

Sabrina Schmitt  
Dr. sc. hum.

## **Funktion und Induktion regulatorischer T-Lymphozyten im murinen Modell der Multiplen Sklerose und während *Graft-versus-Host* Erkrankung nach Stammzelltransplantation**

Geboren am 30.12.1980 in Heidelberg  
Diplom der Fachrichtung Biologie am 04.10.2005 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Dermatologie  
Doktorvater: Prof. Dr. rer. nat. K. Mahnke

Natürlich vorkommende regulatorische T-Zellen sind Hauptmediatoren bei der Suppression von Effektor T-Zellen und damit einer der wichtigsten Populationen im Rahmen verschiedener Autoimmunerkrankungen.

Ihre Rolle während extrakorporaler Photopherese war bis dato nicht abschließend geklärt, eine Induktion ihrer supprimierenden Eigenschaften durch ECP-Behandlung wurden jedoch vermutet. Das Ziel dieser Arbeit war es daher, die Treg Population während der Behandlung von GvHD Patienten mit ECP zu analysieren.

So war es im Rahmen der vorliegenden Arbeit mittels durchflusszytometrischer Analysen des peripheren Blutes ECP-behandelter GvHD-Patienten möglich, einen Anstieg der Treg im peripheren Blut ECP-behandelter GvHD Patienten zu beobachten. Andere Immunzellpopulationen erfuhren keine Änderungen hinsichtlich ihrer prozentualen Menge innerhalb der PBMC. Diese Ergebnisse führten zu der Annahme, dass Treg eine der Immunzellpopulationen darstellen, welche durch eine ECP-Behandlung beeinflusst werden, Daher wurde die Treg-Population im Folgenden auch auf ihre Funktionalität hin untersucht.

Hier wurde eine erhöhte Kapazität der Treg, die Proliferation von Effektor T-Zellen in *in vitro* Suppressionassays zu supprimieren, festgestellt. Diese erhöhte Suppressorkapazität konnte unter anderem auf eine erhöhte Adenosin-Sekretion der Treg nach ECP-Behandlung zurückgeführt werden. Hierbei wurde sowohl der ATP-Verbrauch als auch die Adenosin Sekretion von Treg nach ECP vermessen. Ebenso konnte über durchflusszytometrische Analysen eine Erhöhung der Expression der Ektonukleotidasen CD39 und CD73 festgestellt werden, welche für den Umsatz des ATP zu Adenosin verantwortlich sind.

Adenosin wiederum hat bekanntermaßen über die Bindung an den  $A_{2A}$ -Rezeptor an der Oberfläche der Effektor T-Zellen Einfluss auf deren Proliferation und kann somit nun auch im humanen System dem Repertoire der Treg als immunmodulierender Faktor zugefügt werden.

Im Rahmen des zweiten Teils der vorliegenden Arbeit war es Ziel, den Einfluss eines molekularbiologisch generierten „Single chain Fragment variable“-Antikörperkonstrukts aus den variablen Domänen des murinen DEC205 Antikörpers gekoppelt an das Autoantigen Mog<sub>35-55</sub> auf den Verlauf einer EAE zu untersuchen. Da die Induktion antigenspezifischer Treg durch DC im *steady state* einer der Mechanismen zur Toleranzinduktion darstellt, sollte hier das spezifische Targeting des Autoantigens zu ruhenden DC und damit die Induktion von Toleranz untersucht werden.

Im Rahmen der murinen Autoimmunerkrankung EAE sind Mog-autoreaktive Effektor T-Zellen eine der für den Krankheitsverlauf mitverantwortlichen Populationen und die Beteiligung regulatorischer T-Zellen während einer EAE wurde schon mehrfach nachgewiesen.

Nach erfolgreicher Klonierung und der Überprüfung der Bindungseigenschaften des Antikörperkonstrukts an dendritische Zellen *in vitro* und *in vivo* wurde der Einfluss des ScFv auf die Induktion von Treg über DC im *steady state* untersucht. Hierbei konnte ein Anstieg der Treg durch zweimalige Injektion des Konstrukts in naive Mäuse beobachtet werden.

Um zu überprüfen, ob diese „induzierte“ Treg-Population einen Einfluss auf den Verlauf einer EAE hat, wurde das Antikörperkonstrukt präventiv vor EAE-Induktion injiziert und die klinische Symptomatik dokumentiert. In der Tat zeigten Mäuse, welche eine präventive Behandlung mit dem Antikörperkonstrukt erhalten hatten, eine deutliche Verbesserung des Krankheitsverlaufs. Ebenso war die Infiltration der Leukozyten in das ZNS bei präventiv behandelten Mäusen deutlich geringer als bei Kontrollmäusen.

Um die Funktionalität der „induzierten“ Treg-Population während EAE zu untersuchen, wurde über HPLC-Analysen sowie Tests zum ATP-Verbrauch eine erhöhte Adenosinproduktion sowie ein erhöhter ATP-Verbrauch in den Treg ScFv-behandelter Mäuse festgestellt.

Die vorliegenden Daten deuten also darauf hin, dass durch die präventive Behandlung von Mäusen mit einem ScFv-DEC205 Antikörperkonstrukt über unreife dendritische Zellen eine Induktion von Treg ausgelöst wird, welche wiederum für die beobachtete Abmilderung der klinischen Symptomatik einer Mog-induzierten EAE verantwortlich sein könnten.