Das Immunsystem muss deshalb nicht nur in der Lage sein, körpereigen von körperfremd zu unterscheiden, sondern auch „körpereigen und für den Gesamtorganismus unschädlich“ von „körpereigen, aber schädlich“. Ist die Antwort des Immunsystems auf schädliche Einflüsse

gestört, drohen beispielsweise vermehrte, ernste Infektionserkrankungen oder Neoplasien. Ist auf der anderen Seite das Immunsystem eher hyperreagibel bzw. weist es eine gestörte Toleranz gegen körpereigene Komponenten auf, entstehen Allergien bzw. Autoimmunerkrankungen [31].

Das Immunsystem muss unterschieden werden in ein angeborenes, unspezifisches und ein erworbenes bzw. spezifisches Immunsystem, welches im Gegensatz zum angeborenen über ein immunologisches Gedächtnis verfügt. Unterteilt wird es ferner in eine humorale und eine zelluläre Abwehr.

2.2.1 Angeborenes Immunsystem

Die zellulären Komponenten des angeborenen Immunsystems sind Mastzellen, Makrophagen, Monozyten, Granulozyten und natürliche Killerzellen. Letztere entwickeln sich zwar aus der lymphozytären Zelllinie, tragen aber keine antigenspezifischen Rezeptoren, sodass sie zum unspezifischen Immunsystem gezählt werden.

Die humoralen Komponenten des angeborenen Immunsystems sind unter anderem Akute-Phase-Proteine, das Komplement-System und bestimmte Zytokine. Vor allem letzteren obliegt die Allgemeinreaktion, wie z.B. Fieberinduktion auf ein immunologisch relevantes Ereignis wie z.B. eine Infektion. Das Komplement-System opsoniert unter anderem z.B. Bakterien gegenüber Phagozyten und natürlichen Killerzellen und ist zur Bildung eines Membranangriffskomplexes in der Lage, über welchen pathologische Zellen lysiert werden können.

Unabhängig von diesen beiden Komponenten werden zum unspezifischen Immunsystem auch physikalische und chemische Abwehrmechanismen des Körpers gerechnet, wie etwa die Haut und deren chemische Abwehr [31].

2.2.2 Erworbenes Immunsystem

Die zelluläre Komponente des erworbenen Immunsystems wird von den B- und T-Zellen getragen, während zur humoralen Komponente die Antikörper (IgA, IgD, IgE, IgG, IgM) sowie weitere Zytokine gezählt werden. Diese Komponenten des Immunsystems können Abwehrreaktionen gegen spezifische

Oberflächenstrukturen von Erregern hervorrufen und sind in der Lage, bei wiederholtem Kontakt mit einem Erreger schnellere und effektivere Abwehrreaktionen in Gang zu setzen (immunologisches Gedächtnis). Die Reifung und Aktivierung insbesondere der T-Lymphozyten spielen für die MS eine zentrale Rolle [32].

Funktionelle, antigenspezifische T-Lymphozyten entwickeln sich im Thymus. Der Antigenrezeptor wird als T-Zell-Rezeptor (TCR) bezeichnet. Er besteht entweder aus $\alpha\beta$ - oder $\gamma\delta$ -Ketten. Erstere erkennen ihre Antigene nur dann, wenn sie über MHC-Moleküle präsentiert werden. Letztere können vor allem auch kleine Nichtpeptidantigene direkt erkennen. Die TCR-Vielfalt kommt durch Rearrangement diverser Gensegmente während des Reifungsprozesses zustande. Im Thymus werden die T-Zellen eliminiert, deren TCR entweder keine der mittels MHC-Molekülen präsentierten Peptidantigene erkennt oder aber zu stark an MHC-Moleküle mit körpereigenen Peptiden bindet. Das Aussortieren dieser Zellen wird als negative Selektion bezeichnet [31].

Autoreaktive T-Zellen, die diesem Prozess der zentralen T-Zelltoleranzentwicklung entgangen sind, werden in der Peripherie in physiologischem Milieu durch Mechanismen der peripheren Toleranz daran gehindert Schäden anzurichten [30].

Beispielsweise werden T-Zellen durch das Fehlen kostimulierender Signale in einen Zustand der Anergie versetzt, aus dem sie nicht mehr reaktiviert werden können [33]. Ferner supprimieren regulatorische T-Zellen die Proliferation und Differenzierung autoreaktiver T-Effektorzellen [34].

Eine naive T-Zelle benötigt vor allem 2 Signale zur Aktivierung [31]:

1. Aktivierung ihres T-Zell-Rezeptors (TCR) durch ein spezifisches Antigen, dass ihr über ein MHC-Molekül der Antigen-präsentierenden Zelle (APZ) präsentiert wird
2. Kostimulation über CD28 durch das ebenfalls auf der APZ exprimierte CD80/CD86.

Nach erfolgreicher Aktivierung erfolgt die klonale Expansion bzw. bei CD4⁺-T-Zellen je nach vorherrschendem Zytokinmilieu eine weitere Ausdifferenzierung in die verschiedenen T-Helferzell-Gruppen [35].

Derzeit wird in vielen Arbeitsgruppen davon ausgegangen, dass der Th17-Subtyp dieser aktivierten T-Zellen die Blut-Hirn-Schranke durchdringt und für weitere Immunzellen durchlässig macht. Diese sind dann verantwortlich für die axonale Schädigung und Neuronenuntergang [36]. Weitere Immunzelltypen und ihre Rolle in der Pathogenese der MS werden im Folgenden detaillierter besprochen.

2.3 Zelltypen in der MS und EAE

2.3.1 B-Zellen

B-Zellen entwickeln sich aus lymphozytären Stammzellen des Knochenmarks. Sie tragen auf ihrer Oberfläche einen antigenspezifischen Rezeptor und entwickeln sich nach Kontakt mit ihrem Antigen in Antikörper-produzierende Plasmazellen. Im Kontext der MS-Erkrankung wird vermutet, dass B-Zellen pathologische Antikörper produzieren, die die Immunreaktion gegen Myelinbestandteile weiter vermitteln und Makrophagen und Bestandteile des Komplementsystems aktivieren [37]. Der Nachweis oligoclonaler Banden [38] und klonaler B-Zellen [39] im Liquor auch im schubfreien Intervall wurde lange als nebenbefundlicher Beleg für die immunvermittelte Entstehung der Erkrankung gewertet.

Untersuchungen der letzten Jahre lassen eine größere Rolle von B-Zellen in der Pathogenese der MS vermuten als bisher bekannt [40, 41].

Studien bei MS-Patienten mit RRMS unter Rituximab-Therapie, einem monoklonalen, chimären Antikörper gegen das von vielen B-Zellen exprimierte Oberflächenprotein CD20, zeigen eine deutliche Verbesserung im Krankheitsverlauf in Bezug auf die Anzahl der Schübe und Läsionen im MRT [42]. Hinzu kommen histologische Untersuchungen, die follikelähnliche

Strukturen mit einer hohen Zahl EBV-infizierte B-Zellen in den Meningen an SPMS erkrankter Personen beschreiben [43, 44].

Diese Ergebnisse lassen auf eine Relevanz der B-Zellreihe für die Entstehung und den Verlauf einer MS-Erkrankung schließen. Trotzdem sind in diesem Bereich weitergehende Untersuchungen und Studien zur Bestätigung der erwähnten Befunde nötig [45].

Als B-Zell-Marker kommt in unseren Untersuchungen ein Anti-CD45r-Antikörper (=Anti-B220-Antikörper) zum Einsatz, welcher im Mausmodell als Pan-B-Zellmarker betrachtet werden kann [46]. Dies ist nicht auf menschliche B-Zellen übertragbar [47].

2.3.2 CD8⁺-Zellen

Histologisch finden sich CD8⁺-T-Zellen in großer Zahl im entzündlichen ZNS-Infiltrat der MS sowohl beim Menschen [48, 49], als auch in diversen Mausmodellen [50, 51]. Dennoch sind CD8⁺-T-Zellen erst in den letzten Jahren verstärkt in den Fokus der MS-Forschung gerückt. Eine Beteiligung dieses T-Zelltyps an der Entstehung der MS ist als tierexperimentell gesichert anzunehmen [52, 53], auch wenn die genaue Funktion nach wie vor nicht definitiv geklärt ist [54]. Nicht zuletzt aufgrund ihres zytotoxischen Potentials wird zum einen eine Effektorfunktion vermutet [55]. Diese Vermutung stützt sich auf Daten, die zeigen, dass CD8⁺-T-Zellen demyelinisierte Axone schädigen und damit für das Ausmaß der bleibenden neurologischen Behinderung durch die Inflammation mitverantwortlich sind [56]. Allerdings zeigen zum anderen bestimmte CD8-T-Zellsubtypen eine regulatorisch-suppressive Funktion [57].

2.3.3 Dendritische Zellen

Dendritische CD11c⁺-Zellen gehören zu den antigenpräsentierenden Zellen. Sie nehmen Antigene auf, prozessieren sie über MHC-Moleküle und können so auch naive T-Zellen aktivieren [58-60]. Ihre Aufgabe ist die Induktion der

spezifischen Immunität gegen Pathogene [61]. Auch regulatorische Einflüsse der CD11c⁺-Zellen auf die Immunantwort und deren Ausmaß sind bekannt [62, 63]. Ferner spielt dieser Zelltyp auch eine Rolle in der Persistenz und dem Ausmaß bereits induzierter Autoimmunität, wie am PLP-induzierten EAE-Modell gezeigt wurde [64]. Diskutiert wird auch die Rolle der CD11c⁺-Zellen in der Toleranzentwicklung gegen Autoantigene im T-Zell-Reifungsprozess im Thymus [63, 65, 66].

Nicht zuletzt aufgrund ihrer Fähigkeit, über Antigenpräsentation eine spezifische Immunität bzw. Toleranz zu induzieren und somit an einem sehr frühen Stadium der Immunantwort beteiligt zu sein, werden CD11c⁺-Zellen verstärkt im Kontext der MS-Erkrankung untersucht [67].

Jüngst wurde jedoch gezeigt, dass eine Depletion dendritischer Zellen die Entstehung einer MOG-induzierten EAE nicht verhindert, beziehungsweise nur schwach abmildert [68], sodass weitere Untersuchungen zur Funktion der dendritischen Zellen in der Entstehung der MS erforderlich sind.

In der vorliegenden Arbeit kommt anti-CD11c als Pan-DC-Marker bei Mäusen zum Einsatz [69, 70]. CD11c⁺-Zellen wurden in CD4⁻ und CD4⁺-Subklassen unterteilt [71]. Auf CD4⁺ dendritischen Zellen ändert sich im Gegensatz zu CD4⁻ dendritischen Zellen die Expression costimulierender Moleküle nach EAE-Induktion mit PLP139-151 Pertussistoxin, was eine Assoziation der CD4⁺ dendritischen Zellen mit der EAE-Entstehung zulässt [72].

2.3.4 CD4⁺-Zellen

Die CD4⁺-T-Zell-Population ist heterogen. Ausgehend von unreifen Th0-Zellen differenzieren sich diese in Abhängigkeit des vorherrschenden Zytokinmilieus weiter in spezialisierte Untertypen [35]. T-Effektorzellen werden über die von ihnen produzierten Zytokine definiert [73, 74]. In dieser Arbeit werden Interferon γ -produzierende Th1-, IL4- produzierende Th2- und IL17- produzierende Th17-CD4⁺-T-Effektorzellen genauer untersucht. Als weiterer CD4⁺-T-Zell-Subtyp wurden regulatorische FoxP3⁺-bzw. CD25⁺-T-Zellen subklassifiziert.

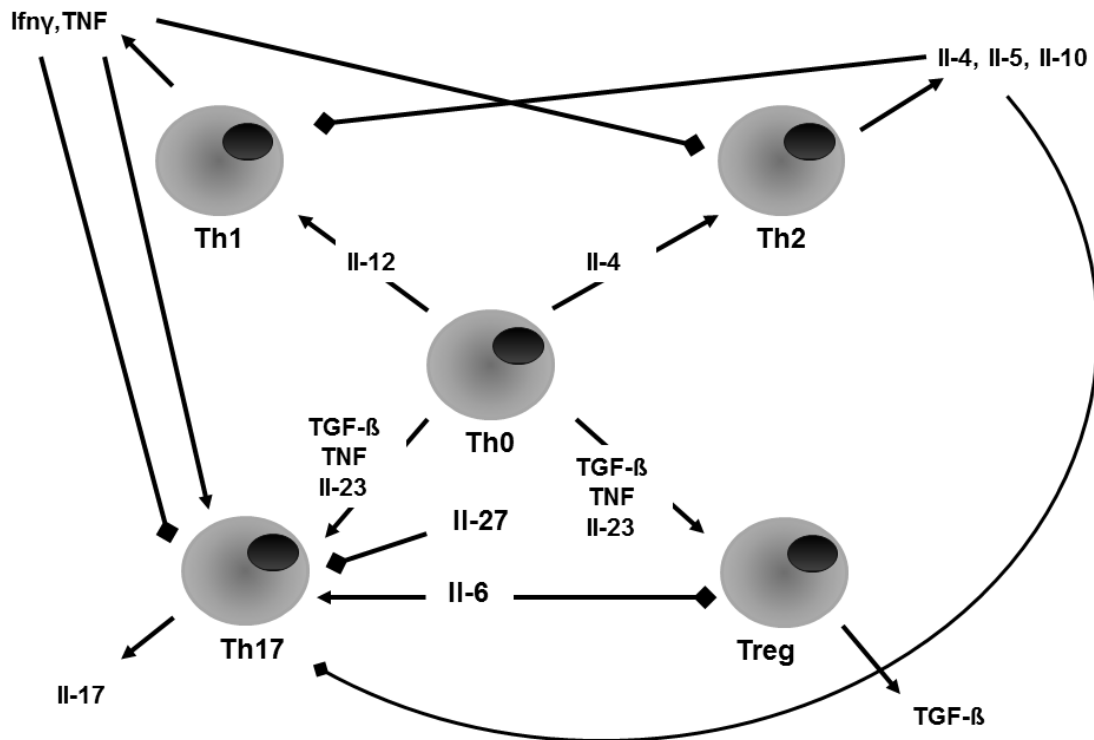


Abbildung 2-1: Entwicklung der verschiedenen CD4⁺-T-Zell-Linien aus der undifferenzierten Th0-Zelle. Linien mit Rautenabschluss stellen eine Inhibition dar, Pfeile eine Induktion. Die Grafik ist modifiziert nach [75] bzw. [76]. Sie dient als Übersicht und erhebt keinen Anspruch auf Vollständigkeit.

2.3.5 Th1-Zellen

Th1-Zellen produzieren das Zytokin IFN γ und werden auch als inflammatorische T-Zellen bezeichnet [77]. Eine IFN γ -Behandlung lässt eine bekannte RRMS exazerbieren [78]. Th1-Zellen produzieren ferner TNF- β und IL-2. In MS-Plaques finden sich unter anderem diese Th1-assoziierten Mediatoren verstärkt [79-81]. Sie initiieren die zelluläre Immunantwort vor allem gegen intrazelluläre Pathogene, indem sie Makrophagen aktivieren und die Produktion opsonierender Antikörper durch B-Zellen stimulieren. Ihnen wurde bis zur Entdeckung der Th17-Zellen die Hauptrolle in der Entstehung der EAE zugeschrieben.

2.3.6 Th2-Zellen

IL4-produzierende Th2-Zellen spielen eine zentrale Rolle in allergischen Immunreaktionen. In der Pathogenese der MS und der EAE spielen Th2-Zellen eine regulatorische Rolle. [32, 82, 83]

Die Zytokine der Th1- und Th2 Zellen hemmen die Proliferation des jeweils anderen Zelltyps [84].

2.3.7 Th17-Zellen

Th17-Zellen wurden erstmals 2005 als eigener Zelltyp beschrieben [83], [73]. Schon zuvor wurde ein IL17 produzierender, autoreaktiver T-Zelltyp vermutet: Ein Blockieren der IL-12-vermittelten Th1-Differenzierung brachte nicht die erwartete Abmilderung der EAE [85]. IL12 ist ein Heterodimer aus IL12p40 und IL12p35. Knockoutmäuse, die eines dieser Moleküle nicht exprimieren, können kein IL12 produzieren und entwickeln keine adäquate Th1-Immunreaktion. Während die IL12p40 defizienten Mäuse wie erwartet, tatsächlich keine EAE entwickeln ist dies bei IL12p35 defizienten Mäusen nicht der Fall [86]. Da sich IL23 die IL12p40-Untereinheit mit IL12 teilt, wurde dessen Bedeutung für das Tiermodell der MS genauer untersucht. IL23 besitzt zusätzlich eine p19 Untereinheit. Cua et al. zeigten, dass sowohl p19 als auch IL12p40 und damit IL23 bzw. dessen Signalweg für die Pathogenese der PLP139-151 induzierten EAE unersetzlich sind [87]. IL23 ist seinerseits essentiell für die Entwicklung der Th17-Zellen [87, 88]. IL17 produzierende Th17-Zellen sind potentere Induktoren der EAE als Th1-Zellen [87]. Im Vergleich zu Gesunden erhöhte IL17-Konzentrationen im Liquor von MS-Patienten [89] sowie hochregulierte IL17-Transskripte in MS-Läsionen [81] lassen auf eine ähnlich bedeutsame Funktion von IL17 beim Menschen schließen.

Aktuell wird vermutet, dass Th17-Zellen die Permeabilität der Blut-Hirnschranke steigern und so eine Migration ZNS-reaktiver Immunzellen, wie Th1-, CD8⁺- und B-Zellen ermöglichen [36]. Neben ihrer Bedeutung für die Entwicklung der

Autoimmunität, kommt Th17-Zellen vermutlich auch eine Schlüsselrolle in der Immunreaktion auf extrazelluläre Bakterien [90] und Tumore [91] zu.

Trotz dieser neuen Erkenntnisse muss die vermutete Schlüsselrolle der Th17-Zellen kritisch betrachtet werden. Einige Arbeitsgruppen benötigen nach wie vor Th1-Zellen zur EAE-Induktion [92], andere rücken das Zusammenspiel von Th1 und Th17 Zellen in den Vordergrund um verschiedene Arten der ZNS-Inflammation zu erklären [93]. So könnte beispielsweise das Ansprechen bzw. Nichtansprechen der MS-Patienten auf eine IFN β -Therapie über das Zusammenspiel dieser beiden Zelltypen erklärt werden [94].

2.3.8 Regulatorische T-Zellen

Regulatorische T-Zellen wirken der Autoimmunität entgegen. Sie spielen eine wesentliche Rolle in der Aufrechterhaltung peripherer Toleranz gegenüber ihren spezifischen Autoantigenen [34]. Fehlende regulatorische T-Zellen lassen im Tiermodell oft letal endende Autoimmunkrankheiten entstehen [95, 96].

Regulatorische T-Zellen werden in der Literatur oft als CD4⁺-Zellen beschrieben, die zusätzlich CD25 (=IL2-Rezeptor α -Kette) exprimieren [97]. CD25 findet sich jedoch auch auf der Oberfläche aktivierter T-Effektorzellen [98], weshalb die Charakterisierung regulatorischer T-Zellen über den für die regulatorische Funktion entscheidenden Transkriptionsfaktor FoxP3 (=Forkhead Box Protein 3) genauer ist [98, 99]. Trotzdem werden regulatorische CD4⁺-T-Zellen oft für in-vitro-Experimente (vgl. 4.8), welche vitale Zellen erfordern, über den Oberflächenmarker CD25 charakterisiert, da für die Identifikation über FoxP3 eine Permeabilisierung der Zellmembran und damit ein Abtöten der Zellen nötig ist.

Regulatorische T-Zellen hemmen über TGF- β 1 die Proliferation von T-Effektorzellen (=CD4⁺CD25⁻-Zellen) in vitro [100]. Auch die CD8⁺-Zellaktivierung und Antikörperproduktion durch B-Zellen wird durch regulatorische T-Zellen inhibiert [100, 101]. Regulatorische Einflüsse auf andere Zelltypen des Immunsystems, wie z.B. Monozyten, Makrophagen [102] oder dendritische

Zellen [103] sind ebenfalls beschrieben. Im Tiermodell sind regulatorische T-Zellen in der Lage die Entstehung der EAE zu verhindern bzw. deren Symptome abzumildern [104-106].

2.4 Tiermodelle der MS

Forscher untersuchen seit vielen Jahrzehnten die MS anhand von Tiermodellen. Mit verschiedenen Methoden werden hierbei Symptome bei Tieren induziert, die denen der MS beim Menschen ähneln. Die Modelle können jeweils nur Teilaspekte der Erkrankung darstellen. So konzentrieren sich beispielsweise Modelle toxin-induzierter Demyelinisierung auf eben diesen Prozess und unter anderem weniger auf die entzündlichen Aspekte der MS [107]. Mit Hilfe von virus-induzierten Modellen der zentralen Demyelinisierung [108] wiederum lässt sich besonders gut die fortschreitende, klinische Behinderung sowie die humorale Immunantwort darstellen [109].

Die als Tiermodell angewandte experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis (EAE) ist ein seit den 30er Jahren des vorigen Jahrhunderts bekanntes [110], gut charakterisiertes Tiermodell der Multiplen Sklerose [111, 112]. Bei der EAE wird eine Entzündung im ZNS durch Immunisierung mit ZNS-Antigenen in Adjuvans hervorgerufen (aktive EAE, z.B. [113]) oder durch den Transfer aktivierter, ZNS-spezifischer CD4⁺-Zellen ausgelöst (z.B. [114]). Gängige ZNS-Antigene sind Proteolipid Protein (PLP), Myelin-basisches Protein (MBP) und Myelin Oligodendrozyten Protein (MOG). Inzestmäuse vom SJL-Stamm sind für eine EAE-Induktion mit den ersten beiden Antigentypen besonders empfänglich, während sich bei C57Bl/6-Mäusen die EAE mit MOG besonders leicht auslösen lässt.

Die s.c.-Immunisierung erfolgt in der Regel durch eine Emulsion mit Freund'schem Adjuvanz, das Hitze-inaktivierte Tuberkulosebakterien zu Verstärkung der Immunantwort enthält. Pertussis-Toxin-Injektionen i.v. oder i.p. erleichtern die Induktion, wobei der genaue Mechanismus nicht bekannt ist.

2.5 PHA-L und Glykosylierung

β 1,6GlcNAc-verknüpfte N-Glykane (vgl. Abbildung 2-2) gehören zu den Endprodukten des hoch regulierten Prozesses der N-Glykosylierung von Proteinen im endoplasmatischen Retikulum und Golgiapparat der Zelle (vgl. Abbildung 6-1). Hierdurch kann die Funktion oder Stabilität des Proteins (z.B. die Empfindlichkeit eines Rezeptors) beeinflusst werden und damit die Funktion bzw. das Verhalten der gesamten Zelle [118, 119]. Diese posttranslationale Modifikation wird durch die Aktivität des Endoplasmatischen Retikulums und Golgiapparats kontrolliert und ist damit unter anderem abhängig von der Stoffwechsellage der Zelle [120]. Nicht beeinflusst wird dabei die Anzahl der Glykane, die ein Protein trägt (diese ist genetisch determiniert), sondern die „Verzweigung“ des Glykans (vgl. Abbildung 2-2). Aus tierexperimentellen Untersuchungen ist bekannt, dass eine genetisch bedingte, ineffektive Glykosylierung die Empfänglichkeit für Autoimmunerkrankungen erhöht und unter anderem eine spontane, entzündliche Demyelinisierung hervorrufen kann [118, 121]. Ferner zeigte sich, dass eine funktionierende N-Glykosylierung auf regulatorischen T-Zellen zur Toleranzentwicklung nach Transplantationen erforderlich ist. Diskutiert wird in diesem Zusammenhang eine reduzierte Migrationsfähigkeit und ein gestörtes Homing regulatorischer T-Zellen bei unterbundener N-Glykosylierung [122].

Um die effektive N-Oberflächenglykosylierung mit immunologischen Methoden darzustellen, eignet sich das Lectin PHA-L, welches spezifisch an β 1,6GlcNAc-verknüpfte N-Glykane, dem Produkt der Monoacylglycerol-Acyltransferase (Mgat) 5, bindet [118, 123]. Lectine sind (Glyko-)Proteine, die Kohlenhydratstrukturen, wie z.B. Glykane auf Proteinen, spezifisch erkennen und binden [124]. In der Literatur wird das Lectin PHA-L auch als *Phaseolus vulgaris* leucoagglutinin bezeichnet und aus der „Red kidney bean“ gewonnen.

3 Fragestellung

In der vorliegenden Arbeit soll untersucht werden, ob bestimmte Oberflächenglykosylierungen von Immunzellen mit der Entwicklung von Autoimmunität im zentralen Nervensystem assoziiert sind. Im Einzelnen sollen folgende Fragen bearbeitet werden:

1. N-Oberflächenglykosylierung auf naiven Immunzellen: Welche Immunzelltypen weisen welche Ausmaße an N-Glykosylierung auf?
2. Ändert sich die N-Oberflächenglykosylierung auf Immunzellen nach Aktivierung in vitro?
3. Ändert sich die N-Oberflächenglykosylierung von Immunzellen während der Entwicklung von Autoimmunität im ZNS?
4. Ist die Änderung der N-Oberflächenglykosylierung von Immunzellen mit funktionellen Veränderungen der Zellen assoziiert?

4 Material und Methoden

4.1 Material

4.1.1 Verwendete Antikörper

Antigen	Klon	Fluoreszenz/ Kopplung	Konzentration	Hersteller
Biotin Microbeads	Keine Angabe d. Herstellers	Anti-Biotin Antibody	Keine Angabe d. Herstellers	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch- Gladbach, Deutschland
PE Microbeads	Keine Angabe d. Herstellers	Anti-PE	Keine Angabe d. Herstellers	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch- Gladbach, Deutschland
CD11c	N418	APC	0,2 mg/ml	Ebioscience

CD25	PC61.5	PE	0,2 mg/ml	Ebioscience
CD25	7D4	PE	Keine Angabe d. Herstellers	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch- Gladbach, Deutschland
CD28	37.51	purified	1mg/ml	Ebioscience
CD3	17A2	purified	1mg/ml	Ebioscience
CD4	RM 4-5	FITC	0,5 mg/ml	Ebioscience
CD45r	RA3-6B2	PE	0,2 mg/ml	Pharmingen
CD62l	MEL-14	PE	0,2 mg/ml	Ebioscience
CD8	53-6.7	FITC	0,5mg/ml	Ebioscience
Foxp3	FJK-16A	PE	0,2 mg/ml	Ebioscience
IFN γ	XMG1.2	PE	0,2 mg/ml	BD Biosciences
IL-17	TC11-18H10	PE	0,2 mg/ml	BD Biosciences
IL-4	11B11	PE	0,2 mg/ml	BD Biosciences
MACS CD4 ⁺ CD25 ⁺ Regulatory T- Cell Biotin- Antibody- Cocktail Ter-119 CD8a CD45r CD49b CD11b	Ter-119 Ly-2 B220 Dx5 Mac-1	Biotinylated Biotinylated Biotinylated Biotinylated Biotinylated	Keine Angabe d. Herstellers	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch- Gladbach, Deutschland
Streptavidin	-	Pacific-Blue	1mg/ml	Invitrogen

Tabelle 1: Verwendete Antikörper

4.1.2 Lectin

Bezeichnung	Klon	Kopplung	Konzentration	Hersteller
PHA-L (Phaseolus vulgaris Leucoagglutinin)	B-1115	Biotinylated	2mg/ml	Vector

Tabelle 2: Verwendete Lectine

4.1.3 Verwendete Chemikalien

Chemikalie / Lösung	Hersteller
6-Mercaptoethanol, 50mM GIBCO®	Invitrogen, Auckland, NZ
70% Ethanol	
BD Perm/Wash™ (10x)	BD Biosciences, San Diego, USA
Bovine Serum Albumine (BSA) pH 7,0	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Austria
CFSE (Carboxyfluoresceinsuccinimidylester)	Molecular Probes®, Invitrogen, Auckland, NZ
CuSO ₄	SIGMA Chemical Co., St. Louis, USA
Cytofix/Cytoperm™ Fixation and Permeabilization Solution (1x)	BD Biosciences, San Diego, USA
DMSO (Dimethylsulfoxide) C ₂ H ₆ OS, Research Grade	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
EDTA	Merck KGaA, 64271 Darmstadt, Germany
Fetal Calf Serum (FCS), inaktiviert	Invitrogen, Auckland, NZ
Formaldehyd	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
FoxP3 Fixation/Permeabilization: Concentrate	Ebioscience, San Diego, CA
FoxP3 Fixation/Permeabilization: Diluent	Ebioscience, San Diego, CA
FoxP3 Fixation/Permeabilization:	Ebioscience, San Diego, CA

Permeabilisation Buffer (10x)	
Freunds Incomplete Adjuvant	Difco™, Voigt Global Distribution LLC, Kansas City, USA
IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium) 12440 (1x) & L-Glutamine, 25mM HEPES GIBCO®	Invitrogen, Auckland, NZ
Ionomycin, Calcium Salt (2mM; in DMSO gelöst), Streptomyces conglobatus, Calbiochem®	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
KHCO3	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Kifunensin K1140 1MG (10mM; in sterilem dest. Wasser gelöst); ≥ 98% (NMR),	SIGMA Chemical Co., St. Louis, USA
LSM 1077 Lymphocyte Separation Medium	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Austria
Monensin sodium salt (2mM)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Mycobacterium tuberculosis desiccated, H37RA	Difco™, Voigt Global Distribution LLC, Kansas City, USA
NaN ₃ 10%	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
NH ₄ Cl	SIGMA Chemical Co., St. Louis, USA
PBS: Dulbecco's PBS (1x) without Ca & Mg, steril	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Austria
Penicillin/Streptomycin (10.000 U/ml Penicillin & 10.000 µg/ml Streptomycin) GIBCO®	Invitrogen, Auckland, NZ
Pertussis Toxin (Bordetella Pertussis), 50µg/ml, Calbiochem®	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
PLP 139-151	Kalbacher Lab, Tübingen

PMA (Phorbol-12-myristate-13-acetate) [1mg/ml (in DMSO gelöst)] (Purity 99,07%), Calbiochem®	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
TrypanBlue Solution (0,4%)	SIGMA Chemical Co., St. Louis, USA

Tabelle 3: Für die Experimente verwendete Chemikalien

4.1.4 Laborgeräte

Gerät	Hersteller
Analysewaage	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Auflichtmikroskop Wilovert A	A Hund, Wetzlar
CO ₂ Water-Jacketed Incubator	Nuaire US Autoflow
Elektrische Eppendorf-Pipette „Easypet“	Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, Wesseling-Berzdorf
Eppendorf-Pipetten (verschiedene Volumina und Ausführungen)	Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, Wesseling-Berzdorf
FACS CyAn™ ADP	Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland
Gilson-Pipetten, Pipetman (verschiedene Volumina)	Gilson, Inc., Middleton, USA
Glasspritzen, Fortuna® Optima®	Poulten & Graf GmbH, Wertheim, Deutschland
Infrarot-Wärmelampe (150 Watt)	Beurer GmbH, Ulm, Deutschland
Kühl-/Gefrierkombination glassline	Liebherr-Holding GmbH, Biberach an der Riss
Kühlzentrifuge Heraeus Megafuge 1.0 R	Kendro Laboratory Products GmbH, Hanaus
MACS Multi Stand	Miltenyi Biotec Inc, Auburn (USA)
Neubauer-Zählkammer, improved, Bright Line, 0,100mm Tiefe	Glaswarenfabrik Karl Hecht KG „Assistent“, Sondheim/Rhön
S1-Biogard-Hood, Modell B60-112	The Baker Co. Inc., Sanford, Maine

Sterilisator, A16/50, BJ 1922, Inh. 14,6ltr	WEBECO, Selmsdorf, Deutschland
Vortex Genie 2™	Bender & Hobein AG, Zürich, Schweiz

Tabelle 4: Verwendete Laborgeräte

4.1.5 Einwegmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
15 ml Tube CELLSTAR®	Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland
50 ml Tube CELLSTAR®	Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland
96-well Zellkulturplatten Flat-Bottom, mit Deckel, Falcon®	Becton Dickison Labware, Franklin Lakes (USA)
96-well Zellkulturplatten U-Bottom, mit Deckel, CELLSTAR®	Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland
BD Microlance 3 Needles	BD Bioscences, Durham (USA)
EDTA KE/9ml Monovette®	Sarstedt, Nümbrecht
Eppendorf-Cups	Eppendorf AG, Hamburg
FACS-Tubes (PP-Tubes 1,3ml 8,55/44MM)	Greiner bio-one, Frickenhausen
Latex-Handschuhe, verschiedene Größen	Ansell, Tamworth (UK)
MACS-Separation-Collumns (LS, MS, LD)	Miltenyi Biotec Inc, Auburn (USA)
Parafilm	Pechiney, Plastic Packaging Menasha (USA)
Pasteurpipetten, Einweg, 3ml	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Petrischalen, steril, 60*15mm	Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland
Pipettenspitzen, verschiedene Größen	Sarstedt, Nümbrecht
Safety-Multifly®-Set	Sarstedt, Nümbrecht

Serologische Pipette costar [®] verschiedene Volumina	Corning Incorporated, Corning (USA)
Serologische Pipette Falcon [®] verschiedene Volumina	Becton Dickison Labware, Franklin Lakes (USA)
Spritze, 2ml, BD Plastipak [™]	Becton Dickison, Madrid (Spain)
Zellsieb, steril 70 bzw. 40 µm	BD Biosciences, Durham (USA)

Tabelle 5: Verwendete Einwegmaterialien

4.1.6 Verwendete Lösungen / Medien

Bezeichnung	Zusammensetzung
Fixierlösung	<ul style="list-style-type: none"> - 280µl Formaldehyd - 10ml PBS
FACS-Puffer	<ul style="list-style-type: none"> - 500ml PBS - 5g BSA - 1ml NaN₃
ACK-Lysis-Puffer (Ammoniumchlorid- Kaliumhydrogenkarbonat-Lösung)	<ul style="list-style-type: none"> - 1 g KHCO₃ - 8,3 g NH₄Cl - 35mg EDTA - Mit dest. Wasser auf 400 ml auffüllen - Mit 1M NaOH auf pH 7,3 einstellen - Auf 1000 ml mit dest. Wasser auffüllen
IMDM-10	<ul style="list-style-type: none"> - 90ml IMDM-12440 - 10ml FCS - 0,1 ml 6-Mercaptoethanol - 1ml Strept/Pen
EB-Working-Solution (nach Protokoll von Ebioscience [125])	<ul style="list-style-type: none"> - 1x Permeabilization Buffer - 9x Aqua Dest.
EB-Fixation/Permeabilisation-Solution (nach Protokoll von Ebioscience [125])	<ul style="list-style-type: none"> - 1x Concentrate - 3x Diluent

BD Perm/Wash™ (nach Protokoll von BD Biosciences [126])	- 1x Permeabilization Buffer - 9x Aqua Dest.
MACS-Puffer	- 500ml PBS - 0,37mg EDTA - 25g BSA

Tabelle 6: Verwendete Lösungen und deren Zusammensetzung

4.1.7 Versuchstiere

Die Versuchstiere waren weibliche, 6-12 Wochen alte SJL-Mäuse (Tierversuchsgenehmigungsnummer des Regierungspräsidiums Tübingen: N06/07), bei denen sich leicht eine EAE induzieren lässt. Die Tiere sind Inzuchtmäuse und wurden in der Tieranlage der Kinderklinik der Universität Tübingen gezüchtet.

4.1.8 Software

Bezeichnung	Version	Hersteller
Excel 2010	14.06	Microsoft®
IBM® SPSS® Statistics	19.0.0	IBM®
Summit®	4.3 Build 2445	Dako Cytomation

Tabelle 7: Verwendete Software

4.2 Immunisierung der Mäuse

4.2.1 Herstellung der Peptid-Wasser-in-Öl-Emulsion

Vorbereitend wurden 24mg inaktiviertes Mycobacterium tuberculosis in 6ml inkompletten Freund'schem Adjuvanz gelöst. Die Ölphase wurde mit einer Glasspritze aufgezogen. In einer zweiten Glasspritze wurde dasselbe Volumen eines Wasser-PLP-Gemischs aufgezogen. Das PLP 139-151 war mit 1,54 mg/ml konzentriert. Die Wasserphase wurde nun durch ein Zwischenstück in die die Ölphase enthaltende Spritze gedrückt. Über ca. 30 Minuten wurde die Emulsion abwechselnd durchgemischt und wieder auf Eis gelegt.

4.2.2 Induktion der EAE an der Maus

6-12 Wochen alte, weibliche SJL-Mäuse wurden mit insgesamt 100µl pro Maus der vorbereiteten Emulsion immunisiert. Dadurch erhielt jede Maus 50nm PLP 139-151 Peptid. Durch die Injektion in die Hinterläufe waren die poplitealen Lymphknoten die hauptsächlich das Injektionsareal drainierenden Lymphknoten. Zur subkutanen Injektion wurden die Mäuse kurz narkotisiert (CO₂-/O₂-Gasgemisch). Vor der sich anschließenden intravenösen Pertussis-Toxingabe wurden die Versuchstiere mit einer Infrarotlampe aufgewärmt. Die sich dabei bildende Hyperämie in den Schwanzvenen erleichterte die Venenpunktion. Pro Tier wurden 200ng PTx gelöst in 100µl PBS injiziert.

4.2.3 Krankheitsscore

Die Tiere wurden spätestens am 6. Tag nach EAE-Induktion täglich untersucht und gemäß der aktuellen Ausprägung der klinischen Krankheitssymptome mithilfe eines Scores [115] beurteilt:

Score 0	Keine erkennbaren Symptome
Score 1	Schwäche der Hinterläufe oder des Schwanzes
Score 2	Schwäche der Hinterläufe und des Schwanzes
Score 3	Schwere Lähmung der Hinterläufe
Score 4	Komplette Lähmung der Hinterläufe und Schwäche der Vorderläufe
Score 5	Exitus

Die an Tag 8 nach EAE-Induktion eingeschläferten Mäuse sollten noch keine schweren Krankheitssymptome gezeigt haben.

4.2.4 Milz- /Lymphknotenentnahme

Am 8. Tag nach EAE-Induktion wurden die SJL-Mäuse mit CO₂ eingeschläfert. Das Vorgehen erfolgte gemäß den Tierschutzrichtlinien am Universitätsklinikum Tübingen im eigenen Käfig.

Nach Eintritt des Todes wurden die Organe mit Skalpell, Pinzette und Schere präpariert, zügig entnommen und in ein 15ml-Falcon-Röhrchen mit eisgekühltem PBS-Puffer gegeben.

4.3 Lymphozytenisolation aus Milz/Lymphknoten

Die entnommenen Milzen wurden durch ein 70µm-Nylon-Zellsieb in eine Petrischale gedrückt. Nachdem mit ca. 5ml PBS nachgespült worden war, wurde die Zellsuspension mit einer serologischen Pipette in ein 15ml-Falcon-Röhrchen überführt. Nach 5minütiger Zentrifugation bei 1400rpm und 4°C wurde der Überstand dekantiert und die Zellen in 3ml ACK-Puffer resuspendiert. Die Zellen wurden über 1 Minute mit dem Lyse-Puffer unter wiederholtem Schütteln inkubiert. Anschließend erfolgte eine erneute Zentrifugation bei 1400rpm und 4°C. Der ACK-Puffer wurde dekantiert und die Zellen 2x in je 5ml PBS-Puffer gewaschen. Anschließend wurden sie in 2ml PBS-Puffer gelöst und die Zellzahl pro Milliliter Suspension bestimmt.

Bei der Lymphozytenisolation aus Lymphknoten fielen der Erythrozytenlyseschritt und die anschließenden Waschschrte weg. Aufgrund der vergleichsweise geringeren Zellzahl erfolgte die Zellzahlbestimmung aus 1ml Gesamtvolumen.

Alle Schritte wurden unter sterilen Bedingungen unter der S1-Biogard-Hood mit sterilen Materialien und Chemikalien durchgeführt. Alle folgenden Versuche und Arbeitsschritte erfolgten mit der hier gewonnenen Zellsuspension.

4.4 Zellzahlbestimmung

Zur Bestimmung der Anzahl an lebenden Zellen wurden 20µl aus der jeweiligen Zellsuspension entnommen und mit 180µl Trypanblau in einem Well gemischt und anschließend in eine Neubauer Zählkammer pipettiert.

Trypanblau dringt nur in tote Zellen ein, aber nicht in lebende. Auf diese Weise kann man die Zellen voneinander unterscheiden. Gezählt wurden nur die vitalen Zellen im mittigen Großquadranten.

Das Volumen der Zählkammer berechnet sich aus der Fläche der Kammer von 1mm² und einer Höhe von 0,1mm = 0,1µl. Der Kammerfaktor beträgt somit 10⁴. Multipliziert mit der Verdünnung der Zellsuspension (1:10) ergab sich die Zellzahl pro Milliliter der untersuchten Suspension.

4.5 Aktivierung von T-Lymphozyten in vitro

Das Ansetzen von Zellkulturen geschah wie alle vorherigen Schritte auch unter sterilen Bedingungen. Es wurden 96-Well-Flachbodenplatten verwendet. In ein Well wurden 500.000 Zellen pipettiert. Anschließend wurde zentrifugiert und der Überstand dekantiert.

Die unspezifische Stimulation zur anschließenden Markierung Zytokin produzierender Zellen erfolgte modifiziert nach dem De Rosa-Protokoll [127]: Stimuliert wurde mit 0,2µl Ionomycin [0,2mM] und 0,4µl PMA (Phorbol-12-myristate-13-acetate) [1 µg/ml]. Um die Fusion der Zytokin-enthaltenden intrazellulären Vesikel mit der Zellmembran zu blockieren wurden 0,4µl Monensin [0,2mM] zum Kulturmedium gegeben. Die Konzentrationen waren zuvor in verschiedenen Verdünnungsreihen ermittelt worden. Die Stimulationsdauer betrug 4 Stunden in 200µl IMDM-10 Nährmedium im Inkubator bei 37°C und 5 Vol.-% CO₂ enthaltender umgebender Luft.

4.6 Hemmung der alpha-1,2-Mannosidase

Zur Hemmung der alpha-1,2-Mannosidase wurden die Zellen über 48h im Inkubator bei 37°C und 5 Vol.-% CO₂ enthaltender Umgebungsluft mit 4µl Kifunensin [1mM], einem spezifischen und hochpotenten Inhibitor der alpha-1,2-Mannosidase I [128] in IMDM-10-Medium inkubiert. Auch hier betrug das Gesamtvolumen pro Well mit 500.000 Zellen 200µl. Die Dauer der Inhibitoreinwirkung war ebenso wie dessen Konzentration in Vorversuchen bestimmt worden.

4.7 Isolation von CD4⁺CD25⁺-Zellen regulatorischen T-Zellen mittels Magnetseparation (MACS)

Die Separation von CD4⁺-CD25⁺-Zellen aus der Milz erfolgte mittels eines MACS-Kits von Miltenyi Biotec. In einem ersten Schritt wurden andere Typen von Immunzellen mittels eines „Antikörper-Cocktails“ aus der Zellsuspension entfernt. Der „Antikörper-Cocktail“ enthielt biotinylierte Antikörper gegen CD8 (Ly-2), CD11b (Mac-1), CD45r (B220), CD49b (DX5) und Ter-119. An die Biotinschnittstelle wurden die magnetisch aktiven Microbeads gekoppelt. Diese

Zellsuspension ließ man eine MACS-Säule in einem Magnetfeld laufen. Dabei wurden die magnetisch markierten Zellen zurückgehalten.

Im zweiten Schritt wurden die angereicherten, nicht magnetisch markierten CD4⁺-Zellen mit antiCD25-PE Antikörpern inkubiert. Gegen das PE-Molekül gerichtete Microbeads banden dann an die CD4⁺CD25⁺-Zellen. Auch diese Zellsuspension lief wieder durch eine MACS-Säule. Um die vom Magnetfeld in der Säule zurückgehaltenen CD4⁺CD25⁺-Zellen herauszuwaschen, wurde die Säule aus dem Magnetfeld genommen und einmal kräftig unter Zuhilfenahme des Stempels mit 2ml Waschpuffer durchgespült.

Zur Kontrolle der Separation wurden die Zellen mit CD4-Fluoreszenz-Antikörpern markiert und durchflusszytometrisch analysiert.

4.8 Proliferationsassay

Die alpha-1,2-Mannosidase der magnetisch isolierten CD4⁺CD25⁺-Zellen wurde mit Kifunensin gehemmt (4.6). Der Kontrollansatz wurde mit PBS-Puffer statt Kifunensin inkubiert. An Tag 2 wurden aus der Milz einer nicht-immunisierten Maus CD4⁺CD25⁻-Zellen isoliert. Diese wurden mit CFSE (Endkonzentration 5µM auf maximal 10⁷ Zellen in 100µl; 3 Minuten Inkubation bei 37°), markiert, sodass das Ausmaß der Proliferation quantifiziert werden konnte. Der Fluoreszenzfarbstoff CFSE wird bei der Zellteilung gleichmäßig auf die Tochterzellen verteilt, sodass die Fluoreszenzintensität bei jeder Zellteilung auf die Hälfte sinkt. Über die Abnahme der Fluoreszenz wird durchflusszytometrisch die Proliferationsrate bestimmt [129]. Die CD4⁺CD25⁻-Effektor-T-Zellen wurden im Verhältnis 3:1 (T_{eff}:T_{reg}) mit den CD4⁺CD25⁺ regulatorischen T-Zellen inkubiert. Es befanden sich dann insgesamt ca. 200 000 Zellen in einem Well.

Die Stimulation erfolgte über 3 Tage in 200µl IMDM-10 Medium/Well in 96-Wellt Flachbodenplatten, welches antiCD3 [3,75µg/ml] und antiCD28 [7,5µg/ml] enthielt. Die Antikörperkonzentrationen waren zuvor in Titrationsexperimenten bestimmt worden. Die Kontrolle enthielt PBS-Puffer statt Antikörper.

4.9 Markieren von Zellen mit Fluoreszenzgekoppelten-Antikörpern

Die Markierung der Zellen mit Fluoreszenzantikörpern (=Färben) ist der entscheidende Schritt zur anschließenden Charakterisierung der Zellen im Durchflusszytometer. Die folgenden Schritte galten sowohl für bearbeitete (=stimulierte/separierte/inhibierte) Zellen als auch für naive Zellen unmittelbar nach den Isolationsschritten. Die Pipettierschritte erfolgten auf Eis mit eisgekühlten Puffern, die Inkubationen im Kühlschrank bei 4°C und auch die Zentrifugationen bei 4°C. Niedrige Arbeitstemperaturen dienen der Vermeidung von unspezifischen Antikörperbindungen. Um ein Ausbleichen der Fluoreszenzfarbstoffe zu verhindern, wurden die Zellen vor Licht geschützt. Für jeden Zelltyp (Th₂, Th₁₇, ...) wurde die Färbung in einem eigenen Well vorgenommen.

Für den ersten Färbeschritt wurden alle extrazellulären, direkt mit Fluoreszenzfarbstoffen gekoppelten Antikörper sowie der PHA-L-Biotin-Antikörper in einem Gesamtvolumen von 50µl FACS-Puffer pro Well über 30min im Dunkeln bei 4°C im Kühlschrank inkubiert. In jedem Well befanden sich 500.000 Zellen. Die Konzentration der Antikörper war immer eine 1:100-Verdünnung, bezogen auf die oben genannte Stock-Konzentration. Das Lectin PHA-L wurde in einer Verdünnung von 1:1000 eingesetzt, nachdem Vorversuche dieses Verhältnis als optimal gezeigt hatten. Die Verdünnung erfolgte in FACS-Puffer.

Nach der Inkubation folgten 2 Waschschrte mit jeweils 200µl FACS-Puffer pro Well. Im 2. Färbeschritt wurde der mit Streptavidin gekoppelte Pacific-Blue-Fluoreszenzfarbstoff ebenfalls in einer 1:1000 Verdünnung in 50µl Gesamtvolumen pro Well gegeben.

Zellen, die noch mit einem intrazellulären Antikörper markiert werden mussten, wurden anschließend permeabilisiert. Die anderen Zellen wurden bereits mit 200µl FACS-Puffer in FACS-Röhrchen überführt und bei Dunkelheit und bei 4° im Kühlschrank aufbewahrt.

Zu beachten waren bei der Permeabilisierung die je nach Hersteller des entsprechenden Antikörpers unterschiedlichen Protokolle und Pufferlösungen zur intrazellulären Antikörpermarkierung. Die Verdünnung der Antikörper war jeweils 1:100 bezogen auf die oben angegebenen Stock-Konzentrationen. Die permeabilisierten Zellen wurden mit 200µl des jeweiligen Arbeitspuffers in FACS-Röhrchen überführt.

Zu beachten war auch, dass die in den unterschiedlichen Kits zur Intrazellulärfärbung enthaltenen Lösungen von unterschiedlichen Osmolaritäten waren: Im FSC-SSC-Dotplot erschienen mit dem EB-Kit permeabilisierte Zellen kleiner als mit dem BD-Kit permeabilisierte. Diese waren wiederum im Vergleich zu unpermeabilisierten Zellen kleiner. Aufgrund dieser technischen Gegebenheiten mussten unterschiedliche Einstellungen am Durchflusszytometer für die unterschiedlichen Kits vorgenommen werden. Mit verschiedenen Kits permeabilisierte Zellen wurden nicht direkt miteinander verglichen.

4.10 Messung mit dem Durchflusszytometer

Das CyAn™ ADP von DakoCytomation (inzwischen Beckman Coulter) ist ein Durchflusszytometer mit 3 Lasern (Wellenlängen: 635nm, 488nm, 405nm), welches gleichzeitig neben 9 Farben auch 2 „Scatter Parameter“ erfassen kann.

Der SSC und FSC erlauben erste Aussagen über die erfassten Zellen: Der FSC gibt einen Hinweis auf die Zellgröße, während der SSC die Granularität der Zellen widerspiegelt.

Wie im FSC-SSC-Dotplot in Abbildung 4-1 veranschaulicht, wurden Events mit geringen Werten im FSC, also sehr kleine Objekte, von den Analysen

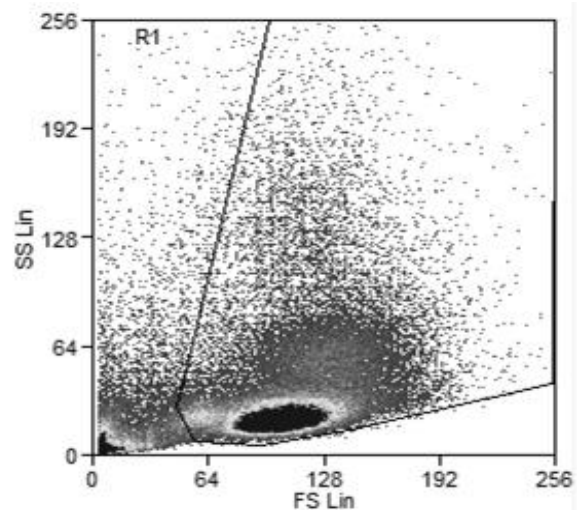


Abbildung 4-1: FSC-SSC-Dotplot mit ausgewähltem Bereich R1

ausgeschlossen. Es handelte sich hierbei beispielsweise um Zellbruchstücke, die durch ihre Autofluoreszenz bei späteren Auswertungen falsch positive Ergebnisse liefern können. Die Autofluoreszenz kann zum Beispiel durch in der zellulären Atmungskette vorkommende natürliche Farbstoffe (z.B. Flavine) oder Stoffwechselprodukte (z.B. NAD(P)H) entstehen [130].

Nur die in der Abbildung 4-1 eingerahmten Ereignisse wurden für Untersuchungen herangezogen. Pro Probe wurden 100.000 Ereignisse im Lymphozytengate gemessen. Die Messungen wurden manuell bei einer Zahl kleiner 100.000 beendet, wenn im aktuellen Probenröhrchen keine Zellsuspension mehr enthalten war.

Für die eigentlichen Messungen musste das Durchflusszytometer in unseren Experimenten jeweils 2-3 Fluoreszenzfarbstoffe gleichzeitig erkennen. Die Fluoreszenzfarbstoffe PE und FITC müssen dabei gegeneinander kompensiert werden, da sich ihr Emissionsspektrum teilweise überlappt. Die Kompensation erfolgte ebenfalls mittels der von DakoCytomation bereitgestellten Mess- und Auswertungssoftware Summit[®]. Dabei kam das Digital Signal Processing (DSP) Kompensations-Verfahren zum Einsatz – ein Verfahren, das sowohl eine Echtzeitdarstellung kompensierter Signale, als auch eine zeitgleiche Speicherung der unkompensierten Rohdaten ermöglicht [131].

Um die Vergleichbarkeit der Messungen zu gewährleisten, mussten die Grundeinstellungen am Gerät stets dieselben sein. Um diese zu überprüfen wurden bei jedem Experiment Einzelfärbungen mitgeführt, die auch für die oben genannte Kompensation verwendet wurden.

4.11 Auswertung und Statistik

Die Messdaten wurden ebenfalls mit der Software Summit[®] ausgewertet. Geeignete Messparameter wie die Mean-Fluorescence-Intensity (MFI) der Fluoreszenzen bestimmter Antikörper auf Zellsubpopulationen oder Ergebnisse (prozentuale) Anteile von Zellpopulationen an der Gesamtpopulation wurden in eine Excel-Tabelle übernommen.

Die Tests auf Signifikanzen erfolgten mittels eines von der Statistiksoftware SPSS® durchgeführten student-t-tests bei unabhängigen Stichproben.

Vorausgegangen waren Tests auf Normalverteilung nach Shapiro und Wilk, da die Fallzahl immer unter $n=50$ lag. Nur beim Vorliegen einer Normalverteilung der Messwerte mit signifikanter Sicherheit wurden T-Tests durchgeführt.

5 Ergebnisse

5.1 N-Glykosylierung muriner Immunzellen in Milz und Lymphknoten

CD4⁺-T-Zellen, zytotoxische CD8⁺-T-Zellen, dendritische Zellen und CD45r⁺-B-Zellen spielen eine große Rolle in der spezifischen Immunantwort (siehe Absatz 2.3). Zunächst sollte die PHA-L-Bindung an diese Immunzelltypen im gesunden Tier analysiert und verglichen werden. Die Intensität der PHA-L-Bindung zeigt dabei das Ausmaß der N-Oberflächenglykosylierung an. Um die Intensitäten der N-Oberflächenglykosylierung auf diesen Zellen zu quantifizieren wurden Milz- und Lymphknotenzellen aus naiven Tieren mit zelltypspezifischen Fluoreszenzantikörpern markiert und im Lymphozytengate über diese identifiziert. Eine Permeabilisierung wie beispielsweise zur Darstellung regulatorischer FoxP3⁺-T-Zellen oder T-Helferzellen erfolgte nicht, ebenso wurden die Zellen nicht in vitro stimuliert.

5.1.1 N-Glykosylierung auf Immunzellen der Milz

Stellt man die Intensitäten der N-Oberflächenglykosylierung der verschiedenen Zelltypen aus der Milz wie in Abbildung 5-1 gegenüber, erkennt man die teilweise sehr deutlichen Unterschiede. Tabelle 8 gibt einen Überblick über die Unterschiede der N-Glykosylierung auf den Immunzelltypen. Dabei weisen CD11c⁺ Zellen die mit Abstand höchste Intensität der N-Oberflächenglykosylierung auf ($n = 13$, Mittlere PHA-L-MFI = 132,23, SEM = 11,2). Sie unterscheiden sich in ihrer N-Oberflächenglykosylierung dabei hoch

signifikant von allen anderen in Abbildung 5-1 dargestellten Immunzelltypen der Milz.

Die Intensität der N-Oberflächenglykosylierung auf CD45r⁺-Zellen (n = 18, Mittlere PHA-L-MFI = 53, SEM = 3,72) unterscheidet sich statistisch hoch signifikant von den auf CD4⁺-Zellen (n = 14, Mittlere PHA-L-MFI = 25, SEM = 2,56) und CD8⁺-T-Zellen (n = 15, Mittlere PHA-L-MFI = 26, SEM = 1,43). Zwischen den beiden letztgenannten Zelltypen findet sich jedoch keine statistisch signifikante Differenz in ihrer N-Oberflächenglykosylierung. Damit ist ein ähnliches Ausmaß der N-Oberflächenglykosylierung bzw. eine ähnliche intensive Aktivität N-Glykosylierender Prozesse bei den beiden T-Zelltypen zu vermuten.

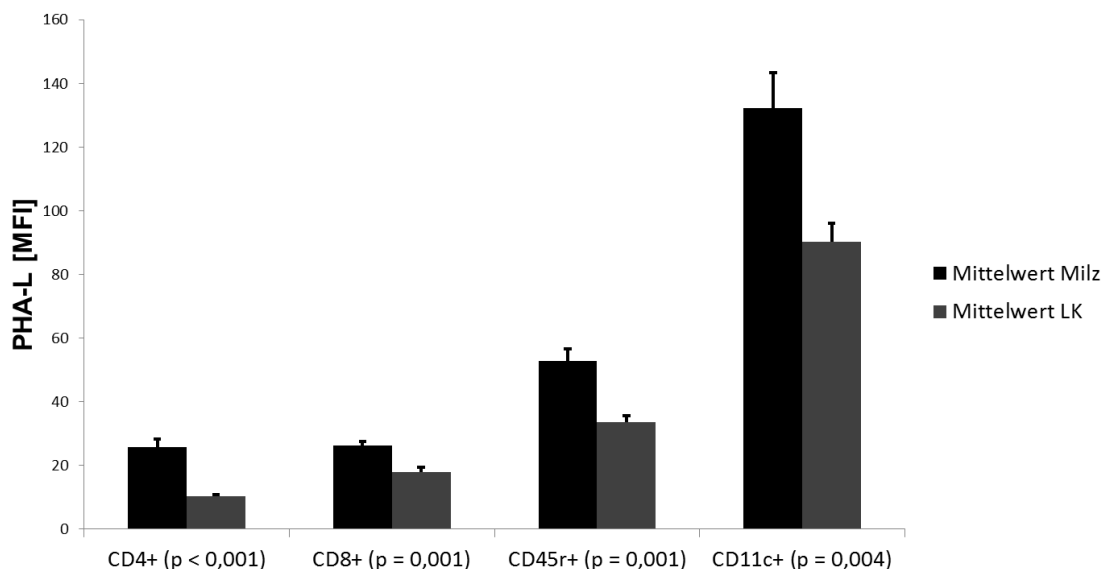


Abbildung 5-1: N-Glykosylierung der Immunzellen in der Milz und im Lymphknoten naiver Tiere.

Es wurden Immunzellen der Milz und der Lymphknoten aus naiven Tieren isoliert und nach Färbung mit zelltyp-spezifischen Antikörpern und PHA-L durchflusszytometrisch untersucht. Das Diagramm zeigt die Mittelwerte der Mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) für PHA-L. Die Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler (SEM). Die p-Werte beziehen sich auf die Unterschiede der PHA-L-Bindung der jeweiligen Zellpopulation zwischen Lymphknoten und Milz.

Zelltyp	CD8 ⁺ (n=15)	CD45r ⁺ (n=18)	CD11c ⁺ (n=13)
CD4 ⁺ (n=14)	Mittlere Differenz = 0,55 SEM = 2,88 p=0,849	Mittlere Differenz = 27,15 SEM = 4,80 p<0,001	Mittlere Differenz = 106,6 SEM = 11,51 p<0,001
CD8 ⁺ (n=15)	-	Mittlere Differenz = 26,60 SEM = 3,99 p<0,001	Mittlere Differenz = 106,05 SEM = 11,62 p<0,001
CD45r ⁺ (n=18)	-	-	Mittlere Differenz = 79,44 SEM = 11,83 p<0,001

Tabelle 8: Unterschiede in der N-Oberflächenglykosylierung zwischen Immunzellklassen aus der Milz naiver Mäuse

5.1.2 N-Glykosylierung auf Immunzellen der Lymphknoten

Auch im Lymphknoten weisen CD11c⁺ Zellen die mit Abstand höchste Intensität der N-Oberflächenglykosylierung auf (n = 11, Mittlere PHA-L-MFI = 90,24, SEM = 5,76). Auch hier unterscheiden sie sich in ihrer N-Oberflächenglykosylierung hoch signifikant von allen anderen in Abbildung 5-1 und Tabelle 9 dargestellten Immunzelltypen.

Neben dem ebenfalls bei Immunzellen der Milz festgestellten hochsignifikanten Unterschied der N-Oberflächenglykosylierung zwischen CD45r⁺-Zellen (n = 11, Middle PHA-L-MFI = 33,5, SEM = 2,03) und den CD4⁺-Zellen (n = 11, Mittlere PHA-L-MFI = 10,21, SEM = 0,55) sowie den CD8⁺-Zellen (n = 11, Mittlere PHA-L-MFI = 18,0, SEM = 1,37), besteht im Lymphknoten zusätzlich ein hoch signifikanter Unterschied zwischen der N-Oberflächenglykosylierung dieser beiden Zelltypen.

Dieser letztgenannte Unterschied kann auf eine organabhängige unterschiedliche N-Glykosylierung desselben Immunzelltyps hinweisen.

Zelltyp	CD8 ⁺ (n=11)	CD45r ⁺ (n=11)	CD11c ⁺ (n=11)
CD4 ⁺ (n=11)	Mittlere Differenz = 7,80 SEM = 1,48 p<0,001	Mittlere Differenz = 23,28 SEM = 2,10 p<0,001	Mittlere Differenz = 80,01 SEM = 5,79 p<0,001
CD8 ⁺ (n=11)	-	Mittlere Differenz = 15,48 SEM = 2,45 p<0,001	Mittlere Differenz = 72,22 SEM = 5,93 p<0,001
CD45r ⁺ (n=11)	-	-	Mittlere Differenz = 56,74 SEM = 6,11 p<0,001

Tabelle 9: Unterschiede in der N-Oberflächenglykosylierung zwischen Immunzellklassen aus Lymphknoten naiver Mäuse

5.1.3 Die Die Intensität der N-Oberflächenglykosylierung auf Immunzellen unterscheidet sich zwischen Milz und Lymphknoten aus naiven Tieren

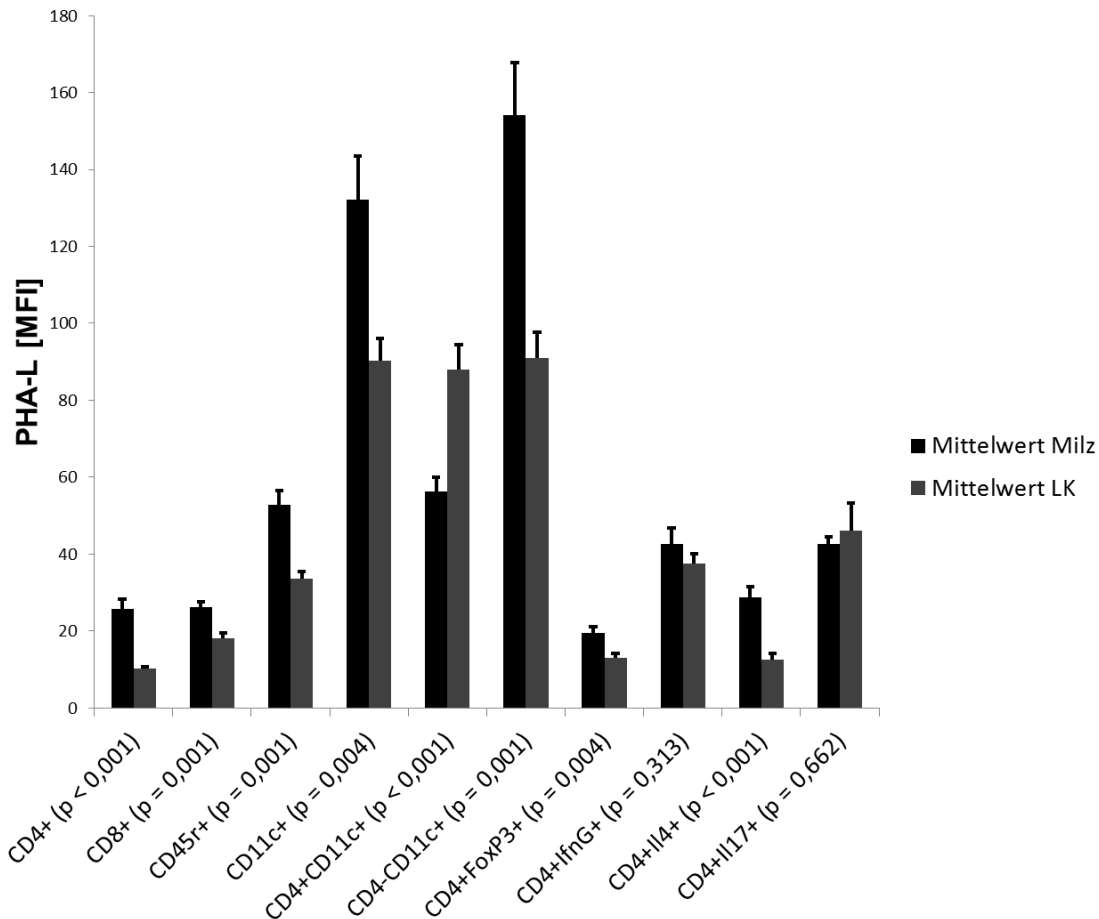


Abbildung 5-2: N-Glykosylierung der Immunzellen in der Milz und im Lymphknoten naiver Tiere einschließlich der untersuchten Subpopulationen.

Es wurden Immunzellen der Milz und der Lymphknoten aus naiven Tieren isoliert und nach Färbung mit zelltyp-spezifischen Antikörpern und PHA-L durchflusszytometrisch untersucht. Das Diagramm zeigt die Mittelwerte der Mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) für PHA-L. Die Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler (SEM). Die p-Werte beziehen sich auf die Unterschiede der PHA-L-Bindung der jeweiligen Zellpopulation zwischen Lymphknoten und Milz.

Bisher wurde nicht untersucht, ob Immunzellen desselben Typs sich in ihrer N-Oberflächenglykosylierung unterscheiden, wenn sie aus verschiedenen Organen stammen. Eine organabhängige N-Oberflächenglykosylierung wäre jedoch nicht zuletzt aufgrund der organabhängigen Oberflächen(glyko)proteinexpression zu erwarten [132]. Wir untersuchten

deshalb in der Folge Immunzellen aus Milz und Lymphknoten aus naiven Mäusen auf mögliche Unterschiede in ihrer N-Oberflächenglykosylierung.

Die Aufbereitung der Zellen erfolgte bis auf den fehlenden Erythrozytenlyseschritt bei Lymphknotenzellen identisch. Die N-Oberflächenglykosylierung der in Abbildung 5-1 gezeigten Zelltypen wurde durchflusszytometrisch wie bereits beschrieben ermittelt.

Zusätzlich erfolgte in Abbildung 5-2 und Tabelle 10 auch ein Vergleich der Subpopulationen (Näheres dazu unter 5.2). Th1-, Th2- und Th17-Zellen wurden dazu zuvor zur Identifikation mit PMA/Ionomycin zur Zytokinproduktion angeregt und nach der Markierung mit den extrazellulären Antikörpern permeabilisiert, sodass die Zytokinantikörper in die Zelle gelangen und dort ihre intrazellulären Antigene binden konnten. CD4⁺FoxP3⁺-Zellen wurden ebenfalls zur Antikörpermarkierung des intrazellulären Forkhead Box Protein 3 permeabilisiert. Allerdings ist bei diesen die Vergleichbarkeit aufgrund der methodisch zur Identifikation notwendigen Stimulation und Permeabilisierung nur eingeschränkt gegeben.

Bei Immunzellen aus der naiven Maus zeigen sich Unterschiede in der durchflusszytometrisch bestimmten N-Oberflächenglykosylierung auf Immunzellen desselben Typs aus Milz und Lymphknoten. Die meisten der untersuchten Zelltypen binden PHA-L signifikant stärker in der Milz als im Lymphknoten (siehe Tabelle 10). Ausnahme hiervon bilden die CD4 positiven dendritischen Zellen. Bei diesen ist die PHA-L-Bindungsintensität in der Milz deutlich stärker als im Lymphknoten.

Keinen signifikanten Unterschied in der N-Oberflächenglykosylierung findet sich zwischen Th1- und Th17-Zellen aus Milz und Lymphknoten.

Die hier festgestellte organspezifische Ausprägung der N-Oberflächenglykosylierung auf den meisten Immunzelltypen kann ein Hinweis auf eine organabhängige Aktivität N-Glykosylierender Prozesse in den Immunzellen sein. Auch eine unterschiedlich starke Expression N-Glykosylierter Oberflächenproteine ist denkbar.

	Milz	Lymphknoten	Differenz (Milz – Lymphknoten)
CD8⁺	n = 15; Mittelwert = 26,19; SEM = 1,43	n = 11; Mittelwert = 18,02; SEM = 1,37	8,17 (SEM=2,04; p = 0,001)
CD45r⁺	n = 18; Mittelwert = 52,80; SEM = 3,72	n = 11; Mittelwert = 33,50; SEM = 2,02	19,29 (SEM=5,04; p = 0,001)
CD4⁺	n = 14; Mittelwert = 25,64; SEM = 2,56	n = 11; Mittelwert = 10,22; SEM = 0,55	15,2 (SEM=2,94; p = 0,002)
CD11c⁺	n = 13; Mittelwert = 132,23; SEM = 11,23	n = 11; Mittelwert = 90,23; SEM = 5,76	42,00 (SEM=12,62; p = 0,004)
CD4⁺CD11c⁺	n = 13; Mittelwert = 56,29; SEM = 3,78	n = 11; Mittelwert = 88,06; SEM = 6,36	-31,78 (SEM=7,99; p < 0,001)
CD4⁻CD11c⁺	n = 13; Mittelwert = 154,09; SEM = 13,61	n = 11; Mittelwert = 90,94; SEM = 6,81	63,15 (SEM=15,21; p = 0,001)
CD4⁺FoxP3⁺	n = 19; Mittelwert = 19,52; SEM = 1,55	n = 12; Mittelwert = 12,75; SEM = 1,24	6,77 (SEM=2,19; p = 0,004)
CD4⁺IFNγ⁺	n = 19; Mittelwert = 42,50; SEM = 4,19	n = 9; Mittelwert = 37,49; SEM = 2,47	5,00 (SEM=6,37; p = 0,313)
CD4⁺II4⁺	n = 13; Mittelwert = 28,78; SEM = 2,67	n = 10; Mittelwert = 12,49; SEM = 1,61	16,28 (SEM=3,37; p < 0,001)
CD4⁺II17⁺	n = 19; Mittelwert = 42,61; SEM = 1,93	n = 10; Mittelwert = 45,97; SEM = 7,19	-3,35 (SEM=7,44; p = 0,662)

Tabelle 10: Unterschiede in der N-Oberflächenglykosylierung zwischen Milz- und Lymphknotenzellen aus naiven Mäusen

5.2 N-Glykosylierung verschiedener T Helfer Subpopulationen

5.2.1 Die N-Oberflächenglykosylierung ist auf CD4⁺FoxP3⁻- Zellen geringer ausgeprägt als auf CD4⁺FoxP3⁺-Zellen

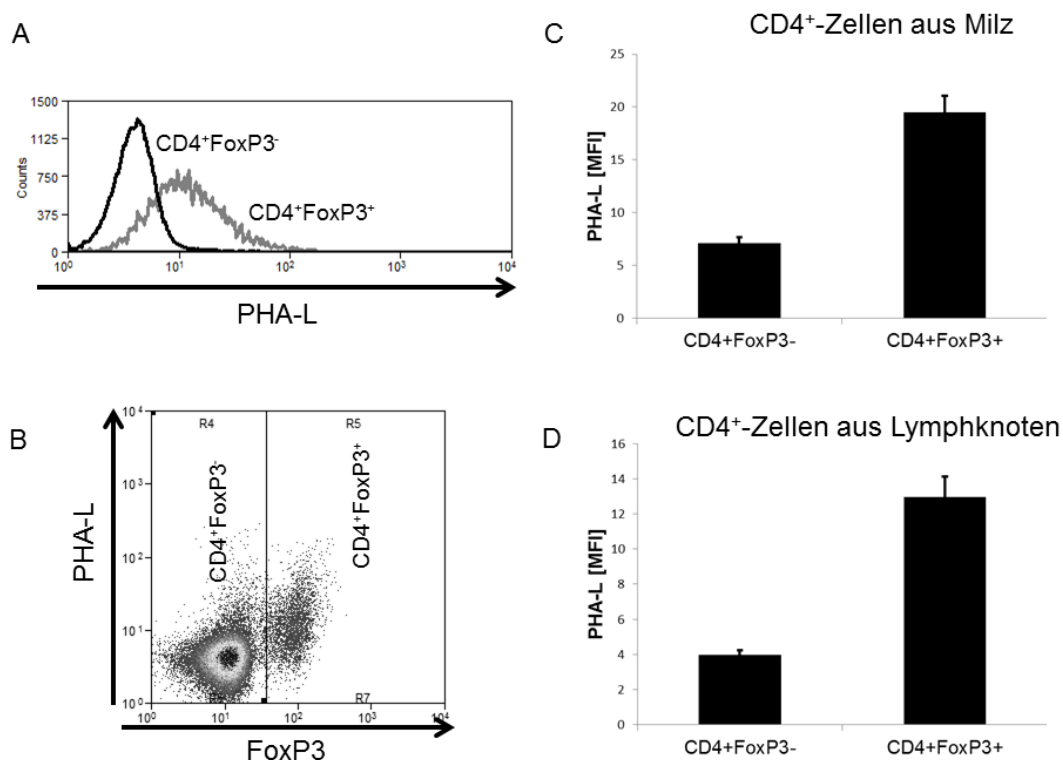


Abbildung 5-3: CD4⁺FoxP3⁺-Zellen weisen eine stärkere N-Glykosylierung auf als CD4⁺FoxP3⁻-Zellen

A/B: Durchflusszytometrische Analyse der PHA-L-Bindung an CD4⁺FoxP3⁺ und CD4⁺FoxP3⁻-Zellen. C/D: Die Diagramme zeigen die Mittelwerte der Fluoreszenzintensität (MFI) für PHA-L (Balken) und den SEM als positiven Fehlerindikator auf CD4⁺FoxP3⁻ T-Effektorzellen und CD4⁺FoxP3⁺ regulatorischen T-Zellen aus Milz und Lymphknoten.

Wie in [122] gezeigt, weisen CD4⁺CD25⁺-T-Zellen aus Milzen naiver Tiere eine höhere N-Oberflächenglykosylierung auf als CD4⁺CD25⁻-T-Effektorzellen. CD4⁺CD25⁺-T-Zellen sind nicht nur regulatorische T-Zellen sondern auch aktivierte T-Effektorzellen, deren IL2-Rezeptor hoch reguliert wurde. Eine

spezifischere Identifikation regulatorischer T-Zellen gelingt über die Darstellung des intrazellulären FoxP3-Moleküls mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers. Um zu überprüfen, ob die erwähnte unterschiedliche N-Oberflächenglykosylierung auch für naive regulatorische, über die antiFoxP3-Bindung identifizierte Zellen sowohl aus Milzen als auch aus Lymphknoten naiver Tiere gilt, wurden die entsprechenden Zellen nach dem oben genannten Schema aufbereitet, permeabilisiert und mit antiCD4- und antiFoxP3-Fluoreszenzantikörpern markiert. Die N-Oberflächenglykosylierung wurde über das Lectin PHA-L gekoppelt mit dem Fluoreszenzfarbstoff Pacific-Blue dargestellt. Wie in Abbildung 4-1 gezeigt, wurden die vom Durchflusszytometer erfassten Ereignisse zunächst im FS/SS-Dotplotdiagramm auf Lymphozyten eingeschränkt. Aus diesen wiederum wurden im CD4 /FoxP3 Diagramm CD4-positive Zellen ausgewählt und diese im unter Abbildung 5-3 B gezeigten FoxP3-/PHA-L-Dotplot dargestellt.

Naive regulatorische CD4⁺FoxP3⁺-Zellen weisen eine signifikant stärkere N-Glykosylierung auf als CD4⁺FoxP3⁻-T-Effektorzellen. Dies gilt für T-Zellen sowohl aus dem Lymphknoten (n = 13; Mittlere Differenz = 8,98; SEM = 1,18; p < 0,001) als auch der Milz (n = 19; Mittlere Differenz = 12,43; SEM = 1,64; p < 0,001). Dabei weisen die regulatorischen CD4⁺FoxP3⁺-Zellen aus der Milz eine signifikant höhere N-Oberflächenglykosylierung auf als die aus dem Lymphknoten (Abbildung 5-2). In weiteren Versuchen soll geklärt werden, ob die N-Oberflächenglykosylierung auch funktionelle Bedeutung hat (vgl. Absatz 5.6 und 5.7).

5.2.2 Die Intensität der N-Oberflächenglykosylierung auf naiven T-Zellen unterscheidet sich nach T-Zell-Subtyp

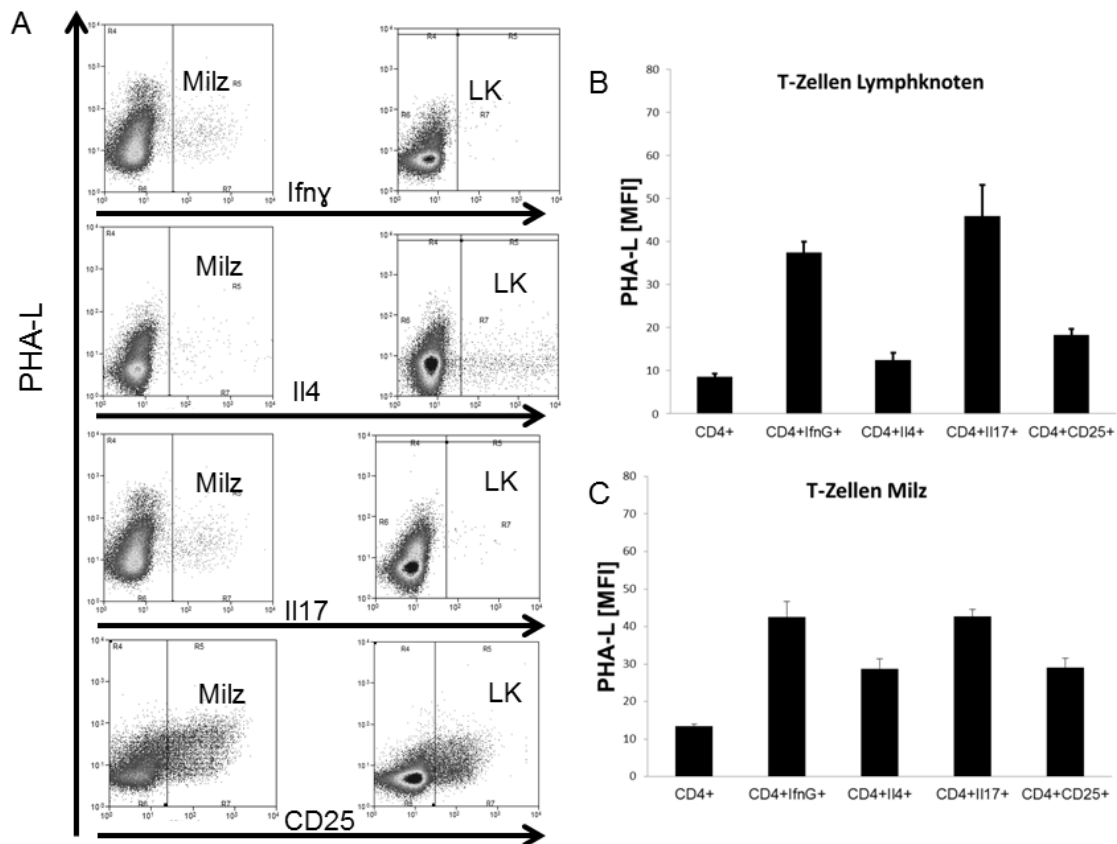


Abbildung 5-4: N-Glykosylierung auf verschiedenen Subtypen der T- Zellen.

A: Die repräsentativen Dotplots zeigen stimulierte und permeabilisierte CD4-positive Zellen aus Milz (linke Spalte) und Lymphknoten (rechte Spalte). Die CD4⁺CD25⁺-Zellen wurden nur permeabilisiert und nicht mit PMA/Ionomycin stimuliert. B/C: Grafische Darstellung der Werte aus. Die Diagramme zeigen die Mittelwerte der Fluoreszenzintensität (MFI) für PHA-L (Balken) und den SEM als positiven Fehlerindikator.

CD4⁺-T-Zellen lassen sich in verschiedene Subtypen unterteilen, deren jeweilige Rollen sich in der EAE unterscheiden (vgl. 2.3.4). Dabei kommt den Th1- und Th17-Zellen eine Schlüsselrolle in der Entstehung der Autoimmunität im ZNS zu, während Th2-Zellen hier eher regulierend wirken ebenso wie regulatorische T-Zellen. Wir analysierten die N-Oberflächenglykosylierung der verschiedenen T-Zellsubtypen, um zu erfahren, ob sich die verschiedenen Rollen auch in einer unterschiedlichen N-Glykosylierung der Oberflächenproteine widerspiegeln. Um die möglichen Unterschiede in der N-Oberflächenglykosylierung zwischen verschiedenen T-Zellsubtypen zu

untersuchen, wurden mit PMA/Ionomycin zur Zytokinproduktion angeregte Milz- und Lymphknotenzellen nach ihrer Markierung mit den extrazellulären Antikörpern mit Hilfe des BD-Bioscience-Kits permeabilisiert. Anschließend erfolgte die weitere Differenzierung mittels zytokinspezifischer Antikörper. Da die Permeabilisierung die Zelloberfläche je nach verwendetem Permeabilisierungskit unterschiedlich beeinflusst, wurden die in Abbildung 5-4 zum Vergleich hinzugezogenen CD4⁺-Zellen ebenfalls mit dem BD-Bioscience-Kit permeabilisiert und mit PMA/Ionomycin stimuliert. Die ebenfalls in Abbildung 5-4 dargestellten CD4⁺CD25⁺-Zellen wurden permeabilisiert aber nicht stimuliert. Wie oben geschrieben wurden CD4-positive Zellen im Lymphozytengate ausgewertet.

Mit PMA/Ionomycin zur Zytokinproduktion angeregte T-Zellsubtypen aus naiven Mäusen weisen ein unterschiedliches Ausmaß der N-Glykosylierung auf. Dabei besteht in beiden Organen zwischen Th17 und Th1 kein signifikanter Unterschied in der N-Oberflächenglykosylierung (Milz: Mittlere Differenz = -0,11, SEM = 4,61, p = 0,981, Lymphknoten: Mittlere Differenz = -28,86, SEM = 7,61, p = 0,289). Allerdings fällt die N-Oberflächenglykosylierung der Th2-Zellen deutlich geringer aus, als die der Th17-Zellen (Milz: Mittlere Differenz = -13,83, SEM = 3,22, p < 0,001, Lymphknoten: Mittlere Differenz = -33,46, SEM = 7,37, p < 0,001) beziehungsweise Th1-Zellen (Milz: Mittlere Differenz = -13,72, SEM = 4,97, p = 0,010, Lymphknoten: Mittlere Differenz = -25,00, SEM = 2,89, p < 0,001). Die N-Oberflächenglykosylierung auf unstimulierten aber permeabilisierten CD4⁺CD25⁺-Zellen unterscheidet sich in der Milz nicht signifikant von der auf Th2-Zellen (Mittlere Differenz = -0,172, SEM = 3,703, p=0,963). Im Lymphknoten allerdings zeigt sich eine signifikant intensivere N-Glykosylierung der CD4⁺CD25⁺-Zellen (Mittlere Differenz = -5,80, SEM = 2,094, p = 0,013). Sowohl in der Milz, als auch im Lymphknoten ist die Intensität der N-Oberflächenglykosylierung auf CD4⁺CD25⁺-Zellen geringer als die auf Th1 und Th17-Zellen. Auffallend ist, dass die differenzierten T-Zelltypen eine intensivere N-Oberflächenglykosylierung aufweisen, als die ebenfalls mit PMA/Ionomycin stimulierte CD4⁺ Gesamtpopulation. Die Aktivität der N-Glykosylierenden

Prozesse scheint Die N-Oberflächenglykosylierung auf CD4⁺-Zellen nimmt bei Stimulation mit PMA/Ionomycin zu

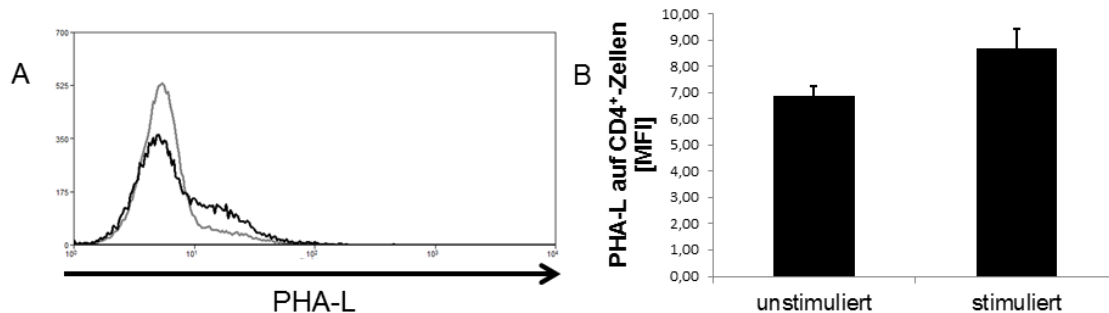


Abbildung 5-5: Nach Stimulation mit PMA/Ionomycin nimmt die N-Glykosylierung auf CD4⁺-Zellen zu. A: Durchflusszytometrische Bestimmung der N-Oberflächenglykosylierung auf mit antiCD4 markierten Zellen aus Lymphknoten gesunder Mäuse vor und nach Stimulation mit PMA/Ionomycin. Graue Kurve CD4⁺unstimuliert, Schwarze Kurve CD4⁺stimuliert. B: Die N-Glykosylierung auf CD4⁺-Zellen wird durch die Stimulation mit PMA/Ionomycin signifikant gesteigert. Das Diagramm zeigt die Mittelwerte der Mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) für PHA-L. Die Fehlerbalken geben den SEM als positiven Fehlerindikator an.

Die Stimulation mit anti-CD3/anti-CD28 führt in vitro zu einer Zunahme der N-Oberflächenglykosylierung [118, 122]. Die verschiedenen T Zell Population werden durch Bestimmung der spezifischen Zytokine nach polyklonaler Stimulation identifiziert. Um herauszufinden, ob schon die kurzzeitige, unspezifische Stimulation mit PMA/Ionomycin ausreicht, um das Ausmaß der N-Glykosylierung zu beeinflussen und damit bei eventuellen Vergleichen mit unstimulierten Zellen berücksichtigt werden muss, wurde die N-Oberflächenglykosylierung auf CD4⁺-Zellen vor und nach Stimulation mit PMA/Ionomycin durchflusszytometrisch bestimmt und verglichen. Aus Lymphknoten isolierte Lymphozyten wurden hierfür über 4h mit PMA/Ionomycin stimuliert. Auf den CD4⁺-Zellen zeigt sich eine signifikante Zunahme der N-Oberflächenglykosylierung (n = 7; Mittlere Differenz = 1,81; SEM = 0,79; p = 0,038). Das Experiment zeigt, dass eine Aktivierung der T-Zellen in vitro mit einer verstärkten N-Glykosylierung einhergeht. Selbst eine kurzzeitige, unspezifische Stimulation dieser Zellen reicht demnach aus, N-Glykosylierende Enzyme der Zelle hoch zu regulieren.

5.3 N-Glykosylierung verschiedener Subpopulationen dendritischer Zellen

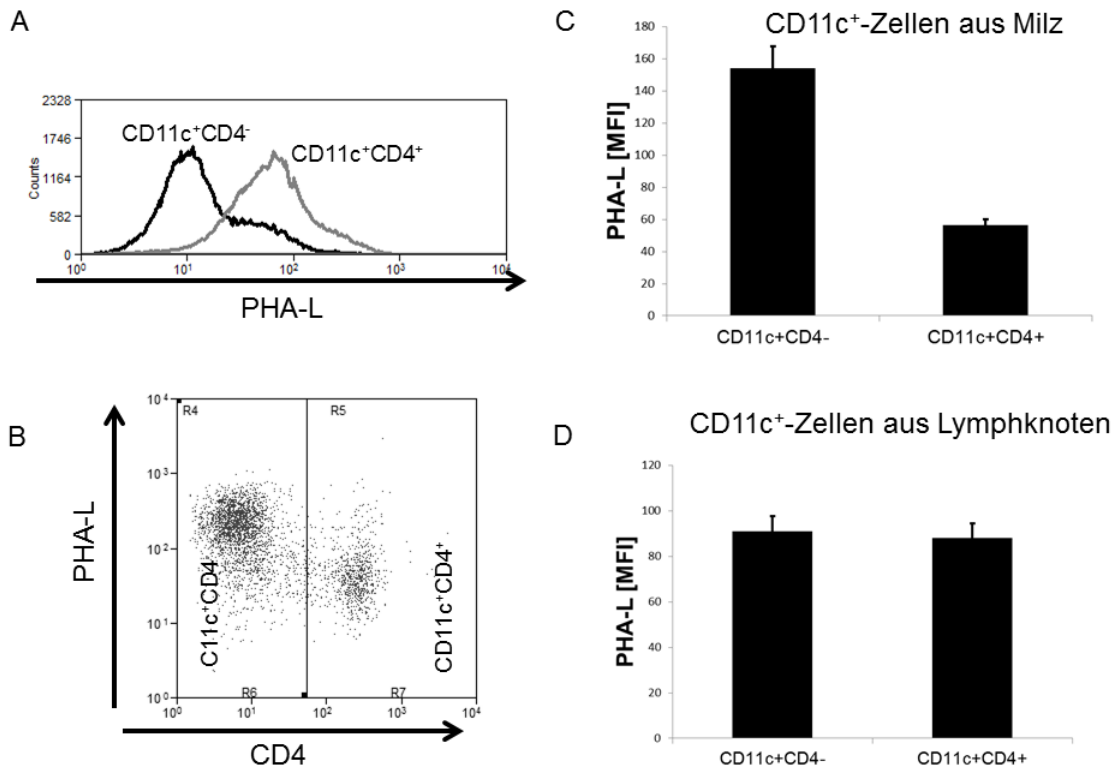


Abbildung 5-6: Naive CD11c⁺CD4⁻-Zellen aus der Milz zeigen eine intensivere N-Glykosylierung als CD11c⁺CD4⁺-Zellen A/B: Durchflusszytometrische Bestimmung der N-Oberflächenglykosylierung aus CD11c⁺-Zellen. Das repräsentative Dotplot und die Histogrammkurven zeigen die PHA-L Bindung auf CD11c⁺-Zellen der Milz. C/D: Die Diagramme zeigen die Mittelwerte der Fluoreszenzintensität (MFI) für PHA-L (Balken) und den SEM als positiven Fehlerindikator auf CD11c⁺-Zellen aus Milz und Lymphknoten.

Die Migrationsfähigkeit bzw. das Migrationsverhalten dendritischer Zellen ist vor allem auch von glykosylierten Oberflächenproteinen abhängig [132]. Dabei scheinen verschiedene Typen dendritischer CD11c⁺-Zellen in der Entstehung von Autoimmunität unterschiedliche Rollen zu spielen [72]. Diese Subklassen naiver dendritischer CD11c⁺-Zellen untersuchten wir auf Unterschiede in ihrer N-Oberflächenglykosylierung. Dazu wurden CD11c⁺-Zellen im Lymphozytengate in einem CD4/PHA-L-Dotplot dargestellt (Abbildung 5-6 B). Dendritische CD11c⁺-Zellen aus Milzen naiver Mäuse weisen eine

unterschiedlich intensive N-Oberflächenglykosylierung auf: CD11c⁺CD4⁻-Zellen weisen eine höhere Affinität zu PHA-L auf, als CD11c⁺CD4⁺-Zellen (n = 13, Mittlere Differenz der MFI = 97,80; SEM = 14,12; p < 0,001).

Interessanterweise findet sich im Lymphknoten kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den beiden Zellpopulationen (n = 11, Mittlere Differenz der MFI = 2,87; SEM = 9,31; p < 0,760).

Die N-Oberflächenglykosylierung auf CD4-positiven dendritischen Zellen ist im Lymphknoten deutlich höher (Mittlere Differenz = 29,06, SEM=7,99; p < 0,001) als in der Milz. Bei CD4-negativen dendritischen Zellen dagegen ist die Intensität der N-Glykosylierung in der Milz größer (vgl. Abbildung 5-2).

Der Unterschied in der N-Oberflächenglykosylierung zwischen den Organen lässt auf einen unterschiedlichen Aktivitätsgrad der N-Glykosylierenden Prozesse rückschließen. Dabei weisen die Subtypen der dendritischen Zellen möglicherweise aufgrund ihrer spezifischen Oberflächenglykoproteinausstattung unterschiedliche PHA-L-Bindungsintensitäten auf, die für das jeweilige Verhalten im Aktivierungsfall verantwortlich sein könnte.

5.4 Verlauf der PLP139-151 induzierten EAE in SJL-Mäusen

Zunächst wurde untersucht, ob sich während der Entstehung und im Verlauf von Autoimmunität im ZNS die N-Oberflächenglykosylierung der Immunzellen ändert. Dazu wurde am Tag 8 nach EAE-Induktion mit PLP 139-151 Peptid den Mäusen die Milzen und poplitealen Lymphknoten, die das Injektionsareal der Immunisierungsemulsion hauptsächlich drainieren, entnommen. Am Tag 8 nach EAE-Induktion ist die Aktivierung der Lymphozyten in diesen Lymphknoten maximal [115]. Die poplitealen Lymphknoten der immunisierten Tiere wiesen dabei deutliche Schwellungen im Vergleich zu den gesunden Kontrollmäusen auf. Die nach EAE-Induktion täglich visitierten Mäuse zeigten bis zum Tag 8 keine oder allenfalls sehr schwache neurologische Auffälligkeiten (Score 0-1). Ab Tag 10 nach EAE-Induktion entwickeln die Tiere klinische Zeichen der EAE.

Die Reaktion auf die Immunisierung lässt sich in der Milz schon im FS/SS-Dotplot der Durchflusszytometrie erkennen (Abbildung 5-7). Besonders auffällig ist hierbei die Zunahme größerer, stärker granulierter Zellen, die morphologisch neutrophilen Granulozyten entsprechen könnten.

Im Lymphknoten dagegen erkennt man durchflusszytometrisch keine vergleichbare Zunahme von großen, granulären Zellen (Abbildung 5-7 A). Nach der zelltypspezifischen, durchflusszytometrischen Analyse erkennt man aber vor allem auf den Immunzellen aus den Lymphknoten eine intensive Änderung der N-Oberflächenglykosylierung.

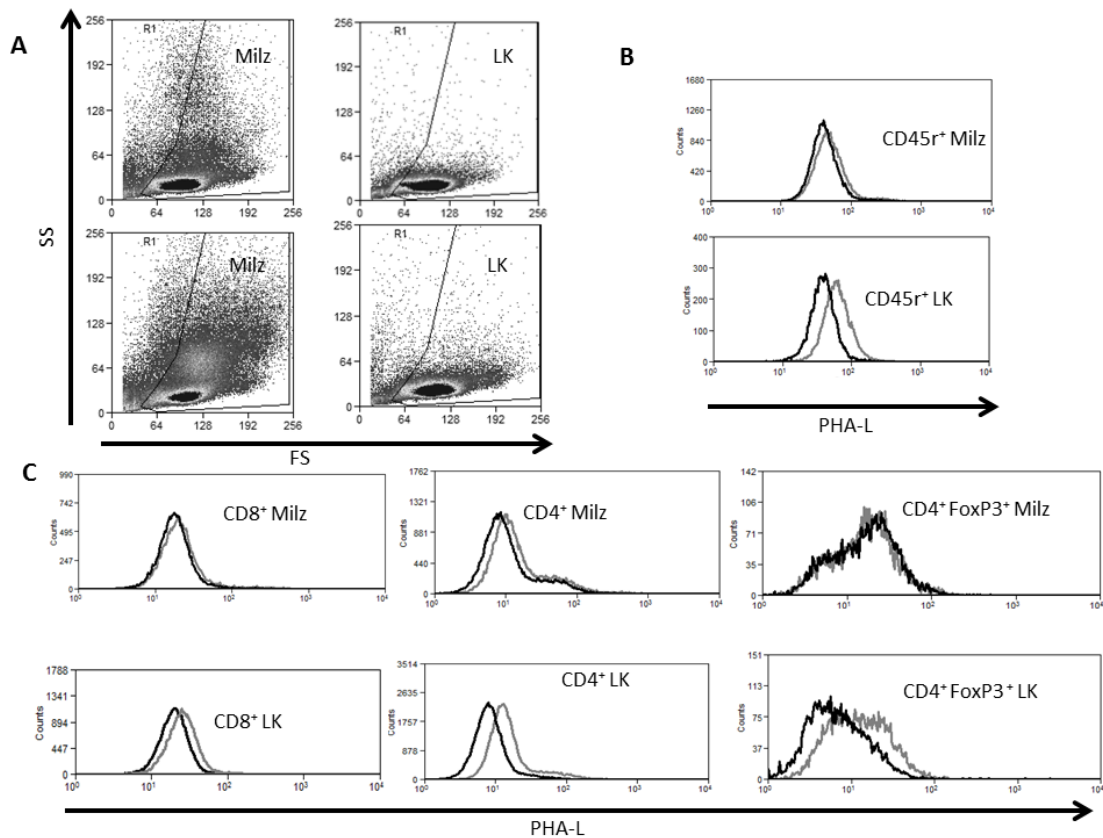


Abbildung 5-7: N-Glykosylierung auf Immunzellen immunisierter Tiere im Vergleich zu gesunden Tieren.

An Tag 8 nach Immunisierung wurden Immunzellen aus den poplitealen Lymphknoten und der Milz isoliert. Nach Markierung mit zelltyp-spezifischen Antikörpern und PHA-L wurden diese durchflusszytometrisch untersucht und mit den entsprechenden Immunzellen aus gesunden Tieren verglichen. A: FS/SS Dotplot der isolierten Milz- und Lymphknotenzellen aus naiven (oben) und immunisierten (unten) Tieren. B/C: Die schwarzen Kurven zeigen die durchflusszytometrisch ermittelte N-Glykosylierung auf Immunzellen gesunder Tiere, graue

Kurven die auf immunisierten Tieren an Tag 8 nach Immunisierung. Die Zelltypen wurden exemplarisch gewählt und repräsentieren mindestens 9 Messungen nach identischem Versuchsprotokoll.

5.5 Änderung der N-Glykosylierung der Immunzellen während der Entstehung und im Verlauf der PLP139-151-induzierten EAE

Zur Bestimmung der Oberflächenglykosylierung wurden die Zellen aus den drainierenden Lymphknoten und Milz isoliert, mit zelltypspezifischen Antikörpern gefärbt und durchflusszytometrisch untersucht.

In den folgenden Abschnitten wird diese Änderung der N-Oberflächenglykosylierung bis zum 8. Tag nach EAE-Induktion zelltypspezifisch auf Ausmaß und statistische Signifikanz hin analysiert. Dabei erhöhen vor allem die Immunzellen der Lymphknoten ihre N-Oberflächenglykosylierung in der Induktionsphase der EAE.

Die meisten der untersuchten Zelltypen aus dem Lymphknoten zeigen an Tag 8 nach Immunisierung eine hoch signifikante Zunahme der N-Glykosylierung. So nimmt beispielsweise auf CD8⁺ zytotoxischen T Zellen, B-Zellen, CD4⁺ Helfer T Zellen und CD4⁺FoxP3⁺ regulatorischen T Zellen die N-Oberflächenglykosylierung nach Immunisierung deutlich zu (Abbildung 5-7 B/C). Die einzige Ausnahme unter den untersuchten Immunzelltypen bilden die Th17-Zellen. Hier findet keine signifikante Änderung in der N-Oberflächenglykosylierung statt (vgl. Abbildung 5-8).

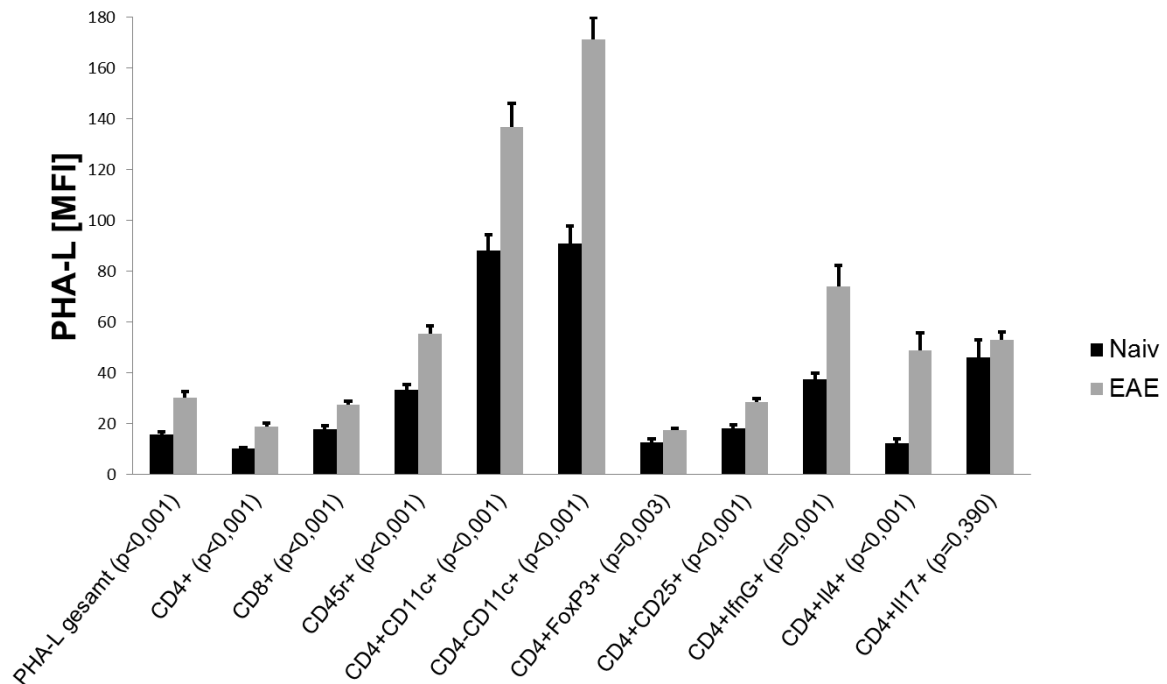


Abbildung 5-8: N-Glykosylierung der Immunzellen im Lymphknoten.

Immunzellen wurden aus den poplitealen Lymphknoten von naiven Mäusen und von Mäusen 8 Tage nach EAE-Induktion isoliert und nach Färbung mit zelltyp-spezifischen Antikörpern und PHA-L durchflusszytometrisch untersucht. Das Diagramm zeigt die Mittelwerte der Mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) für PHA-L. Die Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler (SEM). Die p-Werte beziehen sich auf die Unterschiede der PHA-L-Bindung der jeweiligen Zellpopulation zwischen naiven und immunisierten Mäusen.

Die Analyse der einzelnen Zelltypen zeigte, dass sich nach Immunisierung die N-Oberflächenglykosylierung auf den Immunzellen kontinuierlich ändert, ohne dass abgrenzbare Populationen mit und ohne N-Glykosylierung vorliegen (vgl. Abbildung 5-7B/C). Besonders auffällig ist die Zunahme der N-Oberflächenglykosylierung auf CD4⁺Il4⁺ Th2-Zellen aus immunisierten Tieren auf fast 300% des Ausmaßes in naiven Tieren.

5.6 Kifunensin hemmt die N-Glykosylierung regulatorischer T Zellen

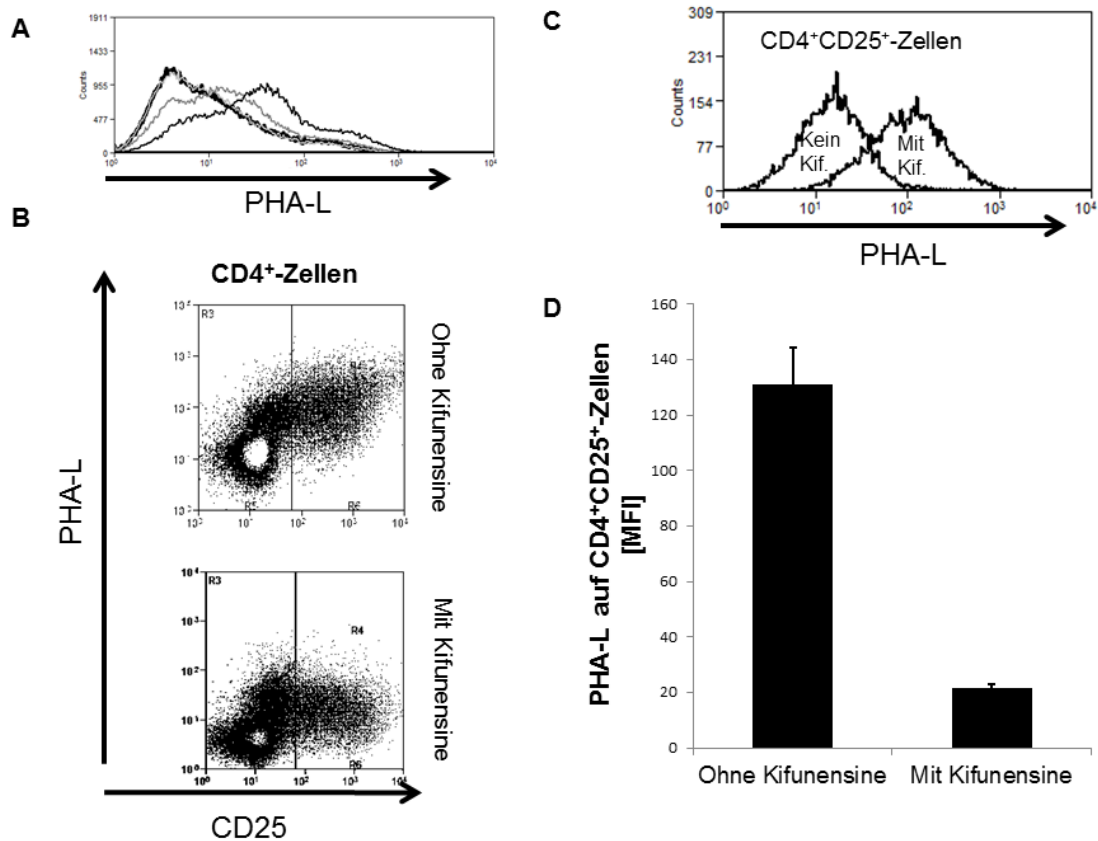


Abbildung 5-9: Kifunensin reduziert das Ausmaß der N-Oberflächenglykosylierung.

Durchflusszytometrische Analyse der N-Glykosylierung auf CD4⁺-Zellen der Milz vor und nach Inkubation mit Kifunensin. A: Die Kurve in dünnem Schwarz stellt die MFI der PHA-L-Bindung auf Lymphozyten ohne Kifunensin dar. Die Kurve in kräftigem Schwarz stellt die MFI nach Inhibition mit 20µM Kifunensin dar (in Folgeversuchen verwendet). Dunkelgrau: 2µM Kifunensin, Hellgrau: 60µM Kifunensin B/C: Für die Versuchsreihe repräsentatives Dotplot/Histogramm: Mit antiCD4 markierte Zellen wurden mit PBS (oben) oder Kifunensin (unten) über zwei Tage inkubiert. C: N-Oberflächenglykosylierung auf CD4⁺CD25⁺-Zellen. D: Das Diagramm zeigt die Mittelwerte der Fluoreszenzintensität (MFI) für PHA-L auf CD4⁺CD25⁺-Zellen. Die Fehlerbalken geben den SEM als positiven Fehlerindikator an.

Kifunensin ist als effektiver Inhibitor der N-Glykosylierung bekannt [128]. Zur Überprüfung, ob mittels Kifunensin eine Reduktion der N-Oberflächenglykosylierung zu erreichen ist wurde die alpha-1,2-Mannosidase der Zellen mit Kifunensin inhibiert. Die Inkubationsdauer von 2 Tagen und die geeignete Konzentration von 20µM ermittelten wir dabei in Vorversuchen bei denen wir neben der Reduktion der N-Oberflächenglykosylierung auch die

Anzahl vitaler Zellen nach der Inkubationszeit berücksichtigten. Die Reduktion der N-Oberflächenglykosylierung mittels Inhibition der alpha-1,2-Mannosidase stellte sich dabei als dosisabhängig heraus. Die Kifunensin-Konzentration von 20µM wurde gewählt, weil unter ihr die zuverlässigste Inhibition der alpha-1,2-Mannosidase bei gleichzeitig möglichst hohem Anteil vitaler Zellen möglich war. Die Inkubationsdauer von 48h wurde ebenfalls in den Vorversuchen nach den eben genannten Kriterien ermittelt.

Durch das beschriebene Inkubationsprotokoll wird eine hoch signifikante Reduktion der N-Glykosylierung auf CD4⁺CD25⁺ T-Zellen erzielt (n=6; SEM=13,4; p<0,001). Die Identifikation der CD4⁺CD25⁺ T-Zellen mit dem Durchflusszytometer erfolgte wie oben beschrieben.

Die Ergebnisse zeigen deutlich die direkte, positive Korrelation der Funktion der alpha-1,2-Mannosidase mit der N-Oberflächenglykosylierung auf CD4⁺CD25⁺ regulatorischen T-Zellen. Kifunensin inhibiert effektiv die Prozessierung von N-Glykanen (vgl. Abbildung 6-1).

5.7 Regulatorische T Zellen mit verminderter N-Glykosylierung haben eine reduzierte Fähigkeit zur Hemmung der Proliferation von Effektor T Lymphozyten

Die N-Oberflächenglykosylierung ist mit funktionellen Änderungen der Zelle assoziiert (vgl. 2.5). Regulatorischen T-Zellen wird eine inhibitorische Wirkung auf die Proliferation von T-Effektorzellen zugeschrieben [34, 100]. Um den Einfluss einer mittels Kifunensin inhibierten N-Oberflächenglykosylierung auf diese Funktion der regulatorischen T-Zellen zu untersuchen, wurden frisch isolierte, CFSE-markierte CD4⁺CD25⁻ T-Effektor-Zellen aus der Milz zusammen mit zuvor über 2 Tage mit Kifunensin inkubierten CD4⁺CD25⁺ regulatorischen Zellen (Treg_{kif}), ebenfalls aus der Milz stammend, mit anti-CD3/anti-CD28-Antikörpern stimuliert.

Es zeigt sich am 3. Tag nach Stimulationsbeginn ein mit im Mittel 10,45% signifikant höherer Anteil an geteilten Zellen bei den mit Treg_{kif} inkubierten

CD4⁺CD25⁻-Zellen als in der Kontrollgruppe (n=3; SEM=0,867; p=0,007). Ermittelt wurde hierfür der Anteil an Zellen, die mindestens eine Teilung durchlaufen haben (vgl. 4.8).

Die N-Oberflächenglykosylierung bzw. die Funktion der alpha-1,2-Mannosidase als direkt mit der N-Oberflächenglykosylierung assoziiertes Enzym scheint demnach einen negativen Einfluss auf die Fähigkeit regulatorischer T-Zellen zu nehmen, die Proliferation von T-Effektorzellen zu hemmen.

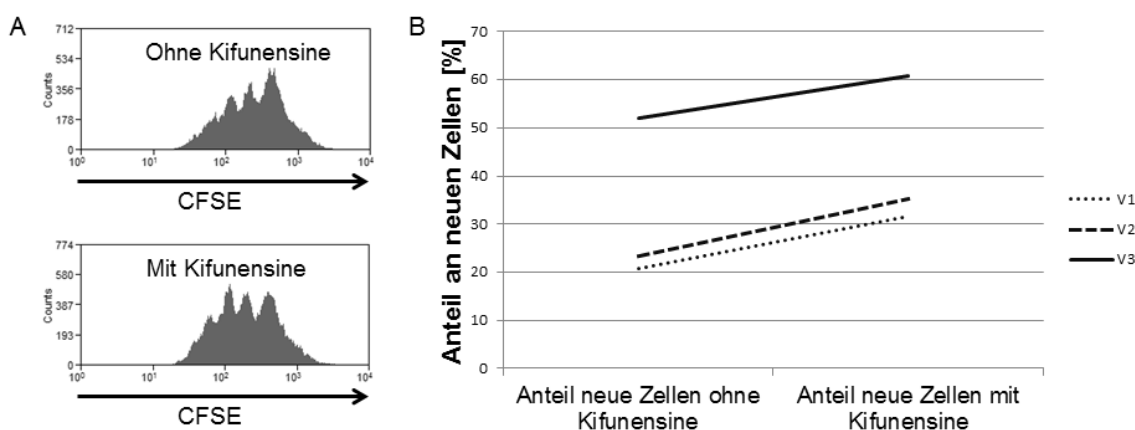


Abbildung 5-10: CD4⁺CD25⁺-Zellen, die mit Kifunensin inkubiert wurden, hemmen die Proliferation von CD4⁺CD25⁻-Zellen weniger effektiv als naive CD4⁺CD25⁺-Zellen.

Proliferationsassay von CD4⁺CD25⁻-Zellen mit Kifunensin oder PBS inkubierten CD4⁺CD25⁺-Zellen A: Repräsentative Histogramme. Gezeigt sind CFSE-markierte CD4⁺-Zellen an Tag 3 nach Simulationsbeginn zusammen mit entweder Kifunensin- oder PBS-inkubierten CD4⁺CD25⁺-Zellen. Der rechte Gipfel im CFSE-Histogramm stellt die Zellen mit der höchsten CFSE-Fluoreszenzintensität dar. Diese haben bis zum Messzeitpunkt keine Teilung durchlaufen. B: V1-V3 stellen die Versuchsreihen mit den Unterschieden in den beiden Ansätzen dar

6 Diskussion

Diese Arbeit untersucht die N-Glykosylierung auf Immunzellen und ihre Bedeutung für die Zellfunktion. In den ersten Untersuchungen stand der Vergleich der Intensität der N-Glykosylierung auf Immunzellen im Vordergrund. Die Ergebnisse der Versuche zeigen eine unterschiedliche Ausprägung der N-Glykosylierung auf den verschiedenen Immunzelltypen. So ist beispielsweise auf CD4⁺FoxP3⁺ regulatorischen T Zellen im Vergleich zu CD4⁺FoxP3⁻T-

Effektorzellen eine höhere N-Glykosylierung erkennbar. Eine höhere N-Oberflächenglykosylierung auf den regulatorischen CD25⁺-T-Zellen aus Milzen naiver Tiere als auf den CD25⁻-T-Effektorzellen war bereits zuvor bekannt [122]. Diesen Unterschied bestätigen unsere Daten in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Demetriou et al. auch für über die FoxP3-Expression definierte, regulatorische T-Zellen [121]. Die Identifikation regulatorischer CD4⁺-T-Zellen über eine FoxP3-Markierung ist dabei als genauer als über die CD25-Markierung zu betrachten, da der IL2-Rezeptor auch auf aktivierten T-Effektorzellen zu finden ist. CD4⁺CD25⁺-Zellen stellen damit eine Mischpopulation aus regulatorischen T-Zellen und aktivierten T-Effektorzellen dar [97-99].

Bei der weiteren Analyse der N-Glykosylierung von naiven CD4⁺FoxP3⁺ regulatorischen T Zellen fällt besonders auch die geringer ausgeprägte N-Oberflächenglykosylierung auf regulatorischen T-Zellen aus Lymphknoten als die auf Zellen desselben Typs aus Milzen auf. Dieser Unterschied wurde zum ersten Mal gezeigt. Die geringere N-Oberflächenglykosylierung im Lymphknoten im Vergleich zur Milz findet sich bemerkenswerterweise auch auf den meisten anderen der untersuchten Immunzelltypen mit Ausnahme der CD4⁺CD11c⁺-Zellen.

Die organabhängige Intensität der N-Oberflächenglykosylierung hängt möglicherweise mit der bereits bekannten Assoziation der N-Glykosylierung mit der Migrationsfähigkeit von Immunzellen zusammen [133]. Die negative Beeinträchtigung der Endotheladhäsions- sowie Homingfähigkeit von regulatorischen T-Zellen mit einer experimentell induzierten, ineffektiven N-Glykosylierung wurde in diesem Zusammenhang bereits beschrieben [122]. Ähnliche Einflüsse der N-Glykosylierung wurden auch auf die Metastasierungsfähigkeit entarteter Zellen beobachtet [134]. Auf migrationsfähigen bzw. zirkulierenden Zellen ist damit eine Funktion der N-Glykosylierung bei der Identifikation des Zielgewebes bzw. der Adhäsion an dieses denkbar.

Als gesichert in diesem Zusammenhang gilt die durch variable N-Glykosylierung hervorgerufene Beeinflussung der Bindungsstärke von Oberflächenglykoproteinen wie CD62L oder CD44 an ihre Liganden und damit unter anderem auch an Gewebetypen [122, 135, 136]. Die Expression dieser Moleküle auf der Zelloberfläche unterscheidet sich je nach Zellsubtyp und variiert innerhalb eines Zelltyps in Abhängigkeit vom beim Aktivieren festgelegten Zielgewebe [132, 137]. Die gewebespezifische Ausstattung mit Oberflächenglykoproteinen kann aufgrund des unspezifischen PHA-L-Bindevhaltens für sich genommen ebenfalls eine Erklärung für die gemessenen Unterschiede der N-Glykosylierung auf Zellen desselben Typs aus verschiedenen Organen sein.

Neben der unterschiedlichen Intensität der N-Oberflächenglykosylierung je nach Herkunftsorgan fallen auch die teilweise stark ausgeprägten Unterschiede der N-Oberflächenglykosylierung zwischen den untersuchten Immunzellklassen auf. Diese Unterschiede wurden bisher nicht analysiert. Da sich jedoch nicht nur die Immunzellklassen, sondern auch deren Subtypen in der Intensität ihrer N-Oberflächenglykosylierung unterscheiden, ist das Ausmaß dieser als spezifisch für den jeweiligen (Sub-)Zelltyp zu vermuten.

Hierbei ist bei Immunzellen aus gesunden Tieren als Ursache am ehesten eine unterschiedliche, zell(sub-)typspezifische Expression von N-Glykosylierten Oberflächenproteinen zu vermuten [119, 136]. Allerdings wäre auch eine zelltypspezifisch unterschiedliche Aktivität N-Glykosylierender Prozesse denkbar und müsste durch geeignete Analysen überprüft werden, wie beispielsweise durch den quantitativen Nachweis der mRNA von an der N-Oberflächenglykosylierung beteiligten Enzymen wie durch die Gruppe von Long [122].

Bei den nach Immunisierung festgestellten Änderungen der N-Glykosylierung auf Immunzellen sind dagegen andere als die eben dargestellten Ursachen wahrscheinlicher. Nach Stimulation bzw. Aktivierung ist eine Zunahme der N-Oberflächenglykosylierung auf T-Zellen bei Stimulation, bedingt durch eine Zunahme der N-Glykosylierenden Zellenzyme bekannt [122, 138, 139]. In

unseren Untersuchungen reicht bereits eine kurzzeitige, unspezifische Stimulation aus, um eine signifikant höhere N-Oberflächenglykosylierung auf CD4⁺-T-Zellen zu erzielen. Die N-Glykosylierenden Prozesse können somit offenbar kurzfristig, aber dennoch effektiv reguliert werden.

Auch bei einer in-vivo-Stimulation der Immunzellen in Form einer EAE-Induktion bei SJL-Mäusen zeigen unsere Daten an Tag 8 nach Induktion eine signifikant stärkere N-Glykosylierung auf den meisten Immunzelltypen des Lymphknotens. Auf den vergleichbaren Milzzellen ist zu diesem Zeitpunkt auf fast keinem Zelltyp eine Veränderung der N-Oberflächenglykosylierung zu erkennen. Interessanterweise besteht eine Ausnahme in den für die frühe Phase der EAE verantwortlich gemachten Th1-Zellen, sowie den fast parallel, möglicherweise zur kompensatorischen Gegenregulation aktivierten Th2-Zellen. Ebenso fällt auf, dass der Unterschied der N-Oberflächenglykosylierung bei CD4⁺CD11c⁺-Zellen im Vergleich zum naiven Tier im immunisierten Tier noch deutlicher ausfällt.

Die erwähnten organabhängigen Unterschiede in der N-Oberflächenglykosylierung, die zwischen den Zellen desselben Typs bei naiven Tieren bestanden, sind ab Tag 8 nach Immunisierung meist nicht mehr nachweisbar. Nach dem bekannten Verlauf der EAE bei SJL-Mäusen [115], beginnen zu diesem Zeitpunkt durch lokale Immunisierung aktivierte Immunzellen in den systemischen Kreislauf überzugehen. Die Zunahme der N-Glykosylierung auf der Oberfläche der Immunzellen aus Lymphozyten ist demnach zeitlich mit der Migration immunisierter Zellen aus den lokalen Lymphknoten assoziiert. Dieser Zusammenhang kann als weitere Bestätigung für die vermutete Bedeutung einer korrekten N-Glykosylierung für die Migrationsfähigkeit von Zellen gesehen werden [122, 133, 134].

Im Gegensatz zu den meisten anderen der untersuchten Zellen, intensivieren Th1-, Th2- und CD4⁺CD11c⁺-Zellen ihre N-Glykosylierung nach unseren Daten schon vergleichsweise früh nach Immunisierung auch in der Milz. Vor allem den Th1- und CD4⁺CD11c⁺-Zellen wird in der Frühphase der spezifischen Immunreaktion auf die Immunisierung eine Schlüsselrolle zugeschrieben [67].

Die frühe Intensivierung der N-Glykosylierung zeigt auch hier eine zeitliche Assoziation mit der Aktivierungsreihenfolge der Zellen im Verlauf der EAE.

Aus früheren Untersuchungen ist zu vermuten, dass eine funktionierende N-Glykosylierung für die inflammatorische Immunantwort an sich essentiell ist [138, 140]. Neben der oben genannten Migrationsfähigkeit wird auch die Empfindlichkeit bestimmter Rezeptoren, wie z.B. des TCR, gegenüber ihren Liganden durch das Ausmaß der N-Glykosylierung moduliert [140, 141]. Dabei führen ineffektive N-Glykosylierende Prozesse, im Sinne einer Reduktion des Ausmaßes der N-Glykosylierung eines Proteins eher zu hyperreagiblen T-Zellen [118], während eine Induktion N-Glykosylierender Prozesse eher supprimierend wirkt [142]. Eine frühzeitige Hochregulation dieser Prozesse, wie bei Th1-Zellen beobachtet, kann als physiologische Gegenregulation zur Stimulation gesehen werden, welche durch Zunahme der N-Glykosylierung und damit herabgesetzter Rezeptorempfindlichkeit für weiter stimulierende Liganden vermittelt werden könnte.

Mit den von uns gewählten Methoden und Experimenten kann jedoch keine Aussage über ein bestimmtes Oberflächenprotein und dessen N-Glykosylierung gemacht werden. Die hier gezeigten Daten lassen dennoch die N-Glykosylierung von Zelloberflächenproteinen auf Immunzellen als interessantes Ziel für detailliertere Untersuchungen zum Verständnis der EAE-Entwicklung in SJL-Mäusen erscheinen. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass eine Induktion N-Glykosylierender Prozesse via oraler GlcNAc-Gabe nach EAE-Induktion deren Fortschreiten verhindert [142]. Auch beim Menschen wurde in einer ersten klinischen Studie diese Form der Immunmodulation bei Morbus-Crohn-Patienten bereits vielversprechend erprobt [143]. Die gegenteiligen Effekte dieser Induktion der N-Glykosylierung wären demnach bei einer Inhibition der N-Glykosylierung zu erwarten.

In unseren in-vitro Versuchen bewirkt eine solche Inhibition der N-Glykosylierung mittels Kifunensin jedenfalls sowohl eine Änderungen des Zellphänotyps bezogen auf die N-Oberflächenglykosylierung als auch der Zellfunktion. Im Gegensatz zu zuvor erhobenen Daten [122], hemmen mit

Kifunensin behandelte regulatorische T-Zellen in unseren in-vitro Experimenten die Proliferation von T-Effektorzellen weniger effektiv als naive regulatorische T-Zellen. Die unterschiedlichen Resultate im Vergleich zu E.T. Long et al. [122] könnten sich durch unterschiedliche Kifunensin-Behandlungsprotokolle, respektive Einwirkzeiten erklären lassen. Das von uns angewandte Inkubationsprotokoll, insbesondere die Inkubationszeit, wurde dabei auch in anderen Arbeitsgruppen zur effektiven Suppression zellulärer N-Glykane genutzt [144].

Unsere Ergebnisse des Proliferationsassays lassen im Umkehrschluss vermuten, dass regulatorische T-Zellen mit verstärkter N-Oberflächenglykosylierung limitierend auf das Ausmaß der T-Zellaktivierung auf einen spezifischen Reiz wirken. Ähnliches lassen auch Daten vermuten, bei denen in nicht weiter aufgeteilten CD4⁺-Zellpopulationen nach Inhibition mit Kifunensin eine höhere IL2-Sezernierung durch die T-Zellen nachgewiesen werden konnte als in der Kontrolle, was für einen höheren Aktivierungsgrad der inhibierten Zellen spricht [139].

Weiterhin sind β 1,6GlcNAc-verknüpfte N-Glykane das bevorzugte Substrat der iGnT zur Bildung von Poly- N-Acetylglukosaminen, die wiederum als Bindungsstelle für Galectine fungieren [145]. Galectine können beispielsweise die Funktion des TCR beeinflussen [146]. Regulatorische T-Zellen mit fehlender Galectin-Bindungsstelle hemmen die Proliferation von CD4⁺CD25⁻-Zellen weniger effektiv als regulatorische T-Zellen vom Wildtyp [147]. Da Kifunensin die N-Glykosylierung, wie oben gezeigt, sehr effektiv hemmt und damit kaum β 1,6GlcNAc-verknüpfte N-Glykane prozessiert werden (vgl. Abbildung 6-1), könnte dieses Fehlen der iGnT-Substrate eine mögliche Erklärung für die ineffektive Suppressorwirkung der Kifunensin-inhibierten regulatorischen T-zellen sein. Bei Swainsonine, einem weiteren Inhibitor der N-Glykosylierung, wurden ähnliche Effekte beobachtet [118]. Auch über andere experimentelle Methoden hervorgerufene Unterbrechungen der N-Glykosylierung, Poly- N-Acetylglukosamin-Bildung oder Galectin-Bindung führen zu hyperreagiblen T-Zellen [118, 134, 141, 146, 148]. Umgekehrt kann die Aktivität der

Glykosylierenden Enzyme durch Vitamin D bzw. seinen aktiven Metabolit induziert werden, wodurch die Empfindlichkeit weiblicher Versuchstiere gegenüber der EAE-Entwicklung gesenkt werden konnte [149]. Erste klinische Studien bei MS-Patienten scheinen immunmodulatorische Effekte für Hochdosis-Vitamin-D-Gaben zu belegen [150]. Zu beachten ist jedoch, dass es sich bei der N-Glykosylierung um einen hoch komplexen Prozess handelt, bei dem die Auswirkungen durch dessen Beeinflussung im Ganzen noch nicht bekannt sind. So werden neben den Oberflächenglykoproteinen auch andere zelluläre Proteine wie z.B. Zytokine und damit deren Bindungsverhalten durch eine Inhibition N-Glykosylierender Prozesse beeinflusst [151]. Eine umfangreiche biochemische Analyse möglicher Änderungen einer Manipulation der N-Glykosylierung stellt hohe Anforderungen an die eingesetzten Methoden.

Das Verständnis dieser Zusammenhänge würde bei der Erklärung vieler ungelöster Fragen im Zusammenhang mit der N-Glykosylierung helfen. Ungeklärt ist beispielsweise, wieso sowohl eine organismusweite Unterbrechung der N-Glykosylierung in allen Zellen (z.B. der genetische Knock-Out entsprechender Enzyme), ähnliche immunologische Effekte hervorruft, wie die Unterbrechung in einer einzelnen Zellpopulationen (z.B. T-Zellen) oder gar deren Subpopulation (z.B. regulatorische T-Zellen). Allerdings wurden hier bisher nur Untersuchungen unter (tier-)experimentellen Bedingungen mit vergleichsweise eingeschränkter Fragestellung und streng auf diese ausgerichteten Endpunkten durchgeführt, sodass mögliche Nebenwirkungen dieser Form der Modulation des Immunsystems bisher kaum bekannt sind.

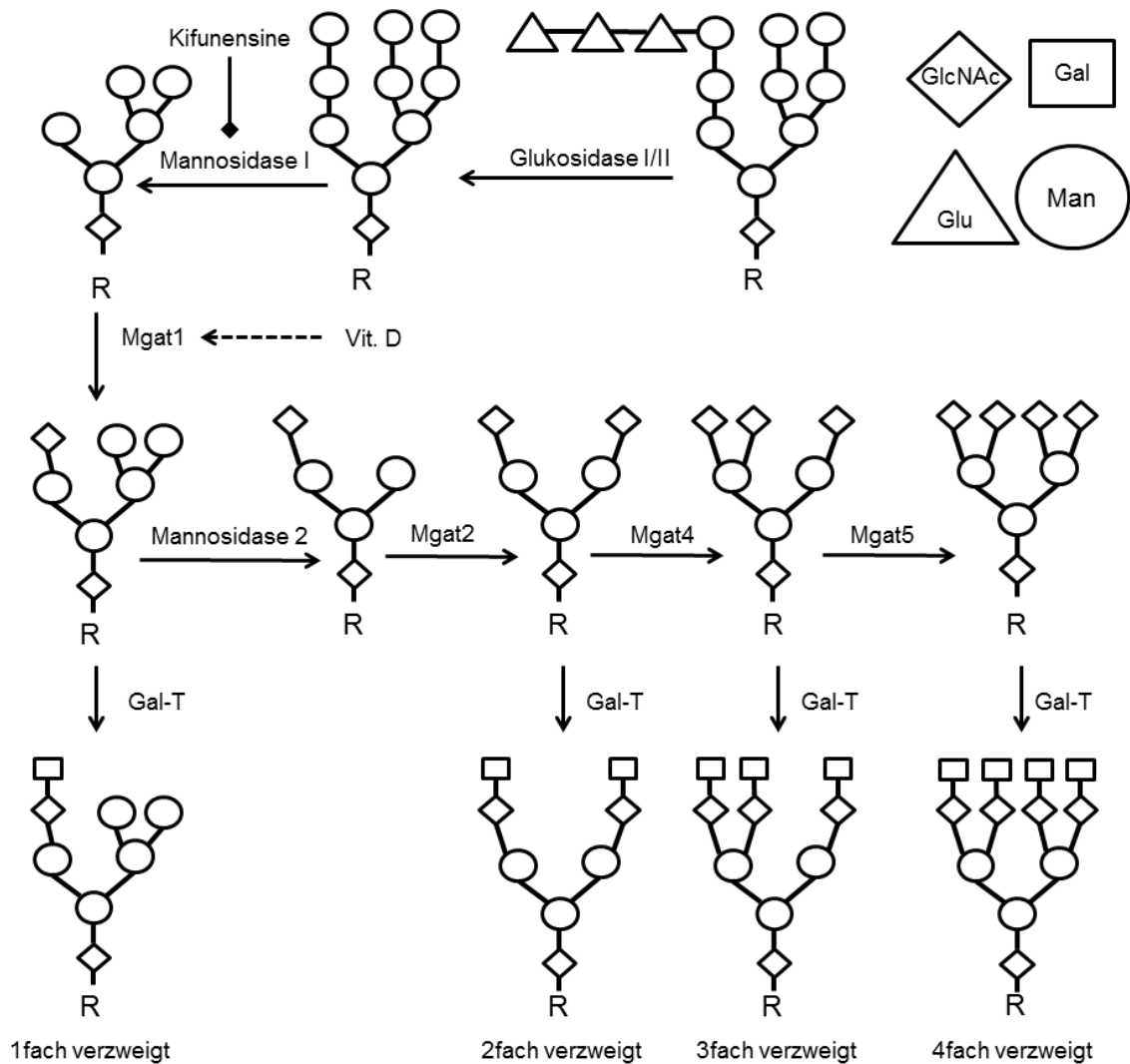


Abbildung 6-1: Prozessierung von N-Glykanen im endoplasmatischen Retikulum bzw. Golgiapparat: Der hoch regulierte Prozess ist abhängig von der Stoffwechselsituation und dem Aktivierungsgrad der Zelle (vgl. z.B. [120]). Neben einer guten Versorgungslage mit dem Substrat UDP-GlcNAc induziert beispielsweise auch aktiviertes Vitamin D diesen Prozess (gestrichelter Pfeil). Kifunensin inhibiert die N-Glykosylierung in einem sehr frühen Stadium (Pfeil mit Rautenende). PHA-L bindet an die Endprodukte dieses Stoffwechselweges [123] und kann somit als Marker für den Aktivitätsgrad der N-Glykosylierung eingesetzt werden. Verwendete Abkürzungen: Gal = Galactosyltransferase 3, Man = Mannose, Gal = Galactose, Glu = Glukose, GlcNAc = N-Acetylglukosamin, Mgat = Monoacylglycerol-Acyltransferase.

6.1 Ausblick

N-Glykosylierende Prozesse wurden in den letzten Jahren als mögliche Schlüsselprozesse in der Entstehung der MS identifiziert [118, 149]. Dieser hochregulierte, posttranslationale Prozess ist nicht nur von genetisch determinierten Enzymen abhängig, sondern wird auch von Umweltfaktoren wie

etwa der Sonneneinstrahlung beeinflusst. Viele in epidemiologischen Untersuchungen zur Multiplen Sklerose diskutierte Einflussfaktoren wie Sonneneinstrahlung, Vitamin-D-Versorgung und genetische Prädisposition greifen auch in den biochemischen Prozess der N-Glykosylierung von Proteinen modulierend ein [149].

Die Ergebnisse unserer Untersuchungen bestätigen die Bedeutung weiterer Untersuchungen N-Glykosylierender Prozesse und deren Auswirkung auf komplexe Sachverhalte wie die Entstehung der Autoinflammation im Rahmen der EAE. Epidemiologische, genetische und klinische Studien weisen auf eine Vergleichbarkeit der Bedeutung der N-Glykosylierung für immunologische Prozesse im Tiermodell und beim Menschen hin. Prinzipien zur Beeinflussung N-Glykosylierender Prozesse könnten damit auch beim Menschen ähnliche Effekte haben. Die von verschiedenen Arbeitsgruppen gezeigten Effekte manipulierender Interventionen erscheinen dabei vielversprechend für die Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze nicht nur bei MS sondern auch bei anderen autoinflammatorischen Erkrankungen. Dafür sind jedoch noch weitere, genauere Untersuchungen erforderlich. So ist beispielsweise die Bedeutung der N-Glykosylierung für bekannte, MS-kritische Proteine nur unvollständig untersucht, ebenso wie physiologischen Regulationsmechanismen der intrazellulären N-Glykosylierenden Prozesse in Abhängigkeit vom Zelltyp.

7 Zusammenfassung

In Experimenten diverser Arbeitsgruppen zeigt sich eine Beeinflussbarkeit der Entstehung und des Verlaufs der EAE durch die Manipulation N-Glykosylierender Prozesse, weshalb wir anhand dieses Tiermodells für die MS systematisch FACS-Analysen der N-Oberflächenglykosylierung auf an der EAE-Entwicklung beteiligten Immunzelltypen aus Milz und Lymphknoten sowohl aus gesunden als auch aus immunisierten SJL-Mäusen untersuchten.

Wir konnten zeigen, dass die Intensität der N-Oberflächenglykosylierung auf den an der Pathogenese der EAE beteiligten Immunzellen in naiven Mäusen zelltypabhängig ist. Dabei unterscheiden sich sowohl die gängigen Gruppen wie

T-Zellen, B-Zellen und dendritische Zellen als auch deren Subklassen wie etwa T-Helfer-Zellen oder CD4⁺- und CD4⁻-dendritische Zellen im Ausmaß ihrer N-Oberflächenglykosylierung. Das Ausmaß dieser bestimmt dabei nicht nur den Zellphänotyp sondern auch die Zellfunktion. Über eine Inhibition der intrazellulären N-Glykosylierung mittels Kifunensin gelingt eine massive Reduktion der N-Oberflächenglykosylierung. In unseren Versuchen zeigten regulatorische T-Zellen mit auf diese Weise gehemmter N-Glykosylierung eine geringere inhibitorische Wirkung auf die T-Effektorzellproliferation als regulatorische T-Zellen mit unbeeinflusster N-Glykosylierung.

Immunzellen desselben Subtyps unterscheiden sich je nach Lokalisation in ihrer N-Oberflächenglykosylierung. Im Lymphknoten ist die N-Oberflächenglykosylierung in der Regel deutlich geringer ausgeprägt als auf Immunzellen aus der Milz. 8 Tage nach Immunisierung mit PLP 139-151-Peptid kommt es bei Immunzellen aus den das Injektionsareal drainierenden Lymphknoten zu einer hochsignifikanten Zunahme der N-Oberflächenglykosylierung auf den meisten Immunzellen, deren Ausprägung zelltypabhängig ausfällt. In der Milz zeigen zu diesem Zeitpunkt nur wenige Immunzelltypen eine Reaktion in Form einer Änderung der N-Oberflächenglykosylierung. Die zwischen Immunzellen aus Milz und Lymphknoten aus naiven Tieren bestehenden Unterschiede in der N-Oberflächenglykosylierung sind 8 Tage nach Immunisierung nur noch für wenige Zelltypen nachweisbar.

Die Ergebnisse unserer Experimente unterstreichen die Bedeutung weiterer Untersuchungen N-Glykosylierender Prozesse und deren Auswirkung auf komplexe Sachverhalte wie die Entstehung der Autoinflammation im Rahmen der MS. Dabei erscheint die EAE als vielversprechendes Modell. Interessant sind diese Prozesse für weitere Forschungsarbeiten vor allem durch ihre multifaktorielle Beeinflussbarkeit z.B. durch Genetik und Umweltfaktoren. Viele Einzelprozesse und -faktoren und deren genaue Bedeutung sind jedoch nach wie vor unklar und erfordern weitere detaillierte Untersuchungen.

8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2-1: Entwicklung der verschiedenen CD4 ⁺ -T-Zell-Linien aus der undifferenzierten Th0-Zelle.....	15
Abbildung 2-2: Struktur der Glykanreste	19
Abbildung 4-1: FSC-SSC-Dotplot mit ausgewähltem Bereich R1.....	34
Abbildung 5-1: N-Glykosylierung der Immunzellen in der Milz und im Lymphknoten naiver Tiere.....	37
Abbildung 5-2: N-Glykosylierung der Immunzellen in der Milz und im Lymphknoten naiver Tiere einschließlich der untersuchten Subpopulationen. .	40
Abbildung 5-3: CD4 ⁺ FoxP3 ⁺ -Zellen weisen eine stärkere N-Glykosylierung auf als CD4 ⁺ FoxP3 ⁻ -Zellen	43
Abbildung 5-4: N-Glykosylierung auf verschiedenen Subtypen der T- Zellen. .	45
Abbildung 5-5: Nach Stimulation mit PMA/Ionomycin nimmt die N-Glykosylierung auf CD4 ⁺ -Zellen zu.	47
Abbildung 5-6: Naive CD11c ⁺ CD4 ⁻ -Zellen aus der Milz zeigen eine intensivere N-Glykosylierung als CD11c ⁺ CD4 ⁺ -Zellen.....	48
Abbildung 5-7: N-Glykosylierung auf Immunzellen immunisierter Tiere im Vergleich zu gesunden Tieren.....	50
Abbildung 5-8: N-Glykosylierung der Immunzellen im Lymphknoten.	52
Abbildung 5-11: Kifunensin reduziert das Ausmaß der N-Oberflächenglykosylierung.	53
Abbildung 5-12: CD4 ⁺ CD25 ⁺ -Zellen, die mit Kifunensin inkubiert wurden, hemmen die Proliferation von CD4 ⁺ CD25 ⁻ -Zellen weniger effektiv als naive CD4 ⁺ CD25 ⁺ -Zellen.....	55
Abbildung 6-1: Prozessierung von N-Glykanen im endoplasmatischen Retikulum bzw. Golgiapparat:.....	62

9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Antikörper	22
Tabelle 2: Verwendete Lectine	23
Tabelle 3: Für die Experimente verwendete Chemikalien	25
Tabelle 4: Verwendete Laborgeräte	26
Tabelle 5: Verwendete Einwegmaterialien	27
Tabelle 6: Verwendete Lösungen und deren Zusammensetzung	28
Tabelle 7: Verwendete Software	28
Tabelle 8: Unterschiede in der N-Oberflächenglykosylierung zwischen Immunzellklassen aus der Milz naiver Mäuse	38
Tabelle 9: Unterschiede in der N-Oberflächenglykosylierung zwischen Immunzellklassen aus Lymphknoten naiver Mäuse	39
Tabelle 10: Unterschiede in der N-Oberflächenglykosylierung zwischen Milz- und Lymphknotenzellen aus naiven Mäusen	43

10 Literaturverzeichnis

1. Noseworthy, J.H., et al., *Multiple sclerosis*. N Engl J Med, 2000. **343**(13): p. 938-52.
2. Poeck K, H.W., *Multiple Sklerose*, in *Neurologie*. 2006, Springer Medizin Verlag: Heidelberg, Germany. p. 490-506.
3. Polman, C.H., et al., *Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the McDonald criteria*. Ann Neurol, 2011. **69**(2): p. 292-302.
4. Freedman, M.S., et al., *Recommended standard of cerebrospinal fluid analysis in the diagnosis of multiple sclerosis: a consensus statement*. Arch Neurol, 2005. **62**(6): p. 865-70.
5. Weinshenker, B.G., et al., *The natural history of multiple sclerosis: a geographically based study. I. Clinical course and disability*. Brain, 1989. **112 (Pt 1)**: p. 133-46.
6. Lublin, F.D. and S.C. Reingold, *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, 1996. **46**(4): p. 907-11.
7. Hafler, D.A., et al., *Risk alleles for multiple sclerosis identified by a genomewide study*. N Engl J Med, 2007. **357**(9): p. 851-62.
8. Cree, B.A., et al., *A major histocompatibility Class I locus contributes to multiple sclerosis susceptibility independently from HLA-DRB1*15:01*. PLoS One, 2010. **5**(6): p. e11296.
9. Bush, W.S., et al., *Evidence for polygenic susceptibility to multiple sclerosis--the shape of things to come*. Am J Hum Genet, 2010. **86**(4): p. 621-5.
10. Patsopoulos, N.A., et al., *Genome-wide meta-analysis identifies novel multiple sclerosis susceptibility loci*. Ann Neurol, 2011. **70**(6): p. 897-912.
11. Sawcer, S., et al., *Genetic risk and a primary role for cell-mediated immune mechanisms in multiple sclerosis*. Nature, 2011. **476**(7359): p. 214-9.
12. Baranzini, S.E., et al., *Genome, epigenome and RNA sequences of monozygotic twins discordant for multiple sclerosis*. Nature, 2010. **464**(7293): p. 1351-6.
13. Ponsonby, A.L., A. McMichael, and I. van der Mei, *Ultraviolet radiation and autoimmune disease: insights from epidemiological research*. Toxicology, 2002. **181-182**: p. 71-8.

14. Lucas, R.M., et al., *Sun exposure and vitamin D are independent risk factors for CNS demyelination*. Neurology, 2011. **76**(6): p. 540-8.
15. Munger, K.L., et al., *Serum 25-hydroxyvitamin D levels and risk of multiple sclerosis*. JAMA, 2006. **296**(23): p. 2832-8.
16. Campbell, G.R., et al., *Mitochondrial DNA deletions and neurodegeneration in multiple sclerosis*. Ann Neurol, 2011. **69**(3): p. 481-92.
17. Ferguson, B., et al., *Axonal damage in acute multiple sclerosis lesions*. Brain, 1997. **120 (Pt 3)**: p. 393-9.
18. Prineas, J.W., et al., *Immunopathology of secondary-progressive multiple sclerosis*. Ann Neurol, 2001. **50**(5): p. 646-57.
19. Barnett, M.H. and J.W. Prineas, *Relapsing and remitting multiple sclerosis: pathology of the newly forming lesion*. Ann Neurol, 2004. **55**(4): p. 458-68.
20. Barnett, M.H. and I. Sutton, *The pathology of multiple sclerosis: a paradigm shift*. Curr Opin Neurol, 2006. **19**(3): p. 242-7.
21. Locatelli, G., et al., *Primary oligodendrocyte death does not elicit anti-CNS immunity*. Nat Neurosci, 2012. **15**(4): p. 543-50.
22. Goodman, A.D., et al., *Sustained-release oral fampridine in multiple sclerosis: a randomised, double-blind, controlled trial*. Lancet, 2009. **373**(9665): p. 732-8.
23. Kapoor, R., et al., *Lamotrigine for neuroprotection in secondary progressive multiple sclerosis: a randomised, double-blind, placebo-controlled, parallel-group trial*. Lancet Neurol, 2010. **9**(7): p. 681-8.
24. Trapp, B.D. and K.A. Nave, *Multiple sclerosis: an immune or neurodegenerative disorder?* Annu Rev Neurosci, 2008. **31**: p. 247-69.
25. Tselis, A., *Epstein-Barr virus cause of multiple sclerosis*. Curr Opin Rheumatol, 2012. **24**(4): p. 424-8.
26. Hernan, M.A., et al., *Multiple sclerosis and age at infection with common viruses*. Epidemiology, 2001. **12**(3): p. 301-6.
27. Berger, T. and M. Reindl, *Multiple sclerosis: disease biomarkers as indicated by pathophysiology*. J Neurol Sci, 2007. **259**(1-2): p. 21-6.
28. de Rosbo, N.K. and A. Ben-Nun, *T-cell responses to myelin antigens in multiple sclerosis; relevance of the predominant autoimmune reactivity to myelin oligodendrocyte glycoprotein*. J Autoimmun, 1998. **11**(4): p. 287-99.

29. Dornmair, K., et al., *T-cell-mediated autoimmunity: novel techniques to characterize autoreactive T-cell receptors*. Am J Pathol, 2003. **163**(4): p. 1215-26.
30. Goverman, J.M., *Immune tolerance in multiple sclerosis*. Immunol Rev, 2011. **241**(1): p. 228-40.
31. Böcker W, D.H., Heitz Ph U, Moch H, *Immunreaktionen*, in *Pathologie*, I.B.A. Müller Ch, Holländer G A, Editor. 2010, Elsevier GmbH, München: München, Germany. p. 74-114.
32. Sospedra, M. and R. Martin, *Immunology of multiple sclerosis*. Annu Rev Immunol, 2005. **23**: p. 683-747.
33. Wells, A.D., et al., *T cell effector function and anergy avoidance are quantitatively linked to cell division*. J Immunol, 2000. **165**(5): p. 2432-43.
34. Walker, L.S., et al., *Antigen-dependent proliferation of CD4+ CD25+ regulatory T cells in vivo*. J Exp Med, 2003. **198**(2): p. 249-58.
35. Constant, S.L. and K. Bottomly, *Induction of Th1 and Th2 CD4+ T cell responses: the alternative approaches*. Annu Rev Immunol, 1997. **15**: p. 297-322.
36. Kebir, H., et al., *Human TH17 lymphocytes promote blood-brain barrier disruption and central nervous system inflammation*. Nat Med, 2007. **13**(10): p. 1173-5.
37. Genain, C.P., et al., *Identification of autoantibodies associated with myelin damage in multiple sclerosis*. Nat Med, 1999. **5**(2): p. 170-5.
38. McLean, B.N., R.W. Luxton, and E.J. Thompson, *A study of immunoglobulin G in the cerebrospinal fluid of 1007 patients with suspected neurological disease using isoelectric focusing and the Log IgG-Index. A comparison and diagnostic applications*. Brain, 1990. **113** (Pt 5): p. 1269-89.
39. Colombo, M., et al., *Accumulation of clonally related B lymphocytes in the cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients*. J Immunol, 2000. **164**(5): p. 2782-9.
40. Meinl, E., M. Krumbholz, and R. Hohlfeld, *B lineage cells in the inflammatory central nervous system environment: migration, maintenance, local antibody production, and therapeutic modulation*. Ann Neurol, 2006. **59**(6): p. 880-92.
41. Owens, G.P., et al., *The B cell response in multiple sclerosis*. Neurol Res, 2006. **28**(3): p. 236-44.

42. Hauser, S.L., et al., *B-cell depletion with rituximab in relapsing-remitting multiple sclerosis*. N Engl J Med, 2008. **358**(7): p. 676-88.
43. Serafini, B., et al., *Dysregulated Epstein-Barr virus infection in the multiple sclerosis brain*. J Exp Med, 2007. **204**(12): p. 2899-912.
44. Serafini, B., et al., *Detection of ectopic B-cell follicles with germinal centers in the meninges of patients with secondary progressive multiple sclerosis*. Brain Pathol, 2004. **14**(2): p. 164-74.
45. Franciotta, D., et al., *B cells and multiple sclerosis*. Lancet Neurol, 2008. **7**(9): p. 852-8.
46. Coffman, R.L. and I.L. Weissman, *B220: a B cell-specific member of the T200 glycoprotein family*. Nature, 1981. **289**(5799): p. 681-3.
47. Bleesing, J.J. and T.A. Fleisher, *Human B cells express a CD45 isoform that is similar to murine B220 and is downregulated with acquisition of the memory B-cell marker CD27*. Cytometry B Clin Cytom, 2003. **51**(1): p. 1-8.
48. Aguzzi A, G.M., Tolnay M, Hans V, Wiestler O D, *Multiple Sklerose*, in *Pathologie*, D. Böcker W, H, Heitz Ph U, Moch H, Editor. 2008, Elsevier: Munich, Germany. p. 298-300.
49. Traugott, U., E. Reinherz, and C. Raine, *Multiple sclerosis: distribution of T cell subsets within active chronic lesions*. Science, 1983. **219**(4582): p. 308-310.
50. Sajic, M., et al., *The role of CD8(+) T cells in a model of multiple sclerosis induced with recombinant myelin oligodendrocyte glycoprotein*. Mult Scler, 2012. **18**(3): p. 286-98.
51. Sobel, R.A. and V.K. Kuchroo, *The immunopathology of acute experimental allergic encephalomyelitis induced with myelin proteolipid protein. T cell receptors in inflammatory lesions*. J Immunol, 1992. **149**(4): p. 1444-51.
52. Huseby, E.S., et al., *A pathogenic role for myelin-specific CD8(+) T cells in a model for multiple sclerosis*. J Exp Med, 2001. **194**(5): p. 669-76.
53. Ji, Q. and J. Goverman, *Experimental autoimmune encephalomyelitis mediated by CD8+ T cells*. Ann N Y Acad Sci, 2007. **1103**: p. 157-66.
54. Saxena, A., et al., *Role of CD8 T cell subsets in the pathogenesis of multiple sclerosis*. FEBS Lett, 2011. **585**(23): p. 3758-63.
55. Sun, D., et al., *Myelin antigen-specific CD8+ T cells are encephalitogenic and produce severe disease in C57BL/6 mice*. J Immunol, 2001. **166**(12): p. 7579-87.

56. Deb, C., et al., *CD8+ T cells cause disability and axon loss in a mouse model of multiple sclerosis*. PLoS One, 2010. **5**(8): p. e12478.
57. Correale, J. and A. Villa, *Role of CD8+ CD25+ Foxp3+ regulatory T cells in multiple sclerosis*. Ann Neurol, 2010. **67**(5): p. 625-38.
58. Hart, D.N., *Dendritic cells: unique leukocyte populations which control the primary immune response*. Blood, 1997. **90**(9): p. 3245-87.
59. Lee, H.K. and A. Iwasaki, *Innate control of adaptive immunity: dendritic cells and beyond*. Semin Immunol, 2007. **19**(1): p. 48-55.
60. Steinman, R.M. and H. Hemmi, *Dendritic cells: translating innate to adaptive immunity*. Curr Top Microbiol Immunol, 2006. **311**: p. 17-58.
61. Pulendran, B., K. Palucka, and J. Banchereau, *Sensing pathogens and tuning immune responses*. Science, 2001. **293**(5528): p. 253-6.
62. Rissoan, M.C., et al., *Reciprocal control of T helper cell and dendritic cell differentiation*. Science, 1999. **283**(5405): p. 1183-6.
63. Steinman, R.M., D. Hawiger, and M.C. Nussenzweig, *Tolerogenic dendritic cells*. Annu Rev Immunol, 2003. **21**: p. 685-711.
64. Bailey-Bucktrout, S.L., et al., *Cutting edge: central nervous system plasmacytoid dendritic cells regulate the severity of relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis*. J Immunol, 2008. **180**(10): p. 6457-61.
65. Banchereau, J. and R.M. Steinman, *Dendritic cells and the control of immunity*. Nature, 1998. **392**(6673): p. 245-52.
66. Brocker, T., M. Riedinger, and K. Karjalainen, *Targeted expression of major histocompatibility complex (MHC) class II molecules demonstrates that dendritic cells can induce negative but not positive selection of thymocytes in vivo*. J Exp Med, 1997. **185**(3): p. 541-50.
67. Isaksson, M., et al., *Plasmacytoid DC promote priming of autoimmune Th17 cells and EAE*. Eur J Immunol, 2009. **39**(10): p. 2925-35.
68. Isaksson, M., et al., *Conditional DC depletion does not affect priming of encephalitogenic Th cells in EAE*. Eur J Immunol, 2012.
69. Steinman, R.M., *The dendritic cell system and its role in immunogenicity*. Annu Rev Immunol, 1991. **9**: p. 271-96.
70. Vremec, D., et al., *CD4 and CD8 expression by dendritic cell subtypes in mouse thymus and spleen*. J Immunol, 2000. **164**(6): p. 2978-86.

71. McLellan, A.D., et al., *Anatomic location and T-cell stimulatory functions of mouse dendritic cell subsets defined by CD4 and CD8 expression*. Blood, 2002. **99**(6): p. 2084-93.
72. Amend, B., et al., *Induction of autoimmunity by expansion of autoreactive CD4+CD62Llow cells in vivo*. J Immunol, 2006. **177**(7): p. 4384-90.
73. Harrington, L.E., et al., *Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages*. Nat Immunol, 2005. **6**(11): p. 1123-32.
74. Mosmann, T.R., et al., *Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins*. J Immunol, 1986. **136**(7): p. 2348-57.
75. Steinman, L., *A brief history of T(H)17, the first major revision in the T(H)1/T(H)2 hypothesis of T cell-mediated tissue damage*. Nat Med, 2007. **13**(2): p. 139-45.
76. Tato, C.M. and J.J. O'Shea, *Immunology: what does it mean to be just 17?* Nature, 2006. **441**(7090): p. 166-8.
77. O'Connor, K.C., A. Bar-Or, and D.A. Hafler, *The neuroimmunology of multiple sclerosis: possible roles of T and B lymphocytes in immunopathogenesis*. J Clin Immunol, 2001. **21**(2): p. 81-92.
78. Panitch, H.S., et al., *Exacerbations of multiple sclerosis in patients treated with gamma interferon*. Lancet, 1987. **1**(8538): p. 893-5.
79. Baker, D., J.K. O'Neill, and J.L. Turk, *Cytokines in the central nervous system of mice during chronic relapsing experimental allergic encephalomyelitis*. Cell Immunol, 1991. **134**(2): p. 505-10.
80. Bright, J.J., et al., *Expression of IL-12 in CNS and lymphoid organs of mice with experimental allergic encephalitis*. J Neuroimmunol, 1998. **82**(1): p. 22-30.
81. Lock, C., et al., *Gene-microarray analysis of multiple sclerosis lesions yields new targets validated in autoimmune encephalomyelitis*. Nat Med, 2002. **8**(5): p. 500-8.
82. Hafler, D.A., *Multiple sclerosis*. J Clin Invest, 2004. **113**(6): p. 788-94.
83. Park, H., et al., *A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17*. Nat Immunol, 2005. **6**(11): p. 1133-41.
84. Zhu, J. and W.E. Paul, *Peripheral CD4+ T-cell differentiation regulated by networks of cytokines and transcription factors*. Immunol Rev, 2010. **238**(1): p. 247-62.

85. Gately, M.K., et al., *The interleukin-12/interleukin-12-receptor system: role in normal and pathologic immune responses*. *Annu Rev Immunol*, 1998. **16**: p. 495-521.
86. Becher, B., B.G. Durell, and R.J. Noelle, *Experimental autoimmune encephalitis and inflammation in the absence of interleukin-12*. *J Clin Invest*, 2002. **110**(4): p. 493-7.
87. Langrish, C.L., et al., *IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation*. *J Exp Med*, 2005. **201**(2): p. 233-40.
88. Happel, K.I., et al., *Cutting edge: roles of Toll-like receptor 4 and IL-23 in IL-17 expression in response to Klebsiella pneumoniae infection*. *J Immunol*, 2003. **170**(9): p. 4432-6.
89. Ishizu, T., et al., *Intrathecal activation of the IL-17/IL-8 axis in opticospinal multiple sclerosis*. *Brain*, 2005. **128**(Pt 5): p. 988-1002.
90. Mangan, P.R., et al., *Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage*. *Nature*, 2006. **441**(7090): p. 231-4.
91. Langowski, J.L., et al., *IL-23 promotes tumour incidence and growth*. *Nature*, 2006. **442**(7101): p. 461-5.
92. O'Connor, R.A., et al., *Cutting edge: Th1 cells facilitate the entry of Th17 cells to the central nervous system during experimental autoimmune encephalomyelitis*. *J Immunol*, 2008. **181**(6): p. 3750-4.
93. Stromnes, I.M., et al., *Differential regulation of central nervous system autoimmunity by T(H)1 and T(H)17 cells*. *Nat Med*, 2008. **14**(3): p. 337-42.
94. Axtell, R.C., et al., *T helper type 1 and 17 cells determine efficacy of interferon-beta in multiple sclerosis and experimental encephalomyelitis*. *Nat Med*, 2010. **16**(4): p. 406-12.
95. Brunkow, M.E., et al., *Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfy, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse*. *Nat Genet*, 2001. **27**(1): p. 68-73.
96. Tarbell, K.V., et al., *CD25+ CD4+ T cells, expanded with dendritic cells presenting a single autoantigenic peptide, suppress autoimmune diabetes*. *J Exp Med*, 2004. **199**(11): p. 1467-77.
97. Sakaguchi, S., et al., *Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases*. *J Immunol*, 1995. **155**(3): p. 1151-64.

98. Fontenot, J.D., et al., *Regulatory T cell lineage specification by the forkhead transcription factor foxp3*. *Immunity*, 2005. **22**(3): p. 329-41.
99. Fontenot, J.D., M.A. Gavin, and A.Y. Rudensky, *Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells*. *Nat Immunol*, 2003. **4**(4): p. 330-6.
100. Nakamura, K., A. Kitani, and W. Strober, *Cell contact-dependent immunosuppression by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor beta*. *J Exp Med*, 2001. **194**(5): p. 629-44.
101. Piccirillo, C.A. and E.M. Shevach, *Cutting edge: control of CD8+ T cell activation by CD4+CD25+ immunoregulatory cells*. *J Immunol*, 2001. **167**(3): p. 1137-40.
102. Taams, L.S., et al., *Modulation of monocyte/macrophage function by human CD4+CD25+ regulatory T cells*. *Hum Immunol*, 2005. **66**(3): p. 222-30.
103. Misra, N., et al., *Cutting edge: human CD4+CD25+ T cells restrain the maturation and antigen-presenting function of dendritic cells*. *J Immunol*, 2004. **172**(8): p. 4676-80.
104. Hori, S., et al., *Specificity requirements for selection and effector functions of CD25+4+ regulatory T cells in anti-myelin basic protein T cell receptor transgenic mice*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. **99**(12): p. 8213-8.
105. Kohm, A.P., et al., *Cutting edge: CD4+CD25+ regulatory T cells suppress antigen-specific autoreactive immune responses and central nervous system inflammation during active experimental autoimmune encephalomyelitis*. *J Immunol*, 2002. **169**(9): p. 4712-6.
106. Zhang, X., et al., *IL-10 is involved in the suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis by CD25+CD4+ regulatory T cells*. *Int Immunol*, 2004. **16**(2): p. 249-56.
107. Rodriguez, M., *Effectors of demyelination and remyelination in the CNS: implications for multiple sclerosis*. *Brain Pathol*, 2007. **17**(2): p. 219-29.
108. Stohlman, S.A. and D.R. Hinton, *Viral induced demyelination*. *Brain Pathol*, 2001. **11**(1): p. 92-106.
109. Pachner, A.R., J. Brady, and K. Narayan, *Antibody-secreting cells in the central nervous system in an animal model of MS: Phenotype, association with disability, and in vitro production of antibody*. *J Neuroimmunol*, 2007. **190**(1-2): p. 112-20.

110. Rivers, T.M., D.H. Sprunt, and G.P. Berry, *Observations on Attempts to Produce Acute Disseminated Encephalomyelitis in Monkeys*. J Exp Med, 1933. **58**(1): p. 39-53.
111. Martin, R., H.F. McFarland, and D.E. McFarlin, *Immunological aspects of demyelinating diseases*. Annu Rev Immunol, 1992. **10**: p. 153-87.
112. Hohlfeld, R. and H. Wekerle, *Autoimmune concepts of multiple sclerosis as a basis for selective immunotherapy: from pipe dreams to (therapeutic) pipelines*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101 Suppl 2**: p. 14599-606.
113. Bischof, F., et al., *Specific treatment of autoimmunity with recombinant invariant chains in which CLIP is replaced by self-epitopes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(21): p. 12168-73.
114. Stromnes, I.M. and J.M. Goverman, *Passive induction of experimental allergic encephalomyelitis*. Nat Protoc, 2006. **1**(4): p. 1952-60.
115. Bischof, F., et al., *Analysis of autoreactive CD4 T cells in experimental autoimmune encephalomyelitis after primary and secondary challenge using MHC class II tetramers*. J Immunol, 2004. **172**(5): p. 2878-84.
116. Steinman, L., *Assessment of animal models for MS and demyelinating disease in the design of rational therapy*. Neuron, 1999. **24**(3): p. 511-4.
117. Veldhoen, M., et al., *Signals mediated by transforming growth factor-beta initiate autoimmune encephalomyelitis, but chronic inflammation is needed to sustain disease*. Nat Immunol, 2006. **7**(11): p. 1151-6.
118. Demetriou, M., et al., *Negative regulation of T-cell activation and autoimmunity by Mgat5 N-glycosylation*. Nature, 2001. **409**(6821): p. 733-9.
119. Dennis, J.W., et al., *Adaptive regulation at the cell surface by N-glycosylation*. Traffic, 2009. **10**(11): p. 1569-78.
120. Dennis, J.W., I.R. Nabi, and M. Demetriou, *Metabolism, cell surface organization, and disease*. Cell, 2009. **139**(7): p. 1229-41.
121. Lee, S.U., et al., *N-glycan processing deficiency promotes spontaneous inflammatory demyelination and neurodegeneration*. J Biol Chem, 2007. **282**(46): p. 33725-34.
122. Long, E.T., et al., *Alpha-1,2-mannosidase and hence N-glycosylation are required for regulatory T cell migration and allograft tolerance in mice*. PLoS One, 2010. **5**(1): p. e8894.
123. Cummings, R.D. and S. Kornfeld, *Characterization of the structural determinants required for the high affinity interaction of asparagine-linked*

- oligosaccharides with immobilized Phaseolus vulgaris leucoagglutinating and erythroagglutinating lectins.* J Biol Chem, 1982. **257**(19): p. 11230-4.
124. Cedeno-Laurent, F. and C.J. Dimitroff, *Galectin-1 research in T cell immunity: past, present and future.* Clin Immunol, 2012. **142**(2): p. 107-16.
 125. eBioscience™. *Staining Intracellular Antigens for Flow Cytometry.* Flow Cytometry - BestProtocols (R) 2010.
 126. BD-Biosciences. *Kit Manual for BD Cytofix/Cytoperm™ Fixation/Permeabilization Kit.* 2005.
 127. Mitra, D.K., S.C. De Rosa, and N. Watanabe, *Intracellular Cytokine FACS-Staining Protocol.* 1999. p. 3
 128. Elbein, A.D., et al., *Kifunensine, a potent inhibitor of the glycoprotein processing mannosidase I.* J Biol Chem, 1990. **265**(26): p. 15599-605.
 129. Marzo, A.L., et al., *Tumor antigens are constitutively presented in the draining lymph nodes.* J Immunol, 1999. **162**(10): p. 5838-45.
 130. Billinton, N. and A.W. Knight, *Seeing the wood through the trees: a review of techniques for distinguishing green fluorescent protein from endogenous autofluorescence.* Anal Biochem, 2001. **291**(2): p. 175-97.
 131. DakoCytomation, *CyAn™ ADP User Guide.* Revision B ed. 2004. 157.
 132. Dudda, J.C. and S.F. Martin, *Tissue targeting of T cells by DCs and microenvironments.* Trends Immunol, 2004. **25**(8): p. 417-21.
 133. Renkonen, R. and J. Ustinov, *Carbohydrate synthesis inhibitors decrease interleukin 1-stimulated lymphocyte binding to endothelial cells.* Eur J Immunol, 1991. **21**(3): p. 777-81.
 134. Granovsky, M., et al., *Suppression of tumor growth and metastasis in Mgat5-deficient mice.* Nat Med, 2000. **6**(3): p. 306-12.
 135. Dennis, J.W., et al., *UDP-N-acetylglucosamine:alpha-6-D-mannoside beta 1,6 N-acetylglucosaminyltransferase V (Mgat5) deficient mice.* Biochim Biophys Acta, 2002. **1573**(3): p. 414-22.
 136. Skelton, T.P., et al., *Glycosylation provides both stimulatory and inhibitory effects on cell surface and soluble CD44 binding to hyaluronan.* J Cell Biol, 1998. **140**(2): p. 431-46.
 137. Siewert, C., et al., *Induction of organ-selective CD4+ regulatory T cell homing.* Eur J Immunol, 2007. **37**(4): p. 978-89.

138. Comelli, E.M., et al., *Activation of murine CD4+ and CD8+ T lymphocytes leads to dramatic remodeling of N-linked glycans*. J Immunol, 2006. **177**(4): p. 2431-40.
139. Sawitzki, B., et al., *Identification of gene markers for the prediction of allograft rejection or permanent acceptance*. Am J Transplant, 2007. **7**(5): p. 1091-102.
140. Partridge, E.A., et al., *Regulation of cytokine receptors by Golgi N-glycan processing and endocytosis*. Science, 2004. **306**(5693): p. 120-4.
141. Kuball, J., et al., *Increasing functional avidity of TCR-redirected T cells by removing defined N-glycosylation sites in the TCR constant domain*. J Exp Med, 2009. **206**(2): p. 463-75.
142. Grigorian, A., et al., *N-acetylglucosamine inhibits T-helper 1 (Th1)/T-helper 17 (Th17) cell responses and treats experimental autoimmune encephalomyelitis*. J Biol Chem, 2011. **286**(46): p. 40133-41.
143. Salvatore, S., et al., *A pilot study of N-acetyl glucosamine, a nutritional substrate for glycosaminoglycan synthesis, in paediatric chronic inflammatory bowel disease*. Aliment Pharmacol Ther, 2000. **14**(12): p. 1567-79.
144. Ryan, S.O., et al., *MHCII glycosylation modulates Bacteroides fragilis carbohydrate antigen presentation*. J Exp Med, 2011. **208**(5): p. 1041-53.
145. Ujita, M., et al., *Poly-N-acetylglucosamine synthesis in branched N-glycans is controlled by complementary branch specificity of I-extension enzyme and beta1,4-galactosyltransferase I*. J Biol Chem, 1999. **274**(24): p. 16717-26.
146. Grigorian, A., S. Torossian, and M. Demetriou, *T-cell growth, cell surface organization, and the galectin-glycoprotein lattice*. Immunol Rev, 2009. **230**(1): p. 232-46.
147. Garin, M.I., et al., *Galectin-1: a key effector of regulation mediated by CD4+CD25+ T cells*. Blood, 2007. **109**(5): p. 2058-65.
148. Grigorian, A. and M. Demetriou, *Mgat5 deficiency in T cells and experimental autoimmune encephalomyelitis*. ISRN Neurol, 2011. **2011**: p. 374314.
149. Mkhikian, H., et al., *Genetics and the environment converge to dysregulate N-glycosylation in multiple sclerosis*. Nat Commun, 2011. **2**: p. 334.
150. Burton, J.M., et al., *A phase I/II dose-escalation trial of vitamin D3 and calcium in multiple sclerosis*. Neurology, 2010. **74**(23): p. 1852-9.

151. Kosuge, T., et al., *Effect of inhibitors of glycoprotein processing on cytokine secretion and production in anti CD3-stimulated T cells*. Biol Pharm Bull, 2000. **23**(1): p. 1-5.

11 Danksagung

Die vorliegende Arbeit durfte ich im Labor der Neurologischen Universitätsklinik unter der Leitung von PD Dr. Felix Bischof durchführen. An erster Stelle geht deswegen mein Dank an meinen Doktorvater Herrn PD Dr. med. Felix Bischof, für die interessante Fragestellung, die gute Zusammenarbeit und Betreuung, vor allem aber seine Geduld in allen Phasen der Promotion. Seine Tür stand stets offen für alle Arten von Fragen und Problemen. Nicht zuletzt seiner großen Erfahrung in der tierexperimentellen Forschung ist das Gelingen der Arbeit zu verdanken. Sein unermüdlicher Einsatz führte auch zur Publikation einiger wesentlicher Erkenntnisse dieser Arbeit.

Auch an Frau Dr. rer. nat. Juliane Klose geht ein besonderer Dank für die praktischen Tipps und Anleitungen zur Durchführung meiner Experimente. Ihre kritischen Fragen und fachlichen Diskussionen führten zu vielen, entscheidenden Verbesserungen nicht nur im Versuchsaufbau und -Ablauf sondern auch zu einer intensiveren Auseinandersetzung mit den zur Bearbeitung der Thematik eingesetzten Methoden.

Den Mitarbeitern des klinischen Labors der Neurologie, vor allem an meine Mitdoktoranden und Evelyn Dubois, danke für unzählbare Aufmunterungen, konkrete Tipps und vor allem eine freundliche Arbeitsatmosphäre.

Ein ebenso großer Dank geht an meine Freunde und Kommilitonen, die immer für mich da waren und mir mit Rat, Tat und aufmunternden Worten beiseite standen.

Vor allem aber danke ich meiner Familie, die mir meine Ausbildung an der Universität Tübingen ermöglicht und mein Interesse an wissenschaftlicher Arbeit geweckt hat.