

Aus dem Institut für Virologie und Immunbiologie
der Universität Würzburg
Lehrstuhl für Immunologie
Vorstand: Prof. Dr. Thomas Hünig

Einfluss blockierender und stimulierender CD28-spezifischer monoklonaler
Antikörper auf die Reifung und Homöostase von T-Zellen der Maus

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von
Gregor Blank
aus Würzburg

Würzburg, April 2009

Referent: Professor Dr. Thomas Hünig
Korreferent: Professor Dr. Thomas Herrmann
Dekan: Professor Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 04. August 2009

Der Promovend ist Arzt.

EINLEITUNG	1
MATERIAL UND METHODEN	10
Mauslinien	10
Organentnahmen und Einzelzellsuspensionen	10
Blutentnahmen	11
In-vivo Behandlung mit monoklonalen α-CD28 Antikörpern	11
Organkulturen	12
<i>Neonatale-Thymus-Organ-Kultur (NTOC)</i>	12
<i>Fetale-Thymus-Organ-Kultur (FTOC)</i>	12
Anreicherung von Zellsubpopulationen	13
<i>Zelldepletion durch IgM-vermittelte Komplementaktivierung</i>	13
<i>Zelldepletion durch magnetische Zellsortierung (Auto-MACS[®])</i>	13
<i>Separation mononukleärer Zellen aus peripherem Blut mittels Lympholyte[®]</i>	14
Zellkulturen	14
<i>Suspensionskulturen mit isolierten CD4⁺CD8⁻ Thymozyten</i>	14
<i>In-vitro Differenzierung von T-Zellen auf OP9 Stromazellen</i>	15
Antikörper	15
<i>Unkonjugierte Antikörper</i>	15
<i>FITC-konjugierte Antikörper</i>	16
<i>PE-konjugierte Antikörper</i>	16
<i>PerCP-konjugierte Antikörper</i>	16
<i>APC-konjugierte Antikörper</i>	16

<i>Biotinylierte Antikörper</i>	17
<i>Sekundärantikörper und Polyklonale Seren</i>	17
Färbungen zur Analyse an einem FACSCalibur® Durchflusszytometer	17
<i>Oberflächenfärbungen</i>	17
<i>Färbungen zur Detektion an der Oberfläche gebundener α-CD28 mAk</i>	18
<i>Intrazelluläre Färbungen</i>	18
<i>Intranukleäre BrdU-Färbungen</i>	19
Ex-vivo Stimulationen und Proliferationstests	20
Bestimmung von zirkulierenden Auto-Antikörpern in Mausseren mittels indirekter Immunfluoreszenz	21
<i>Gewinnung von Serum aus peripheren Blutproben</i>	21
<i>Immunfluoreszenzfärbung der Seren zur Detektion zirkulierender Auto-Ak</i>	21
Verwendete Software	22
ERGEBNISSE	23
Einfluss CD28-spezifischer monoklonaler Antikörper auf die Homöostase von T-Zellen	23
<i>In-vivo Behandlung mit α-CD28 mAk</i>	23
<i>Ex-vivo Behandlung mit α-CD28 mAk mittels NTOC</i>	31
Einfluss CD28-spezifischer monoklonaler Antikörper auf die Entwicklung von T-Zellen	34
<i>In-vivo Behandlung von Rag^{-/-} Mäusen mit CD28 Superagonisten</i>	34
<i>Ex-vivo Behandlung mit α-CD28 mAk mittels FTOC</i>	36
<i>In-vitro Differenzierung von DN T-Zellen auf OP9 Stromazellen in Anwesenheit von α-CD28 mAk</i>	39

Einfluss einer chronischen Behandlung mit dem blockierenden α-CD28 mAk E18 auf die Homöostase von T-Zellen	41
<i>Analysen peripheren Blutes bei chronischer E18-Injektion</i>	41
<i>Analyse der peripheren Lymphknoten, Milz und Thymus nach 25wöchiger Behandlung mit E18</i>	44
<i>Analyse der Mäuse nach 13 Wochen Erholungsphase im Anschluss an eine 25wöchige Behandlung mit E18</i>	52
DISKUSSION	58
Die Behandlung mit CD28-spezifischen monoklonalen Antikörpern hat keinen Einfluss auf die Differenzierung von T-Zellen im Thymus	58
Die Behandlung mit CD28 Superagonisten hat keinen Einfluss auf die Zusammensetzung der einzelnen Populationen im Thymus	60
Die Behandlung mit dem blockierenden α-CD28 mAk hat keinen Einfluss auf die Zusammensetzung der CD4- und CD8-definierten Subpopulationen im Thymus	62
Die Behandlung mit dem blockierenden α-CD28 mAk reduziert die Anzahl regulatorischer T-Zellen im Thymus und peripheren Lymphknoten	63
Die chronische Behandlung mit dem blockierenden α-CD28 mAk führt zu einer reversiblen Reduktion von CD4 T-Zellen und regulatorischen T-Zellen	64
ZUSAMMENFASSUNG	66
LITERATURVERZEICHNIS	68

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

82

ANHANG

Danksagung

Lebenslauf

EINLEITUNG

Die Entwicklung eines Immunsystems stellt eine wichtige Voraussetzung für höhere Vertebraten dar, um sich erfolgreich gegen äußere Angriffe durch pathogene Bakterien und Viren zur Wehr setzen zu können. Aber auch die Erkennung deregulierter körpereigener Zellen als „fremd“ bzw. „verändertes Selbst“ und die Zerstörung dieser, stellt eine wesentliche Aufgabe des Immunsystems zur Erhaltung der körperlichen Integrität vieler Lebewesen dar.

Um diesen Anforderungen gerecht zu werden verfügt das Immunsystem sowohl über einen zellvermittelten, als auch über einen humoralen Ast der Immunantwort. Eine weitere Möglichkeit der Unterteilung besteht in einer nativen (oder angeborenen) und einer adaptiven (oder erworbenen) Immunität. Zu den Komponenten des angeborenen Immunsystems zählen u.a. Makrophagen, Dendritische Zellen, Granulozyten, Natürliche Killerzellen, das Komplementsystem sowie verschiedene Interferone und Akute Phase Proteine. Durch das Erkennen unveränderlicher Merkmale auf der Oberfläche pathogener Organismen und rasches Reagieren stellt das angeborene Immunsystem das erste Hindernis für eingedrungene Krankheitserreger dar. Weiterhin spielt es eine große Rolle in der Aktivierung des erworbenen Teils der Immunantwort. Letzterer setzt sich zusammen aus den B- und T-Lymphozyten. Die Fähigkeiten dieses adaptiven Immunsystems liegen in der spezifischen Erkennung körperfremder Substanzen und ferner in der Bildung eines immunologischen Gedächtnisses. Das erworbene Immunsystem ermöglicht ein schnelleres und effektiveres Vorgehen gegen sich wiederholende Infektionen und stellt damit durch das immunologische Gedächtnis einen lange bestehenden Schutz für den Organismus dar.

Wie alle hämatopoetischen Stammzellen entstehen die Vorläuferzellen der Lymphozyten im Knochenmark. Doch während der größte Teil der B-Zell-Entwicklung auch dort stattfindet, wandern die Vorläuferzellen der späteren T-Zellen über das Blut in den Thymus, um dort weiter zu differenzieren.

Der Thymus ist ein primär lymphatisches Organ und befindet sich im oberen Mediastinum. Er besteht makroskopisch aus zwei Lappen. Mikroskopisch unterscheidet man einen inneren, medullären und einen äußeren, kortikalen Anteil. Der Kortex ist der Bereich, in dem die frühen Stufen der T-Zell-Entwicklung stattfinden [zusammengefasst u.a. in Germain, R. N. 2002]. Anhand der unterschiedlichen Expression der Korezeptoren CD4 und CD8 lassen sich dabei drei Hauptstadien definieren: CD4⁻CD8⁻ (Doppelnegative, DN), CD4⁺CD8⁺ (Doppelpositive, DP) sowie CD4⁺CD8⁻ und CD4⁻CD8⁺ (Einzelpositive, SP) T-Zellen [zusammengefasst u.a. in Germain, R. N. 2002, Kappes, J. D., et al. 2005].

Die DN Thymozyten lassen sich durch die sequenzielle Expression der Oberflächenmarker CD44 und CD25 in vier weitere aufeinanderfolgende Stadien unterteilen: CD44⁺CD25⁻ (DN1), CD44⁺CD25⁺ (DN2), CD44⁻CD25⁺ (DN3) und CD44⁻CD25⁻ (DN4). Während dieser Entwicklungsphasen findet zunächst das somatische Rearrangieren der β -Kette des T-Zell-Rezeptors statt. Dabei unterliegen bereits all diejenigen Zellen einer Selektion (sog. β -checkpoint), die keine funktionsfähige Vorstufe des TZR (pre-TCR) besitzen [zusammengefasst u.a. in von Boehmer, H. 2005].

Auf der Stufe der DP Thymozyten erfolgt nach dem Rearrangieren der α -Kette schließlich die Expression des reifen $\alpha\beta$ -T-Zell-Rezeptors ($\alpha\beta$ -TZR) auf der Zelloberfläche. Es folgen zwei weitere Auslesungsprozesse: bei der positiven Selektion gehen alle Zellen zugrunde, die Selbst-MHC-Moleküle nicht erkennen können [Bevan, M. J. 1977, von Boehmer, H. 1990, Guidos, C. J. 1996, Zinkernagel, R. M., et al. 1997, zusammengefasst u.a. in Goldrath, A. W., & Bevan, M. J. 1999]. Die negative Selektion ist ein aktiver Prozess, bei dem das Erkennen über MHC präsentierter körpereigener Peptide zur sofortigen Apoptose führt. Hierdurch wird erreicht, dass potentiell autoreaktive Zellen nicht in die Peripherie gelangen [Kappler, J. W., et al. 1987, Kisielow, P., et al. 1988, Bluthmann, H., et al. 1988, Robey, E., et al. 1994, zusammengefasst in Hogquist K. A., et al. 2005].

Bei weiterer Differenzierung verlieren die heranreifenden Zellen die Expression eines der beiden Korezeptoren des T-Zell-Rezeptors und reifen zu SP T-Zellen

heran. Diejenigen Zellen, deren TZR an MHC Klasse I Moleküle bindet, behalten die Expression von CD8 und werden zu CD4⁻CD8⁺ T-Zellen, sog. zytotoxischen T-Zellen. T-Helferzellen (Th-Zelle; CD4⁺CD8⁻) hingegen entstehen durch Verlust der Expression von CD8 bei Bindung ihres TZR an MHC Klasse II Moleküle. Hierbei spielen sowohl die Dauer, als auch die Intensität des resultierenden TZR-Signals eine entscheidende Rolle [Yasumoto, K., et al. 2000, Bruguera, E., et al. 2000].

Zwar kommt es während der Entwicklung der T-Zellen im Thymus zu einer Aussonderung autoreaktiver Zellen [Palmer, E., et al. 2003], doch ist diese Selektion nicht ganz lückenlos. Immer wieder gelangen Zellen, welche „selbst“ erkennen in die Peripherie. In den 90er Jahren konnte die Gruppe um Sakaguchi und Asano in der Maus zeigen, dass eine Subpopulation der CD4⁺ T-Zellen bei der Kontrolle autoreaktiver T-Zellen eine entscheidende Rolle spielt und bezeichnete diese Gruppe als regulatorische T Zellen (T_{reg}). Die T_{regs} stellen ca. 5-10 % der CD4 Population dar und exprimieren zusätzlich die IL-2 Rezeptor α -Kette (CD25) [Sakaguchi, S., et al. 1995, Asano, M., et al. 1996]. Später wurden die regulatorischen T-Zellen auch in der Ratte [Stephens, L. A., & Mason, D. 2000] und schließlich im Menschen beschrieben [Jonuleit, H., et al. 2001, Ng, W. F., et al. 2001].

Anhand ihrer Herkunft und unterschiedlichen suppressiven Wirkungsweise kann man die CD4⁺ regulatorischen T-Zellen in zwei Untergruppen einteilen, die induzierten und die natürlichen T_{regs} [Jonuleit, H., & Schmitt, E. 2003, Fallarino, F., et al. 2003, Karim, M., et al. 2004]. Letztere entstehen und reifen hauptsächlich im Thymus [Itoh, M., et al. 1999].

Weitere Studien enthüllten eine spezifische Rolle von FoxP3 in der Entwicklung und Funktion von natürlichen CD4⁺CD25⁺ T_{regs} [Hori, S., et al. 2003, Fontenot, J. D., et al. 2003, Khattri, R., et al. 2003, Fontenot, J. D., & Rudensky, A. Y. 2005]. Dies ermöglicht eine genauere Identifikation der natürlichen regulatorischen T-Zellen (CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺). FoxP3 ist ein 49-55 kDa schweres Protein und Mitglied der forkhead/winged-helix-Familie von Transkriptionsfaktoren und wurde identifiziert als genetischer Defekt in

sogenannten „scurfy“ Mäusen [Brunkow, M. E., et al. 2001]. Eine Störung der thymischen Produktion von T_{regs} führt zur Entstehung von Autoimmunkrankheiten [Sakaguchi, S. 2000, Shevach, E. M. 2000, Maloy, K. J., et al. 2001], was die zentrale Rolle dieser CD4 T-Zell-Subpopulation in der Aufrechterhaltung der immunologischen Toleranz gegenüber „Selbst“ deutlich widerspiegelt [zusammengefasst in Sakaguchi, S. 2004].

Im Gegensatz zu konventionellen T-Zellen sind die regulatorischen T-Zellen nicht in der Lage IL-2 zu produzieren, jedoch spielt eine parakrine Sekretion von IL-2 durch Effektor CD4 T-Zellen eine entscheidende Rolle für das Überleben und die Aktivierung peripherer T_{regs} [zusammengefasst u.a. in Hünig, T. 2007].

Die aktuelle Vorstellung über die Aktivierung von T-Zellen basiert auf einer Zwei-Signal-Theorie, die 1970 von Bretscher und Cohn zunächst für die B-Zell-Aktivierung postuliert und 1975 von Lafferty und Cunningham auf die T-Zellen erweitert wurde. Für die Aktivierung von T-Zellen ist eine spezifische Erkennung von Antigenen über die Interaktion von Peptid-präsentierenden-MHC-Molekülen und TZR Voraussetzung. Doch nur selten reicht das resultierende Signal („Signal 1“) aus, um alleine eine Proliferation und Differenzierung der T-Lymphozyten bewirken zu können [Viola, A., & Lanzavecchia, A. 1996]. Ohne weitere Signale gehen die Lymphozyten vielmehr in einen anergen Zustand über oder werden apoptotisch [Lenschow, D. J., et al. 1996, Appleman, L. J., & Boussiotis, V. A. 2001, Seroogy, C. M., & Fathman, C. G. 2003].

Um proliferieren und zu Effektorzellen differenzieren zu können, benötigen T-Lymphozyten ein weiteres Signal („Signal 2“). Dieses sog. kostimulatorische Signal ist von der Antigenpräsentation unabhängig und wird über akzessorische Oberflächenmoleküle auf T-Zellen generiert. Hierzu gehören eine Vielzahl von Rezeptor-Ligand-Paaren, wie z.B. LFA-1 – ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3, VLA-4 – VCAM-1, CD40 – CD40L, ICOS – ICOSL, PD-1 – PD-L1, PD-L2, CD28 – B7-1/ B7-2.

CD28 ist nicht nur das am besten charakterisierte, sondern auch das effektivste und somit wichtigste kostimulatorische Molekül bei der Aktivierung und

Toleranzentwicklung von T-Zellen [Hara, T., & Fu, S. M. 1985, zusammengefasst u.a. in Alegre, M. L. 2001, Sharpe, A. H., & Freeman, G. J. 2002].

Es handelt sich hierbei um ein 44 kDa schweres homodimeres Glykoprotein, das in der Maus auf nahezu allen $\alpha\beta$ -T-Zellen nachweisbar ist [Gross, J. A., et al. 1990]. Die Expression von CD28 ist nicht statisch, sondern nimmt in hohem Maße bei der Aktivierung einer T-Zelle zu, wobei sich die Dichte an CD28 Molekülen besonders an der immunologischen Synapse erhöht [Turka, L. A., et al. 1990, Bromley, S. K., et al. 2001].

Auch während der Reifung der Thymozyten ist seine Expression streng reguliert. Die höchste Dichte an CD28-Rezeptoren findet man in der Maus auf DP Thymozyten, bei weiterer Differenzierung zu reifen SP T-Zellen nehmen diese wieder etwas ab. Analysen der Subpopulationen der DN Thymozyten in der Maus zeigen eine sehr geringe Expression von CD28 auf DN1, DN2 und den meisten DN3. Diejenigen DN3 hingegen, die bereits die β -Kette des TZR exprimieren, sowie DN4 Thymozyten zeigen eine ähnlich hohe Expression von CD28 wie DP Thymozyten [Gross, J. A., et al. 1992, Williams, J. A., et al. 2005]. Im Gegensatz zur Maus exprimieren die DP Thymozyten der Ratte und des Menschen nur wenig CD28 auf der Zelloberfläche [Hansen, J. A., et al. 1980, Lum, L. G., et al. 1982, Tacke, M., et al. 1995].

Nach Aktivierung über CD28 erhöht die T-Zelle die Produktion verschiedener Zytokine, wie z.B. IL-2, IL-4, IL-5 etc. [Lenschow, D. J., et al. 1996]. Dies geschieht sowohl durch eine erhöhte Transkription, als auch durch eine Stabilisierung der jeweiligen messenger RNA (mRNA) [Lindsten, T. 1989]. Ferner reduziert die Bindung von CD28 auf T-Zell-Niveau die Anzahl von TZR, die aktiviert werden müssen, damit die Zelle effektiv Zytokine produzieren bzw. in Proliferation übergehen kann, d.h. die Schwelle für die T-Zell-Aktivierung wird herabgesetzt [Viola, A., & Lanzavecchia, A. 1996, Itoh, Y., & Germain, R. N. 1997]. Eine weitere Funktion von CD28 liegt in der Induktion von $bcl-x_L$, einem Mitglied der anti-apoptotischen bcl-2 Familie, wodurch sich das Überleben der T-Zelle verbessert [Boise, L. H. 1993]. Letztlich gibt es auch einige Hinweise darauf, dass durch Ligation von CD28 die Differenzierung von T-Zellen zu IL-4

produzierenden Typ-2 T-Helferzellen (T_H2) gefördert werden könnte [Rulifson, I. C. 1997].

Zwar wird die *in vivo* T-Zell-Differenzierung und die Gesamtzahl an T-Zellen in Abwesenheit eines CD28 Signals nicht beeinträchtigt, jedoch reduziert sich die Anzahl an $CD4^+CD25^+$ regulatorischen T-Zellen um etwa 80%. Auch für das Überleben der T_{regs} in der Peripherie ist eine Stimulation über CD28 ein essentieller Faktor [Salomon, B., et al. 2000, Bour-Jordan, H., & Bluestone, J. A. 2002, Lohr, J., et al. 2003, Tang, Q., et al. 2003, Sansom, D. M., & Walker, L. S. 2006]. Die Reduktion von thymischen T_{regs} in $CD28^{-/-}$ [Tai, X., et al. 2005], jedoch nicht in $IL2^{-/-}$ -Mäusen [D´Cruz, L. M., & Klein, L. 2005, Fontenot, J. D., et al. 2005], lässt vermuten, dass während der Entwicklung im Thymus ein CD28 Signal in *cis* benötigt wird, nicht hingegen eine Bindung von IL-2 in *trans*. Für das Überleben und die Aktivierung von T_{regs} in der Peripherie wird zusätzlich ein CD28 Signal in *trans* benötigt um die parakrine Sekretion von IL-2 durch Effektor T-Zellen zu ermöglichen.

Neuere Arbeiten hingegen lassen auf gegenteilige Aspekte schließen [Dai, S., et al. 2008, Ishizuka, J., et al. 2008].

Die physiologischen Liganden B7-1 (CD80) und B7-2 (CD86) besitzen beide eine Immunglobulin C-ähnliche Domäne und überschneiden sich auch weitestgehend in ihren Funktionen [McAdam, A. J., et al. 1998]. Der größte Unterschied zwischen ihnen liegt wohl in der unterschiedlichen Expression auf verschiedenen Antigen präsentierenden Zellen (APZ) und auch zu verschiedenen Zeitpunkten der Immunantwort. Auf den meisten Populationen von APZ ist B7-2 konstitutiv in geringem Level exprimiert und wird nach erfolgter Aktivierung rasch hochreguliert. B7-1 hingegen ist induzierbar und wird erst zu einem späteren Zeitpunkt exprimiert [Freeman, G. J., et al. 1993, Hathcock, K. S., et al. 1994]. Die frühere Expression von B7-2 deutet darauf hin, dass es der wichtigere Kostimulator von beiden bei der Initiierung der Immunantwort ist.

Innerhalb des Thymus ist die Expression von B7-1 und B7-2 streng reguliert. Man findet sie sowohl auf kortikalen epithelialen Zellen [Zheng, X., et al. 2004], sowie auf medullären epithelialen und dendritischen Zellen [Inaba, K., et al.

1995, Nelson, A. J., et al. 1993], wobei die Expression der beiden Liganden im thymischen Kortex, in dem die frühen Entwicklungsstadien der T-Zell-Entwicklung stattfinden, sehr eingeschränkt ist.

Die Verwendung spezifischer monoklonaler Antikörper (mAk) in experimentellen Arbeiten stellt nicht nur ein gängiges Verfahren dar, um Oberflächenrezeptoren zu quantifizieren und biochemisch zu charakterisieren, sondern sie werden auch genutzt, um als „künstliche“ Liganden die Funktion der jeweiligen Rezeptoren zu triggern bzw. zu blockieren.

In Bezug auf CD28 benutzt man schon seit Langem stimulatorische mAk um die Mechanismen der Kostimulation in Mensch, Maus und Ratte zu erforschen. Bei der Entwicklung CD28-spezifischer mAk im Rattenmodell isolierte die Arbeitsgruppe um Professor Hünig neben konventionellen auch „superagonistische“ mAk. Diese besitzen im Gegensatz zu den konventionellen CD28 mAk die besondere Fähigkeit ohne zusätzliche Stimulation des TZR eine volle Aktivierung von T-Zellen herbeizuführen (Abb. 1) [Tacke, M., et al. 1997]. Solche Superagonisten wurden mittlerweile auch für den Menschen [Siefken, R., et al. 1997, Lühder, F., et al. 2003] und Mäuse [Dennehy, K. M., et al. 2006] generiert.

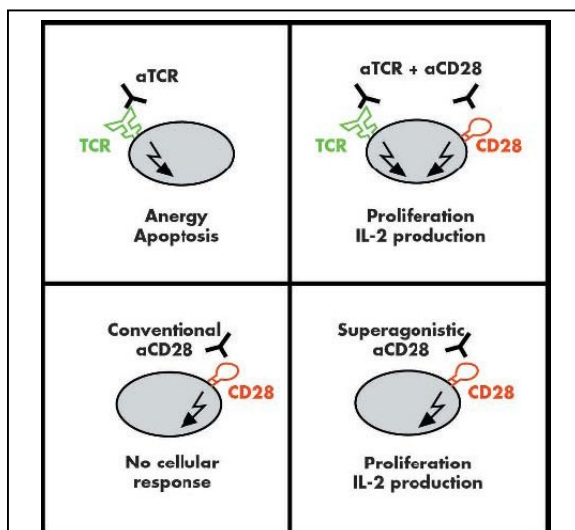


Abbildung 1 Zwei Klassen CD28 spezifischer mAk: „konventionelle“ und „superagonistische“.

(entnommen aus Beyersdorf, N., et al. 2005)

Bei der Untersuchung der Bindungsstellen am CD28 Molekül stellte man fest, dass alle untersuchten konventionellen mAk an einer von der Zellmembran entfernteren Region des CD28 Moleküls binden, die Nahe der Bindungsstelle von B7 (sog. MYPPPY Motiv) liegt (Abb. 2a) [Lühder, F., et al. 2003, Dennehy, K. M., et al. 2006]. Im Gegensatz hierzu binden super-agonistische anti-CD28 mAk einen seitlichen, der Membran

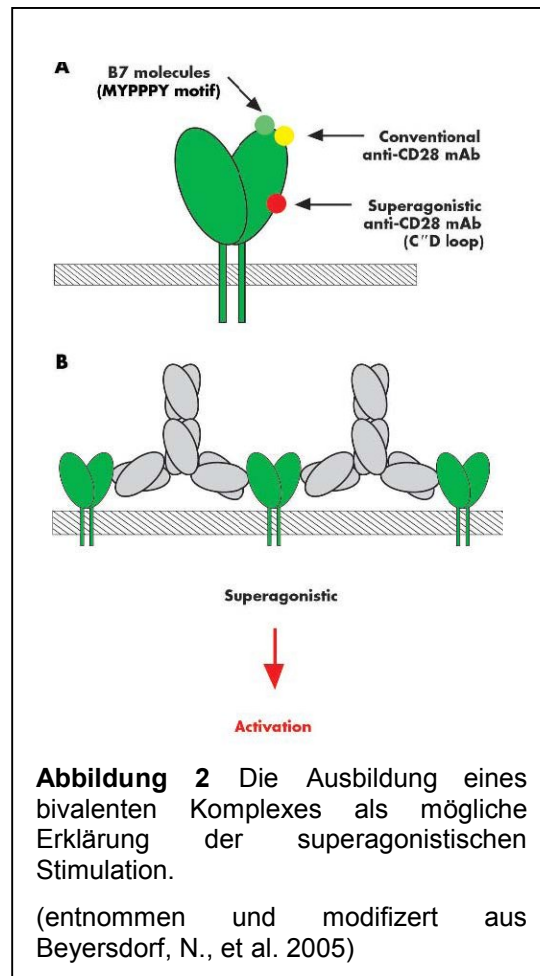
näher gelegenen Part des Moleküls (sog. C'D loop) (Abb. 2a), was ihnen ermöglicht eine Quervernetzung von CD28 Molekülen auszubilden (Abb. 2b) [Evans, E. J., et al. 2005, Dennehy, K. M., et al. 2006].

Es wird vermutet, dass hierdurch eine CTLA-4 ähnliche bivalente Interaktion [Collins, A. V., et al. 2002] zwischen benachbarten CD28-Molekülen und den superagonistischen mAb und somit eine Voraussetzung für eine Anhäufung stimulatorischer Signale zu einem starken Aktivierungssignal geschaffen wird [Beyersdorf, N., et al. 2005].

Die superagonistische anti-CD28 Stimulation funktioniert nicht nur in vitro, sondern auch in vivo. So führt die

Applikation des CD28 Superagonisten bei Ratten [Tacke, M., et al. 1997] und Mäusen [Gogishvili, T., et al. 2009] zu einer vorübergehenden, aber signifikanten Erhöhung der Gesamtanzahl an T-Zellen. Die Zellzahlen steigen dabei auf das bis zu Vierfache ihres Ausgangswertes an, größtenteils verursacht durch eine Zunahme von CD4 positiven T-Zellen und B-Zellen. Es wurde gezeigt, dass der letztere Anstieg indirekt als Folge der Aktivierung der CD4 T-Zellen resultierte. Andere Zellpopulationen, wie CD8⁺ T-Zellen, γ/δ T-Zellen und NK-Zellen, waren auch betroffen, jedoch in geringerem Ausmaß [Tacke, M., et al. 1997]. Diese Lymphozytose scheint im Tiermodell von gutartiger Natur zu sein und wird gut toleriert von den Versuchstieren [Rodriguez-Palermo, M., et al. 1999, Gogishvili, T., et al. 2009].

Genauere Untersuchungen der CD4 Population zeigten eine verhältnismäßig stärkere Zunahme von regulatorischen CD4⁺CD25⁺ T-Zellen (T_{reg}) im Vergleich



zu konventionellen CD4⁺CD25⁻ T-Zellen [Lin, C. H., & Hünig, T. 2003]. Durch CFSE-markierte Transferexperimente mit gereinigten CD4⁺CD25⁻ bzw. CD4⁺CD25⁺ T-Zellen konnte dargelegt werden, dass obgleich beide Populationen stark proliferierten, ihr jeweiliger Phänotyp beibehalten wurde. Die in-vivo Applikation von CD28 Superagonisten führte somit vorzugsweise zu einer Expansion und starken Aktivierung von natürlich auftretenden CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺CTLA-4^{high} T_{reg}-Zellen [zusammengefasst in Beyersdorf, N., et al. 2005 und 2006, sowie Hünig, T., et al. 2005]. Diese Daten konnten neuerdings auch an Mäusen bestätigt werden [Gogishvili, T., et al. 2009].

Im menschlichen Organismus hingegen führte die Applikation des CD28 Superagonisten TGN1412 im Rahmen einer Phase I Studie zu einer lebensbedrohlichen Zytokinfreisetzung bei sechs gesunden Probanden [Suntharalingam, G., et al. 2006, Hanke, T. 2006, Stebbings, R., et al. 2007].

Hinsichtlich seiner Auswirkungen auf das T-Zell-Kompartiment wurde der CD28 Superagonist durch die Arbeitsgruppe um Professor Hünig in der Literatur bereits beschrieben. Ziel der vorliegenden Arbeit war die Einbeziehung des Thymus, in dem die T-Zellen, und insbesondere auch die natürlichen T_{regs}, heranreifen. Hierzu wurde neben dem superagonistischen α -mouse CD28 mAk (D665) auch ein blockierender α -mouse CD28 mAk (E18) in verschiedenen in vitro und vivo Experimenten verwendet, um einen Einfluss der verschiedenen CD28 Antikörper auf die Entwicklung der T-Zellen zu analysieren.

Ein weiteres Ziel der Arbeit war die Untersuchung der Auswirkungen einer chronischen Blockade des CD28 Rezeptors auf die Homöostase der T-Zellen.

MATERIAL UND METHODEN

Mauslinien

Die verwendeten Mauslinien entstammen entweder aus der hausinternen Tierzucht des Instituts für Virologie und Immunbiologie der Universität Würzburg oder wurden über die Firma Harlan-Winkelmann aus Borcheln bestellt.

Tierstamm	Herkunft
C57Bl/6	Institut für Virologie und Immunbiologie der Universität Würzburg
CD28 r/m transgene Mäuse [Dennehy, K. M., et al. 2007]	
Rag-1-defiziente Mäuse [Mombaerts, P., et al. 1992]	
BALB/cOlaHsd	Firma Harlan-Winkelmann, Borcheln
Gravide C57Bl/6JOlaHsd	

Organentnahmen und Einzelzellsuspensionen

Unmittelbar nach dem Töten der zu analysierenden Mäuse mittels einer gesättigten CO₂-Atmosphäre erfolgte die Präparation der einzelnen Organe: Thymus, Milz und Lymphknoten (LK). Letztere wurden aus folgenden Regionen entfernt: submandibulär, axillär, brachial, mesenterial, inguinal sowie lumbal. Die entnommenen Organe wurden anschließend in 15 ml balancierte Salzlösung mit Zusatz von 0,2% Rinderserumalbumin (BSS/ BSA) gegeben und auf Eis gekühlt.

Zur Herstellung von Einzelzellsuspensionen wurden die einzelnen Organe jeweils durch Nylon-Siebe (Maschengröße: 70 µm; Fa. BD Pharmingen™, Heidelberg) gerieben und anschließend wieder in BSS/ BSA-Medium aufgenommen.

Um die in der Milz befindlichen Erythrozyten zu lysieren wurde das Sediment deren Einzelzellsuspension je in 1 ml Red Blood Cell Lysing Buffer (Fa. Sigma-

Aldrich, Steinheim) resuspendiert. Nach 3 min wurde die Lyse durch Zugabe von 15 ml BSS/ BSA gestoppt.

Die Einzelzellsuspensionen aller Organe wurden nun gewaschen. Dies erfolgte jeweils durch eine 5-minütige Zentrifugation mit 1500 Umdrehungen pro Minute (rpm) bei 4°C. Nach Absaugen der Überstände wurden die Zell-Sedimente wieder in 20 ml BSS/ BSA aufgenommen und anschließend resuspendiert. Dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt.

Blutentnahmen

Die Blutentnahmen erfolgten durch Dr. Karin Elflein jeweils aus den venösen Plexen der Orbita. Hierzu wurden die Versuchstiere zunächst mittels volatiler Anästhetika narkotisiert. Sodann wurden einige Tropfen Blut gewonnen, indem eine feine heparinisierte Glaskapillare entlang des medialen Orbitarandes in die venösen Plexen eingeführt wurde.

An getöteten Tieren erfolgte die Blutentnahme durch eine gezielte Punktion der rechten Herzkammer.

In-vivo Behandlung mit monoklonalen α -CD28 Antikörpern

Die Injektion der monoklonalen α -CD28 Antikörper (mAk) D665 bzw. E18 erfolgte intraperitoneal (i.p.) in den linken unteren Quadranten des Abdomens. Je nach Versuchsaufbau variierten hierbei die Menge der Antikörper bzw. die Zeitdauer zwischen Injektion und Analyse der Organe. Den Kontrolltieren wurde entweder ein Isotyp-Kontroll-Ak , MOPC31c, oder steriles PBS injiziert.

Organkulturen

Neonatale-Thymus-Organ-Kultur (NTOC)

Am Tag ihrer Geburt wurden neugeborene Mäuse getötet. Anschließend erfolgte die Präparation der einzelnen Lobi des Thymus. Diese wurden mit einer Pinzette sauber separiert und anschließend getrennt voneinander auf je einen Whatman® Membranfilter (Fa. Herolab, Wiesloch) gegeben. Anschließend erfolgte eine Inkubation der Organe in RPMI 1640-Medium (Fa. Gibco, Gaithersburg, USA; supplementiert mit 50 ml SC und 25 ml FSC je 500 ml) bei 37°C und 5% CO₂ für 6 Tage. Hierbei war es wichtig, dass sich die einzelnen Lobi für den gesamten Zeitraum auf den Filtern befanden und nicht frei im Medium schwammen.

Den Medien wurden anfangs jeweils 10 µg/ml der α-CD28 Antikörper D665, E18 oder der Isotyp-Kontrolle, MOPC31c, beigemischt, wobei darauf geachtet wurde, dass sich je ein Lobus in der Versuchsgruppe (D665 bzw. E18) und der dazugehörige Lobus in der Kontrollgruppe (MOPC31c) befand. Nach 6 Tagen Inkubation wurden die Lobi vom Filter genommen und Einzelzellsuspensionen (siehe oben) hergestellt.

Fetale-Thymus-Organ-Kultur (FTOC)

Bei der Firma Harlan-Winkelmann, Borcheln, wurde eine gravide Maus bestellt. Genau 16 Tage nach deren Verpaarung wurde das Muttertier getötet und die Feten aus dem Uterus entnommen. Die Präparation der fetalen Thymi (Entwicklungstag 16, E16) wurde unter einem Auflichtmikroskop bei zwanzigfacher Vergrößerung durchgeführt. Aufgrund der geringen Organgröße wurden die einzelnen Lobi nicht voneinander getrennt, sondern der Thymus als Ganzes inkubiert.

Die restlichen Arbeitsschritte gleichen denen der NTOC.

Anreicherung von Zellsubpopulationen

Zelldepletion durch IgM-vermittelte Komplementaktivierung

Zur Isolation CD4⁻CD8⁻-Thymozyten (DN) mussten die im Thymus befindlichen reiferen Stufen der T-Zellentwicklung, nämlich CD4⁺, CD8⁺ sowie CD4⁺CD8⁺ (DP) T-Zellen, depletiert werden. Hierzu wurde wie folgt vorgegangen:

Nach Herstellung von Einzelzellsuspensionen wurden ca. 2×10^8 Thymozyten in 10 ml BSS gewaschen und anschließend mittels je 1 ml eines Überstandes von α -CD4 IgM, sowie α -CD8 IgM produzierender B-Lymphozyten (hausinterne Herkunft) resuspendiert. Nach einer Inkubationsphase von 30 min auf Eis wurde mit 10 ml BSS gewaschen, und das Zellsediment in 3 ml BSS resuspendiert. Hierzu wurden nun 333 μ l einer Komplement-Lösung (Fa. Cedarlane, Ontario, Canada) gegeben und es schloss sich eine 45-minütige Lyse-Phase im 37°C warmen Wasserbad an. Anschließend erfolgten zwei weitere Waschschrte in je 10 ml BSS um die somit isolierten DN-Thymozyten vom Zelldetritus der lysierten Zellen zu trennen. Eine Überprüfung auf Reinheit der isolierten Zellen wurde mittels FACS-Färbung durchgeführt.

Zelldepletion durch magnetische Zellsortierung (Auto-MACS[®])

Ein anderes, schonenderes, Verfahren zur Isolation DN-Thymozyten erfolgte durch magnetische Zellsortierung mittels eines Auto-MACS[®]-Gerätes (Fa. Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach). Hierzu wurden 3×10^8 Thymozyten in 500 μ l BSS/ BSA aufgenommen und 10 μ l eines PE-konjugierten α -CD4 Ak sowie 20 μ l eines PE-konjugierten α -CD8 Ak hinzugegeben. Nach einer Inkubationsdauer von 20 min bei 4°C erfolgten zwei Waschschrte mit 10 ml BSS/ BSA. Die Zellen wurden nun in 500 μ l BSS/ BSA aufgenommen und es wurden 150 μ l Anti-PE-MicroBeads[®] (Fa. Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach) beigemischt. Anschließend erfolgte eine 15-minütige Inkubationsphase bei 4°C. Nach zwei weiteren Waschschrten mit jeweils 10 ml BSS/ BSA wurden die Zellen letztlich durch ein Zellsieb (Maschengröße: 70 μ m; Fa. BD

Pharming™, Heidelberg) gespült um entstandene Zelltrümmer zu entfernen. Die Zelldepletion wurde nun vollautomatisch nach entsprechender Programmierung des Auto-MACS[®]-Gerätes durchgeführt.

Auch hierauf erfolgte eine Überprüfung der Reinheit der isolierten DN-Zellen mittels FACS-Färbung.

Separation mononukleärer Zellen aus peripherem Blut mittels Lympholyte[®]

Direkt nach der Blutentnahme wurden einige Tropfen Blut in 300 µl PBS-EDTA [1mM] gegeben. Diese wurden anschließend vorsichtig mit 300 µl Lympholyte[®] (Fa. Cedarlane, Ontario, Canada) unterschichtet. Nach 15-minütigem Zentrifugieren mit 1500 rpm bei Raumtemperatur konnten die mononukleären Zellen als Grenzschicht zwischen den beiden Phasen (PBS und Lympholyte[®]) mit einer Pipette abgesaugt werden. Sodann wurden die Zellen mit 3 ml BSS gewaschen und konnten anschließend mittels FACS-Färbung analysiert werden.

Zellkulturen

Suspensionskulturen von isolierten CD4⁺CD8⁻ Thymozyten

Für die Kultivierung DN-Thymozyten wurden 6-Napf-Zellkulturplatten (Fa. Greiner Bio-One, Solingen) verwendet. Diese wurden zuvor über Nacht mit je 1 ml Sekundärantikörper (Goat- α -mouse-IgG, G α IgG; 50 µg/ml in 50 mM Na₂CO₃/ NaHCO₃) bei 4°C inkubiert. Danach wurde die Antikörperlösung wieder abgenommen (mehrmalige Verwendung) und die Näpfe wurden jeweils zweimal mit 4 ml BSS gewaschen. In alle Näpfe wurde nun 4,75 µl (30 µM) des Pan-Caspase-Inhibitors, Z-VAD (Fa. Sigma-Aldrich, Steinheim) gegeben. Anschließend wurden 6x10⁶ isolierte DN-Zellen in 2,5 ml x-vivo[®]15 (Fa. Bio Whittaker, Verviers, Belgien, supplementiert mit 50 ml SC je 500ml) für 2 bzw. 3 Tage inkubiert bei 37°C und 5% CO₂.

Je nach Behandlung wurde den Medien zuvor 20 µg/ml der α-CD28 Antikörper D665, E18 oder der Isotyp-Kontrolle, MOPC31c, beigemischt.

In-vitro Differenzierung von T-Zellen auf OP9 Stromazellen

Zunächst wurden 5×10^4 OP9 Zellen in 0,5 ml OP9-Medium (MEM, Fa. Gibco Gaithersburg, USA, supplementiert mit 20% FCS) in 24-Napf-Zellkulturplatten (Fa. Greiner Bio-One, Solingen) ausplattiert und bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurde das Medium vorsichtig abgesaugt, wobei darauf geachtet wurde, dass sich die konfluenten OP9 Zellen nicht voneinander bzw. vom Boden der Platten lösten. Anschließend wurden je Napf 6×10^3 über Auto-MACS[®] isolierte DN-Thymozyten in 0,5 ml RPMI-Medium (supplementiert mit 50 ml SC und 25 ml FCS je 500 ml) hinzupipetiert.

Die Inkubationsdauer in diesem OP9 Kokultur-System betrug 6 Tage bei 37°C und 5% CO₂. Das Ernten der Zellen erfolgte durch kräftiges Pipetieren und mehrmaligem Waschen der Platten mit FACS-Puffer. Anschließend wurden die Zellen mittels FACS-Färbung analysiert.

Antikörper

Unkonjugierte Antikörper

Zielantigen (Klon)	Hersteller/ Herkunft
mouse CD28 mAb D665, superagonistisch	*, [Dennehy, K.M., et al. 2006]
mouse CD28 mAb E18, konventionell	*, [Dennehy, K.M., et al. 2006]
hamster anti-mouse CD28-LE/AF (PV-1)	[Abe, R., et al. 1995]
rat CD28 mAb JJ316, superagonistisch	*, [Tacke, M., et al. 1997]

* Institut für Virologie und Immunbiologie der Universität Würzburg

FITC-konjugierte Antikörper

Zielantigen (Klon)	Hersteller/ Herkunft
BrdU	BD Pharmingen™, Heidelberg
CD3 (17A2)	BD Pharmingen™, Heidelberg
CD4 (L3T4) (RM4-5)	BD Pharmingen™, Heidelberg
CD8 α (Ly-2) (53-6.7)	BD Pharmingen™, Heidelberg
CD44 (Pgp-1, Ly-24) (IM7)	BD Pharmingen™, Heidelberg
rat CD28mAb JJ319, konventionell	*, [Tacke, M., et al. 1995]

* Institut für Virologie und Immunbiologie der Universität Würzburg

PE-konjugierte Antikörper

Zielantigen (Klon)	Hersteller/ Herkunft
CD45R/B220 (RA3-6B2)	BD Pharmingen™, Heidelberg
CD8 α (Ly-2) (53-6.7)	BD Pharmingen™, Heidelberg
CD25 (IL-R α chain, p55) (PC61)	BD Pharmingen™, Heidelberg

PerCP-konjugierte Antikörper

Zielantigen (Klon)	Hersteller/ Herkunft
CD4 (L3T4) (RM4-5)	BD Pharmingen™, Heidelberg

APC-konjugierte Antikörper

Zielantigen (Klon)	Hersteller/ Herkunft
CD8 α (Ly-2) (53-6.7)	BD Pharmingen™, Heidelberg
CD25 (IL-2R α chain, p55) (PC61)	BD Pharmingen™, Heidelberg
FoxP3 (FJK-16s)	eBioscience™, San Diego, USA

Biotinylierte Antikörper

Zielantigen (Klon)	Hersteller/ Herkunft
CD8 α (Ly-2) (53-6.7)	BD Pharmingen™, Heidelberg
CD25 (IL-2R α chain, p55) (7D4)	BD Pharmingen™, Heidelberg

Sekundärantikörper und Polyklonale Seren

Zielantigen (Klon)	Hersteller/ Herkunft
Donkey- α -mouse-IgG-PE	Dianova, Hamburg
Goat- α -mouse-IgG, G α mIgG	Sigma-Aldrich, Steinheim
Goat- α -Syrian-hamster-IgG-FITC, G α hIgG	Dianova, Hamburg
MOPC31c (Maus IgG1, κ) [Ono, M., et al. 1977]	BD Pharmingen™, Heidelberg
Normal-mouse-Immunglobulins (nMlg)	Sigma, Deisenhofen
Sheep- α -mouse-IgG-FITC, Sh α mIgG	The Binding Site, Birmingham, UK
Streptavidin-APC	BD Pharmingen™, Heidelberg

Färbungen zur Analyse an einem FACSCalibur® Durchflusszytometer

Alle Reagenzien und Antikörper wurden in sättigender Konzentration verwendet, titriert auf 1×10^6 Zellen in 100 μ l Färbevolumen.

Oberflächenfärbungen

Zunächst wurden 1×10^6 der zu analysierenden Zellen in FACS-Röhrchen (Fa. Greiner Bio-One, Solingen) samt 3 ml FACS-Puffer (PBS/0,1%BSA/0,01%NaN₃) überführt. Nach 5-minütiger Zentrifugation bei 4°C und 1500 rpm wurden die Überstände abgeschüttet (= Waschen) und das Zellsediment zur Blockade von Fc-Rezeptoren in 50 μ l (20 μ g/ml) nMlg für 15 min bei 4°C inkubiert. Auf den zuletzt erwähnten Schritt konnte bei den Färbungen von

Thymozyten verzichtet werden. Ohne weiteres Waschen wurden dann 50 μ l (bzw. 100 μ l bei Thymozyten-Färbungen) eines vorverdünnten Gemisches aus direkt konjugierten Antikörpern hinzupipetiert. Verwendung fanden für eine Vierfarbenfluoreszenz FITC-, PE-, PerCP-, APC- bzw. biotinylierte Antikörper. Nach 20-minütiger Inkubation bei 4°C schloss sich ein Waschschrift an. Bei Verwendung biotinylierter Antikörper erfolgte ein weiterer Färbeprozess mit 100 μ l vorverdünnten APC-konjugierten Streptavidin-Antikörpern.

Nach einem finalen Waschschrift wurden die Zellsedimente in 250 μ l FACS-Puffer resuspendiert und anschließend am FACSCalibur[®] analysiert. Erfolgte die Messung nicht unmittelbar nach Beendigung der Färbungen, so wurden die Zellen mit PBS/1% Formaldehyd fixiert.

Färbungen zur Detektion an der Oberfläche gebundener α -CD28 mAk

Um die α -CD28 mAk, D665 bzw. E18, an der Zelloberfläche der zu analysierenden Lymphozyten detektieren zu können, musste der Oberflächenfärbung ein gesonderter Färbeprozess vorangeschaltet werden. Hierbei wurden die Zellen zunächst mit 100 μ l vorverdünnten donkey- α -mouse-IgG-PE inkubiert, das sich an die Fc-Stücke der an der Zelloberfläche gebundenen D665- bzw. E18-Ak anlagerte.

Nach einem Waschschrift und anschließender Blockade mit 50 μ l (20 μ g/ml) nMlg wurde dann wie oben beschrieben fortgefahren.

Intrazelluläre Färbungen

Zunächst wurden die Oberflächenfärbungen (siehe oben) durchgeführt. Nach dem letzten Waschschrift wurde das Zellsediment in 250 μ l frisch zubereiteter Fix/Perm working solution (1 Teil Fixation/Permeabilization Concentrate auf 3 Teile Fixation/Permeabilization Diluent, Fa. eBioscience, San Diego, USA) resuspendiert und kräftig gevortext. Durch eine 30-minütige Inkubation im Dunklen bei Raumtemperatur (bzw. über Nacht bei 4°C) wurden die Zellen fixiert und permeabilisiert. Hierauf folgten mehrere Waschschriffe: zunächst

einer mit 3 ml FACS-Puffer, gefolgt von zwei Waschschritten mit je 1 ml frisch zubereitetem Permeabilization Buffer (1 Teil 10X Permeabilization Buffer, Fa. eBioscience, San Diego, USA, auf 9 Teile ddH₂O). Sodann erfolgte die intrazelluläre Färbung mit in 50 µl Permeabilization Buffer verdünnten FoxP3-APC mAk. Die Inkubationsdauer für die intrazelluläre Färbung betrug 30 min bei 4°C. Nach zwei weiteren Waschschritten mit je 1 ml frisch zubereitetem Permeabilization Buffer erfolgte die Resuspension der Zellsedimente in 250 µl FACS-Puffer und anschließend die Analyse am FACSCalibur®.

Intranukleäre BrdU-Färbungen

BALB/c-Mäusen wurde dreimal im Abstand von 8 Stunden jeweils 100 µl (1 mg) BrdU (Fa. BD Pharmingen™, Heidelberg) i.p. injiziert. Weitere 8 Stunden nach der letzten Injektion erfolgten die Organentnahme, das Herstellen von Einzelzellsuspensionen sowie die Oberflächenfärbungen wie oben beschrieben. Anschließend wurde das Zellsediment in 100 µl Cytofix/Cytoperm™ Puffer (Fa. BD Pharmingen™, Heidelberg) resuspendiert und die Zellen hierdurch während einer 20-minütigen Inkubationsphase bei Raumtemperatur fixiert und permeabilisiert. Sodann wurden die Zellen mit 1 ml Perm/Wash™ Puffer (Fa. BD Pharmingen™, Heidelberg) gewaschen, gefolgt von einer 10-minütigen Inkubation in 100 µl Cytoperm™ Plus Puffer (Fa. BD Pharmingen™, Heidelberg) auf Eis. Zwischen zwei weiteren Waschschritten in 1 ml Perm/Wash™ Puffer erfolgte eine Re-Fixation der zu analysierenden Zellen mit 100 µl Cytofix/Cytoperm™ Puffer für 5 Minuten bei Raumtemperatur. Danach wurden die Zellen in 100 µl DNase (Fa. BD Pharmingen™, Heidelberg) für eine Stunde bei 37°C inkubiert, um das inkorporierte BrdU einer Färbung zugänglich zu machen. Ein weiteres Mal wurde mit 1 ml Perm/Wash™ Puffer gewaschen. Sodann erfolgte die intranukleäre Färbung mit in 50 µl Perm/Wash™ Puffer verdünnten BrdU-FITC mAk für 20 min bei Raumtemperatur.

Vor der Analyse am FACSCalibur[®] wurde abschließend noch mit 1 ml Perm/Wash[™] Puffer gewaschen und die Zellen letztlich in 250 µl FACS-Puffer aufgenommen.

Ex-vivo Stimulationen und Proliferationstests

Je 2×10^5 ungetrennte Lymphknoten- oder Milzzellen pro Napf wurden auf 96-Napf-Kulturplatten (Fa. Greiner Bio-One, Solingen) mit Rundböden aufgetragen. Für die einzelnen Stimulationen kamen folgende Substanzen zur Anwendung: α -CD3 [0,5 µg/ml], D665 [10 µg/ml], Concanavalin A (ConA, Fa. Sigma-Aldrich, Steinheim) [5 µg/ml] oder SEB [0,5 µg/ml] (Fa. Sigma-Aldrich, Steinheim, bzw. verschiedene Verdünnungen eines Überstandes SEB produzierender Zellen, hausinterne Herkunft).

Nach 48 Stunden Inkubation bei 37°C und 5% CO₂ folgte die Zugabe von 25 µl ³H-Thymidin/Napf [1,0 mCi/ml] (Fa. MP Biomedicals Europe, Illkirch, Frankreich) und eine weitere 16-stündige Phase im Brutschrank bei den genannten Bedingungen.

Anschließend wurden die Zellen mit Hilfe eines Betaplate[™] Harvester (Fa. Wallac Oy, Turku, Finnland) auf einen Glasfaserfilter geerntet. Nach einer Trockenphase von 2 Stunden bei 37°C wurden die Filter mit 10 ml Szintillationsflüssigkeit getränkt und in eine Plastikhülle eingeschweißt. Mittels eines Betaplate[™] Szintillationszählers (Fa. Wallac Oy, Turku, Finnland) wurde nun der radioaktive Zerfall des ³H-Thymidins gemessen und als Zerfallzahl pro Minute (cpm) angegeben. Diese ist proportional zur Proliferationsrate der Zellen, die das ³H-Thymidin in neugebildete DNS einbauten.

Bestimmung von zirkulierenden Auto-Antikörpern in Mausseren mittels indirekter Immunfluoreszenz

Gewinnung von Serum aus peripheren Blutproben

Direkt nach der Blutentnahme wurden einige Tropfen Blut in spezielle Serum-Röhrchen (Fa. BD Pharmingen™, Heidelberg) gegeben. Nachdem der Gerinnungsprozess der Plättchen und Gerinnungsfaktoren abgeschlossen war (1h bei RT), konnte das Serum im Anschluss an ein 5-minütiges Zentrifugieren bei 10000 rpm als Überstand abpipetiert und weiterverwendet werden.

Immunfluoreszenzfärbung der Seren zur Detektion zirkulierender Auto-Ak

Das Screening der Mausseren umfasste die folgenden vier häufigsten Autoantikörper: antinukleäre Antikörper (ANA), anti-mitochondriale Antikörper (AMA), Antikörper gegen die glatte Muskulatur (ASMA/ GMA) und Antikörper gegen Magenparietalzellen (AGPCA). Für die Durchführung der Tests wurden Kits der Firma The Binding Site (Birmingham, UK) verwendet, in denen alle benötigten Materialien vorhanden waren.

Zunächst wurden die gewonnenen Mausseren im Verhältnis 1:20 mit PBS-Puffer verdünnt und anschließend daraus eine serielle Verdünnungsreihe erstellt. Sodann wurden je 50 µl der verdünnten Mausseren und ein Tropfen der Kontrollen auf Objektträger mit Maus-Leber-Niere-Magen-Gefrierschnitten aufgetragen. Gleichermaßen wurde zusätzlich mit Ratten-Leber-Niere-Magen-Gefrierschnitten verfahren. Nach einer 20-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer, wurden die Objektträger rasch mit PBS-Puffer gewaschen und für 10 min in einem PBS-Pufferbad belassen. Anschließend wurden die Objektträger aus dem Pufferbad genommen und vorsichtig abgetrocknet. Die Objektträger wurden nun wieder in die feuchte Kammer zurückgelegt. Unmittelbar hierauf wurde auf jede Auftragstelle ein Tropfen Fluoreszenz-Konjugat (Sheep- α -mouse-IgG-FITC, Sh α mIgG) gegeben und für 20 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Erneut erfolgte ein Waschschrift, wobei dem PBS-Puffer für eine Gegenfärbung 2-3 Tropfen

einer 1%igen Evans-Blue-Lösung je 100 ml Puffer zugegeben wurden. Abschließend wurden die Objektträger wieder aus dem Pufferbad genommen, vorsichtig getrocknet, auf die Auftragstellen jeweils ein Tropfen Eindickmedium gegeben und schließlich Deckgläschen aufgebracht.

Die Auswertung der gefärbten Gefrierschnitte erfolgte unter dem Fluoreszenzmikroskop.

Verwendete Software

Der vorliegende Text wurde mit Microsoft Word[®] erstellt, die verwendeten Diagramme, sowie deren statistische Auswertung, mittels Ungepaarten T-Test (unpaired t test) und dem Programm PRISM[®]. Alle Daten sind dargestellt als mean \pm SD (Mittelwert \pm Standardabweichung).

Die Analyse der am FACSCalibur[®] Durchflusszytometer gewonnenen Daten erfolgte mit CellQuest[®] der Firma Becton/ Dickinson. Anhand ihres „Forward Scatter“ und „Side Scatter“ - Profils erfolgte eine Einstufung vitaler Zellen, welche alleinig zur Analyse verwendet wurden.

ERGEBNISSE

Einfluss CD28-spezifischer monoklonaler Antikörper auf die Homöostase von T-Zellen

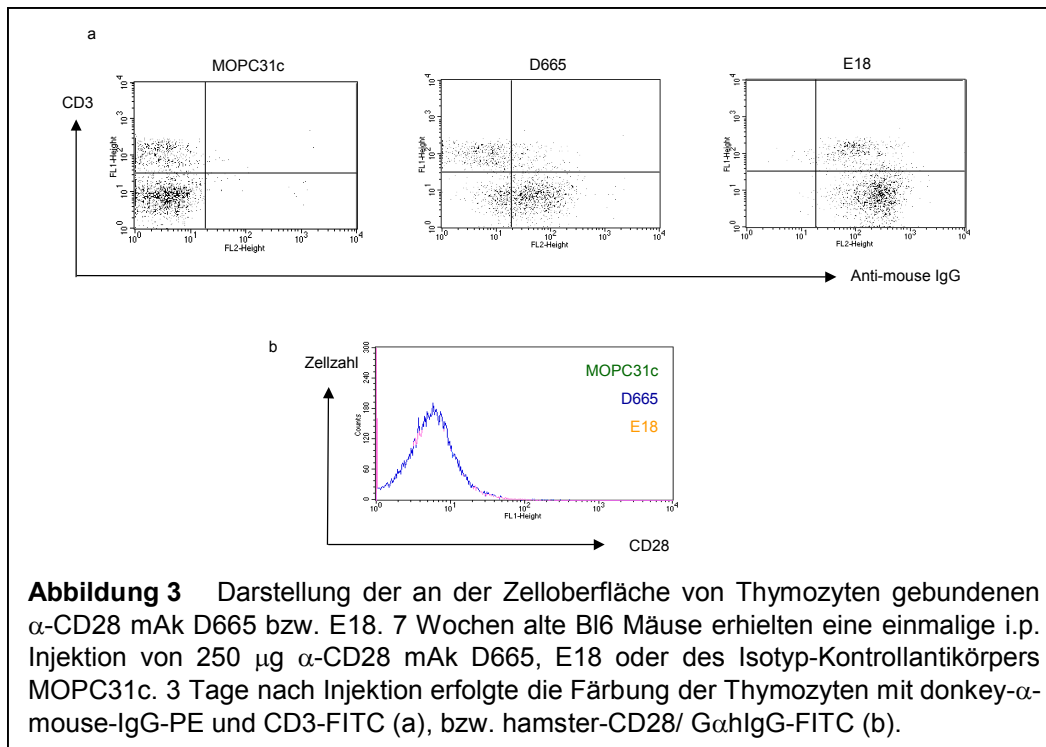
In-vivo Behandlung mit α -CD28 mAk

Der Focus der vorliegenden Arbeit konzentrierte sich zunächst auf die Analyse der Thymi von Mäusen, in denen die T-Zellen und damit auch die „natürlichen“ regulatorischen T-Zellen heranreifen.

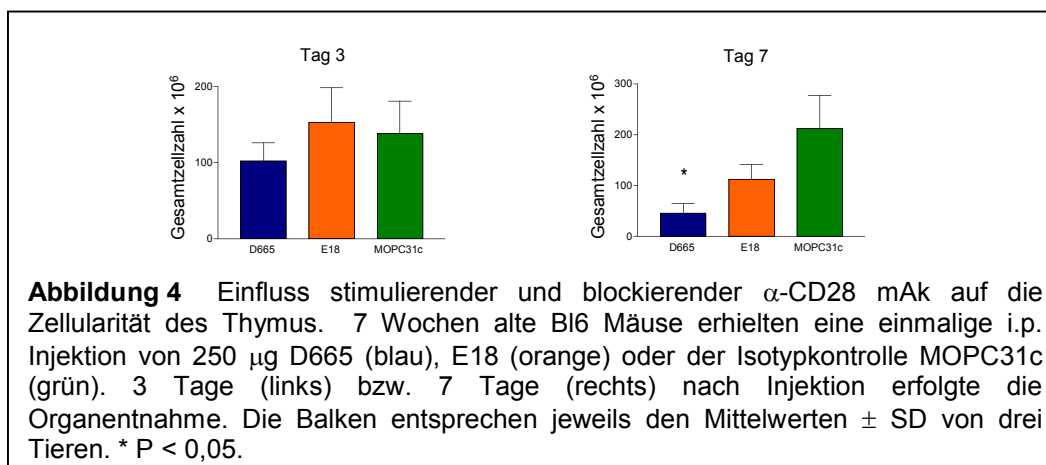
In der Maus ist CD28 auf der Oberfläche fast aller Thymozyten nachweisbar, wobei die Expressionslevel bei reifen Thymozyten im Vergleich zu ihren Vorläuferzellen (v.a. DP Thymozyten) etwas reduziert sind [Gross, J. A., et al. 1992, Williams, J. A., et al. 2005, bzw. siehe oben].

Als erster Schritt wurde zunächst gezeigt, dass die i.p. injizierten α -CD28 mAk, D665 und E18, auf der Zelloberfläche der Thymozyten gebunden waren. Dies war Voraussetzung für weitere Untersuchungen am Thymus, die einen Einfluss dieser Antikörper auf die T-Zell-Homöostase bzw. T-Zell-Entwicklung (siehe unten) analysieren sollten. FACS-Analysen mit PE-konjugierten α -mouse - Sekundärantikörpern zeigten im Gegensatz zur Isotypkontrolle MOPC31c deutliche Signale für oberflächlich gebundene Antikörper auf Thymozyten, die aus Mäusen isoliert wurden, die 3 Tage zuvor mit D665 bzw. E18 behandelt wurden (Abb. 3a). Dabei ließen sich die CD28 spezifischen Antikörper auf nahezu allen Thymozyten nachweisen. Entsprechend einer geringeren Expression von CD28 stellte sich die Signalstärke oberflächlich gebundener Antikörper auf reifen Thymozyten etwas reduziert dar (Abb. 3a).

Aus Abbildung 3b wird ersichtlich, dass die injizierten anti-CD28 mAk auch tatsächlich alle CD28-Rezeptoren besetzt hatten, und diese somit für die in der Abbildung dargestellte indirekte FACS-Färbung nicht mehr zugänglich waren. Lediglich bei den Kontrolltieren konnten CD28-Rezeptoren auf der Zelloberfläche der Thymozyten mit fluoreszierenden Antikörpern angefärbt werden (Abb. 3b).



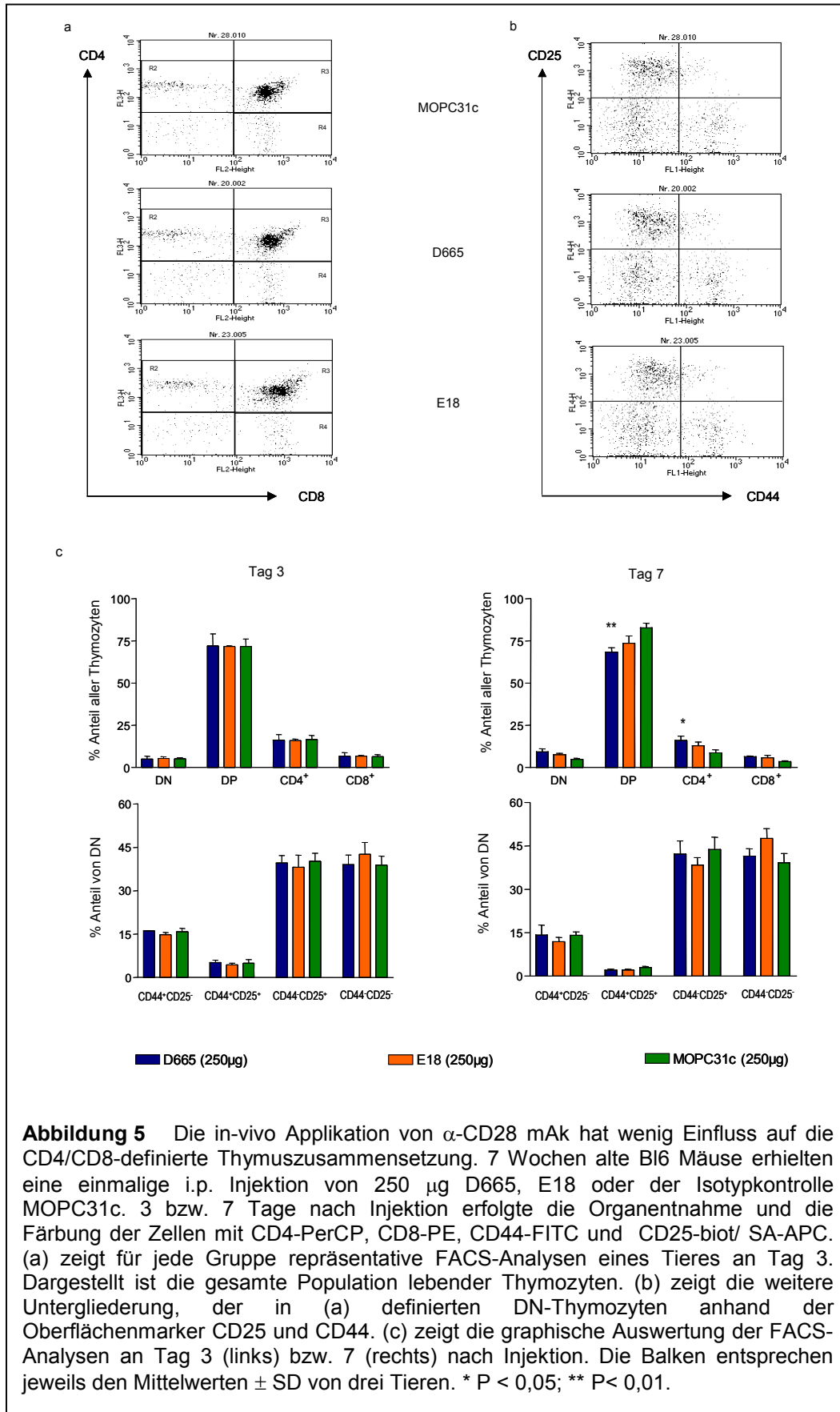
Im Gegensatz zu Lymphknoten und Milz der Maus [Gogishvili, T., et al. 2009] stellte sich die Zellzahl des Thymus drei Tage nach einer Behandlung mit dem CD28 Superagonisten unverändert dar (Abb. 4). Nach sieben Tagen war die Gesamtzahl an Thymozyten sogar etwas reduziert im Vergleich zur Kontrolle. Auch von einer Blockade des CD28-Moleküls durch E18 mAk blieb die Zellzahl der Thymi nach drei Tagen unbeeinflusst. An Tag Sieben hingegen lag auch nach Injektion von E18 mAk die Gesamtzahl der Thymozyten im Mittel etwas unter der in Kontrolltieren ermittelten Zahl, der Unterschied erwies sich jedoch statistisch gesehen als nicht signifikant (Abb. 4).



FACS-Analysen der durch die Oberflächenmarker CD4- und CD8-definierten Subpopulationen des Thymus zeigten ferner drei Tage nach Applikation der Antikörper keine signifikanten Unterschiede in der Zusammensetzung des Organs (Abb. 5a und c oben links). Die in peripheren Lymphknoten und der Milz beobachtete Zunahme der Gesamtzellzahl bei einer Behandlung mit superagonistischen Antikörpern, und insbesondere der massive Anstieg CD4⁺ T-Zellen konnte für den Thymus am Tag 3 nicht bestätigt werden. Sieben Tage nach Behandlung der Tiere hingegen, zeigte sich eine leichte Zunahme des Anteils CD4⁺ T-Zellen von im Mittel 8,9 % bei den Kontrolltieren auf 16,0 % bei D665 Applikation, sowie eine entsprechende Abnahme des Anteils DP Thymozyten (Abb. 5c oben rechts). Die absolute Anzahl der CD4⁺ T-Zellen im Thymus blieb im Mittel jedoch deutlich niedriger im Vergleich zur Kontrolle ($7,3 \times 10^6$ CD4⁺ Zellen bei D665 Behandlung bzw. $18,1 \times 10^6$ Zellen bei MOPC31c) (nicht gezeigt), sodass der relative Anstieg der CD4 Thymozyten auf den Verlust von DP Zellen zurückgeführt werden kann.

Die Behandlung mit dem blockierenden α -CD28 mAK E18 zeigte, ebenso wie nach drei Tagen (Abb. 5a und c oben links), auch sieben Tage nach Injektion (Abb. 5c oben rechts) keinen Einfluss auf die Verteilung der einzelnen CD4- und CD8-definierten Populationen des Thymus.

Die prozentuale Zusammensetzung der unreifen Vorstufen von T-Zellen, die sog. DN-Thymozyten, wurde weder durch superagonistische, noch durch blockierende α -CD28 mAk beeinflusst. Dies traf sowohl drei Tage (Abb. 5b und c unten links), als auch sieben Tage (Abb. 5c unten rechts) nach Applikation der Antikörper zu.



Auch die durch eine in-vivo Behandlung mit CD28 Superagonisten bevorzugte Expansion regulatorischer T-Zellen ($CD4^+CD25^+$ bzw. $CD4^+CD25^+FoxP3^+$) in peripheren Lymphknoten der Maus [Gogishvili, T., et al. 2009] (Abb. 6 rechte Spalte), zeigte sich nicht im Thymus. Weder der Anteil CD25 positiver Zellen unter den CD4 Zellen, noch die absolute Anzahl regulatorischer T-Zellen im Thymus unterschied sich nach einer Applikation des Superagonisten von den Werten aus Kontrolltieren (Abb. 6 linke Spalte). Am Tag 7 nach Behandlung mit D665 stellte sich die Gesamtzellzahl regulatorischer T-Zellen im Thymus sogar im Mittel reduziert dar ($2,6 \times 10^5$ $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ Zellen versus $5,2 \times 10^5$ nach MOPC31c Behandlung; Abb. 6b unten links). Der Anteil CD25- und FoxP3- positiver Zellen unter den CD4 Zellen zeigte jedoch auch an Tag 7 keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 6b oben links).

Gegensätzlich stellte sich das Vorhandensein von regulatorischen T-Zellen im Thymus nach Applikation des blockierenden α -CD28 mAk E18 dar. Bereits an Tag 3 sank der Anteil $CD25^+FoxP3^+$ Zellen von CD4 positiven Zellen um ein Drittel von durchschnittlich 3,3 % auf 2,2 % (Abb. 6a oben links). Die absolute Anzahl regulatorischer T-Zellen im Thymus E18-behandelter Tiere lag im Mittel 25 % unter der in Kontrolltieren ($5,5 \times 10^5$ $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ Zellen versus $7,2 \times 10^5$) (Abb. 6a unten links). Sieben Tage nach Injektion des blockierenden Antikörpers reduzierte sich der Anteil regulatorischer Zellen auf ca. 40 % im Vergleich zu Kontrolltieren (1,2 % versus 3,0 %) (Abb. 6b oben links). Die Gesamtzahl der $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ Zellen betrug nur noch ein Drittel der bei Kontrolltieren gemessenen Gesamtzahl ($1,7 \times 10^5$ versus $5,2 \times 10^5$) (Abb. 6b unten links).

Gleichermaßen reduzierte der mAk E18 den Anteil regulatorischer Zellen unter den CD4 positiven Zellen in peripheren Lymphknoten um durchschnittlich 20 % an Tag 3 (Abb. 6a oben rechts; T_{regs} hier nur dargestellt als $CD4^+CD25^+$) bzw. 25 % an Tag 7 (Abb. 6b oben rechts), sowie die Gesamtanzahl der T_{regs} von im Mittel $3,2 \times 10^6$ Zellen auf $1,9 \times 10^6$ an Tag 3 (Abb. 6a unten rechts; T_{regs} hier nur dargestellt als $CD4^+CD25^+$) bzw. $2,4 \times 10^6$ auf $1,4 \times 10^6$ Zellen an Tag 7 (Abb. 6b unten rechts).

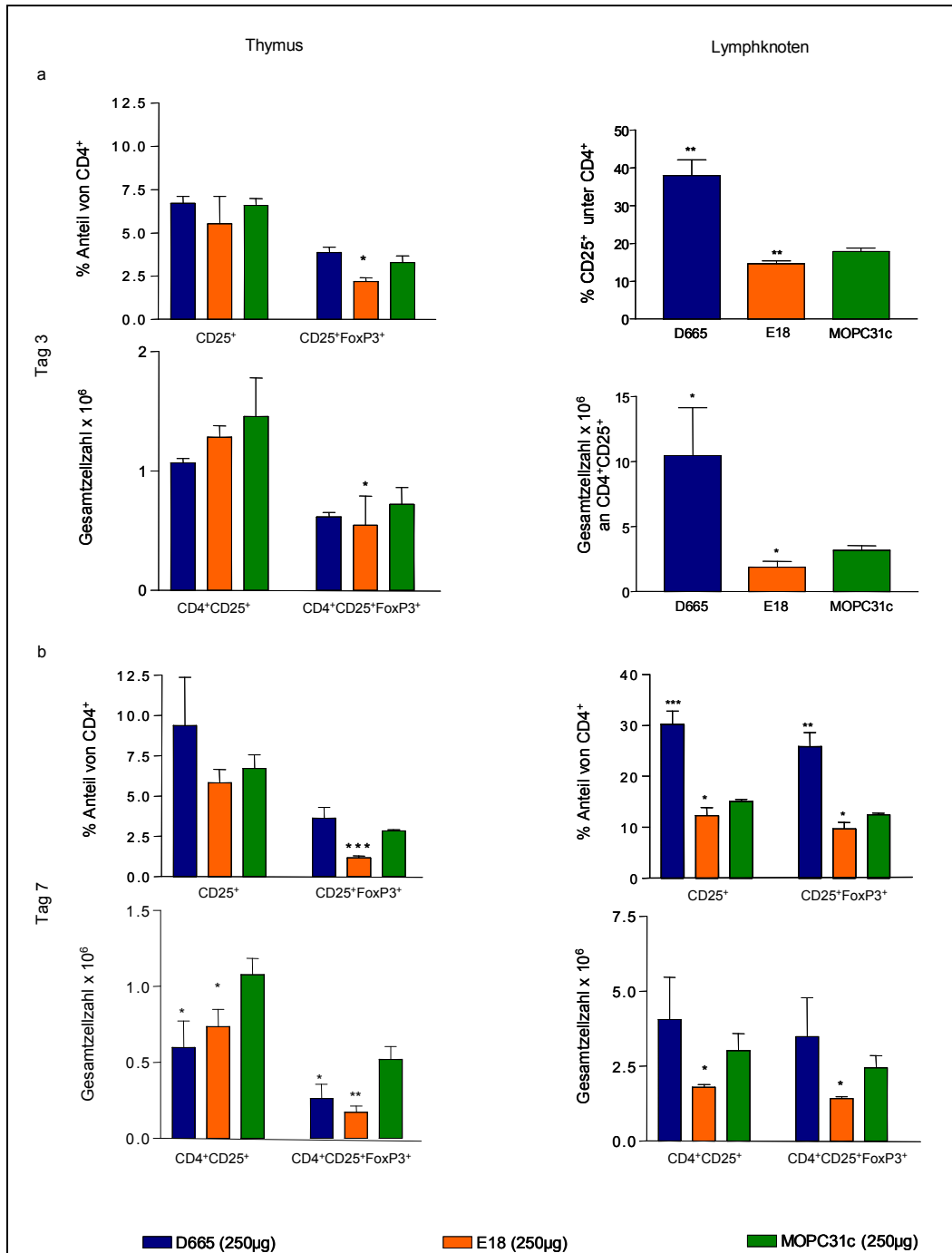


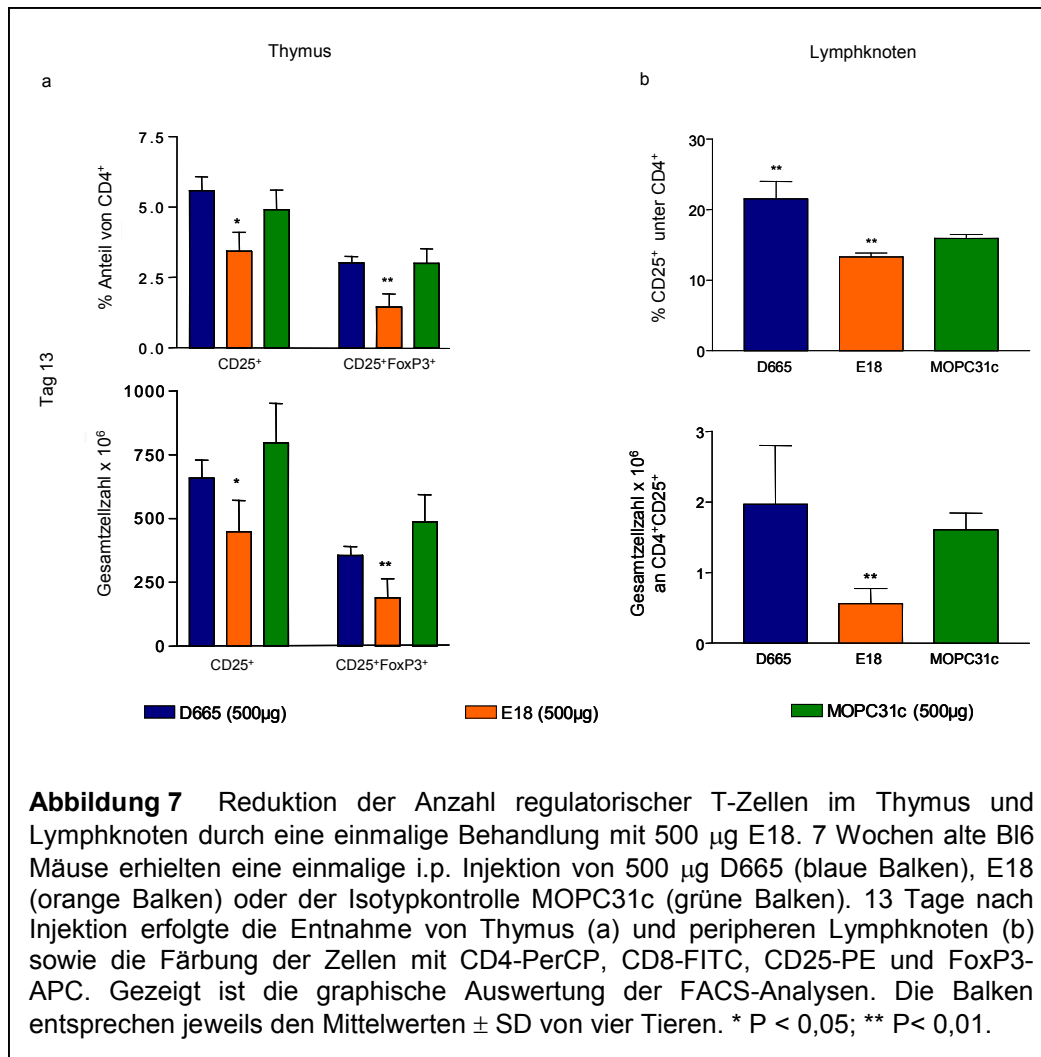
Abbildung 6 Reduktion der Anzahl regulatorischer T-Zellen im Thymus und Lymphknoten durch eine einmalige Behandlung mit 250 µg E18. 7 Wochen alte B16 Mäuse erhielten eine einmalige i.p. Injektion von 250 µg D665 (blaue Balken), E18 (orange Balken) oder der Isotypkontrolle MOPC31c (grüne Balken). 3 (a) bzw. 7 (b) Tage nach Injektion erfolgte die Entnahme von Thymus (linke Spalte) und peripheren Lymphknoten (rechte Spalte) sowie die Färbung der Zellen mit CD4-PerCP, CD8-FITC, CD25-PE und FoxP3-APC. Gezeigt ist die graphische Auswertung der FACS-Analysen. Die Balken entsprechen jeweils den Mittelwerten ± SD von drei Tieren. * P < 0.05; ** P < 0.01; *** P < 0.001.

In einem weiteren Experiment wurde den Mäusen jeweils 500 μg der $\alpha\text{-CD28}$ mAk injiziert. Die Organentnahmen erfolgten nach 13 Tagen. Zu diesem Zeitpunkt waren die mAk D665 bzw. mAk E18 noch auf der Oberfläche der T-Zellen nachweisbar (nicht abgebildet). Ein Einfluss auf die Gesamtanzahl der Thymozyten wurde weder nach Behandlung mit superagonistischen, noch mit blockierenden $\alpha\text{-CD28}$ Antikörpern beobachtet (nicht abgebildet). Auch die Verteilung der CD4- und CD8-definierten Populationen des Thymus, sowie deren absolute Anzahl differierte nicht zwischen den verschiedenen Behandlungen (nicht abgebildet).

Wie an den Tagen 3 und 7, so zeigte sich auch 13 Tage nach Applikation des Superagonisten keine Zunahme regulatorischer T-Zellen im Thymus (Abb. 7a). In peripheren Lymphknoten hingegen lag der Anteil CD25 positiver Zellen unter den CD4 T-Zellen nach Injektion von D665 mAk im Mittel über dem der mit MOPC31c-behandelten Kontrolltiere (15,6 % versus 13,4 %) (Abb. 7b oben). Die Gesamtzahl an regulatorischen T-Zellen in den Lymphknoten hatte sich bereits weitestgehend normalisiert (Abb. 7b unten).

Die Behandlung mit dem blockierenden $\alpha\text{-CD28}$ mAk E18 hingegen zeigte auch noch 13 Tage nach Injektion eine Reduktion sowohl des Anteils von T_{regs} unter CD4 positiven Zellen (3,0 % versus 1,4 %) (Abb. 7a oben), als auch der Gesamtzahl an T_{regs} im Thymus ($4,9 \times 10^5$ versus $1,9 \times 10^5$ CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ Zellen) (Abb. 7a unten).

Gleiche Beobachtungen zeigten sich in peripheren Lymphknoten: der Anteil CD25 positiver T-Zellen in der Population der CD4 Zellen nach E18-Behandlung lag mit 8,6 % etwa ein Drittel unter der Kontrolle (13,4 %) (Abb. 7b oben). Die absolute Anzahl CD4⁺CD25⁺ regulatorischer T-Zellen lag im Mittel sogar etwa zwei Drittel unter der Anzahl in MOPC31c-behandelten Kontrolltieren ($0,6 \times 10^6$ versus $1,6 \times 10^6$) (Abb. 7b unten).



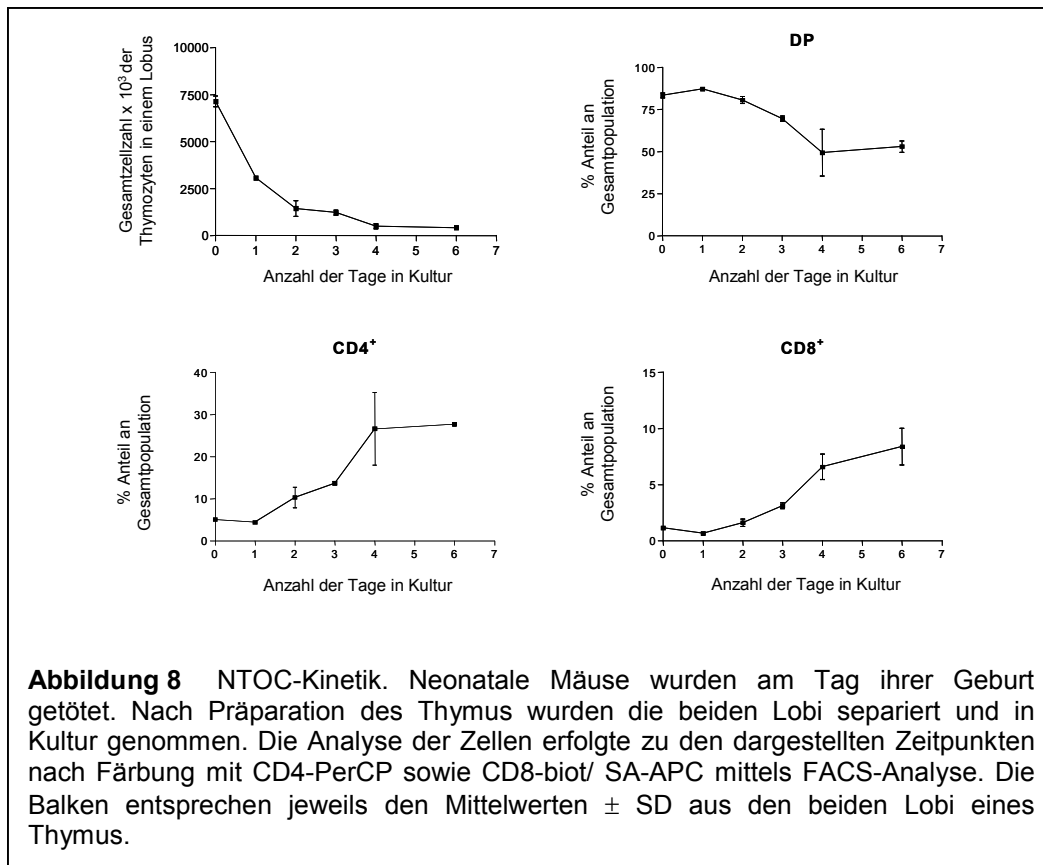
Zusammenfassend lässt sich somit festhalten, dass eine in-vivo Behandlung mit CD28 Superagonisten keinen bzw. nur einen sehr geringen Einfluss auf die Zusammensetzung der einzelnen Populationen im Thymus hat. Die in peripheren Lymphknoten und der Milz der Ratte beschriebene Expansion von CD4 T-Zellen [Tacke, M., et al. 1997], mit einer verhältnismäßig stärkeren Zunahme regulatorischer Zellen [Lin, C. H., & Hünig, T. 2003, Gogishvili, T., et al. 2009] war nicht auf den Thymus übertragbar. An Tag 7 nach Applikation des Superagonisten zeigten sich eher entgegengesetzte Resultate mit einer Reduktion der Gesamtpopulation und der Anzahl CD4 positiver Zellen. Die regulatorischen T-Zellen im Thymus blieben im Vergleich zur Kontrolle zu jedem untersuchten Zeitpunkt gänzlich unbeeinflusst hinsichtlich ihrer Gesamtanzahl, sowie ihres Anteils unter CD4 T-Zellen.

Durch eine Behandlung mit dem blockierenden α -CD28 mAk E18 konnte hingegen selektiv der Anteil regulatorischer T-Zellen, als auch ihre absolute Anzahl im Thymus gesenkt werden, ohne wesentliche Einflüsse auf andere Subpopulationen zu entfalten. Dies wurde zu allen untersuchten Zeitpunkten beobachtet und zeigte sich auch in peripheren Lymphknoten.

Ex-vivo Behandlung mit α -CD28 mAk mittels NTOC

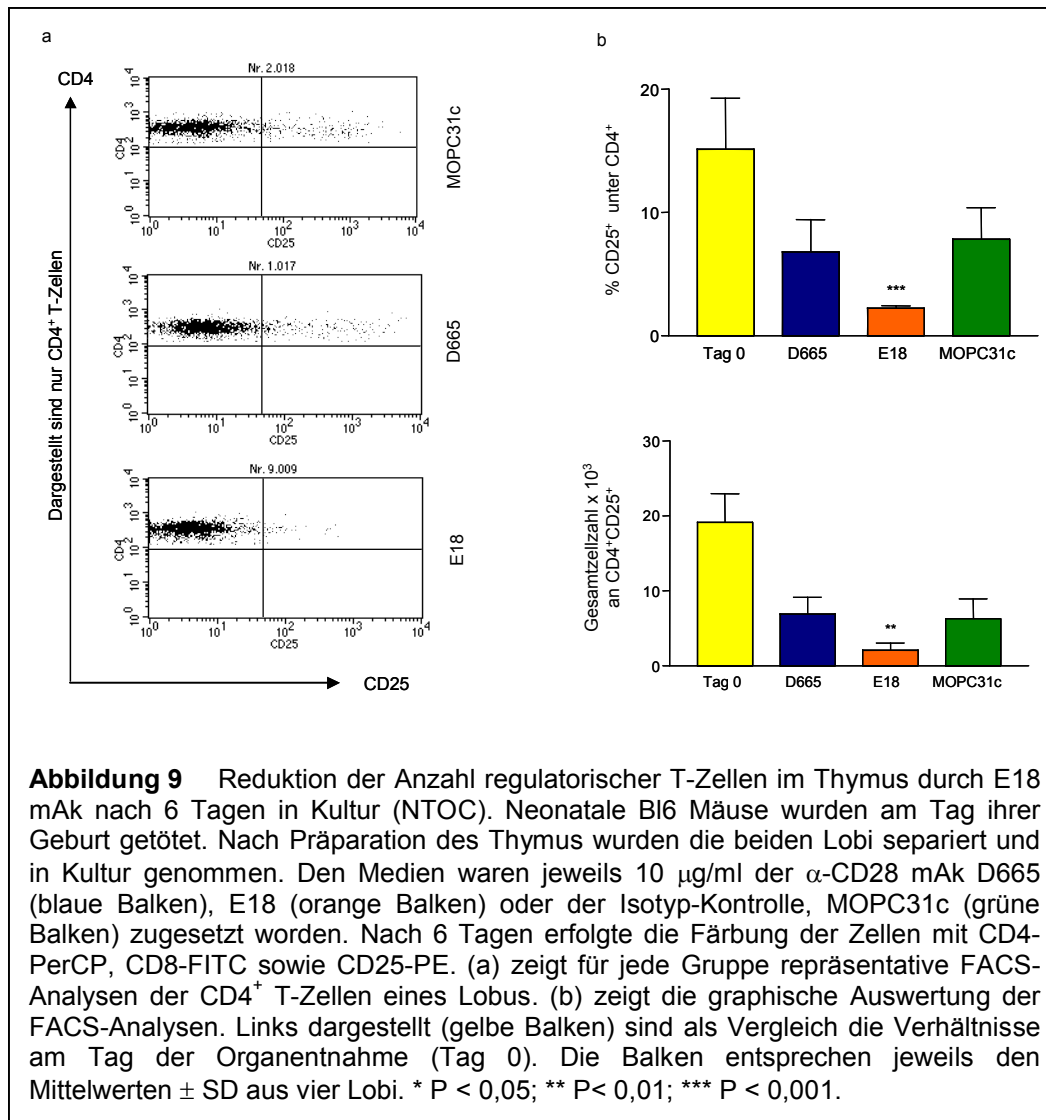
Um indirekte Einflüsse durch die intraperitoneale Injektion der Antikörper in vivo auszuschließen wurden Neonatale-Thymus-Organ-Kulturen als weiterer Ansatz zur Untersuchung eines Einflusses CD28-spezifischer monoklonaler Antikörper auf die Homöostase von T-Zellen gewählt. Hierbei wurden die Thymozyten im kompletten Organverband eines Lobus neugeborener Mäuse in Kultur genommen. Aus Abbildung 8 (oben links) wird ersichtlich, dass die Gesamtzahl der Zellen in den Lobi während der Kulturdauer stetig sank. Dies war vor allem zurückzuführen auf einen Untergang unreifer DP-Thymozyten im Rahmen ihres Differenzierungsprozesses (nicht abgebildet). Die reiferen CD4 oder CD8 positiven T-Zellen waren hiervon auch betroffen, jedoch in geringerem Ausmaß (nicht abgebildet). Dies spiegelte sich in einer relativen Zunahme der Anteile dieser Populationen in der Zusammensetzung der Lobi (Abb. 8 unten), während der Prozentsatz an DP-Thymozyten stetig sank (Abb. 8 oben rechts).

Auch in Anwesenheit CD28 spezifischer mAk während der gesamten Inkubationsdauer reduzierte sich die absolute Anzahl an Thymozyten stetig (nicht abgebildet). Ebenso änderte sich die Zusammensetzung der einzelnen Populationen des Thymus zugunsten einer Zunahme des Anteils reifer CD4 positiver bzw. CD8 positiver T-Zellen, und einer Abnahme unreifer Thymozyten im Vergleich zu nicht-inkubierten neonatalen Thymi (nicht abgebildet).



Weder die Behandlung mit dem CD28 Superagonisten, noch mit dem blockierenden E18 mAK, änderte dabei jedoch die Verteilung der einzelnen CD4- und CD8-definierten Populationen im Vergleich zu einer Behandlung mit dem Isotyp-Kontroll-Antikörper MOPC31c (nicht abgebildet). Dies legt nahe, dass der Verlust von DP Zellen in vivo (siehe oben, Abb. 5b) über Stress zustande kam.

Wie zuvor bei der in-vivo Behandlung beschrieben, so reduzierte auch eine ex-vivo Behandlung neonataler Thymi mit E18 mAk sowohl den Anteil CD25 positiver Zellen unter den CD4 T-Zellen (2,2 % versus 8,5 %) (Abb. 9a und b oben), als auch die absolute Anzahl an regulatorischen Zellen ($2,1 \times 10^3$ versus $6,8 \times 10^3$ Zellen) (Abb. 9b unten).



Die Applikation des superagonistischen D665 mAk hatte in diesem Versuchsansatz keinen Einfluss auf die CD4⁺CD25⁺ regulatorischen T-Zellen im Thymus neugeborener Mäuse.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Verteilung der einzelnen CD4- und CD8-definierten Populationen im Thymus neugeborener Mäuse nicht durch eine ex-vivo Behandlung mit CD28 spezifischen monoklonalen Antikörpern beeinflusst wird. Während der Superagonist keinen Effekt auf die regulatorischen T-Zellen erkennen ließ, lag diese Population nach Behandlung mit E18 mAK deutlich unter der Isotypkontrolle. Die in-vivo gezeigten

Beobachtungen nach Applikation blockierender CD28 Antikörper bestätigten sich somit in diesem Versuchsaufbau.

Einfluss CD28-spezifischer monoklonaler Antikörper auf die Entwicklung von T-Zellen

Die genaue Rolle kostimulatorischer Signale in der Proliferation und Differenzierung früher Stadien in der T-Zell-Entwicklung der Maus ist noch weitgehend ungeklärt. Es existieren jedoch einige Hinweise, dass eine Kostimulation über CD28 mit seinen physiologischen Liganden hierbei beitragen könnte, wie z.B. die ansteigende Expression von CD28 während der Reifung CD4⁺CD8⁻ Thymozyten [Gross, J. A., et al. 1992, Williams, J. A., et al. 2005], oder eine Expression des B7-2 Liganden im Kortex des Thymus [Zheng, X., et al. 2004, Lind, E. F., et al. 2001, zusammengefasst in Lehar, S. M., et al. 2002].

In-vivo Behandlung von Rag^{-/-} Mäusen mit CD28 Superagonisten

Eine feinabgestimmte Regulation der CD28-B7 Interaktion ist eine wichtige Voraussetzung für eine normale Entwicklung unreifer T-Zellen im Thymus [Williams, J. A., et al. 2005]. Auch in Abwesenheit eines Signals durch den vorläufigen T-Zell-Rezeptor (pre-TCR) ist eine Differenzierung von DN zu DP Thymozyten über den CD28/B7 Signalweg möglich. Dies konnte durch Verwendung transgener Mäuse auf einem Rag-2 knock-out Hintergrund gezeigt werden, in denen sowohl die Expression von CD28 über alle Stadien der T-Zell-Entwicklung hinweg, als auch die Expression des Liganden B7-2 im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen drastisch erhöht waren [Williams, J. A., et al. 2005].

Um zu untersuchen, ob auch eine Stimulation unreifer T-Zellen durch den CD28 Superagonisten ausreicht, die Entwicklungsblockade in Rag^{-/-} Mäusen [Mombaerts, P., et al. 1992] zu umgehen, wurde diesen Tieren einmalig 250 µg

D665 mAk i.p. injiziert. Acht Tage später erfolgten die Entnahmen und Analyse von Thymus, peripheren Lymphknoten und Milz.

Zu diesem Zeitpunkt konnte in keinem dieser lymphatischen Organen ein nennenswerter Anteil reifer oder unreifer T-Zellen (auch keine DP Thymozyten) nachgewiesen werden (nicht abgebildet).

Ferner blieb auch die Gesamtzahl der Zellen in diesen Organen stark beeinträchtigt durch den Verlust des Rag-Genes [Mombaerts, P., et al. 1992] im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen (nicht abgebildet).

Abbildung 10a zeigt, dass durch eine Behandlung mit dem Superagonisten die absolute Anzahl an Zellen in den lymphatischen Organen nicht beeinflusst wurde im Vergleich zur Isotypkontrolle.

Auch auf die Zusammensetzung der Zellen im Thymus zeigte der stimulierende α -CD28 mAk D665 keinen Effekt (Abb. 10b). Die Blockade in der Entwicklung

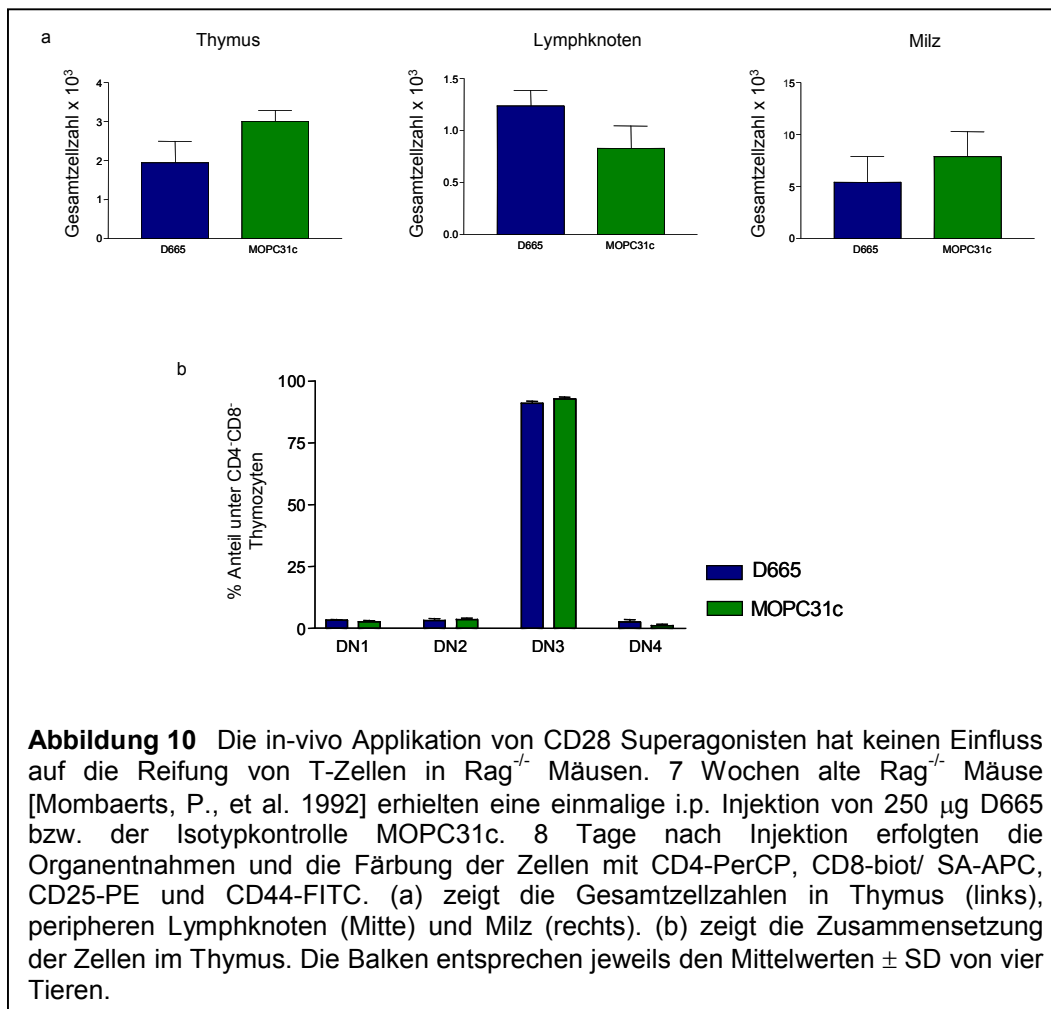


Abbildung 10 Die in-vivo Applikation von CD28 Superagonisten hat keinen Einfluss auf die Reifung von T-Zellen in Rag^{-/-} Mäusen. 7 Wochen alte Rag^{-/-} Mäuse [Mombaerts, P., et al. 1992] erhielten eine einmalige i.p. Injektion von 250 μ g D665 bzw. der Isotypkontrolle MOPC31c. 8 Tage nach Injektion erfolgten die Organentnahmen und die Färbung der Zellen mit CD4-PerCP, CD8-biot/ SA-APC, CD25-PE und CD44-FITC. (a) zeigt die Gesamtzellzahlen in Thymus (links), peripheren Lymphknoten (Mitte) und Milz (rechts). (b) zeigt die Zusammensetzung der Zellen im Thymus. Die Balken entsprechen jeweils den Mittelwerten \pm SD von vier Tieren.

von T-Zellen auf der Stufe der Rearrangierung der β -Kette des TZR (DN3 – DN4), der sogenannte β -checkpoint [zusammengefasst u.a. in von Boehmer, H. 2005], konnte nicht durch eine Stimulation mit dem Superagonisten umgangen werden.

Ex-vivo Behandlung mit α -CD28 mAk mittels FTOC

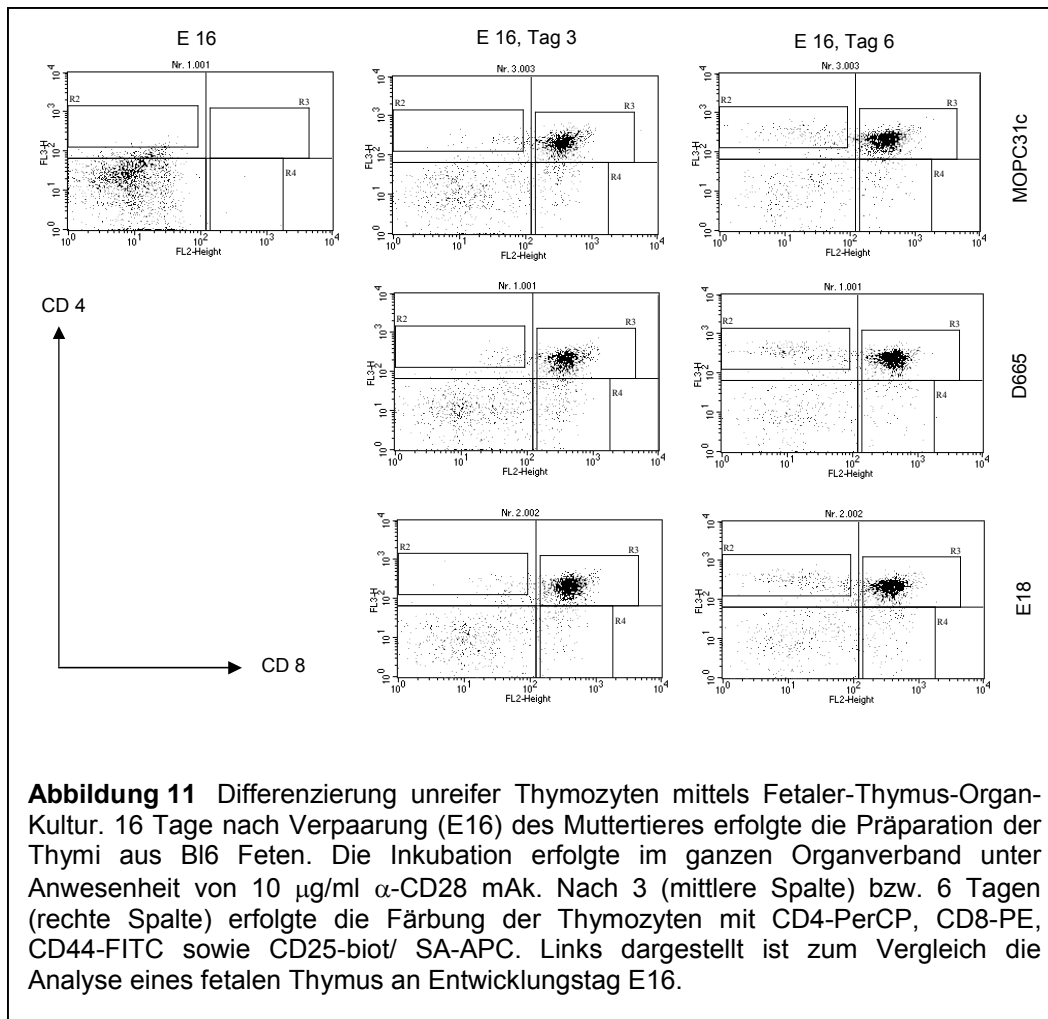
Eine andere Möglichkeit zur Untersuchung der T-Zell-Entwicklung stellt die Fetale-Thymus-Organ-Kultur dar. Hierdurch wird es ermöglicht, die Reifung der Zellen in der natürlichen Umgebung des kompletten Organverbandes zu analysieren.

Anders als bei der oben beschriebenen NTOC befanden sich sämtliche Thymozyten zum Zeitpunkt der Organentnahme im DN Stadium (Abb. 11 linke Spalte, E16). Ein weiterer Unterschied lag darin, dass die Gesamtanzahl an Thymozyten, entsprechend der Entwicklung in vivo, bei der FTOC während der Inkubation anstieg (nicht abgebildet).

Schon nach drei Tagen befand sich ein Großteil der Thymozyten (ca. 60%) im DP Stadium, nach sechs Tagen waren es bereits ca. 70% (Abb. 11 obere Zeile). Auch die Differenzierung bis hin zu reifen T-Zellen ließ sich anhand der FACS-Analysen beobachten (z.B. CD4⁺: 0,9 % (E16); 2,3 % (E16, Tag 3); 6,8 % (E16, Tag 6)) (Abb. 11 obere Zeile).

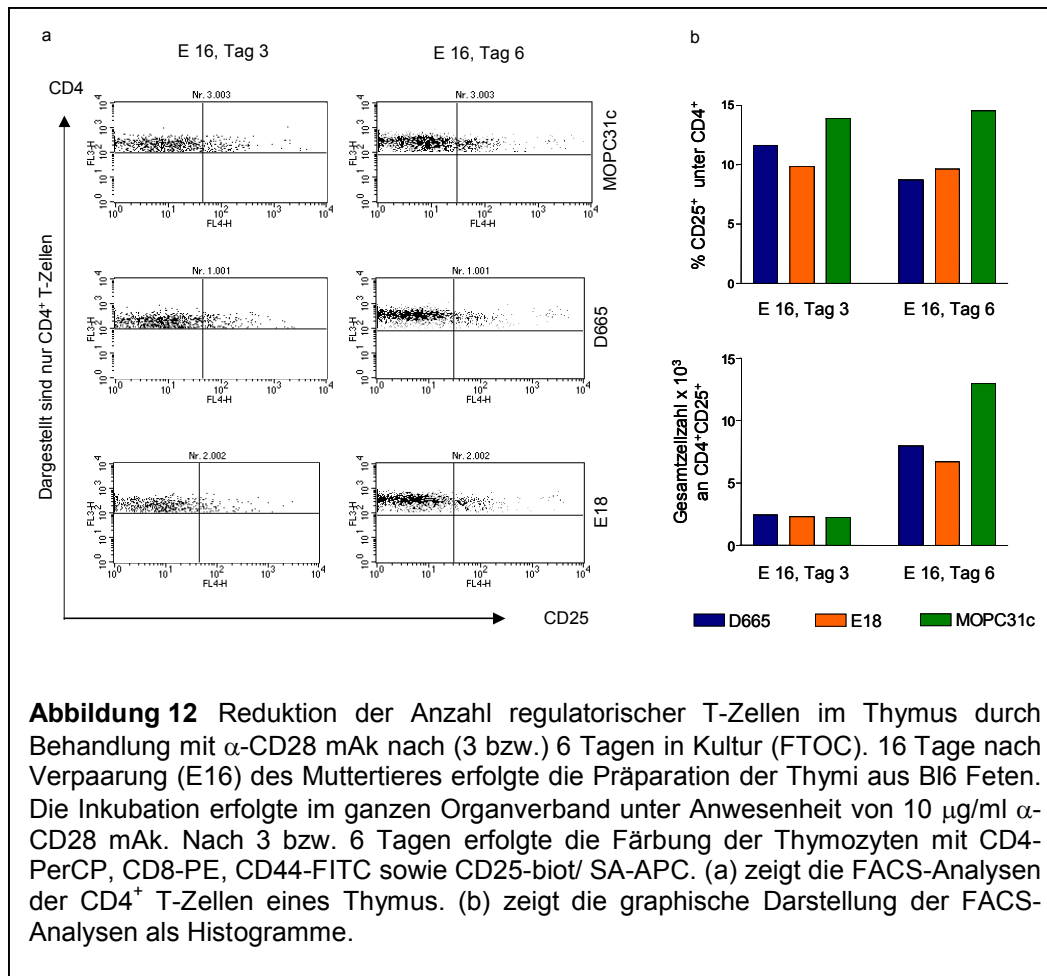
Weder durch eine Behandlung mit dem blockierenden CD28 mAk, noch mit dem Superagonisten wurde die Reifung der DN Zellen in den fetalen Thymi beeinträchtigt oder unterstützt. Ein Vergleich der verschiedenen Antikörper mit der Isotypkontrolle ließ keine großen Unterschiede in der Zusammensetzung der CD4- und CD8-definierten Populationen der Thymi erkennen (Abb. 11).

Auch die Verteilung der einzelnen DN Subpopulationen (DN1-4) differierte kaum (nicht abgebildet).



Bei genauerer Analyse der CD4 positiven T-Zellen zeigte sich, dass sowohl der Anteil regulatorischer T-Zellen in den fetalen Thymi, als auch die Gesamtzahl an T_{regs} nach sechs Tagen Kultur durch die Behandlung mit α -CD28 mAk reduziert wurde (Abb. 12). Dies wurde sowohl bei Verwendung des Superagonisten, als auch des blockierenden E18 beobachtet.

Aufgrund der nur geringen Veränderungen und mangelnder Hinweise für eine bedeutende Einflussnahme der verschiedenen CD28-spezifischen Antikörper auf die Entwicklung der frühen T-Zell-Stadien wurde diese Versuchsreihe nicht wiederholt, sodass eine statistische Analyse an dieser Stelle unterbleiben muss.



Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass eine Behandlung mit CD28 spezifischen monoklonalen Antikörpern keinen Einfluss auf die Differenzierung von unreifen T-Zellen hat. Weder an sehr frühen Zeitpunkten in der Entwicklung (DN1-4), noch in späteren Stadien (DP und SP) zeigten sich Hinweise auf einen Beitrag der Antikörper in der Reifung der T-Zellen.

Einzig die CD4⁺ CD25⁺ T-Zellen im Thymus reagierten auf die Behandlung mit α -CD28 mAk mit einer Abnahme sowohl ihres Anteils unter konventionellen CD4 positiven T-Zellen, als auch ihrer absoluten Anzahl im Thymus.

In-vitro Differenzierung von DN T-Zellen auf OP9 Stromazellen in Anwesenheit von α -CD28 mAk

In der Entwicklung der Thymozyten in vivo spielt eine fein regulierte Interaktion zwischen den heranreifenden Zellen und dem Thymusstroma eine entscheidende Rolle [zusammengefasst u.a. in Germain, R. N. 2002].

Bei Verwendung einfacher Suspensionskulturen mit CD4⁻CD8⁻ Thymozyten, die aus Bl6 Mäusen isoliert wurden, konnte keine weitere Entwicklung der DN Zellen in Kultur erreicht werden (nicht abgebildet). Auch eine zusätzliche Stimulation der Zellen mit dem CD28 Superagonisten zeigte keinen Effekt auf die Proliferation und Differenzierung der unreifen DN Zellen (nicht abgebildet).

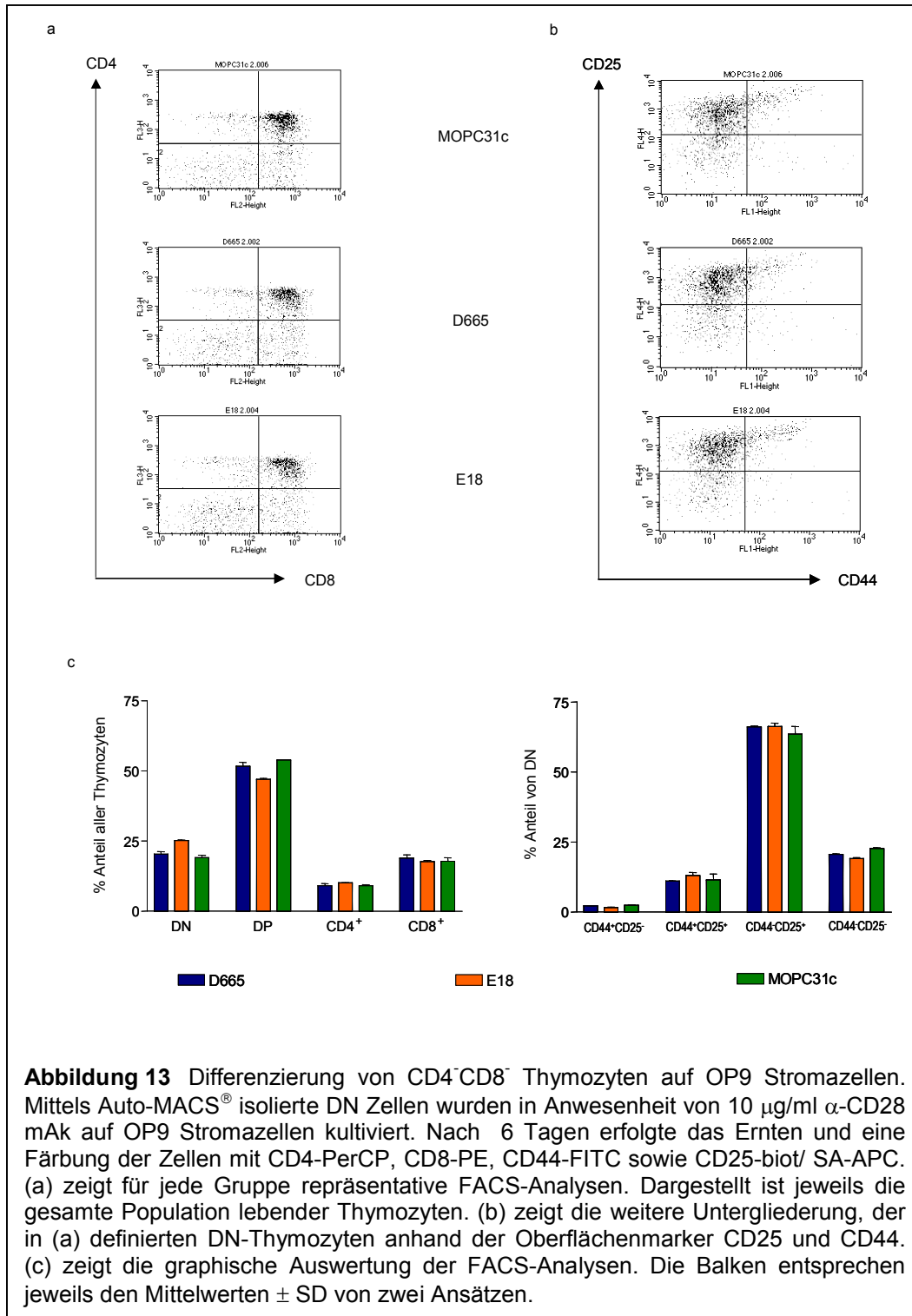
Aus diesem Grund wurde zur Untersuchung des Einflusses stimulierender bzw. blockierender α -CD28 mAk auf die Entwicklung von DN T-Zellen ein Kokultursystem auf OP9 Stromazellen herangezogen, um in vitro ein (stark vereinfachtes) physiologisches Milieu zu imitieren.

Hierbei differenzierten die Zellen, die anfangs alle einen CD4⁻CD8⁻ Phänotyp zeigten, über ein Zwischenstadium der DP Thymozyten, bis hin zu reifen CD4⁺CD8⁻ bzw. CD4⁻CD8⁺ T-Zellen (Abb. 13a oben).

Weder die Anwesenheit stimulierender, noch blockierender α -CD28 mAk konnte die Entwicklung der DN Zellen beeinflussen. Dies zeigte sich weder in einer verzögerten noch einer beschleunigten Reifung der DN Zellen im Vergleich zur Isotyp-Kontrolle (Abb. 13a und c links).

Auch die Zusammensetzung der einzelnen Entwicklungsstufen der DN Thymozyten wurde durch eine in-vitro Behandlung mit α -CD28 mAk nicht beeinflusst, was sich anhand einer weiteren Unterteilung dieser Population mittels der Oberflächenmarker CD25 und CD44 zeigte (Abb. 13b und c rechts).

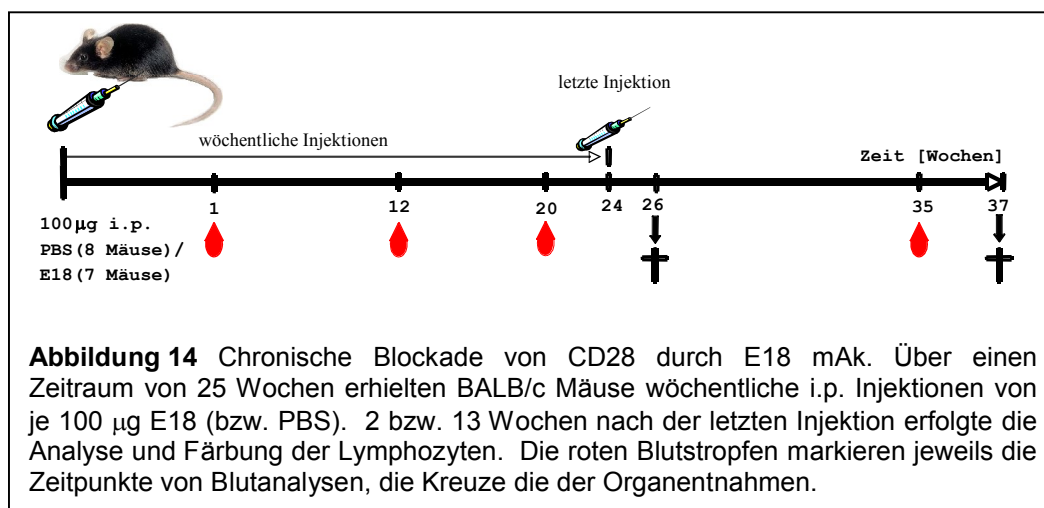
Der Anteil an regulatorischen CD4⁺CD25⁺ Zellen unter den reifen CD4 positiven T-Zellen lag im Mittel bei etwa fünf Prozent, wobei die Anwesenheit der verschiedenen CD28-spezifischen Antikörper keinen weiteren Einfluss auf den Anteil an regulatorischen T-Zellen nahm (nicht abgebildet).



Einfluss einer chronischen Behandlung mit dem blockierenden α -CD28 mAk E18 auf die Homöostase von T-Zellen

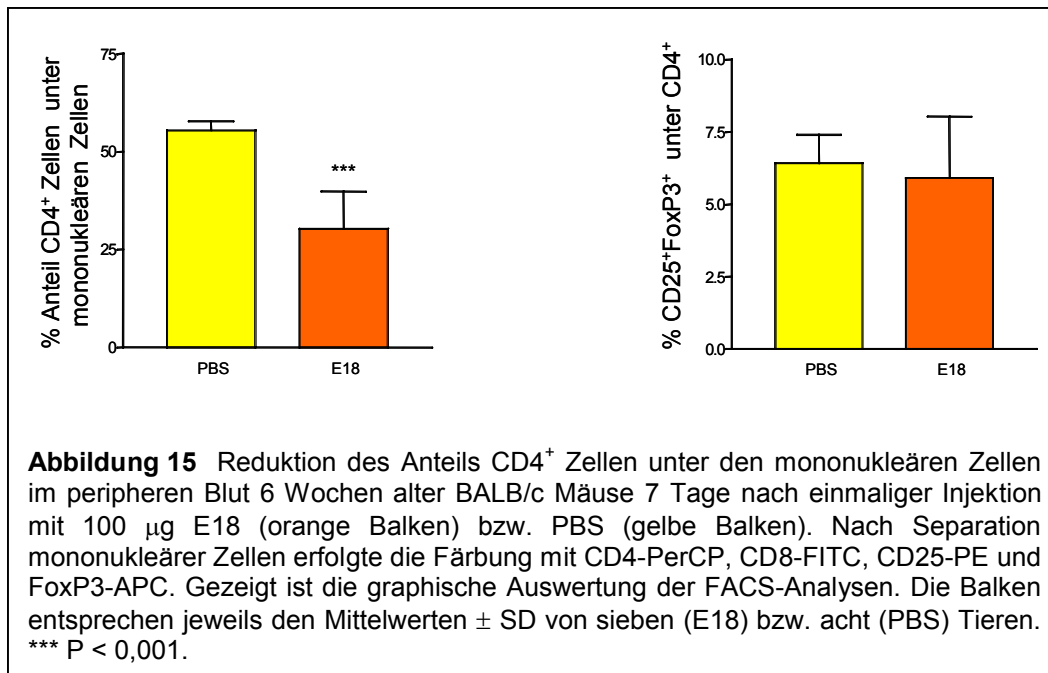
Im oberen Abschnitt konnte gezeigt werden, dass bereits durch einmalige in-vivo Injektionen bzw. in-vitro Behandlungen mit dem blockierenden α -CD28 mAk E18 sowohl der Anteil regulatorischer T-Zellen, als auch ihre absolute Anzahl in Thymus und peripheren Lymphknoten gesenkt werden konnte. Der folgende Abschnitt dieser Arbeit sollte den Einfluss einer dauerhaften Blockade des kostimulatorischen Moleküls CD28 durch E18 mAk auf die Homöostase der T-Zellen in der Maus untersuchen.

Hierzu wurde BALB/c Mäusen über einen Zeitraum von 25 Wochen eine wöchentliche Dosis von jeweils 100 μ g E18 mAk (bzw. PBS in Kontrolltieren) i.p. injiziert. Abbildung 14 zeigt den kompletten Versuchsaufbau.



Analysen des peripheren Blutes bei chronischer E18-Injektion

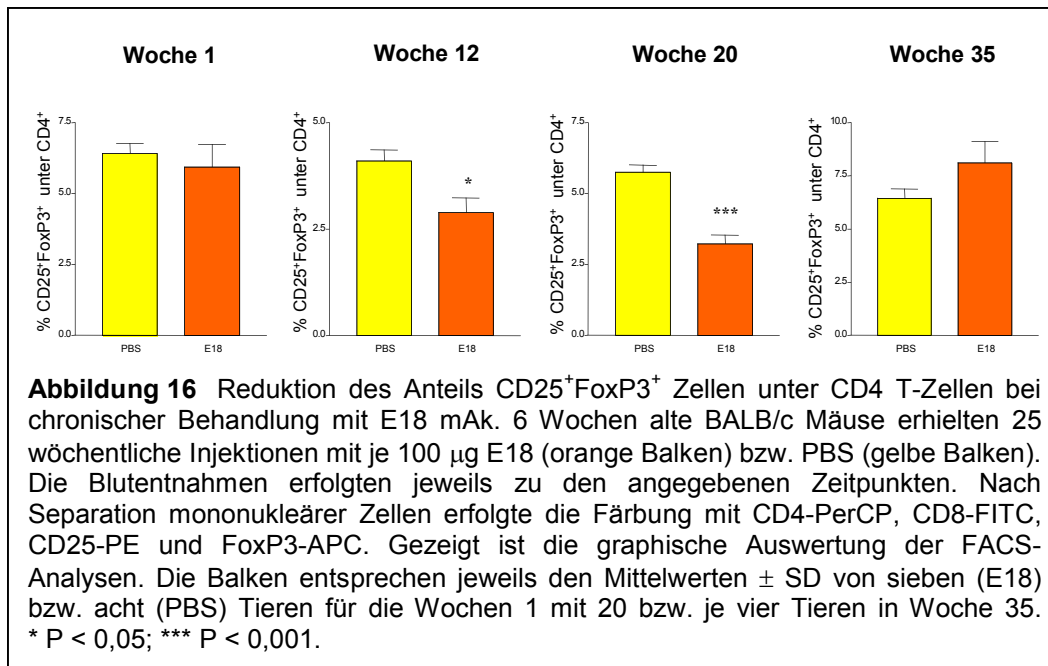
In den Analysen der Blutproben zeigte sich, dass bereits nach einmaliger Behandlung mit dem blockierenden E18 mAk der relative Anteil der CD4 T-Zellen unter allen mononukleären Zellen im peripheren Blut gegenüber den Kontrolltieren im Mittel deutlich reduziert war (30,3 % versus 55,3 %) (Abb. 15 links).



Der Anteil der regulatorischen CD25⁺FoxP3⁺ Zellen unter den CD4 T-Zellen im peripheren Blut unterschied sich nach einmaliger Injektion des blockierenden α -CD28 mAk nicht von den Kontrolltieren (Abb. 15 rechts).

Im Laufe der chronischen Applikation von E18 verringerte sich der Anteil der CD4 T-Zellen unter den mononukleären Zellen weiter auf etwa die Hälfte in Woche 12 (30,0 % versus 62,0 %) und schließlich ein Drittel in Woche 20 im Vergleich zu den Kontrolltieren (16,0 % versus 43,4 %) (nicht abgebildet).

Während nach einer Injektion des blockierenden α -CD28 mAk E18 der Anteil der regulatorischen Zellen unter den CD4 T-Zellen im peripheren Blut keine Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle zeigte (Abb. 15 rechts und Abb. 16), führte eine chronische Behandlung mit E18 zu einer langsamen, aber stetigen Abnahme CD25⁺FoxP3⁺ Zellen unter den CD4 T-Zellen. Nach 12 Injektionen mit je 100 µg E18 lag der Anteil regulatorischer Zellen an CD4 T-Zellen im Mittel etwa 30 % unter den mit PBS behandelten Kontrolltieren (2,9 % versus 4,1 %) (Abb. 16). Nach 20 Wochen reduzierte sich der Anteil CD25⁺FoxP3⁺ Zellen auf nahezu die Hälfte des Wertes PBS behandelter Kontrollen (3,2 % versus 5,8%) (Abb. 16).



Nach Aussetzen der E18 Injektionen erholte sich die Population regulatorischer T-Zellen. 13 Wochen nach der letzten Behandlung konnte kein signifikanter Unterschied im Anteil der T_{regs} unter CD4 T-Zellen im peripheren Blut festgestellt werden (Abb. 16).

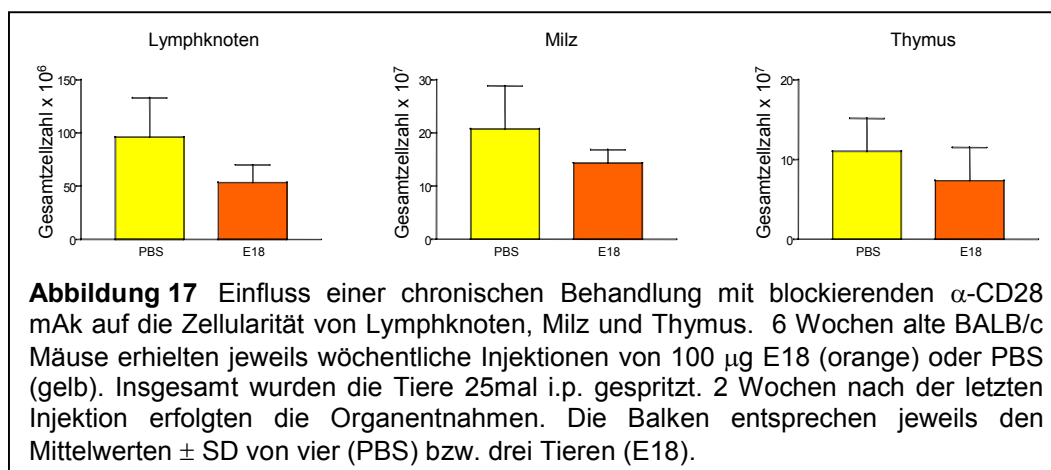
Die „natürlichen“ T_{regs} leisten einen entscheidenden Beitrag im Schutz vor immunopathologischen Prozessen und autoimmunen Reaktionen [u.a. Sakaguchi, S., et al. 2006].

Daher wurden die Blutproben von Woche 12 sowie 20 ferner auf das Vorhandensein autoreaktiver Antikörper getestet. Das Screening der Mausseren umfasste die folgenden vier häufigsten Autoantikörper: antinukleäre Antikörper (ANA), anti-mitochondriale Antikörper (AMA), Antikörper gegen die glatte Muskulatur (ASMA/ GMA) und Antikörper gegen Magenparietalzellen (AGPCA). Die permanente Blockade des kostimulatorischen CD28 Moleküls mit resultierender Reduktion des Anteils regulatorischer T-Zellen im peripheren Blut führte zu den angegebenen Zeitpunkten nicht zu einer Induktion oben genannter Antikörper (nicht abgebildet).

Analyse der peripheren Lymphknoten, Milz und Thymus nach 25wöchiger Behandlung mit E18

Über einen Zeitraum von 25 Wochen wurden die Mäuse jeweils insgesamt mit 2,5 mg des blockierenden E18 mAk behandelt. 14 Tage nach der letzten Injektion wurden die Versuchs- und Kontrolltiere je in zwei Gruppen geteilt. Die Organentnahmen erfolgten demnach zwei bzw. 13 Wochen (siehe unten) nach der letzten Injektion.

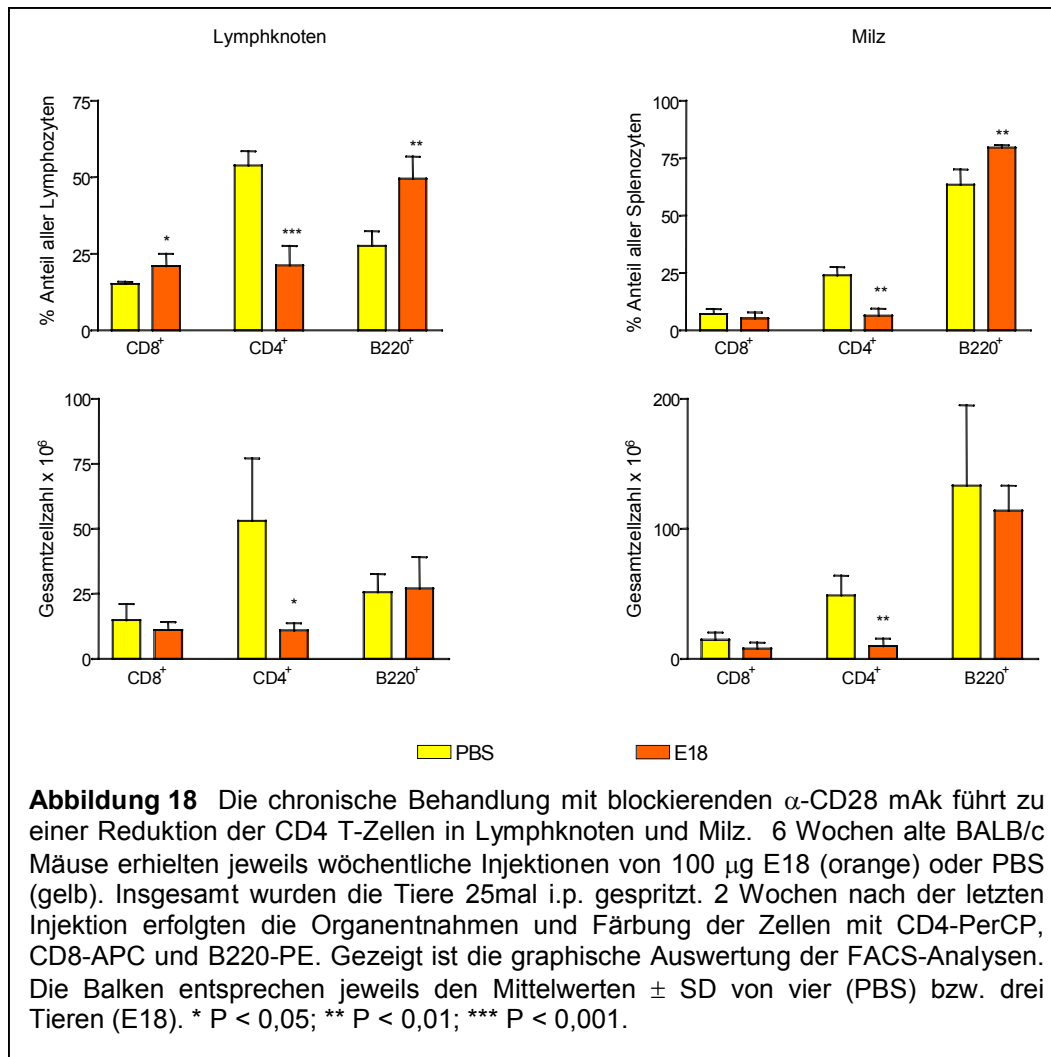
Abbildung 17 zeigt, dass eine chronische Blockade von CD28 durch E18 mAk in allen drei analysierten Organen zu einer leichten, jedoch statistisch nicht signifikanten Reduktion der Gesamtzellzahlen führte.



Im Gegensatz zu den Blutanalysen beobachtete man eine anteilige Zunahme der B-Zellen, sowie in den Lymphknoten zusätzlich der CD8 positiven T-Zellen (Abb. 18 oben).

Gleichermaßen hingegen zeigten die Analysen von Lymphknoten und Milz, dass der Anteil CD4 positiver T-Zellen in der Zusammensetzung der Organe durch die Behandlung mit E18 deutlich reduziert war (LK: 21,3 % versus 53,9%; Milz: 6,5 % versus 24,0 %) (Abb. 18 oben).

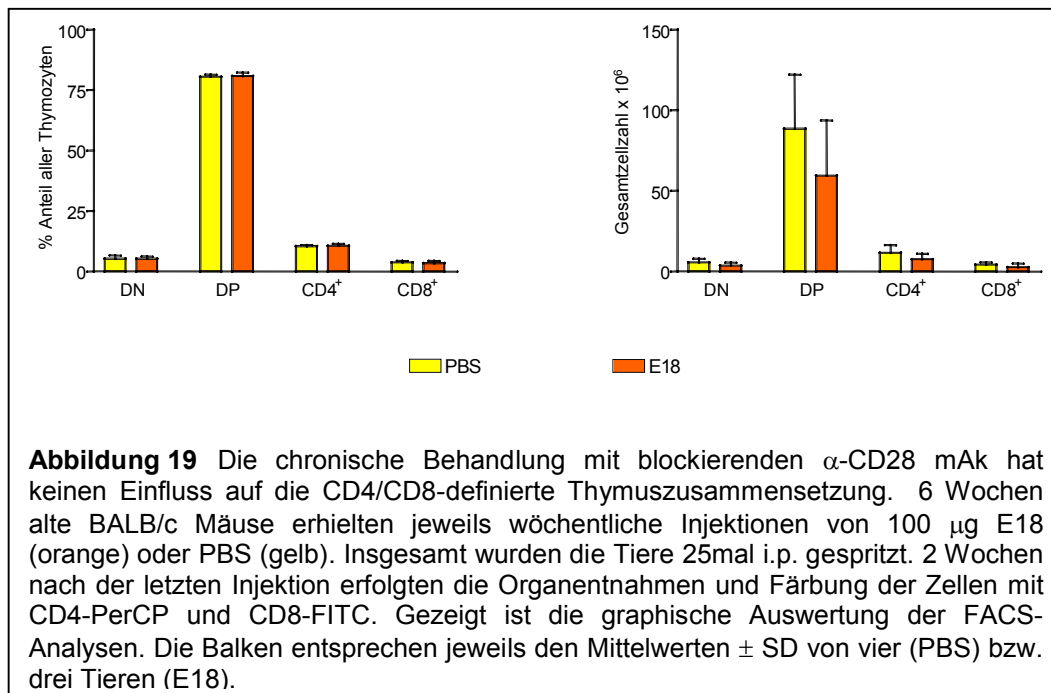
Betrachtete man die Gesamtanzahl der jeweiligen Zellpopulationen in den Organen, so ließ sich erkennen, dass die absolute Zahl an B-Zellen sowie CD8 T-Zellen durch eine Behandlung mit E18 mAk nicht beeinflusst werden konnte (Abb. 18 unten).



Einzig die absolute Anzahl an CD4 T-Zellen stellte sich in Übereinstimmung mit den einmaligen Ak-Behandlungen (siehe oben) nach der chronischen Applikation von E18 mAk reduziert dar. In den Lymphknoten und der Milz betrug die Gesamtzahl CD4 positiver Zellen im Mittel ca. ein Fünftel des Wertes der Kontrolltiere (LK: $11,0 \times 10^6$ versus $53,0 \times 10^6$ Zellen; Milz: $9,8 \times 10^6$ versus $48,8 \times 10^6$ Zellen) (Abb. 18 unten).

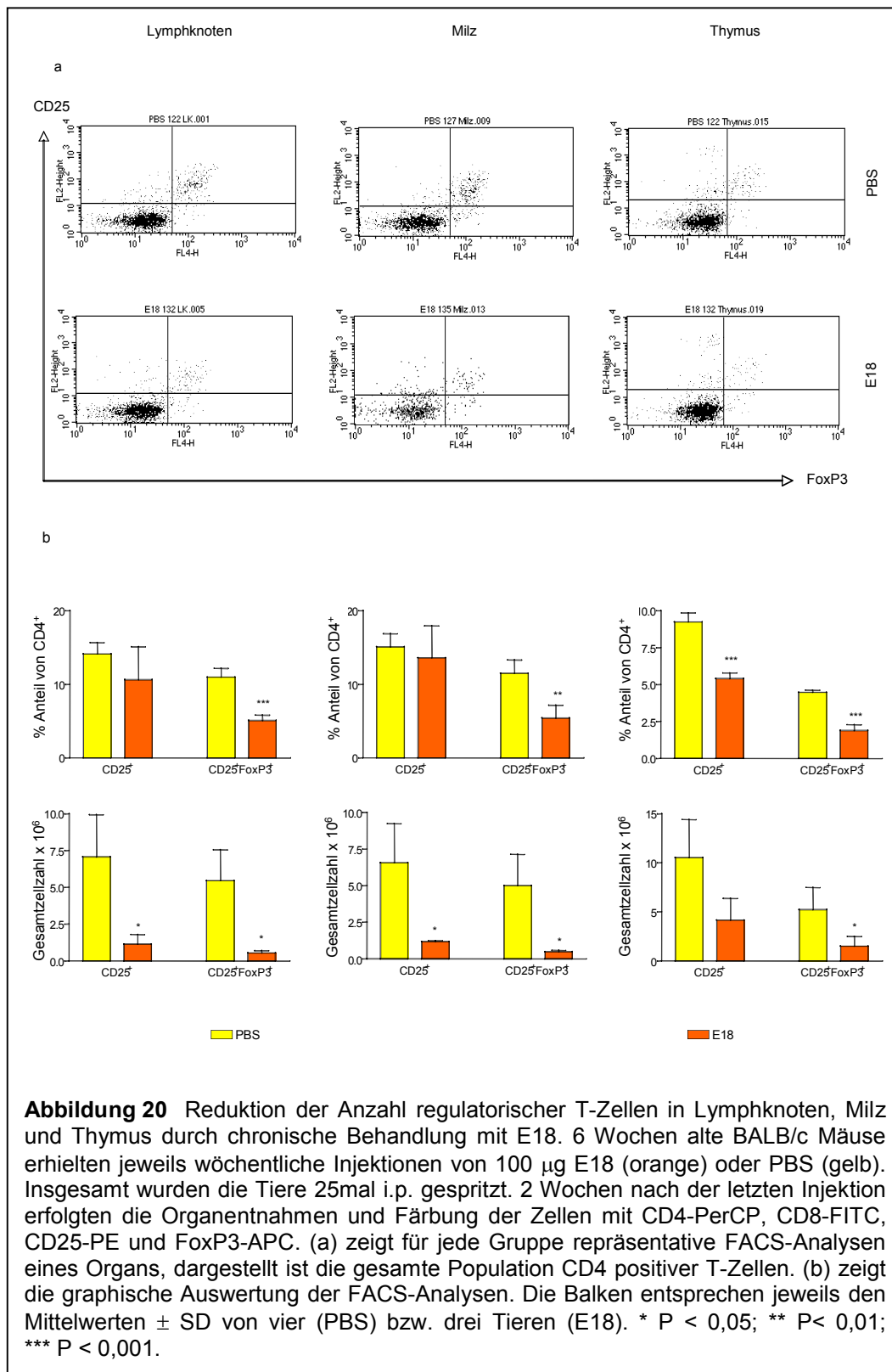
Im Gegensatz zu den bisherigen Beobachtungen im Blut, Lymphknoten und Milz wurde die CD4/CD8-definierte Zusammensetzung der Thymi durch die chronische Behandlung mit E18 nicht beeinflusst. Sowohl der relative Anteil, als auch die absolute Anzahl der einzelnen Populationen im Thymus, insbesondere

auch der CD4 T-Zellen, differierte nach chronischer Behandlung mit E18 nicht mit dem der Kontrolltiere (Abb. 19).



Bei Analyse der regulatorischen T-Zellen hingegen zeigte sich in allen drei untersuchten Organen eine einheitliche Reduktion des Anteils an Tregs unter den CD 4 T-Zellen, ebenfalls in Übereinstimmung mit den oben beschriebenen Resultaten. Sowohl in den Lymphknoten (5,1 % versus 11,0 %), der Milz (5,5 % versus 11,5 %), als auch im Thymus (1,9 % versus 4,5 %) lag der mittlere Anteil CD25⁺FoxP3⁺- Zellen um mehr als die Hälfte unter den Kontrollen (Abb. 20a und b oben).

Auch die absolute Anzahl an regulatorischen T-Zellen stellte sich in allen drei Organen vermindert dar. Im Thymus war die Gesamtanzahl an CD25⁺FoxP3⁺- Zellen um ca. 70 % reduziert (1,5 x 10⁵ versus 5,2 x 10⁵ Zellen), in den Lymphknoten (0,5 x 10⁶ versus 5,5 x 10⁶ Zellen) und der Milz (0,5 x 10⁶ versus 5,0 x 10⁶ Zellen) sogar um ca. 90 % (Abb. 20 unten).



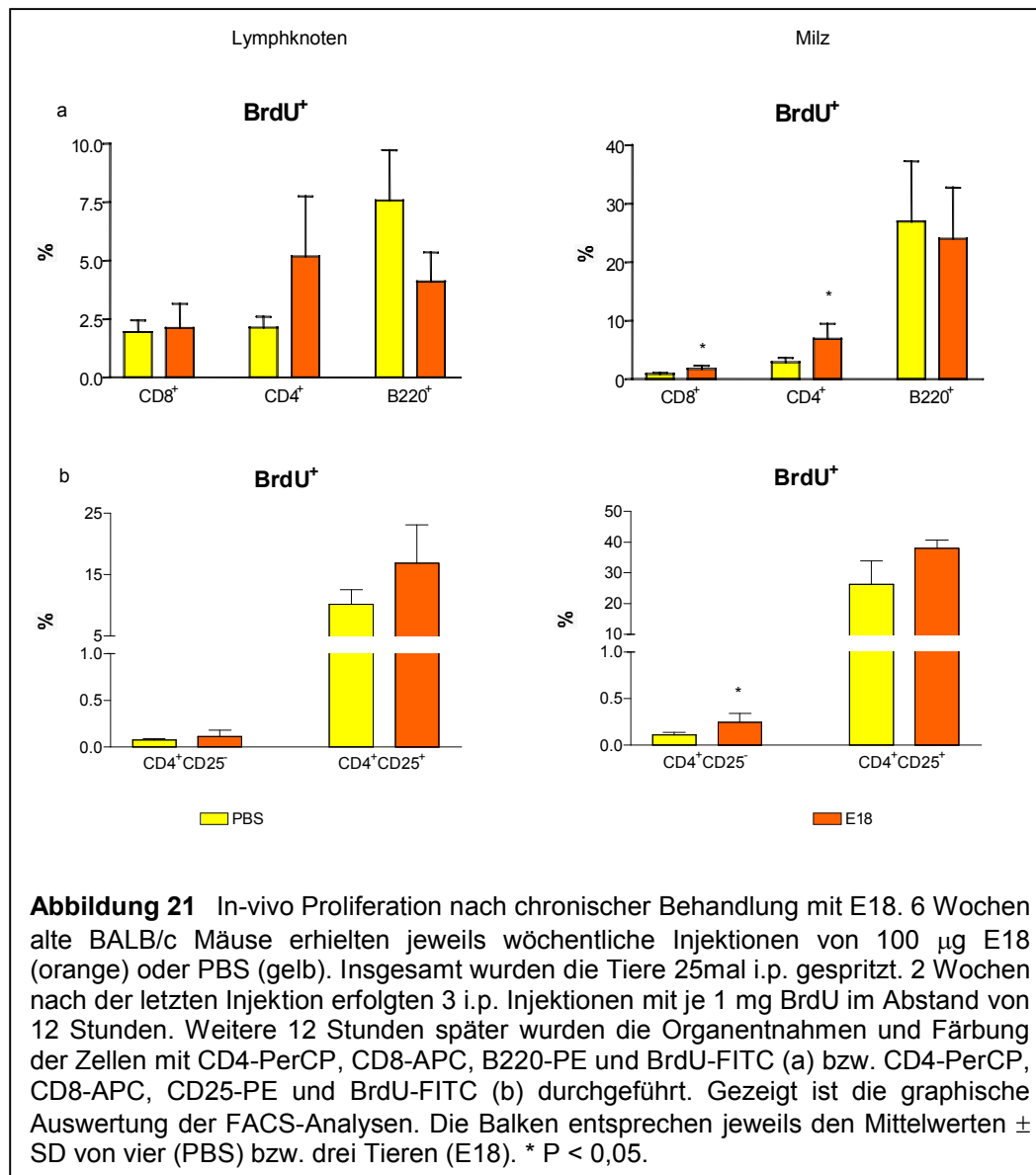
Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass eine chronische Applikation des blockierenden α -CD28 mAk E18 über einen Zeitraum von 25 Wochen zu einer Reduktion CD4 positiver Zellen im peripheren Blut, Lymphknoten und der Milz führt. Weiterhin wurde in den mit E18 behandelten Tieren eine stark verringerte Anzahl an regulatorischen T-Zellen im Blut, sowie in allen untersuchten Organen festgestellt, ohne dass es zu messbarer Autoimmunität kam.

Trotz der Tatsache, dass $CD4^+CD25^+$ T_{reg} Zellen in vitro anerg sind, proliferieren sie bei Transfer in lymphopenische Mäuse [Annacker, O., et al. 2001, Gavin, M. A., et al. 2002]. Ferner zeigen periphere $CD4^+CD25^+$ T Zellen unter physiologischen Bedingungen eine stärkere Proliferation als $CD4^+CD25^-$ T-Zellen [Hori, S., et al. 2002, Fisson, S., et al. 2002, Sakaguchi, S., et al. 2004] (Abb. 21b). Ausgehend von diesen Daten, sowie einer Reduktion von CD4 und regulatorischen T- Zellen in E18 behandelten Tieren (siehe oben), sollte der Einfluss einer chronischen Applikation von E18 mAk auf die Proliferation einzelner Zellpopulationen in den untersuchten Organen nach Aussetzen der Ak-Behandlung analysiert werden.

Abbildung 21a zeigt, dass durch eine dauerhafte Blockade des kostimulatorischen CD28 Rezeptors der Anteil proliferierender T- und B-Zellen in peripheren Lymphknoten statistisch nicht signifikant beeinflusst werden konnte. Jedoch lag der Anteil proliferierender $CD4^+$ T-Zellen im Mittel etwa zweifach über der Kontrolle (Abb. 21a), was die Erholungsphase der selektiv reduzierten CD4 Zellen widerspiegelt. Die B-Zellen proliferierten im Gegensatz hierzu weniger stark (Abb. 21a).

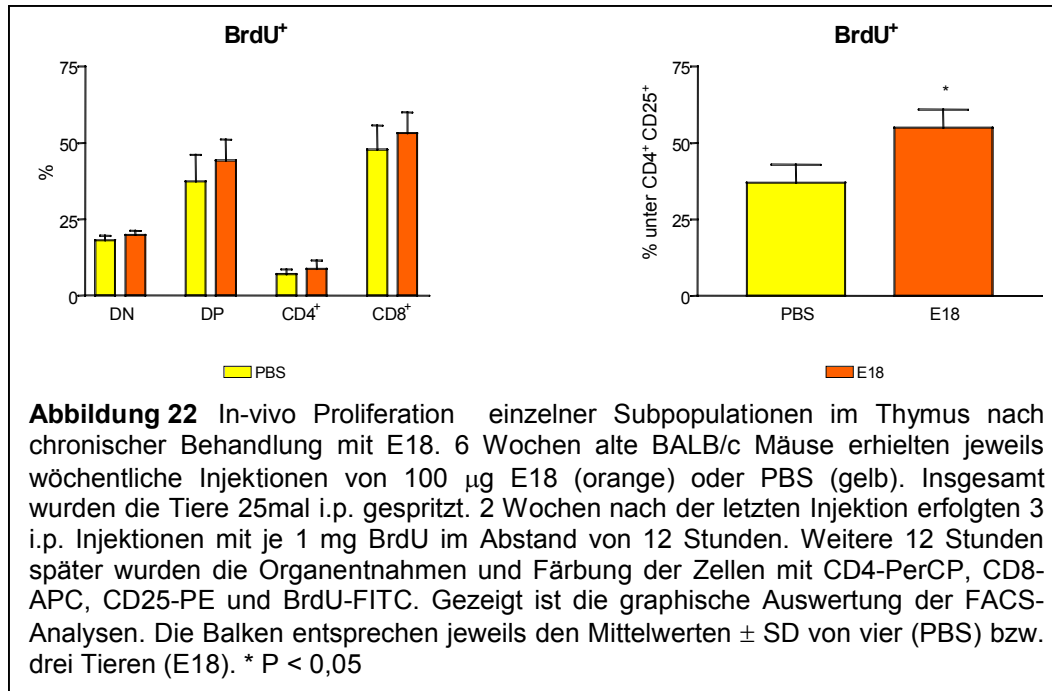
Innerhalb der CD4 T-Zellen unterschied sich weder bei CD25 negativen noch positiven Zellen die in vivo Proliferation von den Kontrollen (Abb. 21b links).

In der Milz lag der Anteil proliferierender CD8 (1,7 % versus 0,9 %) sowie CD4 T-Zellen (6,9 % versus 2,9 %) im Mittel etwa 2fach über den Kontrollwerten (Abb. 21a rechts). Unter den CD4 Zellen zeigten vor allem die konventionellen (0,2 % versus 0,1 %), nicht die regulatorischen Zellen, eine erhöhte Proliferation (Abb. 21b rechts).

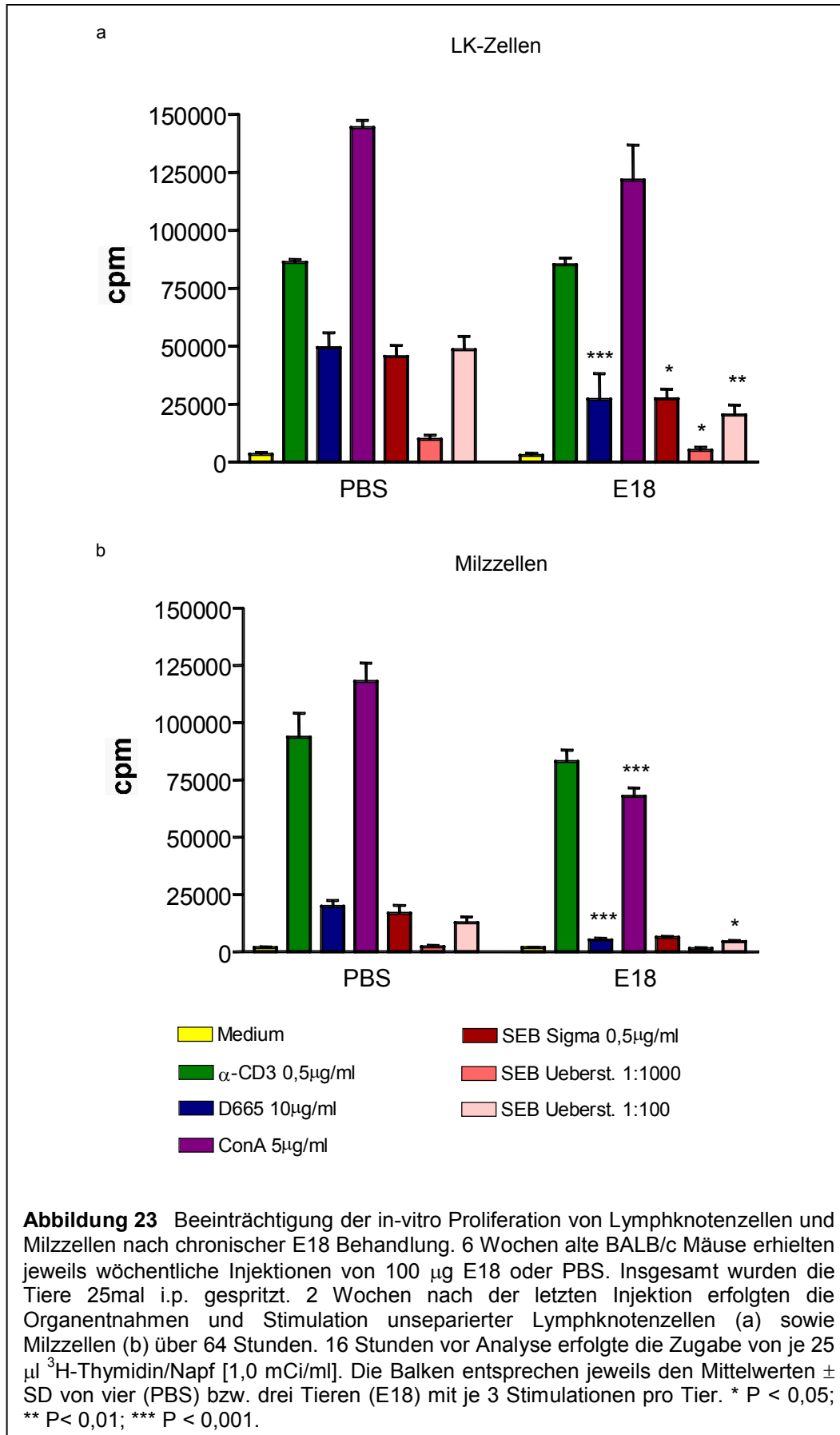


Sowohl in den Lymphknoten, als auch in der Milz zeigten die regulatorischen T-Zellen eine stärkere Proliferation als konventionelle CD4⁺CD25⁻ T-Zellen (Abb. 21).

Im Thymus hob sich nur die Population der CD4⁺CD25⁺ T-Zellen im Vergleich zu der Kontrollgruppe ab (Abb. 22). Dort lag der Anteil der proliferierenden regulatorischen Zellen im Mittel etwa ein Drittel über der PBS-Gruppe (55,0 % versus 37,1 %) (Abb. 22 rechts).



In-vitro Proliferationstests ergaben eine im Vergleich zur Kontrollgruppe deutlich reduzierte ex-vivo Proliferationsfähigkeit der mit E18 behandelten Tiere. Hierzu wurden nicht separierte Lymphknotenzellen (Abb. 23a) und Milzzellen (Abb. 23b) zusammen mit verschiedenen Stimuli über 64 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Die Aktivierung der T-Zellen erfolgte durch Zugabe von anti-CD3 mAk, beziehungsweise dem Mitogen Concanavalin A (ConA) über den CD3-Komplex. Dieser Komplex ist für die Signaltransduktion der T-Zelle, nicht aber für die Antigen/ MHC-Erkennung verantwortlich. Ebenso als Stimulans verwendet wurde das Staphylokokkenenterotoxin B (SEB), welches als Superantigen wirkt und zu einer peptidunabhängigen T-Zell-Aktivierung führt. Eine weitere Aktivierung der T-Zellen erfolgte durch den CD28 Superagonisten (D665) über den kostimulatorischen Rezeptor CD28 (siehe oben).



Analyse der Mäuse nach 13 Wochen Erholungsphase im Anschluss an eine 25wöchige Behandlung mit E18

In einem zweiten Teil des Experimentes wurde den Versuchstieren im Anschluss an die chronische Applikation von E18 mAk eine 13wöchige Rekonvaleszenzphase gewährt.

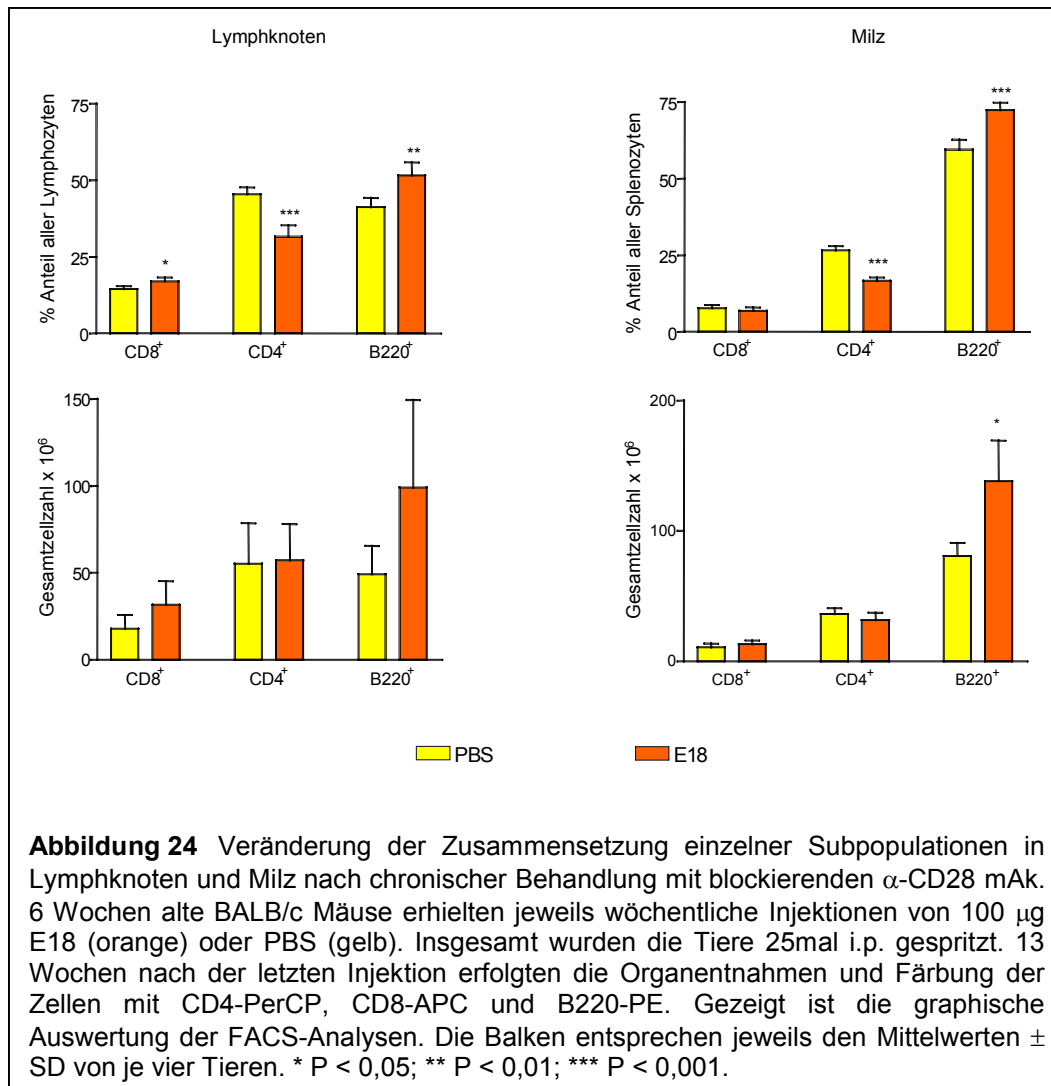
Im vorhergehenden Abschnitt über die peripheren Blutanalysen wurde bereits erwähnt, dass die Suppression regulatorischer T-Zellen nur vorübergehend stattfand und sich der Anteil CD25⁺FoxP3⁺ Zellen unter den CD4 T-Zellen nach Aussetzen der Behandlung nicht mehr von den Kontrolltieren unterschied (Abb. 16 rechts).

Bei der Untersuchung der Lymphknoten und Milz zeigte sich, dass sich selbst nach 13 Wochen Erholungsphase die prozentuale Verteilung der einzelnen Subpopulationen im Vergleich zur Kontrollgruppe noch verändert darstellte (Abb. 24 oben). Während zwei Wochen nach der letzten Injektion jedoch der Anteil der CD4 T-Zellen in den peripheren Lymphknoten und in der Milz auf etwa ein Drittel reduziert war (siehe oben, sowie Abb. 18 oben), so lag der Anteil CD4 positiver Zellen 13 Wochen später im Mittel bei etwa zwei Drittel im Vergleich zur Kontrolle (LK: 31,7 % versus 45,5 %; Milz: 16,7 % versus 26,6 %) (Abb. 24 oben). Auch hier beobachtete man eine relative Zunahme des Anteils der B-Zellen, sowie in den Lymphknoten zusätzlich der CD8 positiven T-Zellen (Abb. 24 oben).

Die absolute Zellzahl der jeweiligen Populationen in Lymphknoten und Milz ließ hingegen im Mittel fast keine Unterschiede erkennen (Abb. 24 unten). Insbesondere die Population der CD4 T-Zellen zeigte im Vergleich eine verhältnismäßig geringe Schwankungsbreite.

Lediglich in der Milz lag die Gesamtanzahl an B220 positiven B-Zellen über den Kontrollwerten (Abb. 24 rechts unten).

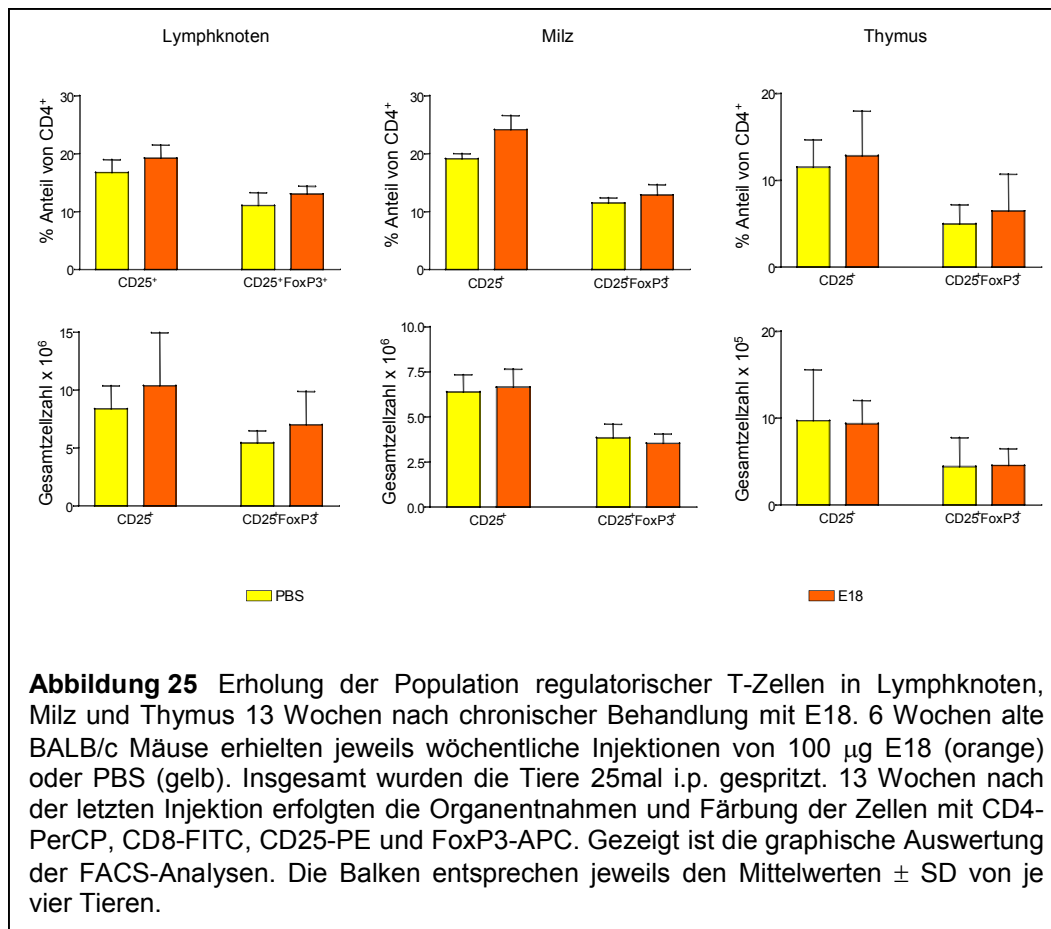
Im Thymus stellte sich sowohl die CD4/CD8-definierte Zusammensetzung, als auch die Zellzahl der jeweiligen Subpopulationen, auch 13 Wochen nach der letzten Injektion von E18 mAk unverändert dar (nicht abgebildet).



Im Hinblick auf die regulatorischen T-Zellen bestätigte sich in allen drei untersuchten Organen die Beobachtung aus den peripheren Blutanalysen nach Aussetzen der Injektionen (siehe oben).

Sowohl der Anteil an regulatorischen T-Zellen unter den CD 4 T-Zellen, als auch die absolute Anzahl an T_{regs} in Lymphknoten, Milz und Thymus hatte sich innerhalb der Rekonvaleszenzphase von 13 Wochen erholt und wies keine signifikanten Unterschiede mehr im Vergleich zu PBS-behandelten Tieren auf (Abb. 25).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Reduktion an regulatorischen T-Zellen im Blut, Lymphknoten, Milz und Thymus durch chronische Behandlung

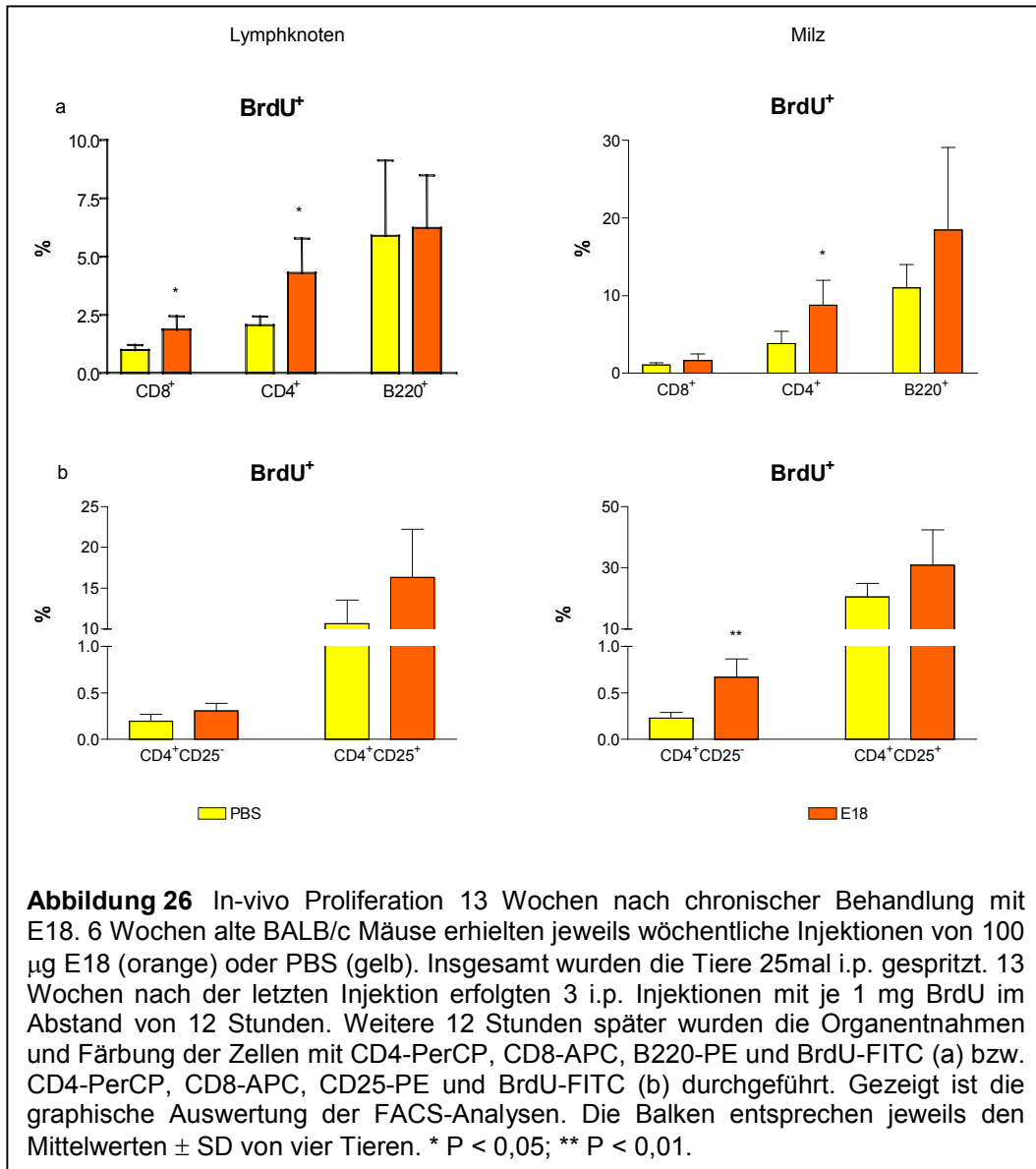


mit dem blockierenden α -CD28 spezifischen mAk E18 nicht von Dauer, sondern innerhalb von etwa drei Monaten komplett reversibel ist.

Während kurz nach Aussetzen der E18 mAk Injektionen die in-vivo Proliferation einzelner Populationen in den Lymphknoten nicht von den Kontrollen differierte, so lag der proliferierende Anteil an CD4 (4,3 % versus 2,1 %) und CD8 T-Zellen (1,9 % versus 1,0 %) nach 13wöchiger Rekonvaleszenzphase im Mittel etwa zweifach über den Referenzwerten (Abb. 26 linke Spalte).

In der Milz stellte sich lediglich der Anteil proliferierender CD4 positiver Zellen erhöht dar (8,8 % versus 3,8 %) (Abb. 26a), wobei die konventionellen CD4⁺CD25⁻ Zellen (0,7 % versus 0,2 %) und nicht die regulatorischen Zellen betroffen waren (Abb. 26b).

Auch zu diesem Zeitpunkt zeigten die regulatorischen T-Zellen sowohl in den Lymphknoten, als auch in der Milz eine stärkere Proliferation als konventionelle

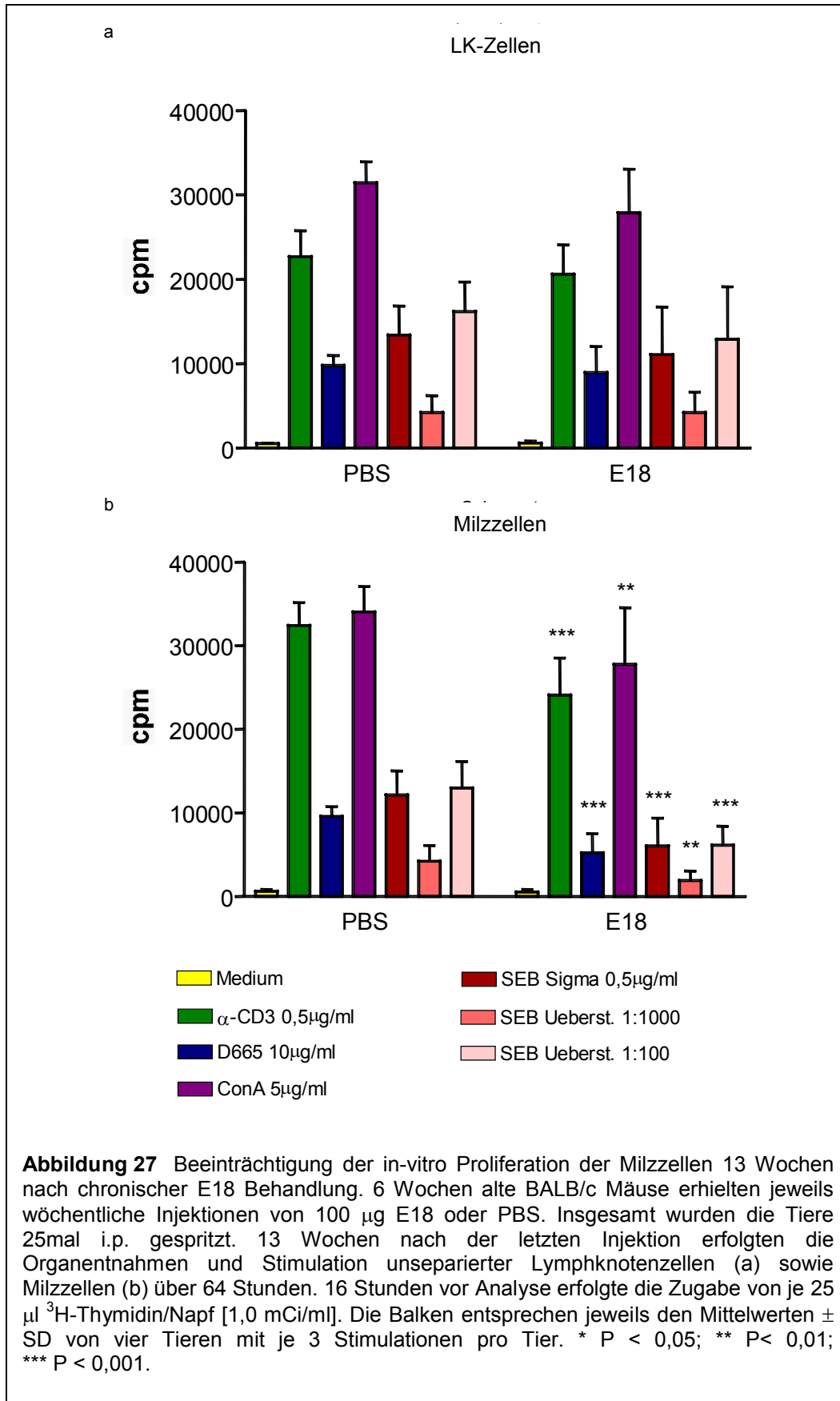


CD4⁺CD25⁻ T-Zellen (Abb. 26), was auf den physiologisch höheren Turnover der T_{regs} zurückzuführen ist.

Die Analysen der Subpopulationen im Thymus ergaben hinsichtlich der in-vivo Proliferation keine Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle (nicht abgebildet).

Die in-vitro Proliferationstests nicht separierter Lymphknotenzellen ergaben 13 Wochen nach Beendigung der Behandlung mit E18 mAk keine Unterschiede mehr im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abb. 27a). Die Stimulation der T-Zellen erfolgte jeweils in analoger Weise (siehe oben).

Die Milzzellen hingegen zeigten auch 3 Monate nach der letzten Injektion des blockierenden CD28-spezifischen monoklonalen Antikörpers eine deutlich reduzierte ex-vivo Proliferationsfähigkeit der Zellen E18-behandelter Tiere (Abb. 27b).



DISKUSSION

Die Behandlung mit CD28-spezifischen monoklonalen Antikörpern hat keinen Einfluss auf die Differenzierung von T-Zellen im Thymus

Wenngleich die entscheidende Rolle des kostimulatorischen Moleküls CD28 bei der Aktivierung und Toleranzentwicklung von T-Zellen schon seit Langem bekannt ist [Hara, T., & Fu, S. M. 1985, zusammengefasst u.a. Sharpe, A. H., & Freeman, G. J. 2002], ist die Rolle dieses Oberflächenmoleküls in der Proliferation und Entwicklung von T-Zellen noch nicht vollends verstanden. Während der Reifung der Thymozyten in der Maus nimmt die Expression von CD28 auf der Zelloberfläche bis zum Stadium der DP Thymozyten stetig zu [Gross, J. A., et al. 1992, Williams, J. A., et al. 2005], auch die Verteilung der physiologischen Liganden B7-1 und B7-2, z. B. auf Antigen präsentierenden Zellen im Stroma des Thymus, ist fein reguliert [Hathcock, K. S., et al. 1994]. So finden bereits während der frühesten Stadien der T-Zell-Entwicklung im thymischen Kortex [Lind, E. F., et al. 2001, zusammengefasst in Lehar, S. M., et al. 2002] Interaktionen zwischen CD28 und seinen Liganden statt [Zheng, X., et al. 2004].

In der vorliegenden Arbeit wird in verschiedenen in-vivo (Abb. 10), ex-vivo (Abb. 11 und 12) und in-vitro (Abb. 13) Experimenten gezeigt, dass eine Behandlung mit dem CD28 Superagonisten D665 keinen Einfluss auf die Differenzierung unreifer Thymozyten nimmt. Im Gegensatz zu aktuellen Ergebnissen um die Arbeitsgruppe von Richard J. Hodes, die in Abwesenheit eines Signals durch den pre-TCR eine Differenzierung von DN zu DP Thymozyten über den B7/CD28 Signalweg aufzeigen konnte [Williams, J. A., et al. 2005], ist die alleinige in-vivo Stimulation von Rag^{-/-} Mäusen [Mombaerts, P., et al. 1992] mit dem Superagonisten nicht ausreichend, um die Entwicklungsblockade dieser Mäuse zu umgehen (Abb. 10). Andere Arbeiten lassen sogar auf eine Unterdrückung der Differenzierung CD4⁺CD8⁻ (DN) Thymozyten durch eine Interaktion zwischen CD28 und seinen Liganden schließen, während die

Proliferation und das Überleben der DN T-Zellen gefördert wird [Zheng, X., et al. 2004].

Die Differenzierung von DP Thymozyten zu SP T-Zellen soll im Widerspruch zu den eigenen Ergebnissen (Abb. 10–13) laut Literatur durch eine Behandlung mit α -CD28 Ak in-vitro gesteigert werden [Cibotti, R., et al. 1997, Groves, T., et al. 1997]. Eine Blockade bzw. Stimulation von CD28 und seiner Signale kann demnach Einfluss auf die Reifung der T-Zellen im Thymus nehmen. So verstärkt die Abwesenheit der CD28/B-7 Interaktion die positive Selektion, was sich in einer erhöhten Anzahl von CD8 SP T-Zellen widerspiegelt [Vacchio, M. S., et al. 2005].

Eine verringerte Deletion von DP Thymozyten in-vivo als Reaktion auf eine Stimulation des TZR ohne eine Kostimulation durch CD28 lässt auf eine Rolle von CD28 auch in der negativen Selektion von Thymozyten vermuten [Noel, P. J., et al. 1998, Lucas, B., & Germain, R. N. 2000]. Hierfür sprechen auch verschiedene Studien, die in-vitro zeigen, dass eine CD28 Quervernetzung die CD3-vermittelte negative Selektion sowohl in FTOC [Amsen, D., & Kruisbeek, A. M. 1996], als auch in Suspensionskulturen [Punt, J. A., et al. 1994, Noel, P. J., et al. 1998] verstärken.

Im Gegensatz dazu bleibt in Analysen fetaler Thymus-Organ-Kulturen die negative Selektion und Differenzierung von Thymozyten durch eine Blockade von CD28 mittels CTLA-4-Fc [Jones, L. A., et al. 1993], bzw. in der vorliegenden Arbeit mit E18 mAk (Abb. 11 und 12) unbeeinflusst. Dies könnte sich, zumindest im Hinblick auf den monovalent bindenden E18 mAk [Dennehy, K. M., et al. 2006], durch eine fehlende Quervernetzung und Stimulation von benachbarten CD28-Molekülen erklären lassen. Die eigenen Ergebnisse der Suspensionskulturen (Abb. 13) ergaben ebenso keine Hinweise auf einen möglichen Einfluss blockierender CD28 mAk in der Entwicklung früher T-Zellen. Auch laut Ergebnissen der Arbeitsgruppe um T. W. Mak bleibt die negative Selektion in CD28-defizienten Mäusen in-vivo unbeeinträchtigt [Shahinian, A., et al. 1993].

Eine mögliche Erklärung für diese widersprüchlichen Ergebnisse könnte sowohl in den unterschiedlich verwendeten Versuchssystemen als auch in den verschiedenen Wegen der negativen Selektion liegen: zum Einen ein CD28-abhängiger Weg für Interaktionen mit geringerer Avidität (wenn Selbst-Antigene auf B7-exprimierende APZ in der kortikomedullären Übergangszone des Thymus treffen), zum Anderen ein CD28-unabhängiger Weg für hochavide Interaktionen mit Selbst-Antigenen, die wahrscheinlich bereits im Kortex stattfinden [Punt, J. A., et al. 1997].

Den einzigen Hinweis auf eine mögliche Einflussnahme CD28-spezifischer monoklonaler Antikörper auf die Entwicklung von T-Zellen im Thymus lieferten die Analysen der CD4⁺CD25⁺ T-Zellen in den FTOC. Hier zeigte sich besonders nach sechs Tagen Inkubation eine Reduktion des Anteils und der Anzahl dieser Zellpopulation unabhängig von der Art des verwendeten α -CD28 mAk (Abb. 12). Ob es sich bei diesen Zellen um regulatorische T-Zellen handelt ist jedoch umstritten: Die Arbeitsgruppe um A. Y. Rudensky konnte zeigen, dass die Entwicklung regulatorischer T-Zellen im Vergleich zu nichtregulatorischen T-Zellen im Thymus verzögert ist, und frühestens bei drei bis vier Tage alten Mäusen durch einen Anstieg der FoxP3-Expression eine genaue Differenzierung möglich ist [Fontenot, J. D., et al. 2005].

Die Behandlung mit CD28 Superagonisten hat keinen Einfluss auf die Zusammensetzung der einzelnen Populationen im Thymus

Die Fähigkeiten und Auswirkungen einer Behandlung mit CD28 Superagonisten auf das T-Zell-Kompartiment sekundär lymphatischer Organe wurde durch die Arbeitsgruppe um Professor Hünig in der Literatur bereits beschrieben. So führt die Applikation des CD28 Superagonisten bei Ratten [Tacke, M., et al. 1997] und Mäusen [Gogishvili, T., et al. 2009] zu einer vorübergehenden, aber signifikanten Erhöhung der Gesamtanzahl an T-Zellen, was sich auch in einer Größenzunahme peripherer Lymphknoten und der Milz widerspiegelt. Betroffen

ist vor allem die Population CD4 positiver T-Zellen. Diese vorübergehende Lymphozytose wurde von den Versuchstieren stets gut toleriert [Rodriguez-Palermo, M., et al. 1999, Gogishvili, T., et al. 2009].

Genauere Untersuchungen der CD4 Population zeigten, dass insbesondere die Population von regulatorischen CD4⁺CD25⁺ T-Zellen (T_{reg}) [Lin, C. H., & Hünig, T. 2003, Gogishvili, T., et al. 2009] von der Proliferation betroffen waren: So stieg der Anteil regulatorischer Zellen von anfangs 5% auf etwa 20% an Tag Drei an, und erreichte erst nach zehn Tagen wieder die Ausgangswerte. Dabei konnte mit Hilfe von Transferexperimenten gezeigt werden, dass die massive Zunahme an T_{regs} nicht auf einer Konversion konventioneller CD25 negativer CD4 T-Zellen beruht [Lin, C. H., & Hünig, T. 2003, Gogishvili, T., et al. 2009]. Dies legt Nahe, dass eine Proliferation prä-existierender natürlicher T_{regs} zu der beobachteten Zunahme dieser Population führt.

Für diese Annahme sprechen auch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit: Sowohl in verschiedenen in-vivo (Abb. 4-7), als auch ex-vivo (Abb. 9) Experimenten ließ sich kein, bzw. nur ein sehr geringer Einfluss auf die Zusammensetzung der Populationen im Thymus feststellen. Die in peripheren Lymphknoten und der Milz der Ratte beschriebene Expansion von CD4 T-Zellen [Tacke, M., et al. 1997], mit einer verhältnismäßig stärkeren Zunahme regulatorischer Zellen [Lin, C. H., & Hünig, T. 2003, Gogishvili, T., et al. 2009] war nicht auf den Thymus übertragbar. Dies macht eine Zunahme der entsprechenden Zellzahlen durch eine de-novo Synthese von konventionellen oder regulatorischen T-Zellen im Thymus unwahrscheinlich. Ferner zeigte sich auch keine Beeinflussung der T-Zell-Entwicklung durch eine Behandlung mit CD28 Superagonisten (siehe oben).

An Tag 7 nach Applikation des Superagonisten zeigten sich sogar entgegengesetzte Resultate mit einer Reduktion der Gesamtpopulation, der Anzahl CD4 positiver Zellen und sowohl der Anzahl als auch des Anteils DP Zellen im Thymus. In Zusammenschau mit den Ergebnissen der NTOC-Experimente, in denen die Gesamtzahl und Zusammensetzung der CD4- und CD8-definierten Populationen durch eine Behandlung mit dem Superagonisten

unverändert blieb, ist eine Stress-induzierte Reaktion für den Verlust von v.a. DP Zellen in-vivo (Abb. 5b, Tag 7) wahrscheinlich.

Die Behandlung mit dem blockierenden α -CD28 mAk hat keinen Einfluss auf die Zusammensetzung der CD4- und CD8-definierten Subpopulationen im Thymus

Analysen zu den Eigenschaften und Fähigkeiten des α -CD28 mAk E18 sind ein aktueller Forschungsschwerpunkt der Arbeitsgruppe um Professor Hünig. Dieser Antikörper bindet monovalent an ein Epitop des CD28 Moleküls nahe der physiologischen B7-Bindungsstelle [Dennehy, K. M., et al. 2006]. Daher könnte er einerseits die physiologische Interaktion zwischen CD28 und seinen Liganden imitieren, andererseits aber auch an dieser Stelle unterbinden. Es wurde gezeigt, dass E18 mAk im Gegensatz zu dem bisher weitverbreiteten und oft verwendeten α -CD28 mAk 37.51 in der Lage ist, die Bindung der physiologischen Liganden vollständig zu verhindern. Somit ist E18 mAk der erste in der Literatur beschriebene Antikörper, der hierzu fähig ist [Yu, X. Z., et al. 2004, Beyersdorf, N., et al. 2008].

Ferner ist E18 mAk in-vivo in der Lage eine durch Superantigene getriggerte T-Zell-Proliferation zu verhindern, ohne dass es zu einer Modulation der CD28 Expression an der Zelloberfläche oder zur Aktivierung der T-Zellen kommt [unveröffentlicht].

In der vorliegenden Arbeit hatte eine Blockade der Interaktion von CD28 und seinen Liganden keinen Einfluss auf die Differenzierung von Thymozyten (siehe oben). Auch die Zusammensetzung und Verteilung der CD4- und CD8-definierten Populationen im Thymus veränderte sich weder in in-vivo noch in-vitro Studien unter einer Behandlung mit E18 mAk, obwohl der Antikörper zu jedem Zeitpunkt der Analysen auf der Zelloberfläche der Thymozyten nachgewiesen werden konnte (Abb. 3, bzw. nicht abgebildet).

Eine entscheidende Rolle von CD28 in der Homöostase von konventionellen T-Zellen im Thymus ist somit wenig wahrscheinlich, denn weder die vollständige Blockade noch die superagonistische Stimulation (siehe oben) mittels CD28-spezifischer monoklonaler Antikörper nahmen einen merklichen Einfluss auf die Zusammensetzung der CD4- und CD8-definierten Populationen.

Die Behandlung mit dem blockierenden α -CD28 mAk reduziert die Anzahl regulatorischer T-Zellen im Thymus und peripheren Lymphknoten

Bei der Behandlung mit E18 mAk nimmt die Population der regulatorischen T-Zellen hingegen eine gewisse Sonderstellung ein. Während andere Subpopulationen im Thymus unbeeinflusst bleiben (siehe oben), konnte durch die Applikation von E18 mAk selektiv sowohl der Anteil regulatorischer T-Zellen, als auch ihre absolute Anzahl im Thymus gesenkt werden. Dies wurde zu allen untersuchten Zeitpunkten beobachtet und zeigte sich auch in peripheren Lymphknoten. Dabei konnte im Thymus der Anteil an regulatorischen T-Zellen unter den CD4 positiven T-Zellen in-vivo um bis zu etwa 60 % (Abb. 6b oben links) und die Gesamtanzahl an T_{regs} auf etwa ein Drittel (Abb. 6b unten links) gesenkt werden. In NTOC-Experimenten reduzierte sich der Anteil an T_{regs} sogar um 75 % im Vergleich zur Isotypkontrolle (Abb. 9b). Die Auswirkungen auf die Population an T_{regs} in den peripheren Lymphknoten zeigten gleichartige Veränderungen, jedoch weit weniger dramatisch (Abb. 6).

Anscheinend im Widerspruch zu diesem reduzierten Output von im Thymus generierten T_{regs} , steigert eine Behandlung mit E18 mAk (nicht jedoch mit dem Fab Fragment) im SEB-System und in einem Modell für akute Abstoßungsreaktionen (aGVHD) den Anteil regulatorischer T-Zellen unter CD4 positiven Zellen [Beyersdorf, N., et al. 2008]. In der Anwesenheit von Fremd- oder Superantigenen und anderen proinflammatorischen Faktoren könnte somit eine agonistische Aktivität von E18 die IL-2 Produktion von konventionellen T-Zellen verstärkt haben und hierdurch die relative Zunahme der regulatorischen Zellen erklärt werden [Beyersdorf, N., et al. 2008].

Andererseits könnte eine Stimulation von CD28 auf T_{regs} mittels E18 mAk ohne eine zusätzliche Bereitstellung von IL-2 durch konventionelle T-Zellen einen direkt inhibitorischen Effekt auf T_{regs} von gesunden Mäusen haben.

Auch in der aktuellen Literatur existieren zahlreiche Hinweise über die Wichtigkeit der B7-CD28 Signale in der Homöostase der regulatorischen T-Zellen in-vivo [Salomon, B., et al. 2000, Tang, Q., et al. 2003, Yamazaki, S., et al. 2003, Malek, T. R., et al. 2004, Tai, X., et al. 2005, D`Cruz, L. M., & Klein, L. 2005]. Da unter allen T-Zellen gerade die regulatorischen T-Zellen diejenigen sind, die am meisten von CD28 mediierten Signalen abgängig sind [Salomon, B., et al. 2000, Tang, Q., et al. 2003, Tai, X., et al. 2005] wird deutlich, warum diese Population besonders empfindlich für eine Behandlung mit E18 mAk ist.

Die chronische Behandlung mit dem blockierenden α -CD28 mAk führt zu einer reversiblen Reduktion von CD4 T-Zellen und regulatorischen T-Zellen

Aufgrund der Tatsache, dass E18 mAk in Mäusen generiert wurde, konnten in einem in-vivo Langzeitversuch repetitive Dosen dieses Antikörpers in gesunde Mäuse injiziert werden, ohne dass es zu einer allergenen Reaktion kam. Bereits nach der ersten Injektion dieses Antikörpers zeigte sich in Blutanalysen eine leichte Reduktion des relativen Anteils von CD4⁺ T-Zellen unter den mononukleären Zellen (Abb. 15). Mit dem Fortschreiten des Experimentes sank dieser Anteil bis zu einem Minimum von etwa einem Drittel im Vergleich zu dem mit PBS behandelten Kontrolltieren (nicht abgebildet). Die Analysen von peripheren Lymphknoten und Milz nach der chronischen Behandlung mit E18 mAk konnten zeigen, dass nicht nur der relative Anteil von CD4 T-Zellen, sondern auch deren absolute Anzahl in den Tieren reduziert war (Abb. 18).

Eine verringerte in-vivo Proliferation der CD4⁺ Zellen als Grund für diese Reduktion konnte ausgeschlossen werden (Abb. 21), die genauen Ursachen hingegen konnten noch nicht geklärt werden. Beobachtungen in B7-transgenen und –defizienten Mäusen [Yu, X., et al. 2000], sowie fehlende Hinweise einer

direkten T-Zell Depletion durch E18 mAk [unveröffentlicht] lassen aber vermuten, dass eine teilweise und/ oder temporäre Modulation der CD28 Signale durch E18 mAk hierfür verantwortlich ist.

Auch der Anteil an regulatorischen T-Zellen unter den CD4 T-Zellen reduzierte sich stetig im Verlaufe des Experimentes (Abb. 16). Trotz der chronischen Applikation von E18 mAk konnte der Anteil regulatorischer T-Zellen unter den CD4 T-Zellen in peripheren Lymphknoten, der Milz und im Thymus um nicht mehr als etwa die Hälfte reduziert werden (Abb. 20). Obwohl auch hier die Proliferation in-vivo gesteigert schien (Abb. 21b und 22), betrug die absolute Anzahl an regulatorischen T-Zellen dabei nur noch etwa ein Zehntel im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 20). Diese Beobachtungen waren 13 Wochen nach der letzten Antikörperapplikation vollständig reversibel (Abb. 25). Die reversible Reduktion von regulatorischen T-Zellen in-vivo im Thymus und sekundär lymphatischen Organen lässt vermuten, dass E18 mAk unter diesen Bedingungen als Inhibitor des CD28-Signalweges fungiert. Hierfür spricht auch eine unterdrückte Antwort von konventionellen CD4 positiven T-Zellen als Reaktion auf eine Stimulation mit SEB und in einem Modell einer aGVHD [Beyersdorf, N., et al. 2008].

Während die Neutralisierung von zirkulierendem IL-2 mittels anti-IL-2 mAk in der Lage ist Autoimmunkrankheiten zu triggern [Setoguchi, R., et al. 2005], zeigen mit anti-CD25 mAk behandelte Tiere [McHugh, R. S., & Shevach, E. M. 2002], ebenso wie mit E18 mAk behandelte Mäuse keine klinischen oder serologischen Anzeichen für die Entwicklung einer „spontanen“ Autoimmunität (nicht abgebildet), trotz niedriger T_{reg} Zahlen für viele Wochen.

ZUSAMMENFASSUNG

Die Kostimulation über den CD28 Oberflächenrezeptor spielt eine entscheidende Rolle sowohl in der Proliferation von T-Zellen, in deren Differenzierung zu Effektorzellen, als auch in der Entwicklung und Kontrolle von regulatorischen T-Zellen. Diese Schlüsselrolle macht CD28 zu einer interessanten Zielstruktur, um den Einfluss monoklonaler Antikörper auf die Entwicklung und Homöostase von T-Zellen zu analysieren.

Die hier verwendeten Antikörper lassen sich funktionell in zwei verschiedene Kategorien einteilen: zum Einen in konventionelle Antikörper (E18 mAk), welche die physiologische Rezeptor-Liganden Interaktion blockieren, und zum Anderen in superagonistische Antikörper (D665 mAk), die in der Lage sind ruhende T-Zellen ohne eine Ligation des T-Zell Rezeptors voll zu aktivieren.

In der vorliegenden Arbeit konnte in verschiedenen in-vitro und in-vivo Experimenten gezeigt werden, dass eine Behandlung mit dem CD28 Superagonisten keinen Einfluss auf die Differenzierung von T-Zellen im Thymus nimmt, und die Zusammensetzung der einzelnen Zellpopulationen in diesem Organ unbeeinflusst bleibt.

Bei Verwendung blockierender anti-Maus CD28 mAk zeigte sich in sämtlichen Untersuchungen eine beeinträchtigte Entwicklung von regulatorischen T-Zellen innerhalb des Thymus, während die anderen Zellpopulationen unbeeinflusst blieben. Auch in Analysen peripherer Lymphknoten lag der Anteil regulatorischer T-Zellen nach Behandlung mit E18 mAk unter den Kontrollwerten.

Durch eine chronische Blockade von CD28 mittels E18 mAk ließ sich die Gesamtanzahl an T_{regs} in peripheren Lymphknoten, Milz und Thymus drastisch senken, ohne dass es zu einem vollständigen Verschwinden dieser Zellpopulation kam. Auch die absolute Zahl an CD4 positiven T-Zellen innerhalb

der peripheren Lymphknoten, Milz und Thymus der behandelten Tiere lag deutlich unter der Kontrolle.

Diese Beobachtungen waren 13 Wochen nach Beendigung der Antikörper-Applikationen vollständig reversibel und zu keinem Zeitpunkt des Experimentes ergaben sich klinische oder serologische Hinweise auf die Entwicklung von Autoimmunität trotz niedriger T_{reg} -Zahlen über mehrere Wochen.

LITERATURVERZEICHNIS

Abe, R., et al., Distinct signal transduction in mouse CD4⁺ and CD8⁺ splenic T cells after CD28 receptor ligation. *J. Immunol.*, 1995. **154**: p. 985-997

Amsen, D., & Kruisbeek, A. M., CD28-B7 interactions function to co-stimulate clonal deletion of double-positive thymocytes. *Int. Immunol.*, 1996. **8**(12): p. 1927-1936

Annacker, O., et al., CD25⁺ CD4⁺ T cells regulate the expansion of peripheral CD4 T cells through the production of IL-10. *J. Immunol.*, 2001. **166**: p. 3008-3018

Alegre, M. L., et al., T-Cell regulation by CD28 and CTLA-4. *Nat. Rev. Immunol.*, 2001. **1**(3): p. 220-228

Appleman, L. J., & Boussiotis V. A., T cell anergy and costimulation. *Immunol. Rev.*, 2001. **192**: p. 161-180

Asano, M., et al., Autoimmune disease as a consequence of developmental abnormality of a T cell subpopulation. *J. Exp. Med.*, 1996. **184**(2): p. 387-396

Bevan, M. J., In a radiation chimaera, host H-2 antigens determine immune responsiveness of donor cytotoxic cells. *Nature*, 1977. **269**: p. 417-418

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. 91-95

Beyersdorf, N., et al., CD28 superagonists put a break on autoimmunity by preferentially activating CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *Autoimmunity Reviews*, 2006. **5**: p. 40-45

Beyersdorf, N., et al., Protection from graft-versus-host disease with a novel B7 binding site-specific mouse anti-mouse CD28 monoclonal antibody. *Blood*, 2008. **112**: p. 4328-4336

Bluthmann, H., et al., T-cell-specific deletion of T-cell receptor transgenes allows functional rearrangement of endogenous alpha- and beta-genes. *Nature*, 1988. **334**: p. 156-159

von Boehmer, H., Developmental biology of T cells in T cell-receptor transgenic mice. *Annu. Rev. Immunol.*, 1990. **8**: p. 531-856

von Boehmer, H., Unique features of the pre-T-cell receptor α -chain: not just a surrogate. *Nat. Rev. Immunol.*, 2005. **5**: p. 571-577

von Boehmer, H., Peptide-based instruction of suppressor commitment in naïve T cells and dynamics of immunosuppression in vivo. *Scand. J. Immunol.*, 2005. **62**(Suppl. 1): p. 49-54

Boise, L. H., et al., Bcl-x, a Bcl-2-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death. *Cell*, 1993. **74**: p. 597-608

Bour-Jordan, H., & Bluestone, J. A., CD28 function: A balance of costimulatory and regulatory signals. *J. Clin. Immunol.*, 2002. **22**: p. 1-7

Bretscher, P., & Cohn, M. A., Theory of self-nonself discrimination. *Science*, 1970. **169**: p. 1042-1049

Bromley, S. K., et al., The immunological synapse and CD28-CD80 interactions. *Nat. Immunol.*, 2001. **2**(12): p. 1159-1166

Bruguera, E., et al., Coreceptor reversal in the thymus : signaled CD4+8+ thymocytes initially terminate CD8 transcription even when differentiating into CD8+ T cells. *Immunity*, 2000. **13**(1) : p. 59-71

Brunkow, M. E., et al., Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurf, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nat. Genet.*, 2001. **27**: p. 68-73

Cibotti, R., et al., Surface Molecules That Drive T Cell Development In Vitro in the Absence of Thymic Epithelium and in the Absence of Lineage-Specific Signals. *Immunity*, 1997. **6**: p. 245-255

Collins, A. V., et al., The interaction properties of costimulatory molecules revisited. *Immunity*, 2002. **17**: p. 201-210

Dai, S., et al., Crossreactive T Cells Spotlight the Germline Rules for $\alpha\beta$ T Cell-Receptor Interactions with MHC Molecules. *Immunity*, 2008. **28**: p. 324-334

D`Cruz, L. M., & Klein, L., Development and function of agonist-induced CD25⁺ Foxp3⁺ regulatory T cells in the absence of interleukin 2 signaling. *Nat. Immunol.*, 2005. **6**: p. 1152-159

Dennehy, K. M., et al., Cutting Edge: Monovalency of CD28 Maintains the Antigen Dependence of T Cell Costimulatory Responses. *J. Immunol.*, 2006. **176**: p. 5725-5729

Dennehy, K. M., et al., Mitogenic CD28 Signals Require the Exchange Factor Vav1 to Enhance TCR Signaling at the SLP-76-Vav-Itk Signalingosome. *J. Immunol.*, 2007. **178**: p. 1363-1371

Evans, E. J., et al., Crystal structure of a soluble CD28-Fab complex. *Nat. Immunol.*, 2005. **6**: p. 271-279

Fallarino, F., et al., Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells. *Nat. Immunol.*, 2003. **4**(12): p. 1206-1212

Fisson, S., et al., Continuous activation of autoreactive CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells in the steady state. *J. Exp. Med.* 2002. **198**: p. 737-746

Fontenot, J. D., et al., Foxp3 programs the development and function of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *Nat. Immunol.*, 2003. **4**: p. 330-336

Fontenot, J. D., et al., Developmental regulation of Foxp3 expression during ontogeny. *J. Exp. Med.*, 2005. **202**(7): p. 901-906

Fontenot, J. D., et al., A function for interleukin 2 in Foxp3-expressing regulatory T cells. *Nat. Immunol.*, 2005. **6**: p. 1142-1151

Fontenot, J. D., & Rudensky, A. Y., A well adapted regulatory contrivance: Regulatory T cell development and the forkhead family transcription factor Foxp3. *Nat. Immunol.*, 2005. **6**: p. 331-337

Freeman, G. J., et al., Cloning of B7-2: a CTLA4 counterreceptor that costimulates human T cell proliferation. *Science*, 1993. **262**: p. 909-911

Gavin, M. A., et al., Homeostasis and anergy of CD4⁺CD25⁺ suppressor T cells in vivo. *Nat. Immunol.*, 2002. **3**: p. 33-41

Germain, R. N., T-cell development and the CD4-CD8 lineage decision. *Nat. Rev. Immunol.* 2002. **2**: p. 309-322

Gogishvili, T., et al., Rapid Regulatory T-Cell Response Prevents Cytokine Storm in CD28 Superagonist Treated Mice. *PLoS One*, 2009. [in press]

Goldrath, A. W., & Bevan, M. J., Selecting and maintaining a diverse T-cell repertoire. *Nature*, 1999. **402**(18): p. 255-262

Guidos, C. J., Positive selection of CD4⁺ and CD8⁺ T cells. *Curr. Opin. Immunol.*, 1996. **8**(2): p. 3201-3210

Groves, T., et al., TCR engagement of CD4⁺CD8⁺ thymocytes in vitro induces early aspects of positive selection, but not apoptosis. *J. Immunol.*, 1997. **158**: p. 65-75

Gross, J. A., et al., The murine homologue of the T lymphocyte antigen CD28. Molecular cloning and cell surface expression. *J Immunol.*, 1990. **144**(8): p. 3201-3210

Gross, J. A., et al., Identification and distribution of the costimulatory receptor CD28 in the mouse. *J. Immunol.*, 1992. **149**: p. 380-388

Hanke, T., Lessons from TGN1412. *Lancet*, 2006. **368**: p. 1569-1570

Hansen, J. A., et al., Monoclonal antibodies identifying a novel T-cell antigen and Ia antigens of human lymphocytes. *Immunogenetics*, 1980. **10**: p. 247- 260

Hara, T., & Fu, S. M., Human T cell activation. I. Monocyte-independent activation and proliferation induced by anti-T3 monoclonal antibodies in the presence of tumor promoter 12-o-tetradecanoyl phorbol-13 acetate. *J. Exp. Med.*, 1985. **161**: p. 641-656

Hathcock, K. S., et al., Comparative analysis of B7-1 and B7-2 costimulatory ligands: expression and function. *J. Exp. Med.*, 1994. **180**: p. 631-640

Hogquist, K. A., et al., Central tolerance: learning self-control in the thymus. *Nat. Rev. Immunol.*, 2005. **5**: p. 772-782

Hori, S., et al., Peripheral expansion of thymus-derived regulatory cells in anti-myelin basic protein T cell receptor transgenic mice. *Eur. J. Immunol.*, 2002. **32**: p. 3729-3735

Hori, S., et al., Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science*, 2003. **299**: p. 1057-1061

Hünig, T., et al., CD28 Superagonists: Mode of action and therapeutic potential. *Immunology Letters*, 2005. **100**: p. 21-28

Hünig, T., Manipulation of Regulatory T-Cell Number and Function with CD28-Specific Monoclonal Antibodies. *Adv. Immunol.*, 2007. **95**: p. 111-148

Inaba, K., et al., Expression of B7 costimulator molecules on mouse dendritic cells. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 1995. **378**: p. 65-70

Ishizuka, J., et al., The Structural Dynamics and Energetics of an Immunodominant T Cell Receptor are Programmed by its V β Domain. *Immunity*, 2008. **28**: p. 171-182

Itoh, M., et al., Thymus and autoimmunity : production of CD25⁺ CD4⁺ naturally anergic and suppressive T cells as a key function of the thymus in maintaining immunologic self-tolerance. *J. Immunol.*, 1999. **162**(9): p. 5317-5326

Itoh, Y., & Germain, R. N., Single cell analysis reveals regulated hierarchical T cell antigen receptor signaling thresholds and intraclonal heterogeneity for individual cytokine responses of CD4⁺ T cells. *J. Exp. Med.*, 1997. **186**: p. 757-766

Jameson, S. C., et al., Positive Selection of Thymocytes. *Annu. Rev. Immunol.*, 1995. **13**(1): p. 93-126

Jones, L. A., et al., CD28 – B7 interactions are not required for intrathymic clonal deletion. *Int. Immunol.*, 1993. **5**(5): p. 503-512

Jonuleit, H., et al., Identification and functional characterization of human CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties isolated from peripheral blood. *J. Exp. Med.*, 2001. **193**(3): p. 1285-1294

Jonuleit, H., & Schmitt, E., The regulatory T cell family: distinct subsets and their interrelations. *J. Immunol.*, 2003. **171**(12): p. 6323-6327

Kappes, J. D., et al., CD4-CD8 lineage commitment: an inside view. *Nat. Immunol.*, 2005. **6**(8): p.761-767

Kappler, J. W., et al., T cell tolerance by clonal elimination in the thymus. *Cell*, 1987. **49**(2): p. 273-280

Karim, M., et al., Alloantigen-induced CD25+CD4+ regulatory T cells can develop in vivo from CD25-CD4+ precursors in a thymus-independent process. *J. Immunol.*, 2004. **172**(2): p. 923-928

Kerstan, A., & Hünig, T., Cutting edge: Distinct TCR- and CD28-derived signals regulate CD95L, Bcl-xL, and the survival of primary T cells. *J. Immunol.*, 2004. **172**: p. 1341-1345

Khatti, R., et al., An essential role for Scurfin in CD4⁺CD25⁺ T regulatory cells. *Nat. Immunol.*, 2003. **4**: p. 337-342

Kisielow, P., et al., Tolerance in T-cell-receptor transgenic mice involves deletion of nonmature CD4⁺CD8⁺ thymocytes. *Nature*, 1988. **333**: p. 742-746

Knoechel, B., et al., Sequential development of interleukin 2-dependent effector and regulatory T cells in response to endogenous systemic antigen. *J. Exp. Med.*, 2005. **202**: p. 1375-1386

Krummel, M. F., et al., Superantigen responses and co-stimulation: CD28 and CTLA-4 have opposing effects on T cell expansion in vitro and in vivo. *Int. Immunol.*, 1996. **8**(4): p. 519-523

Lafferty, K. J., & Cunningham, A. J., A new analysis of allogeneic interactions. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.*, 1975. **53**: p. 27-42

Lehar, S. M., et al., T Cell Development in Culture. *Immunity*, 2002. **17**: p. 689-692

Lenschow, D. J., & Bluestone, J. A., T cell co-stimulation and in vivo tolerance. *Curr. Opin. Immunol.*, 1993. **5**(5): p. 747-752

Lenschow, D. J., et al., CD28/B7 system of T cell costimulation. *Annu. Rev. Immunol.*, 1996. **14**: p. 233-258

Lin, C. H., & Hünig, T., Efficient expansion of regulatory T cells in vitro and in vivo with a CD28 superagonist. *Eur. J. Immunol.*, 2003. **33**(3): p. 626-638

Lind, E. F., et al., Mapping Precursor Movement through the Postnatal Thymus Reveals Specific Microenvironments Supporting Defined Stages of Early Lymphoid Development. *J. Exp. Med.*, 2001. **194**(2): p. 127-134

Lindsten, T., et al., Regulation of lymphokine messenger RNA stability by surface-mediated T cell activation pathway. *Science*, 1989. **244**: p. 339-343

Lohr, J., et al., The inhibitory function of B7 costimulators in T cell responses to foreign and self-antigens. *Nat. Immunol.*, 2003. **4**: p. 664-669

Lucas, B., & Germain, R. N., Opening a Window on Thymic Positive Selection: Developmental Changes in the Influence of Cosignaling by Integrins and CD28 on Selection Events Induced by TCR Engagement. *J. Immunol.*, 2000. **165**: p. 1889-1895

Lühder, F., et al., Topological requirements and signaling properties of T cell-activating, anti-CD28 antibody superagonists. *J. Exp. Med.*, 2003. **197**: p. 955-966

Lum, L. G., et al., *In vitro* regulation of immunoglobulin synthesis by T-cell subpopulations defined by a new human T-cell antigen (9.3). *Cell. Immunol.*, 1982. **72**: p. 122-129

Malek, T. R., et al., Tolerance, not immunity, crucially depends on IL-2. *Nat. Rev. Immunol.*, 2004. **4**: p. 665-674

Maloy, K. J., et al., Regulatory T cells in the control of immune pathology. *Nat. Immunol.*, 2001. **2**: p. 816-822

McAdam, A. J., et al., The role of B7 co-stimulation in activation and differentiation of CD4⁺ and CD8⁺ T cells. *Immunol. Rev.*, 1998. **165**: p. 231-247

McHugh, R. S., & Shevach, E. M., Cutting Edge: depletion of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells is necessary, but not sufficient, for induction of organ-specific autoimmune disease. *J. Immunol.*, 2002. **168**: p. 5979-5983

Mombaerts, P., et al., RAG-1-deficient mice have no mature B and T lymphocytes. *Cell*, 1992. **68**(5): p. 869-877

Nelson, A. J., et al., Medullary thymic epithelium expresses a ligand for CTLA4 in situ and in vitro. *J. Immunol.*, 1993. **151**: p. 2453-2461

Ng, W. F., et al., Human CD4(+)CD25(+) cell : a naturally occurring population of regulatory T cells. *Blood*, 2001. **98**(9): p. 2736-2744

Noel, P. J., Impaired Negative Selection in CD28-Deficient Mice. *Cell. Immunol.*, 1998. **187**: p. 131-138

Ono, M., et al., Purification of immunoglobulin heavy chain messenger RNA by immunoprecipitation from mouse myeloma tumor, MOPC-31C. *J. Biochem. (Tokyo)*, 1977. **81**(4): p. 949-954

Palmer, E., et al., Negative selection – clearing out the bad apples from the T-cell repertoire. *Nat. Rev. Immunol.*, 2003. **3**(5): p. 383-391

Punt, J. A., et al., Negative selection of CD4⁺CD8⁺ thymocytes by T cell receptor-induced apoptosis requires a costimulatory signal that can be provided by CD28. *J. Exp. Med.*, 1994. **179**: p. 709-713

Punt, J. A., T Cell Receptor (TCR)-induced Death of Immature CD4⁺CD8⁺ Thymocytes by Two Distinct Mechanisms Differing in Their Requirement for CD28 Costimulation: Implications for Negative Selection in the Thymus. *J. Exp. Med.*, 1997. **11**: p. 1911-1922

Robey, E., et al., Selective events in T cell development. *Annu. Rev. Immunol.*, 1994. **12**: p. 675-705

Rodriguez-Palermo, M., et al., Triggering of T cell proliferation through CD28 induces GATA-3 and promotes T helper type 2 differentiation in vitro and in vivo. *Eur. J. Immunol.*, 1999. **29**: p. 3914-3924

Rulifson, I. C., CD28 costimulation promotes the production of T_H2 cytokines. *J. Immunol.*, 1997. **158**: p. 658-665

Sakaguchi, S., et al., Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J. Immunol.*, 1995. **155**(3): p. 1151-1164

Sakaguchi, S., Regulatory T cells: key controllers of immunologic self-tolerance. *Cell*, 2000. **101**: p. 455-458

Sakaguchi, S., The origin of FOXP3-expressing CD4⁺ regulatory T cells: thymus or periphery. *J. Clin. Invest.*, 2003. **112**: p. 1310-1312

Sakaguchi, S., et al., Naturally arising CD4⁺ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu. Rev. Immunol.*, 2004. **22**: p. 531-562

Sakaguchi, S., et al., Naturally arising Foxp3-expressing CD25⁺ CD4⁺ regulatory T cells in self-tolerance and autoimmune disease. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 2006. **305**: p. 51-66

Salomon, B., et al., B7/CD28 costimulation is essential for the homeostasis of the CD4⁺CD25⁺ immunoregulatory T cells that control autoimmune diabetes. *Immunity*, 2000. **12**: p. 431-440

Sansom, D. M., & Walker, L. S., The role of CD28 and cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 (CTLA-4) in regulatory T-cell biology. *Immunol. Rev.*, 2006. **212**: p. 131-148

Seroogy, C. M., & Fathman, C. G., T-cell anergy: from phenotype to genotype and back. *Immunol. Res.*, 2003. **28**(3): p. 255-264

Setoguchi, R., et al., Homeostatic maintenance of natural Foxp3⁺CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells by interleukin (IL)-2 and induction of autoimmune disease by IL-2 neutralization. *J. Exp. Med.*, 2005. **201**: p. 723-735

Shahinian, A., et al., Differential T cell costimulatory requirements in CD28-deficient mice. *Science*, 1993. **261**: p. 609-611

Sharpe, A. H., & Freeman, G. J., The B7-CD28 superfamily. *Nat. Rev. Immunol.*, 2002. **2**: p. 116-126

Shevach, E. M., Regulatory T cells in autoimmunity. *Annu. Rev. Immunol.*, 2000. **18**: p. 423-449

Siefken, R., et al., CD28-mediated activation of resting human T cells without costimulation of the CD3/TCR complex. *Cell Immunol.*, 1997. **176**: p. 59-65

Stebbing, R., et al., "Cytokine Storm" in the Phase I Trial of Monoclonal Antibody TGN1412: Better Understanding the Causes to Improve PreClinical Testing of Immunotherapeutics. *J. Immunol.*, 2007. **179**: p. 3325-3331

Stephens, L. A., & Mason, D., CD25 is a marker for CD4⁺ thymocytes that prevent autoimmune diabetes in rats, but peripheral T cells with this function are found in both CD25⁺ and CD25⁻ subpopulations. *J Immunol.*, 2000. **165**(6): p. 3105-3110

Suntharalingam, G., et al., Cytokine storm in a phase 1 trial of the anti-CD28 monoclonal antibody TGN1412. *N. Engl. J. Med.*, 2006. **355**: p. 1018-1028

Tacke, M., et al., Cellular distribution and costimulatory function of rat CD28. Regulated expression during thymocyte maturation and induction of cyclosporin A sensitivity of costimulated T cell responses by phorbol ester. *J. Immunol.*, 1995. **154**: p. 5121-5127

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**: p. 239-247

Tai, X., et al., CD28 costimulation of developing thymocytes induces Foxp3 expression and regulatory T cell differentiation independently of interleukin 2. *Nat. Immunol.*, 2005. **6**: p. 152-162

Tang, Q., et al., Cutting Edge : CD28 controls peripheral homeostasis of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *J. Immunol.*, 2003. **171**: p. 3348-3352

Turka, L. A., et al., CD28 is an inducible T cell surface antigen that transduces a proliferative signal in CD3⁺ mature thymocytes. *J. Exp. Med.*, 1990. **144**(4): p. 1646-1653

Vacchio, M. S., et al., A novel role for CD28 in thymic selection: elimination of CD28/B7 interactions increase positive selection. *Eur. J. Immunol.*, 2005. **35**: p. 418-427

Viola, A., & Lanzavecchia, A., T cell activation determined by T cell receptor number and tunable thresholds. *Science*, 1996. **273**: p. 104-106

Williams, J. A., et al., Regulated Costimulation in the Thymus Is Critical for T Cell Development: Dysregulated CD28 Costimulation Can Bypass the Pre-TCR Checkpoint. *J. Immunol.*, 2005. **175**: p. 4199-4207

Yamazaki, S., et al., Direct expansion of functional CD25⁺CD4⁺ regulatory T-cells by antigen-processing dendritic cells. *J. Exp. Med.*, 2003. **198**: p. 235-247

Yasumoto, K., et al., The duration of antigen receptor signalling determines CD4⁺ versus CD8⁺ T cell lineage fate. *Nature*, 2000. **404**(6777): p. 506-510

Yu, X., et al., The role of B7 costimulation in CD4/CD8 T cell homeostasis. *J. Immunol.*, 2000. **164**: p. 3543-3553

Yu, X. Z., et al., CD28 ligation induces transplantation tolerance by IFN-gamma-dependent depletion of T cells that recognize alloantigens. *J. Clin. Invest.*, 2004. **113**: p. 1624-1630

Zheng, X., et al., B7-CD28 Interaction Promotes Proliferation and Survival but Suppresses Differentiation of CD4-CD8⁻ T Cells in the Thymus. *J. Immunol.*, 2004. **173**: p. 2253-2261

Zinkernagel, R. M., et al., The Discovery of MHC restriction. *Immunol. Today*, 1997. **18**(1): p. 14-17

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

aGVHD	acute graft-versus-host disease
Ak	Antikörper
APC	Allophycocyanin
APZ	Antigen präsentierende Zelle
BrdU	Bromdesoxyuridin
BSA	Rinderserumalbumin
BSS	Balancierte Salzlösung
CD	cluster of differentiation
CFSE	carboxy-fluorescein diacetate succinimidyl ester
cpm	counts per minute/ Zerfallzahl pro minute
ConA	Concanavalin A
DN	Doppelnegativer/ CD4 ⁻ CD8 ⁻ Thymozyt
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DP	Doppelpositiver/ CD4 ⁺ CD8 ⁺ Thymozyt
FCS	fötale Kälberserum
FITC	Flouresceinthioisocyanat
FTOC	Fetale-Thymus-Organ-Kultur
ICAM	Intercellular Cell Adhesion Molecule
ICOS	Inducible Costimulatory Molecule
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
INF	Interferon
i.p.	intraperitoneal
LFA	Leukocyte Function Antigen
LK	Lymphknoten
mAb/ mAk	monoklonaler Antikörper
MHC	Major Histocompatibility Complex
mRNA	messenger Ribonucleic acid
NTOC	Neonatale-Thymus-Organ-Kultur
PBS	Phosphat gepufferte Kochsalzlösung

PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin-Chlorophyll-Protein
rpm	Umdrehungen in der Minute
SD	Standardabweichung
SEB	Staphylokokkenenterotoxin B
SP	CD4 ⁺ CD8 ⁻ oder CD4 ⁻ CD8 ⁺ einzelpositive T-Zelle
TCR/ TZR	T-cell receptor/ T-Zell-Rezeptor
Th-Zelle	T-Helferzelle
T _{reg}	regulatorische T-Zelle
VCAM	Vaskular Cell Adhesion Molecule
VLA	Very Late Antigen

ANHANG

Danksagung

Am Zustandekommen dieser Arbeit hatten folgende Personen nachhaltig Anteil, denen ich an dieser Stelle danken möchte:

Mein ganz besonderer Dank geht an Herrn Professor Dr. Thomas Hünig für seine ausgezeichnete Betreuung, für die vielen Anregungen und konstruktive Diskussionen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Herrn Dr. Fernando Elias danke ich sowohl für die praktisch experimentellen Anleitungen als auch für seine ständige Diskussionsbereitschaft.

Frau Dr. Shin-Young Na möchte ich danken für die praktische Anleitung im Erlernen der NTOC- und FTOC-Techniken und ferner für weiterführende Diskussionen.

Herrn Dr. Niklas Beyersdorf danke ich ebenfalls für viele Anregungen und konstruktive Diskussionen.

Frau Dr. Karin Elflein gilt mein Dank für die tatkräftige Unterstützung bei den Blutentnahmen der Versuchstiere.

Frau Kirsty McPherson MSc. danke ich für die Anleitung und Betreuung der Experimente zur Differenzierung von T-Zellen auf OP9 Stromazellen.

Frau Claudia Hahn gilt mein Dank für die Unterstützung bei der Analyse der Blutseren nach Autoimmun-Antikörpern.

Herrn Peter Zigan möchte ich für die praktische Mithilfe bei der Durchführung vieler Experimente danken.

Herrn Professor Dr. Michael Klein verdanke ich die Überlassung der Rag-1-defizienten Mäuse.

Abschließend möchte ich mich noch bei allen nicht namentlich erwähnten Mitarbeitern des Instituts für Virologie und Immunbiologie bedanken, deren großzügig gegebene Ratschläge und Reagenzien wesentlich zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben.