

Aus dem Institut für Virologie und Immunbiologie
der Universität Würzburg
Leitung: Prof. Dr. Wolfgang Kastenmüller



Expression und Funktion von CD28 im Schwein

Expression and function of CD28 in pigs

Dissertation zur Erlangung des medizinischen Doktorgrades an der
Graduate School of Life Sciences,
Julius-Maximilians-Universität Würzburg,
Klasse Infektion und Immunität

Vorgelegt von

Sabrina Uehlein

aus Würzburg

Würzburg, 2021



Eingereicht am:

Bürostempel

Mitglieder des Promotionskomitees:

Vorsitzender: Prof. Dr. Andreas Beilhack

1. Betreuer: Priv.-Doz. Dr. Niklas Beyersdorf

2. Betreuer: Prof. Dr. Thomas Kerkau

3. Betreuer: Prof. Dr. Ulrich Hofmann

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunden ausgehändigt am:

*Man muss viel gelernt haben, um über das,
was man nicht weiß, fragen zu können.*

Jean-Jacques Rousseau

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen und Erläuterungen	VI
Abbildungsverzeichnis	IX
Tabellenverzeichnis	XI
1. Einleitung.....	1
1.1 Das Schwein in Medizin und Forschung	1
1.1.1 Die bisherige Verwendung von porcinen Produkten in der Medizin.....	1
1.1.2 Die zunehmende Etablierung des Schweins als Krankheitsmodell	2
1.1.3 Das Schwein als potenzielle Ressource für künftige Xenotransplantationen..	2
1.2 T-Zellen	3
1.2.1 Die Rolle der T-Zelle im Immunsystem	3
1.2.2 Die immunologische Synapse.....	4
1.2.3 Die T-Zell-Reifung	6
1.2.4 T-Zell-Subgruppen.....	8
1.2.5 Die CD4 ⁺ T-Zell-Differenzierung.....	9
1.2.6 Die CD8 ⁺ T-Zell-Differenzierung.....	10
1.2.7 Regulatorische T-Zellen	11
1.2.8 Superagonistische anti-CD28 Antikörper (CD28-SA).....	13
1.3 Vergleich porciner und humaner T-Zellen	14
1.3.1 Durchflusszytometrische Charakterisierung der T-Zellen.....	14
1.3.2 CTLA-4.....	14
1.3.3 CD28.....	16
1.4 Zielsetzung der Arbeit.....	18
2. Material und Methoden	19
2.1 Material.....	19
2.1.1 Geräte	19
2.1.2 Software.....	20

2.1.3	Verbrauchsmaterialien.....	20
2.1.4	Chemische Substanzen	21
2.1.5	Medien	22
2.1.6	Puffer und Lösungen.....	22
2.1.7	Kits	24
2.1.8	Antikörper	25
2.1.9	Primer	26
2.1.10	Biologische Stoffe.....	26
2.2	Methoden	27
2.2.1	Zellbiologische Methoden	27
2.2.1.1	Allgemeine Zellkulturmethoden.....	27
2.2.1.1.1	<i>Einzelzellsuspension lymphatischer Organe</i>	<i>27</i>
2.2.1.1.2	<i>Bestimmung der vitalen Zellkonzentration/ -zahl.....</i>	<i>27</i>
2.2.1.1.3	<i>Isolation von Lymphozyten.....</i>	<i>27</i>
2.2.1.1.4	<i>Kryokonservierung porciner Leukozyten.....</i>	<i>28</i>
2.2.1.1.5	<i>Auftauen porciner Leukozyten</i>	<i>28</i>
2.2.1.1.6	<i>Zellmarkierung mit eFluor670</i>	<i>28</i>
2.2.1.2	Proliferationsassays	29
2.2.1.2.1	<i>Xenogene gemischte Lymphozytenreaktion.....</i>	<i>29</i>
2.2.1.2.2	<i>Kostimulatorische Aktivität des porcinen CD28.....</i>	<i>30</i>
2.2.1.2.3	<i>Direkt stimulatorische Aktivität des porcinen CD28</i>	<i>31</i>
2.2.2	Molekularbiologische Methoden	33
2.2.2.1	Genexpressionsanalyse porciner Leukozyten.....	33
2.2.2.1.1	<i>RNA-Extraktion.....</i>	<i>33</i>
2.2.2.1.2	<i>DNA-Verdau.....</i>	<i>34</i>
2.2.2.1.3	<i>Reverse Transkription (cDNA-Umschrieb)</i>	<i>34</i>
2.2.2.1.4	<i>Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....</i>	<i>34</i>
2.2.2.1.5	<i>Gel-Elektrophorese</i>	<i>35</i>
2.2.2.2	Proteinanalyse.....	35
2.2.2.2.1	<i>SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....</i>	<i>35</i>
2.2.2.2.2	<i>Coomassie Blau-Färbung.....</i>	<i>36</i>

2.2.2.2.3	<i>Trocknen von SDS-Gelen.....</i>	36
2.2.2.2.4	<i>Bestimmung der Proteinmenge.....</i>	36
2.2.3	Immunologische Methoden.....	36
2.2.3.1	Herstellung monoklonaler Antikörper.....	36
2.2.3.1.1	<i>Gewinnung von Antikörper-Überständen.....</i>	36
2.2.3.1.2	<i>Isotypisierung monoklonaler Antikörper.....</i>	37
2.2.3.1.3	<i>Aufreinigung monoklonaler Antikörper.....</i>	37
2.2.3.2	Durchflusszytometrie.....	38
2.2.3.2.1	<i>Anreicherung durch Zellsortierung (FACS-Sort).....</i>	38
2.2.3.2.2	<i>FACS-Analyse.....</i>	39
2.2.3.3	Magnetische Separation von Antigen-präsentierenden Zellen (APCs) der Maus.....	42
3.	Ergebnisse.....	44
3.1	Untersuchungen zur CD28 Genexpression im Schwein.....	44
3.1.1	Qualitative Untersuchung der pCD28 mRNA-Expression.....	44
3.1.1.1	CD28 mRNA Expression in Splenozyten Dt. Landrasse Schweine.....	44
3.1.1.2	CD28 mRNA Expression in Schweine T-Zellen.....	45
3.1.2	Quantitative Untersuchung der pCD28 mRNA Expression.....	46
3.1.2.1	Bestätigung der CD28 mRNA Expression in porcinen T-Zellen auf Einzelzellebene mittels Prime Flow®.....	46
3.1.2.2	Ähnlich starke CD28 mRNA Genexpression innerhalb der CD4 ⁺ T-Zellsubgruppen.....	48
3.2	Charakterisierung der pCD28 Proteinexpression mittels anti-pCD28 spezifischer Antikörper.....	49
3.2.1	Selektionierung und Bindungsverhalten pCD28 spezifischer monoklonaler Antikörper-Klone.....	49
3.2.2	Kreuzreaktivität anti-pCD28 spezifischer mAb mit CD28 von Mensch und Maus.....	52
3.2.3	Untersuchung der pCD28 Oberflächenexpression.....	54
3.2.3.1	Ähnliche CD28 Oberflächenexpression in CD4 ⁺ und CD8 ⁺ T-Zellen.....	54

3.2.3.1	Kein Unterschied in der CD28 Oberflächenexpression der CD4 ⁺ T-Zellsubpopulationen	56
3.3	Funktionelle Analyse des pCD28 Moleküls.....	57
3.3.1	Kostimulatorische Funktion des pCD28 Moleküls.....	57
3.3.1.1	Erfolgreiche Inhibition von Schweine-T-Zellen in einer xenogenen Mixed Lymphocyte Reaction mit hCTLA-4-Ig	57
3.3.1.2	Schweine-T-Zell-Aktivierung durch Kostimulation mit anti-CD28 mAb.....	59
3.3.2	Testung auf direkt stimulatorische Eigenschaften von anti-pCD28 mAb.....	62
3.3.2.1	Screening von anti-pCD28 mAb auf direkt stimulatorische Funktion	62
3.3.2.2	Vergleich unterschiedlicher Formen der Immobilisierung von anti-pCD28 mAb auf Dynabeads Pan Mouse Ig.....	64
3.3.2.3	Stärkeres proliferatives Ansprechen von CD4 ⁺ als CD8 ⁺ T-Zellen auf anti-pCD28 mAb Klon 4C8.....	65
3.3.2.4	Ähnliches proliferatives Ansprechen von T _{reg} und T _{conv} auf anti-pCD28 mAb 4C8.....	66
4.	Diskussion.....	70
4.1	Verwendung von Material Dt. Landrasse Schlachttiere	70
4.2	Expression und Funktion von CD28	71
4.2.1	CD28 mRNA Expression	71
4.2.2	CD28 Proteinexpression.....	72
4.2.3	CD28 Funktion.....	73
4.2.3.1	Bindung von pCD28 an B7 in xenogener MLR.....	73
4.2.3.2	Erhöhte Stimulierbarkeit von CD8 ⁺ T-Zellen im Vergleich zu CD4 ⁺ T-Zellen durch anti-CD3 mAb beladene Dynabeads Pan Mouse Ig.....	73
4.2.3.3	Unterschiedlich stimulierende Wirkung von anti-pCD28 mAb auf CD4 ⁺ und CD8 ⁺ T-Zellen.....	74
4.2.3.4	Einfluss von anti-CD28 mAb auf CD4 ⁺ Subpopulationen	74
4.3	Ausstehende weitere Charakterisierung von pCD28	76
4.4	(Prä-)klinische Bedeutung der anti-pCD28 mAb	76

5.	Zusammenfassung/ Summary	77
6.	Literaturverzeichnis	79
7.	Danksagung.....	95
8.	Eidesstattliche Erklärung/ Affidavit	97
9.	Lebenslauf	98

Abkürzungen und Erläuterungen

(b)	Basen (engl.: bases)
[c]	Konzentration (engl.: concentration)
Abb.	Abbildung
APC	Allophycocyanin, Antigen-präsentierende Zelle (eng.: antigen-presenting cell)
BSA	Bovines Serum Albumin
BSS	Buffered saline solution
BV	Brilliant Violett
CaCl ₂ 2 H ₂ O	Calciumchlorid-Dihydrat
CaCl ₂ 4 H ₂ O	Calciumchlorid-Tetrahydrat
CD	Differenzierungscluster (eng.: cluster of differentiation)
CFSE	5-(and 6)-Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester
Con A	Concanavalin A
CTLA-4	zytotoxisches T-Lymphozyten assoziiertes Antigen 4
Cy	Cyanin
d	Tag (engl.: day)
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
ddH ₂ O	Doppelt destilliertes Wasser
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulphoxide
DPBS	Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
FACS	Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung (engl.: fluorescence-activated cell sorting)
FB	Flachboden
FCS	fötales Kälberserum (engl.: fetal calf serum)
FITC	Fluorescein
Flt3	Fms related tyrosine kinase 3
Foxp3	Forkhead-Box-Protein P3
FSC	Vorwärts-Streustrahlung (engl.: forward scatter)
FSC-A	Vorwärts-Streustrahlungsfläche (engl.: forward scatter area)

FSC-H	Vorwärts-Streustrahlungshöhe (engl.: forward scatter height)
FSC-W	Vorwärts-Streustrahlungsweite (engl.: forward scatter width)
g α m	Ziege anti-Maus (engl.: goat anti-mouse)
h	human
hCTLA-4-Ig	Fusionsprotein aus einem Immunglobulin (Fc-Teil) und dem humanen zytotoxischen T-Lymphozyten assoziierten Antigen 4 (extrazelluläre Domäne)
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
Ig	Immunglobulin
KCl	Kaliumchlorid
KH ₂ PO ₄	Kaliumhydrogenphosphat
Lsg.	Lösung
LSM	Lymphozytenseparationsmedium (engl.: lymphocyte separating medium)
M	Marker
m	Maus
mAb	monoklonaler Antikörper (engl.: monoclonal antibody)
MEM	engl.: minimum essential medium
MFI	mediane Fluoreszenzintensität (engl.: median fluorescence intensity)
MgCl ₂ 6 H ₂ O	Magnesiumchlorid-Hexahydrat
MgSO ₄ 7 H ₂ O	Magnesiumsulfat-Heptahydrat
MHC	Major Histocompatibility Complex
Min.	Minuten
MLR	gemischte Lymphozytenreaktion (engl.: mixed lymphocyte reaction)
mRNA	Messenger RNA
n	Anzahl (engl.: number)
Na ₂ HPO ₄ 2 H ₂ O	Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat
NaCl	Natriumchlorid
NaN ₃	Natriumacid
NaOCl	Natriumhypochlorid
Na-Pyruvat	Natriumpyruvat
nicht-essent. AS	nicht-essentielle Aminosäuren

nmlg	normales Maus Immunglobulin
p	porcin
PB	Pacific Blue
PBMC	mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (engl.: peripheral blood monocytic cells)
PBS	Phosphate Buffered Saline
PE	Phycoerythrin
Pen-Strep	Penicillin-Streptomycin
PerCP	Peridinin Chlorophyllprotein
RB	Rundboden
rm	recombinant mouse
RNA	Ribonucleinsäure
SC	Zusatz für Zellkulturmedium (engl.: supplement for cell culture medium)
SDS	Sodium-Dodecyl-Sulfat
SDS-PAGE	Sodium-Dodecyl-Sulfat Polyacrylamid Gelelektrophorese
SSC	Seitwärts-Streustrahlung (engl.: side scatter)
SSC-A	Seitwärts-Streustrahlungsfläche (engl.: side scatter area)
SSC-H	Seitwärts-Streustrahlungshöhe (engl.: side scatter height)
SSC-W	Seitwärts-Streustrahlungsweite (engl.: side scatter width)
Tab.	Tabelle
TZR	T-Zell-Rezeptor
Ü/S	Überstand
unv.	unverdünnt
VB	V-Boden
wt	Wildtyp (engl.: wild type)

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Die immunologische Synapse.....	4
Abb. 2:	Die T-Zell-Reifung	7
Abb. 3:	Die Aktivierung naiver CD4 ⁺ T-Zellen	9
Abb. 4:	Immunsuppressive Effektorfunktionen aktivierter regulatorischer T-Zellen.....	11
Abb. 5:	Bindungsstellen von anti-pCD28 mAb am kostimulatorischen CD28 Molekül.....	13
Abb. 6:	Speziesübergreifender Sequenzvergleich des CTLA-4 Moleküls.....	15
Abb. 7:	Speziesübergreifender Sequenzvergleich des CD28 Moleküls	16
Abb. 8:	Fotographische Beispielaufnahme einer verwendeten porcinen Milz.....	18
Abb. 9:	Berechnung der vitalen Zellkonzentration und -zahl.....	27
Abb. 10:	Versuchsansatz zur xenogenen gemischten Lymphozytenreaktion.....	30
Abb. 11:	Versuchsansatz zur Untersuchung der kostimulatorischen Aktivität des pCD28 Moleküls.....	31
Abb. 12:	Versuchsansätze zur Untersuchung der direkten stimulatorischen Funktion des pCD28 Moleküls	32
Abb. 13:	Immunisierungsverfahren zur Herstellung von Maus anti-Schwein CD28 mAb in BALB/c Mäusen.....	37
Abb. 14:	Gatingstrategie für porcine Splenozyten.....	38
Abb. 15:	Angewandte Gatingstrategie für das Prime Flow® RNA Assay Kit.....	42
Abb. 16:	Depletionskontrolle.....	43
Abb. 17:	Expression von pCD28 mRNA in porcinen Splenozyten.....	44
Abb. 18:	pCD28 mRNA Expressionsunterschiede in porcinen Splenozytensubpopulationen (RT-PCR)	45
Abb. 19:	Bestätigung der RT-PCR Ergebnisse für pCD28 mRNA Expressionsunterschiede in porcinen Splenozyten mittel Prime Flow®	46
Abb. 20:	Keine Unterschiede in den pCD28 mRNA Expressionsprofilen der CD4 ⁺ T-Zellsubpopulationen.....	48
Abb. 21:	Verfahren zur Selektionierung pCD28 spezifischer mAb Klone.....	49

Abb. 22: Verfahren zur Untersuchung des Bindungsverhaltens pCD28 spezifischer mAb Klone.....	50
Abb. 23: Bindungsverhalten getesteter anti-pCD28 mAb zu verschiedenen Inkubationszeitpunkten.....	51
Abb. 24: Geringe Kreuzreaktivität der anti-pCD28 mAb Überstände 3C11 und 4H10 mit hCD28.....	52
Abb. 25: Keine Kreuzreaktivität der anti-pCD28 mAb Überstände mit mCD28.....	53
Abb. 26: Ähnliche Oberflächenexpression von pCD28 in CD4 ⁺ CD8α ⁻ / CD8α ^{low} T-Zellen und CD4 ⁻ CD8α ⁺ T-Zellen.....	54
Abb. 27: Ähnliche pCD28 Oberflächenexpression in verschiedenen CD4 ⁺ T-Zellsubpopulationen.....	56
Abb. 28: Inhibitorische Wirkung hCTLA-4-Ig in der MLR mit Schweine-Milzzellen und Maus-APCs.....	58
Abb. 29: Fähigkeit anti-pCD28 spezifischer mAb zur Kostimulation von T-Zellen am Beispiel des CD28 mAb 3D11	59
Abb. 30: Induktion von CD28-Kostimulation in CD4 ⁺ CD8α ⁻ / CD8α ^{low} und CD4 ⁻ CD8α ^{high} Splenozyten durch den aufgereinigten anti-pCD28 mAb 3D11.....	61
Abb. 31: Direkte Stimulation von Schweine-T-Zellen durch anti-pCD28 mAb	63
Abb. 32: Bei Induktion der direkten Stimulation zeigen T-Zellen die höchsten Proliferationsraten mit anti-pCD28 mAb beladene Dynabeads Pan Mouse Ig.....	64
Abb. 33: Anti-pCD28 mAb 4C8 induziert bessere Proliferation von CD4 ⁺ als von CD8 ⁺ T-Zellen	65
Abb. 34: Ähnliche Proliferationsraten von CD4 ⁺ Foxp3 ⁺ und CD4 ⁺ Foxp3 ⁻ T-Zellen nach direkter Stimulation durch anti-pCD28 mAb 4C8	66
Abb. 35: Keine Zunahme des Anteils an CD4 ⁺ Foxp3 ⁺ T-Zellen an den CD4 ⁺ T-Zellen durch Stimulation mit anti-pCD28 mAb 4C8	67
Abb. 36: Keine Zunahme der absoluten Zellzahl an CD4 ⁺ Foxp3 ⁺ T-Zellen nach Stimulation mit anti-pCD28 mAb 4C8	69

Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Forschungsfelder mit porcinen Tiermodellen	2
Tab. 2:	Durchflusszytometrische Zellmarker humaner und porciner T-Zellen	14
Tab. 3:	Speziesübergreifender Sequenzvergleich des CTLA-4 Moleküls.....	15
Tab. 4:	Kreuzreaktivität zwischen B7 und CTLA-4/ -Ig verschiedener Spezies.....	15
Tab. 5:	Speziesübergreifender Sequenzvergleich des CD28 Moleküls	16
Tab. 6:	Kreuzreaktivität zwischen B7-Molekülen und CD28 verschiedener Species	17
Tab. 7:	Testung verfügbarer CD28 mAb auf Kreuzreaktivität mit CD4+ T-Zellen verschiedener Spezies	17
Tab. 8:	Thermocycler-Programm der RT-PCR.....	35
Tab. 9:	Färbepanel für die fluoreszenzaktivierte Zellsortierung porciner Splenozyten.....	38
Tab. 10:	Färbepanel zur Testung der spezifischen Bindung von Antikörperüberständen	40
Tab. 11:	Färbepanel zur Analyse der CD28 Oberflächenexpression auf konventionellen und regulatorischen CD4+ T-Zellen	40
Tab. 12:	Färbepanel zur Analyse der CD28 Oberflächenexpression auf CD4-CD8 ^{ahigh} T- Zellen	40
Tab. 13:	Färbepanel zur Bestimmung der Kreuzreaktivität von Antikörperüberständen mit humanen PBMCs.....	41
Tab. 14:	Färbepanel zur Bestimmung der Kreuzreaktivität von Antikörperüberständen mit Maus-Splenozyten.....	41
Tab. 15:	Färbepanel zur Genexpressionsanalyse von pCD28 und β -Actin in porcinen T-Zellen	41
Tab. 16:	Färbepanel zur Genexpressionsanalyse von pCD28 und β -Actin in CD4+ T- Zellsubpopulationen.....	42
Tab. 17:	Färbepanel zur Erfolgskontrolle der T-Zell-Depletion	43

1. Einleitung

1.1 Das Schwein in Medizin und Forschung

1.1.1 Die bisherige Verwendung von porcinen Produkten in der Medizin

Die Verwendung porciner Produkte hat in der Medizin eine lange Tradition. So empfahl Hippocrates bereits 400 v. Chr. das Auftragen von ausgelassenem Schweinefett zusammen mit Baumharz als Therapieoption zur Wundbehandlung [1].

Die Entdeckung der medikamentösen Substituierbarkeit menschlicher Hormone durch porcine Homologa erfolgte jedoch erst einige Zeit später gegen Ende des 19. Jhr. [2]. Bis zur standardisierten Synthese von Tetrajodthyronin (T4), das erstmals in den 1960ern erfolgreich hergestellt werden konnte [3], bestand die bevorzugte Therapie des Hypothyreoidismus bis Mitte der 1970er aus der oralen Einnahme von porcinem getrockneten Schilddrüsenextrakt [4].

Nicht nur in der Hypothyreose-, sondern auch in der Diabetes-Therapie fanden Schweine Anwendung. Etwa 30 Jahre nach Einführung des porcinen Schilddrüsenhormonersatz erfolgte 1922 die erstmalige Anwendung von porcinem Insulin am Menschen [5]. Bis zur enzymatischen Semi-Synthese von Humaninsulin aus Schweineinsulin in den 1970er Jahren wurde daher primär Schweineinsulin zusammen mit Rinderinsulin therapeutisch eingesetzt [6; 7]. Kurze Zeit später, zu Beginn der 1980er, gelang dann die erste rekombinante Synthese des Humaninsulins [8–10].

Während porcine Produkte Ende des 20. Jhr. im Bereich des Hormonersatzes durch biotechnologische Verfahren ersetzt wurden, finden sie heute im Bereich des Aortenklappenersatz [11–14] und der Verbrennungs- [15–17] bzw. Wundtherapie [18] immer noch ihre berechnete Verwendung.

1.1.2 Die zunehmende Etablierung des Schweins als Krankheitsmodell

Berechtigten und zunehmenden Einsatz finden Schweine heute auch in der Forschung als Krankheitsmodell für verschiedene Erkrankungen des Menschen [19; 20]. Ein Ausschnitt der verschiedenen Forschungsfelder findet sich dabei in Tab. 1.

Fachbereich	Quelle	Fachbereich	Quelle	Fachbereich	Quelle
chirurgisch	[21; 22]	bildgebend	[23; 24]	regenerativ	[25]
infektiologisch	[26; 27]	onkologisch	[28; 29]	immunologisch	[30; 31]
humangenetisch	[32; 33]	kardiovaskulär	[34; 35]		

Tab. 1: Forschungsfelder mit porcinen Tiermodellen

1.1.3 Das Schwein als potenzielle Ressource für künftige Xenotransplantationen

Neben den erwähnten großen, bedeutenden Forschungsfeldern, wie dem der Kardiologie, stellt die porcine Xenotransplantation einen weiteren wichtigen Forschungsaspekt dar. Ein Aspekt, der aufgrund des ubiquitären Mangels an Spenderorganen zunehmend an Bedeutung gewinnt [36]. Trotz langjähriger Bemühungen lässt sich hier jedoch noch keine der xenogenen Herzklappentransplantation [37] ähnliche Erfolgsgeschichte für die Transplantation solider Organe [38], der Haut [39; 40] oder den Knochen [41] verzeichnen. Gründe hierfür stellen unter anderem die ungelösten Probleme der Spenderorganabstoßung durch das Immunsystems des Empfängers dar [42]. Bemühungen bestehen daher, die Immunologie des Schweins und des Menschen besser zu verstehen, um zielgerichtet eine effektive Toleranz auf T-Zell-Ebene bewirken und die gewonnenen Ergebnisse auch auf andere porcine Tiermodelle mit translativem Ansatz übertragen zu können. Vielversprechende Ansätze zur Verhinderung einer Organabstoßung bilden genetisch veränderte Spenderschweine [43–46], die Expansion regulatorischer T-Zellen [47] oder die Beeinflussung kostimulatorischer Signalwege [48; 49]. In den folgenden Kapiteln sollen daher das humane und porcine Immunsystem mit Fokus auf T-Zellen näher beleuchtet werden.

1.2 T-Zellen

1.2.1 Die Rolle der T-Zelle im Immunsystem

Zusammen mit den B-Zellen gehören die T-Zellen dem erworbenen Immunsystem, dem phylogenetisch jüngeren Part unseres Immunsystems, an [50]. Die erwähnten Zellnamen leiten sich von ihrem jeweiligen Entdeckungs- bzw. Entstehungsort im primär lymphatischen System ab. T steht daher für Thymus und B für Bursa Fabricii, dem aviären Äquivalent zum Knochenmark [51; 52]. Funktionell betrachtet wird den B-Zellen die sogenannte humorale Immunantwort zugeschrieben, die mit einer Produktion von Antigen-erkennenden Immunglobulinen (Ig) einhergeht [53]. Diese im Grundaufbau Y-förmigen Glykoproteine, bestehend aus sogenannten schweren und leichten Polypeptidketten, können entsprechend ihrer Klasse [54–60] entweder primär transmembranär oder sekundär gelöst in verschiedenen Körperflüssigkeiten an sogenannte Fc-Rezeptoren von Immunzellen, Leukozyten, gebunden sein. Fc steht dabei für das kristallisierbare Fragment der schweren Kette, die die biologische Aktivität vermittelt, während Fv, die variable Domäne beider Ketten, die Antigen-Bindungsstelle repräsentiert [61–63]. Obligatorisch für eine suffiziente Immunglobulinherstellung ist eine Antigen-Bindung an den B-Zell-Rezeptor (BCR) mit konsequenter endozytotischer Internalisierung und reziproker Selbstaktivierung durch Antigenpräsentation an T-Zellen über Major Histocompatibility (MHC) Moleküle [64–68]. Die zelluläre Immunantwort [53], repräsentiert durch T-Zellen, reift zusammen mit der humoralen Immunantwort erst im Laufe des Lebens aus [69]. Als Ort des Geschehens sind vor allem sekundär lymphatische Organe, wie Lymphknoten und Milz, zu nennen [70].

Der phylogenetisch ältere Teil unseres Immunsystems wird als angeborenes Immunsystem bezeichnet und setzt sich zusammen aus Monozyten, natürlichen Killerzellen (NK), Granulozyten, Mastzellen [71] und dendritischen Zellen (DC). Letztere stellen durch die Effizienz ihrer Phagozytose, Prozessierung und Antigenpräsentation ein wichtiges Bindeglied beider Systeme dar [50; 69]. Neben den DCs gehören auch Monozyten und B-Zellen zu den sogenannten professionellen Antigen-präsentierenden Zellen (APCs), während Mastzellen und Granulozyten den atypischen APCs angehören [72]. Aufgabe dieser Zellen ist es, das erworbene Immunsystem im nahe lokalisierten sekundär lymphatischen Gewebe zu aktivieren und bis zur Bereitstellung einer spezifischen Immunantwort eine schnelle erste Immunabwehr gegenüber potenziell schädigenden Erregern oder Zellen zu gewährleisten [73].

Zur Charakterisierung der Leukozyten wurde das sogenannte Cluster of Differentiation (CD) System entwickelt, das die einzelnen Zelloberflächenmoleküle kategorisiert [74].

1.2.2 Die immunologische Synapse

T-Zellen, auch T-Lymphozyten genannt, kommunizieren mit APCs über sogenannte immunologische Synapsen [75], einem Spalt von nur wenigen Nanometern, in dem eine Zell-Zell-Interaktion auf molekularer Ebene erfolgt. Bei Bindung des T-Zell-Rezeptors (TZR) kommt es zu einer Unterdrückung der T-Zellbewegung und Ausbildung einer speziellen Kontaktstelle durch Rekrutierung verschiedener Signalmoleküle [76]. Der ringförmige Aufbau der Synapse wird dabei in ein zentrales, peripheres und distales supramolekulares Aktivierungscluster (SMAC) eingeteilt [77]. Schematisch ist dies für das zentrale supramolekulare Aktivierungscluster (cSMAC) in Abb. 1 zusammen mit den beteiligten Signalmolekülen und ihren interaktionsbedingten Auswirkungen auf T-Zellen festgehalten.

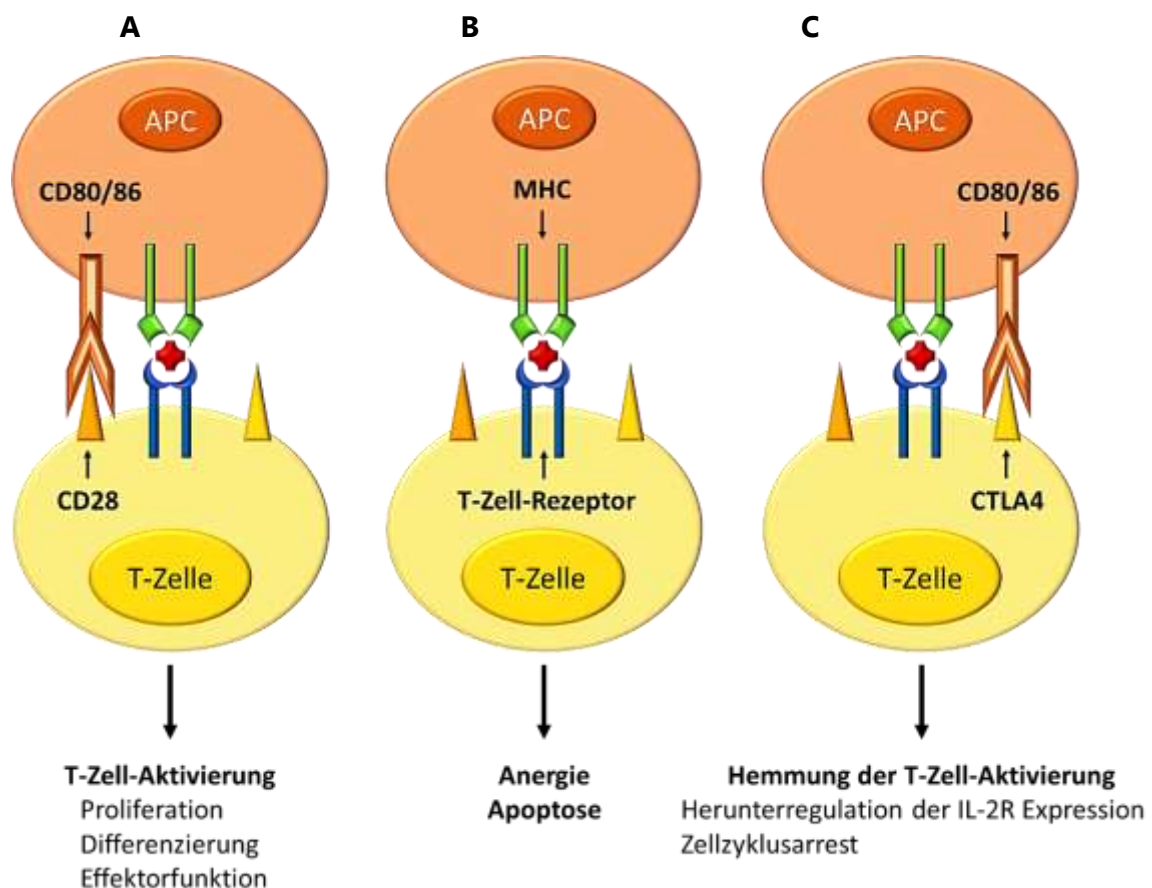


Abb. 1: Die immunologische Synapse

(A) Bei Zellkontakt zwischen T-Zelle und Antigen-präsentierender Zelle (APC) via Interaktion des kostimulatorischen Rezeptors CD28 mit dem CD80/86 Molekül sowie via Interaktion des T-Zell-Rezeptors mit dem Major Histocompatibility Complex (MHC) wird die Zelle aktiviert und sie beginnt zu proliferieren, differenzieren und führt Effektorfunktionen aus. (B) Bei alleiniger Interaktion zwischen dem MHC-Molekül und dem T-Zell-Rezeptor (TZR) wird die T-Zelle anerg und/oder apoptotisch. (C) Bindet das CD80/86 Molekül jedoch an CTLA-4, anstelle von CD28, so kommt es durch Herunterregulation der IL-2/-R (Interleukin 2/-Rezeptor) Expression und einem Zellzyklusarrest zu einer Hemmung der T-Zell-Aktivierung. Quelle: In Anlehnung an [78].

Der $\alpha\beta$ T-Zell-Rezeptor (TZR)

Mittels seiner Bindungsstellen an den Enden der α - und β -Kette erkennt der $\alpha\beta$ TZR zwar den Peptid-MHC, kann jedoch selbst kein Zellsignal auslösen. Dies erfolgt über einen dem TZR konstitutiv angelagerten CD3-Komplex, welcher aus einem CD3 $\zeta\zeta$ Homo- sowie zwei Heterodimeren, CD3 $\epsilon\delta$ und CD3 $\epsilon\gamma$ [79], besteht. Zur Bindung des korrekten T-Zell spezifischen MHCs sind jedoch noch weitere Korezeptoren, CD4 und CD8, nötig. Für die Bindung des MHC II ist dies das CD4 Molekül und für die Bindung des MHC I das CD8 Molekül [80]. Die alleinige TZR-Peptid-MHC-Bindung zwischen APC und T-Zelle führt jedoch ohne weitere kostimulatorische Stimuli zur Anergie [81] und Apoptose [82].

Der kostimulatorische Rezeptor CD28

Kommt es zwischen T-Zelle und APC zusätzlich zur TZR-Peptid-MHC-Bindung zur Interaktion des kostimulatorischen Rezeptors CD28 der T-Zelle mit Liganden der B7-Familie, B7-1 (CD80) und B7-2 (CD86), so wird die T-Zelle stimuliert und es erfolgt keine Anergie [83; 84].

Die zusätzliche Bindung von CD28 mit den Liganden CD80/86 über das MYPPPY-Motiv [85] führt dann aktivierungsbedingt zur gesteigerten Expression des Interleukins IL-2 [86] und des IL-2 Rezeptors (IL-2R) [87], sowie zum Zellzyklusprogress [88]. Eine Verstärkung der APC-abhängigen T-Zell-Aktivierung kann in-vitro durch die Zugabe von mitogenen Lektinen, wie Concanavalin A (Con A), bewirkt werden [89]. In-vitro kann alternativ auch eine T-Zell-Aktivierung ohne APCs durch die Zugabe von Beads, die mit anti-CD3/ anti-CD28 monoklonalen Antikörpern (mAb) beladen wurden, ausgelöst werden [90].

Das zytotoxische T-Lymphozyten assoziierte Antigen 4 (CTLA-4)

CTLA-4, ein Homolog zum kostimulatorischen Rezeptor CD28 [91], bindet ebenfalls die Liganden der B7-Familie über das MYPPPY-Motiv und ist zusammen mit CD28 als Mitglied der Immunoglobulin-Superfamilie [92] in derselbigen Genregion auf Chromosom 2q33 [93] kodiert [94].

Die Bindung des bivalenten Homodimers an B7-Molekülen führt jedoch, gegensätzlich zur Bindung des monovalenten CD28 [95], zu einer reduzierten IL-2 und IL-2R Expression sowie zum Zellzyklusarrest [96; 97]. CD80 (B7-1) bindet im Vergleich zu CD28 bevorzugt CTLA-4 [98].

Ein weiterer Unterschied zwischen CTLA-4 und CD28 besteht in der Expression der für CTLA-4 und CD28 kodierenden Gene. Während CD28 konstitutiv auf ruhenden und aktivierten Zellen exprimiert wird [91], erfolgt die Expression des CTLA-4 nur im Zuge der T-Zell-Aktivierung [99].

Eine Ausnahme bilden hierbei regulatorische T-Zellen [100], deren dauerhafte CTLA-4-Expression primär der Prävention einer inadäquaten Immunantwort naiver T-Zellen dient [101].

Gezielt therapeutisch genutzt wird diese Negativregulation zusammen mit der erhöhten Bindungsaffinität [102] bei Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises [103–105]. Durch die Blockade der potenziell aktivatorisch wirkenden B7-Moleküle mittels CTLA-4-Ig [106], einem Fusionsprotein aus der extrazellulären Domäne des CTLA-4 [107] sowie der modifizierten Fc-Region eines G1 Immunglobulins (IgG1) [108], kann die Krankheitsaktivität signifikant reduziert werden [109].

1.2.3 Die T-Zell-Reifung

Die Fähigkeit, den Peptid-MHC mittels TZR zu erkennen, zu binden und ein TZR-Signal nur bei präsentierten Fremdantigenen auszulösen, erlernen T-Zellen während der sogenannten T-Zell-Reifung im Thymus [110].

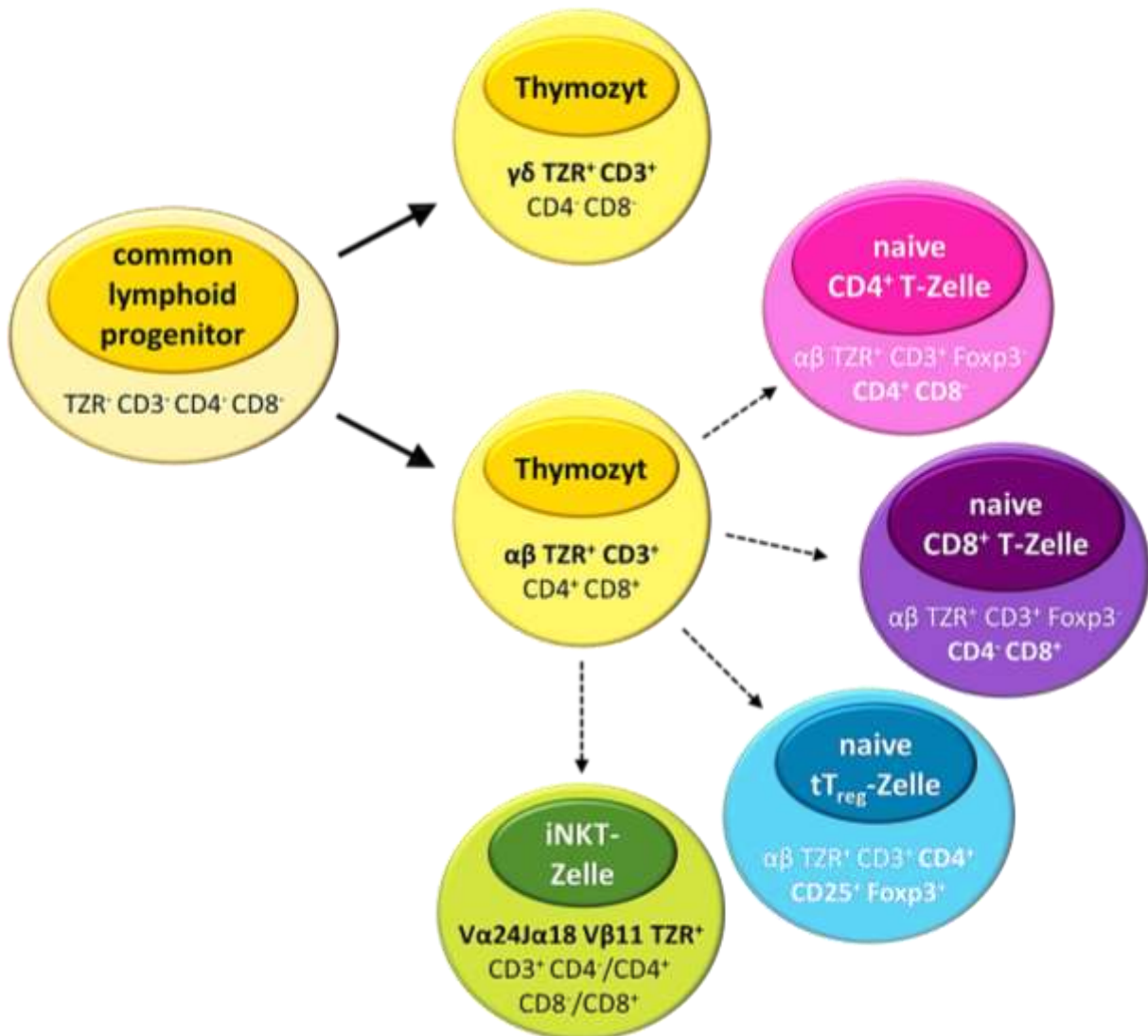
Die zunächst noch T-Zell-Rezeptor negativen ($CD3^-$) und T-Zell-Korezeptor doppelt-negativen ($CD4^-CD8^-$, DN) Lymphoblasten wandern aus dem Knochenmark aus, um im Thymus zu T-Zell-Rezeptor positiven ($CD3^+$) Thymozyten heranzureifen [111]. Während dieses prä-T-Zell-Stadiums kommt es zunächst im Thymus zu einer somatischen Rekombination und ggf. Umlagerung von Genen, die die T-Zell-Rezeptorketten (α , β , γ , δ) kodieren [112]. Hier entscheidet sich die Zugehörigkeit der Zelle zur $\alpha\beta$ oder $\gamma\delta$ T-Zelllinie [113]. Während $\gamma\delta$ Thymozyten meist als DN Zellen den Thymus verlassen [114], durchlaufen $\alpha\beta$ Thymozyten noch einige weitere Reifungs- und Selektionsschritte [115]. So kommt es im Verlauf zu einem unreifen doppelt-positiven ($CD4^+CD8^+$, DP) Stadium mit Positivselektion und schließlich zu einem reifen einfach-positiven ($CD4^+CD8^-$ oder $CD4^-CD8^+$, SP) Stadium mit Negativselektion, dem selbsttoleranten Reifungsstadium [116; 117].

Neben den reifen $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zell-Effektorvorläufern gibt es jedoch noch zwei weitere T-Zell-Subgruppen, die aus dem doppelt-positiven bzw. dem einfach-positiven Reifungsstadium entstehen. Dabei handelt es sich um die invariante natürliche Killer T-Zelle (iNKT) [118] und um die natürliche regulatorische T-Zelle (tT_{reg} , alt: nT_{reg}) [119; 120].

Die selbst-erkennenden und selbst-toleranten Thymozyten wandern dann als Thymus emigrierende $CD4^+/CD8^+/tT_{reg}$ Zellen (RTE) in die Peripherie [121] und differenzieren nach T-Zell-Aktivierung zu Effektor- und Gedächtniszellen weiter aus [122]. iNKT-Zellen, zugehörig zu den unkonventionellen T-Zellen, differenzieren hingegen bereits im Thymus zu Effektorzellen aus [123]. Schematisch sind die angesprochenen Reifungsprozesse in Abb. 2 zusammengefasst.

Knochenmark

Thymus

**Abb. 2: Die T-Zell-Reifung**

Aus der ausgewanderten hämatopoetischen Stammzelle des Knochenmarks können sich im Thymus die noch T-Zell-Rezeptor negativen (TZR) und doppelt-negativen (DN, CD4⁻ CD8⁻) Zellen in zwei unterschiedliche T-Zelllinien, in die $\alpha\beta$ oder $\gamma\delta$ T-Zelllinie, entwickeln. Die $\alpha\beta$ T-Zelllinie bringt dabei die naive CD4⁺ T-Zelle, die naive CD8⁺ T-Zelle, die naive natürliche regulatorische T-Zelle (tT_{reg}) sowie die invariante natürliche Killer T-Zelle (iNKT-Zelle) hervor, die dann in die Peripherie auswandern. Phänotypisch für tT_{reg} ist dabei der Transkriptionsfaktor Forkhead-Box-Protein3 (Foxp3) sowie für iNKT-Zellen der invariante TZR V α 24-J α 18 V β 11.

1.2.4 T-Zell-Subgruppen

Die im Kapitel T-Zellreifung beschriebenen T-Zellen werden klassischerweise in die beiden Hauptgruppen der konventionellen und nicht-konventionellen T-Zellen unterteilt. Während konventionelle T-Zellen über ein hoch variables TZR-Repertoire verfügen, mit dem sie eine Vielzahl prozessierter Protein-Antigene mittels polymorpher MHC-Molekülen erkennen können, verfügen unkonventionelle T-Zellen nur über ein sehr limitiertes, stark konserviertes TZR-Repertoire, mit dem sie Lipide, klein-molekulare Metabolite sowie phosphorylierte Metabolite erkennen können. Präsentiert werden diese primär Nicht-Protein-Antigene durch monomorphe Oberflächenproteine, wie CD1 und MR1 [124; 125].

Weiterhin kennzeichnend für unkonventionelle T-Zelle ist ihre schnelle Immunantwort und ihre funktionelle Monoklonalität [126]. Somit stellen unkonventionelle T-Zellen ein Bindeglied zwischen dem angeborenen und erworbenen Immunsystem dar [127; 128].

Konventionelle T-Zellen hingegen zeichnen sich durch eine verzögerte [123], aber spezifischere Immunantwort aus [126], die dem Differenzierungsprozess aus naiven (T_{naiv}) zu Effektor T-Zellen (T_{eff}) geschuldet ist. Ebenso prägnant ist für sie die Fähigkeit zur Bildung von Gedächtniszellen (T_{mem}) [125; 123; 126].

konventionelle T-Zellen

Zu den konventionellen T-Zellen (T_{conv}) zählen somit alle $CD4^+$ oder $CD8^+ \alpha\beta$ T-Zellen mit variablem TZR [127], wobei innerhalb der $CD4^+$ und $CD8^+ \alpha\beta$ T-Zellen eine weitere Unterteilung in konventionelle und regulatorische $CD4^+$ T-Zellen erfolgt [129–131]. Die regulatorischen T-Zellen nehmen somit eine Sonderstellung in dieser Gruppe ein und werden zusammen mit den $CD4^+$ oder $CD8^+ \alpha\beta$ T-Zellen in den nachfolgenden Kapiteln näher beleuchtet.

unkonventionelle T-Zellen

Die zahlenmäßig im Menschen kleine Gruppe der unkonventionellen T-Zellen (T_{unconv}) [132] besteht gemäß der aktuellen Definition aus $\gamma\delta$ und natürlichen Killer T-Zellen (NKT) sowie den sogenannten Mucosa-assoziierten invarianten T-Zellen (MAIT) [123; 125]. Diese Zellen werden jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter näher beleuchtet.

1.2.5 Die CD4⁺ T-Zell-Differenzierung

Nach der generellen Beschreibung der verschiedenen T-Zellpopulationen werden in den folgenden Kapiteln nun die konventionellen T-Zellen näher behandelt. Begonnen wird hierbei mit der Erläuterung der Aktivierung und Differenzierung naiver CD4⁺ T-Zellen zu CD4⁺ Effektor T-Zellen, den T-Helferzellen (T_h Zellen). Aufbauend auf den Erklärungen zur immunologischen Synapse in Kapitel 1.2.2 sind die erforderlichen Schritte zur Aktivierung naiver CD4⁺ T-Zellen in Abb. 3 festgehalten.

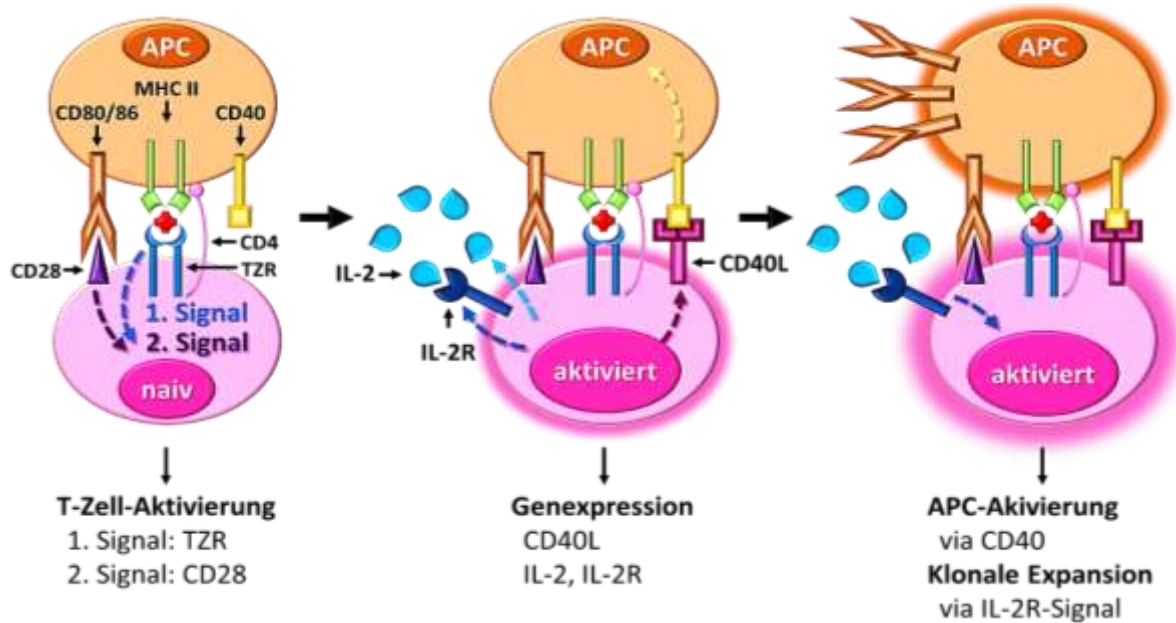


Abb. 3: Die Aktivierung naiver CD4⁺ T-Zellen

Zur Aktivierung einer naiven CD4⁺ T-Zelle durch eine Antigen-präsentierende Zelle (APC) sind zwei Signale, zum einen via des T-Zell-Rezeptor (TZR) und zum anderen via CD28, notwendig. Daraufhin exprimiert die aktivierte CD4⁺ T-Zelle vermehrt Interleukin 2 (IL-2), den dazugehörigen Rezeptor (IL-2R) sowie den Liganden CD40L, der Ligand des CD40 Rezeptors auf APCs. Aufgrund des IL-2R-Signals kommt es dann zur klonalen Expansion der aktivierten CD4⁺ T-Zellen und in Zuge der gleichzeitigen CD40L-CD40 Interaktion zur vermehrten Expression von kostimulatorischen Molekülen, wie CD80/86, und Zytokinen in den APCs. Dies ist sowohl für die klonale Expansion der aktivierten CD4⁺ T-Zellen als auch für die nachfolgende Aktivierung der naiven CD8⁺ T-Zellen bedeutsam. Quelle: Eigene Darstellung in Anlehnung an [133–137].

In Abhängigkeit von der Zusammensetzung des bei Aktivierung bestehenden Mikromilieus aus Vitaminen, Zytokinen, Histamin, Adenosin und Arylhydrocarbon, entscheidet sich die Richtung, in die sich die aktivierten CD4⁺ T-Zellen spezialisieren [138]. Diese Spezialisierung ist jedoch nicht endgültig, sondern kann sich den gegebenen inflammatorischen Verhältnissen anpassen. Dies wird als Plastizität bezeichnet [139–144]. Gemein ist den Th Zellen, dass sie durch ihren Einfluss sowohl auf das angeborene als auch auf das erworbene Immunsystem eine zentrale Rolle in deren (Dys-)Regulation spielen [145; 146].

Kontrovers wurde hierbei vor allem die Rolle in der Aktivierung, Differenzierung und Gedächtniszellbildung von naiven CD8⁺ T-Zellen diskutiert. Beschrieben wurden einige differenzierte CD4⁺ unabhängige [147–150] sowie CD4⁺ abhängige [151–165] Ergebnisse und Modelle, aus denen herauszulesen ist, dass eine CD4⁺ unabhängige CD8⁺ T-Zellaktivierung zwar möglich, aber zur Gewährleistung einer ausreichenden Aktivierung und Induktion von CD8⁺ Gedächtniszellen gegebenenfalls nicht ausreichend sein kann.

Ebenfalls kontrovers diskutiert werden die zugrundeliegenden Mechanismen und Abläufe der CD4⁺ Gedächtniszellbildung und von zentralen, Effektor-, Stammzell- und gewebeständigen Gedächtniszellen [166; 167].

Als potenzielles Erklärungsmodell kristallisierte sich in den vergangenen Jahren ein zeitlich abgestimmtes Zusammenspiel aus den Faktoren Antigen, IL-2 und Kostimulation heraus [168–170]. Gedächtniszellen haben nicht nur den Vorteil, dass sie im Vergleich zu naiven Zellen affinere TZR für dasselbige Antigen aufweisen, sondern auch dass sie zur Aktivierung geringere Antigen-Dosen und ein geringes Maß an Kostimulation benötigen [171]. Aufgrund dessen können Gedächtniszellen durch die geringere Aktivierungsschwelle frühzeitig beginnen, zu re-expandieren und nicht-abgeschaltete Zytokin-kodierende Gene [172; 173] Antigen-spezifisch zu re-exprimieren [171; 174]. Angemerkt sei jedoch, dass die beobachtete Proliferationsdauer und -stärke von CD4⁺ Gedächtniszellen im Vergleich zu naiven CD4⁺ und CD8⁺ Gedächtniszellen deutlich gemindert ist [175]. Vermindert ist zudem auch im Vergleich mit CD8⁺ Gedächtniszellen die Langlebigkeit der CD4⁺ Gedächtniszellen [171].

1.2.6 Die CD8⁺ T-Zell-Differenzierung

Während naive CD4⁺ T-Zellen durch ihre Aktivierung und Differenzierung zu T_h-Zellen die Immunantwort als Ganzes dirigieren und lenken, zeichnen sich differenzierte CD8⁺ T-Zelle, sogenannte zytotoxische T-Zellen (CTL), durch eine direktere Form der Immunabwehr aus. Durch die Sekretion proinflammatorischer Zytokine (IFN- γ , TNF- α) [176], die Freisetzung zytotoxischer Granula (Perforin, Granzym) und die (in-)direkte Zellinteraktion über Apoptose-induzierende Liganden (FasL, TRAIL) [177–179] kommt es zur Elimination infizierter oder veränderter Zellen [180]. Eine Steigerung der tumorlytischen Eigenschaften kann bereits heute, nicht nur tierexperimentell [181], sondern auch klinisch [182], erfolgreich erzielt werden. Die Aktivierung naiver CD8⁺ T-Zellen erfolgt unter CD28 Kostimulation bei Antigen-Kreuzpräsentation über MHC I Moleküle, die auf den meisten kernhaltigen Zellen exprimiert werden [164].

Verstärkt werden kann dieser Mechanismus durch Zytokine (IL-2/ -21), sezerniert von Th-Zellen, und/ oder durch die CD40-CD40L bedingte Aktivierung klassischer dendritischer Zellen Typ 1 (cDC1) mit konsekutiv vermehrter Expression von CD80/86 und Sekretion aktivierender Zytokine (IL-12/ -15) [161]. Bedingt durch die Aktivierung kommt es dann zu einer massiven klonale Expansion [183] und Subspezialisierung in Analogie zu Th-Zellen [164].

1.2.7 Regulatorische T-Zellen

Basierend auf den beiden Wirkprinzipien des Immunsystems, der Immunabwehr und der Immuntoleranz, wurde in den vorangegangenen Kapiteln die Funktion der Immunabwehr durch Zellen des erworbenen Immunsystems, den konventionellen und nicht-konventionellen T-Zellen, beschrieben. Im Folgenden soll es daher um die Immuntoleranz gehen, die unter anderem durch die heterogene Gruppe [184] der regulatorischen T-Zellen [185], gesichert wird. Unterschieden wird hierbei in eine zentrale und eine periphere Form der Immuntoleranz [186]. Während die zentrale Toleranz auf der Negativselektion im Thymus beruht [187], wird die periphere Toleranz durch ein Zusammenspiel aus TZR-induzierter Anergie [188], aktivierungsbedingtem Zelltod [189] sowie immunsuppressiven Zellen, zu denen T_{reg} gehören [190], gewahrt. Auf welche Weise T_{reg} ihre anti-inflammatorischen bzw. immunsuppressiven Effektorfunktionen ausüben, ist in Abb. 4 ersichtlich.

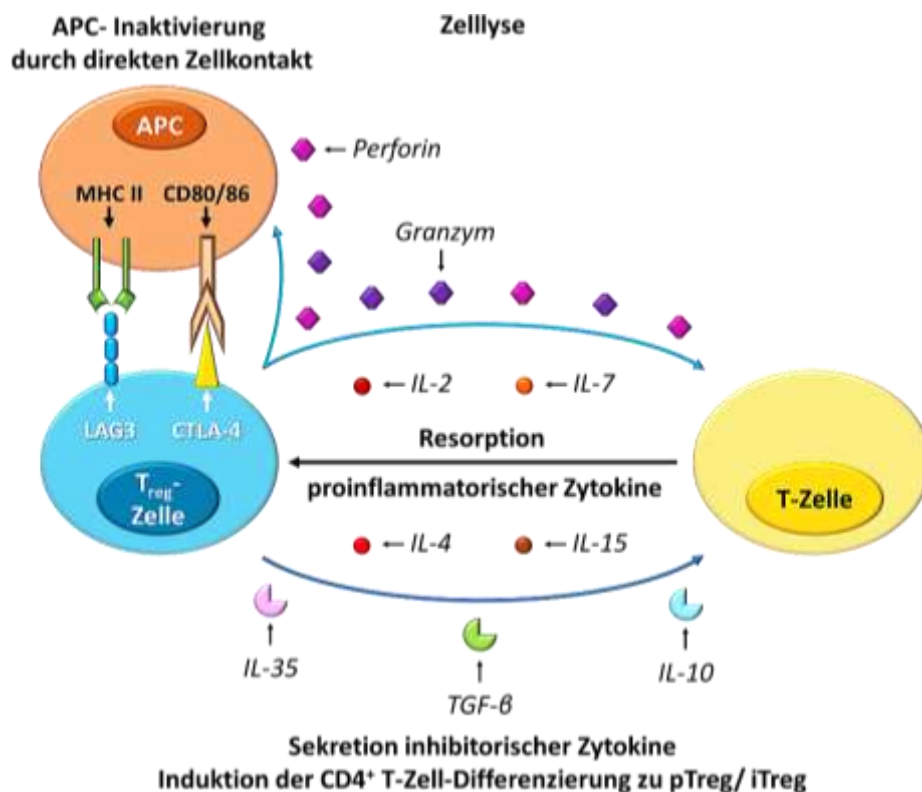


Abb. 4: Immunsuppressive Effektorfunktionen aktivierter regulatorischer T-Zellen

Die Suppressionsmechanismen regulatorischer T-Zellen lassen sich in drei Kategorien einteilen. Hierzu zählen die direkte Zell-Interaktion (via: LAG3 mit MHCII, CTLA-4 mit CD80/86), die Resorption proinflammatorischer Zytokine (IL-2/ -4 /-7 /-15) sowie die Sekretion zelltoxischer Substanzen (Granzym, Perforin) und inhibitorischer, teils iTreg induzierender (IL-35, IL-10, TGF- β) Zytokine. Quelle: Eigene Darstellung in Anlehnung an [191; 192].

Neben den bisher erwähnten CD4⁺ T_{reg} Zellen wurden in den vergangenen Jahren auch noch weitere T_{reg} Populationen, CD8⁺ und DN T_{reg} Zellen, zunehmend charakterisiert. Zahlenmäßig belaufen sich diese Populationen jedoch auf einen im Vergleich deutlich geringeren Zellanteil [193–196].

Ursprünglich zuerst im menschlichen Blut entdeckt [197], ist heute bekannt, dass CD4⁺ T_{reg} Zellen vor allem auch nicht-lymphatischen Organen, wie dem Skelettmuskel, dem viszeralen Fettgewebe oder der Darmschleimhaut lokalisiert sind [198].

Je nach Abstammungsort wird hierbei unterschieden, ob es sich um T_{reg} des Thymus (tT_{reg}, alt: nT_{reg}), um periphere (pT_{reg}) aus naiven CD4⁺ T_{conv} oder um in-vitro induzierte T_{reg} Zellen (iT_{reg}) aus TGF β behandelten naiven CD4⁺ T_{conv} handelt [198; 199]. Sowohl pT_{reg} als auch iT_{reg} werden zudem gemäß ihrer Foxp3 Expression in klassische CD4⁺ Foxp3⁺ T_{reg} Zellen und CD4⁺ Foxp3⁻ Typ 1 regulatorische T-Zellen (Tr1) untergliedert [200]. Tr1 Zellen kennzeichnet eine Koexpression von Lag3 und CD49b [201], eine erniedrigte IL-2, aber erhöhte IFN- γ Sekretion sowie eine nur transiente Foxp3 Expression bei T-Zellaktivierung [202].

Nicht zuletzt auch durch die Untersuchung der erwähnten Foxp3⁻ T_{reg} wurde deutlich, dass der Transkriptionsfaktor Foxp3 zwar nicht als exklusiver T_{reg} Zellmarker verwendet werden kann [203–206], aber dennoch eine konstitutive Foxp3⁺ Expression für die Entstehung und Funktionsaufrechterhaltung von CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ tT_{reg} Zellen unerlässlich ist [207–211].

In Anbetracht der CD28-bedingten Regulation des Foxp3 [212] erklärt sich daher auch die starke Abhängigkeit CD4⁺ Foxp3⁺ T_{reg} Zellen vom kostimulatorischen CD28 Signal im Vergleich zu CD4⁺T_{conv} [213]. Analog zu CD4⁺ T_{conv} wurde in den vergangenen Jahren ebenfalls deutlich, dass CD4⁺ Treg nicht nur Gedächtnis- [214], sondern auch spezialisierte Effektorzellen (eT_{reg}) bilden können [215]. Interessanterweise weisen eTreg Expressionsfaktoren der situationsbedingten vorherrschenden T_h-Zellspezialisierung auf. Im Falle einer T_h1 dominanten Immunantwort ist dies T-bet, im Falle von T_h2 GATA3 und im Fall von T_h17 ROR γ T [216–221]. T-bet, GATA3 und ROR γ T sind somit ebenso wenig als exklusive T_{conv} Marker zu betrachten.

Eine verlässliche Untersuchungsmethode zur Differenzierung CD4⁺Foxp3⁺ tT_{reg} von CD4⁺ Foxp3⁺ pT_{reg} ist aktuell noch nicht etabliert [222; 223].

1.2.8 Superagonistische anti-CD28 Antikörper (CD28-SA)

Als superagonistische anti-CD28 Antikörper (CD28-SA) werden monoklonale Antikörper (mAb) bezeichnet, die, wie in Abb. 5 gezeigt, aufgrund ihrer Bindungsart am kostimulatorischen Rezeptor CD28 eine T-Zellaktivierung ohne zusätzliches TZR-Signal bewirken können [224].

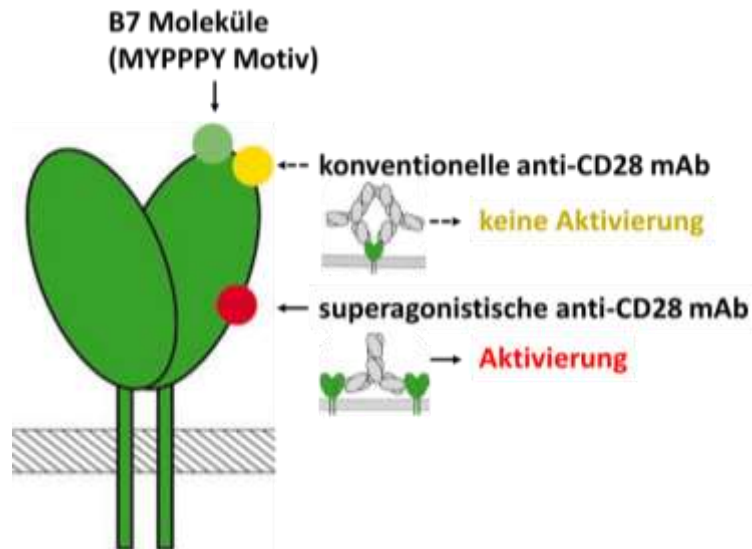


Abb. 5: Bindungsstellen von anti-pCD28 mAb am kostimulatorischen CD28 Molekül

Gezeigt sind die Bindungsstellen verschiedener Interaktionspartner mit dem CD28 Molekül. Frontal bindende Liganden, wie B7-Moleküle und konventionelle Antikörper, sind nicht in der Lage, eine Aktivierung der T-Zelle ohne zusätzliches TZR-Signal auszulösen. Die seitlich an der C'D Schleife des extrazellulären Ig-ähnlichen Domäne des CD28 Moleküls bindenden superagonistischen Antikörper können hingegen eine direkte Aktivierung auslösen. Als ursächlich hierfür wird die Bildung linearer Komplexe aus CD28-SA und CD28 Molekülen angesehen. Quelle: [225], modifiziert durch Sabrina Uehlein.

Vornehmlich werden hierbei t_{reg} Zellen aktiviert, deren konsekutive Ausübung immunsuppressiver Effektorfunktionen und starke Proliferation zu einer absoluten und prozentualen Zunahme am $CD4^+$ T-Zellanteil führen [225; 213]. Darauf aufbauende Untersuchungen haben ferner ergeben, dass durch CD28-SA naive wie Gedächtnis T_{reg} Zellen gleichermaßen stimuliert werden [226]. Therapeutisch werden CD28-SA bereits im Tiermodell für Autoimmunerkrankungen, wie MS [227], oder auch für Erkrankungen mit verstärkter Inflammation, wie der akuten Spender-versus-Empfänger-Reaktion (aGvHD) [228] oder dem Herzinfarkt [229] erfolgreich eingesetzt.

1.3 Vergleich porciner und humaner T-Zellen

Nachdem im vorherigen Hauptkapitel T-Zellen in ihrer Entwicklung und Funktion im Allgemeinen am Beispiel des Menschen erläutert wurde, wird das vorletzte Hauptkapitel der Einleitung sich mit zentralen molekularen Unterschieden und Gemeinsamkeiten der porcinen und humanen T-Zellen beschäftigen.

1.3.1 Durchflusszytometrische Charakterisierung der T-Zellen

Zelltyp	phänotypische Zellmarker	
	Mensch	Schwein
CD8⁺ T-Zelle	$\alpha\beta$ TZR ⁺ CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD4 ⁻	$\alpha\beta$ TZR ⁺ CD3 ⁺ CD4 ⁻ CD8 α^{high} CD8 β^+ [230]
CD4⁺ T-Zelle	$\alpha\beta$ TZR ⁺ CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD8 ⁻	$\alpha\beta$ TZR ⁺ CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD8 α^- / CD8 α^{low} CD8 β^- [231]
Foxp3⁺ T_{reg} Zelle	CD25 ^{high} Foxp3 ^{high} [232]	CD25 ^{high} Foxp3 ⁺ [233]
CD4⁺ T_{conv} Zelle	CD25 ⁻ / CD25 ⁺ Foxp3 ⁻ / Foxp3 ^{low} [232]	CD25 ⁻ Foxp3 ⁻ [233]
CD4⁺ T_{mem}	[234]	CD8 α^{low} [231]
<i>zentral</i>	CD45RO ⁺ CD62L ^{high}	CD8 α^{low} CD27 ⁺ [235]
<i>Effektor</i>	CD45RO ⁺ CD62L ⁻ / CD62L ^{low}	CD8 α^{low} CD27 ⁻ [235]
CD4⁺ T_{naiv}	CD45RO ⁻ CD62L ⁺ [234]	CD8 α^- CD27 ⁺ [231; 235]
iNKT	V α 24J α 18 CD4 ⁺ / CD4 ⁻ CD8 α^+ [236]	V α 87-J α 60 CD4 ⁻ CD8 α^+ [237; 238]
$\gamma\delta$ T-Zelle	$\gamma\delta$ TZR ⁺ CD3 ⁺ CD4 ⁺ / CD4 ⁻ CD8 ⁺ / CD8 ⁻ [239]	$\gamma\delta$ TZR ⁺ CD3 ⁺ CD4 ⁻ CD8 α^+ / CD8 α^- [240; 241]

Tab. 2: Durchflusszytometrische Zellmarker humaner und porciner T-Zellen

Gemäß den Ausführungen in Tab. 2 ist zu entnehmen, dass sich humane und porcine T-Zellen in Bezug auf ihre phänotypische Marker sehr stark ähneln können. So werden regulatorische Foxp3⁺ T-Zellen beider Spezies beinahe identisch charakterisiert. Die phänotypische Charakterisierung CD4⁺ naiver und Gedächtniszellen T-zellen weicht hier jedoch deutlich voneinander ab.

1.3.2 CTLA-4

Bei der Betrachtung der mRNA-Sequenz für CTLA-4 gemäß Abb. 6 und Tab. 3 fällt zunächst auf, dass das Schwein verglichen mit anderen typischerweise in Tiermodellen verwendeten Spezies eine höhere allgemeine Übereinstimmung mit der humanen mRNA-Sequenz aufweist. Innerhalb besonders wichtiger und stark konservierter Bereiche, wie dem B7-Bindemotiv, weicht das Schwein wiederum ab. Diese Abweichungen führen unter anderem dazu, dass eine Interaktion porciner T-Zellen mit humanen oder Maus-APCs über B7-CTLA-4 nicht mehr möglich ist. Diese und weitere Interaktionsmöglichkeiten sind dabei in Tab. 4 zusammengefasst.



Abb. 6: Speziesübergreifender Sequenzvergleich des CTLA-4 Moleküls

„-“ bedeutet Spezies übergreifende Übereinstimmung der Aminosäurenposition, „_“ bedeutet Abweichung der Aminosäurenposition nur in der porcinen Sequenz, „p“ bedeutet porcine, „h“ bedeutet human, „r“ bedeutet Ratte, „m“ bedeutet Maus, „□“ kennzeichnet die Epitop-Bindungsstelle der B7-Moleküle mit dem CTLA-4 Molekül. Referenzsequenzen und Analyseverfahren sind in Tab. 3 angegeben.

Spezies	Referenzsequenz	E-Wert		Übereinstimmung	
		Schwein	Mensch	Schwein	Mensch
Sus scrofa	NP_999314.1	8e-173	3e-148	100,0 %	85,0%
Homo sapiens	NP_005205.2	3e-148	3e-173	85,0 %	100,0 %
Mus musculus	NP_033973.2	2e-130	1e-125	76,0 %	75,0 %
Rattus norvegicus	NP_113862.1	5e-130	3e-131	75,0 %	76,0 %

Tab. 3: Speziesübergreifender Sequenzvergleich des CTLA-4 Moleküls

Zur Analyse der Sequenzübereinstimmung wurde das online Analyseprogramm BLASTp (Version 2.7.1+) der National Center for Biotechnology Information (NCBI) mit DELTA-BLAST Algorithmus angewendet.

		B7		
		Mensch	Maus	Schwein
CTLA-4 / -lg	Mensch	CD86: + [242]	CD86: + [244]	CD80: + [247]
		B7: + [243]	B7: + [245; 246]	CD86: + [248]
		B7: + [243]	B7: + [245; 246]	B7: + [249; 243]
	Maus	CD80: + [250]	CD80/86: + [251]	CD80/86: ~ [251]
	Schwein	CD80: - [247]	CD80/86: ~ [253; 251]	CD80/86: + [251]
		B7: - [243; 249; 252]		B7: + [243]

Tab. 4: Kreuzreaktivität zwischen B7 und CTLA-4/ -lg verschiedener Spezies

„+“ bedeutet starke Kreuzreaktivität, „~“ bedeutet schwache Kreuzreaktivität, „-“ bedeutet keine Kreuzreaktivität.

1.3.3 CD28

Analog zum CTLA-4-Sequenzvergleich zwischen Mensch und Schwein weist das Schwein im Spezies übergreifenden Vergleich auch für CD28 eine höhere allgemeine Übereinstimmungsrate mit der humanen mRNA Sequenz auf. Bei genauerer Betrachtung der erst kürzlich aufklärten porcinen CD28 (pCD28) mRNA Sequenz [254] zeigt sich auch hier eine deutliche Abweichung im Spezies übergreifenden Vergleich für stark konservierte Bereiche, wie dem B7-Bindemotiv. Sequenzvergleich und -analyse sind in Abb. 7 und Tab. 5 festgehalten.

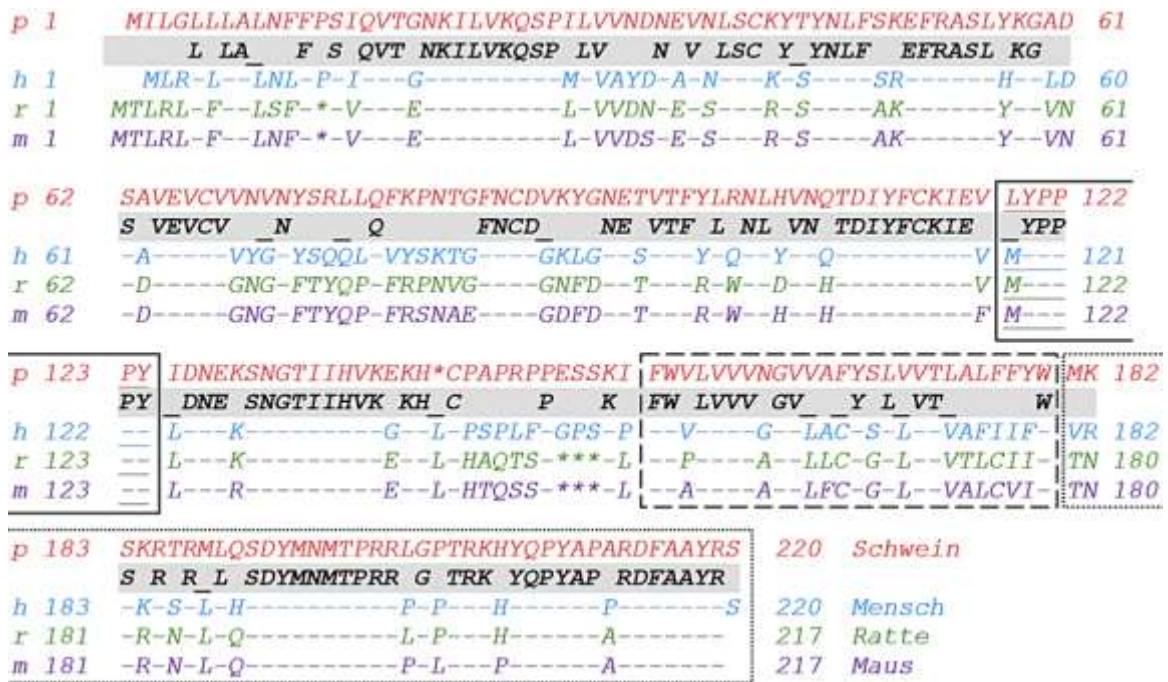


Abb. 7: Speziesübergreifender Sequenzvergleich des CD28 Moleküls

„-“ bedeutet Spezies übergreifende Übereinstimmung der Aminosäureposition, „_“ bedeutet Abweichung der Aminosäureposition nur in der porcinen Sequenz, „*“ bedeutet Interposition von Aminosäuren in anderen Sequenzen an dieser Position, „p“ bedeutet porcine, „h“ bedeutet human, „r“ bedeutet Ratte, „m“ bedeutet Maus, „□“ kennzeichnet das B7-Bindemotiv, „|”“ kennzeichnet die Transmembranregion, „-”“ kennzeichnet den zytoplasmatischen Teil gemäß [254]. Referenzsequenzen und Analyseverfahren sind in Tab. 5 angegeben.

Spezies	Referenzsequenz	E-Wert		Übereinstimmung	
		Schwein	Mensch	Schwein	Mensch
Sus scrofa	NP_001274339.1	5e-171	5e-117	100,0 %	78,0%
Homo sapiens	NP_006130.1	5e-117	7e-171	78,0 %	100,0 %
Rattus norvegicus	NP_037253.1	5e-113	6e-110	71,0 %	70,0 %
Mus musculus	NP_031668.3	1e-107	3e-109	69,0 %	69,0 %

Tab. 5: Speziesübergreifender Sequenzvergleich des CD28 Moleküls

Zur Analyse der Sequenzübereinstimmung wurde das online Analyseprogramm BLASTp (Version 2.7.1+) der National Center for Biotechnology Information (NCBI) mit DELTA-BLAST Algorithmus benutzt.

Inwieweit die beobachteten pCD28 Sequenzunterschiede einen Einfluss auf die Bindung zwischen porcinen T-Zellen und xenogenen APCs haben könnten, ist bislang aufgrund mangelnder Daten zur direkten pCD28-B7 Interaktion unklar. Bisherige Untersuchungsergebnisse zur Interaktion zwischen humanen T-Zellen und porcinen APCs sind in Abb. 4 zusammengefasst.

		B7		
		Mensch	Maus	Schwein
CD28	Mensch	CD86: + [242] CD80/86: + [255]	B7: + [256]	CD80: + [257] CD86: + [248] B7: + [249]
	Schwein	?	?	?

Tab. 6: Kreuzreaktivität zwischen B7-Molekülen und CD28 verschiedener Species
 „+“ bedeutet Kreuzreaktivität, „?“ bedeutet unbekannte Interaktion.

Mitunter ein wesentlicher Grund für die geringe Anzahl an durchgeführten Studien zur Expression, Funktion und Interaktion des porcinen CD28 Moleküls wird vermutlich die eingeschränkte Auswahl an spezifischen Untersuchungsmöglichkeiten sein. In Bezug auf immunologisch basierte Verfahren gibt es, wie in Tab. 7 ersichtlich, beispielsweise aktuell noch keine verfügbaren monoklonalen Antikörper (mAb) mit primärer Spezifität für oder Kreuzreaktivität mit Schweine CD28.

Klon	stimulatorisches Potenzial	Reaktivität			
		Mensch PBMC	Maus Milz	Ratte Milz	Schwein Milz
TGN1412/ TAB08	superagon.	+	-	-	-
D665	superagon.	-	+	-	-
JJ316	superagon.	-	-	+	-
204-12	konventionell	+	-	∅	-

Tab. 7: Testung verfügbarer CD28 mAb auf Kreuzreaktivität mit CD4⁺ T-Zellen verschiedener Spezies

„-“ bedeutet keine Kreuzreaktivität, „+“ bedeutet vorhandene Kreuzreaktivität, „∅“ bedeutet nicht getestet. Für die Spezies Maus, Ratte und Schwein wurden Milzen und für die humanen Zellen wurden mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMCs) für die Isolation von CD4⁺ T-Lymphozyten verwendet. Quelle: unveröffentlichte Daten von N. Wolf, X. Ding, S. Uehlein, N. Beyersdorf.

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es, das bisher wenig erforschte porcine CD28 Molekül in Bezug auf Gen- und Proteinexpression sowie auf Funktion in Leukozyten Dt. Landrasse Schweine tiefergehend zu untersuchen. Untersuchungsgrundlage dieses Forschungsvorhabens bildete, wie in Abb. 8 dargestellt, die porcine Milz, das größte sekundär lymphatische Organ des Schweins [258].

Der erste Teil dieser Arbeit behandelte zunächst die Analyse der pCD28 Genexpression mittels RT-PCR in porcinen Splenozyten. Zur Bestätigung der qualitativen RT-PCR Ergebnisse wurde eine durchflusszytometrisch-basierte quantitative mRNA-Expressionsanalyse auf Einzelzellebene mittels Prime Flow® durchgeführt.

Der zweite Teil dieser Arbeit befasste sich im ersten Schritt mit der Selektionierung und Charakterisierung pCD28 spezifischer mAb. Hierfür wurden die selbst generierten Maus anti-Schwein CD28 mAb Klone und Subklone zuerst einer Affinitätstestung an porcinen Splenozyten sowie anschließend einer Kreuzreaktivitätstestung an humanen PBMCs und Maus-Splenozyten unterzogen. Nach Auswahl geeigneter anti-pCD28 mAb Klone wurde im zweiten Schritt mit der Charakterisierung der pCD28 Oberflächenexpression auf porcinen Splenozyten bzw. auf CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen fortgefahren. Analog zur durchflusszytometrischen mRNA-Analyse wurden auch hier CD4⁺ T-Zellsubpopulationen miteinander verglichen.

Im dritten und letzten Teil der Arbeit wurde die funktionelle Untersuchung des pCD28 Moleküls sowie die weitere Antikörpercharakterisierung näher beleuchtet. In verschiedenen Proliferationsassays wurde das pCD28 Oberflächenmolekül auf Kostimulation, direkte Stimulation und superagnostische Funktion an verschiedenen T-Zellpopulationen getestet.



Abb. 8: Fotografische Beispielaufnahme einer verwendeten porcinen Milz

Wie hier beispielhaft in der Abbildung gezeigt, besitzen porcine Milzen eine lang gestreckte Form mit einer durchschnittlichen Länge von ca. 30 cm. Der dreieckige Querschnitt ist im Bild nur angedeutet zu erkennen.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Gerät	Typ	Hersteller
Durchflusszytometer	LSR II	BD Bioscience, Heidelberg
Eismaschine	AF100	Scottsman, Vernon Hills, USA
FACSSorter	FACS Aria III	BD Bioscience, Heidelberg
Feinstwassersystem	Barnstead™ GenPure™ Pro UV/ UF	Life Technologies GmbH, Darmstadt
Gefrierschrank -80 °C	Forma™ 600 Series	Life Technologies GmbH, Darmstadt
Geltrockner	Drystar B	H. Hözel Labortechnik GmbH, Wörth
Heizblock	Thermocycler comfort	Eppendorf AG, Hamburg
Inkubator	Heraeus®	Kendro Laboratory Products GmbH, Hanau
	HERACell150i	Life Technologies GmbH, Darmstadt
	HERACell 140i	Darmstadt
Lichtmikroskop	DMLS	Leica Microsysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar
	513558	Leitz, Wetzlar
	CK41	Olympus Deutschland GmbH, Hamburg
Magnethalter	MACS Multistand	Miltenyi Biotech GmbH, Bergisch Gladbach
	Research 300	Eppendorf AG, Hamburg
Multipipetten	Socorex Acura 885	Fisher Scientific GmbH, Schwerte-Geisecke
	Nanodrop 2000	Life Technologies GmbH, Darmstadt
Netzgerät	microcomputer electro- phoresis power supply	Consort bvba, Turnhout, BE
pH-Meter	Hi9321 microprocessor	Hanna Instruments, Vöhringen
Pipettierhilfe	accu-jet® pro	Brand GmbH & Co KG, Wertheim
	Pipetus	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Reagenzglas- schüttler	Vortex Genie 2™	A. Hartenstein, Würzburg

Sicherheitswerkbank	Heraeus® HERAsafe® KS12	Kendro Laboratory Products GmbH, Hanau
Thermocycler	Mastercycler	Eppendorf AG, Hamburg
	TPersonal	Biometra GmbH, Göttingen
Tischzentrifuge	Heraeus® Biofuge Fresco	Kendro Laboratory Products GmbH, Hanau
	Centrifuge 5415 C	Eppendorf AG, Hamburg
UV-System	Gel iX20 Imager	Intas Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen
Wasserbad	1002	Gesellschaft für Labortechnik GmbH, Burgwedel
	1083	
Zählkammer	Neubauer-improved 0,01 mm	Paul Marienfeld GmbH und Co. KG, Lauda-Königshofen
Zentrifuge	Heraeus® Megafuge 1.0 R	Kendro Laboratory Products GmbH, Hanau

2.1.2 Software

Software, Version	Hersteller
Graph Pad Prism® v5.0	Graph Pad Software Inc., San Diego, USA
FlowJo v8.8.3, v10	Treestar, Ashland, USA
FACSDiva Software	BD Bioscience, Heidelberg

2.1.3 Verbrauchsmaterialien

Produkt	Bezugsquelle
FACS-Röhrchen, 5 ml	Sarstedt AG & Co., Nürnberg
Konische Zentrifugenröhrchen, 15,0 ml/ 50 ml	Sarstedt AG & Co., Nürnberg Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Kryokonservierungsgefäße, 1,5 ml	Carl-Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
LD Säule	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
Microtiter-Gefäße	A. Hartenstein, Würzburg
Mikrotiterplatte FB, 24 Näpfe/ 96 Näpfe	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen BD Biosciences Falcon®, Heidelberg
Mikrotiterplatte RB/ VB, 96 Näpfe	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Petrischale steril, 60/15 mm	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Röhre, 5 ml	Sarstedt AG & Co., Nürnberg
Serologische Pipetten, 2,0 ml/ 5,0 ml/ 10,0 ml/ 25,0 ml	Sarstedt AG & Co., Nürnberg
Sterile Einweg-Bottle Top Filter	Life technologies Nalgene™ Rapid-Flow™,

mit SFCA-Membran	Darmstadt
Zellsiebe, 40,0 µm/ 70,0 µm	BD Biosciences Falcon®, Heidelberg

2.1.4 Chemische Substanzen

Substanz	Bezugsquelle
Acrylamid 4K Solution, 30 %	AppliChem GmbH, Darmstadt
Agarose	AppliChem GmbH, Darmstadt
APS-Pulver	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
BSA	Carl-Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
CaCl₂ 2 H₂O	Merck, Darmstadt
CaCl₂ 4 H₂O	Merck, Darmstadt
Cell Proliferation Dye eFluor 670	eBioscience Inc., Frankfurt a. M.
CFSE	Biologend, San Diego, USA
Concanavalin A	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
DAPI	Life Technologies GmbH, Darmstadt
D-Glucose	Carl-Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Diethylamin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
DMEM high glucose	Lonza Bio Whittaker, HESSISCH Oldendorf
DMSO	Sigma Aldrich Co., Taufkirchen
DPBS	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach
EDTA (0,5 M)	Carl-Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Essigsäure	AppliChem GmbH, Darmstadt
FACSClean	BD Bioscience, Heidelberg
FACSRinse	BD Bioscience, Heidelberg
FCS	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Fixable Viability Dye eFluor 780	eBioscience Inc., Frankfurt a. M.
GeneRuler 1 kb DNA ladder	Life Technologies GmbH, Darmstadt
Glycerin	Carl-Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
HEPES	Lonza Group AG, Basel, CH
KCl	Carl-Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
KH₂PO₄	Carl-Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
L-Glutamin (200 mM)	Life Technologies GmbH, Darmstadt
LSM 1077	GE Healthcare, Uppsala, SW
MgCl₂ 6 H₂O	Carl-Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
MgSO₄ 7 H₂O	Merck, Darmstadt
Na₂HPO₄ 2 H₂O	Carl-Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
NaCl	Carl-Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
NaN₃	AppliChem GmbH, Darmstadt
Na-Pyruvat (100 mM)	Life Technologies GmbH, Darmstadt
nicht-essent. AS, MEM (100x)	Life Technologies GmbH, Darmstadt
Orange G	Carl-Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Page Ruler Prestained Protein Ladder	Life Technologies GmbH, Darmstadt
Pen-Strep	PromoCell GmbH, Heidelberg

Pen-Strep (10.000 U/ ml)	Life Technologies GmbH, Darmstadt
Phenolrot	Merck, Darmstadt
Proleukin® S	Novartis Pharma GmbH, Nürnberg
Protein G Sepharose, 4 Fast Flow	GE Healthcare, Uppsala, SW
RPMI 1640 + L-Glutamin	Life Technologies GmbH, Darmstadt
TEMED	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Tris	Merck, Darmstadt
Tris ultrapure	AppliChem GmbH, Darmstadt
Trypanblau	AppliChem GmbH, Darmstadt Sigma Aldrich, Taufkirchen
β-Mercaptoethanol (50 mM)	Life Technologies GmbH, Darmstadt

2.1.5 Medien

Bezeichnung	Bestandteile	
Kryokonservierungsmedium porciner Zellen	70 %	FCS
	10 %	DMSO
	20 %	RPMI 1640 Supp.
Zellkulturmedium RPMI 1640 Supp.	40,0 ml	SC
	5,0 %	FCS
	in 500 ml	RPMI 1640

2.1.6 Puffer und Lösungen

Bezeichnung	Bestandteile	
BSS	1100 ml	BSS I
	1100 ml	BSS II
	auf 10 l	Aqua dest. auffüllen
BSS I	18,6 g	CaCl ₂ 2 H ₂ O
	40,0 g	KCL
	800,0 g	NaCl
	20,0 g	MgCl ₂ 6 H ₂ O
	20,0 g	MgSO ₄ 7 H ₂ O
	in 10 l	Aqua dest.
BSS II	100,0 g	D-Glucose
	6,0 g	KH ₂ PO ₄
	23,8 g	NaHPO ₄ 2 H ₂ O
	1,0 g	Phenolrot
	in 10 l	Aqua dest.
BSS-BSA	20 g	BSA
	in 10,0 l	BSS
Coomassie- Entfärbelösung	12,5 %	Isopropanol
	10,0 %	Essigsäure
	in 0,5 l	ddH ₂ O
Coomassie-Färbelösung	12,5 %	Isopropanol

2. Material und Methoden

	10,0 %	Essigsäure
	0,25 %	Coomassie Blue R250
	in 0,5 l	ddH ₂ O
Elutionspuffer pH 11,0	50 mM in	Diethylamin H ₂ O
FACS-Puffer	0,10 % 0,02 % in	BSA NaN ₃ PBS für FACS
Fixationslösung	25 % in	Fixation/ Permeabilization concentrate Fixation/ Permeabilization Diluent
Lagerungspuffer	0,9 % in	NaN ₃ PBS
Lämmli nicht-reduzierend 6x	0,72 ml 2,4 ml 3,0 ml 1,2 ml 2,68 ml	Tris (1,0 M, pH 6,8) SDS (10,0 %) Glycerin Bromphenolblau (0,1 %) ddH ₂ O
Laufpuffer 5x	94,0 g 15,1 g 10,0 % in 1,0 l	Glycin Tris SDS ddH ₂ O
NaCl-Lösung 1,8 %	18,0 g in 1,0 l	NaCl ddH ₂ O
Neutralisationspuffer pH 6,0	2 M in	Tris H ₂ O
Orange G	10 g 3,0 ml 7,0 ml	Orange G Glycerin ddH ₂ O
PBS	80,0 g 2,0 g 11,5 g 2,0 g 1,670 g 1,0 g in 10 l	NaCl KCl Na ₂ HPO ₄ 2 H ₂ O KH ₂ PO ₄ CaCl ₂ 4 H ₂ O MgCl ₂ 6 H ₂ O Aqua dest.
PBS für FACS	80,0 g 2,0 g 11,5 g 2,0 g in 10 l	NaCl KCl Na ₂ HPO ₄ 2 H ₂ O KH ₂ PO ₄ Aqua dest.
Permeabilisierungslösung	10 % in	10x Permeabilization Buffer ddH ₂ O
RLT-Puffergemisch	10 µl 1000 µl	β-Mercaptoethanol RLT-Puffer
RT-PCR Mastermix	10 µl 2,5 µl 1,0 µl	10x Puffer pro 1:10 verdünnten Primer Betaine

2. Material und Methoden

	1 µl	10mM dNTPs
	0,5 µl	Phusion High Fidelity DNA Polymerase
	30,5 µl	H ₂ O
Sammelgel 4 %	750 µl	Tris (1 M, pH 6,8)
	60 µl	SDS (10 %)
	1,4 ml	TEMED
	40 µl	APS (10 %)
	3,7 ml	H ₂ O
	780 µl	Acrylamid
SC	500 ml	FCS
	100 ml	Na-Pyruvat 100 mM
	100 ml	nicht-essent. AS, Mem (100x)
	100 ml	Pen-Strep 10.000 U/ ml
	5,0 ml	β-Mercaptoethanol 50 mM
	60,0 ml	5 % Glutamin Lsg.
TAE 1x	20,0 ml	50x TAE
	980,0 ml	ddH ₂ O
TAE 50x	121,0 g	Tris
	28,55 ml	Essigsäure
	50 ml	0,5 M EDTA
	auf 500 ml	ddH ₂ O
Trenngel 12 %	2,5 ml	Tris (1,5 M, pH8,8)
	0,1 ml	SDS (10 %)
	10 µl	TEMED
	50 µl	APS (10%)
	3,35 ml	H ₂ O
	4,0 ml	Acrylamid
Trypanblau-Lösung	0,04 %	Trypanblau
	in	PBS
Waschpuffer	1 M	NaCl
	in	PBS

2.1.7 Kits

Bezeichnung	Bezugsquelle
AbC™ Total Antibody Compensation Bead Kit	Life technologies Molecular Probes™, Darmstadt
DNase I (Amplification Grade)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Foxp3/ Transcription Factor Fixation/ Permeabilization Concentrate and Diluent	eBioscience Inc., Frankfurt a. M.
iScript cDNA synthesis kit	AbD Serotec, Puchheim
Mouse Monoclonal Antibody Isotyping Test Kit	AbD Serotec, Puchheim
Mouse PrimeFlow RNA Assay Kit	eBioscience Inc., Frankfurt a. M.
RNeasy Mini Kit (50)	QIAGEN GmbH, Hilden

2.1.8 Antikörper

Erstantikörper	Klon	Bezugsquelle
humanisierter anti-Mensch CTLA-4-Ig		Bristol-Myers Squibb GmbH & Co. KGaA, München
Maus anti-Maus CD28	E18	ExBio, Prag, CZ
Maus anti-Maus Ki67 Alexa 647	B56	BD Bioscience, Heidelberg
Maus anti-Mensch CD28	204-12	Novus Biologicals LTD, Cambridge, UK
Maus anti-Mensch CD28	CD28.2	Biologend Inc., London, UK
Maus anti-Mensch CD4 PE	RPA-T4	eBioscience Inc., Frankfurt a. M.
Maus anti-Schwein CD25	K231.3B2	Bio-Rad AbD Serotec GmbH, Puchheim
Maus anti-Schwein CD3ϵ	PPT3	Bio-Rad AbD Serotec GmbH, Puchheim
Maus anti-Schwein CD3ϵ PE Cy7	BB23-8E6-8C8	BD Bioscience, Heidelberg
Maus anti-Schwein CD4α PE	74-12-4	BD Bioscience, Heidelberg
Maus anti-Schwein CD8α FITC	76-2-11	BD Bioscience, Heidelberg
Normales Maus Immunglobulin	polyklonal	Sigma Aldrich Co., Taufkirchen
Ratte anti-Maus B220 Alexa647	RA3-6B2	BD Bioscience, Heidelberg
Ratte anti-Maus CD3ϵ FITC	145-2C11	Biologend Inc., London, UK
Ratte anti-Maus CD4 PE	GK 1.5	Biologend Inc., London, UK
Ratte anti-Maus Fcγ	2.4G2	AG Kerkau, Würzburg
Ratte anti-Maus Foxp3 PE Cy5	FJK-16s	eBioscience Inc., Frankfurt a. M.
Ratte anti-Schwein $\gamma\delta$ T-cells APC	MAC320	BD Bioscience, Heidelberg

Zweitantikörper	Bezugsquelle
Ziege anti-Maus IgG (H+L) Alexa 647	Dianova GmbH, Hamburg
Ziege anti-Maus IgG (H+L) Biotin	Dianova GmbH, Hamburg
Ziege anti-Maus IgG (H+L) FITC	Dianova GmbH, Hamburg

Streptavidin-Konjugate	Bezugsquelle
Streptavidin PE-Cy5	Biologend Inc., London, UK
Streptavidin PerCP	Biologend Inc., London, UK

Antikörper-beschichtete magnetische Kügelchen	Bezugsquelle
CD90.2 MicroBeads, Maus	Miltenyi Biotech GmbH, Bergisch Gladbach
Invitrogen™ Dynabeads Pan Mouse IgG	Life Technologies GmbH, Darmstadt

2.1.9 Primer

Primer	5'-3'-Sequenz	Bezugsquelle
pCD28 Fwd	CTAGAATTCGCCGCCACCATGA- TCCTCGGGTTACTCCTGGC	Sigma Aldrich Co., Taufkirchen
pCD28 Rev	CTAGGGATCCTCAGGAGCGGTA- GGCTGCAAA	Sigma Aldrich Co., Taufkirchen
hActin b as	CTAGAAGCATTTCGCGGTGGACG- ATGGAGGG	Sigma Aldrich Co., Taufkirchen
hActin b es	TGACGGGGTCACCCACACTGTG- CCCATCTA	Sigma Aldrich Co., Taufkirchen

2.1.10 Biologische Stoffe

Zell-/ Zuchtlinie	Spezies/ Genom	Herkunft
A20J	Mus musculus	Institut für Virologie und Immunbiologie, Würzburg
Blutzapfen	Homo sapiens	Ambulanz für Transfusionsmedizin des Universitätsklinikum Würzburg, Würzburg ¹
BW	Mus musculus	Institut für Virologie und Immunbiologie, Würzburg
C57BL/6 wt	Mus musculus	Institut für Virologie und Immunbiologie, Würzburg
Dt. Landrasse	Sus scrofa	Metzgerei Hollerbach, Rimpar

¹ In Einklang mit den Richtlinien des Ethikkomitees der Medizinischen Fakultät der Universität Würzburg (voll anonymisiert).

2.2 Methoden

2.2.1 Zellbiologische Methoden

2.2.1.1 Allgemeine Zellkulturmethoden

2.2.1.1.1 Einzelzellsuspension lymphatischer Organe

Nach der fachgerechten Tötung der Tiere wurden die Organe entnommen und zur Vereinzelung der Zellen mittels eines 12 ml Spritzenstempels durch ein Nylon-Zellsieb gerieben. Entsprechend des jeweiligen Versuchsansatzes wurde die Zellsuspension anschließend entweder steril für Zellkulturen in BSS-BSA bzw. in RPMI 1640 Supp. oder unsteril für FACS-Analysen in PBS bzw. FACS-Puffer aufgefangen. Für die porcinen Zellen wurde von Sieben mit 70 µm Maschenbreite, für die Maus-Zellen Siebe mit 40 µm Maschenbreite Gebrauch gemacht. In Bezug auf dt. Landrasse-Schweine erfolgte nur eine Aufarbeitung der Milz.

2.2.1.1.2 Bestimmung der vitalen Zellkonzentration/ -zahl

Zur Bestimmung der Zellkonzentration bzw. der absoluten Zellzahl wurden 10 µl der Zellsuspension im Verhältnis 1:10 mit 0,04 %iger Trypanblau-Lsg. vermischt und auf eine Neubauer-Zählkammer aufgetragen. Gemäß der Formel in Abb. 9 konnte anhand der unter dem Lichtmikroskop bestimmten Zellzahl Z pro Gruppenquadrat Q sowie das zur Resuspension verwendete Volumen V die Zellkonzentration c bzw. die absolute Zellzahl Z_a berechnet werden.

$$Z_a = c [\text{Zellzahl/ ml}] \times V [\text{ml}] = \frac{Z_{Q1} + Z_{Q2} + Z_{Q3} + Z_{Q4}}{4} \times 10 \times 10^4 \times V [\text{ml}]$$

Abb. 9: Berechnung der vitalen Zellkonzentration und -zahl

2.2.1.1.3 Isolation von Lymphozyten

Zur Isolation von mononukleären Zellen aus heparinisierem Blut oder Milzgewebe wurde die Dichtegradientenzentrifugation durchgeführt. Hierzu wurden zunächst 15 ml LSM 1077 in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen pipettiert und anschließend für 5 Min. bei 355 g und RT zentrifugiert. Anschließend wurden dann 30 ml Blut bzw. 30 ml Milz-Zellsuspension vorsichtig über den Gradienten geschichtet und für 15 Min. bei 1132 g, RT und ohne Bremse zentrifugiert.

Im weiteren Schritt wurde dann unter Zuhilfenahme einer Pasteurpipette der Lymphozytenring vorsichtig abgenommen, in ein neues 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt, bei 355 g und 10°C für 5 Min. zentrifugiert, der Überstand (Ü/S) abgenommen und das Pellet zur anschließenden Zellzahlbestimmung in ca. 5 ml BSS-BSA resuspendiert. Die Milz-Zellsuspension wurde dabei nach dem in 2.2.1.1 geschilderten Verfahren steril hergestellt. Verwendet wurde die Zentrifuge Megafuge 1.0R Zentrifuge der Firma Kendro.

2.2.1.1.4 Kryokonservierung porciner Leukozyten

Für die kurzfristige Kryokonservierung porciner Leukozyten wurden die Zellen im Anschluss an die in 2.2.1.1.3 Isolation von Lymphozyten beschriebene Zellisolation mittels Zentrifugation (5 Min., 355 g, 10°C, Megafuge 1.0R Zentrifuge der Firma Kendro) pelletiert und durch Resuspension mit Kryokonservierungsmedium auf eine Zellkonzentration von 1×10^7 Zellen/ ml eingestellt. Die zu je 1,0 ml aliquotierten Zellsuspensionen wurden dann jeweils in ein 1,5 ml Kryokonservierungsgefäß bei -80°C für die Dauer von bis zu 12 Monaten tiefgefroren.

2.2.1.1.5 Auftauen porciner Leukozyten

In Vorbereitung auf das Auftauen der kryokonservierten porcinen Leukozyten wurde das Zellkulturmedium zusammen mit dem Wasserbad auf 37 °C erwärmt. Anschließend wurden dann jeweils drei der im 37 °C warmen Wasserbad fast vollständig aufgetauten Zellsuspensions-Aliquots in ein konisches 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Im nächsten Schritt wurden dann die leeren Kryokonservierungsgefäße drei Mal mit jeweils einem 1 ml des erwärmten Zellkulturmediums ausgewaschen und das Medium tropfenweise zur Zellsuspension pipettiert.

Nach diesem Vorgang erfolgte dann das langsame tropfenweise Auffüllen der Zentrifugenröhrchen mit erwärmtem Zellkulturmedium auf 50 ml, die dann für 5 Min. bei 355 g und 20 °C in der Megafuge 1.0R Zentrifuge der Firma Kendro zentrifugiert wurden.

2.2.1.1.6 Zellmarkierung mit eFluor670

Die zu markierenden Zellen wurden zunächst zwei Mal mit PBS gewaschen und anschließend auf eine Zellkonzentration von 2×10^7 Zellen/ ml eingestellt. Nach diesem Vorbereitungsschritt mit 37 °C warmen PBS wurde eine 1:500 Verdünnung des Proliferationsfarbstoffs eFluor670 hergestellt. Verwendet wurde hierfür das gleiche Volumen an 37 °C warmem PBS wie für das Einstellen der Zellkonzentration.

Im nächsten Schritt wurde dann unter Verwendung eines Reagenzglasschüttlers die Zellsuspension mit der eFluor670-Verdünnung vermischt und für 10 Min dunkel im Wasserbad bei 37 °C inkubiert.

Durch die Zugabe des 4- bis 5-fachen Volumens an eiskaltem BSS-BSA sowie die anschließende 5-minütige Inkubation bei 4 °C wurde die weitere Farbstoff-Aufnahme in die Zellen gestoppt und nicht-aufgenommenes eFluor670 durch einen 2-maligen Waschschrift mit BSS-BSA entfernt. Alle Waschschriffe erfolgten bei 355 g für 5 Min. bei 10 °C in der Zentrifuge Megafuge 1.0R der Firma Kendro.

2.2.1.2 Proliferationsassays

2.2.1.2.1 Xenogene gemischte Lymphozytenreaktion

Zur Analyse einer funktionellen Bedeutung des pCD28 Oberflächenmoleküls wurden Versuche zur xenogenen gemischten Lymphozytenreaktion (MLR) von isolierten Lymphozyten dt. Landrasse-Schweine mit Antigen-präsentierenden Zellen von C57BL/6 wt Mäusen unternommen. Die verwendeten Mäuse entstammten der Hauszucht des Instituts für Virologie und Immunbiologie Würzburg und befanden sich im Alter zwischen 17 und 21 Wochen. Für den Versuch wurden zunächst Milzen beider Spezies aufgereinigt, die Lymphozyten isoliert und die T-Lymphozyten der Maus-Splenozyten gemäß 2.2.3.3 negativ selektioniert.

Anschließend wurden jeweils 1×10^5 eFluor670 markierte Schweine Lymphozyten zusammen mit 1×10^5 T-Zell-depletierten Maus-Milzzellen für sechs Tage in 96-Napf-Rundbodenplatten in Kultur genommen.

Dabei wurde das Zellkulturmedium mit hCTLA-4-Ig (0 µg/ ml, 0,025 µg/ ml, 0,25 µg/ ml, 2,5 µg/ ml) und rekombinant erzeugtem, humanem Proleukin (0 M, $0,25 \times 10^{-7}$ M) versetzt. Als syngene Negativkontrolle diente ein Versuchsansatz ohne hCTLA-4-Ig, jeweils mit und ohne Proleukin (IL-2). Die Versuchsansätze wurden jeweils als Dubletten angelegt.

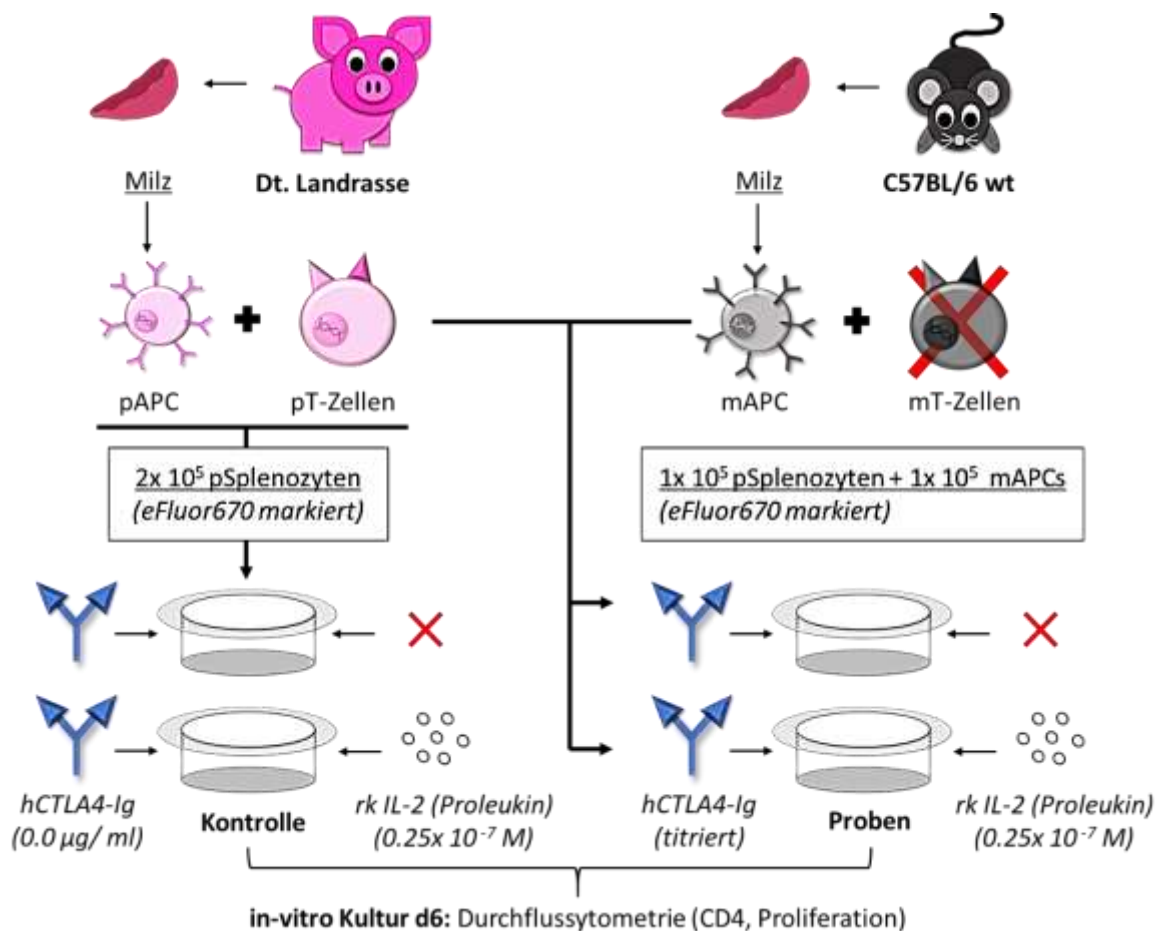


Abb. 10: Versuchsansatz zur xenogenen gemischten Lymphozytenreaktion

„pAPC“ bzw. „mAPC“ steht für porcine bzw. Maus-Antigen-präsentierende Zellen, „pT-Zellen“ bzw. „mT-Zellen“ steht für porcine bzw. Maus-T-Zellen, „hCTLA-4-Ig“ steht für humanes CTLA-4-Immunglobulin. Inkubation porciner Splenozyten im syngenem Ansatz ohne mAPC und im xenogenen Ansatz mit mAPC aus der Milz von C57BL/6 wt Mäusen. Die porcinen Splenozyten wurden vor Inkubation mit dem Proliferationsfarbstoff eFluor670 markiert. Zur Zellkultur wurden zusätzlich verschiedene Konzentrationen an hCTLA-4-Ig und rk IL-2 (Proleukin) gegeben. Nach 6-tägiger Inkubation (d6) erfolgte die durchflusszytometrische Analyse des Proliferationsverhaltens porciner CD4^+ T-Lymphozyten.

2.2.1.2.2 Kostimulatorische Aktivität des porcinen CD28

Zur Untersuchung der kostimulatorischen Aktivität des porcinen CD28 Oberflächenmoleküls wurden 2×10^5 eFluor670 markierte, isolierte Lymphozyten aus der Milz dt. Landrasse-Schweine für drei, vier oder fünf Tage zusammen mit anti-CD3 ϵ (PPT3) Antikörper-beladenen Dynabeads Pan Mouse Ig und anti-CD28 spezifischen Antikörperüberständen (CD28 mAb Ü/S) in einem Volumen von 200 μl in Kultur genommen. Verwendet wurden hierfür 96-Napf-Flachbodenplatten sowie anti-CD3 ϵ Antikörper-Konzentrationen von 20, 10, 5 und 0 $\mu\text{g/ml}$ für die Beschichtung der Dynabeads Pan Mouse Ig und anti-CD28 Antikörperüberstände in einer Verdünnung von 1:4.

Als Negativkontrolle diente jeweils ein Ansatz ohne Antikörperüberstand. Als Positivkontrolle dienten Ansätze mit jeweils 0,1 µg/ml und 1 µg/ml Concanavalin A. Zu den Zeitpunkten d3, d4 und d5 erfolgte dann die Auswertung der Proliferation von eFluor670 markierten CD4⁺ CD8α⁻/ CD8α^{low} T-Zellen, CD4⁻ CD8^{high} T-Zellen und doppelt negativen Zellen mittels Durchflusszytometrie am Durchflusszytometer LSRII der Firma BD.

Maus anti-Schwein CD28 mAb und anti-CD3ε mAb beladene Dynabeads Pan Mouse Ig

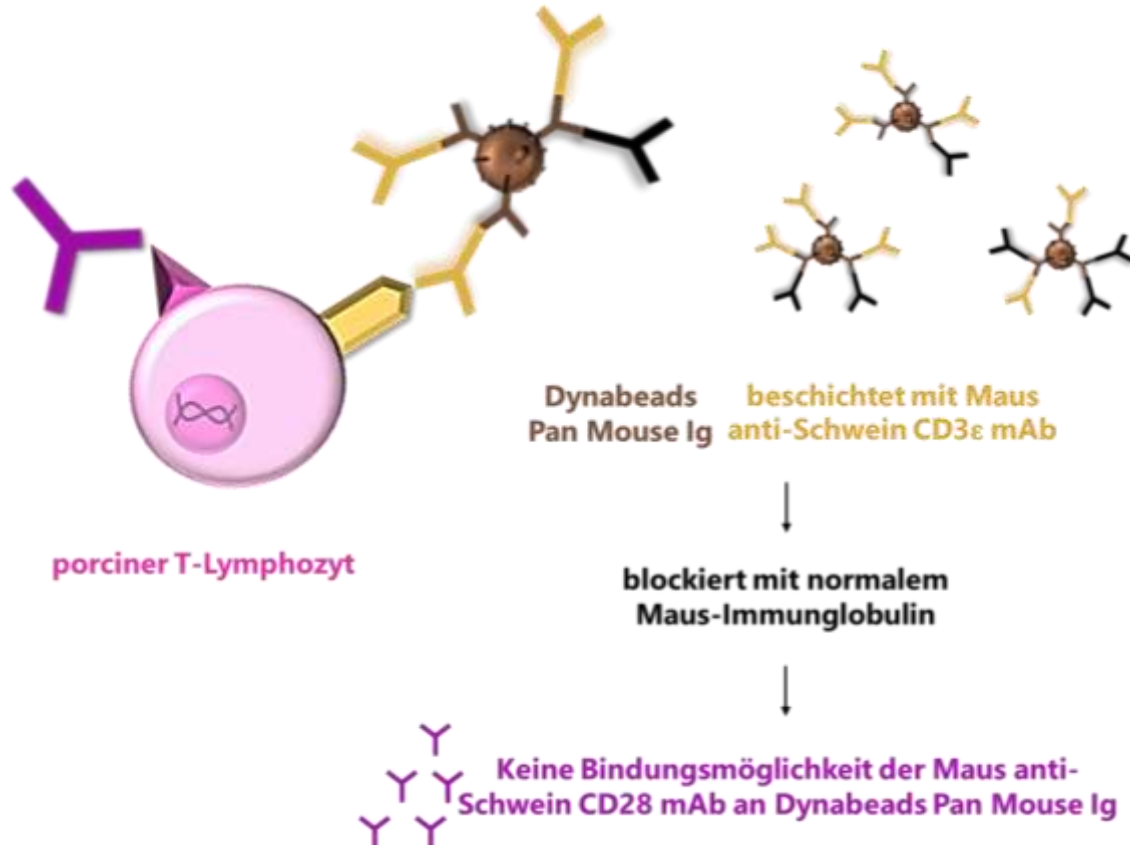


Abb. 11: Versuchsansatz zur Untersuchung der kostimulatorischen Aktivität des pCD28 Moleküls

Inkubation porciner Splenozyten mit anti-pCD28 mAb Ü/S in Lsg. und anti-CD3ε mAb beladenen Dynabeads Pan Mouse Ig. Die freien Bindungsstellen der Dynabeads Pan Mouse Ig wurden nach Beschichtung mit anti-CD3ε mAb mit normalem Maus-Immunglobulin blockiert.

2.2.1.2.3 Direkt stimulatorische Aktivität des porcinen CD28

Allgemein

Zur Untersuchung der direkt stimulatorischen Aktivität des porcinen CD28 Oberflächenmoleküls wurden 2×10^5 eFluor670 markierte isolierte Lymphozyten aus Milzen dt. Landrassenschweine für drei bis fünf Tage bei 37 °C und 5 % CO₂ zusammen mit CD28 mAb Ü/S, mit CD28 mAb Ü/S und unbeladenen Dynabeads Pan Mouse Ig oder mit CD28 mAb Ü/S beladenen Dynabeads Pan Mouse Ig in einem Volumen von 200 µl in Kultur genommen. Verwendet wurden hierfür 96-Napf-Rundbodenplatten sowie anti-CD28 mAb Ü/S in einer Verdünnung von 1:4.

Zu den Zeitpunkten d3, d4 und d5 erfolgte dann die Auswertung der Proliferation von e-Fluor670 markierten $CD4^+ CD8\alpha^- / CD8\alpha^{low}$ T-Zellen, $CD4^- CD8\alpha^{high}$ T-Zellen und doppelt negativen Zellen mittels Durchflusszytometrie am Durchflusszytometer LSR II der Firma BD. Eine schematische Darstellung der Versuchsansätze findet sich in Abb. 12.

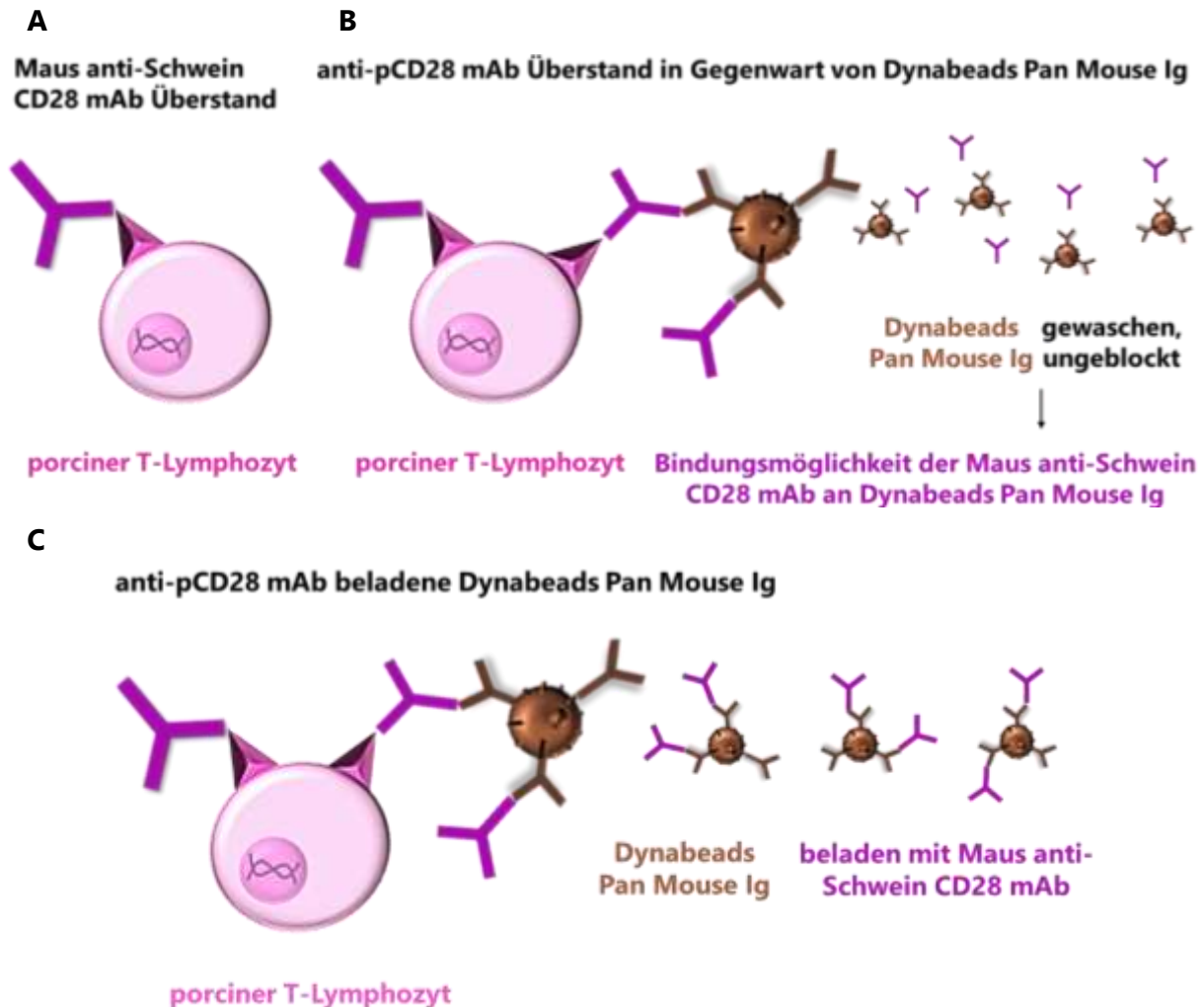


Abb. 12: Versuchsansätze zur Untersuchung der direkten stimulatorischen Funktion des pCD28 Moleküls

(A) Inkubation porciner Splenozyten mit anti-pCD28 mAb Ü/S in Lsg. (B) Inkubation porciner Splenozyten mit anti-pCD28 mAb Ü/S in Lsg. und unbeladenen Dynabeads Pan Mouse Ig. (C) Inkubation porciner Splenozyten mit anti-pCD28 mAb beladenen Dynabeads Pan Mouse Ig.

Sort-Kultur

Um eine mögliche direkt stimulatorische Funktion der Antikörperüberstände auf die einzelnen porcinen Lymphozyten-Subpopulationen genauer analysieren zu können, wurde der folgende Versuchsansatz mit sortierten und unsortierten, eFluor670 markierten porcinen Splenozyten durchgeführt.

Hierzu wurden in einer 96-Napfplatte jeweils 2×10^5 Zellen pro Napf in einem Volumen von 200 μl für drei, vier und fünf Tage bei 37 °C und 5,0 % CO_2 kultiviert. Anschließend wurde das Proliferationsverhalten mittels Durchflusszytometrie bestimmt.

Für die beiden Versuchsansätze, Medium und 1:4 in Medium verdünntem CD28 mAb Ü/S, wurden Rundbodenplatten verwendet. Für die Versuchsansätze mit Dynabeads Pan Mouse Ig wurden hingegen Flachbodenplatten eingesetzt. Im Verhältnis 5:1 wurden dabei entweder mit PBS gewaschene oder mit anti-pCD28 mAb beladene Dynabeads Pan Mouse Ig zu den Zellen hinzugegeben.

Zu den Zellkulturen mit unbeladenen Dynabeads Pan Mouse Ig wurden zusätzlich noch Antikörperüberstände in 1:4 Verdünnung hinzugegeben. Sortiert wurden folgende Lymphozyten-Subpopulationen $\text{CD4}^+\text{CD8}\alpha^- / \text{CD8}\alpha^{\text{low}}$, $\text{CD8}\alpha^{\text{high}}\text{CD4}^-$, $\text{CD4}^-\text{CD8}^-$ gemäß 2.2.3.1.1.

2.2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.2.1 Genexpressionsanalyse porciner Leukozyten

2.2.2.1.1 RNA-Extraktion

Für die Extraktion von RNA aus porcinen Splenozyten wurde das RNeasy Mini Kit verwendet. Hierfür wurde in Anschluss an das in 2.2.1.4 beschriebene Verfahren zur Zellisolation bzw. in Anschluss an den FACS-Sort 1×10^7 Zellen abzentrifugiert (355 g, 5 Min., 4 °C, Zentrifuge Heraeus® Megafuge 1.0 R der Firma Kendro), mittels 600 μl des RLT-Puffergemisches resuspendiert und lysiert. Für alle nachfolgend aufgeführten Zentrifugationsschritte wurde die Tischzentrifuge Heraeus® Biofuge Fresco der Firma Kendro verwendet.

Die Zellsuspension wurde auf eine QiaShredder Säule aufgetragen, für 2 Min. bei 16.060 g zentrifugiert und 350 μl des 70 %igen Ethanol hinzupipettiert. Im zweiten Schritt wurde dann 700 μl der Probe auf eine RNeasy Säule aufgetragen und für 20 s bei 9.503 g zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut verworfen und der Schritt mit der verbliebenen Probe wiederholt. Nach dem Verwerfen des Überstandes wurden 700 μl des Waschpuffers RW1 auf die Säule gegeben und die Säule bei 9.503 g für 20 s zentrifugiert.

Es folgte nach Verwerfen des Überstandes ein zweimaliger Waschvorgang mit 500 μl des Waschpuffers RPE. Hierfür wurde die Probe nach dem 1. Pipettieren für 10 s bei 9.503 g zentrifugiert und nach dem 2. Pipettieren für 2 Min. bei 9.503 g und 1 Min. bei 16.060 g zentrifugiert. Im letzten Schritt wurde die membrangebundene RNA in RNase-freies Wasser eluiert.

Hierfür wurde zunächst RNase-freies Wasser direkt auf die Membran der RNeasy Säule gegeben, die Säule in neues 1,5 ml Reagiergefäß überführt und für 1 Min. bei 9.503 g zentrifugiert. Die beschriebenen Schritte erfolgten auf Eis bzw. bei 4 °C.

2.2.2.1.2 DNA-Verdau

Direkt im Anschluss an die RNA-Extraktion erfolgte der enzymatische DNA-Verdau mittels „DNase I Amplification Grade“ Kit. Hierzu wurde ein Versuchsansatz aus 4 µl des 10x Puffers, 4 µl der DNase I und 33 µl extrahierter RNA gebildet, der für 15 Min. bei Raumtemperatur inkubiert wurde.

Die enzymatische Reaktion wurde mittels Hinzupipettieren von 4 µl der Stop-Lösung und der erneuten Inkubation für 10 Min. bei 70°C beendet. Die verdauten Proben wurden anschließend bei -20 °C gelagert bzw. zunächst für die reverse Transkription verwendet.

2.2.2.1.3 Reverse Transkription (cDNA-Umschrieb)

Für die reverse Transkription wurde nach Bestimmung der OD mittels des Nanophotometers Nanodrop 2000 der Firma Thermo Scientific 1,0 µg DNA-verdauter RNA mittels „iScript cDNA Synthesis“ Kit umgeschrieben. Dazu wurde aus der in ein PCR-Gefäß überführten Probe ein Reaktionsansatz aus 4 µl 5x iScript Puffer und 1 µl iScript Enzym gebildet, dessen Volumen mittels RNase-freien Wasser auf ein Zielvolumen von 20 µl eingestellt wurde. Die reverse Transkription erfolgte dann in einem 3-schrittigen Zyklus im Thermocycler TPersonal der Firma Biometra. Hierzu wurde die Probe zunächst für 5 Min. bei 25 °C, danach für 30 Min. bei 42 °C und schließlich für 5 Min. bei 85 °C inkubiert. Die synthetisierte cDNA wurde anschließend bei -80 °C gelagert bzw. zunächst für die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) verwendet.

2.2.2.1.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Zur Untersuchung der CD28 Expression auf mRNA Ebene in Relation zur Haushaltsgenexpression von β Actin wurde eine Reverse Transkriptase PCR (RT-PCR) durchgeführt. Nach Vorlegen von 48 µl Mastermix in ein PCR-Gefäß wurden 2 µl der Template-cDNA hinzupipettiert und das Reaktionsgemisch gemäß des in Tab. 8 beschriebenen Protokolls im Thermocycler „Mastercycler“ der Firma Eppendorf prozessiert.

Phase	Schritt	Zeit	Temperatur	Zyklen
Vorbereitung	Initiale Denaturierung	30 s	98 °C	1
	Denaturierung	10 s	98 °C	
Durchführung	Annealing	30 s	72 °C	35
	Elongation	30 s	72 °C	
Lagerung	Kühlung	∞	4 °C	1

Tab. 8: Thermocycler-Programm der RT-PCR

2.2.2.1.5 Gel-Elektrophorese

Um die amplifizierten Sequenzen der RT-PCR sowohl quantitativ als auch qualitativ analysieren zu können, wurde eine Gel-Elektrophorese der Proben angefertigt. Hierfür wurde ein 1 %iges Agarosegel aus 1,5 mg Agarose und 150 ml 1x TAE hergestellt, das vor dem Gießen mit 3 µl GelRed versehen wurde. Nach dem Erkalten des Gels wurde dieses in eine mit 50x TAE befüllte Gelelektrophoresekammer eingesetzt, der Kamm mit 20 Taschen entfernt und die Kammern abwechselnd mit Probe und Marker beladen. Dabei wurden die 50 µl PCR-Produkt Proben zuvor mit 12,5 µl Orange G versehen. Nach einer Laufzeit von 30 Min. bei 130 V und 500 mA wurde die Gel-Elektrophorese beendet und das entstandene Bandenmuster im Gel mittels des UV-Systems „Gel iX20 Imager“ der Firma Intas detektiert und fotografisch aufgenommen. Als Netzgerät für Elektrophorese diente der microcomputer electrophoresis power supply von Consort. Zur Beurteilung der Bandengrößen wurde als Marker der GeneRuler 1 kb DNA ladder der Firma Thermo Fisher Scientific eingesetzt.

2.2.2.2 Proteinanalyse

2.2.2.2.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Reinheitsbestimmung des Antikörper-Aufreinigungsverfahrens, sowie zur Bestätigung des Isotypisierungstestergebnisses wurde im Anschluss an die Aufreinigung der Zellkulturüberstände eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese der Proben angefertigt. Verwendet wurde hierfür ein 4 %iges Sammel- und 12 %iges Trenngel.

Vor der Auftragung der Proben wurden diese im Verhältnis 2:1 mit nicht-reduzierendem Lämmli-Puffer gemischt, zentrifugiert, für 5 Min. bei 95 °C aufgeköcht, erneut zentrifugiert und jeweils 15 µl der Probe in die Geltaschen hineinpipettiert.

Des Weiteren wurde zur Molekülmassebestimmung der Banden der Marker Page Ruler Prestained Protein Ladder der Firma Thermo Scientific auf das Gel aufgetragen.

Für 90 Min. erfolgte dann bei ca. 90 V die gelelektrophoretische Auftrennung der Proben. Alle Zentrifugationsschritte wurden für 1 Min. bei 16.000 g und RT mittels der Tischzentrifuge Centrifuge 5415 C der Firma Eppendorf durchgeführt.

2.2.2.2.2 Coomassie Blau-Färbung

Zur spezifischen Färbung von Proteinen in einem SDS-Gel wurde dieses zunächst für 1 h bis 2 h in Coomassie-Färbelösung inkubiert und anschließend über Nacht in Coomassie-Entfärbelösung gelegt.

2.2.2.2.3 Trocknen von SDS-Gelen

Um Coomassie Blau-gefärbte SDS-Gele dauerhaft konservieren zu können, wurden diese mittels des Geltrockners Drystar B der Firma H. Hölzel Labortechnik GmbH behandelt. Hierzu wurde das SDS-Gel luftblasenfrei auf Chromatographiepapier überführt, mit Frischhaltefolie abgedeckt und für 90 Min. bei 100 °C und maximaler Vakuumleistung getrocknet.

2.2.2.2.4 Bestimmung der Proteinmenge

Die Proteinmengenbestimmung der aufgereinigten Antikörperaliquots erfolgte in Anschluss an die SDS-PAGE maschinell mittels des Nanophotometers Nanodrop 2000 der Firma Thermo Scientific.

2.2.3 Immunologische Methoden

2.2.3.1 Herstellung monoklonaler Antikörper

2.2.3.1.1 Gewinnung von Antikörper-Überständen

Die in Vorarbeiten zu dieser Doktorarbeit gegen das porcine CD28 Molekül immunisierten Mäuse wurden drei Tage nach der letzten Immunisierung mittels zervikaler Dislokation getötet, präpariert und die Milz gemäß dem in 2.2.1.1 geschilderten Verfahren zur Zellsuspension vereinzelt. Anschließend erfolgte mittels Hybridomtechnik eine Fusion der Maus-Splenozyten mit der Myelomzelllinie Sp2/0AgX. Bei erfolgreicher Fusionierung wurde dann eine Klonierung sowie Subklonierung der Hybridome durchgeführt und die entsprechenden Zellkulturüberstände gewonnen und zunächst an pCD28 exprimierenden BW5147-Zellen, Zellen einer Mäuse-T-Zell-Lymphom-Zelllinie, getestet. Die einzelnen Immunisierungsschritte sind in Abb. 13 festgehalten.

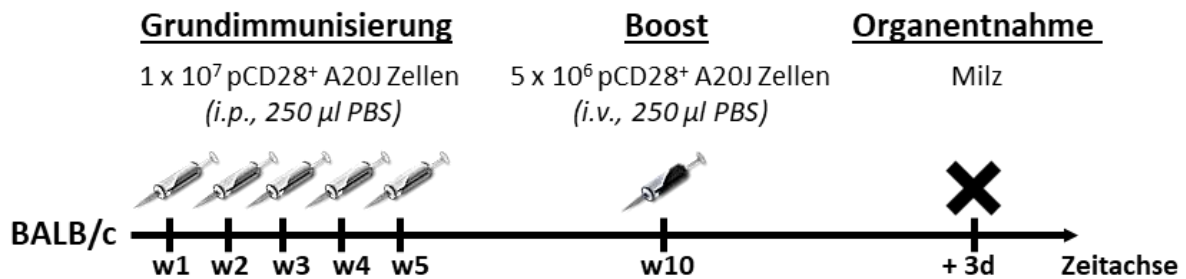


Abb. 13: Immunisierungsverfahren zur Herstellung von Maus anti-Schwein CD28 mAb in BALB/c Mäusen

Zur Induktion einer Antikörperbildung gegen das porcine CD28 Molekül wurden pCD28 exprimierende A20J-Zellen zunächst einmal wöchentlich über einen Zeitraum von 5 Wochen BALB/c Mäusen intraperitoneal injiziert. In Woche 10 erhielten die Mäuse dann einmalig eine Auffrischungsimpfung intravenös in halbiertes Dosierung, bevor die Milz der Tiere drei Tage nach dem Boost entnommen wurde.

2.2.3.1.2 Isotypisierung monoklonaler Antikörper

Die Isotypisierung der aus der Fusion bzw. Subklonierung gewonnenen monoklonalen Antikörperüberstände erfolgte unter Zuhilfenahme des „Mouse Monoclonal Antibody Isotyping Test Kit“ Kits. Hierfür wurde zunächst eine Lösung, bestehend aus 900 µl PBS, 100 µl einer 10 %igen BSA-Lösung und 10 µl des Antikörper-Überstandes, hergestellt und 150 µl dieser Lösung in eine entsprechende Testsäule überführt. Der Inhalt dieser Säule wurde anschließend mittels Reagenzglasschüttlers durchgemengt und für 30 s inkubiert. Im nächsten Schritt wurde die Säule dann zusammen mit einem darin befindlichen Teststreifen für 10 Min. bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert und das Ergebnis nach dem Trocknen des Teststreifens abgelesen.

2.2.3.1.3 Aufreinigung monoklonaler Antikörper

Die Aufreinigung von IgG Antikörperüberständen erfolgte mittels „Protein Sepharose G, 4 Fast Flow“. In Vorbereitung auf die Filtrierung wurden die Säulen zunächst mit jeweils 1 ml Sepharose G beladen und anschließend einmalig mit 10 ml Elutionspuffer und 10 ml PBS vorgespült. Die Filtration des Antikörpers erfolgte dann über Nacht bei 4 °C mit einer Geschwindigkeit von einem Tropfen pro Sekunde. Vor dem Eluieren des Antikörpers in 5 ml Elutionspuffer wurden die Säulen zunächst mit 15 ml PBS und zweimalig mit 8 ml Waschpuffer vorgespült und die aufgefangene Antikörperlösung anschließend zu je 1 ml Lösung und 62 µl Neutralisationspuffer aliquotiert.

2.2.3.2 Durchflusszytometrie

2.2.3.2.1 Anreicherung durch Zellsortierung (FACS-Sort)

Allgemein

Die Zellsortierung erfolgte in der Serviceeinheit für Zellsortierung des IZKF Würzburg und Immunbiologie am FACS-Sorter FACS Aria III der Firma Becton Dickinson. Für eine anschließende mRNA-Extraktion erfolgte die Sortierung in RLT-Puffergemisch, für das Anlegen einer Zellkultur entsprechend in Zellkulturmedium.

Lymphozytensubpopulationen aus Schweine Milzzellen der Dt. Landrasse

Nach der Isolation porciner Lymphozyten wurden diese gemäß des Färbeprotokolls in Tab. 9 gefärbt und gemäß der Gatingstrategie in Abb. 14 sortiert. Der Reinheitsgrad lag hierbei für die $CD4^+CD8^- / CD8\alpha^{low}$ Population bei ca. 95 %, für die $CD4^-CD8\alpha^{high}$ Population bei ca. 98% und für die $CD4^-CD8\alpha^{-/low}$ Population bei ca. 96 % .

Antikörper	Klon	Konjugation	Verdünnung	Inkubation
nmlg	polyklonal	-	1:50	15 Min.
anti- CD4 α	74-12-4	PE	1:250	15 Min.
anti- CD8 α	76-2-11	FITC	1:800	

Tab. 9: Färbepanel für die fluoreszenzaktivierte Zellsortierung porciner Splenozyten

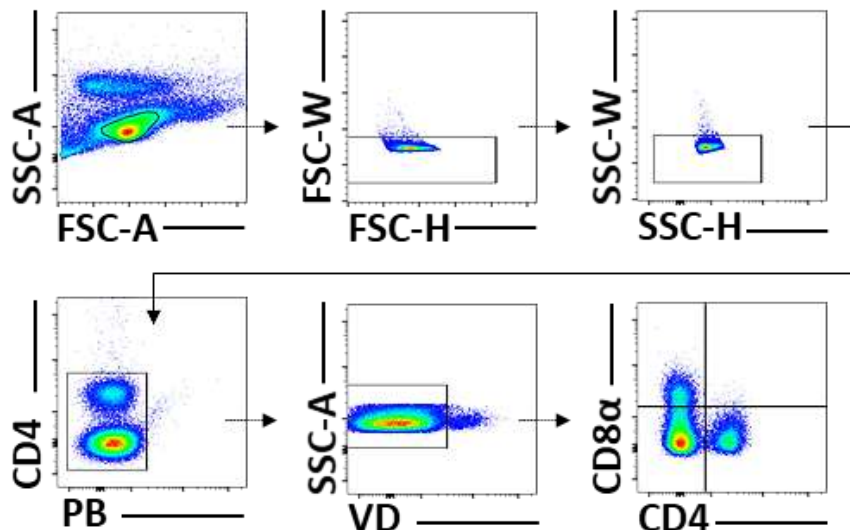


Abb. 14: Gatingstrategie für porcine Splenozyten

Zur Zellanreicherung und durchflusszytometrischen Analyse von porcinen Splenozyten wurde zunächst ein passender FSC-A Forward- und SSC-A Sideward-Scatter ausgewählt. Im positiv selektionierten Gate wurden dann anschließend unter Verwendung der Parameter FSC-W/ FSC-H und SSC-W/ SSC-H Dubletten negativ selektioniert. Stark autofluoreszierende Zellen sowie apoptotische oder nekrotische Zellen wurden dann in den nächsten Schritten mittels nicht-belegter Fluoreszenzkanäle (PB) und dem Lebendfarbstoff Viability Dye (VD) weiter negativ selektioniert.

2.2.3.2.2 FACS-Analyse

Allgemein

Als Standard für die FACS-Analyse wurden jeweils 1×10^6 Zellen pro Probe in einem Volumen von 25 μl bzw. 50 μl in einer 96-Napf-V-Bodenplatte bei 4 °C gefärbt und in einem Volumen von 250 μl mit FACS-Puffer gewaschen. Eine Ausnahme hiervon bildete die Analyse von Zellkulturen und die Färbung von Zellen, die für den Sort und eine anschließende Kultur bestimmt waren. Im Falle der Zellkulturanalyse erfolgte die Färbung gemäß dem Standardverfahren ohne zuvorige Bestimmung der exakten Zellzahl. Für Zellen, die nach der Sortierung in Kultur genommen wurden, wurde Zellkulturmedium anstelle von FACS-Puffer zur Färbung verwendet. Die Messung der Proben wurde im Durchflusszytometer LSR II der Firma BD vorgenommen. Auf Grund der mangelnden Differenzierbarkeit von toten und lebenden Zellen im Forward- und Sideward-Scatter des LSR II wurde Viability Dye (VD) 1:1000 in alle Färbepanel integriert. Im Standardverfahren erfolgte für Färbungen der direkten Immunfluoreszenz ein 15-minütiger Blockschrift mit 2.4G2 für Maus-Zellen bzw. nmlg für Schweine-Zellen vor der 15- bis 30-minütigen Inkubation mit Fluorochrom-konjugierten Antikörpern und Viability Dye (VD).

Für intrazelluläre Färbungen, die in Anschluss an die Oberflächenfärbung vorgenommen wurden, wurde das Foxp3/ Transcription Factor Fixation/ Permeabilization Concentrate and Diluent Kit verwendet. Hierfür wurden die Zellen nach einem Waschschrift mit FACS-Puffer zunächst für 30 Min. bei RT in 100 μl Fixationslösung inkubiert, mit 150 μl Permeabilisationslösung gewaschen, in 25 μl Antikörper-Lösung erneut für 45 Min. bei RT inkubiert und danach wieder mit 150 μl Permeabilisationslösung gewaschen.

Alle Waschschriffe erfolgten für jeweils 3 Min. bei 320 g und 10 °C in der Zentrifuge Megafuge 1.0R Zentrifuge der Firma Kendro.

Testung der spezifischen Bindung von Antikörperüberständen an porcinen CD4⁺ T-Lymphozyten

Zellkulturüberstände der anti-pCD28 Klone, die sich im ersten Screening-Verfahren mit pCD28 exprimierenden BW5147-Zellen als hoch positiv erwiesen hatten, wurden für die Bindung an porcinen Lymphozyten getestet. Zum Nachweis der Bindung an CD4⁺ porcine T-Lymphozyten wurden die in Tab. 10 festgehaltenen Reagenzien für die indirekte Immunfluoreszenz verwendet.

Antikörper	Klon	Konjugation	Verdünnung	Inkubation
anti-pCD28	verschiedene	-	unv.	15 Min.
gam IgG	polyklonal	Biotin	1:200	15 Min.
Streptavidin	-	PerCP	1:2000	15 Min.
nmlg	polyklonal	-	1:50	15 Min.
anti-CD4 α	74-12-4	PE	1:250	30 Min.

Tab. 10: Färbepanel zur Testung der spezifischen Bindung von Antikörperüberständen

Untersuchung der pCD28-Oberflächenexpression weiterer Lymphozytensubpopulationen mittels aufgereinigter Antikörper des Klons 3D11

Der spezifisch bindende Überstand des Klons 3D11 wurde gemäß 2.2.3.1.3 aufgereinigt und für eine genaue Analyse der CD28 Oberflächenexpression an Leukozyten verwendet. Die angewendeten Reagenzien sind dabei in den Tabellen Tab. 11 bis Tab. 12 dargestellt.

Antikörper	Klon	Konjugation	Verdünnung	Inkubation
anti-pCD28	3D11	-	unv.	15 Min.
gam IgG	polyklonal	Biotin	1:200	15 Min.
Streptavidin	-	PerCP	1:2000	15 Min.
nmlg	polyklonal	-	1:50	15 Min.
anti-CD4 α	74-12-4	PE	1:250	30 Min.
anti-CD3 ϵ	BB23-8E6	PE-Cy7	1:200	
anti-Foxp3	FJK-16s	PE-Cy5	1:50	45 Min.

Tab. 11: Färbepanel zur Analyse der CD28 Oberflächenexpression auf konventionellen und regulatorischen CD4⁺ T-Zellen

Antikörper	Klon	Konjugation	Verdünnung	Inkubation
anti-pCD28	3D11	-	unv.	15 Min.
gam IgG	polyklonal	Alexa 647	1:400	15 Min.
nmlg	polyklonal	-	1:50	15 Min.
anti-CD4 α	74-12-4	PE	1:250	30 Min.
anti-CD8 α	76-2-11	FITC	1:400	
anti-CD3 ϵ	BB23-8E6	PE-Cy7	1:200	

Tab. 12: Färbepanel zur Analyse der CD28 Oberflächenexpression auf CD4⁺CD8 α ^{high} T-Zellen

Kreuzreaktivität der Zellkulturüberstände mit humanen PBMCs

Mittels „Blutzapfen“, bereitgestellt durch die Transfusionsmedizin des Universitätsklinikum Würzburg, konnte die Kreuzreaktivität der anti-pCD28 spezifischen Antikörperüberstände mit humanen PBMCs bestimmt werden. Für die isolierten Lymphozyten wurde das in Tab. 13 zusammengefasste Färbeprotokoll angewendet.

Antikörper	Klon	Konjugation	Verdünnung	Inkubation
anti-pCD28	verschiedene	-	unv.	15 Min.
anti-hCD28	CD28.2	-	1:1000	
γam IgG	polyklonal	Biotin	1:200	15 Min.
Streptavidin	-	PerCP	1:2000	15 Min.
nmlg	polyklonal	-	1:50	15 Min.
anti-CD4α	RPA-T4	PE	1:100	30 Min.

Tab. 13: Färbepanel zur Bestimmung der Kreuzreaktivität von Antikörperüberständen mit humanen PBMCs

Kreuzreaktivität der Zellkulturüberstände mit Maus-Splenozyten

Zur Überprüfung der Kreuzreaktivität anti-pCD28 spezifischer Antikörperüberstände mit Maus-Splenozyten wurde das in Tab. 14 zusammengefasste Färbeprotokoll angewendet.

Antikörper	Klon	Konjugation	Verdünnung	Inkubation
anti-pCD28	verschiedene	-	unv.	15 Min.
anti-mCD28	E18	-	1:5000	
γam IgG	polyklonal	Biotin	1:200	15 Min.
Streptavidin	-	PerCP	1:2000	15 Min.
nmlg	polyklonal	-	1:50	15 Min.
anti-CD4α	GK 1.5	PE	1:500	30 Min.

Tab. 14: Färbepanel zur Bestimmung der Kreuzreaktivität von Antikörperüberständen mit Maus-Splenozyten

Analyse der pCD28 mRNA Expression mittels Prime Flow

In Zusammenarbeit mit dem Unternehmen eBioscience konnte ein Prime Flow® RNA Assay Kit speziell für die durchflusszytometrische Analyse der pCD28 Genexpression erarbeitet werden. Grundlage dessen war die NCBI Referenzsequenz NM_001287410.1, die für die Entwicklung eines spezifischen pCD28 mRNA Probe Sets verwendet wurde. Als Positivkontrolle diente ein murines β-Actin [259–261] Probe Set mit Kompatibilität für porcine Zellen. Das Kit wurde gemäß Anleitung in Anschluss an die standardmäßig durchgeführten Oberflächen- bzw. Intrazellulärfärbungen gemäß Tab. 15 und Tab. 16 angewendet. Eine Zusammenfassung der Gatingstrategie ist in Abb. 15 dargestellt.

Antikörper	Klon	Konjugation	Verdünnung	Inkubation
nmlg	polyklonal	-	1:50	15 Min.
anti-CD4α	74-12-4	PE	1:250	30 Min.
anti-CD8α	76-2-11	FITC	1:400	

Tab. 15: Färbepanel zur Genexpressionsanalyse von pCD28 und β-Actin in porcinen T-Zellen

Antikörper	Klon	Konjugation	Verdünnung	Inkubation
anti- CD25	K231.3B2	-	1:200	15 Min.
g α m IgG	polyklonal	FITC	1:100	15 Min.
nmlg	polyklonal	-	1:50	15 Min.
anti- CD4α	74-12-4	PE	1:250	30 Min.
anti- Foxp3	FJK-16s	PE-Cy5	1:50	45 Min.

Tab. 16: Färbepanel zur Genexpressionsanalyse von pCD28 und β -Actin in CD4⁺ T-Zell-subpopulationen

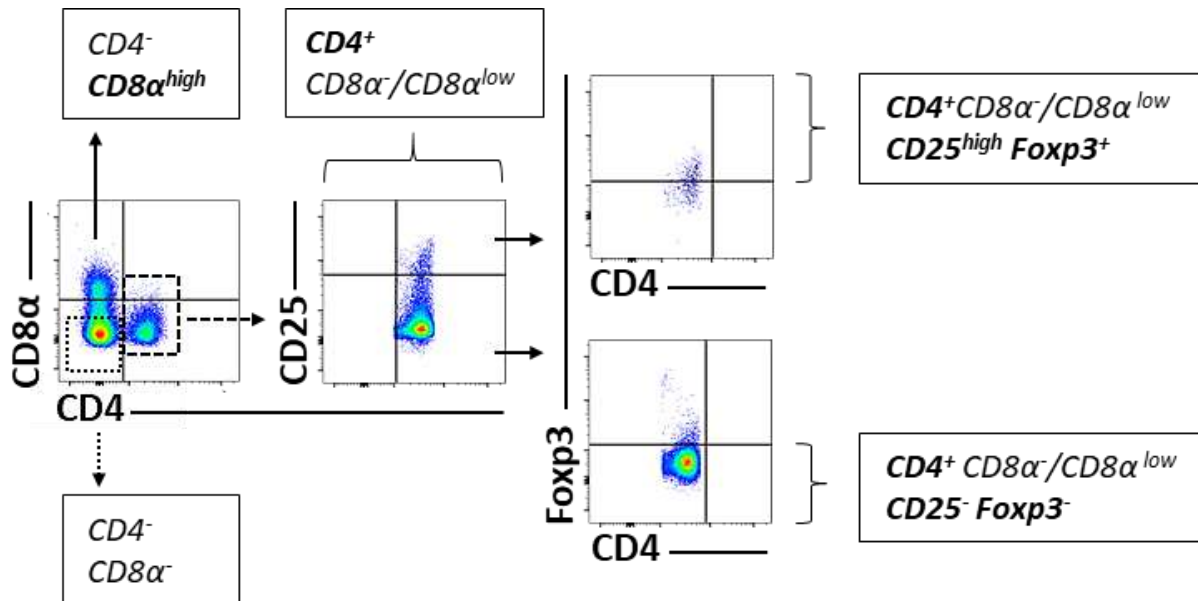


Abb. 15: Angewandte Gatingstrategie für das Prime Flow® RNA Assay Kit

Die auf Abb. 14 aufbauende Gatingstrategie zeigt die durchflusszytometrischen Charakteristika der beiden porcinen T-Lymphozyten-Hauptvertreter CD4⁻ CD8 α ^{high}, kurz CD8⁺ T-Lymphozyten, und CD4⁺ CD8 α ⁻/CD8 α ^{low}, kurz CD4⁺ T-Lymphozyten. Die CD4⁺ T-Lymphozyten sind hier zusätzlich in regulatorische (CD4⁺ CD8 α ⁻/CD8 α ^{low} CD25^{high} Foxp3⁺) und konventionelle (CD4⁺ CD8 α ⁻/CD8 α ^{low} CD25⁻ Foxp3⁻) Subpopulationen untergliedert. Der Großteil der Nicht-T-Lymphozyten befindet sich im CD4⁻ CD8 α ⁻ Gate.

2.2.3.3 Magnetische Separation von Antigen-präsentierenden Zellen

(APCs) der Maus

Zur Isolation Antigen-präsentierender Zellen (APCs) aus Milzen wildtypischer C57BL/6 Mäuse erfolgte im Anschluss an die Leukozytenisolation gemäß 2.2.1.1.3 eine Depletion Maus-T-Lymphozyten. Hierzu wurden die mit PBS auf 1×10^8 Zellen/ml eingestellten Milzzellen zunächst im Verhältnis 1:50 mit normalen Maus-Immunglobulin und anschließend im Verhältnis 1:10 mit anti-CD90.2 MicroBeads für 15 Min. bei 4 °C inkubiert.

Nach diesen beiden Inkubationsphasen wurden die Zellen 2-malig mit BSS-BSA gewaschen, in 1 ml BSS-BSA resuspendiert und auf die 3-malig mit 1 ml BSS-BSA vorgespülten LD-Säulen gegeben. Nach dem Durchlauf der Probe durch die Säule wurde die Säule erneut 3-malig mit 1 ml BSS-BSA gewaschen und zusammen mit der Probe aufgefangen.

Gemäß Tab. 17 und Abb. 16 wurden Reinheitsfärbungen zur Erfolgskontrolle der Depletion sowohl vor der Antikörperinkubation als auch nach dem Durchlauf durch die Säule durchgeführt. Alle Zentrifugations- bzw. Waschschrte erfolgten bei 320 g und 10 °C für 5 Min in der Zentrifuge Heraeus® Megafuge 1.0 R der Firma Kendro.

Antikörper	Klon	Konjugation	Verdünnung	Inkubation
anti-Fcγ	2.4G2	-	1:5	15 Min.
anti-CD3ε	145-2C11	FITC	1:100	15 Min.
anti-B220	RA3-6B2	Alexa647	1:250	

Tab. 17: Färbepanel zur Erfolgskontrolle der T-Zell-Depletion

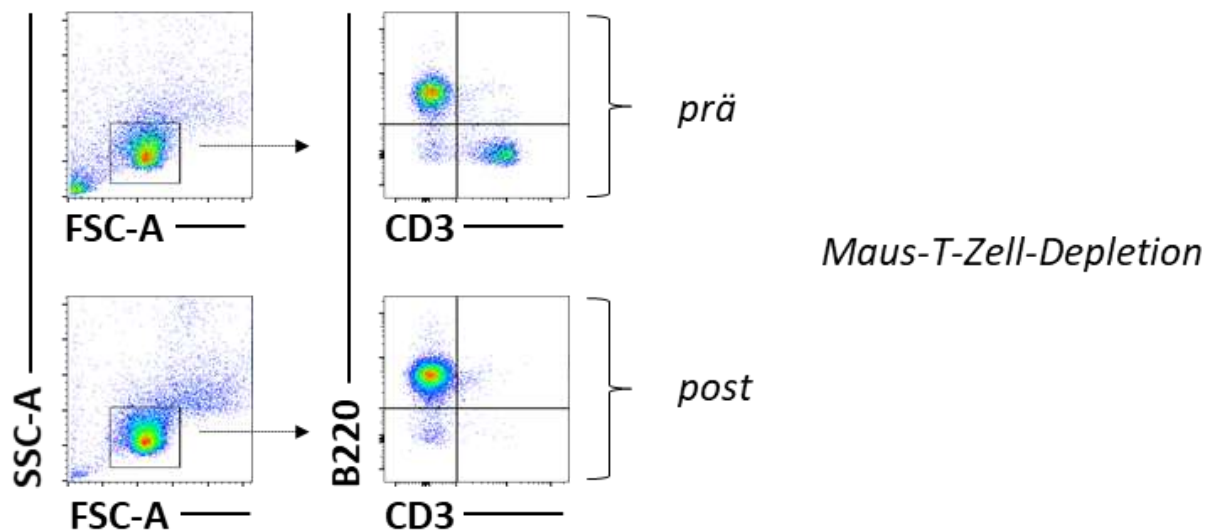


Abb. 16: Depletionskontrolle

Im Forward- und Sideward-Scatter wurden zunächst lebende Maus-Lymphozyten ausgewählt, die dann im Folgefenster auf die charakteristischen Lymphozyten Marker CD3 für T-Zellen und B220 für B-Zellen hin untersucht wurden. Beispielhaft erfolgte hier eine Reduktion der CD3⁺ Zellen von 25,1 % (prä) auf 0,13 % (post).

3. Ergebnisse

3.1 Untersuchungen zur CD28 Genexpression im Schwein

3.1.1 Qualitative Untersuchung der pCD28 mRNA-Expression

3.1.1.1 CD28 mRNA Expression in Splenozyten Dt. Landrasse Schweine

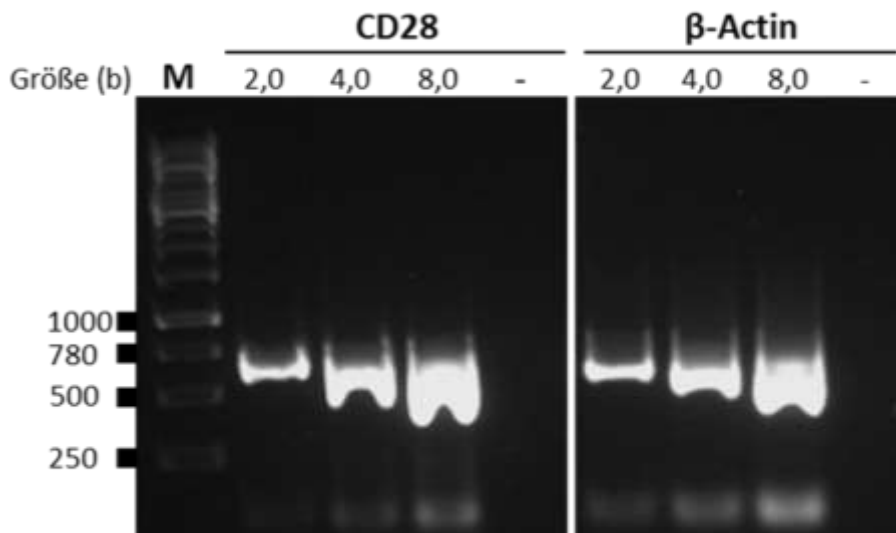


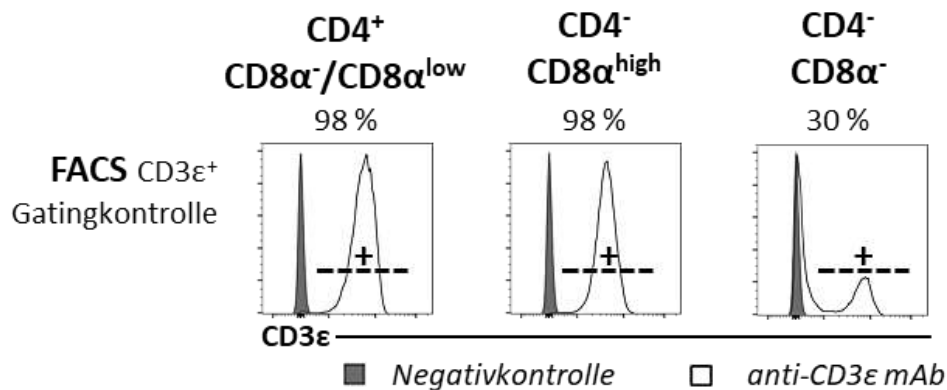
Abb. 17: Expression von pCD28 mRNA in porcinen Splenozyten

„(b)“ bedeutet Basengröße, „M“ bedeutet Marker, „-“ bedeutet Negativkontrolle, „2,0“, „4,0“ und „8,0“ kennzeichnen die auf das Gel aufgetragene Menge des RT-PCR-Produkts in μ l. Gelelektrophorese der amplifizierten cDNA des zu untersuchenden CD28 Gens im Vergleich zum Haushaltsgen β -Actin.

Zur Testung der Milz als geeignetes Untersuchungsmedium wurden zunächst Splenozyten auf die mRNA Expression von pCD28 in Relation zum Haushaltsgen β -Actin mittels RT-PCR hin untersucht. Deutlich erkennbar in der in Abb. 17 gezeigten Gelelektrophorese sind Banden im Bereich von 500 Basen und 780 Basen. Diese entsprechen den gemäß Berechnung erwarteten Basenlängen von 692 Basen für pCD28 und 661 Basen für β -Actin. Grundlage der Berechnung bildeten die mRNA- bzw. cDNA-Sequenzen NM_001287410.1 und DQ845171.1. Unter Betrachtung der Bandenstärke lässt sich somit eine positive pCD28 mRNA Expression für Splenozyten Dt. Landrasse Schweine konstatieren und die Eignung der Milz bestätigen.

3.1.1.2 CD28 mRNA Expression in Schweine T-Zellen

A



B



Abb. 18: pCD28 mRNA Expressionsunterschiede in porcinen Splenozytensubpopulationen (RT-PCR)

(A) Anteil der CD3ε positiven Zellen, T-Zell-Rezeptor exprimierenden Zellen, an sortierten Splenozytensubpopulationen CD4⁻ CD8α^{high} (ca. 98 % CD8⁺ T-Zellen), CD4⁺ CD8α⁻/CD8α^{low} (ca. 98 % CD4⁺ T-Zellen), CD4⁻ CD8α⁻ (ca. 30 % CD4⁻ CD8α⁻ T-Zellen). (B) Bildausschnitt aus der Gelelektrophorese des zu untersuchenden CD28 RT-PCR-Produkts im Vergleich zur β-Actin Positivkontrolle für die sortierten Splenozytensubpopulationen CD4⁻ CD8α^{high}, CD4⁺ CD8α⁻/CD8α^{low} und CD4⁻ CD8α⁻.

Zur Identifikation der pCD28 mRNA exprimierenden Zellpopulation in der Milz wurden drei Zellpopulationen gemäß Abb. 18 A sortiert und anschließend einer RT-PCR für pCD28 und β-Actin mRNA unterzogen. Wie aus Abb. 18 B ersichtlich, konnte eine pCD28 mRNA Expression nur für primär TZR positive (CD3ε⁺) Populationen in der RT-PCR detektiert werden. Für die CD4⁻ CD8α⁻ Population, zu denen auch NK- und γδ T-Zellen gehören, wäre ebenfalls mit einer zarten, aber positiven CD28 Bande zu rechnen gewesen, doch scheint es hier aufgrund des niedrigen T-Zellanteils von 30 % zu keinem Nachweis einer pCD28 mRNA Expression gekommen zu sein. Bei genauerer Betrachtung der CD4⁺ CD8α⁻/CD8α^{low} und CD4⁻ CD8α^{high} Population fällt zudem ein kräftigeres pCD28 Bandenmuster für CD4⁺ CD8α⁻/CD8α^{low} Zellen auf. Zur weiteren Analyse eines möglichen quantitativen Expressionsunterschieds innerhalb der T-Zellpopulation ist daher im Folgenden eine Untersuchung mittels Prime Flow® erfolgt.

3.1.2 Quantitative Untersuchung der pCD28 mRNA Expression

3.1.2.1 Bestätigung der CD28 mRNA Expression in porcinen T-Zellen auf Einzelzellebene mittels Prime Flow®

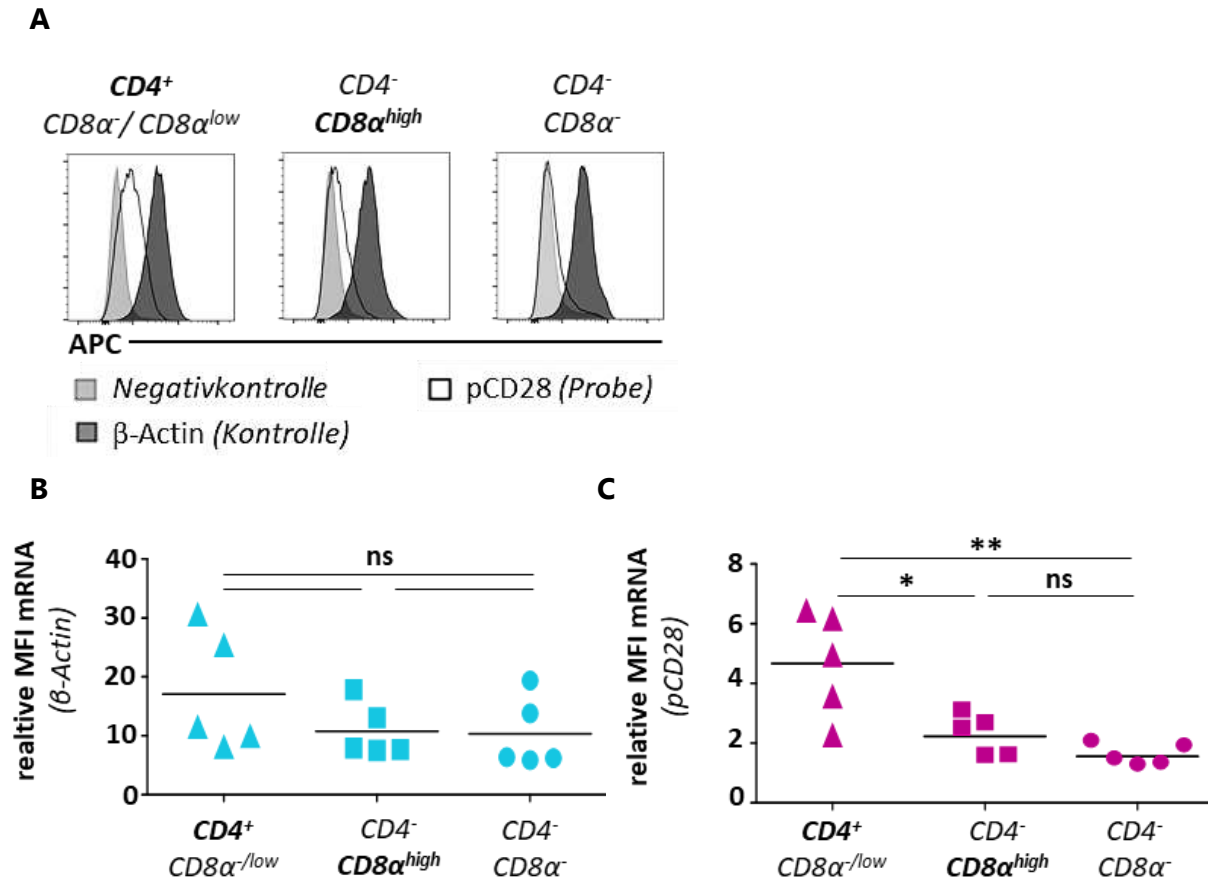


Abb. 19: Bestätigung der RT-PCR Ergebnisse für pCD28 mRNA Expressionsunterschiede in porcinen Splenozyten mittel Prime Flow®

(A) „APC“ steht für Allophycocyanin, dem eingesetzten Fluoreszenzfarbstoff zur durchflusszytometrischen Analyse des mRNA Gehalts an pCD28 und β -Actin in den Splenozytensubpopulationen $CD4^+ CD8\alpha^- / CD8\alpha^{low}$, $CD4^- CD8\alpha^{high}$ und $CD4^- CD8\alpha^-$. Die Ergebnisse sind zusammen mit der Negativkontrolle im Histogramm dargestellt. (B, C) Analyse der relativen medianen Fluoreszenzintensität (MFI) aus fünf Experimenten im Streudiagramm mit Mittelwerten. Statistische Auswertung mittels ungepaartem, zweiseitigen t-Test, $n=5$. [rel. MFI: mediane Fluoreszenzintensität (MFI) der spezifischen Färbung/ MFI der Negativkontrollfärbung]

Mittels Prime Flow®, einer neuen quantitativen, durchflusszytometrischen Methode zur mRNA Expressionsanalyse auf Einzelzellebene, konnten die Ergebnisse und Vermutungen der qualitativen RT-PCR für die pCD28 mRNA bestätigt werden. So zeigen die Histogramme der Abb. 19 A ein deutliches, aber unterschiedlich starkes Fluoreszenzsignal für den Gehalt an CD28 mRNA in den T-Zell-Populationen $CD4^+ CD8\alpha^- / CD8\alpha^{low}$ und $CD4^- CD8\alpha^{high}$ im Vergleich zur jeweiligen Negativkontrolle.

In der T-Zell-armen $CD4^-CD8\alpha^-$ Population hingegen überlappen die Graphen der Negativkontrolle und pCD28 Probe beinahe vollkommen. Ursächlich für die geringfügige Abweichung der beiden Graphen könnten $CD4^-CD8\alpha^-$ T-Zellen, wie $\gamma\delta$ oder NKT-Zellen, sein.

Bekräftigt werden die histogrammischen Ergebnisse durch die statistische Analyse der relativen medianen Fluoreszenzintensität für die CD28 und β -Actin mRNA in Abb. 19 B+C. Während sich die untersuchten Populationen bezüglich der β -Actin Positivkontrolle nicht signifikant unterscheiden, kommt es in Bezug auf die pCD28 Probe zu einem signifikanten Expressionsunterschied zwischen der $CD4^+$ T-Zell- und Nicht-T-Zell-Population ($CD4^-CD8\alpha^-$) sowie zwischen $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen. In der Zusammenschau der Histogramme und der statistischen Analyse lässt sich somit sagen, dass nicht einzelne $CD4^+$ T-Zellen, sondern viel mehr die gesamte $CD4^+$ T-Zellpopulation eine erhöhte pCD28 mRNA Expression im Vergleich zur $CD8^+$ T-Zellpopulation aufweist. Weiterhin in Bezug auf $CD4^+$ T-Zellen auffallend ist die im Vergleich zu den anderen Populationen starke Varianz der MFI-Werte für Probe und Positivkontrolle.

Der nicht-signifikante Unterschied zwischen der $CD8^+$ T-Zellpopulation und der $CD4^-CD8\alpha^-/CD8\alpha^{low}$ Zellpopulation könnte durch den geringen Stichprobenumfang sowie durch $CD4^-CD8\alpha^-$ T-Zellen innerhalb der $CD4^-CD8\alpha^-$ Zellpopulation bedingt sein.

3.1.2.2 Ähnlich starke CD28 mRNA Genexpression innerhalb der CD4⁺ T-Zellsubgruppen

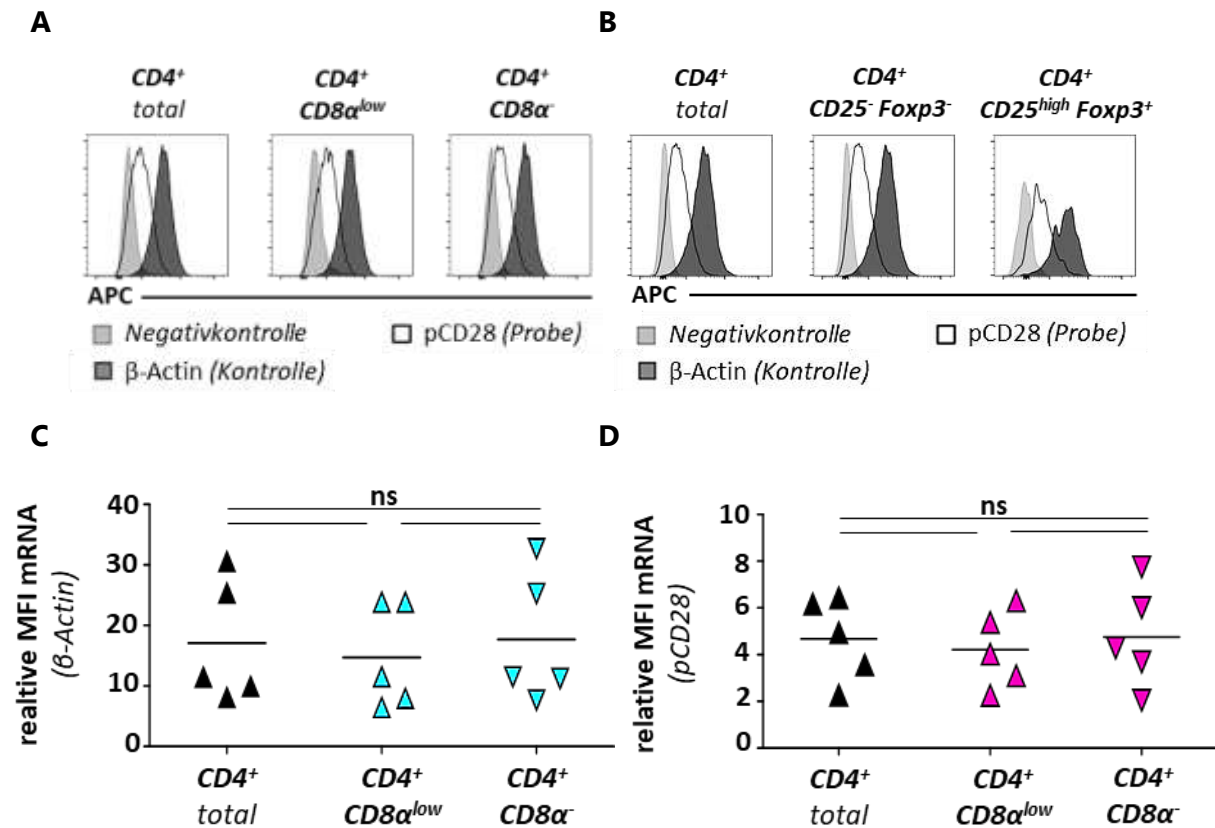


Abb. 20: Keine Unterschiede in den pCD28 mRNA Expressionsprofilen der CD4⁺ T-Zellsubpopulationen

(A, B) „APC“ steht für Allophycocyanin, dem eingesetzten Fluoreszenzfarbstoff zur durchflusszytometrischen Analyse des mRNA Gehalts an pCD28 und β-Actin in CD4⁺ T-Zell-Subpopulationen. Die Ergebnisse sind zusammen mit der Negativkontrolle im Histogramm dargestellt.

(C, D) Statistische Auswertung der CD4⁺ T-Zellsubpopulation CD4⁺ CD8α^{low} und CD4⁺ CD8α⁻ mittels gepaartem, zweiseitigen t-Test aus 5 Versuchen. Darstellung der Mittel- und Einzelwerte im Streudiagramm, n=5. [rel. MFI: MFI der spezifischen Färbung/ MFI der Negativkontrolle]

Nachdem die Verwendung von Prime Flow® zur quantitativen pCD28 Genexpressionsanalyse zunächst an den RT-PCR Ergebnissen der sortierten Schweine-Milzzellpopulationen validiert worden war. Wurden im zweiten Schritt auch verschiedene CD4⁺ T-Zellpopulationen untereinander verglichen. In der graphischen Darstellung der mRNA Expressionsmuster für pCD28 und β-Actin in Abb. 20 A+B weisen CD4⁺ CD8α^{low} (T_{mem}) und CD4⁺ CD8α⁻ (T_{naiv}) sowie CD4⁺ CD8α⁻ / CD8α^{low} CD25⁻ Foxp3⁻ (T_{conv}) und CD4⁺ CD8α⁻ / CD8α^{low} CD25^{high} Foxp3⁺ (T_{reg}) ähnliche mRNA Expressionsprofile für die untersuchten Gene auf. Bestätigt wird dies zudem für T_{mem} und T_{naiv} in der nachfolgenden statistischen Analyse der relativen MFI in Abb. 20 C+D, die keine signifikanten Unterschiede zwischen T_{mem} und T_{naiv} ergibt.

3.2 Charakterisierung der pCD28 Proteinexpression mittels anti-pCD28 spezifischer Antikörper

3.2.1 Selektionierung und Bindungsverhalten pCD28 spezifischer monoklonaler Antikörper-Klone

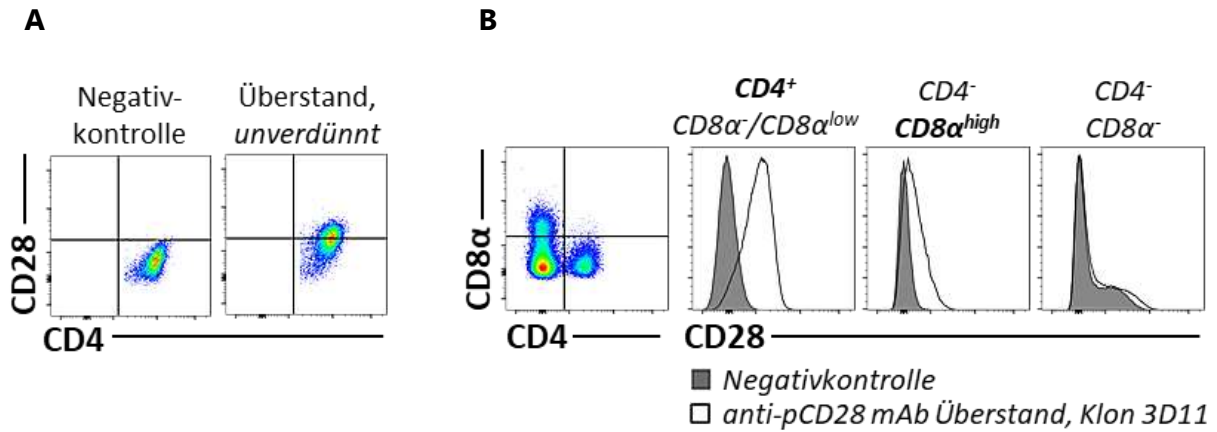


Abb. 21: Verfahren zur Selektionierung pCD28 spezifischer mAb Klone

(A) Analyse des Bindungsverhaltens der anti-pCD28 mAb an CD4⁺ CD8α⁻/CD8α^{low} Splenozyten mittels Pseudocolor Dotplot (B) Histogrammischer Vergleich zwischen Negativkontrolle und anti-pCD28 mAb 3D11 in den Populationen CD4⁺ CD8α⁻/CD8α^{low}, CD4⁻ CD8α^{high} und CD4⁻ CD8α⁻

Zur Analyse der Bindungsspezifität der mittels Hybridom-Technik erzeugten Maus anti-Schwein CD28 mAb Überstände wurde diese zunächst an den stark pCD28 mRNA exprimierenden CD4⁺CD8α⁻/CD8α^{low} Splenozyten durchflusszytometrisch getestet. Nach Positivselektion an CD4⁺ Splenozyten erfolgte dann eine weitere Charakterisierung an CD4⁻CD8α^{high} und CD4⁻CD8α⁻ Splenozyten.

Zur weiteren Charakterisierung des Bindungsverhaltens wurden Titrations der jeweiligen pCD28 spezifischen mAb Überstände zu verschiedenen Inkubationszeiten an CD4⁺ Splenozyten durchgeführt. Exemplarisch sind die beiden Verfahren für den Klon 3D11 in Abb. 21 und Abb. 22 dargestellt

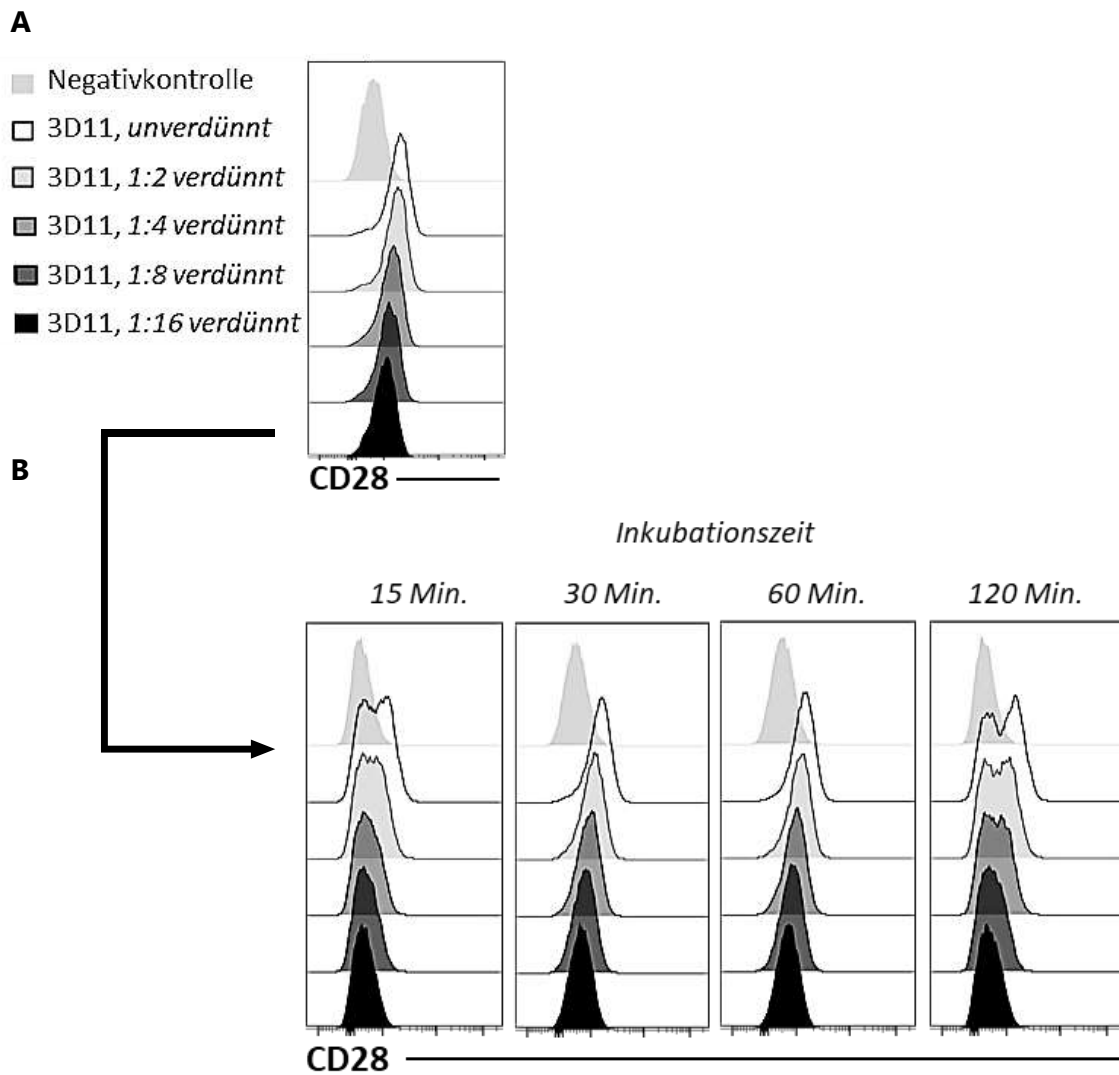


Abb. 22: Verfahren zur Untersuchung des Bindungsverhaltens pCD28 spezifischer mAb Klone

Histogramme zur beispielhaften Analyse des Bindungsverhaltens des anti-pCD28 mAb 3D11 an $CD4^+ CD8\alpha^- / CD8\alpha^{low}$ Splenozyten bei 4 °C (A) in verschiedenen Verdünnungsstufen (B) zu den Inkubationszeitpunkten 15 Min., 30 Min., 60 Min. und 120 Min.

In einer vergleichende Gegenüberstellung des Bindungsverhaltens der ersten (Sub-)Klone in Abb. 23 A+B wird deutlich, dass die generierten anti-pCD28 mAb in zwei, jeweils zeitlich konstante Kategorien unterteilt werden können. Antikörper, die nach einer Inkubationszeit von 15 Min. nicht an Zellen binden, also eine relative MFI von ca. 1.0 aufzeigen, tendieren auch im zeitlichen Verlauf (120 Min.) nicht mehr dazu, und können als nicht reaktiv eingestuft werden. Antikörper hingegen, die bereits nach 15 Min. eine MFI von mind. 1.5 aufweisen, zeigen auch im weiteren Verlauf eine Bindung.

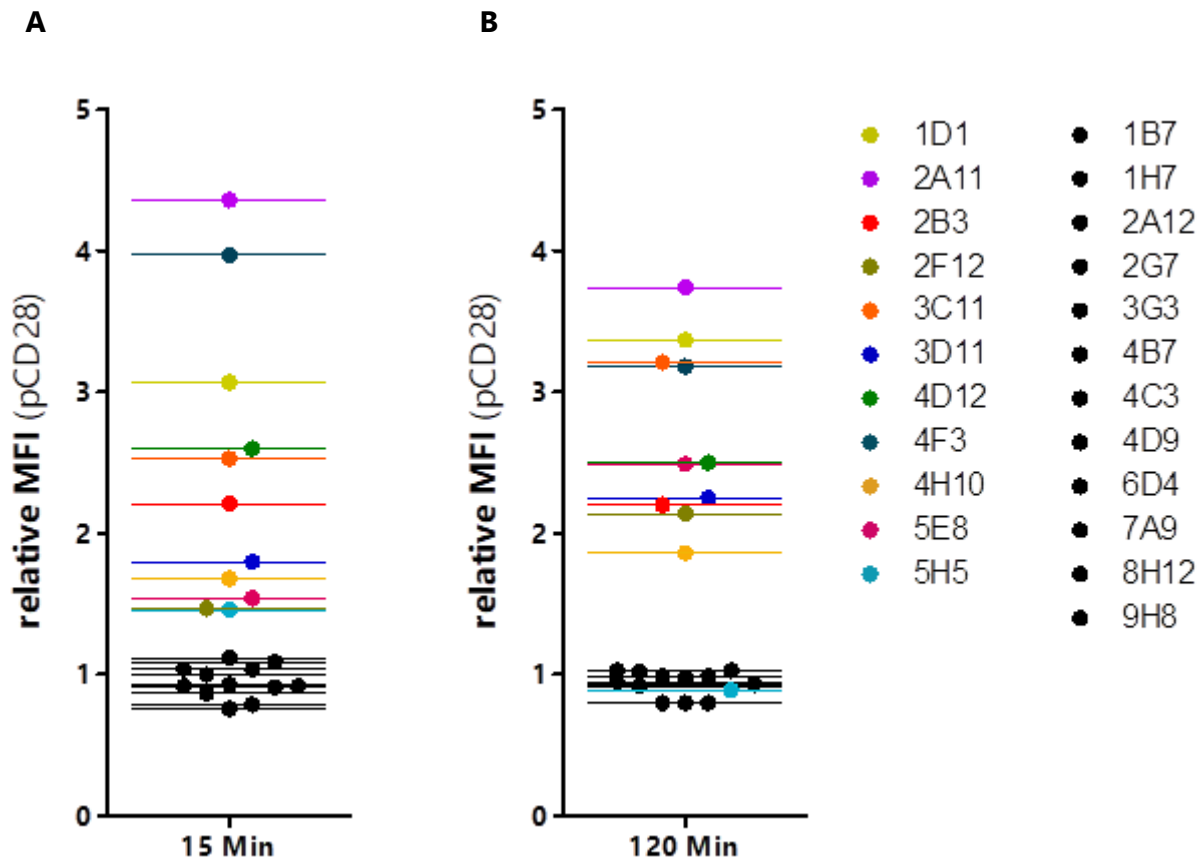


Abb. 23: Bindungsverhalten getesteter anti-pCD28 mAb zu verschiedenen Inkubationszeitpunkten

Zusammenschau des Bindungsverhaltens der getesteten anti-pCD28 mAb an $CD4^+ CD8\alpha^- / CD8\alpha^{low}$ Splenozyten nach Inkubation auf Eis für (A) 15 Min. und (B) 120 Min. repräsentiert durch die relative MFI (pCD28) [rel. MFI: mediane Fluoreszenzintensität (MFI) der spezifischen Färbung mit anti-pCD28 mAb \ddot{U}/S / MFI der Kontrollfärbung ohne anti-pCD28 mAb \ddot{U}/S] (A, B) unverdünnt, „schwarz“ entspricht keine Reaktivität, „farbig“ entspricht Reaktivität

Die für Oberflächenfärbungen unüblich lange Inkubationszeit von 2 h wurde gewählt, um potenzielle pCD28-SA zu identifizieren. Aus den Erfahrungen mit anti-Ratte CD28-SA [262] ist bekannt, dass für diese Spezies CD28-SA auf Grund des lateral lokalisierten Epitops im Bereich der C'D Schleife eine sehr langsame Bindungskinetik aufweisen und eine detektierbare Bindung deshalb erst nach mehrstündiger Inkubation möglich ist.

3.2.2 Kreuzreaktivität anti-pCD28 spezifischer mAb mit CD28 von Mensch und Maus

Wie bereits zu anfangs der Arbeit beschrieben wurde, war in der Vorarbeit zum Projekt aufgefallen, dass die verfügbaren anti-Mensch/ -Maus/ -Ratte CD28 mAb trotz relativ hoher Homologie (ca. 69 % - 94 %) keine Kreuzreaktivität untereinander oder mit porcinen Zellen aufgezeigt haben. Deshalb galt es im Folgenden zu prüfen, ob es unter den anti-pCD28 spezifischen mAb eventuell Antikörper mit Kreuzreaktivität für humane oder Maus-T-Zellen geben könnte. Dies könnte bei positiver Kreuzreaktivität zum einen Aufschluss über die Lokalisation der von anti-pCD28 mAb erkannten Epitope und zum anderen Aufschluss über Spezies-spezifische Unterschiede und Gemeinsamkeiten in Bezug auf die funktionelle Epitopkartierung ergeben.

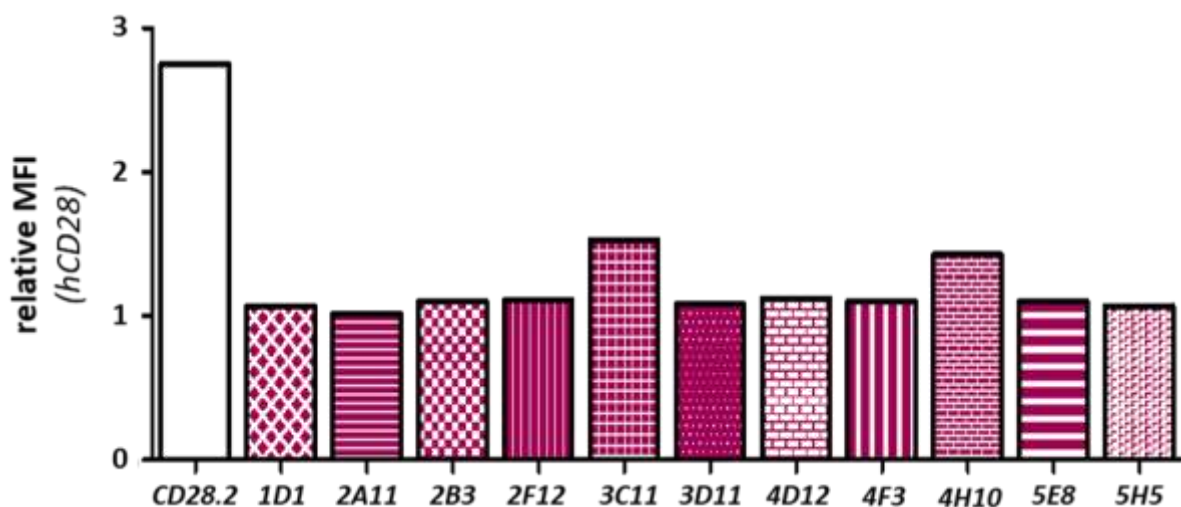


Abb. 24: Geringe Kreuzreaktivität der anti-pCD28 mAb Überstände 3C11 und 4H10 mit hCD28

Graphische Darstellung der Kreuzreaktivität verschiedener unverdünnter anti-pCD28 mAb Ü/S mit humanen CD4⁺ T-Zellen (PBMCs). Der Klon CD28.2 diente hierbei als Positivkontrolle und wurde verdünnt bei einer Konzentration von 0,1 µg/ml eingesetzt. [rel. MFI: MFI der spezifischen Färbung/ MFI der Negativkontrollfärbung ohne anti-CD28 mAb].

Entsprechend der in Abb. 24 dargestellten Ergebnisse ist zu erkennen, dass zwei der getesteten anti-pCD28 spezifischen mAb Ü/S in Relation zur Positivkontrolle CD28.2 (relative MFI: 2,75) eine geringe Kreuzreaktivität mit humanen CD4⁺ T-Zellen aus PBMCs aufweisen. Hierbei handelt es sich um die Überstände der anti-pCD28 mAb 3C11 (MFI: 1,53) und 4H10 (MFI: 1,43). Da die generierten Überstände herstellungsbedingt nur sehr niedrige Konzentrationen an anti-pCD28 mAb aufweisen und somit bei der Färbung der humanen PBMCs eventuell keine ausreichende Sättigung der Färbelösung mit anti-pCD28 mAb vorlag, ist zur Überprüfung der schwachen Signale der Klone 3C11 und 4H10 eine erneute Testung auf Kreuzreaktivität nach Antikörperaufreinigung und -titration durchzuführen.

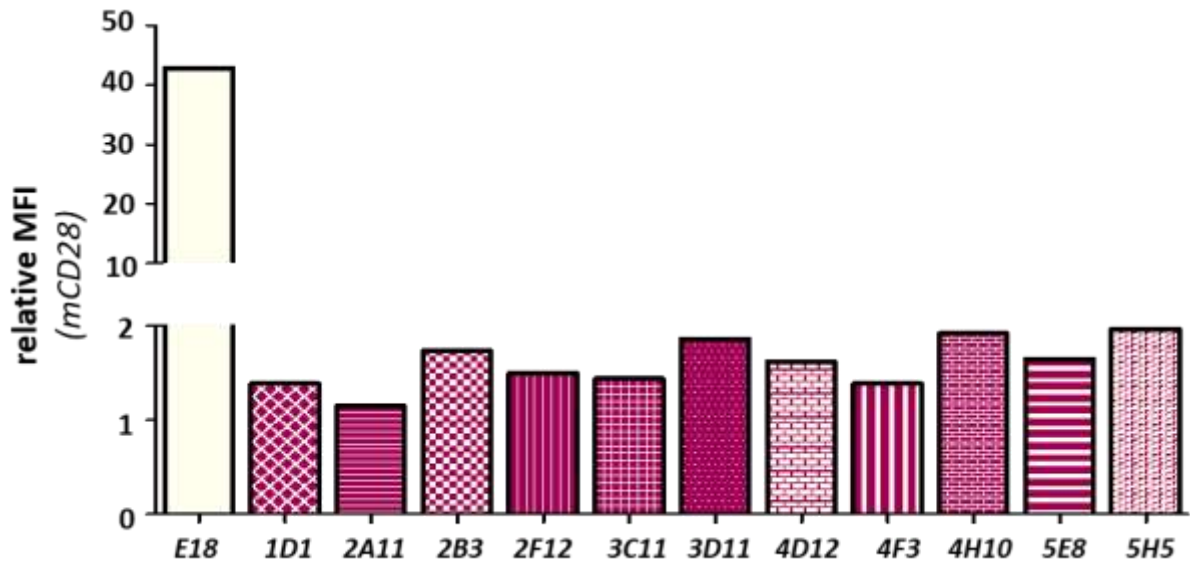


Abb. 25: Keine Kreuzreaktivität der anti-pCD28 mAb Überstände mit mCD28

Graphische Darstellung der Kreuzreaktivität verschiedener unverdünnter anti-pCD28 mAb Ü/S mit CD4⁺ T-Zellen (Milz) einer Wildtyp C57BL/6 Maus. Klon E18 diente hierbei als Positivkontrolle und wurde verdünnt bei einer Konzentration von 1,0 µg/ml eingesetzt. [rel. MFI: MFI der spezifischen Färbung mit Primär- und Sekundärantikörper/ MFI der Negativkontrollfärbung ohne anti-CD28 mAb].

Bei der Testung der anti-pCD28 mAb auf Kreuzreaktivität mit Maus CD4⁺ T-Lymphozyten aus der Milz zeigten die getesteten Überstände, bis auf den Klon 2A11 (relative MFI: 1,15), eine leicht erhöhte relative MFI (relative MFI: 1,39 – 1,97). Dargestellt ist dies in Abb. 25.

Aufgrund des im Vergleich zur Positivkontrolle E18 (MFI: 42,8) jedoch schwachen Signals der Überstände ist davon auszugehen, dass es sich hierbei um keine Kreuzreaktivität der getesteten anti-pCD28 mAb mit dem mCD28 handelt.

3.2.3 Untersuchung der pCD28 Oberflächenexpression

3.2.3.1 Ähnliche CD28 Oberflächenexpression in $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen

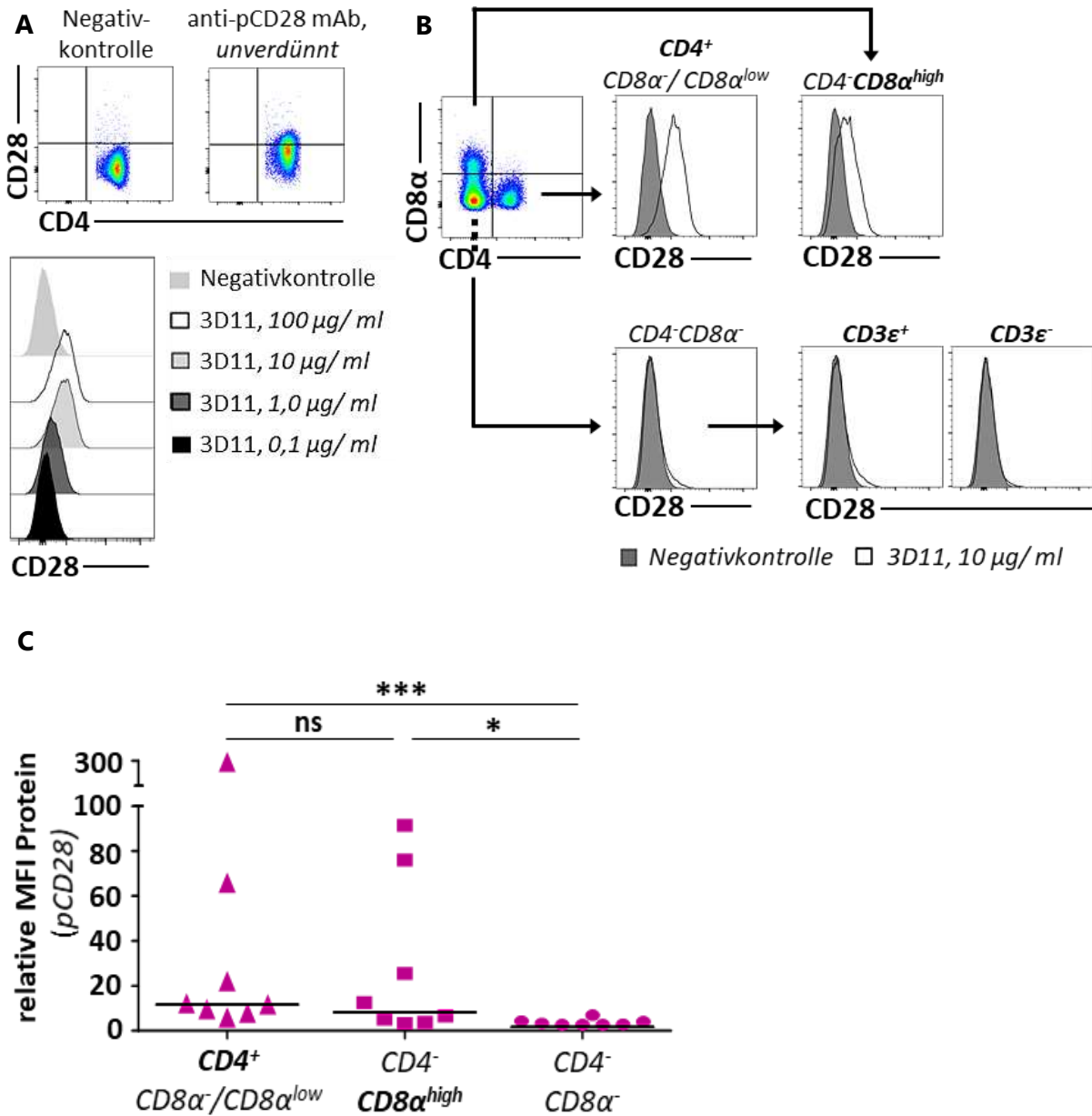


Abb. 26: Ähnliche Oberflächenexpression von pCD28 in $CD4^+$ $CD8\alpha^-/CD8\alpha^{low}$ T-Zellen und $CD4^-CD8\alpha^+$ T-Zellen

(A) Titration des aufgereinigten Klon 3D11 zur Bestimmung der idealen Konzentration für Anfärbungen von $CD4^+$ T-Zellen. (B) Gatingstrategie zur Analyse der pCD28 Oberflächenexpression in den Splenozytensubpopulationen $CD4^+CD8\alpha^-/CD8\alpha^{low}$, $CD4^-CD8\alpha^{high}$, $CD4^-CD8\alpha^-CD3\epsilon^-$ und $CD4^-CD8\alpha^-CD3\epsilon^+$ mittels anti-pCD28 mAb 3D11 (C) Statistische Analyse der relativen MFI aus acht Experimenten mittels Mann-Whitney-U-Test im Streudiagramm mit Median und Einzelwerten, $n=8$.

Um die CD28 Oberflächenexpression genauer untersuchen zu können, wurden Überstände der positiv selektionierten Klone, wie die des Klons 3D11 isotypisiert, aufgereinigt und erneut in verschiedenen Konzentrationen auf die spezifische Bindung hin untersucht und die ideale Konzentration, hier 10 µg/ml, ermittelt. Dargestellt ist dies in Abb. 26 A.

In der Synopse der Histogramme aus der Einzelfärbung in Abb. 26 B zeigt sich, analog zur zuvor durchgeführten mRNA Analyse, eine erhöhte Oberflächenexpression der CD4⁺ T-Zellen für das pCD28 Protein verglichen mit CD8⁺ T-Zellen. Anders als in der statistischen Analyse zur CD28 mRNA Expression ergeben sich für die Experimente zur pCD28 Proteinexpression jedoch keine signifikant erhöhten Werte für CD4⁺ T-Zellen in Relation zu den CD8⁺ T-Zellen (s. Abb. 26 C). Vorstellbar wäre, dass CD4⁺ T-Zellen bspw. in Folge eines erhöhten CD28 Protein Turnovers eine konstant erhöhte CD28 mRNA-Expression aufweisen. Hinweisgebend hierfür wären vergleichende Studien zur Internalisierungsrate des CD28 Oberflächenmoleküls in CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen. Weiterhin signifikant bleibt jedoch der Expressionsunterschied zwischen CD4⁺ T-Zellen und CD4⁻CD8α⁻ Zellen.

Ein verminderter Turnover des CD28 Moleküls durch CD8⁺ T-Zellen könnte zudem auch die Diskrepanz der CD28 mRNA und CD28 Protein Expressionsunterschiede zwischen CD8⁺ T-Zellen und CD4⁻CD8α⁻ Zellen erklären. Während es für die CD28 mRNA zu keinem signifikanten Expressionsunterschied gekommen ist, zeigen CD8⁺ T-Zellen für die CD28 Proteinexpression signifikant erhöhte Werte im Vergleich zu CD4⁻CD8α⁻ Zellen (s. Abb. 26 C).

Wie bereits für die pCD28 mRNA Ergebnisse der CD4⁻CD8α⁻ Zellen antizipiert wurde, kommt es bei den TZR negativen CD4⁻CD8α⁻ Zellen hingegen zu keiner messbaren pCD28 Oberflächenexpression und es bestätigt sich, dass innerhalb der CD4⁻CD8α⁻ Population T-Zellen für die positive CD28 mRNA bzw. Proteinexpression verantwortlich sind (s. Abb. 26 B).

3.2.3.1 Kein Unterschied in der CD28 Oberflächenexpression der CD4⁺ T-Zellsubpopulationen

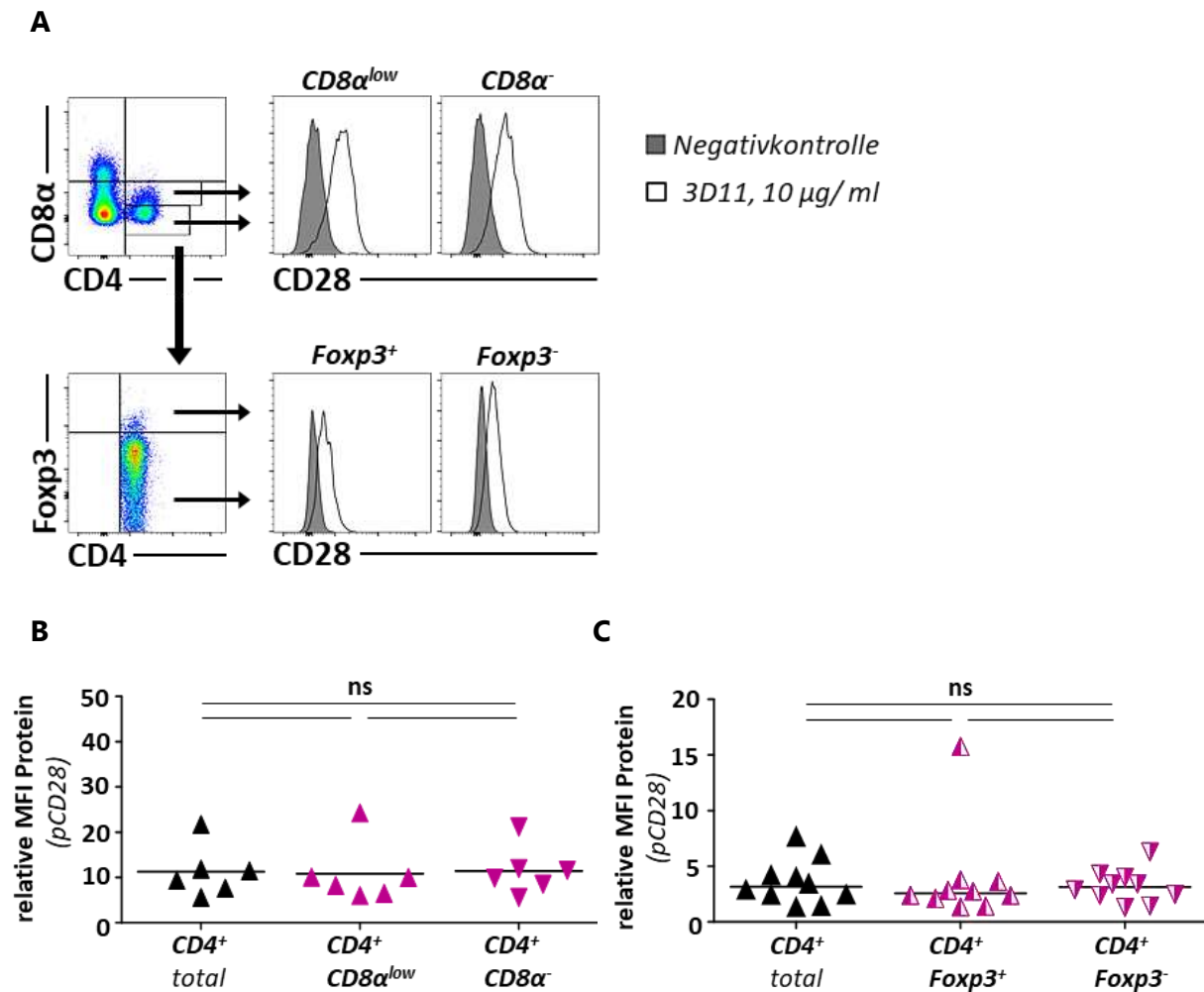


Abb. 27: Ähnliche pCD28 Oberflächenexpression in verschiedenen CD4⁺ T-Zellsubpopulationen

(A) Gatingstrategie zum Vergleich der pCD28 Oberflächenexpression im Histogramm zwischen den CD4⁺ T-Zellsubpopulationen CD4⁺ Foxp3⁺ (T_{reg}) und CD4⁺ Foxp3⁻ (T_{conv}) sowie CD4⁺ CD8 α^{low} (T_{mem}) und CD4⁺ CD8 α^{-} (T_{naiv}) mittels anti-pCD28 mAb 3D11. (B,C) Analyse der relativen MFI im Streudiagramm, Mittelwert, t-Test gepaart, zweiseitig (B) n=6, (C) durchgeführt, analysiert und ausgewertet durch Xin Ding, n=10.

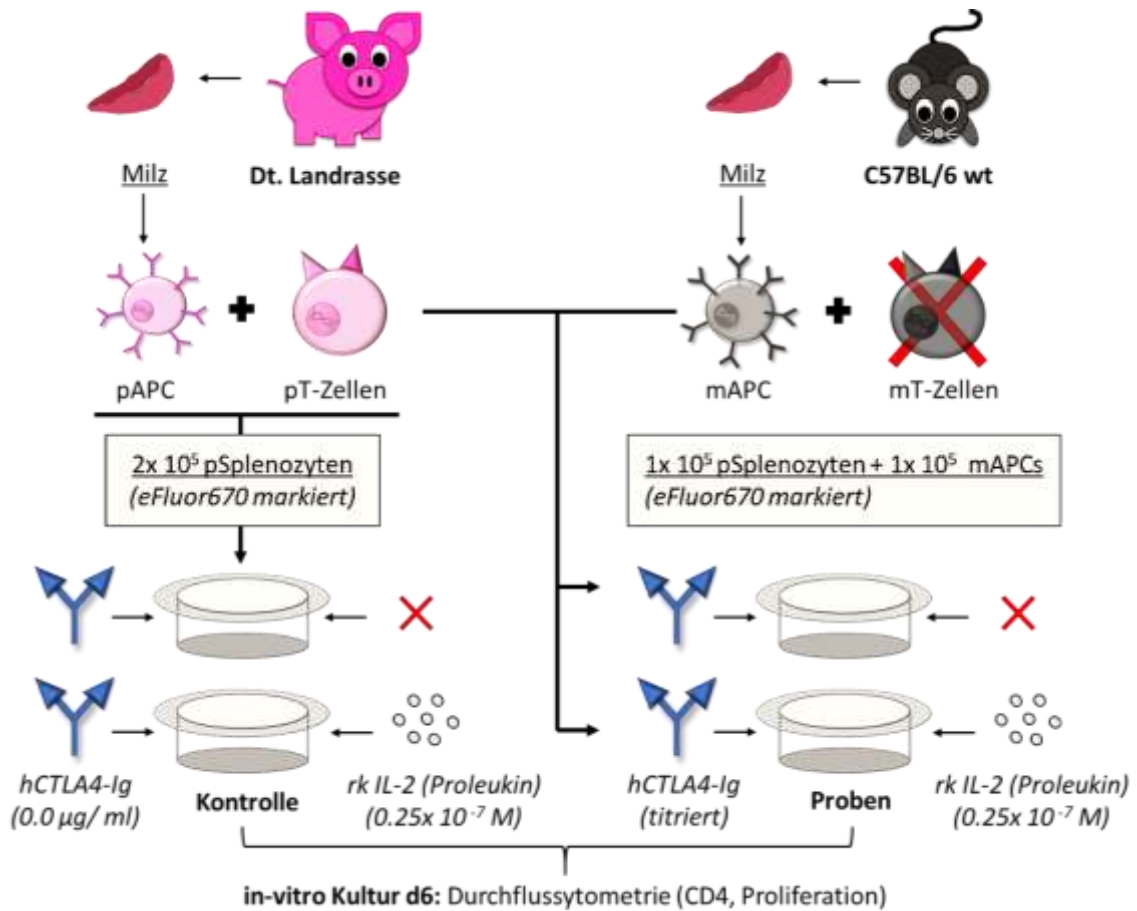
Analog zur bereits betrachteten mRNA Expression ist aus den Histogrammen der Abb. 27 A herauszulesen, dass die verschiedenen CD4⁺ T-Zellsubpopulationen T_{mem} (CD4⁺CD8 α^{low}) und T_{naiv} (CD4⁺CD8 α^{-}) sowie T_{reg} (Foxp3⁺) und T_{conv} (Foxp3⁻) das CD28 Oberflächenprotein ähnlich stark exprimieren. In der statistischen Analyse ergeben sich somit bei fast identischen Mittelwerten keine signifikanten Expressionsunterschiede für T_{mem} (CD4⁺CD8 α^{low}) und T_{naiv} (CD4⁺CD8 α^{-}) sowie für T_{reg} (Foxp3⁺) und T_{conv} (Foxp3⁻). Nachzuvollziehen ist dies in Abb. 27 B+C.

3.3 Funktionelle Analyse des pCD28 Moleküls

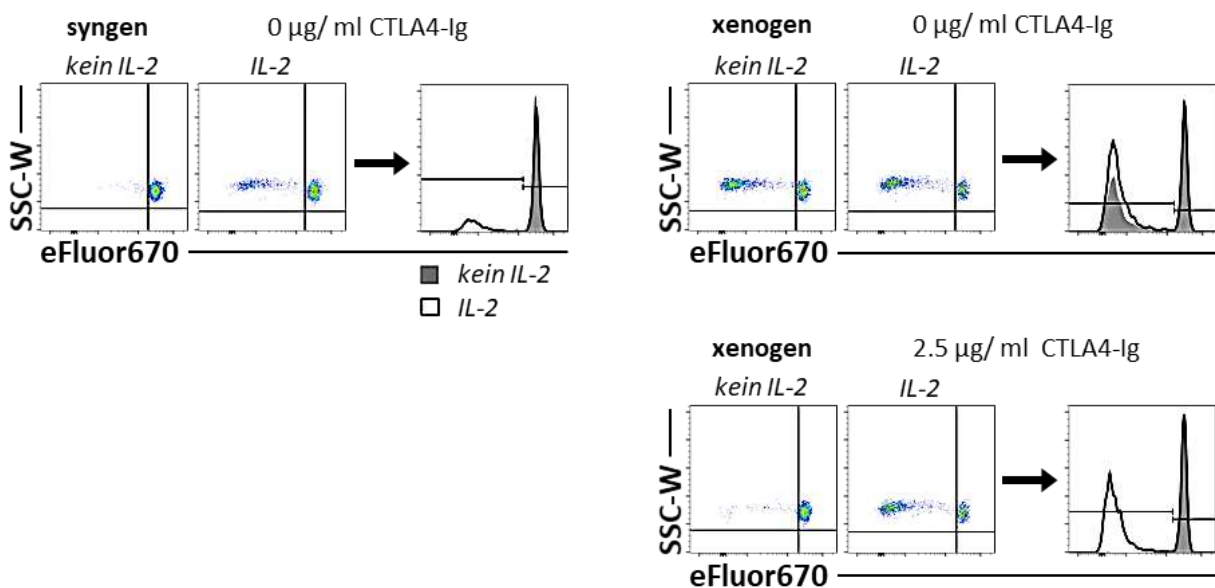
3.3.1 Kostimulatorische Funktion des pCD28 Moleküls

3.3.1.1 Erfolgreiche Inhibition von Schweine-T-Zellen in einer xenogenen Mixed Lymphocyte Reaction mit hCTLA-4-Ig

A



B



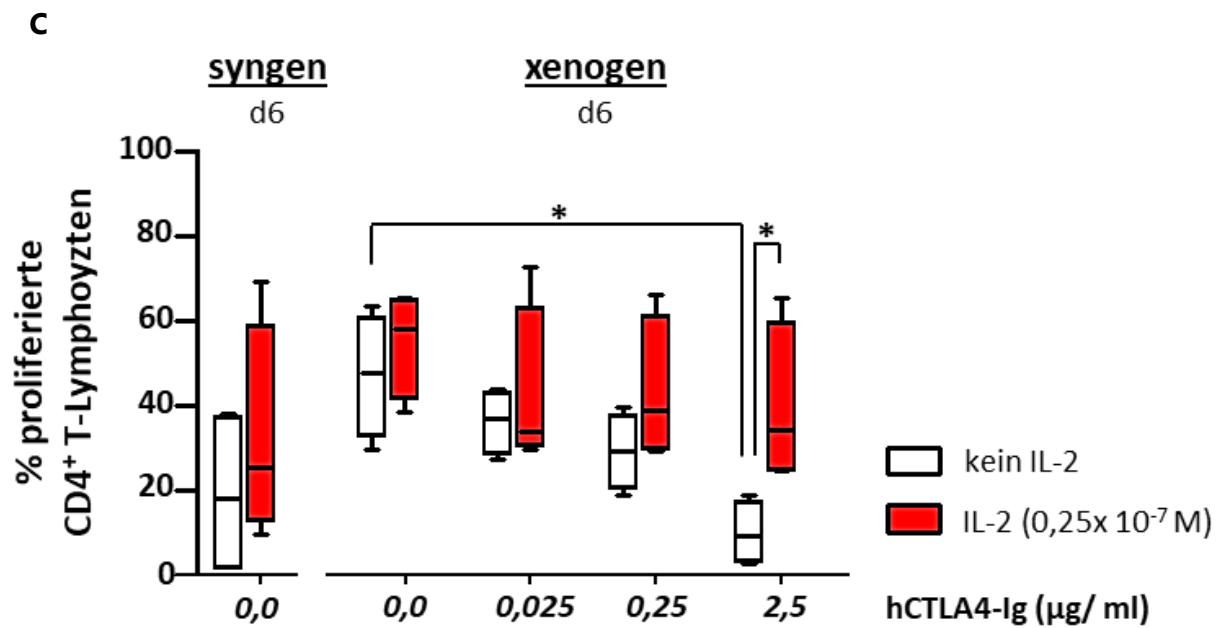


Abb. 28: Inhibitorische Wirkung hCTLA-4-Ig in der MLR mit Schweine-Milzzellen und Maus-APCs

(A) Schema (B) Rohdaten (C) Statistische Analyse des prozentualen Anteils an proliferierten Zellen an Kulturtag 6 (d6) aus vier Experimenten im Box-Whiskers-Diagramm, Mann-Whitney-U-Test, $n=4$.

Wie in der Einleitung zunächst beschrieben, sind porcine T-Zellen mittels CTLA-4 in der Lage, sowohl porcine als auch humane APCs ^{via} Interaktion mit B7 zu binden. Eine Bindung von Maus-APCs durch porcine T-Zellen mittels Interaktion zwischen CTLA-4 und B7 erfolgt hingegen nur mäßig schlecht bis gar nicht. Das humane CTLA4-Ig wiederum ist im Stande, B7-Moleküle aller genannten Spezies zu binden und folglich zu blockieren. pCD28, homolog zum pCTLA-4, verfügt in seiner Proteinsequenz über ein spezifisch porcines B7-Bindemotiv, über dessen genaue Funktion und Interaktion von pCD28 mit porcinen oder anderen APCs noch nichts Näheres bekannt ist.

Zur Untersuchung der vermuteten pCD28 Interaktion mit B7 wurde gemäß Abb. 28 A ein xenogener Versuchsaufbau mit APC-vermittelter T-Zell-Aktivierung sowie selektiver Blockade der Interaktion durch hCTLA-4-Ig mit und ohne zusätzliche IL-2 Stimulation gewählt. Sollte pCD28 keine kostimulatorischen oder sogar inhibierende Funktionen besitzen, so wäre durch die Blockade inhibitorischer Interaktionen durch hCTLA-4-Ig mit einer Steigerung der T-Zellaktivierung und einem konsekutiven Anstieg der Zellproliferation zu rechnen. Sollte pCD28, wie in anderen Spezies, kostimulatorische Fähigkeiten besitzen, so ist durch die Inhibition aktivierender Interaktionen mit B7 durch hCTLA-4-Ig eine reduzierte T-Zellaktivierung und ein konsekutiver Abfall der Zellproliferation zu erwarten. Eine funktionelle Kompensation der Inhibition von CD28-Kostimulation sollte daher durch die Zugabe von IL-2 [263] ermöglicht werden.

Wie sich in Abb. 28 B zeigt, sind die Zellen im syngenem System mittels IL-2, gemessen an ihrer Proliferation, allgemein stimulierbar und können im xenogenen System durch alleinige Inkubation mit Maus-APCs noch stärker stimuliert werden. Eine zusätzliche leichte Steigerung der Zellproliferation im xenogenen System ist dabei ebenfalls durch die Zugabe von IL-2 möglich (s. Abb. 28 B). Wird jedoch hCTLA-4-Ig zugegeben, so nimmt die prozentuale Anzahl proliferierter Zellen dosisabhängig wieder signifikant ab und unterscheidet sich bei einer Maximaldosis von 2.5 µg/ml nicht vom medianen Ausgangswert des syngenem Systems (s. Abb. 28 C). Erfolgreich verhindert werden konnte eine derartige Abnahme der Proliferation durch das Hinzufügen von IL-2 (s. Abb. 28 B, C), was zu einer konstant hohen Proliferation führte (s. Abb. 28 C). Daraus lässt sich indirekt schließen, dass Schweine T-Zellen ebenfalls einen kostimulatorischen Oberflächenrezeptor für B7-Moleküle besitzen, bei dem es sich vermutlich um pCD28 handelt.

3.3.1.2 Schweine-T-Zell-Aktivierung durch Kostimulation mit anti-CD28

mAb

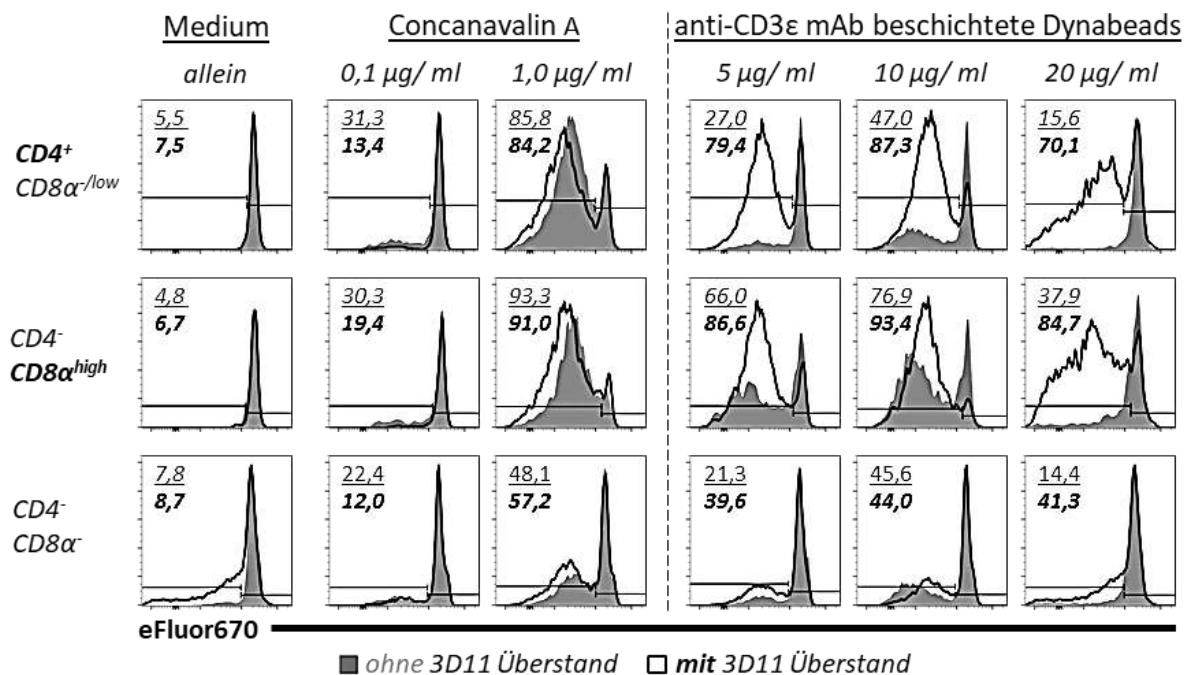


Abb. 29: Fähigkeit anti-pCD28 spezifischer mAb zur Kostimulation von T-Zellen am Beispiel des CD28 mAb 3D11

Porcine Splenozyten wurden für 4 Tage in Ansätzen mit und ohne anti-pCD28 mAb Überstand (Klon 3D11) in Medium, verschiedenen Konzentrationen an Concanavalin A und anti-CD3ε mAb beladenen Dynabeads Pan Mouse Ig kultiviert. Das Proliferationsverhalten wurde nach 4-tägiger Inkubation durchflusszytometrisch ausgelesen. Die Zahlen entsprechen dem Anteil an eFluor670^{low}-Zellen.

Zur weiteren Untersuchung der vermuteten Funktion des pCD28 Moleküls wurden porcine Splenozyten in kostimulatorischen Versuchsansätzen zusammen mit positiv selektionierten anti-pCD28 mAb Überständen für vier Tage kultiviert und die pCD28-vermittelte T-Zellaktivierung anschließend anhand des Proliferationsverhaltens bestimmt.

Wie in Abb. 29 repräsentativ für die Mehrzahl der getesteten anti-pCD28 spezifischen mAb zu erkennen ist, konnte der Überstand des anti-pCD28 mAb 3D11 in Lsg. alleine keine Proliferation der T-Zellpopulationen $CD4^+CD8\alpha^- / CD8\alpha^{low}$ und $CD4^-CD8\alpha^{high}$ bewirken.

Auch bei Zugabe einer unterschwelligen Dosis Concanavalin A (Con A 0,1 μ g/ ml) zum Überstand 3D11 ist keine Proliferationszunahme für die Zellpopulationen $CD4^+CD8\alpha^- / CD8\alpha^{low}$, $CD4^-CD8\alpha^{high}$ und $CD4^-CD8\alpha^-$ zu verzeichnen.

Erst durch die Stimulation mittels Con A 1,0 μ g/ ml ließ sich eine anti-pCD28 mAb vermittelte, leichte Proliferationszunahme beobachten.

Eine deutliche Proliferationssteigerung der T-Zellpopulationen $CD4^+CD8\alpha^- / CD8\alpha^{low}$ und $CD4^-CD8\alpha^{high}$ zeigte sich in Kombination mit anti-CD3 ϵ mAb beladenen Dynabeads Pan Mouse Ig. Auffällig hierbei ist die im Vergleich zu den $CD4^+CD8\alpha^- / CD8\alpha^{low}$ Zellen verstärkte Proliferation der $CD4^-CD8\alpha^{high}$ Zellen bereits durch anti-CD3 ϵ mAb beladene Dynabeads Pan Mouse Ig, die sich unter Zugabe des anti-pCD28 mAb Überstands seitens der $CD4^+CD8\alpha^- / CD8\alpha^{low}$ Zellen wieder ausgleicht.

Ein leichter Anstieg der Zellproliferation ist dabei auch für die $CD4^-CD8\alpha^-$ Population im kostimulatorischen Versuchsansatz mit und ohne anti-pCD28 mAb zu verzeichnen.

Die Überstände der anti-pCD28 mAb sind somit im Stande, eine kostimulatorische Funktion in CD28 exprimierenden Zellen, T-Zellen, auszulösen. Die Fähigkeit, eine superagonistische Funktion zu induzieren, konnte leider für keinen der getesteten Klone in dieser Versuchsreihe beobachtet werden.

Zur Gewährleistung, dass die gemessenen kostimulatorischen Eigenschaften der Überstände den anti-pCD28 mAb zuzuschreiben sind, wurden die Überstände aufgereinigt, isotypisiert und die Versuche in titrierter Form wiederholt (s. Abb. 30).

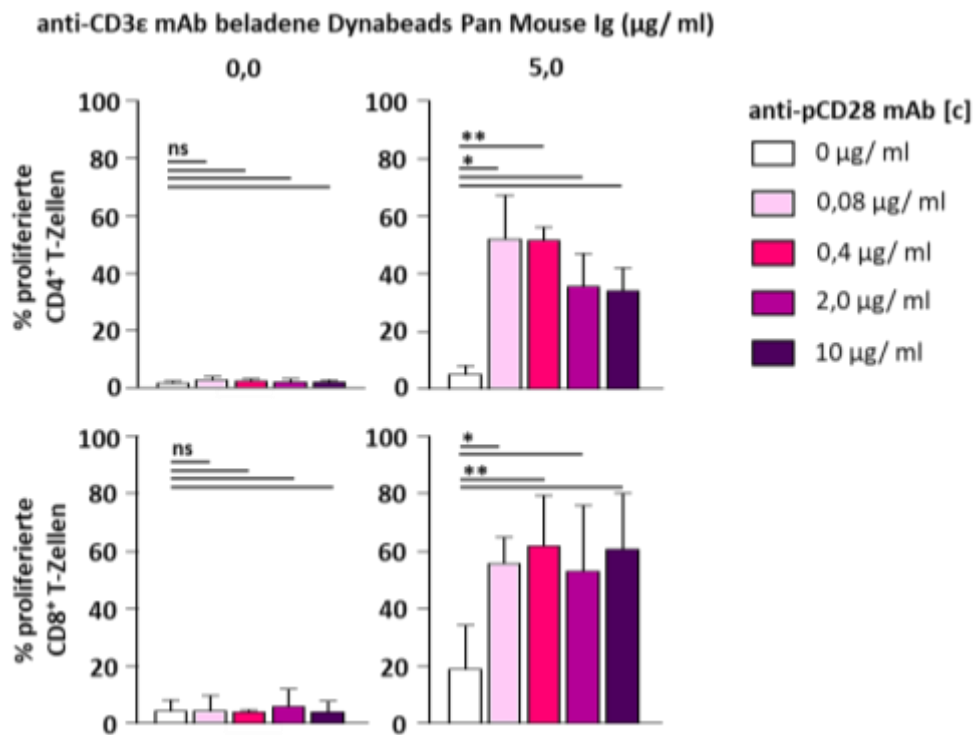


Abb. 30: Induktion von CD28-Kostimulation in $CD4^+ CD8\alpha^- / CD8\alpha^{low}$ und $CD4^- CD8\alpha^{high}$ Splenozyten durch den aufgereinigten anti-pCD28 mAb 3D11

Kultivierung porciner Splenozyten im kostimulatorischen Versuchsansatz, Säulendiagramm mit Mittelwert und oberer SD, d3, t-Test, gepaart, zweiseitig, n=3.

Ähnlich wie bei der Verwendung von Überständen in Abb. 29 vermag der aufgereinigte anti-pCD28 mAb alleine keine T-Zellproliferation zu bedingen (s. Abb. 30). Erst durch die Zugabe von anti-CD3ε mAb beladenen Dynabeads Pan Mouse Ig ist eine signifikante Steigerung der Zellproliferation zu verzeichnen. Die bereits beobachtete kostimulatorische Funktion ist somit alleine auf die Inkubation mit anti-pCD28 mAb und nicht auf potenziell mitogene Zellkulturzusätze wie rekombinantes humanes Interleukin-6 (rk IL-6) der anti-pCD28 mAb Ü/S zurückzuführen.

Auch in diesem Versuchsansatz zeigen $CD8^+$ T-Zellen in Relation zu $CD4^+$ T-Zellen ein vermehrtes proliferatives Ansprechen auf anti-CD3ε mAb beladene Dynabeads Pan Mouse Ig (ca. 5 % für $CD4^+$ T-Zellen versus ca. 20 % für $CD8^+$ T-Zellen). $CD4^+$ T-Zellen scheinen zwar weniger stark auf anti-CD3ε mAb beladene Dynabeads Pan Mouse Ig, aber umso stärker auf die Kostimulation durch anti-pCD28 mAb 3D11 anzusprechen. Während $CD8^+$ T-Zellen bei kontinuierlicher Steigerung der anti-pCD28 mAb Konzentration bis 10 µg/ml weiterhin eine konstante Proliferationsrate aufzeigen, kommt es bei $CD4^+$ T-Zellen zu einem Abfall der Proliferation bei anti-pCD28 mAb Konzentrationen größer als 0,08 µg/ml. Aufschluss hierüber könnte zum einen das Oberflächenexpressionsverhältnis von CD3 und CD28 und zum anderen die intrazellulär ausgelösten Signalkaskaden in den aktivierten $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen geben.

3.3.2 Testung auf direkt stimulatorische Eigenschaften von anti-pCD28 mAb

3.3.2.1 Screening von anti-pCD28 mAb auf direkt stimulatorische Funktion

In den bisherigen Versuchsansätzen hatte sich gezeigt, dass die Überstände aller positiv selektionierter anti-pCD28 mAb eine kostimulatorische Wirkung auf Schweine-T-Zellen haben können. Eine superagonistische Wirkung der Überstände konnte hingegen unter diesen Bedingungen noch nicht beobachtet werden. Unter dem Aspekt, dass die CD28 mAb Konzentration in den gewonnenen Zellkulturüberständen der Hybridome sehr niedrig und ggf. für eine Aktivierung nicht ausreichend ist, wurden im Folgenden Ansätze verwendet, die die anti-pCD28 mAb Präsentation und die damit einhergehende mögliche Zellaktivierung verbessern sollen. Anders als im Versuchsansatz zur Kostimulation werden die Überstände, wie in Abb. 31 A, nicht alleine, sondern zusammen mit Dynabeads Pan Mouse Ig zur Kultur gegeben. Dargestellt ist dies in Abb. 31 B.

Durch die Kultivierung porciner Splenozyten mit Dynabeads Pan Mouse Ig und anti-pCD28 mAb Ü/S in Lsg. kristallisierte sich, wie in Abb. 31 C+D zu sehen, heraus, dass einige Klone eine mitogene Wirkung auf T-Zellen haben können, die unterschiedlich stark für CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen ist. So scheinen die Klone 3F9, 4D12 und 4C8 befähigt, durch die Dynabeads Pan Mouse Ig-vermittelte CD28 mAb Präsentation CD4⁺ aber nicht CD8⁺T-Zellen direkt stimulieren zu können. Eine hohe Dichte-Kultur, wie sie bei humanen T-Zellen zur Verbesserung des Ansprechens auf superagonistische anti-pCD28 mAb verwendet wird [264], erbrachte für porcine T-Zellen keinen zusätzlich stimulatorischen Effekt (nicht gezeigte Daten).

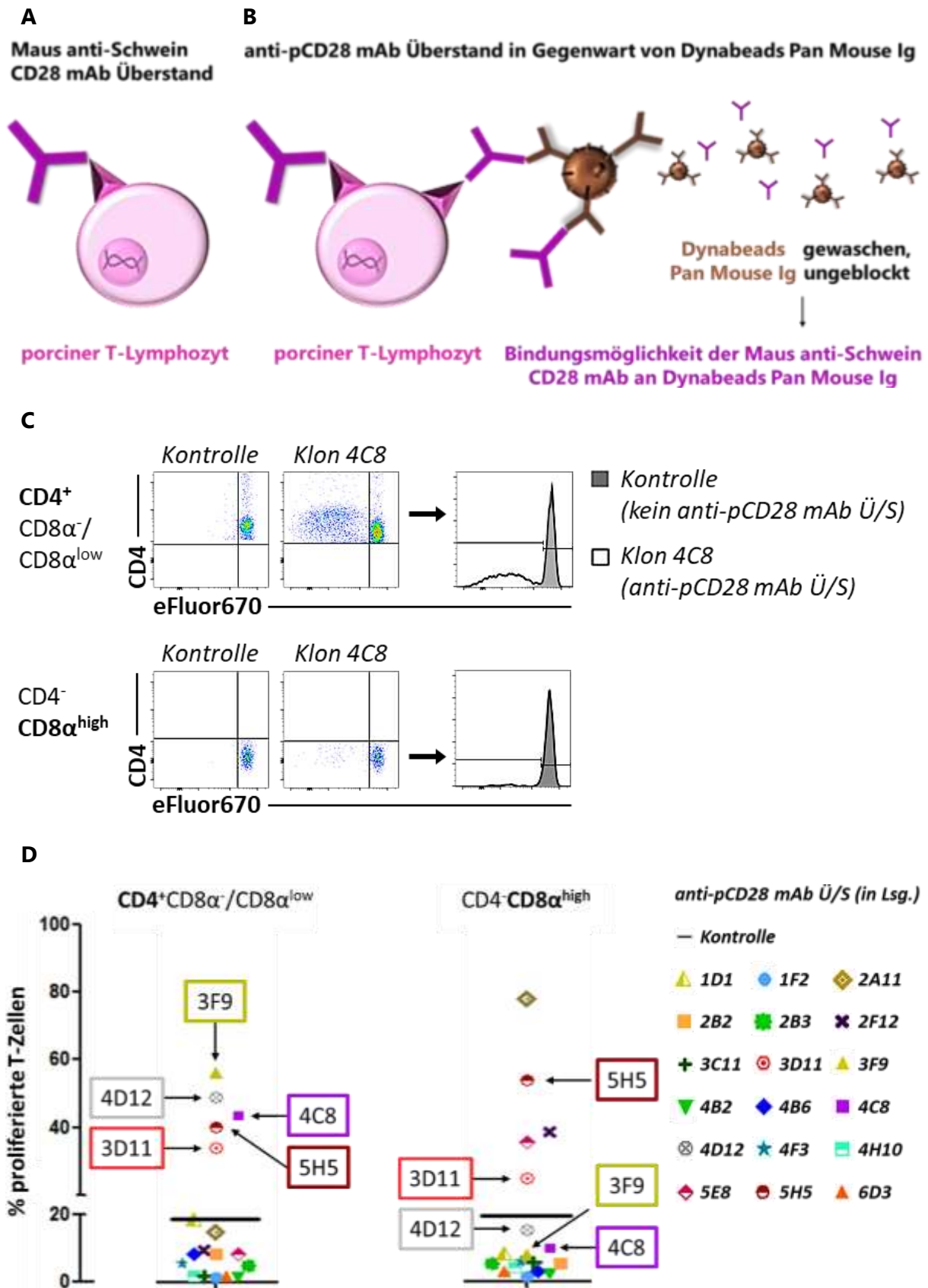


Abb. 31: Direkte Stimulation von Schweine-T-Zellen durch anti-pCD28 mAb

Schematische Darstellung der Versuchsansätze zur direkten Stimulation durch anti-pCD28 mAb in Lsg. (A) ohne und (B) mit Dynabeads Pan Mouse Ig. (C, D) Inkubation porciner Splenozyten mit Dynabeads Pan Mouse Ig und anti-pCD28 mAb Überständen verschiedener Klone oder Medium als Kontrolle. Streudiagramm, d5, n=1.

3.3.2.2 Vergleich unterschiedlicher Formen der Immobilisierung von anti-pCD28 mAb auf Dynabeads Pan Mouse Ig

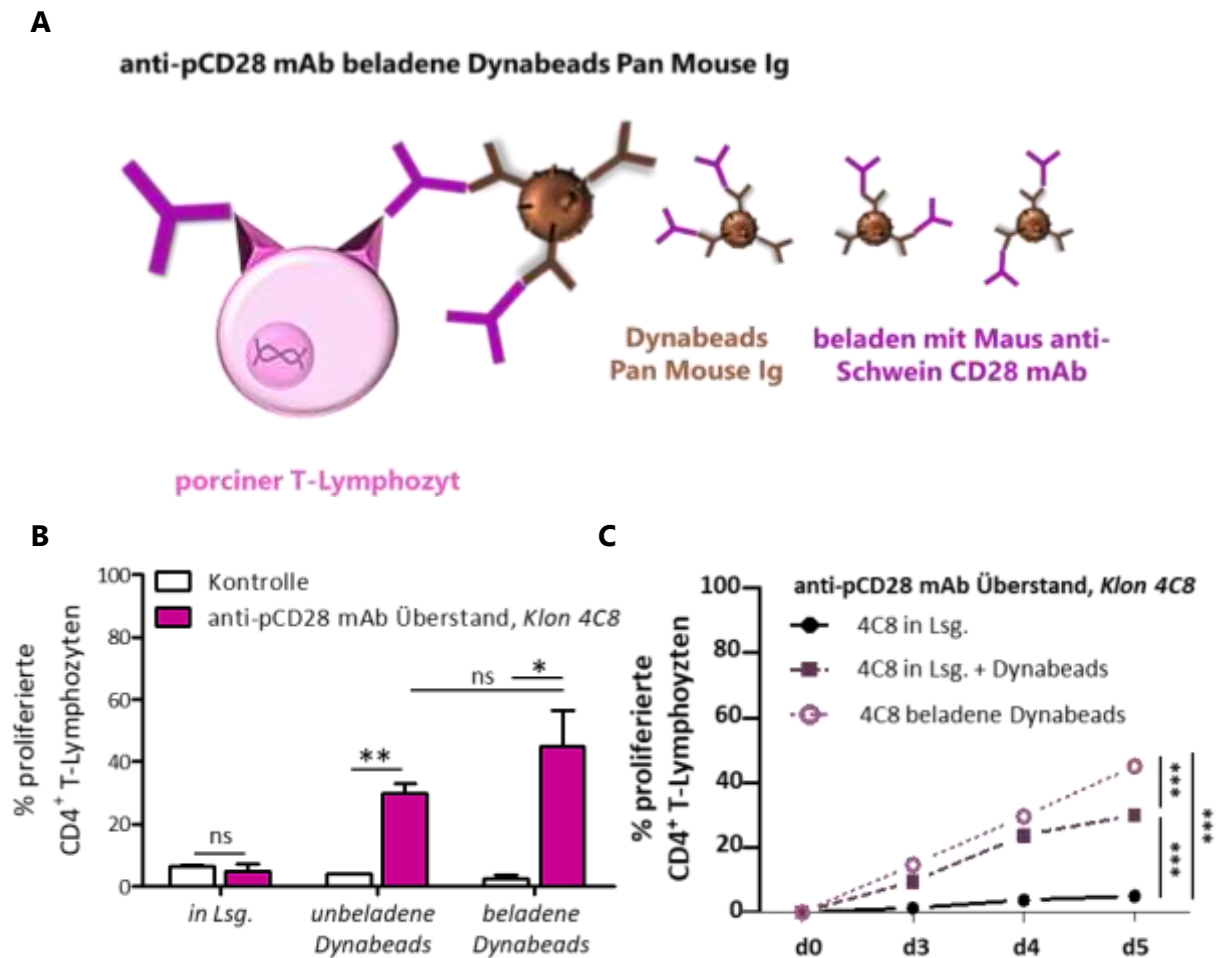


Abb. 32: Bei Induktion der direkten Stimulation zeigen T-Zellen die höchsten Proliferationsraten mit anti-pCD28 mAb beladene Dynabeads Pan Mouse Ig

(A) Schematische Darstellung der Versuchsansätze zur direkten Stimulation mit anti-pCD28 mAb beladenen Dynabeads Pan Mouse Ig. (B) Säulendiagramm, d5, Mittelwert mit oberer Standardabweichung, t-Test, gepaart, zweiseitig, $n=3$ (C) Liniendiagramm mit Mittelwerten, ANOVA, $n=3$.

Unter der Annahme, dass das verbesserte Ansprechen auf anti-pCD28 mAb in 3.3.2.1 darauf zurückzuführen ist, dass die Antikörper durch spontane Bindung an die sich in Suspension befindlichen Dynabeads Pan Mouse Ig ein Crosslinking der CD28 Moleküle hervorrufen, wurden die Dynabeads Pan Mouse Ig im nächsten Schritt direkt mit anti-pCD28 mAb beladen.

Somit kann ausgeschlossen werden, dass weitere in den Überständen befindliche, lösliche Faktoren (rk IL-6, etc.) ursächlich für die Proliferation sind.

Wie in den Abbildungen Abb. 32 B+C am Beispiel des $CD4^+$ T-Zell spezifisch aktivierenden Klons 4C8 zu erkennen ist, bewirken die mit anti-pCD28 mAb beladenen Dynabeads Pan Mouse Ig eine signifikante Zunahme der T-Zellproliferation im Vergleich zu den Versuchsansätzen, bei denen anti-pCD28 mAb in Lsg. zugegeben wurde.

Anhand Abb. 32 C ist zudem zu erkennen, dass sich die Zellen für den in Abb. 32 B gewählten Analysetag d5 tendenziell noch im Übergang vom Proliferationsanstieg zur Plateauphase befinden und somit das Proliferationsmaximum noch nicht überschritten haben.

3.3.2.3 Stärkeres proliferatives Ansprechen von $CD4^+$ als $CD8^+$ T-Zellen auf anti-pCD28 mAb Klon 4C8

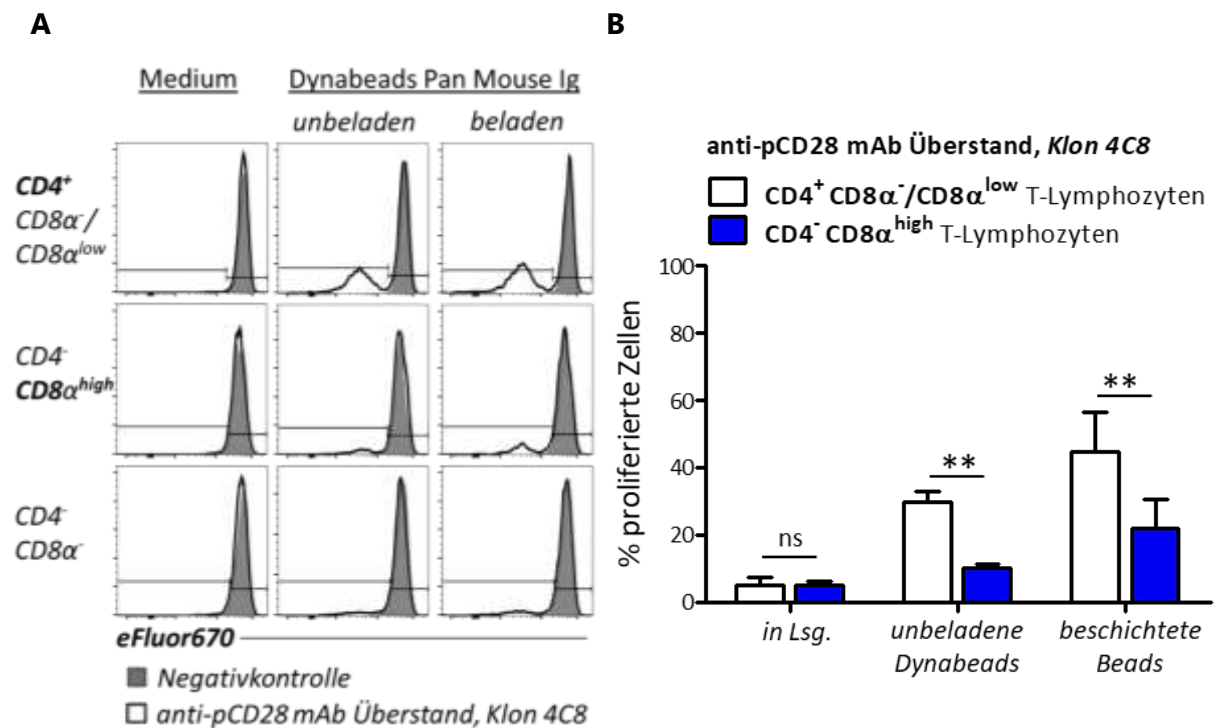


Abb. 33: Anti-pCD28 mAb 4C8 induziert bessere Proliferation von $CD4^+$ als von $CD8^+$ T-Zellen

(A, B) Inkubation porciner Splenozyten mit anti-pCD28 mAb 4C8 Überständen in Lsg. und anti-pCD28 mAb 4C8 beschichteten Dynabeads Pan Mouse Ig (A) Histogramm, d5, $n=1$ (B) Säulendiagramm, d5, Mittelwert + SD, t-Test, gepaart, zweiseitig, $n=3$.

Was sich in den Streudiagrammen von Abb. 31 bereits angedeutet hatte, wird in den Histogrammen und der statistischen Auswertung von Abb. 33 noch deutlicher. $CD4^+$ T-Zellen ($CD4^+CD8\alpha^-/CD8\alpha^{low}$) werden durch die Dynabeads Pan Mouse Ig vermittelte anti-pCD28 mAb Präsentation des Klons 4C8 signifikant stärker stimuliert als $CD8^+$ T-Zellen ($CD4^+CD8\alpha^{high}$). Bei den doppelt-negativen Zellen kommt es hingegen zu fast keiner messbaren Proliferation.

3.3.2.4 Ähnliches proliferatives Ansprechen von T_{reg} und T_{conv} auf anti-pCD28 mAb 4C8

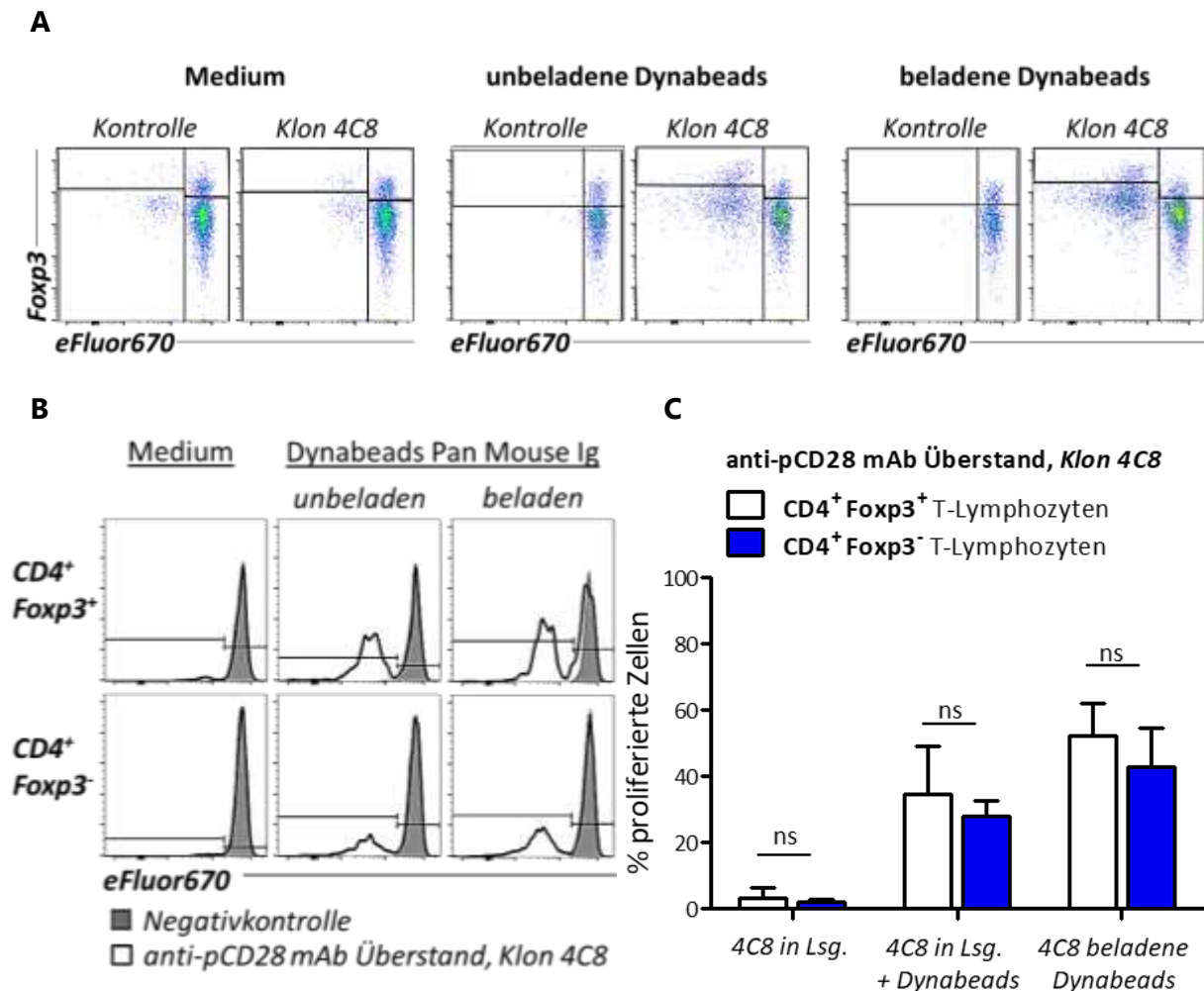


Abb. 34: Ähnliche Proliferationsraten von $CD4^+Foxp3^+$ und $CD4^+Foxp3^-$ T-Zellen nach direkter Stimulation durch anti-pCD28 mAb 4C8

(A) d5 Pseudocolor-Dotplots (B) d5 Histogramm (C) d5, Mittelwert und obere Standardabweichung, t-Test, gepaart, zweiseitig, $n=3$. Die Ergebnisse in 3.3.2.4 stammen aus den selbigen Experimenten wie die Ergebnisse in 3.3.2.3

Bei der weiteren Analyse der $CD4^+$ T-Zellsubpopulationen, dargestellt in Abb. 34 A, fällt auf, dass $CD4^+Foxp3^+$ T-Zellen (T_{reg}) im Verlauf der 5-tägigen Dynabeads Pan Mouse Ig-vermittelten pCD28-Präsentation ein ähnlich proliferatives Verhalten wie $CD4^+Foxp3^-$ T-Zellen (T_{conv}) aufweisen. Die in Abb. 34 B tendenziell erkennbare ausgeprägtere proliferative Reaktion der T_{reg} auf Inkubation mit Antikörpern des Klons 4C8 erweist sich in der statistischen Auswertung in Abb. 34 C jedoch als nicht signifikant.

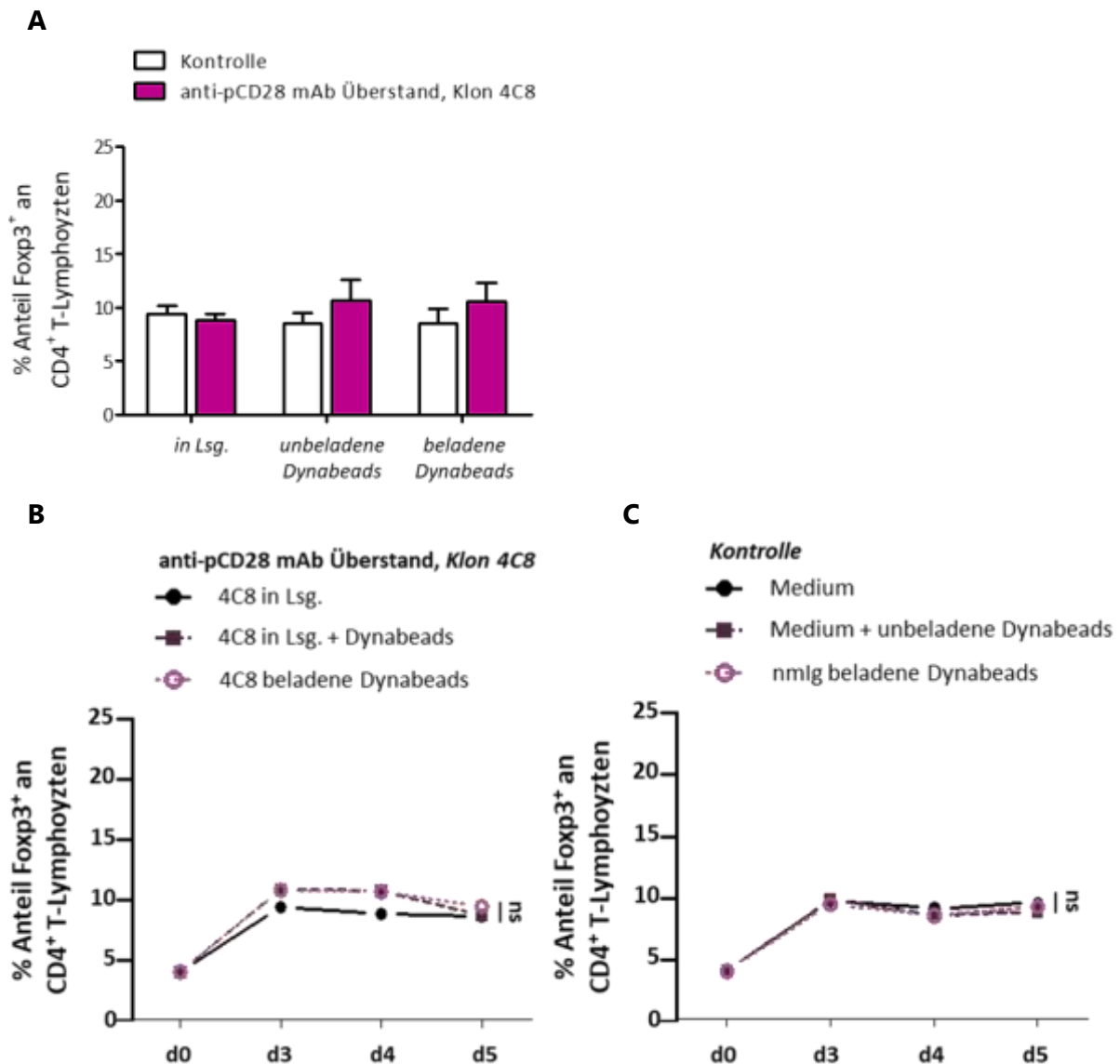


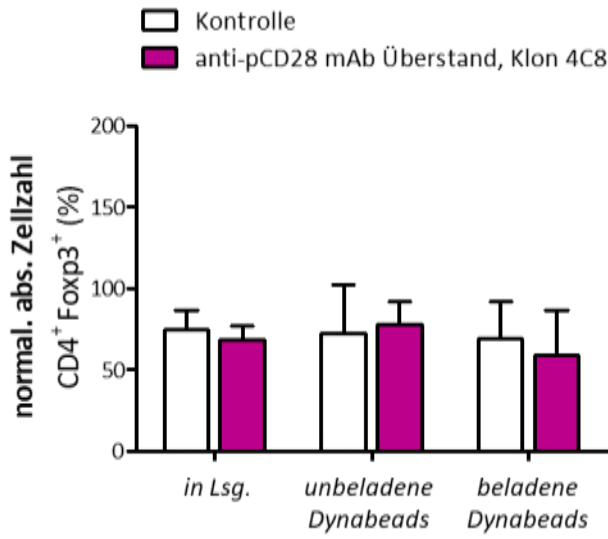
Abb. 35: Keine Zunahme des Anteils an CD4⁺ Foxp3⁺ T-Zellen an den CD4⁺ T-Zellen durch Stimulation mit anti-pCD28 mAb 4C8

(A) d5, Säulendiagramm mit Mittelwert und oberer Standardabweichung, one way ANOVA, $n=3$ (B, C) Liniendiagramm mit Mittelwert, d5, two way ANOVA, $n=3$.

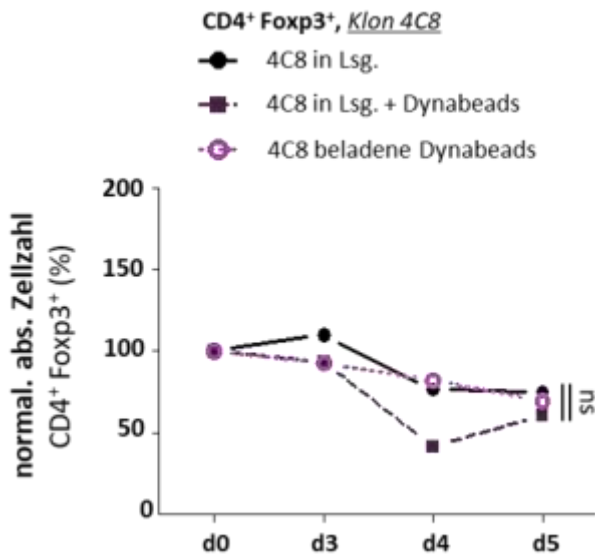
Als ebenfalls nicht signifikant erwies sich der Einfluss des anti-pCD28 mAb 4C8 in Lsg. oder gebunden an Dynabeads Pan Mouse Ig auf den prozentualen Anteil der CD4⁺ Foxp3⁺ T-Zellen (T_{reg}) an der CD4⁺ T-Zell-Gesamtpopulation nach 5-tägiger Inkubation (s. Abb. 35 A)

Die in Abb. 35 B und C beobachtete, fast identische prozentuale Zunahme des T_{reg} Zellanteils an der CD4⁺ T-Zellpopulation über die Zeit für die Inkubation in Medium und in Gegenwart von anti-pCD28 mAb, ist, wie aus Abb. 36 hervorgeht, auf eine unterschiedlich starke Abnahme der Foxp3⁺ und Foxp3⁻ Zellen zurückzuführen. Die gleichmäßige Abnahme der T_{conv} scheint dabei anti-pCD28 mAb unabhängig zu sein. Ursächlich für den Anstieg des T_{reg} Zellanteils ist somit eine allgemein gesteigerte Überlebensrate der T_{reg} verglichen mit T_{conv} in den in-vitro Kulturen.

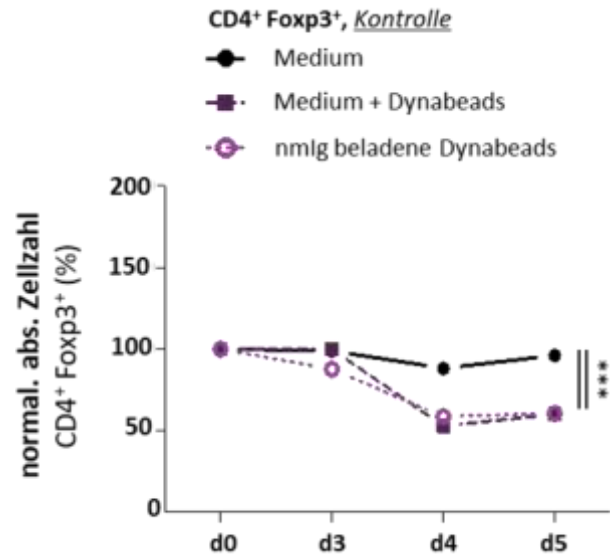
A



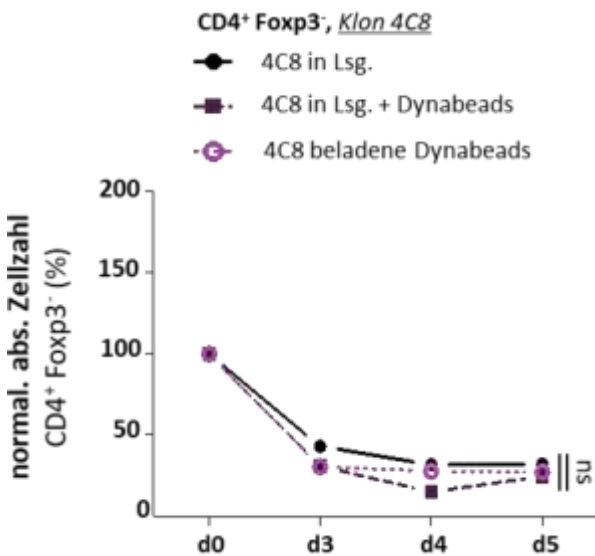
B



C



D



E

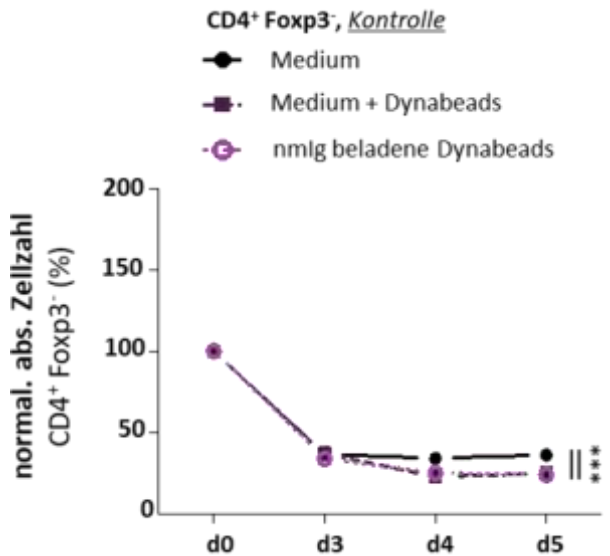


Abb. 36: Keine Zunahme der absoluten Zellzahl an CD4⁺Foxp3⁺ T-Zellen nach Stimulation mit anti-pCD28 mAb 4C8

Normalisierte CD4⁺ Foxp3⁺ und CD4⁺ Foxp3⁻ T-Zellzahl in Bezug auf 2x10⁵ isolierte Lymphozyten an Zellkulturtag d0 dargestellt (A) im Säulendiagramm mit Mittelwert und oberer Standardabweichung, d5, one-way ANOVA, n=3 bzw. (B-E) im Liniendiagramm mit Mittelwert, two-way ANOVA, d5, n=3

Beiden Populationen gemein ist jedoch der Umstand, dass es zur Zellzahlreduktion bei Inkubation mit Dynabeads Pan Mouse Ig kommt (s. Abb. 36 C+E). Mitunter verantwortlich hierfür sind mögliche Aggregatbildungen und Internalisierungsvorgänge, die aufgrund der 4C8 vermittelten Proliferation in Abb. 36 B+D maskiert sind.

4. Diskussion

Der kostimulatorische Rezeptor CD28 spielt eine bedeutende Rolle sowohl für die Aktivierung von T-Zellen im Allgemeinen als auch für die Aufrechterhaltung der zellulären Homöostase von regulatorischen T-Zellen im Speziellen. Durch die Bindung von CD28 an die Liganden B7.1 und B7.2 kommt es bei T-Zell-Aktivierung unter anderem, vermittelt durch die gesteigerte Expression und vermehrte mRNA-Stabilisierung von IL-2 und IL-2R, zur klonalen Expansion der T-Zellen. Im murinen und humanen System konnte zusätzlich gezeigt werden, dass eine alleinige Stimulation von T-Zellen mit CD28-SA ohne zusätzliches TZR-Signal zur gezielten klonalen Expansion regulatorischer T-Zellen führt.

Ziel dieser Arbeit war es, neben den Untersuchungen zur Expression und Funktion von CD28 im Großtiermodell Schwein auch selbst generierte Maus anti-Schwein pCD28 mAb auf ihre stimulatorischen Eigenschaften hin zu evaluieren.

In dieser Arbeit gelang es, in-vitro die Expression von pCD28 auf mRNA- und Proteinebene in $\alpha\beta$ T-Zellen der Milz von Dt. Landrasse Schlachttieren nachzuweisen. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass einige wenige der getesteten, spezifischen anti-pCD28 mAb mit kostimulatorischen Fähigkeiten auch direkt stimulatorisch auf $\alpha\beta$ T-Zellen wirken können.

4.1 Verwendung von Material Dt. Landrasse Schlachttiere

Zur Untersuchung der bisher wenig erforschten Funktion und Expression von CD28 im Schwein wurden in der vorliegenden Arbeit Milzen von Schlachttieren Dt. Landrasse Schweine verwendet. Das in der Tierverwertung als Abfallprodukt anfallende Organ konnte somit zusätzlich genutzt werden und ersparte folglich die Tötung von Tieren zu Zwecken der Grundlagenforschung.

Nachteilig hieran ist jedoch die fehlende Identifikationsmöglichkeit von möglichen Einflussfaktoren auf die Expression und Funktion von pCD28. Unbekannt sind bspw. Alter, Geschlecht, Aufzuchtort/ -art und -futter sowie Impfstatus, Erkrankungsgeschichte, immunologischer Status und verwandtschaftliche Verhältnisse der Tiere.

Aufgrund der extern durchgeführten Tötung der Tiere konnte zudem weder Einfluss auf die Schlachtung selbst noch auf die Dauer und Art des Transportvorgangs genommen werden.

Ein weiteres potenzielles Problem in der Verwendung von Dt. Landrasse Schweinen stellt der Umstand dar, dass zur Expressions- und Funktionsanalyse von pCD28 anti-pCD28 mAb verwendet wurden deren Generierung nicht auf Dt. Landrasse Schweinen, sondern auf dem CD28 Protein von Aachener Minischwein PBMCs sowie auf der CD28 cDNA von Wuzhishan Miniaturschweinen basiert.

Bei entsprechenden Sequenzunterschieden zwischen den Rassen wäre es somit möglich, dass die generierten anti-pCD28 mAb strukturell und funktionell bedeutsame Epitope von Dt. Landrasse Schweinen nicht abdecken könnten.

4.2 Expression und Funktion von CD28

4.2.1 CD28 mRNA Expression

Die CD28 mRNA Expression der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellpopulationen wurde zunächst mittels RT-PCR und dann mittels Prime Flow[®] auf Einzelzellebene untersucht. Aufgrund des hoch selektiven Isolations- und Gatingverfahrens belief sich der Anteil der Nicht-T-Zellen im Lifegate der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen auf ca. 2 %, sodass auf eine gesonderte Analyse der CD3⁻ Zellen mittels FACS-Sort und RT-PCR verzichtet wurde. Für die auf Einzelzellanalyse beruhende Methode des Prime Flow[®] findet sich hier jedoch angesichts des geringen CD3⁻ Zellanteils in den besagten Gates eine berechnete Anwendungsmöglichkeit.

In unseren Experimenten zeigte sich jedoch im Vergleich zu den üblichen FACS Färbemethoden, dass vermutlich aufgrund des Prime Flow[®] Verfahrens mit 2-tägiger Inkubation bei Temperaturen bis zu 40 °C die Färbung die uns zur Verfügung stehenden Fluorochrom-Konjugationen der anti-CD3 mAb keine überzeugenden Ergebnisse liefern können (nicht gezeigte Daten).

Bei den identifizierten Nicht-T-Zellen wird es sich zum Teil um porcine DCs und Monozyten gehandelt haben [265–268], die sich auf Grund mangelnder Differenzierbarkeit im FSC/ SSC nicht von Lymphozyten unterscheiden ließen. Bei der Mehrzahl der CD4⁻CD8⁻ Nicht-T-Zellen hingegen ist anzunehmen, dass diese Zellpopulation primär aus B-Zellen besteht, die literaturabhängig ca. 15 % - 30 % [269–271] der porcinen Lymphozyten in der Milz ausmacht.

Sowohl zur allgemeinen Vervollständigung der CD28 mRNA Expressionsanalyse als auch zur Bestätigung von CD28 als kostimulatorischen Rezeptor auf T-Zellen sollten zusätzlich NKT und $\gamma\delta$ T-Zellpopulationen sowie gezielt auch Nicht-T-Zellpopulationen, wie B-Zellen, Monozyten und DCs, mittels RT-PCR und Prime Flow[®] charakterisiert werden.

Für die weitere Charakterisierung von $\gamma\delta$ T-Zellen und $\gamma\delta$ T-Zellsubpopulationen würde sich, zusätzlich zu den bereits verwendeten anti-CD4 und anti-CD8 α mAb, bspw. der anti-CD2 Klon MSA4 sowie der anti- $\gamma\delta$ TZR Klon PGBL22A [240] eignen. Zur Charakterisierung der NK T-Zellen käme neben den bekannten Marker, CD2, CD3, CD4, CD5, CD8, CD6, CD11b und CD16 [272], auch der etwas neuere anti-NKp46 mAb in Betracht [273]. B-Zellen und B-Zellpopulationen wiederum könnten mittels anti-CD21 mAb Klon BB6-11C9.6, anti-IgM Klon PIG45A, anti-CD2 mAb Klon 1038H-5-37 [274; 275] identifiziert und in Hinblick auf CD28 Expression näher untersucht werden. Für eine sicherere Differenzierung von T_{mem} und T_{naiv} ist es des Weiteren anzuraten, zusätzlich zu den bereits verwendeten CD3, CD4, CD8 α Markern, weitere Marker, wie CD27, in das Färbepanel aufzunehmen.

4.2.2 CD28 Proteinexpression

Im Anschluss an die mRNA Expression konnte mittels der in der Zwischenzeit generierten CD28 mAb Überstände die Proteinexpression der T-Zellen näher beleuchtet werden. In der Analyse der CD28 Oberflächenproteinexpression konnten, anders als bspw. bei humanen T-Zellen [276] bekannt, keine eindeutig identifizierbaren CD28⁺ und CD28⁻ Populationen der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen bestimmt werden. Ursächlich hierfür war ein jeweils vollständiger Shift der zu untersuchenden Zellen bei Färbungen gegen CD28.

Technisch einwendbar wäre hier, dass zu dem Zeitpunkt der Charakterisierung der Großteil der Überstände noch nicht aufgereinigt worden war, sodass die Kontrollen leider ohne entsprechenden Kontrollantikörper und nur mit den verwendeten Sekundärantikörpern durchgeführt werden konnte. Anhand der bisherigen Färbungen ist dennoch eher davon auszugehen, wie in Abb. 26 A für CD4⁺ T-Zellen dargestellt, dass alle Zellen der CD4⁺ bzw. CD8⁺ T-Zellpopulationen das CD28 Oberflächenprotein exprimieren, die Expression jedoch unterschiedlich stark ausgeprägt ist.

Als letztlich definitiver Beweis der spezifischen Antikörperbindung der generierten anti-pCD28 mAb könnte eine Immunpräzipitation mit zusätzlicher Epitopkartierung durchgeführt werden. Für eine Kartierung kämen als Methode der Wahl die Röntgen-Kristallstrukturanalyse [277], die Kernspinresonanzspektroskopie [278], die Massenspektroskopie [279], das Phage-Display [280] oder die ortsgerechte Mutagenese [281] in Frage.

Wie bereits in 4.2.1 für die mRNA Expression angesprochen wären auch hier weitere Färbungen zur durchflusszytometrischen Charakterisierung der CD28 Proteinexpression von NKT und $\gamma\delta$ T-Zellpopulationen sowie von Nicht-T-Zellpopulationen, wie B-Zellen, Monozyten und DCs, nachzuholen. Erste Färbungen zur pCD28 Proteinexpression in NKT und $\gamma\delta$ T-Zellpopulationen wurden in der Zwischenzeit durch Saalmüller et al. durchgeführt (unveröffentlichte Daten).

4.2.3 CD28 Funktion

4.2.3.1 Bindung von pCD28 an B7 in xenogener MLR

In der xenogenen gemischten Lymphozytenreaktion (s. Abb. 28) konnte gezeigt werden, dass porcine T-Zellen zur Aktivierung eine Interaktion mit B7-Molekülen benötigen. Da hCTLA-4-Ig in der Lage ist, sowohl das Maus- als auch das porcine B7-Moleküle zu blockieren, kann folglich nicht ausgeschlossen werden, dass porcinen T-Zellen (pT-Zellen) auch durch Maus-APCs (mAPCs) aktiviert werden könnten. Letzteres könnte beispielsweise durch eine direkte Interaktion zwischen pT-Zellen und mAPCs (direkte Xenostimulation) oder auch durch Übertragung von mAPC Proteinen auf pAPC (indirekte Xenostimulation) erfolgt sein, wie es bereits für allogene MHC-Moleküle bekannt ist [282]. Zur Bestimmung, ob und inwieweit pCD28 mB7 im Vergleich zu pB7 binden kann, könnte bspw. das Hefe-zwei-Hybrid-System (Y2H), die Co-Immunopräzipitation (IP) [283] oder die bimolekulare Fluoreszenzkomplementation [284] angewendet werden. Dies würde zudem den direkten Nachweis der Bindung von pCD28 an pB7 erbringen.

4.2.3.2 Erhöhte Stimulierbarkeit von CD8⁺ T-Zellen im Vergleich zu CD4⁺

T-Zellen durch anti-CD3 mAb beladene Dynabeads Pan Mouse Ig

Eine erhöhte proliferative Aktivität wiesen CD8⁺ T-Zellen im Vergleich zu CD4⁺ T-Zellen in Versuchsansätzen zur Kostimulation in 3.3.1.2 bei alleiniger Inkubation mit anti-CD3 mAb beladene Dynabeads Pan Mouse Ig auf. Ein Umstand, der durchaus auch von humanen T-Zellen bekannt ist [285]. Aufschluss über den zugrundeliegenden Mechanismus und den Einfluss der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen aufeinander könnten vergleichende Untersuchungen zur TZR-Rezeptordichte [286], Internalisierungsassays [287] des TZR mittels Trypanblau-Quenching, TZR-vermittelte Zellaktivierungsstudien mittels Calcium Influx [288; 289] und Zellzyklusanalyse [290] sowie durchflusszytometrische Analysen der intrazellulären Zytokinexpression mittels Brefeldin A [291] und des NFkB- und NFAT-Signalwegs [292] liefern.

4.2.3.3 Unterschiedlich stimulierende Wirkung von anti-pCD28 mAb auf CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen

In den Versuchen zur Kostimulation (s. Abb. 29, Abb. 30) konnte beobachtet werden, dass CD4⁺ T-Zellen im Vergleich zu CD8⁺ T-Zellen sensibler, d.h. mit stärkerer Proliferation, auf anti-pCD28 mAb 3D11 reagieren. Dies wiederholte sich wiederum in den Versuchen zur direkten Stimulation (s. Abb. 31). Hier wurde jedoch in der Zusammenschau mit anderen anti-pCD28 mAb deutlich, dass CD4⁺ T-Zellen verglichen mit CD8⁺ T-Zellen nicht generell stärker stimuliert werden. Während die Klone 3F9, 4D12 und 4C8 nur CD4⁺ T-Zellen ansprechen, aktivieren die Klone 2A11, 2F12 und 5E8 dagegen nur CD8⁺ T-Zellen. Dies wiederum lässt die Frage aufkommen, ob die Epitope der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen, an welche die Klone binden, die selbe Lokalisation aufweisen und wenn ja, weshalb die gleiche Bindung zu unterschiedlich starken Aktivierungsmustern führt. Während sich eine unterschiedliche Lokalisation und die Art des Epitops mittels Epitopkartierung, wie bereits in 4.2.2 näher erwähnt, aufklären ließe, könnte die Analyse nachgeschalteter Signalwege, ähnlich wie in 4.2.3.2 für anti-CD3 mAb, Aufschluss über unterschiedliche Aktivierungsmuster geben.

4.2.3.4 Einfluss von anti-CD28 mAb auf CD4⁺ Subpopulationen

Aufgrund der im Durchflusszytometer veränderten Morphologie der Zellen nach Inkubation in aktivierenden Versuchsansätzen war es leider nicht mehr möglich, CD4⁺ T_{mem} und T_{naiv} allein anhand des Markers CD8α zu unterscheiden. Da aktivierungsbedingt vermutlich auch zusätzliche Marker, wie CD27, keine klare Differenzierung der Populationen gewährleisten können, sollten weitere Versuche zur Analyse der Zellproliferation mit sortierten CD4⁺ T_{mem} und T_{naiv} durchgeführt werden.

Bei Dynabeads Pan Mouse Ig vermittelter Präsentation von anti-pCD28 mAb 4C8 wiesen T_{reg} und T_{conv} in Abb. 34 eine deutliche Zunahme des Anteils proliferierender Zellen auf. Eine Abnahme der T_{conv} Zellzahl, wie in der Kontrolle in Abb. 36, konnte aber dennoch nicht dadurch verhindert werden. Eine Abnahme der gemessenen T_{conv} Zellzahl könnte unter anderem auch dadurch zustande kommen, dass T_{conv} durch eine intrazelluläre Aufnahme der Dynabeads Pan Mouse Ig eine veränderte Morphologie im Sideward-Scatter (SSC^{high}) aufweisen und somit aus dem Zellgate fallen. Anhand der aktuell vorliegenden Daten kann hierzu leider keine klare Aussage getroffen werden.

Bei T_{reg} scheint im Vergleich zur Kontrolle die Zellzahl nicht generell bereits durch in-vitro Inkubation, sondern vor allem aktivierungsbedingt abzunehmen. Da aber aufgrund der niedrigen anti-pCD28 mAb Konzentration in den Überständen und somit auch an den Dynabeads Pan Mouse Ig eher weniger von einem aktivierungsbedingten Zelltod durch Überstimulation auszugehen ist, sind andere Gründe hierfür in Betracht zu ziehen.

Besonders in Bezug auf T_{conv} gilt es herauszufinden, welche allgemeinen Überlebenssignale porcine T-Zellen für eine stabile in-vitro Kultur benötigen. Als geeigneter Marker scheint hier weniger die Proliferation, als vielmehr der Zelltod zu fungieren, der bspw. mittels Annexin V weiter untersucht werden könnte.

In Bezug auf T_{reg} gilt es zu klären, ob für eine primäre Aktivierung und eine kontinuierliche Stimulation möglicherweise unterschiedliche Konzentrationsschwellen an anti-pCD28 mAb bzw. unterschiedliche Stimuli erforderlich sind.

Dies könnte neben der intrazellulären Aufnahme von Dynabeads Pan Mouse Ig ein Erklärungsansatz dafür sein, weshalb porcine Zellen durch anti-pCD28 mAb Überstände zwar aktiviert, aber nach Aktivierung nur 1 bis 2 Zellteilungen durchflusszytometrisch gemessen werden können.

Daher sollten die bisherigen Versuche mit aufgereinigten Antikörpern der potenziell superagonistischen anti-pCD28 mAb 3F9, 4D12 und 4C8 in titrierter Form wiederholt werden. Bei keinerlei Hinweis auf eine superagonistische Funktion könnten die aufgereinigten anti-pCD28 mAb auch zusätzlich an Schweinen aus kontrollierten Schlacht- und Aufzuchtbedingungen sowie auf Grund des Antigenherstellungsmechanismus an Aachener Minischweinen getestet werden. Interessant wäre hierbei vor allem auch, der Einfluss der erwähnten Klone in Abhängigkeit von der verwendeten Konzentration auf die inhibitorischen Eigenschaften der T_{reg} (Subpopulationen) und die Stabilität ihres jeweiligen Phänotyps. Experimente hierzu erfolgten in der Zwischenzeit durch Beyersdorf et al. (unveröffentlichte Daten).

In Bezug auf erforderliche Stimuli konnten beispielsweise Langenhorst et al. erst kürzlich für humane und Maus- T_{reg} zeigen, dass eine Blockade der T_{reg} -Interaktion mit MHC II-Molekülen bei Inkubation mit CD28-SA zu einem signifikanten Abfall der Zellproliferation führt [293].

4.3 Ausstehende weitere Charakterisierung von pCD28

Analysiert wurden bisher in dieser Arbeit die mRNA und Proteinexpression sowie die Funktion von pCD28 in CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen. Zur vollständigen Charakterisierung von pCD28 in Bezug auf T-Zellen gilt es daher, zusätzlich auch NKT und $\gamma\delta$ T-Zellen zu untersuchen. Letztere stellen mit ca. 15 % bis 30 % einen bedeutenden Anteil der porcinen Lymphozyten dar [294]. Des Weiteren ist zu ermitteln, inwieweit die Expression und das Ausmaß der Funktion von pCD28 in Abhängigkeit von weiteren Faktoren wie Alter, Geschlecht und Immunstatus stehen könnte und ob pCD28 ggf. auch in anderen Zellen exprimiert wird. Von besonderem Interesse wäre hierbei vor allem die Funktion von pCD28 in Nicht-T-Zellen.

Dass CD28 auch in Nicht-T-Zellen exprimiert werden kann, ist beispielsweise schon seit längerem für humane Plasmazellen bekannt [295]. Hier scheint das CD28 Molekül vor allem für das Überleben der Plasmazellen und deren Antikörperproduktion von Bedeutung zu sein [296].

4.4 (Prä-)klinische Bedeutung der anti-pCD28 mAb

Sollte sich in der Wiederholung der bisherigen Experimente mit aufgereinigten anti-pCD28 mAb der Klone 3F9, 4C8 und 4D12 gemäß den Ansätzen in 4.2.3.4 doch eine superagonistische Funktion der genannten Klone herauskristallisieren, so ermöglichte dies den präklinischen Transfer von CD28-SA basierenden Therapiestrategien gemäß 1.2.8 in das Großtiermodell.

Im Falle einer positiven superagonistischen Funktionstestung sollte jedoch auch bedacht werden, inwieweit die Maus anti-Schwein mAb für eine entsprechende in-vivo Anwendung biotechnologisch an das Schwein angepasst werden müssten, um ähnlich wie beim Menschen eine Immunreaktion gegen die xenogenen Antikörper zu vermeiden. Dies ist dabei vor allem für die wiederholte Gabe der mAb von Bedeutung [297; 298].

Von besonderer Bedeutung wäre der Schritt zur Testung im Großtier vor allem für das Voranbringen therapeutischer Maßnahmen zur Verbesserung der postinfarziellen myokardialen Wundheilung. Bei erfolgreichem Bestehen der präklinischen Testung im Klein- und Großtiermodell könnte somit die Zulassung zur klinischen Testung beantragt werden.

In verschiedenen Phasen der klinischen Testung wird Theralizumab, ein humanisierter hCD28-SA, bereits im Rahmen der rheumatischen Arthritis [299], des systemischen Lupus erythematoses [300] sowie für solide Tumore [301] bereits eingesetzt und stünde somit für eine klinische Testung bei Myokardinfarkt bereits zur Verfügung.

5. Zusammenfassung/ Summary

Zusammenfassung

Trotz zahlreicher Fortschritte im Verständnis der Funktionsweise des kostimulatorischen Rezeptors CD28 in Mensch, Maus, Ratte und Makake ist nach wie vor wenig hierüber in Bezug auf das Tiermodell Schwein bekannt. Die vorliegende Arbeit untersucht die Funktion und Expression von CD28 in Schweine-T-Zellen sowie die Regulierbarkeit der T-Zellaktivierung durch anti-pCD28 mAb. Die Ergebnisse zeigen, dass hierbei vor allem CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen differenziert betrachtet werden müssen. Grundsätzlich unterscheiden sich die beiden T-Zellpopulationen in der CD28 mRNA Expression, im Expressionsverhältnis zwischen CD28 mRNA und Protein, sowie im proliferativen Ansprechen auf anti-pCD28mAb. So reagierten CD4⁺ im Vergleich zu CD8⁺ T-Zellen auf die kostimulatorische Inkubation mit anti-pCD28 mAb des Klons 3D11 sensibler. In direkt stimulatorischen Ansätzen zeigte sich, dass CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen durch unterschiedliche anti-pCD28 mAb differentiell angesprochen werden können. Eine superagonistische Funktion konnte für CD4⁺ T-Zell aktivierende anti-pCD28 mAb in den bisherigen Versuchen noch nicht beobachtet werden. Letzteres ist hierbei vor allem für den Transfer von vielversprechenden Therapiestrategien vom Kleintier- zum Großtiermodell auf dem Weg zur Entwicklung neuer Therapieoptionen für Autoimmunerkrankungen, Erkrankungen mit starker proinflammatorischer Aktivität und dem Myokardinfarkt von Bedeutung.

Summary

Even though tremendous progress has been made in clarifying the function of the costimulatory receptor CD28 in human, mouse, rat, and macaques, concerning pigs, an important large animal model, only little is still known about CD28 expression and function. Therefore, our work aimed at investigating the function and expression of CD28 in porcine T cells as well as the applicability of anti-pCD28 mAb as a tool to regulate T cell activation, specifically. Our results indicate that the two major T cell groups, CD4⁺ and CD8⁺, have to be considered separately. These cell populations differ in their level of pCD28 mRNA expression, their ratio of CD28 mRNA and protein expression as well as their proliferative responsiveness towards anti-pCD28 mAb. In costimulatory assays, CD4⁺ compared to CD8⁺ T cells showed higher sensitivity toward low concentrations of the anti-pCD28 mAb 3D11. Additionally, in direct stimulatory assays, CD4⁺ and CD8⁺ T cells can be specifically targeted by different anti-pCD28 mAb. With these assays, a superagonistic anti-pCD28 mAb could not be detected so far. With anti-pCD28 superagonist, promising therapeutic strategies developed in rodents could be tested in pigs as a large animal model, representing the next step on the way towards new therapeutic options for autoimmune diseases, diseases with strong proinflammatory activity and myocardial infarction.

6. Literaturverzeichnis

- [1] Lee, K., et al., *History of burns: The past, present and the future*. Burns Trauma, 2014, 2(4): p. 169–180.
- [2] McAninch, E., et al., *The History and Future of Treatment of Hypothyroidism*. Ann Intern Med, 2016, 164(1): p. 50–56.
- [3] Jonklaas, J., et al., Guidelines for the treatment of hypothyroidism: prepared by the american thyroid association task force on thyroid hormone replacement. Thyroid, 2014, 24(12): p. 1670–1751.
- [4] Dayan, C., et al., Management of hypothyroidism with combination thyroxine (T4) and triiodothyronine (T3) hormone replacement in clinical practice: a review of suggested guidance. Thyroid Res, 2018, 11(1): p. 246.
- [5] Crasto, W., (2016), *Handbook of Insulin Therapies*. Springer International Publishing: Cham.
- [6] Häring, H.-U., et al., (2011), *Diabetologie in Klinik und Praxis*. 6. Aufl. Georg Thieme Verlag KG: s.l.
- [7] Hürter, P., et al., (2006), *Diabetes bei Kindern und Jugendlichen: Grundlagen - Klinik - Therapie*. 6th ed. Springer: Dordrecht.
- [8] White, J., A Brief History of the Development of Diabetes Medications. Diabetes Spectr, 2014, 27(2): p. 82–86.
- [9] Hilgenfeld, R., et al., The evolution of insulin glargine and its continuing contribution to diabetes care. Drugs, 2014, 74(8): p. 911–927.
- [10] Baeshen, N., et al., *Cell factories for insulin production*. Microb Cell Fact, 2014, 13: p. 141.
- [11] Ziemer, G., et al., (2010), *Herzchirurgie. Die Eingriffe am Herzen und den herznahen Gefäßen*. 3., völlig neu bearbeitete Auflage. Springer-Verlag Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg.
- [12] Yap, K., et al., *Aortic valve replacement: is porcine or bovine valve better?* Interact Cardiovasc Thorac Surg, 2013, 16(3): p. 361–373.
- [13] Reineke, D., et al., *Mechanical versus biological aortic valve replacement strategies*. Expert Rev Cardiovasc Ther, 2016, 14(4): p. 423–430.
- [14] Gupta, B., et al., Systemic Semilunar Valve Replacement in Pediatric Patients Using a Porcine, Full-Root Bioprosthesis. Ann Thorac Surg, 2015, 100(2): p. 599–605.
- [15] Chester, D., et al., *Skin and skin substitutes in burn management*. Trauma, 2004, 6(2): p. 87–99.
- [16] Greenwood, J., et al., Experience With Biobrane: Uses and Caveats for Success. Eplasty, 2009, 9.
- [17] Vogt, P., (2011), *Praxis der Plastischen Chirurgie. Plastisch-rekonstruktive Operationen - Plastisch-ästhetische Operationen - Handchirurgie - Verbrennungschirurgie*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg.
- [18] Rogers, A., et al., The use of Biobrane® for wound coverage in Stevens-Johnson Syndrome and Toxic Epidermal Necrolysis. Burns, 2017, 43(7): p. 1464–1472.

- [19] Flisikowska, T., et al., *Genetically modified pigs to model human diseases*. J Appl Genet, 2014, 55(1): p. 53–64.
- [20] Stricker-Krongrad, A., et al., *The Miniature Swine as a Model in Experimental and Translational Medicine*. Toxicol Pathol, 2016, 44(4): p. 612–623.
- [21] Chen, W., et al., Laparoscopic Partial Nephrectomy with a Remotely Activated Bulldog Clamp in a Pig Model. J Endourol, 2017, 31(1): p. 66–71.
- [22] Mbaidjol, Z., et al., Endoluminal laser-assisted vascular anastomosis-an in vivo study in a pig model. Lasers Med Sci, 2017, 32(6): p. 1343–1348.
- [23] Hubbard, L., et al., Comprehensive Assessment of Coronary Artery Disease by Using First-Pass Analysis Dynamic CT Perfusion: Validation in a Swine Model. Radiology, 2018, 286(1): p. 93–102.
- [24] McGuire, J., et al., Utilization of MRI for Cerebral White Matter Injury in a Hypobaric Swine Model-Validation of Technique. Mil Med, 2017, 182(5): p. e1757-e1764.
- [25] Yamasaki, A., et al., Osteochondral regeneration using constructs of mesenchymal stem cells made by bio three-dimensional printing in mini-pigs. J Orthop Res, 2018.
- [26] Iwatsuki-Horimoto, K., et al., The Microminipig as an Animal Model for Influenza A Virus Infection. J Virol, 2017, 91(2).
- [27] Rajao, D., et al., Swine as a model for influenza A virus infection and immunity. ILAR J, 2015, 56(1): p. 44–52.
- [28] Boettcher, A., et al., Development of Severe Combined Immunodeficient (SCID) Pig Models for Translational Cancer Modeling: Future Insights on How Humanized SCID Pigs Can Improve Preclinical Cancer Research. Front Oncol, 2018, 8: p. 559.
- [29] Callesen, M., et al., *A genetically inducible porcine model of intestinal cancer*. Mol Oncol, 2017, 11(11): p. 1616–1629.
- [30] Duran-Struuck, R., et al., Miniature Swine as a Clinically Relevant Model of Graft-Ver-sus-Host Disease. Comp Med, 2015, 65(5): p. 429–443.
- [31] Vela, F.-J., et al., Evaluation of antigen-induced synovitis in a porcine model: Immunological, arthroscopic and kinetic studies. BMC Vet Res, 2017, 13(1): p. 93.
- [32] Beraldi, R., et al., Genetic ataxia telangiectasia porcine model phenocopies the multisystemic features of the human disease. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis, 2017, 1863(11): p. 2862–2870.
- [33] Cui, D., et al., Generation of a miniature pig disease model for human Laron syndrome. Sci Rep, 2015, 5: 15603.
- [34] Kluttig, R., et al., Invasive Hemodynamic Monitoring of Aortic and Pulmonary Artery Hemodynamics in a Large Animal Model of ARDS. J Vis Exp, 2018(141).
- [35] Leshem, E., et al., Evaluation of ablation catheter technology: Comparison between thigh preparation model and an in vivo beating heart. Heart Rhythm, 2017, 14(8): p. 1234–1240.
- [36] Abouna, G., *Organ shortage crisis. Problems and possible solutions*. Transplant Proc, 2008, 40(1): p. 34–38.
- [37] Manji, R., et al., *Xenograft bioprosthetic heart valves. Past, present and future*. Int J Surg, 2015, 23(Pt B): p. 280–284.

- [38] Ekser, B., et al., *Xenotransplantation of solid organs in the pig-to-primate model*. *Transpl Immunol*, 2009, 21(2): p. 87–92.
- [39] Yamamoto, T., et al., *Skin xenotransplantation: Historical review and clinical potential*. *Burns*, 2018, 44(7): p. 1738–1749.
- [40] Shi, Y., et al., *Comprehensive evaluation of decellularized porcine corneal after clinical transplantation*. *Xenotransplantation*, 2017, 24(6).
- [41] Salamanca, E., et al., *Bone regeneration using a porcine bone substitute collagen composite in vitro and in vivo*. *Sci Rep*, 2018, 8(1): p. 984.
- [42] Cooper, D., *A brief history of cross-species organ transplantation*. *Proc (Bayl Univ Med Cent)*, 2012, 25(1): p. 49–57.
- [43] Cowan, P., et al., *Xenogeneic transplantation and tolerance in the era of CRISPR-Cas9*. *Curr Opin Organ Transplant*, 2019, 24(1): p. 5–11.
- [44] Iwase, H., et al., *Current status of pig kidney xenotransplantation*. *Int J Surg*, 2015, 23: p. 229–233.
- [45] Wijkstrom, M., et al., *Renal xenotransplantation. Experimental progress and clinical prospects*. *Kidney Int*, 2017, 91(4): p. 790–796.
- [46] Yamada, K., et al., *Tolerance in xenotransplantation*. *Curr Opin Organ Transplant*, 2017, 22(6): p. 522–528.
- [47] Singh, A., et al., *CD4+CD25Hi FoxP3+ regulatory T cells in long-term cardiac xenotransplantation*. *Xenotransplantation*, 2018, 25(2): e12379.
- [48] Lee, R., et al., *Blockade of CD28-B7, but not CD40-CD154, prevents costimulation of allogeneic porcine and xenogeneic human anti-porcine T cell responses*. *The Journal of Immunology*, 2000, 164(6): p. 3434–3444.
- [49] Wu, G., et al., *Co-stimulation blockade targeting CD154 and CD28/B7 modulates the induced antibody response after a pig-to-baboon cardiac xenograft*. *Xenotransplantation*, 2005, 12(3): p. 197–208.
- [50] Yatim, K., et al., *A brief journey through the immune system*. *Clin J Am Soc Nephrol*, 2015, 10(7): p. 1274–1281.
- [51] Namm, J., et al., *B lymphocytes as effector cells in the immunotherapy of cancer*. *J Surg Oncol*, 2012, 105(4): p. 431–435.
- [52] Parra, D., et al., *Evolution of B cell immunity*. *Annu Rev Anim Biosci*, 2013, 1: p. 65–97.
- [53] Miller, J., *Cellular basis of the immune response*. *Acta Endocrinol Suppl (Copenh)*, 1975, 194: p. 55–76.
- [54] Bournazos, S., et al., *Diversification of IgG effector functions*. *International Immunology*, 2017, 29(7): p. 303–310.
- [55] Chen, K., et al., *New insights into the enigma of immunoglobulin D*. *Immunol Rev*, 2010, 237(1): p. 160–179.
- [56] Preud'homme, J.-L., et al., *Structural and functional properties of membrane and secreted IgD*. *Mol Immunol*, 2000, 37(15): p. 871–887.
- [57] Ishizaka, K., et al., *Identification of IgE*. *J Allergy Clin Immunol*, 2016, 137(6): p. 1646–1650.

- [58] Stone, K., et al., *IgE, mast cells, basophils, and eosinophils*. J Allergy Clin Immunol, 2010, 125(2 Suppl 2)S73-80.
- [59] Boes, M., Role of natural and immune IgM antibodies in immune responses. Mol Immunol, 2000, 37(18): p. 1141–1149.
- [60] Woof, J., et al., *The function of immunoglobulin A in immunity*. J Pathol, 2006, 208(2): p. 270–282.
- [61] Schroeder, H., et al., *Structure and function of immunoglobulins*. J Allergy Clin Immunol, 2010, 125(2 Suppl 2)S41-52.
- [62] Feige, M., et al., *How antibodies fold*. Trends Biochem Sci, 2010, 35(4): p. 189–198.
- [63] Sela-Culang, I., et al., *The structural basis of antibody-antigen recognition*. Front Immunol, 2013, 4: p. 302.
- [64] Rock, K., Antigen presentation by hapten-specific B lymphocytes. I. Role of surface immunoglobulin receptors. J Exp Med, 1984, 160(4): p. 1102–1113.
- [65] Lanzavecchia, A., *Antigen-specific interaction between T and B cells*. Nature, 1985, 314(6011): p. 537–539.
- [66] Reth, M., *Antigen receptors on B lymphocytes*. Annu Rev Immunol, 1992, 10: p. 97–121.
- [67] Kurosaki, T., *Genetic analysis of B cell antigen receptor signaling*. Annu Rev Immunol, 1999, 17: p. 555–592.
- [68] Malhotra, S., et al., B cell antigen receptor endocytosis and antigen presentation to T cells require Vav and dynamin. J Biol Chem, 2009, 284(36): p. 24088–24097.
- [69] Simon, A., et al., Evolution of the immune system in humans from infancy to old age. Proc Biol Sci, 2015, 282(1821).
- [70] Manickasingham, S., et al., *Mature T cell seeks antigen for meaningful relationship in lymph node*. Immunology, 2001, 102(4): p. 381–386.
- [71] Cardamone, C., et al., Mast cells as effector cells of innate immunity and regulators of adaptive immunity. Immunol Lett, 2016, 178: p. 10–14.
- [72] Kambayashi, T., et al., Atypical MHC class II-expressing antigen-presenting cells: can anything replace a dendritic cell? Nature Reviews Immunology, 2014, 14719 EP -.
- [73] Iwasaki, A., et al., *Control of adaptive immunity by the innate immune system*. Nature Immunology, 2015, 16(4): p. 343–353.
- [74] Engel, P., et al., CD Nomenclature 2015: Human Leukocyte Differentiation Antigen Workshops as a Driving Force in Immunology. J Immunol, 2015, 195(10): p. 4555–4563.
- [75] Basu, R., et al., *Mechanical Communication at the Immunological Synapse*. Trends Cell Biol, 2017, 27(4): p. 241–254.
- [76] Dustin, M., *The immunological synapse*. Cancer Immunol Res, 2014, 2(11): p. 1023–1033.
- [77] Chen, L., et al., *Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition*. Nature Reviews Immunology, 2013, 13227 EP -.

- [78] Alegre, M., et al., *T-cell regulation by CD28 and CTLA-4*. Nat Rev Immunol, 2001, 1(3): p. 220–228.
- [79] Birnbaum, M., et al., *Molecular architecture of the $\alpha\beta$ T cell receptor-CD3 complex*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014, 111(49): p. 17576–17581.
- [80] Artyomov, M., et al., *CD4 and CD8 binding to MHC molecules primarily acts to enhance Lck delivery*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010, 107(39): p. 16916–16921.
- [81] Schwartz, R., *A cell culture model for T lymphocyte clonal anergy*. Science, 1990, 248(4961): p. 1349–1356.
- [82] Green, D., et al., *Activation-induced cell death in T cells*. Immunol Rev, 2003, 193: p. 70–81.
- [83] Harding, F., et al., *CD28-mediated signalling co-stimulates murine T cells and prevents induction of anergy in T-cell clones*. Nature, 1992, 356(6370): p. 607–609.
- [84] Greenfield, E., et al., *CD28/B7 costimulation: a review*. Crit Rev Immunol, 1998, 18(5): p. 389–418.
- [85] Truneh, A., et al., *Differential recognition by CD28 of its cognate counter receptors CD80 (B7.1) and B70 (B7.2): analysis by site directed mutagenesis*. Mol Immunol, 1996, 33(3): p. 321–334.
- [86] Umlauf, S., et al., *Regulation of interleukin 2 gene expression by CD28 costimulation in mouse T-cell clones: both nuclear and cytoplasmic RNAs are regulated with complex kinetics*. Mol Cell Biol, 1995, 15(6): p. 3197–3205.
- [87] Toyooka, K., et al., *CD28 co-stimulatory signals induce IL-2 receptor expression on antigen-stimulated virgin T cells by an IL-2-independent mechanism*. International Immunology, 1996, 8(2): p. 159–169.
- [88] Appleman, L., et al., *CD28 costimulation mediates T cell expansion via IL-2-independent and IL-2-dependent regulation of cell cycle progression*. J Immunol, 2000, 164(1): p. 144–151.
- [89] Gallagher, R., et al., *Studies on the accessory requirement for T lymphocyte activation by concanavalin A*. Clin Exp Immunol, 1986, 66(1): p. 118–125.
- [90] Trickett, A., et al., *T cell stimulation and expansion using anti-CD3/CD28 beads*. Journal of Immunological Methods, 2003, 275(1-2): p. 251–255.
- [91] Lindsten, T., et al., *Characterization of CTLA-4 structure and expression on human T cells*. J Immunol, 1993, 151(7): p. 3489–3499.
- [92] Buonavista, N., et al., *Molecular linkage of the human CTLA4 and CD28 Ig-superfamily genes in yeast artificial chromosomes*. Genomics, 1992, 13(3): p. 856–861.
- [93] Naluai, A., et al., *The CTLA4/CD28 gene region on chromosome 2q33 confers susceptibility to celiac disease in a way possibly distinct from that of type 1 diabetes and other chronic inflammatory disorders*. Tissue Antigens, 2000, 56(4): p. 350–355.
- [94] Balzano, C., et al., *CTLA-4 and CD28: similar proteins, neighbouring genes*. Int J Cancer Suppl, 1992, 7: p. 28–32.
- [95] Dennehy, K., et al., *Cutting edge: monovalency of CD28 maintains the antigen dependence of T cell costimulatory responses*. J Immunol, 2006, 176(10): p. 5725–5729.

- [96] Walunas, T., et al., *CTLA-4 ligation blocks CD28-dependent T cell activation*. J Exp Med, 1996, 183(6): p. 2541–2550.
- [97] Brunner, M., et al., *CTLA-4-Mediated inhibition of early events of T cell proliferation*. The Journal of Immunology, 1999, 162(10): p. 5813–5820.
- [98] Collins, A., et al., The interaction properties of costimulatory molecules revisited. Immunity, 2002, 17(2): p. 201–210.
- [99] Perkins, D., et al., *Regulation of CTLA-4 expression during T cell activation*. J Immunol, 1996, 156(11): p. 4154–4159.
- [100] Takahashi, T., et al., Immunologic Self-Tolerance Maintained by Cd25+Cd4+Regulatory T Cells Constitutively Expressing Cytotoxic T Lymphocyte–Associated Antigen 4. J Exp Med, 2000, 192(2): p. 303–310.
- [101] Jain, N., et al., Dual function of CTLA-4 in regulatory T cells and conventional T cells to prevent multiorgan autoimmunity. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010, 107(4): p. 1524–1528.
- [102] Bluestone, J., et al., *CTLA4lg: bridging the basic immunology with clinical application*. Immunity, 2006, 24(3): p. 233–238.
- [103] Langford, C., et al., A randomized, double-blind trial of Abatacept (CTLA4-Ig) for the treatment of giant cell arteritis. Arthritis Rheumatol, 2017, 69(4): p. 837–845.
- [104] Blair, H., et al., *Abatacept: A Review in Rheumatoid Arthritis*. Drugs, 2017, 77(11): p. 1221–1233.
- [105] Lubrano, E., et al., *Abatacept for the treatment of psoriatic arthritis*. Expert Rev Clin Immunol, 2018, 14(11): p. 899–905.
- [106] Podojil, J., et al., Targeting the B7 family of co-stimulatory molecules: successes and challenges. BioDrugs, 2013, 27(1): p. 1–13.
- [107] Xu, Z., et al., Affinity and cross-reactivity engineering of CTLA4-Ig to modulate T cell costimulation. J Immunol, 2012, 189(9): p. 4470–4477.
- [108] Lenschow, D., et al., Long-term survival of xenogeneic pancreatic islet grafts induced by CTLA4Ig. Science, 1992, 257(5071): p. 789–792.
- [109] Buch, M., et al., Abatacept reduces disease activity and ultrasound power Doppler in ACPA-negative undifferentiated arthritis: a proof-of-concept clinical and imaging study. Rheumatology (Oxford), 2017, 56(1): p. 58–67.
- [110] Shah, D., et al., *An overview of the intrathymic intricacies of T cell development*. J Immunol, 2014, 192(9): p. 4017–4023.
- [111] Yang, Q., et al., *T-cell lineage determination*. Immunol Rev, 2010, 238(1): p. 12–22.
- [112] Bassing, C., et al., The Mechanism and Regulation of Chromosomal V(D)J Recombination. Cell, 2002, 109(2):S45–S55.
- [113] Ciofani, M., et al., *Determining $\gamma\delta$ versus $\alpha\beta$ T cell development*. Nat Rev Immunol, 2010, 10(9): p. 657–663.
- [114] Ciofani, M., et al., Stage-specific and differential notch dependency at the alphabeta and gammadelta T lineage bifurcation. Immunity, 2006, 25(1): p. 105–116.

- [115] Starr, T., et al., *Positive and negative selection of T cells*. Annu Rev Immunol, 2003, 21: p. 139–176.
- [116] Ciofani, M., et al., *The thymus as an inductive site for T lymphopoiesis*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2007, 23: p. 463–493.
- [117] Klein, L., et al., Positive and negative selection of the T cell repertoire. What thymocytes see (and don't see). Nat Rev Immunol, 2014, 14(6): p. 377–391.
- [118] Bendelac, A., et al., *The biology of NKT cells*. Annu Rev Immunol, 2007, 25: p. 297–336.
- [119] Hsieh, C.-S., et al., *Selection of regulatory T cells in the thymus*. Nat Rev Immunol, 2012, 12(3): p. 157–167.
- [120] Klein, L., et al., Central CD4+ T cell tolerance: deletion versus regulatory T cell differentiation. Nature Reviews Immunology, 2019, 19(1): p. 7–18.
- [121] van den Broek, T., et al., *The full spectrum of human naive T cells*. Nature Reviews Immunology, 2018, 18(6): p. 363–373.
- [122] Pipkin, M., et al., *SnapShot: effector and memory T cell differentiation*. Cell, 2009, 138(3)606.e1-2.
- [123] Ivanov, S., et al., Role of non-conventional T lymphocytes in respiratory infections: the case of the pneumococcus. PLoS Pathog, 2014, 10(10)e1004300.
- [124] Godfrey, D., et al., *The burgeoning family of unconventional T cells*. Nature Immunology, 2015, 16(11): p. 1114–1123.
- [125] Lepore, M., et al., *The Conventional Nature of Non-MHC-Restricted T Cells*. Front Immunol, 2018, 9: 1365.
- [126] Schattgen, S., et al., Bohemian T cell receptors: sketching the repertoires of unconventional lymphocytes. Immunol Rev, 2018, 284(1): p. 79–90.
- [127] Gaspari, A., et al., (2008), *Clinical and Basic Immunodermatology*. Springer London: London.
- [128] Trottein, F., et al., Natural Killer T Cells and Mucosal-Associated Invariant T Cells in Lung Infections. Front Immunol, 2018, 9: p. 1750.
- [129] Corthay, A., *How do regulatory T cells work?* Scand J Immunol, 2009, 70(4): p. 326–336.
- [130] Alderson, K., et al., Regulatory and Conventional CD4+ T cells Show Differential Effects Correlating with PD-1 and B7-H1 Expression After Immunotherapy. J Immunol, 2008, 180(5): p. 2981–2988.
- [131] Wolf, K., et al., Conventional and Regulatory CD4+ T Cells That Share Identical TCRs Are Derived from Common Clones. PLoS ONE, 2016, 11(4)e0153705.
- [132] Kim, E., et al., *Innate T cells in the intensive care unit*. Mol Immunol, 2019, 105: p. 213–223.
- [133] Kambayashi, T., et al., Atypical MHC class II-expressing antigen-presenting cells: can anything replace a dendritic cell? Nature Reviews Immunology, 2014, 14: p. 719–730.
- [134] Boyman, O., et al., The role of interleukin-2 during homeostasis and activation of the immune system. Nature Reviews Immunology, 2012, 12: p. 180-190.

- [135] Neumann, J., (2008), *Immunbiologie. Eine Einführung*. Springer: Berlin.
- [136] Malek, T., et al., *Tolerance, not immunity, crucially depends on IL-2*. Nature Reviews Immunology, 2004, 4: p. 665–674.
- [137] Ricordi, C., et al., *Clinical islet transplantation: advances and immunological challenges*. Nat Rev Immunol, 2004, 4(4): p. 259–268.
- [138] Akdis, M., et al., TH17 and TH22 cells: a confusion of antimicrobial response with tissue inflammation versus protection. J Allergy Clin Immunol, 2012, 129(6): p. 1438–1449.
- [139] Martinez-Sanchez, M., et al., Role of Cytokine Combinations on CD4+ T Cell Differentiation, Partial Polarization, and Plasticity: Continuous Network Modeling Approach. Front Physiol, 2018, 9: p. 877.
- [140] Caza, T., et al., *Functional and Phenotypic Plasticity of CD4(+) T Cell Subsets*. Biomed Res Int, 2015, 2015: p. 521957.
- [141] Geginat, J., et al., *Plasticity of human CD4 T cell subsets*. Front Immunol, 2014, 5: p. 630.
- [142] Murphy, K., et al., Effector T cell plasticity: flexibility in the face of changing circumstances. Nature Immunology, 2010, 11674 EP -.
- [143] Zhou, L., et al., *Plasticity of CD4+ T cell lineage differentiation*. Immunity, 2009, 30(5): p. 646–655.
- [144] Luckheeram, R., et al., *CD4+T cells: differentiation and functions*. Clin Dev Immunol, 2012, 2012: p. 925135.
- [145] Zhu, J., et al., *Differentiation of effector CD4 T cell populations (*)*. Annu Rev Immunol, 2010, 28: p. 445–489.
- [146] Zhu, J., *T Helper Cell Differentiation, Heterogeneity, and Plasticity*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2018, 10(10).
- [147] Wang, B., et al., *Multiple Paths for Activation of Naive CD8+ T Cells: CD4-Independent Help*. The Journal of Immunology, 2001, 167(3): p. 1283–1289.
- [148] Lunsford, K., et al., Activation and maturation of alloreactive CD4-independent, CD8 cytolytic T cells. Am J Transplant, 2006, 6(10): p. 2268–2281.
- [149] Edwards, L., et al., Phenotype and function of protective, CD4-independent CD8 T cell memory. Immunol Res, 2013, 55(1-3): p. 135–145.
- [150] Zhai, Y., et al., Activation of Alloreactive CD8+ T Cells Operates Via CD4-Dependent and CD4-Independent Mechanisms and Is CD154 Blockade Sensitive. The Journal of Immunology, 2003, 170(6): p. 3024–3028.
- [151] Bennett, S., et al., Help for cytotoxic-T-cell responses is mediated by CD40 signalling. Nature, 1998, 393478 EP -.
- [152] Schoenberger, S., et al., T-cell help for cytotoxic T lymphocytes is mediated by CD40–CD40L interactions. Nature, 1998, 393480 EP -.
- [153] Shedlock, D., et al., Requirement for CD4 T cell help in generating functional CD8 T cell memory. Science, 2003, 300(5617): p. 337–339.
- [154] Janssen, E., et al., CD4+ T cells are required for secondary expansion and memory in CD8+ T lymphocytes. Nature, 2003, 421852 EP -.

- [155] Novy, P., et al., CD4 T cells are required for CD8 T cell survival during both primary and memory recall responses. *J Immunol*, 2007, 179(12): p. 8243–8251.
- [156] Phares, T., et al., CD4 T cells promote CD8 T cell immunity at the priming and effector site during viral encephalitis. *J Virol*, 2012, 86(5): p. 2416–2427.
- [157] Hu, Z., et al., CD4(+) T-cell dependence of primary CD8(+) T-cell response against vaccinia virus depends upon route of infection and viral dose. *Cell Mol Immunol*, 2016, 13(1): p. 82–93.
- [158] Laidlaw, B., et al., *The multifaceted role of CD4+ T cells in CD8+ T cell memory*. *Nature Reviews Immunology*, 2016, 16102 EP -.
- [159] Wodarz, D., et al., *The role of T cell help for anti-viral CTL responses*. *J Theor Biol*, 2001, 211(4): p. 419–432.
- [160] Cruz-Adalia, A., et al., Conventional CD4+ T cells present bacterial antigens to induce cytotoxic and memory CD8+ T cell responses. *Nature Communications*, 2017, 8(1): p. 1591.
- [161] Borst, J., et al., *CD4+ T cell help in cancer immunology and immunotherapy*. *Nature Reviews Immunology*, 2018, 18(10): p. 635–647.
- [162] Greyer, M., et al., T Cell Help Amplifies Innate Signals in CD8(+) DCs for Optimal CD8(+) T Cell Priming. *Cell Rep*, 2016, 14(3): p. 586–597.
- [163] Mescher, M., et al., Molecular basis for checkpoints in the CD8 T cell response: tolerance versus activation. *Semin Immunol*, 2007, 19(3): p. 153–161.
- [164] Mittrücker, H.-W., et al., *Heterogeneity in the differentiation and function of CD8+ T cells*. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, 2014, 62(6): p. 449–458.
- [165] Swain, S., et al., *Expanding roles for CD4+ T cells in immunity to viruses*. *Nat Rev Immunol*, 2012, 12(2): p. 136–148.
- [166] Farber, D., et al., *Human memory T cells: generation, compartmentalization and homeostasis*. *Nature Reviews Immunology*, 2013, 1424 EP -.
- [167] Gaspar, D., et al., *CD4 T-Cell Memory Generation and Maintenance*. *Crit Rev Immunol*, 2014, 34(2): p. 121–146.
- [168] Dhume, K., et al., Early programming and late-acting checkpoints governing the development of CD4 T-cell memory. *Immunology*, 2018, 155(1): p. 53–62.
- [169] Devarajan, P., et al., New Insights into the Generation of CD4 Memory May Shape Future Vaccine Strategies for Influenza. *Front Immunol*, 2016, 7: p. 136.
- [170] McKinstry, K., et al., Effector CD4 T-cell transition to memory requires late cognate interactions that induce autocrine IL-2. *Nature Communications*, 2014, 5: p. 5377.
- [171] McKinstry, K., et al., *The potential of CD4 T-cell memory*. *Immunology*, 2010, 130(1): p. 1–9.
- [172] Barski, A., et al., Rapid Recall Ability of Memory T cells is Encoded in their Epigenome. *Sci Rep*, 2017, 739785 EP -.
- [173] Omilusik, K., et al., *The origins of memory T cells*. *Nature*, 2017, 552(7685): p. 337–339.
- [174] MacLeod, M., et al., *CD4 memory T cells: what are they and what can they do?* *Semin Immunol*, 2009, 21(2): p. 53–61.

- [175] MacLeod, M., et al., *Memory CD4 T cells: generation, reactivation and re-assignment*. Immunology, 2010, 130(1): p. 10–15.
- [176] Berg, R., et al., The role of CD8 T cells in innate immunity and in antigen non-specific protection. *Curr Opin Immunol*, 2006, 18(3): p. 338–343.
- [177] Hassin, D., et al., Cytotoxic T lymphocyte perforin and Fas ligand working in concert even when Fas ligand lytic action is still not detectable. *Immunology*, 2011, 133(2): p. 190–196.
- [178] Martínez-Lostao, L., et al., *How Do Cytotoxic Lymphocytes Kill Cancer Cells?* Clin Cancer Res, 2015, 21(22): p. 5047–5056.
- [179] Kagi, D., et al., Fas and perforin pathways as major mechanisms of T cell-mediated cytotoxicity. *Science*, 1994, 265(5171): p. 528–530.
- [180] Halle, S., et al., *Mechanisms and Dynamics of T Cell-Mediated Cytotoxicity In Vivo*. Trends Immunol, 2017, 38(6): p. 432–443.
- [181] Jaime-Sánchez, P., et al., Antigen-specific primed cytotoxic T cells eliminate tumour cells in vivo and prevent tumour development, regardless of the presence of anti-apoptotic mutations conferring drug resistance. *Cell Death & Differentiation*, 2018, 25(9): p. 1536–1548.
- [182] Turtle, C., et al., CD19 CAR-T cells of defined CD4+:CD8+ composition in adult B cell ALL patients. *J Clin Invest*, 2016, 126(6): p. 2123–2138.
- [183] Gerritsen, B., et al., *The memory of a killer T cell: models of CD8(+) T cell differentiation*. Immunol Cell Biol, 2016, 94(3): p. 236–241.
- [184] Ward-Hartstonge, K., et al., *Regulatory T-cell heterogeneity*. Clin Transl Immunology, 2018, 7(3).
- [185] Sakaguchi, S., et al., *Regulatory T cells and immune tolerance*. Cell, 2008, 133(5): p. 775–787.
- [186] Mackay, I., *Tolerance and autoimmunity*. West J Med, 2001, 174(2): p. 118–123.
- [187] Sprent, J., et al., *The thymus and central tolerance*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2001, 356(1409): p. 609–616.
- [188] van Parijs, L., et al., *Mechanisms of peripheral T cell tolerance*. Novartis Found Symp, 1998, 2155-14; discussion 14-20, 33-40.
- [189] Buckner, J., et al., Regulating the immune system: the induction of regulatory T cells in the periphery. *Arthritis Res Ther*, 2004, 6(5): p. 215–222.
- [190] Zhao, H., et al., *Tregs: Where We Are and What Comes Next?* Front Immunol, 2017, 8: p. 1578.
- [191] Rochman, Y., et al., *New insights into the regulation of T cells by γ c family cytokines*. Nature Reviews Immunology, 2009, 9: p. 480–490.
- [192] Rink, L., et al., (2015), *Immunologie für Einsteiger. 2.*, neu bearb. u. aktualisierte Aufl. 2015. Springer Spektrum: Berlin, Heidelberg.
- [193] Churlaud, G., et al., Human and Mouse CD8(+)CD25(+)FOXP3(+) Regulatory T Cells at Steady State and during Interleukin-2 Therapy. *Front Immunol*, 2015, 6: p. 171.
- [194] Kim, H.-J., et al., *CD8+ Treg - From Mouse To Man*. Blood, 2013, 122(21): p. 3474.

- [195] Ligocki, A., et al., Advances on Non-CD4 + Foxp3+ T Regulatory Cells: CD8+, Type 1, and Double Negative T Regulatory Cells in Organ Transplantation. *Transplantation*, 2015, 99(8): p. 1553–1559.
- [196] Yu, Y., et al., *Recent advances in CD8+ regulatory T cell research*. *Oncol Lett*, 2018, 15(6): p. 8187–8194.
- [197] Campbell, D., et al., *Phenotypic and functional specialization of FOXP3+ regulatory T cells*. *Nat Rev Immunol*, 2011, 11(2): p. 119–130.
- [198] Panduro, M., et al., *TISSUE-Tregs*. *Annu Rev Immunol*, 2016, 34: p. 609–633.
- [199] Abbas, A., et al., *Regulatory T cells: recommendations to simplify the nomenclature*. *Nature Immunology*, 2013, 14(4): p. 307–308.
- [200] Zeng, H., et al., Type 1 regulatory T cells: a new mechanism of peripheral immune tolerance. *Cell Mol Immunol*, 2015, 12(5): p. 566–571.
- [201] Gagliani, N., et al., Coexpression of CD49b and LAG-3 identifies human and mouse T regulatory type 1 cells. *Nat Med*, 2013, 19(6): p. 739–746.
- [202] Chihara, N., et al., *Differentiation and Characterization of Tr1 Cells*. *Curr Protoc Immunol*, 2016, 1133.27.1-3.27.10.
- [203] Allan, S., et al., Activation-induced FOXP3 in human T effector cells does not suppress proliferation or cytokine production. *International Immunology*, 2007, 19(4): p. 345–354.
- [204] Morgan, M., et al., Expression of FOXP3 mRNA is not confined to CD4+CD25+ T regulatory cells in humans. *Hum Immunol*, 2005, 66(1): p. 13–20.
- [205] Tran, D., et al., Induction of FOXP3 expression in naive human CD4+FOXP3 T cells by T-cell receptor stimulation is transforming growth factor-beta dependent but does not confer a regulatory phenotype. *Blood*, 2007, 110(8): p. 2983–2990.
- [206] Wang, J., et al., Transient expression of FOXP3 in human activated nonregulatory CD4+ T cells. *Eur J Immunol*, 2007, 37(1): p. 129–138.
- [207] Fontenot, J., et al., Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nature Immunology*, 2003, 4(4): p. 330–336.
- [208] Hori, S., et al., Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science*, 2003, 299(5609): p. 1057–1061.
- [209] Gavin, M., et al., *Foxp3-dependent programme of regulatory T-cell differentiation*. *Nature*, 2007, 445(7129): p. 771–775.
- [210] Bennett, C., et al., The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nature Genetics*, 2001, 2720 EP -.
- [211] Sun, L., et al., Foxp3 is critical for human natural CD4+CD25+ regulatory T cells to suppress alloimmune response. *Transpl Immunol*, 2012, 26(2-3): p. 71–80.
- [212] Soligo, M., et al., CD28 costimulation regulates FOXP3 in a RelA/NF-κB-dependent mechanism. *Eur J Immunol*, 2011, 41(2): p. 503–513.
- [213] Beyersdorf, N., et al., *CD28 co-stimulation in T-cell homeostasis: a recent perspective*. *Immunotargets Ther*, 2015, 4: p. 111–122.

- [214] Rosenblum, M., et al., *Regulatory T cell memory*. Nat Rev Immunol, 2016, 16(2): p. 90–101.
- [215] Dias, S., et al., Effector Regulatory T Cell Differentiation and Immune Homeostasis Depend on the Transcription Factor Myb. Immunity, 2017, 46(1): p. 78–91.
- [216] Cretney, E., et al., Characterization of Blimp-1 function in effector regulatory T cells. J Autoimmun, 2018, 91: p. 73–82.
- [217] Levine, A., et al., Stability and function of regulatory T cells expressing the transcription factor T-bet. Nature, 2017, 546421 EP -.
- [218] Yu, F., et al., Dynamic expression of transcription factors T-bet and GATA-3 by regulatory T cells maintains immunotolerance. Nature Immunology, 2014, 16197 EP -.
- [219] Duhen, T., et al., Functionally distinct subsets of human FOXP3+ Treg cells that phenotypically mirror effector Th cells. Blood, 2012, 119(19): p. 4430–4440.
- [220] Campbell, D., *Regulatory T cells GATA have it*. Immunity, 2011, 35(3): p. 313–315.
- [221] Campbell, D., et al., *Phenotypical and functional specialization of FOXP3+ regulatory T cells*. Nature Reviews Immunology, 2011, 11119 EP -.
- [222] Szurek, E., et al., Differences in Expression Level of Helios and Neuropilin-1 Do Not Distinguish Thymus-Derived from Extrathymically-Induced CD4+Foxp3+ Regulatory T Cells. PLoS ONE, 2015, 10(10)e0141161.
- [223] Yadav, M., et al., Neuropilin-1 distinguishes natural and inducible regulatory T cells among regulatory T cell subsets in vivo. J Exp Med, 2012, 209(10): p. 1713–1722.
- [224] Lühder, F., et al., Topological requirements and signaling properties of T cell-activating, anti-CD28 antibody superagonists. J Exp Med, 2003, 197(8): p. 955–966.
- [225] Beyersdorf, N., et al., Superagonistic anti-CD28 antibodies: potent activators of regulatory T cells for the therapy of autoimmune diseases. Ann Rheum Dis, 2005, 64: p. iv91-iv95.
- [226] He, X., et al., Single CD28 stimulation induces stable and polyclonal expansion of human regulatory T cells. Sci Rep, 2017, 7: p. 43003.
- [227] Beyersdorf, N., et al., Selective targeting of regulatory T cells with CD28 superagonists allows effective therapy of experimental autoimmune encephalomyelitis. J Exp Med, 2005, 202(3): p. 445–455.
- [228] Beyersdorf, N., et al., Superagonistic CD28 stimulation of allogeneic T cells protects from acute graft-versus-host disease. Blood, 2009, 114(20): p. 4575–4582.
- [229] Weirather, J., et al., Foxp3+ CD4+ T cells improve healing after myocardial infarction by modulating monocyte/macrophage differentiation. Circ Res, 2014, 115(1): p. 55–67.
- [230] Piriou-Guzylack, L., et al., *Membrane markers of the immune cells in swine: an update*. Vet Res, 2008, 39(6): p. 54.
- [231] Saalmüller, A., et al., *T-helper cells from naive to committed*. Vet Immunol Immunopathol, 2002, 87(3-4): p. 137–145.
- [232] Sakaguchi, S., et al., *FOXP3+ regulatory T cells in the human immune system*. Nature Reviews Immunology, 2010, 10490 EP -.

- [233] Käser, T., et al., Phenotypic and functional characterisation of porcine CD4(+)CD25(high) regulatory T cells. *Vet Immunol Immunopathol*, 2008, 122(1-2): p. 153–158.
- [234] Mahnke, Y., et al., *The who's who of T-cell differentiation: human memory T-cell subsets*. *Eur J Immunol*, 2013, 43(11): p. 2797–2809.
- [235] Gerner, W., et al., Phenotypic and functional differentiation of porcine $\alpha\beta$ T cells. Current knowledge and available tools. *Mol Immunol*, 2015, 66(1): p. 3–13.
- [236] Montoya, C., et al., Characterization of human invariant natural killer T subsets in health and disease using a novel invariant natural killer T cell-clonotypic monoclonal antibody, 6B11. *Immunology*, 2007, 122(1): p. 1–14.
- [237] Yang, G., et al., *Analysis of T cell antigen receptor expression by porcine natural killer T cells*. *The Journal of Immunology*, 2018, 200(1 Supplement)59.16.
- [238] Yang, G., et al., Characterizing porcine invariant natural killer T cells: A comparative study with NK cells and T cells. *Dev Comp Immunol*, 2017, 76: p. 343–351.
- [239] Vantourout, P., et al., *Six-of-the-best: unique contributions of $\gamma\delta$ T cells to immunology*. *Nat Rev Immunol*, 2013, 13(2): p. 88–100.
- [240] Sedlak, C., et al., CD2 and CD8 α define porcine $\gamma\delta$ T cells with distinct cytokine production profiles. *Dev Comp Immunol*, 2014, 45(1): p. 97–106.
- [241] Sinkora, M., et al., Development of gammadelta thymocyte subsets during prenatal and postnatal ontogeny. *Immunology*, 2005, 115(4): p. 544–555.
- [242] Azuma, M., et al., *B70 antigen is a second ligand for CTLA-4 and CD28*. *Nature*, 1993, 366(6450): p. 76–79.
- [243] Vaughan, A., et al., Porcine CTLA4-Ig Lacks a MYPPPY Motif, Binds Inefficiently to Human B7 and Specifically Suppresses Human CD4+ T Cell Responses Costimulated by Pig But Not Human B7. *The Journal of Immunology*, 2000, 165(6): p. 3175–3181.
- [244] Freeman, G., Murine B7-2, an alternative CTLA4 counter-receptor that costimulates T cell proliferation and interleukin 2 production. *J Exp Med*, 1993, 178(6): p. 2185–2192.
- [245] Dhirapong, A., et al., Therapeutic effect of cytotoxic T lymphocyte antigen 4/immunoglobulin on a murine model of primary biliary cirrhosis. *Hepatology*, 2013, 57(2): p. 708–715.
- [246] Blazar, B., et al., In vivo blockade of CD28/CTLA4. B7/BB1 interaction with CTLA4-Ig reduces lethal murine graft-versus-host disease across the major histocompatibility complex barrier in mice. *Blood*, 1994, 83(12): p. 3815–3825.
- [247] Peraino, J., et al., Molecular basis of cross-species reactivities of human versus porcine CTLA-4. *Hum Immunol*, 2013, 74(7): p. 842–848.
- [248] Choi, I., et al., Molecular cloning, expression and functional characterization of miniature swine CD86. *Mol Immunol*, 2006, 43(5): p. 480–486.
- [249] Pierson, R., et al., Current status of xenotransplantation and prospects for clinical application. *Xenotransplantation*, 2009, 16(5): p. 263–280.
- [250] Vasu, C., CD80 and CD86 C domains play an important role in receptor binding and co-stimulatory properties. *International Immunology*, 2003, 15(2): p. 167–175.

- [251] Mirenda, V., et al., Achieving Permanent Survival of Islet Xenografts by Independent Manipulation of Direct and Indirect T-Cell Responses. *Diabetes*, 2005, 54(4): p. 1048–1055.
- [252] Koshika, T., et al., Relative efficiency of porcine and human cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 immunoglobulin in inhibiting human CD4+ T-cell responses co-stimulated by porcine and human B7 molecules. *Immunology*, 2011, 134(4): p. 386–397.
- [253] Tian, M., et al., Alternative immunomodulatory strategies for xenotransplantation. CD80/CD86-CTLA4 pathway-modified immature dendritic cells promote xenograft survival. *PLoS ONE*, 2013, 8(7): e69640.
- [254] Su, H., et al., Molecular cloning and characterization of the full-length cDNA encoding the porcine CD28. *Vet Immunol Immunopathol*, 2012, 146(3-4): p. 264–269.
- [255] Lanier, L., et al., CD80 (B7) and CD86 (B70) provide similar costimulatory signals for T cell proliferation, cytokine production, and generation of CTL. *J Immunol*, 1995, 154(1): p. 97–105.
- [256] Ikemizu, S., et al., *Structure and dimerization of a soluble form of B7-1*. *Immunity*, 2000, 12(1): p. 51–60.
- [257] Tadaki, D., et al., Porcine CD80. Cloning, characterization, and evidence for its role in direct human T-cell activation. *Xenotransplantation*, 2003, 10(3): p. 252–258.
- [258] Chen, H., et al., Understanding *Haemophilus parasuis* infection in porcine spleen through a transcriptomics approach. *BMC Genomics*, 2009, 10: p. 64.
- [259] Foss, D., et al., Regulation of hypoxanthine phosphoribosyltransferase, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and beta-actin mRNA expression in porcine immune cells and tissues. *Anim Biotechnol*, 1998, 9(1): p. 67–78.
- [260] Nygaard, A.-B., et al., Selection of reference genes for gene expression studies in pig tissues using SYBR green qPCR. *BMC Mol Biol*, 2007, 8: p. 67.
- [261] Suzuki, T., et al., *Control selection for RNA quantitation*. *BioTechniques*, 2000, 29(2): p. 332–337.
- [262] Tacke, M., et al., CD28-mediated induction of proliferation in resting T cells in vitro and in vivo without engagement of the T cell receptor: evidence for functionally distinct forms of CD28. *Eur J Immunol*, 1997, 27(1): p. 239–247.
- [263] Boomer, J., et al., *An enigmatic tail of CD28 signaling*. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2010, 2(8): a002436.
- [264] Römer, P., et al., Preculture of PBMCs at high cell density increases sensitivity of T-cell responses, revealing cytokine release by CD28 superagonist TGN1412. *Blood*, 2011, 118(26): p. 6772–6782.
- [265] Edwards, J., et al., CD1- and CD1+ porcine blood dendritic cells are enriched for the orthologues of the two major mammalian conventional subsets. *Sci Rep*, 2017, 7: p. 40942.
- [266] Jamin, A., et al., Characterization of conventional and plasmacytoid dendritic cells in swine secondary lymphoid organs and blood. *Vet Immunol Immunopathol*, 2006, 114(3-4): p. 224–237.

- [267] Merad, M., et al., The dendritic cell lineage: ontogeny and function of dendritic cells and their subsets in the steady state and the inflamed setting. *Annu Rev Immunol*, 2013, 31: p. 563–604.
- [268] Lambert, C., et al., Monocytes and macrophages in flow: an ESCCA initiative on advanced analyses of monocyte lineage using flow cytometry. *Cytometry B Clin Cytom*, 2017, 92(3): p. 180–188.
- [269] Appleyard, et al., *Characterization of porcine CD5 and CD5+ B cells*. *Clin Exp Immunol*, 1998, 111(1): p. 225–230.
- [270] Boeker, M., et al., Quantification of B, T and Null Lymphocyte Subpopulations in the Blood and Lymphoid Organs of the Pig. *Immunobiology*, 1999, 201(1): p. 74–87.
- [271] Joling, P., et al., Distribution of lymphocyte subpopulations in thymus, spleen, and peripheral blood of specific pathogen free pigs from 1 to 40 weeks of age. *Vet Immunol Immunopathol*, 1994, 40(2): p. 105–117.
- [272] Gerner, W., et al., *Porcine T lymphocytes and NK cells--an update*. *Dev Comp Immunol*, 2009, 33(3): p. 310–320.
- [273] Mair, K., et al., NKp46 expression discriminates porcine NK cells with different functional properties. *Eur J Immunol*, 2012, 42(5): p. 1261–1271.
- [274] Braun, R., et al., Porcine B Cell Subset Responses to Toll-like Receptor Ligands. *Front Immunol*, 2017, 8: p. 1044.
- [275] Sinkora, M., et al., The comparative profile of lymphoid cells and the T and B cell spectratype of germ-free piglets infected with viruses SIV, PRRSV or PCV2. *Vet Res*, 2014, 45: p. 91.
- [276] Appay, V., et al., Sensitive Gene Expression Profiling of Human T Cell Subsets Reveals Parallel Post-Thymic Differentiation for CD4+ and CD8+ Lineages. *The Journal of Immunology*, 2007, 179(11): p. 7406–7414.
- [277] Toride King, M., et al., Epitope Mapping of Antibody-Antigen Interactions with X-Ray Crystallography. *Methods Mol Biol*, 2018, 1785: p. 13–27.
- [278] Bardelli, M., et al., *Epitope mapping by solution NMR spectroscopy*. *J Mol Recognit*, 2015, 28(6): p. 393–400.
- [279] Opuni, K., et al., *Mass spectrometric epitope mapping*. *Mass Spectrom Rev*, 2018, 37(2): p. 229–241.
- [280] Moreira, G., et al., *Epitope Mapping by Phage Display*. *Methods Mol Biol*, 2018, 1701: p. 497–518.
- [281] Bachman, J., *Site-directed mutagenesis*. *Meth Enzymol*, 2013, 529: p. 241–248.
- [282] Afzali, B., et al., *Pathways of major histocompatibility complex allorecognition*. *Curr Opin Organ Transplant*, 2008, 13(4): p. 438–444.
- [283] Lin, J.-S., et al., *Protein-Protein Interactions: Co-Immunoprecipitation*. *Methods Mol Biol*, 2017, 1615: p. 211–219.
- [284] Kerppola, T., Bimolecular fluorescence complementation (BiFC) analysis as a probe of protein interactions in living cells. *Annu Rev Biophys*, 2008, 37: p. 465–487.

- [285] Li, Y., et al., Comparison of anti-CD3 and anti-CD28-coated beads with soluble anti-CD3 for expanding human T cells: differing impact on CD8 T cell phenotype and responsiveness to restimulation. *J Transl Med*, 2010, 8: p. 104.
- [286] Schodin, B., et al., Correlation Between the Number of T Cell Receptors Required for T Cell Activation and TCR–Ligand Affinity. *Immunity*, 1996, 5(2): p. 137–146.
- [287] Alcover, A., et al., *Internalization and intracellular fate of TCR-CD3 complexes*. *Crit Rev Immunol*, 2000, 20(4): p. 325–346.
- [288] Fracchia, K., et al., Modulation of T Cell Metabolism and Function through Calcium Signaling. *Front Immunol*, 2013, 4: p. 324.
- [289] Joseph, N., et al., The calcium feedback loop and T cell activation: how cytoskeleton networks control intracellular calcium flux. *Biochim Biophys Acta*, 2014, 1838(2): p. 557–568.
- [290] Kim, K., et al., *Assaying Cell Cycle Status Using Flow Cytometry*. *Curr Protoc Mol Biol*, 2015, 11128.6.1-11.
- [291] Foster, B., et al., *Detection of intracellular cytokines by flow cytometry*. *Curr Protoc Immunol*, 2007, Chapter 6Unit 6.24.
- [292] Fisher, W., et al., NFAT and NFkappaB activation in T lymphocytes: a model of differential activation of gene expression. *Ann Biomed Eng*, 2006, 34(11): p. 1712–1728.
- [293] Langenhorst, D., et al., Self-Recognition Sensitizes Mouse and Human Regulatory T Cells to Low-Dose CD28 Superagonist Stimulation. *Front Immunol*, 2017, 8: p. 1985.
- [294] Takamatsu, H.-H., et al., Porcine gammadelta T cells: possible roles on the innate and adaptive immune responses following virus infection. *Vet Immunol Immunopathol*, 2006, 112(1-2): p. 49–61.
- [295] Kozbor, D., et al., Tp44 molecules involved in antigen-independent T cell activation are expressed on human plasma cells. *The Journal of Immunology*, 1987, 138(12): p. 4128–4132.
- [296] Rozanski, C., et al., CD28 Promotes Plasma Cell Survival, Sustained Antibody Responses, and BLIMP-1 Upregulation through Its Distal PYAP Proline Motif. *J Immunol*, 2015, 194(10): p. 4717–4728.
- [297] Hwang, W., et al., *Immunogenicity of engineered antibodies*. *Methods*, 2005, 36(1): p. 3–10.
- [298] Ryman, J., et al., *Pharmacokinetics of Monoclonal Antibodies*. *CPT Pharmacometrics Syst Pharmacol*, 2017, 6(9): p. 576–588.
- [299] Tyrnin, D., et al., From TGN1412 to TAB08: the return of CD28 superagonist therapy to clinical development for the treatment of rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol*, 2016, 34(4 Suppl 98): p. 45–48.
- [300] Touma, Z., et al., Current and future therapies for SLE: obstacles and recommendations for the development of novel treatments. *Lupus Sci Med*, 2017, 4(1).
- [301] Cabo, M., et al., Trial Watch: Immunostimulatory monoclonal antibodies for oncological indications. *Oncoimmunology*, 2017, 6(12).

7. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich meinen herzlichen Dank den nachstehenden Personen entgegenbringen, die mich auf dem Weg zur Anfertigung und Fertigstellung dieser Promotionsschrift stetig begleitet und unterstützt haben:

Zuallererst gilt mein Dank meinem Doktorvater, Herrn Priv.-Doz. Dr. Niklas Beyersdorf, für die wissenschaftliche Erstbetreuung dieser Arbeit, die mannigfachen Anregungen und detailgenauen Verbesserungsvorschläge, sowie den unerschütterlichen Enthusiasmus und Optimismus an das Gelingen dieser Arbeit. In Erinnerung wird mir dabei auch das offene Ohr für Probleme jeder Art bleiben.

Ich danke meinem Zweitbetreuer, Herrn Prof. Dr. Thomas Kerkau, für die allzeit konstruktiven Ratschläge, die illustratorisch wertvollen Hinweise und die kritische Hinterfragung meiner Arbeit.

Bedanken möchte ich mich auch bei meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Ulrich Hofmann, für das Annehmen der angebotenen Position als Drittbetreuer im Promotionskomitee sowie jede Form der wissenschaftlichen und nicht-wissenschaftlichen Hilfestellung.

Ein großes Dankeschön gebührt, neben meinen Betreuern, auch den aktiven und ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Kerkau/ Beyersdorf, insbesondere Frau Dr. Anna Uri, Frau Xin Ding sowie Frau Nelli Wolf. Bei Anna Uri, meiner ehemaligen Kollegin und Trainingspartnerin, möchte ich mich für die zahlreichen Tricks und Kniffe mit den Gerätschaften und der Analysesoftware bedanken. Für die langwierige Vorarbeit sowie die intensive Mitarbeit in der Charakterisierung der Antikörper geht mein Dank an Xin Ding und Nelli Wolf. Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei Xin Ding für die freundschaftliche Zusammenarbeit, die durchgeführten Nachfärbungen und die Erlaubnis, diese auch in meine Arbeit aufnehmen zu dürfen.

Des Weiteren zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben die durch Herrn Christian Linden sowie in Vertretung durch Frau Nelli Wolf durchgeführten Durchflusszytometrie-basierten Zellsortierungen der Serviceeinheit Zellsortierung am Institut für Virologie und Immunbiologie.

Für die gute wissenschaftliche Zusammenarbeit, die nützlichen Ratschläge und die ständige Hilfsbereitschaft danke ich Frau Dr. Nadine Gladow, Frau Helga Wagner sowie Frau Sandra Umbenhauer aus der Arbeitsgruppe Hofmann/ Frey.

Deeply grateful for inspiring conversations, making me feel appreciated and taken seriously as a medical student among scientific researchers, I have got to thank Mr. Hemant Kumar Yoshi, Mrs. Vishakha Rakesh Tiwarekar, Ms. Vini John as well as Mr. Mohindarmuruges Karunakaran for contributing to a joyful time at the Institute for Virology and Immunobiology.

Für jeden guten Rat und jede gute Tat soll hier auch Danke gesagt sein, an alle nicht namentlich genannten Mitarbeiter des Instituts für Virologie und Immunbiologie, des Zentrums für experimentelle molekulare Medizin sowie des Deutschen Zentrums für Herzinsuffizienz.

Ebenso dankbar bin ich auch für die finanzielle Unterstützung durch das Interdisziplinäre Zentrum für Klinische Forschung (IZKF) Würzburg sowie durch die Graduiertenschule für Lebenswissenschaften (GSLs) Würzburg sowie für die intellektuelle Förderung im strukturierten Promotionsprogramm durch das Graduiertenkolleg Immunmodulation.

Meinen aufrichtigen Dank möchte ich auch gegenüber meinem Onkel, Andreas Preißl, aussprechen, der sich immer zuverlässig und bedacht, um die wöchentlichen Lieferungen und den gekühlten Transport der frischen Schweinemilzen und -herzen gekümmert hat.

Mein ganz besonderer Dank geht zu guter Letzt an meine Eltern, Bernhard und Christine Uehlein, die mir meinen bisherigen Lebensweg in dieser Form ermöglicht und mich Zeit meines Lebens bei der Verwirklichung meiner Pläne unterstützt haben. Ihnen ist daher zusammen mit meinem verstorbenen Großvater, Albert Preißl, diese Arbeit gewidmet.

8. Eidesstattliche Erklärung/ Affidavit

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation „**Expression und Funktion von CD28 im Schwein**“ eigenständig, d.h. insbesondere selbständig und ohne Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters, angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Ich erkläre außerdem, dass die Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Buckenhof, 26.01.2021

Ort, Datum

Unterschrift

Affidavit

I hereby confirm that my thesis entitled “**Expression and function of CD28 in pigs**” is the result of my own work. I did not receive any help or support from commercial consultants. All sources and / or materials applied are listed and specified in the thesis.

Furthermore, I confirm that this thesis has not yet been submitted as part of another examination process neither in identical nor in similar form.

Buckenhof, 26.01.2021

Place, Date

Signature

9. Lebenslauf