

**Verstärkung und Modulation der Immunantwort  
der Ratte mit Hilfe eines superagonistischen,  
CD28-spezifischen, monoklonalen Antikörpers**

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

vorgelegt von  
**Karin Elflein**

aus  
Schlema/Erzgebirge

Würzburg, 2004

Eingereicht am: .....

1. Gutachter: Professor Dr. Hünig  
2. Gutachter: PD Dr. Kuhn

1. Prüfer: Professor Dr. Hünig  
2. Prüfer: PD Dr. Kuhn  
der mündlichen Prüfung

Tag der mündlichen Prüfung: .....  
Promotionsurkunde ausgehändigt am: .....

Hiermit erkläre ich, die vorliegende Arbeit  
selbstständig angefertigt und keine anderen  
als die angegebenen Hilfsmittel verwendet zu haben.

Diese Arbeit hat weder in gleicher noch in ähnlicher Form  
in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen.

Ich habe in keinem früheren Verfahren einen  
akademischen Grad erworben oder zu erwerben versucht.

Würzburg, den .....

-----

Karin Elflein

Herrn Professor Dr. T. Hünig danke ich sehr, dass ich diese Arbeit im Institut für Immunbiologie und Virologie durchführen konnte. Ich danke ihm für seine sehr gute und intensive Betreuung, die vielen anregenden Diskussionen, seine konstruktive (teilweise auch sehr strenge) Kritik und die stetige Unterstützung zum Gelingen dieser Arbeit.

Herrn PD Dr. M. Kuhn danke ich sehr für das Interesse an dieser Arbeit und deren Vertretung vor der Fakultät für Biologie der Universität Würzburg.

Herrn PD Dr. K. Erb danke ich für seine stetige Hilfsbereitschaft und für seine Unterstützung bei den Wurminfektionen.

Herrn Prof. Dr. M. Goebel und Frau Dr. S. Pilgrim danke ich für ihre Unterstützung bei den Listerien-Infektionen.

Bei meinen Kollegen und Freunden möchte ich mich bedanken für ihre Hilfsbereitschaft und die nette Atmosphäre. Besonders Beate Geyer danke ich für ihre stetige Unterstützung im Labor und natürlich auch für den vielen Spaß auf der Arbeit. Danke auch an Stefan Wiehr für seine stetige Hilfe bei kleinen und großen Problemen am Computer und den vielen lebhaften Diskussionen über Arbeit und Leben.

Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei meiner Mutter für ihre unermüdliche Hilfsbereitschaft und ihren lieben, aufbauenden Worten, wenn ich "mal durchhing".

Mein größter Dank gilt meinem lieben Mann Andreas und unserem kleinen Schatz Lea für ihre Liebe und stetige Unterstützung. Danke an Dich, meine kleine Maus, für Dein Lachen und Dein sonniges Gemüt, was mir durch manche schwere Zeit geholfen hat.

Meiner kleinen Lea  
Meinem Mann Andreas  
Meiner Mutter

# Inhaltsverzeichnis

<b>1.</b>	<b>Einleitung</b> .....	1
1.1.	Das Immunsystem.....	1
1.2.	Die T-Zell-Entwicklung.....	4
1.3.	Kostimulation.....	5
1.4.	Das CD28/ CTLA-4 -- B7-1/ B7-2 System.....	8
1.5.	Th1/ Th2-Differenzierung der CD4 <sup>+</sup> T Zellen.....	13
1.6.	<i>Listeria monocytogenes</i> als Modellorganismus für die Induktion einer CD8- und Th1-polarisierten Immunantwort....	19
1.7.	<i>Nippostrongylus brasiliensis</i> als Modellorganismus für die Induktion einer Th2-polarisierten Immunantwort.....	22
1.8.	Regulatorische T Zellen.....	26
1.9.	T-Zell-Lymphopenie und Regeneration eines peripheren T-Zell-Kompartiments.....	31
1.10.	Aufgabengebiet der vorliegenden Arbeit.....	33
<b>2.</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	35
<b>2.1.</b>	<b>Material</b> .....	35
2.1.1.	Verwendete Antikörper.....	35
2.1.2.	Versuchstiere.....	36
2.1.3.	Lösungsansätze, Puffer und Kulturmedien.....	37
2.1.4.	Reagenzien.....	41
2.1.5.	Bakterien.....	43
2.1.6.	Nematoden.....	43
2.1.7.	Geräte/ Ausstattung.....	43
2.1.8.	Standards und Kits.....	44
<b>2.2.</b>	<b>Methoden</b> .....	45
2.2.1.	Versuche mit ATXBM-Ratten.....	45
2.2.1.1.	Bestrahlung und Zelltransfer - Die ATXBM-Ratte bzw. Herstellung von Chimären (ATXBM = adult, thymektomiert, bestrahlt und Knochenmark rekonstituiert).....	45

2.2.1.2.	Antikörpergabe <i>in vivo</i> .....	46
2.2.1.3.	Hauttransplantation.....	46
2.2.1.4.	KLH-Immunisierung.....	46
2.2.2.	Präparationen.....	47
2.2.2.1.	Präparation von Lymphzellen aus verschiedenen Geweben.....	47
2.2.2.2.	Serumgewinnung.....	48
2.2.2.3.	Bestimmung der Zellzahl.....	49
2.2.3.	Zellaufreinigungen.....	49
2.2.3.1.	B-Zell-Depletion einer LK-Zell-Suspension mittels einer Nylonwollsäule.....	49
2.2.3.2.	B-Zell-Depletion einer LK-Zell-Suspension mittels "T cell recovery column"....	50
2.2.3.3.	B-Zell-Aufreinigung mittels MACS-Säule.....	50
2.2.4.	Zellfärbungen.....	51
2.2.4.1.	Oberflächenfärbung.....	51
2.2.4.2.	CFSE-Färbung <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i> .....	51
2.2.4.3.	Durchflusszytometrie.....	52
2.2.5.	Histologie.....	53
2.2.5.1.	Fixierung verschiedener Gewebe und Schnittanfertigung.....	53
2.2.5.2.	Beschichten von Objektträgern.....	54
2.2.5.3.	Hämalaun-Eosin-Färbung.....	55
2.2.5.4.	PAS-Färbung.....	55
2.2.6.	<i>Ex-vivo</i> -Versuche.....	56
2.2.6.1.	(Re-)Stimulation.....	56
2.2.6.2.	Proliferationstest.....	57
2.2.6.3.	Nachweis KLH-spezifischer Immunglobuline mittels ELISA.....	57
2.2.6.4.	ELISA zum Nachweis der verschiedenen Immunglobulinklassen.....	58
2.2.6.5.	Zytokin-ELISA.....	58
2.2.7.	Infektionsversuche.....	59
2.2.7.1.	Infektion mit <i>Nippostrongylus brasiliensis</i> .....	59
2.2.7.2.	Auszählen von Wurmeiern im Kot von mit <i>Nippostrongylus brasiliensis</i> - infizierten Ratten.....	60
2.2.7.3.	Infektion mit <i>Listeria monocytogenes</i> .....	60
2.2.7.4.	Ermittlung der Erregerzahl in den Lebern von mit <i>Listeria monocytogenes</i> - infizierten Ratten.....	61

<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	62
<b>3.1.</b>	<b><i>In vivo</i> T-Zell-Expansion durch Stimulation mittels superagonistischem, CD28 spezifischem mAk</b> .....	62
3.1.1.	Zellteilungsraten nach Behandlung mit mitogenem anti-CD28 mAk.....	62
3.1.1.1.	<i>In-vitro</i> -Versuche.....	62
3.1.1.2.	<i>In-vivo</i> -Versuche.....	64
3.1.2.	Repopulation der verschiedenen Zellkompartimente in rekonstituierten ATXBM-Ratten nach Behandlung mit superagonistischem, CD28-spezifischem mAk.....	66
3.1.2.1.	<i>In-vivo</i> -Rekonstitutionsmodell.....	66
3.1.2.2.	Repopulation der einzelnen Leukozytenpopulationen im Blut bzw. in den sekundären Lymphorganen (Milz und Lymphknoten) lymphopenischer Ratten nach Inokulation von superagonistischem anti-CD28 mAk.....	68
3.1.2.2.1.	Blut.....	68
3.1.2.2.2.	Sekundäre Lymphorgane.....	71
<b>3.2.</b>	<b>Quantitative Aspekte der Immunantwort der mit mitogenem anti-CD28 mAk therapierten, T-lymphopenischen Ratten</b> .....	73
3.2.1.	Transplantatabstoßung.....	73
3.2.2.	Immunisierung T-lymphopenischer Ratten mit dem Modellantigen KLH.....	76
3.2.2.1.	Optimierung des bisherigen Rekonstitutions- und Immunisierungsprotokolls..	76
3.2.2.2.	Proliferation von Milz- und Lymphknotenzellen aus CD28-Superagonist behandelten, KLH-immunisierten Ratten nach Restimulation <i>in vitro</i> .....	78
<b>3.3.</b>	<b>Qualitative Aspekte der Immunantwort der mit mitogenem anti-CD28 mAk therapierten, T-lymphopenischen Ratten</b> .....	81
3.3.1.	Immunglobulinklassen im Blut T-lymphopenischer Ratten therapiert mit superagonistischem anti-CD28 mAk.....	81
3.3.2.	Zytokinproduktion von CD4 <sup>+</sup> T Lymphozyten CD28-Superagonist behandelte Tiere nach Restimulation <i>in vitro</i> .....	83
3.3.2.1.	Polyklonale Stimulation mit Concanavalin A.....	83
3.3.2.2.	KLH-Restimulation.....	83



3.3.3.	Regulatorische T Zellen in T-lymphopenischen Ratten nach Behandlung mit superagonistischem anti-CD28 mAk.....	86
<b>3.4.</b>	<b>Modulation der Immunantwort gegen Infektionserreger mit CD28-Superagonisten.....</b>	<b>87</b>
3.4.1.	Infektionsversuche mit dem Rattenhakenwurm <i>Nippostrongylus brasiliensis</i> .....	87
3.4.1.1.	Infektionsverlauf einer <i>Nippostrongylus brasiliensis</i> - Infektion.....	87
3.4.1.2.	Proliferative <i>in vitro</i> "Recall"-Antwort <i>Nippostrongylus brasiliensis</i> - infizierter Ratten auf Wurmantigene.....	90
3.4.1.3.	Zytokinproduktion der mit <i>Nippostrongylus brasiliensis</i> - infizierten Ratten auf Wurmantigene.....	92
3.4.1.4.	Immunpathologie der Lunge nach Infektion mit <i>Nippostrongylus brasiliensis</i> ..	95
3.4.2.	Infektionsversuche mit <i>Listeria monocytogenes</i> .....	97
3.4.2.1.	Infektionsverlauf einer <i>Listeria monocytogenes</i> - Infektion.....	97
3.4.2.2.	Proliferative <i>in vitro</i> "Recall"-Antwort <i>Listeria monocytogenes</i> - infizierter Ratten auf Protein 60 (p60) und Heat-killed-listeria (HKL).....	98
3.4.2.3.	Zytokinproduktion der mit <i>Listeria monocytogenes</i> - infizierten Ratten .....	99
3.4.2.4.	Immunpathologie der Leber nach Infektion mit <i>Listeria monocytogenes</i> .....	100
<b>4.</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>102</b>
<b>4.1.</b>	<b>Regeneration des T-Zell-Kompartiments mit Hilfe von CD28-Superagonist.....</b>	<b>102</b>
<b>4.2.</b>	<b>T-Zell-Funktion nach peripherer T-Zell-Expansion mittels CD28-Superagonist.....</b>	<b>106</b>
<b>4.3.</b>	<b>Modulation der Immunantwort gegen Infektionserreger mittels CD28-Superagonist.....</b>	<b>108</b>
<b>4.4.</b>	<b>Ausblick.....</b>	<b>114</b>
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>114</b>
<b>6.</b>	<b>Summary.....</b>	<b>117</b>
<b>7.</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>120</b>

**8. Abkürzungsverzeichnis..... 148**

**9. Abbildungsverzeichnis..... 150**

**Lebenslauf**

# 1. Einleitung

## 1.1. Das Immunsystem

Das Immunsystem höherer Vertebraten spielt mit seinem Schutz vor Infektionen und deregulierten körpereigenen Zellen eine zentrale Rolle für das Überleben eines Organismus. Es besteht aus zwei Teilen, dem naiven oder angeborenen und dem erworbenen bzw. adaptiven, und nur das Zusammenwirken der beiden Äste gewährt seine hohe Effizienz.

Dabei stützt sich die angeborene Immunantwort mit ihren Komponenten - Makrophagen, Dendritische Zellen (DZ), Granulozyten, Natürliche Killerzellen (NK), Proteine der Komplementkaskade, Interferone und Akute Phase Proteine - auf Rezeptoren, die auf eingedrungenen Erregern unveränderliche Merkmale erkennen, wie z. Bsp. LPS auf Gram-negativen Bakterien, und reagiert sofort darauf. Somit ist die angeborene Immunantwort die erste Verteidigung gegen das Eindringen von Krankheitserregern. Es aktiviert zusätzlich noch den adaptiven Teil der Immunantwort.

Letzterer wird durch B- (für bursa fabricii bzw. bone marrow) und T-(für Thymus) Lymphozyten vermittelt. Die erworbene Immunantwort zeichnet sich durch spezifische Erkennung körperfremder Substanzen und die Bildung eines immunologischen Gedächtnisses aus. Auf Grund dieser Fähigkeiten ist ein viel schnelleres und effektiveres Vorgehen gegen sich wiederholende Infektionen möglich. Außerdem bleibt ein Schutz über das immunologische Gedächtnis lange bestehen.

Historisch gesehen wurde zwischen einer humoralen und einer zellvermittelten Immunantwort unterteilt, wobei hier der Unterschied darin lag, dass die humorale Antwort zellunabhängig übertragbar war. In beide Vorgänge sind die Komponenten der erworbenen Immunität involviert, die B- Lymphozyten in der humoralen und die T-Lymphozyten in der zellvermittelten Immunantwort.

B- und T-Lymphozyten entwickeln sich aus gleichen Vorläuferzellen im Knochenmark, jedoch findet die Ausreifung beider Zelltypen an verschiedenen Orten statt. Beide Lymphozyten exprimieren auf ihrer Zelloberfläche hochspezifische Antigenrezeptoren, die B- und T-Zellrezeptoren (BZR bzw. TZR). Diese besitzen die Fähigkeit, einen Teil des Antigens - die antigene Determinante - zu binden. Dabei trägt jeder Lymphozyt nur einen Rezeptortyp definierter Spezifität, was bedeutet, dass

diese Zelle nur für ein bestimmtes Motiv hochspezifisch ist (Mäkelä & Cross, 1970). Die durch beide Rezeptoren ausgeübte Unterscheidung zwischen „selbst“ und „nicht-selbst“ (Tolerieren eigener/ Eliminieren fremder Strukturen) ist einer der entscheidenden Aspekte für die richtige Ausübung der Funktionen des erworbenen Immunsystems.

BZR und TZR stellen Multiproteinkomplexe dar, welche aus klonal variablen antigenbindenden (bei BZR: schwere und leichte Ketten der Immunglobuline (Ig); bei TZR:  $\alpha$ - und  $\beta$ -Ketten) und invarianten akzessorischen Ketten (bei BZR:  $Ig\alpha$  und  $Ig\beta$ ; bei TZR: CD3-Komplex bestehend aus  $CD3\gamma$ ,  $CD3\delta$ ,  $CD3\epsilon$  und der  $\zeta$ -Kette) bestehen. Sie spielen eine entscheidende Rolle beim Transport des Rezeptors an die Zelloberfläche und bei dessen Signaltransduktion.

Die Entwicklung von B-Zellen findet in der fetalen Leber und später im Knochenmark statt. Eine Aktivierung ruhender, ausgereifter B Lymphozyten wird über Antigenkontakt mit dem BZR, einem membrangebundenen Immunglobulinmolekül (IgM), ausgelöst. In Folge dessen, und reguliert durch „Helfersignale“ der T Zellen (s.u.), kommt es zu einer starken Proliferation und zu einer Differenzierung in Gedächtnis- und Plasmazellen. Letzterer Zelltyp sezerniert im Verlauf der Immunantwort seinen eigenen Rezeptor in Form löslicher Antikörper (In Folge dessen entstand auch der Name humorale Immunantwort.). Mittels dieses Vorganges können Pathogene und ihre toxischen Produkte neutralisiert, die Komplementkaskade aktiviert und eine Verbesserung der Phagozytose mittels Makrophagen durch Anlagerung von Antikörpern (Opsonierung) an körperfremde Materialien (Bakterien etc.) herbeigeführt werden.

T Lymphozyten reifen im Thymus. Sie sind Hauptkomponenten bei der zellvermittelten Immunantwort. Anders als B-Zellen erkennen T Lymphozyten Antigene nur zellvermittelt, d.h. in prozessierter Form auf der Oberfläche präsentierender Zellen. Dies geschieht in Assoziation mit Adaptormolekülen, den MHC-Proteinen (Glykoproteine, die im Haupthistokompatibilitätskomplex codiert sind.; engl.: **Major Histocompatibility Complex**). Sie präsentieren den T Zellen Proteinabbauprodukte des Antigens.

Es existieren zwei Klassen von MHC-Molekülen; MHC KI. 1 Moleküle werden auf fast allen kernhaltigen Körperzellen exprimiert. Sie präsentieren Peptide, deren Proteinvorläufer zytosolischen Ursprungs sind.

MHC KI.2 Moleküle befinden sich nur auf der Oberfläche von Antigen präsentierenden Zellen (engl.: Antigen Presenting Cells = APC ) wie z.Bsp. Dendritische Zellen, aktivierte B Zellen, Makrophagen. Sie tragen Peptide, welche von Proteinen stam-

men, die in die Zelle aufgenommenen wurden.

Jedoch benötigt der TZR zur Erkennung des MHC-Antigen-Komplexes einen zusätzlichen Rezeptor. Diese „Korezeptoren“ binden an konstante Bereiche des MHC-Moleküls und verbessern so die Interaktionen zwischen MHC und TZR. Zur Erkennung von MHC I tragen periphere T-Lymphozyten den CD8-Rezeptor (Cluster of Differentiation) - für MHC II den CD4-Rezeptor. Die Entscheidung darüber, welchen Korezeptor eine reife T Zelle exprimiert, wird während der Reifung im Thymus festgelegt.

T Zellen unterscheiden sich ebenfalls anhand ihrer Funktion. So werden CD4<sup>+</sup>T Zellen auch als Helfer-T-Zellen (Th) und CD8<sup>+</sup> T Zellen als cytotoxische T Zellen (Cytotoxic T Lymphocytes = CTL) bezeichnet. Dabei liegt die Aufgabe letzt genannter T-Lymphozyten in der Überwachung normaler Körperzellen. Durch sie wird ein Virusbefall, eine Infektion durch intrazelluläre Mikroorganismen (z.Bsp.: *Listeria monocytogenes*) oder aber auch eine Entartung in Form eines Tumors registriert und mit der Eliminierung der betroffenen Zelle begonnen. Helfer-T-Zellen regulieren und koordinieren die Immunantwort. Sie sezernieren unter anderem Zytokine, mit denen sie in negativer oder positiver Weise auf Wachstums- und Differenzierungsprozesse anderer Zellpopulationen (z.Bsp. B Zellen) Einfluss nehmen können.

T Lymphozyten spielen demnach eine entscheidende Rolle bei den meisten immunologischen Reaktionen. Ersichtlich wird dies bei Mensch und Tier mit einer erniedrigten T-Zell-Zahl (Acquired immunodeficiency syndrom = AIDS) oder gar einer fehlenden T-Zell-Population (Severe combined immunodeficiency disease = SCID; Leonard, 2001).

## 1.2. Die T-Zell-Entwicklung

Dabei kommt es zunächst zur Einwanderung von Vorläuferzellen aus dem Knochenmark in den Thymus. Hier erfolgt die Entwicklung der T Zellen nach einem allgemeinen Schema, welches in verschiedenen Spezien (z.Bsp. Ratten, Mäuse) beobachtet werden konnte.

Ein "dreifach negatives" Vorläuferstadium (= TN-Stadium,  $CD3^-$ ,  $CD4^-$  und  $CD8^-$ ) entwickelt sich über ein unreifes, "einfach positives" Stadium (immature SP = iSP) in das im Thymus vorherrschende  $CD4^+$ ,  $CD8^+$  und  $TZR^{low}$  "doppelt positive" Stadium (DP). Aus dieser Population bilden sich dann nach erfolgter positiver und negativer Selektion die reifen  $TZR^{high}$ ,  $CD4^+$  bzw.  $CD8^+$  SP Zellen (zusammengefasst in Hünig et al., 2001). Dabei werden bei der positiven Selektion alle Zellen eliminiert, bei denen keine Selbst-MHC-Restriktion erfolgte. Selbst-MHC-Restriktion bedeutet, auf körperfremde Peptide nur bei Präsentation über körpereigene Allele der MHC-Proteine zu reagieren. Bei der negativen Selektion führt eine Erkennung von MHC-präsentierten körpereigenen Peptiden zur sofortigen Apoptose dieser Zellen. Somit wird ein Ausschleusen potentiell autoreaktiver Zellen in die Peripherie verhindert (Kappler et al., 1987; Robey et al., 1994; Guidos, 1996).

Das Kompartiment reifer T Zellen, welches den Thymus verläßt beinhaltet neben den, zum größten Teil auftretenden,  $\alpha\beta$ TZR-Zellen auch (ca. 1-5%)  $\gamma\delta$ TZR-Zellen, welche noch weiter in  $CD8\alpha/\beta$  exprimierende und  $CD4$ - $CD8$ -Zellen unterteilt werden können. Außerdem beinhaltet die  $CD4^+\alpha\beta$ TZR-Zellpopulation die  $CD25$  exprimierenden, "natürlichen" regulatorischen T Zellen. Auf sie wird später näher eingegangen.

Ein wesentlicher Unterschied zwischen der T-Zell-Entwicklung in der Maus und in der Ratte besteht darin, dass in der Maus die Differenzierungsschritte innerhalb der TN-Population anhand der zwei Oberflächenmarker  $CD44$  und  $CD25$  ( $\alpha$ -Kette des IL-2R) definiert werden (zusammengefasst in Germain, 2002). Im Vergleich dazu existiert eine ähnliche Einteilung der TN-Zell-Stadien bei der Ratte, basierend auf der Expression von  $CD2$  und  $CD45RC$  (auch L-CA = leukocyte - common antigen). Dabei wird im Laufe der Entwicklung  $CD45RC$  runterreguliert, während die Expression von  $CD2$  zunimmt (Law et al., 1989).

### 1.3. Kostimulation

Eine spezifische Erkennung von Antigenen ist für die T-Zell-Aktivierung unerlässlich, jedoch in den meisten Fällen nicht ausreichend. Nur selten ist ein TZR-Signal stark genug, allein eine Proliferation der T Lymphozyten zu bewirken und eine Differenzierung in Effektorzellen einzuleiten (Viola & Lanzavecchia, 1996). Fast immer wird ein zweites Signal benötigt, das von der Antigenpräsentation unabhängig ist. Die Fähigkeit ein solches „kostimulatorisches“ Signal zu generieren, besitzen nur „professionelle“ APZ. Von normalen Gewebezellen kann es nicht erzeugt werden. Erstmals wurde diese 2-Signal-Theorie der Aktivierung 1970 von Bretscher und Cohn für B-Zellen formuliert. Lafferty und Cunningham erweiterten diese Theorie dann 1975 auf die T Zellen. Das Fehlen eines kostimulatorischen Signals führt in den meisten Fällen dazu, dass T Lymphozyten keine Effektorfunktion ausüben können und in einen anergen Zustand übergehen oder apoptotisch werden (Lenschow et al., 1993; Appleman and Boussiotis, 2001; Seroogy and Fathman, 2003). Im Falle einer Anergie verlieren T Zellen ihre Fähigkeit, auf Antigene zu antworten (Sie können kein IL-2 bilden und nicht proliferieren.), eine Strategie, um die Toleranz gegenüber „selbst“ aufrecht halten zu können bzw. die Aktivierung autoreaktiver T Zellen zu verhindern, welche der zuvor schon beschriebenen Selektionen im Thymus entgangen sind.

Erste Beobachtungen der Notwendigkeit einer Kostimulation bei der T-Zell-Aktivierung stammen von Transplantationsexperimenten, welche zeigten, dass die Expression körperfremder Antigene auf Geweben und nicht mittels APZ zu keiner produktiven Immunantwort führten (Lafferty et al., 1983). Bekräftigt wurde diese Aussage später durch Arbeiten mit transgenen (Tg) Mäusen, welche MHC I oder MHC II Alloantigene auf pankreatischen  $\beta$ -Zellen in den Langerhans'schen Inseln exprimierten. Es war in diesem Modell nicht möglich eine Autoimmunantwort zu generieren, trotz der Applikation von Antigen-spezifischen T Zellen aus Tg<sup>+</sup>-Mäusen, deren Inselzellen dieses körperfremde MHC II-Molekül exprimierten. Auch hier fehlten die kostimulatorischen Signale von professionellen Antigen präsentierenden Zellen (Burkly et al., 1990).

Es existieren eine Vielzahl von Rezeptor-Ligand-Paaren, welche jene kostimulatorischen Signale liefern, um eine T-Zell-Aktivierung als Antwort auf einen Antigenkontakt einzuleiten und voranzutreiben, LFA-1 - ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3, VLA-4 - VCAM-1,

CD40 - CD40L, ICOS - ICOSL, PD-1 - PD-L1, PD-L2 und CD28, CTLA-4 - B7-1/B7-2. Dabei können die Wirkungsmechanismen der einzelnen Moleküle sehr unterschiedlich sein (beispielsweise die Verbesserung der Adhäsion) und sollen hier im einzelnen nicht für jedes Paar ausführlich erörtert, sondern, mit Ausnahme des zu letzt erwähnten, nur kurz umrissen werden.

LFA-1 (leukocyte functional antigen oder auch CD11a/CD18 bzw.  $\alpha_L\beta_2$ ) gehört gemeinsam mit VLA-4 (*very late activation-antigen 4* oder auch CD49d/CD29,  $\alpha_4\beta_1$ ) zu den  $\beta$ -Integrinen. Sie spielen eine große Rolle als Zelladhäsionsmoleküle und bei der Extravasation von Lymphozyten (Janeway et al., 2002; zusammengefasst in Yung et al., 2003). Sie können aber auch als kostimulatorische Moleküle einen Einfluss auf die Zytokinproduktion (auch Erhöhung von CD25-Expression), Proliferation und Absterben von T Zellen nehmen (van Seventer et al., 1991 (I und II); Damle et al., 1993). ICAM-1 (CD54) und ICAM-2 (CD102) bzw. VCAM-1 (CD106) sind die Liganden zu den Integrinen LFA-1 und VLA-4. Sie sind Mitglieder der Immunglobulin-Superfamilie und werden von Endothelzellen exprimiert. ICAM-2 ist auch vereinzelt auf DZ vorzufinden (Janeway et al., 2002).

Die Wechselwirkungen von CD40-CD40L können ebenfalls als kostimulatorische Signale agieren, sie sind aber weniger stark als jene, welche über CD28-B7 ausgelöst werden (Grewal et al., 1995). CD40 ist Mitglied der TNF-Familie und wird von APZ (DZ und B Zellen) exprimiert; CD40L (auch CD154, gp39, T-BAM, TRAP) gehört zu der TNF-Rezeptorfamilie und ist auf aktivierten, ausgereiften aber nicht auf ruhenden T Zellen vorzufinden. CD40-CD40L-Signale spielen eine entscheidende Rolle bei der Proliferation, Reifung und Ig-Produktion von B Zellen, sowie bei der Reifung von DZ, welche dadurch wiederum Antigen-spezifische CD8<sup>+</sup> CTL aktivieren können (Bennett et al., 1998; van Kooten and Banehovan, 2000).

ICOS wurde erstmals auf aktivierten humanen T Zellen gefunden (Hutloff et al., 1999), und wird nur nach Aktivierung auf T Lymphozyten exprimiert. Es ist häufig auf T Zellen in Keimzentren vorzufinden, wobei es hier eine unterstützende Funktion bei der Differenzierung von B Zellen in Gedächtnis- oder Plasmazellen ausübt. (McAdam et al., 2001) Des weiteren ist ICOS zu Beginn der Differenzierung von T-Helfer-Zellen in Th1 und Th2 auf beiden Subpopulationen vorzufinden, aber nur auf Th2-Zellen bleibt im weiteren Verlauf ein hohes Niveau an ICOS erhalten (McAdam et al., 2000). ICOSL, der Ligand zu ICOS, zeigt Homologien zum B7-Molekül (Daher auch oft eine



Bezeichnung in Verbindung mit B7.), dem Liganden von CD28 und CTLA-4. Jedoch ist seine Expression nicht nur auf hämapoetische Zellen beschränkt (Yoshinaga et al., 1999). Kostimulatorische Signale von ICOS/ ICOSL unterstützen die Proliferation kurz zuvor aktivierter Zellen, jedoch scheint die wichtigere Aufgabe in einer Erhöhung der Zytokinproduktion von Effektorzellen zu liegen, da anti-ICOS mAk oder ein ICOSL-Ig Fusionsprotein eine Steigerung der IL-4-, IL-5-, IL-10-, IFN $\gamma$ -, TNF $\alpha$ - und GM-CSF-Produktion bewirken (Hutloff et al., 1999). Trotz vieler Gemeinsamkeiten zwischen den den Proteinen des CD28/B7 Systems mit denen des ICOS/ICOSL Systems, konnten nur sehr schwache Interaktionen zwischen beiden *in vitro* beobachtet werden (Brodie et al., 2000).

PD-1 (Programmed Death 1; Ishida et al., 1992), benannt nach seiner Entdeckung an T Zellen, welche gerade programmiertem Zelltod unterlagen, wird nicht nur vorrangig auf T Zellen exprimiert, sondern wurde auch auf B Zellen gefunden (Agata et al., 1996). Innerhalb des T-Zell-Kompartiments ist PD-1 besonders im Thymus vorzufinden, auf doppelt negativen Thymozyten, welche sich vor dem Übergang in das doppelt positive Stadium befinden. Ein Fehlen von PD-1 zeigte, dass autoreaktive Zellen, die einer Selektion im Thymus entgingen, und bei Vorhandensein des kostimulatorischen Rezeptors in der Peripherie nicht aktiviert werden konnten, plötzlich Autoimmunreaktionen zeigten (Nishimura et al., 1999; Nishimura et al., 2000). Diese Beobachtungen sprechen für eine Rolle von PD-1 als Regulator für periphere T-Zell-Toleranz. Als Liganden zu PD-1 wurden zwei zu B7 homologe Moleküle identifiziert (Freeman et al., 2000; Latchman et al., 2001). Diese Liganden binden an kein anderes Mitglied aus der CD28 Superfamilie, und PD-1 bindet auch nur an PD-1L oder PD-2L (Sharpe and Freeman 2002).

Anders als B7-1 und B7-2 ist das Vorkommen der beiden Liganden von PD-1 nicht nur auf hämapoetische Zellen beschränkt. Kostimulation über PD-1/ PD-1L, PD-2L inhibiert T-Zell-Proliferation und Zytokinproduktion in Abhängigkeit von der Antigenkonzentration und unabhängig von einem starken CD28-B7 Signal. Ist die Antigenlast sehr hoch, so bleibt die T-Zell-Proliferation bestehen, jedoch kommt es zu einer deutlichen Reduzierung in der Produktion verschiedener Zytokine (Freeman et al., 2000; Latchman et al., 2001). Auf Grund der inhibitorischen Eigenschaften wurde untersucht, ob dieses Rezeptor-Liganden-Paar auch von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatorischen T Zellen benutzt wird. Es konnte aber lediglich eine unterstützende, inhibitorische Funktion festgestellt werden, nicht jedoch die Hauptstrategie regulatorischer

T Zellen (Baecher-Allan et al., 2001). Neben den Studien über die inhibitorischen Signale von PD-1/ PD-1L, PD-2L gibt es auch Arbeiten, in denen deutlich gezeigt werden konnte, dass es bei PD-1-Kostimulation des besagten Systems zu einer Erhöhung der T-Zell-Proliferation kommt, die IL-10 Produktion gesteigert wird und eine geringe IFN $\gamma$  und GM-CSF-Produktion zu beobachten ist (Dong et al., 1999; Tseng et al., 2001).

#### 1.4. Das CD28/CTLA-4 -- B7-1/ B7-2 System

Die CD28 -- B7 Interaktion beschreibt den am besten studierten von allen kostimulatorischen Wegen und zählt zudem noch zu den wichtigsten bei der T-Zell-Aktivierung und -Toleranz (Sharpe and Freeman 2002 ; Alegre et al. 2001).

Als erster beschrieb Hansen 1980 das CD28-Molekül. Er verwendet monoklonale anti CD28-Antikörper als Differenzierungsmarker auf CD4<sup>+</sup> und einigen CD8<sup>+</sup> T Zellen (Hansen et al. 1980). Von CD28 wurde zunächst angenommen, bei einer Kostimulation lediglich zu verhindern, dass T Zellen in einen anergen Zustand übergehen. Heute ist jedoch bekannt, dass über diesen Weg der T-Zell-Aktivierung der effektivste Kostimulus bei naiven aber auch schon ausdifferenzierten T Zellen auftritt. Dies konnte sowohl im Menschen (Hara et al. 1985) als auch in der Maus (Groß et al. 1990 und 1992) und in der Ratte (Tacke et al., 1997) nachgewiesen werden.

Der Haupteffekt der CD28-Kostimulation liegt in der Anregung und Aufrechterhaltung von Antigen-spezifischen T-Zell-Antworten. Dabei wird durch die Bindung von CD28 die Anzahl der TZR reduziert, die notwendig sind, Proliferation oder Zytokinproduktion auszulösen, d.h. es kommt zu einem Absinken der Schwelle der T-Zell-Aktivierung. Es wird vermutet, dass CD28 "Lipid rafts" an die Stelle der Interaktion zwischen T-Zelle und APZ rekrutiert ("immunologische Synapse") und somit die lokale Konzentration lipidgebundener Enzyme und Adaptormoleküle erhöht (Viola et al 1996 und 1999).

Im Verlauf einer Immunantwort wird die Klongröße aktivierter T Zellen durch Proliferation (= Expansion) und Apoptose (=Kontraktion) bestimmt. CD28 kann auf beide Vorgänge Einfluss haben. Durch CD28 wird das Überleben einer T Zelle verbessert, indem es die Expression des anti-adoptotischen Moleküls bcl-x<sub>L</sub>, eines Mitglieds der anti-apoptotischen bcl-2-Familie, erhöht. Bei einer Kostimulation mit CD28 ändert sich nicht das Niveau an bcl-2, jedoch wird mehr bcl-x<sub>L</sub> produziert, wel-

ches ein Fas-vermitteltes Absterben der T-Lymphozyten verhindert (Boise et al 1993 und 1995). Eine entscheidene Rolle spielt CD28 auch bei der Steigerung der Produktion verschiedener Zytokine, wie z.B. IL-2, IL-4, IL-5 etc. (Lenschow et al 1996, Thompson et al 1989). Lindstein et al beschreibt 1989, dass diese Erhöhung der Lymphokine auf eine verbesserte Expression dieser Lymphokingene nach einer erfolgten CD28-Kostimulation zurückzuführen ist, in Form einer zunächst erhöhten Transkription (NF $\kappa$ B ist CD28 abhängig) und einer anschließenden Stabilisierung der Lymphokin-mRNA. Zusammengefasst wirken Signale des kostimulatorischen Rezeptors CD28 positiv regulierend auf die Immunantwort.

Bei CTLA-4 (**C**ytotoxic **T** Lymphocyte-associated **A**ntigen 4 oder CD152) handelt es sich um ein zu CD28 homologes Molekül (Linsley et al 1991). Beide Moleküle sind zu 31% identisch (Ostrov et al 2000).

Die wichtigste Aufgabe von CTLA-4 liegt in der negativen Regulation der Immunantwort (Sharpe and Freeman 2002). Im Speziellen besteht dies aus der Einschränkung der IL-2 Produktion, und dass sich teilende T-Lymphozyten in der G1-Phase des Zellzyklus zurück gehalten werden. Ein Absinken der Zytokinproduktion nach erfolgtem CTLA-4-Signal beruht demnach nicht auf einer Reduzierung der Menge an produzierten Zytokinen, sondern auf der Verminderung Zytokin-produzierender Zellen (Walunas et al 1994, zusammengefasst in Alegre et al 2001). CTLA-4 Knockout-Mäuse sterben an einer verheerenden lymphoproliferativen Erkrankung (Waterhouse et al 1995), in deren Verlauf es zu einer Anhäufung von T Zellen in sekundären Lymph- und nicht lymphatischen Organen wie Herz und Leber kommt. Dies Mäuse werden nicht älter als fünf Wochen.

Eine wichtige Rolle spielt CTLA-4 auch in der peripheren Toleranz (Perez et al 1997). Blockierende Antikörper gegen CTLA-4 zeigten auf der einen Seite eine Steigerung der Anti-Tumor-Immunität, lösten aber auch Autoimmunreaktionen aus (Perrin et al. 1996).

Sowohl CD28 als auch CTLA-4 sind homodimere Glykoproteine, wobei die Verbindung zwischen zwei Monomeren über eine Disulfidbrücke realisiert wird. Als Stelle der Dimerisierung wird ein unpaariger Cysteinrest in proximaler Lage zur transmembranen Domäne angenommen (zusammengefasst bei Lenschow et al 1996, Stamper et al 2001).

CD28 ist auf ca. 80% aller menschlichen  $\alpha\beta$ T-Zellen exprimiert (Martin et al. 1986), dabei ist es auf allen CD4<sup>+</sup>T Zellen aber nur auf ca. 50% aller CD8<sup>+</sup>T Zellen vorzufin-

den (Yamada et al., 1985). Bei Mäusen (Gross et al., 1990) und Ratten (Tacke et al. 1995) ist CD28 auf der Oberfläche von nahezu allen  $\alpha\beta$ -T-Zellen auffindbar. Dabei ist seine Expression nicht statisch, sondern nimmt in hohem Maße bei der Aktivierung einer T Zelle zu, wobei sich hier die Dichte besonders an der TZR-Bindungsstelle (immunologische Synapse) erhöht (Turka et al., 1990; Bromley et al., 2001).

Dem gegenüber wird CTLA-4 nur von aktivierten T Zellen exprimiert (Brunet et al., 1987). Die höchste Expression wird sowohl bei Maus und Ratte wie auch beim Menschen ca. 48 Stunden nach erfolgter T-Zell-Aktivierung erreicht und ist nach ca. 96 Stunden wieder bis auf ein Hintergrundniveau verschwunden (Linsley et al., 1992; Walunas et al., 1994; Lin, 2004). Des weitern scheint eine Diskrepanz zwischen mRNA-Transkription und der Expression des CTLA-4-Moleküls an der Oberfläche zu bestehen.

Die CTLA-4 Expression bei  $CD4^+CD25^+$  T Zellen (regulatorische T Zellen, auf welche im weiteren noch näher eingegangen wird) stellt eine Besonderheit dar, da hier CTLA-4 konstitutiv vorhanden ist. In verschiedenen Versuchen an Mäusen mit blockierenden Antikörpern gegen CD152 konnte gezeigt werden, dass die regulatorischen Zellen ihre suppressive Funktion verloren (Takahashi et al. 2000; Read et al., 2000). Jedoch erbrachte eine Blockade von CTLA-4 bei humanen  $CD4^+CD25^+$  T Zellen keinerlei Einschränkungen in deren regulatorischen Funktion. Auch sind regulatorische  $CD4^+CD25^+$  Zellen aus CTLA-4-defizienten Mäusen ebenso funktionstüchtig wie jene aus Wildtyp-Mäusen (Takahashi et al., 2000). Die Bedeutung von CTLA-4 für T regulatorische Zellen ist also noch umstritten.

Nicht eindeutig geklärt bleibt auch die Frage, auf welche Weise CTLA-4 seine inhibitorische Funktion ausübt. Zur Zeit werden zwei Möglichkeiten in Betracht gezogen. Zum einen könnte es sich um ein Konkurrieren von CTLA-4 und CD28 um die Liganden CD80 und CD86 handeln. Andererseits wäre eine direkt ausgelöste intrazelluläre Signalkaskade, ohne vorheriges Konkurrieren bzw. neben der von CD28 denkbar (Alegre et al., 2001).

Die Liganden von CD28 und CTLA-4 sind B7-1 (CD80) und B7-2 (CD86) (Yokochi et al., 1982; Freeman et al., 1993; Azuma et al. 1993), wobei, aufgrund der bivalenten Bindung von CTLA-4 an B7 gegenüber der monovalenten von CD28, CTLA-4 zu beiden eine höhere (bis zu 10000 fach gesteigerte) Avidität besitzt (Davis et al., 2003). Beide Moleküle beinhalten eine Immunglobulin C-ähnliche Domäne. Ihre Funktionen überschneiden sich weitestgehend (McAdam et al., 1998). Die größte Differenz zwischen ihnen liegt wohl in der Expression auf den verschiedenen APZ und auch zu verschiedenen Zeitpunkten der Immunantwort.

CD80 ist vorrangig auf Dendritischen Zellen exprimiert und auf ruhenden B Zellen nahezu nicht zu entdecken. Die Expression von B7-1 beginnt erst nach erfolgter B-Zell-Aktivierung und erreicht seinen Höhepunkt nach ca. 48-72 Stunden. CD86 ist auf ruhenden B-Zellen nur sehr wenig vorzufinden. Nach erfolgter B-Zell-Stimulation beginnt eine rasche Expression an der Oberfläche mit einem Maximum nach ca. 18-24 Stunden. Bei einem Vergleich beider Kostimulatoren ist das maximal erreichte Niveau an B7-1 deutlich niedriger als das von B7-2 (Hathcock et al., 1994).

Bei der Regulierung beider Kostimulatoren spielen eine Reihe von Oberflächen-Glykoproteine eine Rolle. Speziell CD40/CD40L hat einen großen Einfluss auf die Expression von B7-1 und B7-2. So werden beide durch den CD40/CD40L-Signalweg über CD40L auf aktivierten T Zellen hochreguliert (zusammengefasst in Lenschow et al., 1996). Des weiteren können auch eine Reihe von Zytokinen Einfluss auf die Expression von B7-1/B7-2 auf APZ nehmen. Von besonderer Bedeutung ist IL-4, welches zu den stärksten Induzierern von B7-2 auf B Zellen zählt. Es führt auch zu der Expression von B7-1 auf B Zellen, jedoch nicht in so starkem Maße (Stack et al., 1994). Ebenfalls hier zu erwähnende Zytokine wären IL-10 und IFN- $\gamma$ , die in unterschiedlicher Weise (hemmend oder fördernd) auf die Präsenz der beiden Kostimulatoren auf der Oberfläche von APZ Einfluss nehmen können (Freedman et al., 1991; Willems et al., 1994).

Die Bedeutung der Interaktionen zwischen den Molekülen CD28/CTLA-4 und B7-1/B7-2 bei der Unterstützung von T- und B-Zell-Antworten wurde durch zahlreiche Experimente unterstrichen. Untersuchungen über die Abstoßung xenogener (menschliche Pankreas-Inseln in Diabetes-Mäuse) und allogener (Ratten Herztransplantate) zeigten, dass eine Blockade der Interaktionen von CD28 mit B7 *in vivo* eine Abstoßung verhindert (Lenschow et al., 1992; Turka et al., 1992), und Donor-spezifische Toleranz erzielt werden konnte. Auch verschiedene Versuche mit CD28<sup>-/-</sup> Mäusen bestätigten die wichtige Rolle des kostimulatorischen Rezeptor/Liganden-Paares bei der Unterstützung der T-Zell-Antwort und der Regulierung von T-B-Zell-Interaktionen, welche wiederum für die Ausdifferenzierung von Plasmazellen wichtig sind. In diesen Mäusen verlief die T-Zell-Entwicklung im Thymus normal, jedoch zeigte sich, dass die peripheren T Zellen nach einer Stimulation mit einem Mitogen (z.B. ConA) in ihrer Zytokinproduktion wesentlich beeinträchtigt waren. Außerdem wiesen CD28-defizienten Mäuse ausgeprägte Defekte bei der humoralen Immunantwort auf (Shahinian et al., 1993).

de Boer et al. (1993) und Klaus et al. (1994) fanden heraus, dass CD28 vermittelte

Signale CD40L mRNA stabilisieren. Somit kann eine schnellere Translation und Expression des CD40L-Moleküls an der Oberfläche erfolgen, was wiederum in einer gesteigerten B-Zell-Antwort resultiert. Dies ist ein weiteres Beispiel dafür, wie die Interaktion der einzelnen Komponenten des CD28-CTLA-4/B7 Komplexes einen entscheidenden Einfluss auf T- und B-Zell-Antworten nimmt.

Die Moleküle des CD28-CTLA-4/B7-Komplexes nehmen jedoch keine universelle Stellung bei der Kostimulation ein. Gezeigt werden konnte dies dadurch, dass normale anti-virale Immunantworten (z.B. zum *Lymphocytic Choriomeningitis Virus (LCMV)*) in CD28<sup>-/-</sup> Mäusen generiert werden können (Shahinian et al., 1993). Dies ist ein Beweis für die Existenz anderer kostimulatorischer Wege, auf welche im Vorfeld mit einigen ausgewählten Beispielen eingegangen wurde.

Einen entscheidenden Einfluss nehmen CD28, CTLA-4 und B7-1, B7-2 auch auf die Kontrolle der Entwicklung der beiden T Helferzellen Subtypen, Th1 und Th2. Auf diese Thematik wird im nächsten Abschnitt näher eingegangen.

## 1.5. Th1/Th2-Differenzierung der CD4<sup>+</sup>T Zellen

Nach der initialen Aktivierung können T Zellen unterschiedliche Effektorfunktionen ausüben. Wie bereits beschrieben, wird dies auch in starkem Maße von der Art eingedrungener Erreger und ihrer Präsentation in prozessierter Form über MHC Peptide bestimmt. Folgt eine Präsentation über MHC I, so wird dieser Komplex von zytotoxischen CD8<sup>+</sup>T Zellen erkannt; im Falle von MHC II-Präsentation werden CD4<sup>+</sup>T Zellen aktiviert. CD4<sup>+</sup>T Zellen können ihrerseits wiederum nach erfolgter Aktivierung zu den verschiedenen T Zellsubpopulationen Th0, Th1, Th2 und Th3 (und auch Tr1) differenzieren.

Stark polarisierte Th1- bzw. Th2-Antworten treten z.Bsp. bei chronischen parasitären Infektionen auf. Jedoch stellen sie eher Extremformen bei der Eliminierung von Erregern dar. In den meisten Fällen einer akuten Immunantwort kommt es zu mehr heterogenen Th1/Th2-Antworten (Murphy and Reiner, 2002).

Die Klassifikation aktiver CD4<sup>+</sup>-Zellen wird im wesentlichen durch das Zytokinexpressionsprofil der einzelnen Subpopulationen bestimmt (Mossmann and Coffmann, 1989; Dong and Flavell, 2001). Th1 Zellen sezernieren hauptsächlich IL-2, IFN $\gamma$  und Lymphotoxin (LT); sie führen zellvermittelte Immunantworten an. Th2 Zellen produzieren IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 und IL-13; sie stehen für extrazelluläre Immunität, indem sie die humorale Immunreaktion unterstützen. Manche Proteine treten jedoch auch bei beiden Subpopulationen auf. Zu ihnen gehören IL-3 und Granulozyten/Makrophagen-Kolonie stimulierender-Faktor (GM-CSF). Die repräsentativsten Zytokine für die Klassifikation von aktivierten CD4<sup>+</sup>T Zellen sind jedoch IFN $\gamma$  für Th1 Zellen und IL-4 für Th2 Zellen. Sie wirken über STAT1/4 bzw. STAT6 und stellen Schlüsselemente bei der Ausdifferenzierung der Subpopulationen dar (Mosman and Sad, 1996; Dong and Flavell, 2001, Murphy and Reiner, 2002; Ho and Glimcher, 2002).

Es zeigte sich jedoch immer wieder, dass auch andere Faktoren (nicht-Zytokine) Einfluss auf den Differenzierungsprozess nehmen können, wie z.Bsp. Antigenpräsentation, Kostimulatoren, der Phänotyp bestimmter Dendritischer Zellen etc. Auf sie wird später näher eingegangen.

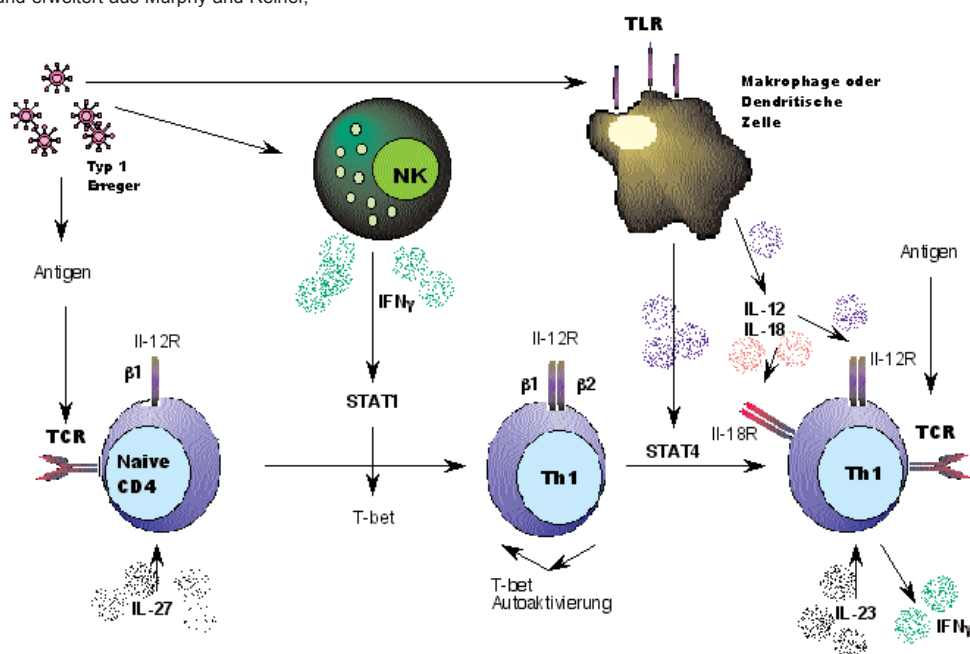
Ebenfalls konnte bestätigt werden, dass bestimmte Transkriptionsfaktoren eine kau-

sale Rolle bei den verschiedenen Gen-Expressions-Programmen der Th1- bzw. Th2-Differenzierung spielen. Für die Entwicklung von Th1-Zellen wäre hier der T-box-Transkriptionsfaktor T-bet zu nennen (Szabo et al., 2000), für die Th2-Differenzierung der Zinkfinger-Transkriptionsfaktor GATA3 (Zheng and Flavell, 1997).

Die genauen Abläufe bei der Differenzierung der einzelnen Subpopulationen aktivierter CD4<sup>+</sup> T Zellen sind auch heute noch nicht eindeutig geklärt, da es sich hier um sehr umfangreiche Prozesse mit vielen alternativen Wegen handelt. Aufgeführt wird nachfolgend eine Zusammenfassung von Murphy and Reiner (2002), welche lediglich die Grundzüge wiedergibt.

**Abbildung 1: Th1-Differenzierung**

(entnommen und erweitert aus Murphy and Reiner, 2002 )



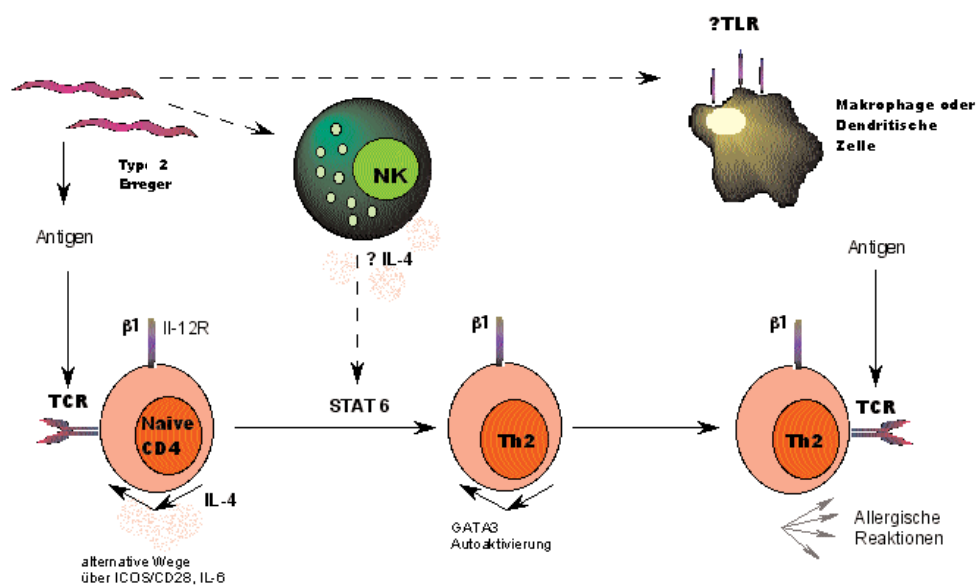
Bei der Entwicklung von Th1 Zellen beherrschen IL-12 und IFN $\gamma$  das Zytokinmilieu in der Mikroumgebung der T Zelle. IFN $\gamma$ , eventuell sezerniert von pathogen-aktivierten Natürlichen Killerzellen, liefert hierbei das erste Signal und wirkt über STAT1 zusammen mit dem TZR-Signal, was zu einer erhöhten Expression von T-bet in naiven CD4<sup>+</sup> T Zellen führt. Dies hat eine Umformung des IFN $\gamma$ -codierenden Genes in einen aktiven Status und das Vorantreiben der Expression des IL-12 Rezeptors (IL-12R) zur Folge. IL-12, eventuell ausgeschüttet von pathogen-aktivierten Makrophagen oder auch aktivierten DC, kann nun über zwei verschiedene Wege die Th1-Antwort beein-



flussen. Einerseits kann es direkt die Produktion von  $\text{IFN}\gamma$  steigern, andererseits die Expression des IL-18-Rezeptors erhöhen, und somit einen weiteren, alternativen Weg zur Steigerung der  $\text{IFN}\gamma$ -Produktion schaffen. Weitere Seitenäste der Differenzierung seien hier nur erwähnt, da sie auch noch nicht im Einzelnen geklärt wurden. Aufzuführen wären hier die Mechanismen über IL-23 (Oppmann et al., 2000) und IL-27 (Pflanz et al., 2002).

### Abbildung 2: Th2-Differenzierung

(entnommen und erweitert aus Murphy and Reiner, 2002 )



Bei der Th2-Entwicklung ist das bestimmende Zytokin IL-4. Es bleibt jedoch zur Zeit noch nicht eindeutig geklärt, welcher Zelltyp für die initiale IL-4-Produktion bei der Th2-Differenzierung verantwortlich ist (Zu erwähnen wären hier  $\text{CD4}^+\text{NK1.1}$  Zellen [Yoshimoto and Paul, 1994], Basophile [Romagnani, 1992] aber auch  $\gamma\delta\text{T}$  Zellen [Ferrick et al., 1995]), bzw. ob IL-4 für die Initiierung überhaupt notwendig ist, oder vielmehr ein Aufheben inhibitorischer Signale der Th2-Entwicklung, durch Eliminieren von IL-12 und  $\text{IFN}\gamma$ , den Weg der Th2-Antwort einleitet. Bei vorhandenem IL-4 würde dies im weiteren - zusammen mit dem TZR-Signal - über STAT6 zu einer erhöhten Expression von GATA-3 und damit zu einer gesteigerten Produktion von IL-4 führen. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, dass geringe Mengen an produziertem IL-4 mancher naiver  $\text{CD4}^+\text{T}$  Zellen (In naiven  $\text{CD4}^+\text{T}$  Zellen liegt eine schwache Expression von GATA-3 vor, ausreichend für einige Zellen, IL-4 zu produzieren [Murphy and Reiner, 2002].) bei einem Fehlen von inhibitorischen Signalen eine Art

positive Rückkopplung darstellt und somit eine Kaskade der Th2-Antwort einleitet. Des Weiteren gibt es Anhaltspunkte, dass eine Th2-Entwicklung auch ohne STAT6 möglich ist (Ouyang et al. 2000), also auch hier andere, alternative Wege existieren. Sowohl das gebildete  $\text{IFN}\gamma$  der Th1-Antwort als auch das IL-4 der Th2-Antwort haben jeweils eine hemmende Wirkung auf die andere Th-Subpopulation. So inhibiert  $\text{IFN}\gamma$  die Produktion von IL-4 (Zhang et al, 2001). Ein Effekt, der durch IL-12 verstärkt wird. Im Gegensatz dazu wird durch IL-4 die Synthese von  $\text{IFN}\gamma$  gestoppt, in dem die Transkriptionsfaktoren herunter reguliert werden (Ohmori and Hamilton, 1997). Dieses gegenseitige Eingreifen ist nicht zuletzt dafür notwendig, eine zu stark polarisierte Immunantwort zu verhindern oder auf kontinuierlich aktivierte Th-Antworten einzuwirken, um inflammatorische Gewebeschäden zu vermeiden bzw. zu minimieren.

Wie zu Beginn dieses Kapitels bereits erwähnt, üben eine Reihe von extrinsischen, teilweise „nicht-Zytokin“ Faktoren ebenfalls einen Einfluss auf die Bildung von Th1/Th2-Zellen aus. So sind Dendritische Zellen im Verlauf einer Immunantwort nicht nur an der initialen klonalen Expansion beteiligt, sondern auch an der spezifischen Entwicklung einer Th1/Th2-Antwort. Dabei ist der ausgeprägte Phänotyp sowie die Herkunft dieser Zellen entscheidend. Es kommt daher zu einer Aufteilung von zwei Klassen von Dendritischen Zellen:

DZ1 entstehen aus einer myeloiden Monozytenvorläuferzelle und produzieren große Mengen an IL-12. Sie können dadurch einen wesentlichen Einfluss auf die  $\text{IFN}\gamma$ -Produktion nehmen und somit eine Th1-Antwort begünstigen.

DZ2 entwickeln sich aus plasmazytoiden dendritischen Vorläuferzellen und sezernieren nur sehr geringe Mengen an IL-12. Sie fördern eine Th2-Antwort, obwohl sie kein IL-4 bzw. IL-13 produzieren (Rissoan et al. 1999). Somit wurde von Rissoan et al. gezeigt, dass es einen IL-4 unabhängigen Weg der Generierung einer Th2-Antwort geben muss, ein weiterer Anhaltspunkt dafür, dass die Ausbildung der Subpopulationen aktivierter  $\text{CD4}^+$  T Zellen kein eingleisiger Prozess ist, sondern ein Netzwerk vieler einzelner, ineinander wirkender Wege darstellt (Moser and Murphy 2000, Liu et al., 2001). Trotz dieser Resultate bleibt die Rolle der Dendritischen Zellen bei der Herausbildung von Th1/Th2 Zellen eher spekulativ.

Die Art und Intensität von T-Zell-kostimulatorischen Signalen können ebenfalls eine entscheidende Rolle bei der Bildung spezifischer Th-Subpopulationen spielen (Kuchroo et al., 1995; Rulifson et al., 1997; Tao et al., 1997; Kato and Nariuchi, 2000).

Der Einfluss der Interaktionen auf die Th1/Th2-Antworten bzw. -Balance ist heute in vielen Details noch unklar. Bereits gezeigt werden konnte, dass CD28-Kostimulation die Expression von GATA-3 erhöht (Rodríguez-Palmero et al. 1999) oder aber auch den Transkriptionsfaktor NF $\kappa$ B aktiviert, welcher wiederum an der Transkription von IL-4 beteiligt ist (zusammengefaßt bei Murphy and Reiners, 2002). Es zeigte sich eine deutlich unterstützende Funktion von CD28 bei der Th2-Entwicklung, was Beobachtungen aus Versuchen mit CD28 $^{-/-}$  Mäusen ebenfalls bestätigten (Shaninian et al., 1993). Jedoch existieren auch Anhaltspunkte, die keine so klare Begünstigung der Th2-Polarisierung mittels CD28-Signal widerspiegeln. In Experimenten mit experimenteller autoimmuner Enzephalitis (EAE) im Mausmodell sowie in verschiedenen *in-vitro*-Ansätzen konnte bei der Untersuchung der CD28-B7.1/B7.2-Interaktionen festgestellt werden, dass eine Bindung von CD28 an B7.1 eine Th-Entwicklung in Richtung Th1 steuert, während CD28-B7.2-Interaktionen zu einer Th2-Antwort führten. Unterstützt wurden diese Aussagen durch Versuche, bei denen entweder anti B7-1 (dies führte zu einer Verminderung von EAE; EAE ist eine über Th1 vermittelte Krankheit) oder anti-B7-2 (Verschlimmerung des Krankheitsbildes) appliziert wurde (Kuchroo et al., 1995). Daher ist eine klare Aussage über eine bevorzugte Th1- bzw. Th2-Polarisierung über CD28-Signal zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht eindeutig möglich.

CTLA-4 kann ebenfalls einen Einfluss auf die Th1/Th2-Differenzierung nehmen und wird dabei meistens mit einer regulierenden (negativen) Rolle bei der Th2-Antwort in Verbindung gebracht. Hierbei ist das Einwirken von CTLA-4 noch relativ hypothetisch. So wird einerseits die Möglichkeit in Betracht gezogen, dass CTLA-4 mit CD28 um die B7-Bindungsstelle konkurriert und dadurch einer über CD28 geförderten Th2-Entwicklung entgegen steuert. Denkbar wäre auch, dass CTLA-4 einen direkten Einfluss auf über CD28 vermittelte Signale nimmt, welche für die Transkription von Th2 Zytokinen entscheidend sind (Oosterwegel et al, 1999). Kato und Nariuchi bringen eher die Rolle von CTLA-4 bei der Ausdifferenzierung von CD4 $^{+}$ T Subpopulationen mit TGF $\beta$ 1 in Verbindung, wobei hier CTLA-4 Kostimulation einen Einfluss auf eine vermehrte Anhäufung von TGF $\beta$ 1-mRNA während der Differenzierung von naiven CD4 $^{+}$ T Zellen nehmen soll (Kato and Nariuchi, 2000). TGF $\beta$ 1 wurde zuvor schon eine fördernde Rolle bei der Herausbildung einer Th1-Antwort zugeschrieben (Nagelkerken et al, 1993), wobei hier auch Hinweise für einen eher inhibitorischen Einfluss existieren (Schmitt et al, 1994).

Auf die Eingangs zu diesem Abschnitt mit erwähnten Subpopulationen Th0 und Th3 (und Tr1) soll nur kurz bzw. später eingegangen werden. Th0-Zellen sind in der Lage, sowohl Th1- als auch Th2-Zytokine zu produzieren, und nehmen bei der Ausdifferenzierung von Th1/Th2-Antworten eine Zwischenstellung ein. Th0-Zellen können wie Th1-Zellen (und auch naive CD4<sup>+</sup>T Zellen) als Antwort auf die Stimulation durch ein Antigen IL-2 produzieren (O'Garra et al., 1998). In Abhängigkeit zum Milieu in ihrer Mikroumgebung besteht die Möglichkeit, dass ihre Differenzierung zu Th1- bzw. Th2-Zellen fortgesetzt wird (Dong and Flavell, 2001). Th3- und Tr1-Zellen stellen zwei noch relativ neu beschriebene Subpopulationen der CD4<sup>+</sup> Helfer-T-Zellen dar. Basierend auf ihrem Zytokinprofil sowie auf ihrer funktionellen Eigenschaften reihen sie sich bei den regulatorischen Zellen ein. Auf sie wird im Abschnitt regulatorische T Zellen noch einmal näher eingegangen (zusammengefasst in Shevach, 2002, kurz zusammengefasst in Lin and Hünig, 2003).

Die hier aufgeführte Bildung der Subpopulationen Th1 bzw. Th2 aus CD4<sup>+</sup>T Zellen nimmt entscheidenden Einfluss auf Resistenz oder Empfindlichkeit gegenüber einem Erreger. In Versuchen mit Mäusen, welche einen verschiedenen genetischen Hintergrund aufwiesen und dadurch entweder bevorzugt IFN $\gamma$  oder IL-4 exprimieren, kam es nach erfolgter *Leishmanien*-Infektion entweder zur Beseitigung des Parasiten aus dem Körper oder zum Verbleiben im Wirtsorganismus und damit einer Verschlimmerung der Infektion (Heinzel 1989). Im Zusammenhang mit der Differenzierung zu Th1 oder Th2 sollte jedoch auch vermerkt sein, dass trotz gegensätzlichem Wirken ein Wechselspiel zwischen Th1- und Th2-Antwort unerlässlich ist im Hinblick auf das Überschießen einer zu stark polarisierten Antwort, deren Folge schwere Gewebeschädigungen sein können. Als Beispiel sei hier eine *Schistosoma mansoni*-Infektion bei IL4-defizienten Mäusen aufgeführt. Das Fehlen einer Th2-Antwort in diesem Falle ergab eine überschießende, Th1-gesteuerte Entzündungsreaktion, in deren Folge eine übermäßig gesteigerte Produktion von TNF $\alpha$  zum Tod der Tiere führte (Brunet et al, 1997, Pearce and MacDonald, 2002).

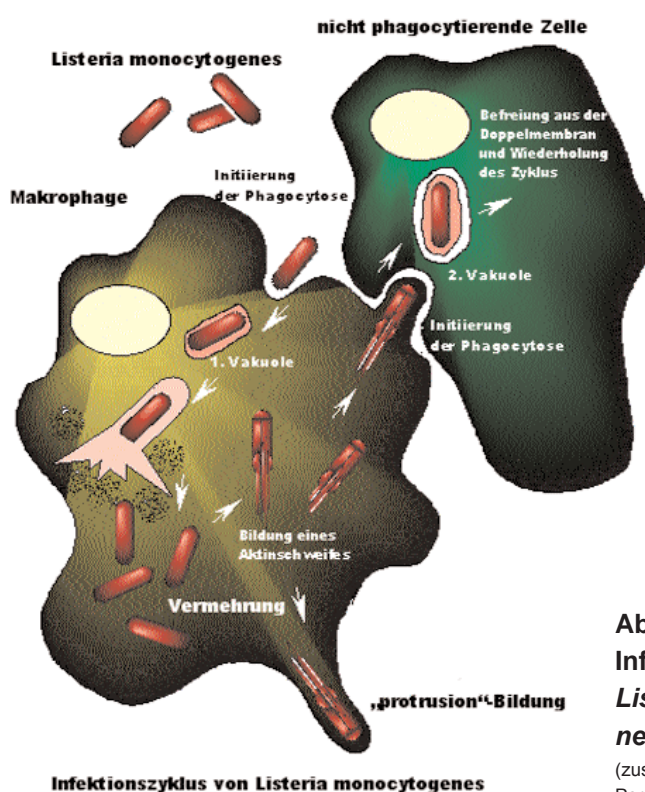
## 1.6. *Listeria monocytogenes* als Modellorganismus für die Induktion einer Th1- und CD8-polarisierten Immunantwort

Listerien sind Gram-positive, nicht-sporulierende, fakultativ anaerobe Stäbchenbakterien, welche im Boden, in Gewässern aber auch in der Vegetation vorzufinden sind. Die Gattung *Listeria* - benannt nach dem britischen Chirurgen Joseph Baron Lister (1827 bis 1912) - umfasst 6 Arten. Davon zählen *L. welsheri*, *L. innocua*, *L. seeligeri* und *L. grayi* zu den apathogenen Arten, während *L. ivanovii* und *L. monocytogenes* den opportunistischen Krankheitserregern angehören. Hierbei ist *L. ivanovii* tierpathogen; *Listeria monocytogenes* verursacht auch beim Menschen eine ernsthafte Erkrankung, welche als Listeriose bekannt ist. Bei einem gesunden Menschen verläuft die Erkrankung meist inapparent, stellt jedoch für immungeschwächte Personen, wie zum Beispiel AIDS- und Transplantationspatienten, für alte Menschen, sowie Neugeborene und Schwangere eine große Gefahr dar. Über den Verzehr von kontaminierten Lebensmitteln, aber auch durch den direkten Kontakt mit Listerienverseuchter Erde (eher selten) gelangen die Erreger in den Darm. Von da aus erfolgt eine Aufnahme über Darmepithelzellen oder Makrophagen. So gelangen die Bakterien in die Blutbahn, von dort aus eine Infektion aller Organe möglich wird. *Listeria monocytogenes* besitzt die Fähigkeit, seine Aufnahme in das Zytoplasma von Körperzellen zu induzieren, somit fakultativ intrazellulär zu leben. Dadurch umgehen diese Bakterien häufig eine humorale Immunabwehr und können so ebenfalls die Blut-Hirn- wie auch die Plazentaschranke überwinden. Die Folge davon sind Hirnhautentzündungen und Schädigungen bzw. Absterben eines Embryos. Da die frühen, grippeähnlichen Symptome der Krankheit oft verkannt werden, kommt es auch in heutiger Zeit, trotz bestehender, wirkungsvoller Therapien (Chloramphenicol etc.) immer noch zu Todesfällen. (Kaufmann, 1993; Janeway et al., 2002; www.medicine-worldwide.de 29.01.2004)

Für die Nahrungsmittelindustrie sind *Listeria monocytogenes* Bakterien als Lebensmittelkeime ein ernsthaftes Problem, da sie auch noch unter extremen Bedingungen, wie hohe Salzkonzentrationen, sehr niedrige Temperaturen oder extreme pH-Werte überleben und sich vermehren.

### Infektionszyklus von *Listeria monocytogenes*

Die Fähigkeit der zytoplasmatischen Verbreitung unterscheidet *Listeria monocytogenes* von den meisten anderen Bakterien. Dies basiert auf der Expression verschiedener Virulenzgene. Sie ermöglichen es den Listerien ebenfalls, nicht-phagozytierende Zellen, wie Epithelzellen oder Fibroblasten zu infizieren.



**Abbildung 3:**  
**Infektionszyklus von**  
***Listeria monocytogenes***

(zusammengestellt nach Tilney und Portnoy, 1989)

Der Infektionszyklus von *Listeria monocytogenes* wurde erstmals detailliert von Tilney und Portnoy 1989 beschrieben. Zu Beginn der Infektion leitet das Bakterium seine eigene Phagozytose durch die Internaline A und B ein. Dadurch kommt es zur Adhäsion an die Wirtszellen und zur beginnenden Invasion (Gaillard et al., 1991; Lingnau et al., 1995; Braun und Cossart, 2000). Am Ende dieses Prozesses sind die Bakterien dann von der Membran des Phagosoms umgeben (primäre Vakuole). Diese wird durch die Sekretion von Listeriolysin zerstört (Portnoy et al., 1988; Andrews und Portnoy, 1994). So gelangen die Bakterien ins Zytoplasma und vermehren sich. Um sich im Zytoplasma fortbewegen zu können, kommt es zur Ausbildung eines

Schweifes aus Aktinfilamenten an einem Pol der Bakterienzelle, wobei die Listerien hierfür Komponenten des Wirtszellzytoskeletts nutzen (Dabiri et al., 1990). Kommt es zu einem Zusammenstoß mit der Plasmamembran der Wirtszelle, entstehen Ausstülpungen (protrusions - Cossart and Lecuit, 1998; Pantaloni et al, 2001), mit Hilfe derer sich die Bakterien in die benachbarten Zellen bohren und wiederum ihre Phagozytose induzieren. Durch Lysieren der sie umgebenden Doppelmembran (sekundäre Vakuole) mittels Listeriolysin und Phospholipase C (PlcB, Lecithinase) gelangen sie in das Zytoplasma einer neuen Wirtszelle (Vazquez-Boland et al., 1992). Der Infektionszyklus kann nun wieder neu starten. Den Listerien ist es so möglich, sich intrazellulär im ganzen Körper auszubreiten. Eine humorale Immunantwort in Form von frei zirkulierenden Antikörpern ist dann nicht effektiv, sondern nur das Erkennenprozessierter Listerienpeptide auf der Oberfläche infizierter Zellen mittels einer zellvermittelten Immunantwort.

### **Immunreaktionen gegen *Listeria monocytogenes***

Eine frühe Erkennung einer primären Infektion durch *L. monocytogenes* wird vorrangig durch Elemente des angeborenen Immunsystems, wie Makrophagen, NK-Zellen,  $\gamma\delta$ T Zellen sowie Granulozyten gewährleistet, indem eine zu starke Ausbreitung und Vermehrung der Bakterien verhindert wird (Dunn und North, 1991; Kaufmann, 1993; Mombaerts et al., 1993; Conlan und North, 1994), bevor das adaptive Immunsystem in den Vordergrund tritt. Hier sind es speziell  $CD8^+$  T Zellen, die an der Beseitigung der Bakterien und dem Schutz vor eventueller Reinfektion beteiligt sind (Lukacs und Kurlander, 1989; Kaufmann 1993; Berg et al. 2003; Schiemann et al., 2003). Aber auch  $CD4^+$  T Zellen sind in Form einer Th1-Antwort entscheidend an einer Immunreaktion gegen *Listeria monocytogenes* beteiligt (Hsieh et al. 1993, Schiemann et al. 2003). So produzieren sie ebenfalls  $IFN\gamma$ , wodurch Makrophagen aktiviert werden, antibakterielle Strategien wie z.Bsp. Bildung von ROI/ RNI, Limitierung des intrazellulären Eisens oder Begünstigung der Phagosom-Lysosom-Fusion einzuleiten (zusammengefasst in Kaufmann, 1993). Ebenfalls besitzen  $CD4^+$  (Th1) und  $CD8^+$  T Zellen die Fähigkeit, chronisch infizierte und somit „kampfunfähige“ Makrophagen abzutöten. Auch an der Bildung von Granulomen sind Th1-Zellen maßgebend beteiligt (Mielke et al., 1992), und sie nehmen einen entscheidenden Einfluss auf die Bildung eines optimalen Niveaus an  $CD8$ -Gedächtniszellen (Shedlock et al., 2003). Auf Grund der Polarisierung einer Immunantwort in Richtung Th1 wird *Listeria monocytogenes* oft als Modellorganismus bei Untersuchungen differenzierter

Immunreaktionen eingesetzt. Es sollte jedoch in diesem Zusammenhang erwähnt sein, dass eine CD4-T-Zell-Antwort bei einer Listerieninfektion auch durch eine direkte Aktivierung von APZ (im besonderen DZ) umgangen werden kann. In diesem Falle könnten Teile des Bakteriums über Toll-Rezeptoren (TLR - Toll-like-receptor) auf Makrophagen bzw. DCs erkannt werden (Hertz et al, 2001; Shedlock et al., 2003).

### **1.7. *Nippostrongylus brasiliensis* als Modellorganismus für die Induktion einer Th2-polarisierten Immunantwort**

Der Rattenhakenwurm *Nippostrongylus brasiliensis* gehört zum Stamm der Nematoden (auch Nematelminthen oder Nematoda). Der Name dieser Würmer rührt von dem griechischen Wort nema = Faden her, welches sich auf ihre Form bzw. ihr Aussehen bezieht. Eine andere Bezeichnung als Rundwürmer entstand nach ihrem unsegmentierten, runden Körperbau. Zu den Nematoden gehören ca. 16000- 20000 Arten, welche nahezu alle Lebensräume besiedeln. So sind die meisten Fadenwürmer frei lebend im Boden und im Wasser, wobei sie hier als Mikroben verzehrende Bewohner eine wichtige Rolle im Nahrungskreislauf, sowie beim Recycling von Chemikalien und organischen Schadstoffen spielen.

Jedoch gehören den Nematoden auch eine Reihe von parasitisch lebenden Arten an, welche bei Pflanzen wie auch Tieren (in nahezu allen Spezies) vorzufinden sind. Als Pflanzenparasiten können sie durch einmaligen Befall eine ganze Ernte vernichten. Die Besonderheiten der parasitischen Formen innerhalb der Nematoden liegen in einem sehr komplexen Lebenszyklus sowie einer engen Anpassung an ihren Wirt. Nematodeninfektionen beim Menschen und sich daraus ergebende Krankheitssymptome wurden bereits 2700 vor Chr. beschrieben (zusammengefasst in: Cheng, 1964; Despommier und Karapelou, 1987; Bush et al., 2001).

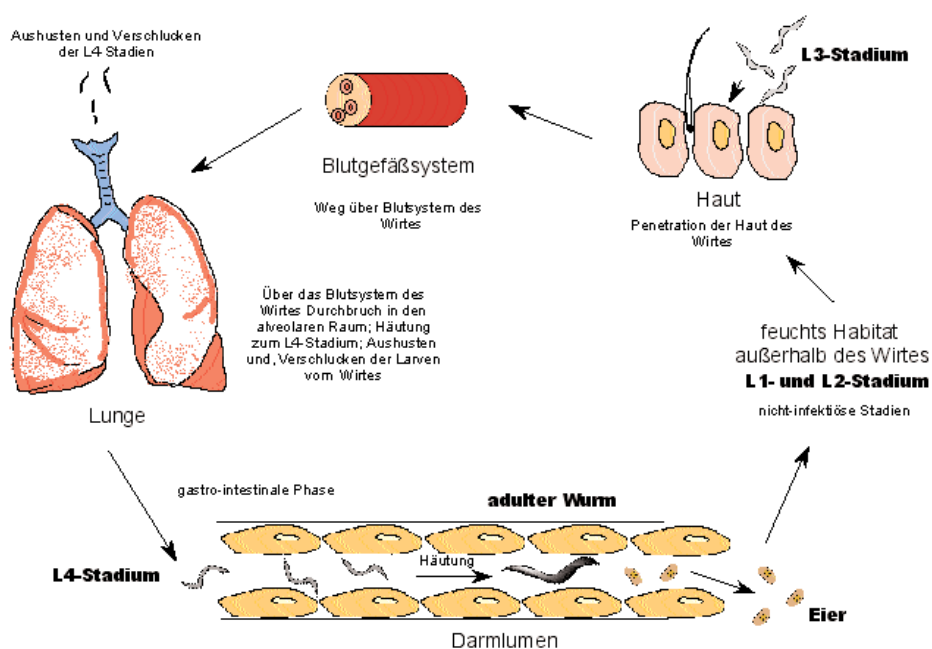
#### **Der Entwicklungszyklus von *Nippostrongylus brasiliensis***

Ein *Nippostrongylus brasiliensis*-Befall beginnt damit, dass das infektiöse, filariforme Larvenstadium 3 (L3) die Haut des Wirtes (im vorliegendem Fall: Ratte) penetriert. Dieses Stadium reagiert bei *Nippostrongylus* besonders empfindlich auf



Temperaturen. Durch die Wärme des Wirtes werden die Larven sehr mobil. Über die am Eintrittsort vorkommenden Kapillaren gelangen sie in den Blutkreislauf und letztendlich in die Lunge. Hier findet auch die Entwicklung zum L4-Stadium statt. Durch Aushusten aus der Lunge und anschließendes Verschlucken geraten die Wurmlarven in den gastro-intestinalen Bereich (Wanderungsphase der Infektion durch die einzelnen Gewebe). Hier im Darm entwickeln sich nach einer erneuten Häutung adulte Würmer mit separaten Geschlechtern. Danach beginnt die Produktion von Eiern, welche über den Kot den Wirt verlassen (Intestinale Phase der Infektion). Gelangen die Eier auf ein feuchtes, nicht anerobes Habitat (zBsp. Boden) kann sich nun wieder über zwei rabditiforme das infektiöse L3-Stadium ausbilden (Cheng, 1964; Gause et al., 2003).

**Abbildung 4: Lebenszyklus von *Nippostrongylus brasiliensis*** (zusammengestellt nach Gause et al., 2003)



Über das Ausplattieren von Kot auf feuchtem Filterpapier (in einer Feuchtkammer) können L3-Larven im Labor herangezüchtet werden. Hier erfolgt die Infektion meist durch subkutane Injektion oder durch Verfütterung, wobei die zweite Methode weniger effektiv ist.

Die Ausreifung nach erfolgter *Nippostrongylus*-Infektion verläuft relativ rasch. Zwischen Penetration und Eiausstoß liegen um die fünf bis sechs Tage, während nach Anzucht auf Filterpapier die Larven für längere Zeit im L3-Stadium verharren können (max. 160 Tage). Jedoch kommt es hier mit steigender Verweildauer dazu, dass die Wurmlarven weniger infektiös werden (Cheng, 1964; Keymer et al, 1983; persönliche Mitteilung mit PD. Dr. Klaus Erb).

### **Immunreaktionen gegen *Nippostrongylus brasiliensis***

Multizelluläre Wurmparasiten sind bekannt dafür, eine Th2-polarisierte Immunantwort zu induzieren, wobei für das endgültige Abtöten und Entfernen des Parasiten aus dem Organismus beide Th-Subpopulationen benötigt werden (Allen and Maizels, 1997; Maizels and Yazdabakhsh, 2003).

Eine Ausnahme stellt der Rattenhakenwurm *Nippostrongylus brasiliensis* (Nb) dar, da hier die Th2-Antwort auch für die Eliminierung des Parasiten aus dem Darm verantwortlich ist (Urban et al., 1993; Finkelman et al., 1997; Urban et al., 1998). Hierbei stehen die CD4<sup>+</sup> T Zell-abhängige IL-4 bzw. IL-13 gesteuerte Becherzellproliferation (Becherzellhyperplasie) und die anschließende, stark erhöhte Schleimsekretion im Vordergrund bei der Bekämpfung der adulten Würmer (Urban et al., 1998; McKenzie et al., 1999; Holland et al., 2000). Gleichartige Vorgänge sind auch in der Lunge während einer Nb-Infektion zu beobachten. Hier kann jedoch nicht davon ausgegangen werden, dass dies zur aktiven Beseitigung des Wurmes bzw. seiner larvalen Formen eingeleitet wird, da diese Reaktionen zu einem Zeitpunkt stattfinden, an welchem das L4-Stadium von Nb schon in den Darm gewandert ist (Tomita et al., 2000; Matsuda et al., 2001). Vielmehr werden diese Reaktionen ebenfalls wie die erst nach Lungenpassage der Larven auftretende Bildung perivaskulärer/ peribronchialer Granulome derzeit eher als immunologische Reaktionen auf Moleküle des Häutungsprozesses des L3-Stadiums zur L4-Larvenform in der Lunge gesehen (Matsuda et al., 2001). Unterstützt wird diese Hypothese dadurch, dass in jenen Infiltraten keine Würmer vorgefunden werden konnten (Ramaswamy et al., 1991; Matsuda et al., 2001).

Bei einer Nb-Infektion treten noch eine Reihe weiterer Th2-Zell-gesteuerter Immunreaktionen auf, wie zBsp. die IL-5 abhängige Eosinophilie (Coffman et al, 1989;

zusammengefasst in Maizels and Yazdabakhsh, 2003), die IL-3/ IL-10 abhängige mukosale Mastozytose (Issekutz et al., 2001) sowie auch eine IL-4 abhängige polyklonale IgE-Antwort (Uchikawa et al., 1993). Es bleibt jedoch zur Zeit noch offen, in welchem Maße sie Einfluss auf die Immunreaktion gegen die parasitäre Infektion haben. Ebenfalls in letzter Zeit häufiger diskutiert, ist die Rolle der so genannten NeMacs bei einem Nematoden-Befall. NeMac (Nematode-elicited Macrophages) heben sich besonders durch ihr spezielles Genexpressionsmuster von anderen, im Organismus vorkommenden Makrophagen ab (Loke et al., 2002). Auf Grund dessen sind sie in der Lage, Eosinophile anzulocken, die Differenzierung von Maus-T-Zellen in Th2 Zellen zu induzieren, aber auch die Proliferation von nicht-lymphoiden sowie T Zellen zu verhindern (zusammengefasst in Maizels and Yazdabakhsh, 2003).

Die Frage nach dem Grund der starken Th2-Polarisierung nach einer erfolgten Nb-Infektion ist heute noch nicht im Ganzen geklärt. Anhaltspunkte bestehen darin, dass die exkretorisch-sekretorischen Proteine (NES) von Nb einen wesentlichen Einfluss auf die letztendliche Th-Differenzierung haben (Holland et al., 2000). So konnte gezeigt werden, dass NES die Produktion von TGF $\beta$  und IL-2 in den mesenterialen Lymphknoten infizierter Ratten vermindert, während die Produktion von IL-4 und IL-10 nicht beeinträchtigt wurden (Uchikawa et al., 2000). Da aber, wie unter Punkt 1.5. bereits beschrieben, eine T-Helferzell-Differenzierung von mehreren Faktoren abhängig sein kann, bleibt offen, ob NES die Hauptursache der stark polarisierten Immunantwort sind.

## 1.8. Regulatorische T Zellen

Der Aufbau sowie die Aufrechterhaltung der Ag-spezifischen T-Zell-Toleranz bewahrt den Körper vor autoaggressiven Immunantworten. Das Immunsystem hat dafür eine Reihe von Mechanismen entwickelt. Zunächst kommt es schon während der Entwicklung von T Zellen im Thymus zu einer Aussonderung autoreaktiver Zellen (im Text weiter vorn; Palmer et al., 2003). Jedoch ist diese Selektion nicht lückenlos, und so gelangen immer wieder Zellen, welche „selbst“ erkennen, in die Peripherie. Hierauf reagiert ein Organismus zunächst mit „passiven“ Methoden der peripheren Toleranz. Dazu gehören die T-Zell-Anergie (Kapitel 1.3.; Schwartz et al., 1990) und T-Zell-Ignoranz bzw. -Indifferenz (Miller et al., 1993). Tritt aber bei einer Infektion der Fall ein, dass es zu einer Kreuzreaktion zwischen Epitopen des Krankheitserregers und „Selbst“-Antigenen kommt, versagen jene Strategien (Wucherpfennig und Strominger, 1995), mit verheerenden Folgen. Ebenfalls problematisch für einen Organismus kann die Überbewertung eines eher harmlosen Antigens durch das Immunsystem enden, in dem eine mehr oder weniger selbst zerstörende Immunantwort eingeleitet wird, wie bei mancher Allergie.

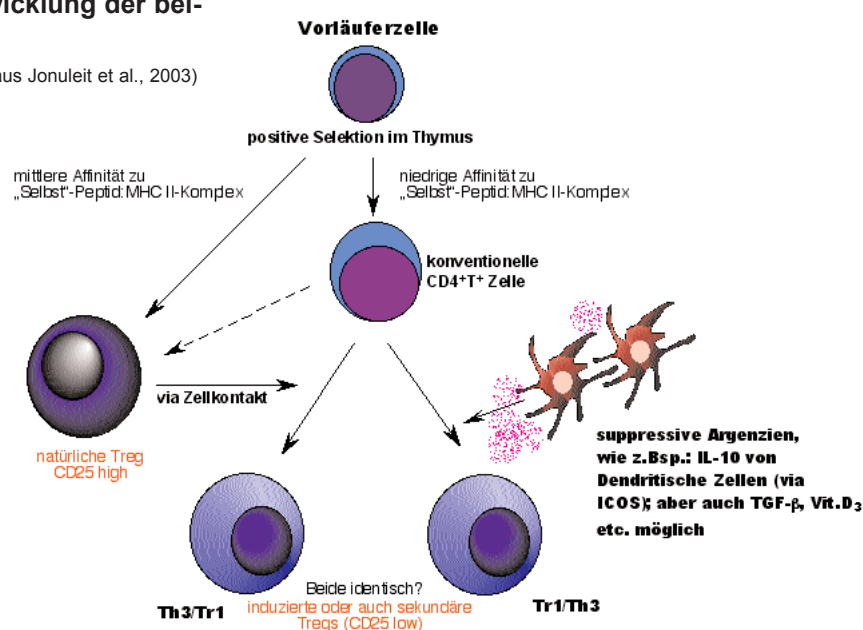
Daher erscheinen die „passiven“ Mechanismen für einen effektiven Schutz allein nicht auszureichen, und es häuften sich in den letzten Jahren immer mehr Beweise, dass noch ein anderer Mechanismus der Immunsuppression existiert. In den späten 60iger Jahren entdeckten Nishizuka und Sakakura (1969), dass Thymektomie von Balb/c-Mäusen, welche keine speziellen Neigungen zu autoimmunen Erkrankungen aufwiesen, drei Tage nach ihrer Geburt zu einer Vielzahl von Autoimmunerkrankungen, wie z.Bsp. Thyroiditis, Gastritis etc., führte. Ein Konzept über suppressive bzw. autoimmune Reaktionen inhibierende T Zellen entstand, und wurde von Gershon et al. (1970) und Penhale et al. (1973) weiterverfolgt. Als Wirkungsweise dieser regulatorischen Zellen wurde zunächst die Sekretion bestimmter Ag-spezifischer Faktoren angenommen. Da es jedoch nicht gelang, diese Substanzen aufzureinigen, wurde die Thematik der Immunsuppression durch eine bestimmte T-Zell-Population zunächst nicht weiterverfolgt. Die Untersuchung suppressorischen Zellen begann in den 90iger Jahren erneut in der Gruppe um Sakaguchi und Asano. Sie zeigten, dass ca. 5-10 % der CD4<sup>+</sup>-T-Zell-Population zusätzlich die IL-2-Rezeptor- $\alpha$ -Kette exprimieren und bei der Kontrolle autoreaktiver T Zellen eine entscheidende Rolle spielen (Sakaguchi et al., 1995; Asano et al., 1996). Diese suppressiven/ inhibitorischen CD4<sup>+</sup>T Zellen (auch als regulatorische T Zellen bezeichnet, kurz Treg) wurden zunächst nur in der Maus

beschrieben; später auch in der Ratte (Stephens et al., 2000) und letztendlich im Menschen (Jonuleit et al., 2001; Ng et al., 2001).

CD4<sup>+</sup> T regulatorische Zellen können grob in zwei Untergruppen aufgeteilt werden - die natürlichen und die induzierten (Jonuleit et al., 2003; Fallarino et al., 2003). Diese Unterteilung basiert einerseits auf der Herkunft, andererseits auf ihren verschiedenen suppressiven Wirkmechanismen.

### Abbildung 5: Entwicklung der beiden Treg-Gruppen

(entnommen und erweitert aus Jonuleit et al., 2003)



Die natürlichen Treg Zellen (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>) werden als Thymusabkömmlinge beschrieben (Itho et al., 1999), wobei in jüngster Zeit auch ein extrathymischer Weg - abgeleitet aus CD25<sup>-</sup>CD4<sup>+</sup> T Zellen - gefunden wurde (Karim et al., 2004). Natürliche Treg werden eher mit dem Patrouillieren im Körper und dem damit verbundenen Auffinden autoreaktiver T Zellen in Verbindung gebracht; also ein Eingreifen bei eher nicht-entzündlichen Vorgängen. Sie verhindern somit aktiv die Induktion spezifischer Autoimmunkrankheiten. Zur Ausübung ihrer suppressiven Funktion benötigen sie einen direkten Zell-Zell-Kontakt (Jonuleit et al., 2003; Fallarino et al., 2003).

Die induzierten bzw. abgeleiteten regulatorischen CD4<sup>+</sup> T Zellen (mit eher niedriger Expression von CD25) werden in der Literatur als von den natürlichen Treg Zellen (Fallarino et al., 2003) oder von konventionellen CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T Zellen (Jonuleit et al.,

2003) abgeleitete Gruppe beschrieben. Bekannt geworden sind sie auch unter den Bezeichnungen Th3 und Tr1 (Weiner et al., 2001 [I und II]; Roncarolo et al., 2001; Kemper et al., 2003; Jonuleit et al., 2003). Sie üben ihre regulatorische Funktion meist in einem inflammatorischen Milieu unabhängig von Zell-Zell-Kontakten über Zytokine, wie z.Bsp. IL-10 und TGF $\beta$ , aus.

Beide Subpopulationen sollten jedoch nicht völlig voneinander getrennt betrachtet werden. So konnte in einer Reihe von Versuchen zu autoimmunen Erkrankungen sowie mit immundefizienten Mäusen gezeigt werden, dass ein Zusammenwirken beider Gruppen oft zu beobachten ist, z.Bsp. beim Fehlen einer regulatorischen Funktion von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T Zellen in IL-10 defizienten Mäusen (Annacker et al., 2001). Ein Zusammenhang beider Populationen spiegelt sich auch bei der Induktion von Th3 und Tr1 Zellen durch CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T Zellen wieder (Dieckmann et al., 2002).

Ein Hauptweg der suppressiven Funktion von natürlichen Treg Zellen wird in der Verhinderung der IL-2 Transkription in verschiedenen T-Zell-Populationen gesehen, welche an einer Immunantwort beteiligt sind. (Thornton and Shevach, 1998). Dies kann durch exogene Gaben von IL-2 oder auch IL-15 wieder umgekehrt werden (Jonuleit et al., 2001; Dieckmann et al., 2002). CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T Zellen besitzen selbst nicht die Fähigkeit, IL-2 zu produzieren, obwohl sie es für ihre Entwicklung und ein Überleben in der Peripherie benötigen. Somit erklärt sich im gewissen Sinne die funktionelle Bedeutung der Expression von IL-2R- $\alpha$ -Kette (CD25), wodurch diese Zellen auch in einer gewissen Abhängigkeit zu anderen aktivierten T Zellen stehen (Papiernik et al., 1998; Jonuleit et al., 2001; zusammengefasst in Shevach, 2002).

Weitere Annahmen über die Funktionsweise regulatorischer T Zellen basieren auf der Expression verschiedener Moleküle. Diese sind jedoch nach wie vor kontrovers. So exprimieren CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T Zellen konstitutiv CTLA-4. Dies könnte ein Anhaltspunkt für inhibitorische Funktionen sein, aber auch auf anderer Seite lediglich einen aktivierten Zustand einer regulatorischen Zelle widerspiegeln (Takahashi et al., 2000; Levings et al., 2001). In jüngster Vergangenheit konnte aber auch gezeigt werden, dass CTLA-4-Expression speziell auf natürlichen Treg Zellen eine Rolle bei der durch Kynurenin induzierten Apoptose in T Zellen spielt (Grohmann et al., 2002; Fallarino et al., 2003).

Genau so offen bleiben die Angaben über die Bedeutung weiterer, von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T Zellen exprimierter Moleküle, wie Ox40 (CD134), L-Selektin (CD62L), LAP (latency-

associated peptide) oder membran gebundener TGF $\beta$  (Jonuleit et al., 2003; Bach, 2003; Nakamura et al., 2004). Besonders letztere wurde immer wieder in Zusammenhang mit suppressiven Wirkmechanismen von natürlichen Treg Zellen gebracht, nicht zuletzt dadurch, dass hier eine enge Verbindung zu den TGF $\beta$  produzierenden Th3 regulatorischen Zellen gesehen wird. So gibt es einige Beweise, dass TGF $\beta$  eine entscheidende Rolle für die suppressive Funktion CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T Zellen spielt (Nakamura et al., 2001; Nakamura et al., 2004). Dem gegenüber stehen jedoch Versuche in TGF $\beta$  defizienten Mäusen, bei denen gezeigt werden konnte, dass Wildtyp CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T Zellen suppressiv auf CD25<sup>-</sup> Zellen jener Mäuse wirken, obwohl sie nicht auf ein TGF $\beta$  Signal antworten können (exprimierten einen dominant neg. TGF $\beta$ -Rezeptor; Piccirillo et al., 2002).

Auch die Beteiligung Antigen präsentierender Zellen (APZ) an regulatorischen Immunreaktionen ist Gegenstand zahlreicher Untersuchungen. So soll die Hochregulierung von kostimulatorischen Molekülen auf APZ durch natürliche Tregs verhindert werden (Cederborn et al., 2000). Jedoch gibt es Beweise dafür, dass die Expression dieser Moleküle auch in Anwesenheit von Suppressor-T-Zellen geschieht (Thornton and Shevach, 2000). Es könnte vielmehr statt einer Veränderung der Funktion von APZ durch Tregs, ein Konkurrieren um kostimulatorische Signale und Zytokine vorliegen (zusammengefasst in Shevach, 2002). So bleibt die Rolle der APZ ebenfalls noch umstritten, und es kann vielleicht als Schlussfolgerung gelten, dass APZ nicht zwingend notwendig sind, um suppressive Signale auszusenden. Damit wird jedoch nicht ihre Funktion als Art „Bühne“ für Tregs ausgeschlossen, von welcher aus regulatorische Zellen agieren ( Shevach, 2002).

Besser gesichert ist jedoch, dass CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T Zellen eine Aktivierung über ihren TZR benötigen, um ihre Funktion ausüben zu können. Einmal aktiviert, sind keine weiteren Stimulationen notwendig. Außerdem arbeiten sie dann auch Antigen-unspezifisch (Thornton and Shevach, 2000).

Bei den induzierten bzw. abgeleiteten T regulatorischen Zellen spielen die immun-suppressiven Zytokine IL-10 und TGF $\beta$  eine entscheidende Rolle. CD25 wird nur wenig oder gar nicht exprimiert (Fallarino et al., 2003). Da sie von Zellen aus der Peripherie abgeleitet werden, sind sie auch häufig als sekundäre Tregs in der Literatur zu finden.

Tr1 - Typ 1 regulatorische T Zellen - produzieren eine große Menge an IL-10

(Roncarolo et al., 2001). Sie besitzen die Fähigkeit, Th1- bzw. Th2-gesteuerte Immunantworten gegen allogene Antigene und verschiedene Pathogene zu inhibieren. Jene funktionellen Eigenschaften scheinen eng mit der IL-10 Produktion verbunden zu sein, da sie bei einer zusätzlichen Gabe von blockierenden Antikörpern gegen IL-10 ausbleiben (Groux et al., 1997; Levings et al., 2000).

Th3 Zellen produzieren in einem größeren Umfang TGF $\beta$ . Sie wurden im Rahmen von Immunisierungsversuchen bei Mäusen mit MBP ("myelin basic protein") entdeckt. (Chen et al., 1994; zusammengefasst in Jonuleit and Schmitt, 2003). Neben der suppressiven Eigenschaft von Th3 Zellen wird vermutet, dass sie eine weitaus größere Rolle in der Immunregulation sowie der T-Zell-Homeostase spielen, da TGF $\beta$  im Organismus weitverbreitet ist und dadurch generell bei verschiedenen Aktivitäten mancher Zelltypen beteiligt ist (Jonuleit and Schmitt, 2003).

Bleibt zum Ende des Abschnittes über Treg Zellen noch zu bemerken, dass sich eine Vielfalt von Subpopulationen von regulatorischen T Zellen unter den beiden, hier grob vorgestellten, Gruppen verbirgt. Gegensätzliche Ergebnisse sowie eine Vielzahl von noch nicht bestätigten Hypothesen erschweren es zur Zeit noch, sie in die Physiologie der Immunantworten richtig einzuordnen. Das Bestreben, hier weiter voranzukommen und tiefere Einblicke zu erhalten, wird nicht zuletzt durch die Möglichkeit auf eine wichtige therapeutische Bedeutung von Treg Zellen, z.Bsp. als attraktive Strategie bei Transplantationen, angetrieben (Bach, 2003; Wood and Sakaguchi, 2003).



## 1.9. T-Zell-Lymphopenie und Regeneration eines peripheren T-Zell-Kompartiments

Aufrechterhaltung des T-Zell-Kompartiments ist entscheidend für humorale aber auch zellvermittelte Immunantworten. Dies wird besonders deutlich, wenn durch eine dramatische Reduzierung der T-Zell-Population opportunistische Keime zu einer Lebensbedrohung werden. Solch eine Situation ist meist bei fortgeschrittener HIV-Infektion zu beobachten, als Konsequenz einer intensiven Chemotherapie bei Krebserkrankungen oder bei einer Therapie gegen Autoimmunkrankheiten, welche auf einer mittels Antikörpergabe ausgelösten T-Zell-Depletion basiert (Mackall et al., 1994; Jendro et al., 1995; Mackall, 1999; Stahnke et al., 2001).

Die Wiederherstellung der ursprünglichen T-Zellzahl nach einer T-Zell-zerstörenden Therapie gestaltet sich mit zunehmendem Alter auf Grund einsetzender Thymusatrophie immer schwieriger (Mackall and Grees, 1997). Bei älteren Patienten sind periphere T Zellen die Hauptquelle einer Regeneration, welche dadurch oft verzögert abläuft und auch nicht zur kompletten Erholung des T-Zell-Kompartiments führt - ein Nährboden für opportunistische Keime entsteht.

In der Vergangenheit gab es eine Vielzahl von Ansätzen, die Regeneration der T-Zell-Population zu verbessern, mit dem Ziel, lebensbedrohliche Infektionen zu verhindern. So zum Beispiel der adaptive Transfer von Effektor-T-Zellen bei der Behandlung von Viruserkrankungen (Riddell and Greenberg, 1995 und 1997; Yee et al., 2002) oder polyklonale Aktivierung von Blutlymphozyten mit antiCD3-mAk und antiCD28-mAk *in vitro* für eine spätere Reinfusion (Levine et al., 1997; Garlie et al., 1999; Laport et al., 2003). Trotz zu verzeichnender Erfolge bleiben Probleme bestehen, wie zum Beispiel eine eingeschränkte Immunität bei einem adaptiven Zelltransfer. Außerdem sind die erwähnten Methoden zur Rekonstitution auf Grund der erforderlichen Zellkulturen unter GMP-Bedingungen sehr aufwendig und mit sehr hohen Kosten verbunden - dies sind behindernde Gründe, die aufgezählten Vorgehensweisen als Standardtherapien zu etablieren.

Um tiefere Einblicke in die Thematik T-Zell-Depletion und -Regeneration zu erhalten, wurde eine Reihe von Tiermodellen entwickelt. Dabei wird die Reduzierung der T Zellen im Organismus mit einer Ganzkörperbestrahlung und anschließender syngener Knochenmarkspende simuliert. Im weiteren können dann zwei Wege der

Regeneration des peripheren T-Zell-Kompartiments verfolgt werden: der thymusabhängige (entspricht Kinder- und Jugendalter) und der thymusunabhängige (entspricht Erwachsenenalter) (Mackall et al., 1997).

Bei einer thymusabhängigen Regenerierung bilden sich neue T Zellen aus T-Vorläuferzellen des transplantierten Knochenmarkes über *de novo* Differenzierung im Thymus. Es wurde dabei beobachtet, dass das T-Zell-Repertoire in rekonstituierten Mäusen drei Monate nach erfolgtem Knochenmarktransfer dem in naiven Tieren entspricht (Mackall et al., 1997).

Der zweite, thymusunabhängige Weg der Regeneration einer T-Zell-Population stützt sich auf die Expansion reifer T Zellen in der Peripherie bzw. zu einem geringen Prozentsatz auch auf die Entwicklung von T-Vorläuferzellen über einen extrathymischen Weg. Meist ist hier die Vielfalt der verschiedenen TZR-Anordnungen limitiert in dem Maße, wie es durch die reife Ausgangspopulation vorgegeben ist (Drayson et al., 1989; Mackall et al., 1996).

Eine Gabe eines kleinen Inokulums reifer T Zellen in einen immundefizienten Empfänger resultiert in einer raschen T-Zell-Proliferation (Miller et al., 1984; Bell et al., 1987; Pereira and Rocha, 1991). Dies erbrachte auch den Beweis, dass eine gewisse homeostatische Kontrolle über die Größe des peripheren T-Zell-Kompartiments besteht.

Bis heute ist jedoch nicht eindeutig geklärt, welche Mechanismen an dieser "spontanen" Expansion peripherer T Zellen beteiligt sind. So gibt es Hinweise darauf, dass naive T Zellen bei reduzierter T-Zellzahl in der Peripherie über „Selbst“Peptid:MHC-Komplexe zur Proliferation stimuliert werden (Ernst et al., 1999; Muranski et al., 2000). Andere Gruppen zweifeln jedoch daran, hier den einzigen Grund der enormen peripheren Expansion in einem lymphopenischen Umfeld zu sehen (Clark et al., 2000; Dorfman et al., 2000; Tan et al., 2001). Es wird in jüngster Zeit davon ausgegangen, dass nicht nur ein einzelner Faktor, sondern mehrere Signale zu diesem Phänomen beitragen. Zum Beispiel könnten in einer kompletten T-Zell-Population Signale vorliegen, die eine weitere Proliferation verhindern, jedoch bei einer Reduzierung des T-Zell-Kompartiments entfallen - somit keine inhibitorische Wirkung mehr auf die Expansion nehmen (Clark et al., 2000). Mit Sicherheit spielen auch eine Reihe von proliferationsfördernden Zytokinen eine Rolle, wie am Beispiel von IL-7 gezeigt werden konnte (Tan et al., 2001). Nicht zu vergessen sei der Kontakt zu „Fremd“-Antigenen, welcher ebenfalls Auslöser einer Expansion sein kann. Da diese Antigen-

getriebene T-Zell-Proliferation schneller verläuft als die spontane, "homeostatische", kommt es durch Antigenkontakt während der Erholungsphase zu einer Verzerrung des T-Zell-Repertoires zugunsten der Antigen-spezifischen Klone (Tanchot et al., 1997).

Auch die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Rekonstitution eines T-Zell-Kompartiments in einem lymphopenischen Umfeld. Hier wurde jedoch versucht, eine rasche und gleichmäßige Expansion eines kleinen Inokulums reifer T Zellen durch die gleichzeitige Behandlung mit einem superagonistischen, CD28-spezifischen mAk zu erreichen.

### **1.10. Aufgabengebiet der vorliegenden Arbeit**

Bei experimentellen Arbeiten zur Stimulation von Rezeptoren auf T Zellen werden häufig anstelle der natürlichen Liganden monoklonale Antikörper eingesetzt, so z.Bsp. anti-TZR, anti-CD3, anti-CD28 etc.

Bei der Entwicklung CD28-spezifischer mAk für die Ratte in der Arbeitsgruppe um Professor Hünig wurden zusätzlich neben konventionellen, welche nur bei gleichzeitiger TZR-Ligation kostimulieren, auch "superagonistische" mAk isoliert (Tacke et al., 1997). Die Besonderheit dieser Antikörper liegt in ihrer Fähigkeit, massive Proliferation von T Zellen zu induzieren ohne eine zusätzliche TZR-Besetzung. Es konnte gezeigt werden, dass CD28-Superagonist nicht wie konventionelle anti-CD28 mAk an ein Epitop naheliegend der Bindungsstelle der natürlichen Liganden CD80/86 bindet, sondern die C'D-Schleife der Ig-ähnlichen Domäne von CD28 als Bindungsstelle benutzt (Lühder et al., 2003). Desweiteren ergaben biochemische Analysen, dass Signale des CD28-Superagonisten direkt NF<sub>κ</sub>B ohne Induktion der Phosphorylierung von ZAP-70 und TZR $\zeta$  aktiviert, intermediäre Substrate des TZR-Signalweges (Bischof et al., 2000; Lühder et al., 2003). Die darauf folgende Charakterisierung der Qualität, der durch die neuen antiCD28-mAk induzierten Immunantwort, ergab einen, u.a. durch die Induktion des Transkriptionsfaktors GATA-3, zum Th2-Typ favorisierten Aktivierungsweg (Rodríguez-Palmero et al., 1999).

Mit Hilfe der neuen CD28-Superagonisten wurde es auch möglich, ein stark depletiertes Immunsystem *in vivo* aus einem kleinen Inokulum einer Population residualer, reifer T Zellen wieder aufzubauen.

Der CD28-Superagonist bildet auch den Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit. Nachdem seine Effektivität für die *in vivo*-Expansion von T Zellen, sowie die Induktion anti-inflammatorischer Zytokine bestätigt wurde, war es Gegenstand dieser Arbeit, anhand verschiedener immunadjuvanter Protokolle die Funktionalität der durch superagonistischen antiCD28-mAk expandierten T Zellen in naiven und T-lymphopenischen Ratten zu untersuchen. Um die verschiedenen Möglichkeiten zur Generierung einer Immunabwehr abzudecken, kamen verschiedene Modellinfektionen bzw. -immunisierungen zur Anwendung:

- die Immunisierung mit dem Modellantigen KLH zur Untersuchung des Aufbaus einer humoralen Immunantwort sowie einer CD4 "Recall"-Antwort
- eine Hauttransplantation zur Untersuchung der zellvermittelten Antwort nach T-Zell-Expansion mittels Superagonist
- Infektion mit *Listeria monocytogenes* als Modell einer induzierten Th1-Antwort
- Infektion mit *Nippostrongylus brasiliensis* als Modell einer induzierten Th2-Antwort

In jüngster Zeit wurde zusätzlich beobachtet, dass CD28-Superagonist ebenfalls die Proliferation von Treg Zellen fördert, wobei jedoch für die letztendliche Ausübung ihrer suppressiven Effektorfunktion wiederum ein TZR vermitteltes Signal notwendig ist (Lin and Hünig, 2003; Thornton and Shevach, 2000). Im Rahmen dieser neuen Erkenntnisse wurden in der vorliegenden Arbeit schon einige Versuche zu der Thematik der Reduzierung immunpathologischer Begleiterscheinungen von Infektionen (zum Beispiel Granulombildungen) mittels einer gezielten Stärkung von Treg Zellen mittels Superagonisten einbezogen.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Material

#### 2.1.1. Verwendete Antikörper

Verwendete Ratten-spezifische monoklonale Antikörper und ihre Referenzen sind in folgender Tabelle aufgelistet:

Name des mAk	Spezifität	Referenz
JJ316	CD28	Tacke et al., 1997
JJ319	CD28	Tacke et al., 1995
Ox-52	Pan T Zellen (95-120kDa Antigen)	Robinson et al., 1986
R73	TZR $\alpha\beta$	Hünig et al., 1989
W3/25	CD4	Jefferies et al., 1985
Ox-35	CD4	Jefferies et al., 1985
Ox-38	CD4	Jefferies et al., 1985
3.4.1.	CD8 $\beta$ -Kette	Torres-Nagel et al., 1992
Ox-8	CD8 $\alpha$ -Kette	Brideau et al., 1980
Ox-39	CD25	Paterson et al., 1987
Ox-22	CD45RC	Spickett et al., 1983
His-41	RT7 <sup>b</sup>	Kampinga et al., 1990
V65	TZR $\gamma\delta$	Kühnlein et al., 1994
10\78	NKR-P1A	Chambers et al., 1989
Ox-33	CD45RA	Woollett et al., 1985
Ox-42	CD11b/c	Robinson et al., 1986
WKH 203	CTLA-4	Lin et al., 2003
A 93-2	IgA	BD PharMingen, nicht veröffentlicht
B 41-1	IgE	BD PharMingen, nicht veröffentlicht

Name des mAk	Spezifität	Referenz
RG 11/39.4	IgG1	BD PharMingen, nicht veröffentlicht
RG 7/1.30	IgG2a	BD PharMingen, nicht veröffentlicht
RG 7/11.1	IgG2b	BD PharMingen, nicht veröffentlicht
G 53-238	IgM	BD PharMingen, nicht veröffentlicht

**Fötales Kalberserum** (fetal calf serum) - FCS

**MOPC-31C** = Maus IgG1, $\kappa$  (Ono et al. 1977)

(Isotyp-Kontrolle)

**L 180** = Maus anti-Schaf Antikörper

(erkennt Schafserythrozyten)

**Normal mouse Immunoglobulins** - NMlg

**Sheep anti-mouse immunoglobulins** - ShaMlg

**Phycoerythrin (PE) conjugated donkey**

**anti-mouse**, (Fab')<sub>2</sub> Fragment - DaM-PE

**Goat anti-rat IgG** (H+L)

(Biotin-SP-konjugiert)

Gibco/BRL, Eggenstein

BD PharMingen, Heidelberg

BD PharMingen, Heidelberg

Sigma, Deisenhofen

Dianova, Hamburg

Dianova, Hamburg

## 2.1.2. Versuchstiere

**Lewis-Ratte**

**PVG-Ratte** (Ola HSD, RT7<sup>a</sup>)

**RT7<sup>b</sup> kongene PVG-Ratte**

hauseigene Zucht

Harlan Winkelmann, Borchten

hauseigene Zucht

Harlan Winkelmann, Borchten

hauseigene Zucht

### 2.1.3. Lösungsansätze, Puffer und Kulturmedien

Assay Diluent	PBS + 10%FCS pH = 7,0
BHI-Kulturplatten	37g BHI 15g Agar Agar auf 1 l destilliertes Wasser
BSS - balanced salt solution	1 Vol. BSS I (10x) 1 Vol. BSS II (10x) 8 Vol. destilliertes Wasser
BSS I	10,0 g Glucose 0,6 g $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 2,3 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 0,1 g Redphenol auf 1 l destilliertes Wasser
BSS II	1,86 g $\text{CaCl}_2$ 4,0 g KCl 80,0 g NaCl 2,0 g $\text{MgCl}_2$ auf 1 l destilliertes Wasser
BSS/BSA	0,2% BSA in BSS
Blocking-Puffer	5% BSA in PBS
Carnoy'sche Lösung	120 ml 100%iger Ethanol

	60 ml Chloroform 20 ml Eisessig
Coating-Puffer I (IFN $\gamma$ und IL-4 ELISA)	8,4 g NaHCO <sub>3</sub> 3,56g Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> auf 1l destilliertes Wasser pH 9,5
Coating-Puffer II (IL-10 ELISA)	11,8 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 16,1 g NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> auf 1l destilliertes Wasser pH 6,5
Coating-Puffer III (IL-2 und IL-13 ELISA)	4,3 g NaHCO <sub>3</sub> 5,3 g Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> auf 1l destilliertes Wasser pH 9,4
Diethanolamin-Puffer	1 M Diethanolamin 0,5 mM MgCl <sub>2</sub> pH 9,5
Eosin 1%ig	10 g Eosin in 1l 70%igem Ethanol lösen (vor Gebrauch gut schütteln und filtrieren + 3 Tropfen 100%iger Essigsäure)
gesättigte Kochsalzlösung	ca. 350 g NaCl auf 1l destilliertes Wasser



Hämalaun nach Mayer	<p>1 g Hämatoxylin          0,2g Natriumjodat          50 g Kaliumaluminiumsulfat          50 g Chloralhydrat          1 g Zitronensäure          auf 1l destilliertes          Wasser</p>
Facs-Puffer	PBS/0,1%BSA/0,01%Na-azid
PBS <sup>-</sup>	<p>8,0 g NaCl          1,15g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>          0,2 g KCl          0,2 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>          auf 1l destilliertes          Wasser          pH 7,4</p>
PBS	<p>8,0 g NaCl          1,15g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>          0,2 g KCl          0,2 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>          0,17g CaCl<sub>2</sub>          0,1 g MgCl<sub>2</sub>          auf 1l destilliertes          Wasser          pH 7,4</p>
PBS/Tween 20	0,05% Tween 20 in PBS
Perjodsäure für PAS	<p>2,7g Perjodsäure          in 100ml destilliertes          Wasser</p>
Poly-L zum Beschichten	500mg Poly-L-Lysin-Hydrobromid

	(Stocklösung) in 100ml 1M Tris pH = 8,0
RPMI <sup>+</sup>	5 ml FCS 1 ml Na-Pyruvat 1 ml nicht-essentielle AS 1 ml Penicillin- Streptomycin 1 ml 5mM2-Mercaptoethanol 29,2 mg Glutamin 500 ml RPMI-1640
Schiff'sche Reagenz	5g Pararosanilin in 150 ml 1N HCl + 5g Kaliummetabisulfit in 850 ml destilliertes Wasser
Schwefelwasser	10 ml Kaliummetabisulfit (10%ig) 10ml 1N HCl auf 100 ml destilliertes Wasser
TAC-Puffer	20 mM TRIS 0,83% NH <sub>4</sub> Cl pH 7,2
Trypanblau-Lösung	0,04% Trypanblau in Facs-Puffer
Waschpuffer für Elisas	0,05% Tween-20 in PBS

### 2.1.4. Reagenzien

Agar-Agar	Roth, Karlsruhe
Aktivkohle	E. Merck, Darmstadt
Aluminium-Kaliumsulfat (Alaun)	Roth, Karlsruhe
BHI (brain-heart-infusion)	Pharmingen, Heidelberg
BSA	Roth, Karlsruhe
CaCl <sub>2</sub>	Roth, Karlsruhe
CFSE (carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester)	MoBiTec, Göttingen
Chloralhydrat	E. Merck, Darmstadt
Chloroform	Baker, Darmstadt
Citric acid	Serva, Heidelberg
Concanavalin A (ConA)	Sigma, Deisenhofen
Diethanolamin	Sigma, Deisenhofen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth, Karlsruhe
Eosin	Roth, Karlsruhe
Essigsäure 100%	Roth, Karlsruhe
Ethanol	E. Merck, Darmstadt
Formaldehyd	Ferak, Berlin
Glycerin	Applichem, Darmstadt
Hämatoxylin	Sigma, Deisenhofen
HCl	Roth, Karlsruhe
<sup>3</sup> H-Thymidin	Amersham, Braunschweig
Isofluran	
Kaliumaluminiumsulfat	E. Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid	Roth, Karlsruhe
Kaliummetabisulfit (=Kaliumdisulfit)	E. Merck, Darmstadt
KLH (Hämocyanin der Napfschnecke <i>Megathura crenulata</i> )	Sigma, Deisenhofen
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Roth, Karlsruhe
L(+)-Glutamin	Roth, Karlsruhe
MgCl <sub>2</sub>	Roth, Karlsruhe
Methoxyfluran (Metofane)	Janssen, Neuss
Natriumazid	Ferak, Berlin

Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Ferak, Berlin
NaCl	Ferak, Berlin
NaHCO <sub>3</sub>	Ferak, Berlin
NaHNO <sub>3</sub>	Ferak, Berlin
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Roth, Karlsruhe
Natriumjodat	Fluka, Buchs/ Schweiz
NaOH	Ferak, Berlin
NH <sub>4</sub> Cl	Ferak, Berlin
NES (Nippostrongylus exkretorisches-sekretores Protein)	freundliche Gabe von Dr. Klaus Erb, Würzburg
4-Nitrophenylphosphat (pNPP)	Sigma, Deisenhofen
nicht-essentielle Aminosäuren (non-essential aminoacids - aa)	Gibco/BRL, Eggenstein
Nylonwolle	Fenwal Laboratories, Deerfield, IL, USA
p60-Protein	freundliche Gabe von Prof. Dr. Göbel, Würzburg
Pararosanilin	Sigma, Deisenhofen
Penicillin-Streptomycin	Gibco/BRL, Eggenstein
Perjodsäure	E. Merck, Darmstadt
Poly-L-Lysin-Hydrobromid	Sigma, Deisenhofen
Redphenol	Sigma, Deisenhofen
RPMI-1640 Medium	Gibco/BRL, Eggenstein
Saponin	Sigma, Deisenhofen
Scintillationsflüssigkeit	Pharmacia, Freiburg
Streptavidin-AKP	Pharmingen, Heidelberg
Streptavidine-Cy-Chrome <sup>R</sup>	Pharmingen, Heidelberg
TiterMax <sup>R</sup> (Bennett et al. 1992)	Alexis, Grünberg/Deutschland
Tetramethylbenzidin (TMB)	Pharmingen, Heidelberg
Tris-(hydroxymethyl)-amoniummethan (TRIS)	Ferak, Berlin
Trypanblau	Sigma, Deisenhofen
Tween-20 (Polyoxyethylen sorbitan mono)	Sigma, Deisenhofen
Vitro-Clud	Langenbrinck, Teningen
Xylol	Fisher Chemicals, Zürich/ Schweiz

### 2.1.5. Bakterien

*Listeria monocytogenes* EGD-Stamm SV1/2A  
(Wildtyp)

freundlicherweise von  
Prof. Göbel  
zur Verfügung gestellt

### 2.1.6. Nematoden

*Nippostrongylus brasiliensis*

freundlicherweise von  
Dr. Erb  
zur Verfügung gestellt

### 2.1.7. Geräte/ Ausstattung

Douncer

Elisa-Reader

Falcon<sup>®</sup> 96-Napf-Platten

Flowcytometer FACScalibur

Flowcytometer FACScan

Liquid scintillation counter (Betaplate<sup>™</sup>) und Harvester

Magnetic-activated cell sorter (MACS<sup>™</sup>)  
und LS bzw LD-Säulen

McMaster Wurmeierzählkammer

Neubauerzählkammer

Objektträger „Superfrost“

Schlittenmikrotom (manuell)

Zentrifugen

Noras, Würzburg

Tecan, Crailsheim

Becton Dickinson,  
Heidelberg

Becton Dickinson,  
Heidelberg

Becton Dickinson,  
Heidelberg

Wallac Oy, Turku,  
Finland

Miltenyi Biotec,

Bergisch Gladbach

Hawskley Technology,  
London/ UK

Hartenstein, Würzburg

Roth, Karlsruhe

bereitgestellt von der  
Neurologischen Klinik  
in Würzburg

Heraeus, Hanau

### 2.1.8. Standards und Kits

OptEIA™ Rat IFNg Set	BD PharMingen, Heidelberg
OptEIA™ Rat IL-4 Set	BD PharMingen, Heidelberg
OptEIA™ Rat IL-10 Set	BD PharMingen, Heidelberg
rat IgE, $\kappa$	Serotec, Düsseldorf
rat IgG1, $\kappa$ (R3-34)	BD PharMingen, Heidelberg
rat IgG2a, $\kappa$ (A110-2)	BD PharMingen, Heidelberg
rat IgG2b, $\kappa$ (R35-38)	BD PharMingen, Heidelberg
rat IgM, $\kappa$ (G42-5.1)	BD PharMingen, Heidelberg
Rat T Cell Recovery Column Kit (normal an high capacity)	Cederlane, Ontario/Canada

## 2.2. Methoden

### 2.2.1. Versuche mit ATXBM-Ratten

#### 2.2.1.1. Bestrahlung und Zelltransfer - Die ATXBM-Ratte bzw. Herstellung von Chimären (ATXBM = adult, thymektomiert, bestrahlt und Knochenmark rekonstituiert)

Dieses Protokoll wurde im Laufe der Zeit mehrfach verbessert.

In den ersten Versuchen mit Chimären in dieser Arbeit wurden zunächst (bereits thymektomiert von Harlan Winkelmann bezogene) PVG-Ratten am ganzen Körper mit 10 Gy/ $\frac{1}{2}$ h von einer  $^{137}\text{Cs}$ -Quelle bestrahlt. Durch die Wahl einer so hohen Dosis war eine Eliminierung aller hämatopoetischen und davon abstammenden, peripheren Zellen in den primären und sekundären lymphoiden Organen sicher. Ohne Rekonstitution mit Spenderzellen sterben die Tiere innerhalb von ungefähr 8-10 Tagen. Die Tiere erhielten noch am selben Tag der Bestrahlung  $5 \times 10^7$  syngene Knochenmarkzellen und  $5 \times 10^6$  kongene periphere T Lymphozyten, aufgereinigt aus Lymphknoten. Die Zellen wurden in BSS resuspendiert und intravenös verabreicht. Des weiteren stellte sich heraus, dass es sich für eine spätere Immunisierung als ungünstig erwies, B- und T-Zell-Rekonstitution an einem Tag durchzuführen, da ein reifes B-Zell-Kompartiment zur Herstellung von Immunglobulinen fehlte. Somit wurden die B- und T-Zell-Gaben zeitlich getrennt. Die Tiere erhielten am Tag der Bestrahlung nur syngene Knochenmarkzellen und drei Wochen später erfolgte die Gabe der peripheren, aufgereinigten, kongenen T Zellen.

Ein weiteres Problem stellten die immer wieder, zum Teil auch in größerer Zahl auftretenden syngenen T Zellen dar. Da die Versuche darauf ausgerichtet waren, die Expansion peripherer T Zellen zu untersuchen, aber bei syngenen T Zellen der genaue Ursprung nicht geklärt werden konnte (extrathymischer Weg versus unvollständige Thymektomie), sollten diese Zellen weitestgehend depletiert werden. Daher wurden in den letzteren Versuchen beim Knochenmark-Transfer vor der Injektion mit Hilfe einer MACS-Säule die T Zellen entfernt. Dies konnte meist bis zu einer Reinheit von 99,2% erreicht werden.

Bei den, trotz zuvor beschriebener Prozedur, vereinzelt auftretenden Tiere mit hohen Zahlen an syngenen T Zellen wird die Ursache in einer unvollständigen Thymektomie vermutet.

### **2.2.1.2. Antikörpergabe *in vivo***

Die Ratten erhielten konventionellen oder mitogenen anti-rat-CD28 mAk (vom Isotyp IgG1) zunächst in einer Konzentration von 1mg/Tier in 1ml PBS. Für spätere Versuche wurde auch (besonders bei den Infektionsversuchen) eine Konzentration von 0,1mg/Tier verabreicht. Die Injektion erfolgte intravenös in die Schwanzvene. Für Kontrollratten wurden Isotyp-identische Antikörper irrelevanter Spezifität verwendet (mouse anti-human CD7, IgG1; MOPC-31C). Die Injektion erfolgte ebenfalls intravenös.

### **2.2.1.3. Hauttransplantationen**

Die Hauttransplantationen erfolgten unter der Mithilfe von Dr. Christoph Otto in der Chirurgischen Universitätsklinik in Würzburg. ATXBM-PVG-Ratten vom MHC-Haplotyp RT1<sup>c</sup> erhielten ein allogenes Hauttransplantat von einer LEW- Ratte (Haplotyp RT1<sup>d</sup>) und als Kontrolle ein syngenes Hauttransplantat. Zunächst wurden die Ratten mit Isofluran narkotisiert und mittels einer Atemmaske (angeschlossen an eine Betäubungsanlage) während der Transplantation unter Narkose belassen. Verlief die Atmung ruhig und stabil, wurden die Tiere im Brustbereich rasiert und mit dem Entfernen von zwei Hautlappen im Brustbereich vorsichtig begonnen. Über eine subkutane Injektion von PBS konnte die Haut angehoben werden. Dies erleichterte die Entfernung und gleichzeitig konnte somit ein Verletzen anderer, unter der Haut befindlicher Gewebe minimiert werden. Danach wurden die Hautlappen der Spendertiere an die freigelegten Bereiche des Empfängers angepasst und mittels Knopfnahnt eingenäht. Dabei wurde das Spendergewebe in umgekehrter Richtung eingepflanzt, um zu gewährleisten, dass auch bei einem sehr guten Verwachsen des Transplantates mit dem Empfängergewebe, ein Wiedererkennen auf Grund der in die entgegengesetzte Richtung wachsenden Haare, möglich ist.

Alle 3 Tage wurden von den 12 behandelten Tieren jeweils 6 (3 Kontrollen/ 3 mit mitogenem Antikörper behandelte) begutachtet, ob sie das allogene Transplantat abgestoßen oder akzeptiert hatten.

### **2.2.1.4. KLH-Immunisierung**

Bei den ersten Versuchen wurde nach dem Protokoll von Marta Rodríguez-Palermo vorgegangen. Dafür erfolgte zunächst die Herstellung der KLH/Alaun-Suspension, wofür 0,2ml/Ratte von 10%igem Alaun mit 0,06ml/Ratte KLH-Stammlösung (4mg/ml) vermischt wurden. 0,25%ige NaOH wurde tröpfchenweise zugeführt bis ein Ausfallen des KLH/Alaun-Komplexes sichtbar war. Das entsprach in etwa 0,5ml/Ratte 0,25%ige



NaOH). Danach kam die Suspension für 30min auf Eis, um eine optimale Präzipitation zu erreichen. Es folgten drei Waschschrte mit PBS, bevor der Komplex in 1ml/Ratte PBS resuspendiert und mit  $5 \times 10^{10}$  *Bortetella pertussis* (inaktivierte Bakterien)/Ratte vermischt wurde (Insgesamt entsprach dies einer Menge von 240 $\mu$ g an verabreichten KLH pro Ratte.).

Die Injektion erfolgte i.p. Das Inokulum betrug 1ml/Ratte von der zuvor hergestellten Suspension.

Weitere Versuche hatten eine Verbesserung bei der Aufbereitung des Antigens zum Ziel. Als sehr erfolgsversprechend hat sich hier das von Alexis hergestellte Titermax<sup>R</sup> erwiesen, das als Adjuvans Ähnlichkeiten mit dem Freund'schen Adjuvans zeigt, doch bei weitem nicht so toxisch ist. Die vom Herstellerge lieferte Titermax<sup>R</sup> Lösung musste im Verhältnis 1:1 mit der Antigenlösung (KLH in PBS) vermischt werden bis sich eine weiße creme-artige Suspension gebildet hatte. Diese wurde dann injiziert. Ein weiterer Vorteil bei dieser Art der Antigenaufbereitung war, dass mit viel weniger Antigen gearbeitet werden konnte. Betrug die verabreichte Menge an KLH/Ratte zuvor 240 $\mu$ g, so konnte jetzt mit 100 $\mu$ g/Ratte gearbeitet werden.

Bei weiteren Versuchen wurde die Injektionsroute verändert. Ein Vergleich von subkutaner, intraperitonealer und intramuskulärer Injektion ergab, dass die besten Ergebnisse mit einer *im*-Verabreichung erzielt werden konnten.

## 2.2.2. Präparationen

### 2.2.2.1. Präparation von Lymphzellen aus verschiedenen Geweben

Zu Beginn wurden die Ratten mittels CO<sub>2</sub>-Begasung getötet. Alle weiteren Präparationsschritte erfolgten unter sterilen Bedingungen. Die **Lymphknoten** (LN; axillar, zervical, bronchial, inguinal, mediastinal und mesenterial) oder die **Milz** wurden den Tieren entnommen und in eisgekühltes BSS/BSA überführt. Um die gewünschten Zellen zu erhalten, wurden die Organe anschließend durch ein Stahl- oder Plastiksieb passiert. Danach kam die gewonnene Suspension in ein Zentrifugenröhrchen (15ml Fassungsvermögen), welches auf Eis gestellt wurde, so dass sich Organreste und -trümmer absetzen konnten. Nach ca. 10min wurde der Überstand in ein neues Röhrchen überführt. Es folgte ein Zentrifugationsschritt bei 1600 U/min für 5min. Das Pellet wurde dann für weitere Arbeiten in einem dafür geeignetem Medium aufgenommen.

Die Elimination der Erythrozyten aus der Milzzellensuspension erfolgte mit TAC-Puffer. Für je eine Milz wurden 10ml auf die Zellen gegeben, 10min dort belassen,

anschließend wieder abzentrifugiert und noch zweimal mit BSS/BSA gewaschen.

Die **Leber** wurde zunächst noch im Tier mit PBS über die Vena porta gespült. Zeigte das Organ eine deutliche Aufhellung, konnte die Spülung beendet und die Leber zunächst im ganzen in RPMI<sup>+</sup> überführt werden. Danach wurde sie zerkleinert durch Zerschneiden und Zerdrücken mittels Spritze und Stahlsieb. Nachdem grobe Organreste und -trümmer beseitigt waren, folgten zwei Waschschriffe in RPMI<sup>+</sup>. Zur Gewinnung der Lymphozyten aus der Leber wurde eine Zentrifugation über einen Percoll-Gradienten durchgeführt. Hierfür wurde die gewonnene Zellsuspension in eine Percoll-Verdünnung von 1:40 (in RPMI<sup>+</sup>) überführt und vorsichtig mit einer 1:80 (in RPMI<sup>+</sup>) Verdünnung überschichtet. Dieser Gradient wurde bei 1200 U/min 25 min ohne Bremse zentrifugiert. Die Lymphozyten befanden sich danach in der Interphase zwischen den beiden Verdünnungen. Sie wurden abgenommen, zweimal in RPMI<sup>+</sup> gewaschen und aufgenommen.

**Knochenmarkzellen** wurden aus Femur und Tibia gewonnen. Zu diesem Zweck wurden die Muskeln entfernt, die Knochenenden abgeschnitten und das Knochenmark mittels Spritze herausgespült. Nach Absetzen von Trümmern und unerwünschten Resten, wurde die Suspension zentrifugiert, worauf eine Elimination der Erythrozyten wie schon bei Milzzellensuspension beschrieben erfolgte. Dabei wurden 10ml TAC-Puffer pro zwei Beineknochen verwendet.

**Periphere Blutleukozyten** (PBL) wurden mittels Blutentnahme durch retroorbitale Punktion und teilweise auch durch Herzpunktion erhalten. Dabei wurde das gewonnene Blut sofort in ein mit 10 $\mu$ l vorbereitetes Eppendorf-Röhrchen überführt und auf Eis gestellt, um eine Koagulation zu verhindern. Auch hier erfolgte eine Erythrozytenlyse mittels TAC-Puffer, wobei auf 400 $\mu$ l Blut 15ml TAC-Puffer eingesetzt wurden. Die Zellen verblieben 10min bei RT darin, wurden anschließend bei 1500U/min für 5min zentrifugiert und noch zweimal in BSS/BSA gewaschen.

#### **2.2.2.2. Serumgewinnung**

Das zur Gewinnung des Serums benötigte Blut wurde entweder am lebenden Tier durch Punktion des retroorbitalen Venengeflechtes oder am getöteten Tier mittels kardialer Punktion gewonnen.

##### *Kardiale Punktion:*

Die Ratte wurde zunächst mittels CO<sub>2</sub> getötet und der Brustkorb eröffnet. Dann wurde mit einer 21G Kanüle das Herz punktiert und ca. 2ml Blut entnommen. Durch

Abzentrifugieren bei 10000U/min für 5min konnte das Serum gewonnen werden, welches entweder sofort weiterverwendet wurde (ELISA) oder aliquotiert und bei -18°C eingefroren wurde.

#### *Punktion des retroorbitalen Venengeflechtes*

Zunächst wurden die Ratten mit Metophan oder Isofluran narkotisiert. Durch langsames Verdrängen des Auges mittels Einführen einer heparinisierten Glaskapillare auf der nasalen Seite des Auges, war es möglich zum Venengeflecht zu gelangen. Dabei blieb das Auge unverletzt. Nach der Blutentnahme drückte das Auge beim Herausnehmen der Kapillare auf die entstandene Verletzung, so dass es selten zu einem Nachbluten kam. Mit dieser Methode konnten jedoch höchstens 800µl Blut gewonnen werden. Sie wurde angewendet, wenn entweder eine Messung eines individuellen Immunglobulinverlaufs nach Immunisierung oder eine Phänotypisierung der Lymphzyten im Blut durchgeführt werden sollte. Seren wurden wie bei kardialer Punktion gewonnen und weiterverwendet.

#### **2.2.2.3. Bestimmung der Zellzahl**

Für die Bestimmung der Zellzahl in einer Zellsuspension (aus Milz, Lymphknoten etc.) wurde eine Neubauer-Zählkammer verwendet. Dabei wurde die Suspension mit einer 0,04%igen Trypanblau-Lösung je nach Dichte in einem Verhältnis von 1:2 bis 1:50 verdünnt. Da Trypanblau nur von toten Zellen aufgenommen wird, ist es möglich, so die Zellen unter dem Mikroskop in tote oder lebende zu unterteilen. Letztere wurden ausgezählt. Die Gesamtkonzentration einer Zellsuspension ergab sich anhand Berechnungen mit der Formel:

Zellzahl/Anzahl ausgezählter Quadranten x Verdünnungsfaktor x 10<sup>4</sup> = Zellzahl/ml

#### **2.2.3. Zellaufreinigungen**

##### **2.2.3.1. B-Zell-Depletion einer LK-Zell-Suspension mittels einer Nylonwollsäule**

Makrophagen, die meisten B-Zellen und andere adhärenente Zellen setzen sich beim passieren einer Nylonwoll-Säule fest. Daher eignet sich diese Methode sehr gut, T Zellen anzureichern. Zur Herstellung der Säule wurden jeweils 1,8g Nylonwolle (vorher verlesen bzw. "gekämmt") in eine 20ml Spritze dicht gepackt, ein Drei-Wege-Hahn und eine 20G Kanüle angebracht. Zu Beginn der Arbeiten wurde die Säule mehrmals mit BSS gespült, um möglichst alle Luftblasen zu beseitigen. Die letzten beiden Waschschrte erfolgten in BSS/5% FCS, bevor die Säule mit letzterem Puffer

für 45min bei 37°C inkubiert wurde.

Bevor die Zellen auf die Säule aufgegeben werden konnten, wurde die Suspension (meistens  $2-4 \times 10^8$  Zellen) auf eine Dichte von  $5 \times 10^7$  Zellen/ml in BSS/ 5%FCS eingestellt. Es folgte erneut eine Inkubation von 45min bei 37°C damit sich die adhären-ten Zellen festsetzen konnten. Danach war es möglich durch Waschen der Säule mit vorgewärmtem BSS/5% FCS (mind. 40ml) die nicht adhären-ten Zellen zu gewinnen. Die Durchflussgeschwindigkeit für den Waschpuffer betrug 1Tropfen/3sec.

### **2.2.3.2. B-Zell-Depletion einer LK-Zell-Suspension mittels "T cell recovery column"**

Die Aufreinigung von T Zellen aus Lymphknoten wurde, wenn später für einen T-Zell-Tranfer benötigt, mit Hilfe eines "T cell recovery column kit" (normal and high capacity) durchgeführt. Hier erzielten Reinheiten liegen zwischen 95 und 99%.

Zu Beginn wurde die Säule mit 15ml BSS/BSA gewaschen. Während des Waschens konnte gleichzeitig das "Column Reagent" - ein polyklonaler goat anti-rat IgG (H+L), in 1,5ml BSS/BSA aufgelöst und nach beendetem Waschschrift appliziert werden. Danach musste die Säule für mindestens eine, aber höchstens 10 Stunde(n), inkubieren. In der Zwischenzeit erfolgte die Vorbereitung der Lymphknotenzellen. Sie wurden für die Säule in BSS/BSA auf eine Konzentration von  $2 \times 10^7$ /ml eingestellt und so auch auf die Säule nach deren Inkubation aufgetragen. (Die Säule wurde nach dem Einwirken des Antikörpers wiederum mit 15ml BSS/BSA gewaschen, um "freies Column Reagent" zu eliminieren.) Die max. Beladung lag bei  $1,5 - 2,0 \times 10^8$  Zellen. Die Durchflussgeschwindigkeit der Zellen betrug max. 10 Tropfen/min. Abschließend wurde, nach Aufgabe der Zellsuspension, die Säule mit mind. 15ml BSS/BSA gespült. (Beschrieben wurde hier die Säule mit normaler Kapazität. Bei Verwendung einer "high capacity" Säule konnte applizierte Zelldichte auf 5 bzw.  $7,5 \times 10^7$  erhöht werden. Eine Beladung bis nahezu  $1 \times 10^9$  Zellen insgesamt war möglich, ohne die Reinheit der Zellen zu gefährden.)

### **2.2.3.3. B-Zell-Aufreinigung mittels MACS-Säule**

Die Aufreinigung von Knochenmarkzellen für einen B-Zell-Transfer erfolgte unter Verwendung von MACS Säulen (LS und LD, große Säulen mit normaler und hoher Dichte an "Magnetbeads"). Zunächst wurden frisch präparierte Lymphknotenzellen (mehrmals gewaschen in BSS/5%FCS) auf  $1 \times 10^8$  Zellen insgesamt in 450µl BSS/5%FCS eingestellt. Zu dieser Suspension kamen dann 50µl beads des pan-T-Zell-mAk Klon Ox-52. Die Inkubationszeit betrug 30min. In der Zwischenzeit

wurde die Säule vorbereitet. Sie wurde zunächst einmal mit PBS (ca. 10ml) und dann noch mit ca. 15ml BSS/5%FCS gespült. Das danach folgende Einspannen in einen Magneten, diente zum Aufbau eines magnetischen Feldes innerhalb der Stahlwolle im Inneren der Säule. Somit wurden die mit beads beladenen Zellen zurückgehalten und nur die unbeladene Fraktion an B-Zellen und unreifen hämatopoetischen Vorläuferzellen konnte die Säule passieren. Der Durchfluß der Zellsuspension war über einen Drei-Wege-Hahn geregelt. Nach Aufgabe der Zellen wurde die Säule noch zusätzlich mit 15ml BSS/5%FCS eluiert.

## **2.2.4. Zellfärbungen**

### **2.2.4.1. Oberflächenfärbung**

0,5-5x10<sup>5</sup> Zellen in 100µl PBS/BSA/Azid wurden zunächst in ein FACS-Röhrchen überführt. Um falsch-positive Färbungen zu minimieren erfolgte zunächst eine Inkubation der Zellen für 10min auf Eis mit 10mg/ml NMIg. So wird eine Blockade von Fc-Rezeptoren erreicht, die die Fähigkeit besitzen, mAbs zu binden. Danach wurden direkt konjugierte Antikörper in sättigender Konzentration zugegeben und die Zellen wiederum für 20min im Dunkeln inkubiert. Verwendung fanden für eine 3-Farben-Färbung FITC-konjugierte, PE konjugierte und biotinierte mAbs. Es folgte ein Waschschrift mit 3ml PBS/BSA/Azid und danach eine erneute Inkubation der Zellen mit Streptavidin-Cyochrome<sup>R</sup> für weitere 10min auf Eis. Dadurch wurde eine Detektion der gebundenen Biotin konjugierten mAbs ermöglicht. Nach einem finalen Waschschrift konnten die Zellen am FACScan bzw. FACScalibur analysiert werden. Zu jeder Färbung gab es Kontrollfärbungen, mit mAbs, welche für die gefärbten Zellen irrelevant waren (Rattenzellen gefärbt mit Maus-anti-Ziege oder Maus-anti-Schaf L180/1).

### **2.2.4.2. CFSE-Färbung *in vitro* und *in vivo***

#### *CFSE*

Die Ermittlung der Teilungsrate ist ein gutes Kriterium zur Einschätzung der mitogenen Aktivität konventioneller und superagonistischer anti-CD28 monoklonaler Antikörper (mAk). Die Technik, welche dafür angewandt wurde, beruht auf eine Färbung, bei der mit jeder Zellteilung der Farbstoff auf beide Tochterzellen zu gleichen Anteilen aufgeteilt wird. Es handelt sich dabei um Carboxyfluoreszin-Diazetat-Succimidyl-Ester oder kurz CFSE. Dieser Farbstoff besteht aus einem Farbmolekül, welches wiederum zwei Azetatgruppen und eine funktionelle Succimidyl-Ester-

Gruppe besitzt. So aufgebaut ist es zwar zunächst membrangängig, aber nicht fluoreszierend. Erst im Inneren der Zelle entfernen endogene Esterasen die beiden Azetatgruppen und verändern damit völlig die Eigenschaften des Farbstoffes. Er ist nun nicht mehr membrangängig, aber dafür stark fluoreszierend. Außerdem kommt es dann, im Zellinneren, ebenfalls zu einer Reaktion zwischen der Succimidyl-Ester-Gruppe und freien Aminogruppen von verschiedenen intrazellulären Proteinen. Es entsteht ein Farbstoff-Protein-Komplex. Dies ist auch der Grund dafür, dass die Färbung unter strikt proteinfreien Bedingungen durchgeführt werden muß (Weston et al., 1990; Lyons and Parish, 1994; Lyons, 2000).

CFSE ist ein relativ lang vorhaltender Farbstoff in der Zelle, der über 5 Zellteilungen „dokumentieren“ kann. (Lyons and Parish, 1994; Lyons, 1999) Trotzdem unterliegt auch er katabolischen Prozessen in der Zelle, besonders zu beobachten *in vivo*, und da wiederum bei Zellen, die sich nicht in einer Teilung befinden. Auf Grund dieser Verluste sollte bei einem nachfolgenden Transfer der Zellen in ein Empfängertier eine intensivere Färbung erfolgen. (Hasbold et al., 1998; Lyons, 2000) Daher wurden die Zellen in den verschiedenen, nachfolgend beschriebenen Ansätzen mit unterschiedlichen Farbstoffkonzentrationen und Färbezeiten behandelt.

#### *Färbung*

Die Färbung mit CFSE wurde proteinfrei durchgeführt. Aus diesem Grunde wurden die zu färbenden Zellen (aus verschiedenen Organen isoliert) mindestens dreimal mit RPMI<sup>-</sup> gewaschen. Danach wurden die Zellen auf eine Konzentration von  $1 \times 10^7$ /ml in RPMI<sup>-</sup> eingestellt und von einer 5mM CFSE-Stammlösung in DMSO so viel hinzugefügt, dass eine Endkonzentration von 1:4000 (*in vivo*) und 1:5000 (*in vitro*) an CFSE-Färbelösung erreicht war. Dabei musste ein rasches Vermischen der CFSE-Stammlösung mit der Zellsuspension in RPMI<sup>-</sup> erfolgen, damit ein rasches Ausdünnen des toxisch wirkenden DMSO gewährleistet war. Es wurde 5min *in vitro* und 10min *in vivo* gefärbt. Danach wurde zweimal mindestens mit RPMI<sup>+</sup> (proteinhaltig) gewaschen. Die Zellen konnten dann in anderen Versuchen (Stimulationen, Transfers) weiterverwendet werden. In jedem Falle musste mit einem Verlust mit 10 - 20% der eingesetzten Zellzahl gerechnet werden.

#### **2.2.4.3. Durchflusszytometrie**

Mit Hilfe spezifischer, mit Fluoreszenzfarbstoff konjugierter Antikörper wurde die quantitative Bestimmung der Prozentzahl von Zellen, welche ein bestimmtes Oberflächenmolekül exprimierten, über Durchflusszytometrie möglich. Hierfür kam ein FACScan (Fluorescence Activated Cell Scan) zur Anwendung. Beim Passieren der

Zellen eines vom Gerät erzeugten Laserstrahls wurden die von den Antikörpern getragenen Farbstoffe zur Emission von Licht charakterischer Wellenlänge angeregt. Dieses Licht wiederum wurde dann vom Gerät gemessen, und ermöglichte somit, die Identifizierung und Charakterisierung einer jeden einzelnen Zelle. Fünf Parameter konnten gleichzeitig gemessen werden:

- Zellgröße („forward scatter“)
- Granularität („side scatter“)
- Fluoreszenz 1 (grüner Kanal, FITC-Farbstoff)
- Fluoreszenz 2 (oranger Kanal, PE-Farbstoff)
- Fluoreszenz 3 (roter Kanal, Streptavidin-Red 670™)

Jede Zelle wurde am Gerät als Punkt dargestellt. Somit konnten auch bei Betrachtung des Diagrammes Zellgröße zu Granularität die toten Zellen sowie Zelltrümmer von den lebenden unterschieden werden. Durch die Verwendung von bestimmten Schranken („gates“), war es möglich, einzelne Populationen getrennt voneinander zu analysieren. So konnten die toten Zellen ausgeschlossen werden.

Für jede einzelne Färbung wurden 10000 Zellen analysiert und aufgezeichnet. Ausgenommen davon waren die CFSE-*in-vivo*-Färbungen. Hier war es nötig bis zu 50000 Zellen pro Färbung zu analysieren, da teilweise in ein Tier injizierte CFSE-Zellen nur schlecht wiedergefunden werden konnten und daher größere Zellzahlen „durchsucht“ wurden. Die Analyse der Färbung erfolgte mit Hilfe der LYSIS II“ Software und die spätere Auswertung am Apple-Macintosh mittels Cell-Quest-Software.

## 2.2.5. Histologie

### 2.2.5.1. Fixierung und Schnitthanfertigung verschiedener Gewebe

#### *Leber*

Das Organ wurde im Ganzen entnommen, jedoch nur ein Teil für die Histologie verwendet. Dieser Teil wurde in kleinere Einheiten zerschnitten und in 4%iges Formaldehyd überführt. Die Verweildauer im Fixierungsmittel betrug ca. 5 bis 6 Stunden. Danach wurde mehrfach mit PBS gespült. In PBS konnte das fixierte Gewebe ca. 1 Woche aufbewahrt werden. Das PBS musste jedoch in der Zwischenzeit mehrmals gewechselt werden. Erst kurz vor dem Einbetten wurde das Gewebe fließend gewässert.

#### *Lunge*

Nach Töten des Tieres wurde der Brustkorb eröffnet, das Zwerchfell durchtrennt und

über eine Herzpunktion ausgeblutet. Dabei kollabierte das Lungengewebe zunächst. Mittels einer über die Trachea eingeführten Braunüle konnte die Lunge dann, ähnlich wie bei einer Lungen-Lavage, mit 4%igem Formaldehyd aufgefüllt werden. Dabei weitete sich das Gewebe wieder. Danach wurde mit einer Klemme oder Pinzette unterhalb der Einstichstelle der Braunüle abgeklemmt, damit ein Herausfließen des Fixierungsmittels nicht möglich war. Hierauf erfolgte ein zügiges Herauspräparieren der Lunge aus dem Brustkorb von der Trachea aus und ein Überführen in ein 50ml Röhrchen mit ca. 30ml 4%igem Formaldehyd. Bei gutem Füllen der Lunge und guter Präparation, konnte nach Entfernen der Klammer im Fixativ beobachtet werden, dass die Lunge schwebte. So wurde sie optimal fixiert. Jedoch kam es häufig dazu, dass Restluft vorhanden war, und die Lunge an der Oberfläche der Flüssigkeit schwamm. Da so keine optimale Fixierung des gesamten Gewebes gewährleistet war, wurde zusätzlich in das Röhrchen ein in 4%igem Formaldehyd getränktes Filterpapier gegeben, damit alle Stellen des Gewebes gleichmäßig mit Fixativ umgeben waren.

Fixiert wurde zwei Tage bei ca. 4°C. Anschließend wurde die Lunge zum bessern Spülen in einzelne Teile zerschnitten und mit PBS umspült und mindestens 1 Tag in PBS belassen, wobei dies mehrmal gewechselt werden mußte. Erst dann konnte das Gewebe, nachdem es noch 10min fließend gewässert wurde, eingebettet werden. Ein Aufbewahren des Lungengewebes über mehrere Tage in PBS war bis zu zwei Wochen möglich.

Das Einbetten in Paraffin erfolgte über eine Einbettmaschine. Hier wurden die Präparate zunächst über eine aufsteigende Alkoholreihe entwässert, bevor sie über zwei Chloroformschritte in Paraffin überführt wurden. Dies dauerte je nach Gewebe zwischen 6 Stunden für die Leber und 8 Stunden für die Lunge. Danach wurden die paraffinierten Objekte aufgeblickt.

Schnitte wurden an einem manuellen Schlittenmikrotom angefertigt, wobei die Schnittdicke bei allen Objekten 7µm betrug. Einbettter und Schlittenmikrotom wurden freundlicher Weise vom histologischen Labor der Neurochirurgischen Klinik und Polyklinik/ Würzburg bereitgestellt

#### **2.2.5.2. Beschichten von Objektträgern**

Objektträger wurden zunächst über Nacht in Leitungswasser mit Spülmittel eingelegt und anschließend mindestens 10min fließend gewässert. Danach folgten drei weitere Waschschrte in destilliertem Wasser für je 30min. Über Nacht wurden die OT dann bei 60°C im Wärmeschrank getrocknet. Am anderen Tag folgte dann das letztendliche Beschichten mit Poly-L. Dafür verwendete Lösung bestand aus 2ml Poly-L-



Stammlösung in 200ml destilliertem Wasser verdünnt. Darin verweilen die Schnitte ca 30min und wurden anschließend über Nacht bei 60°C getrocknet.

#### **2.2.5.3. Hämalaun-Eosin-Färbung**

Zunächst wurden Paraffinschnitte über einen Xylolschritt (ca 30min) und eine anschließende absteigende Alkoholreihe entparaffiniert. Nach einem kurzen Waschritt in destilliertem Wasser wurden die Schnitte in Hämalaun nach Mayer überführt und 10min belassen. Hierauf folgten 10min fließend wässern. Danach kamen die Schnitte noch für etwa 5min in Eosin. Anschließend wurde über eine aufsteigende Alkoholreihe und zwei Xylolschritte zu je 10min entwässert, bevor die Schnitte mit Vitro-Clud eingedeckelt wurden.

#### **2.2.5.4. PAS-Färbung**

Zunächst wurden Paraffinschnitte über einen Xylolschritt (ca. 30min) und eine anschließende absteigende Alkoholreihe entparaffiniert. Danach folgte ein Verweilen (ca. 5min) in Canoy'scher Lösung, welche danach verworfen wurde. Die Schnitte mussten darauf folgend gründlich mit destilliertem Wasser gespült werden, bevor sie in Perjodsäure überführt wurden. Hier verblieben sie 20min. Auch danach musste ausgedehnt unter fließendem Wasser (mindestens 10min) und noch einmal mit destilliertem Wasser gespült werden. Nach diesem umfangreichen Spülen wurden die Schnitte in Schiff'sche Reagenz überführt, in welchem sie 15min inkubierten.

Nach Abkippen der Schiff'schen Reagenz wurde mindestens dreimal je 2min mit Schwefelwasser gespült und anschließend 10min unter fließendes Wasser gestellt. Bevor die Schnitte nun noch mit Mayers Hämalaun gegen gefärbt wurden (10min), wurde kurz mit destilliertem Wasser gespült. Auch nach der zweiten Färbung wurde 10min gewässert. Hierauf folgte eine aufsteigende Alkoholreihe, zwei Xylolschritte zu je 10min und Eindeckeln mit Vitro-Clud.

## 2.2.6. Ex-vivo-Versuche

### 2.2.6.1. (Re-)Stimulation

Je  $2 \times 10^5$  ungetrennte Lymphknoten- oder Milzzellen/ml RPMI<sup>+</sup> wurden hierfür zunächst auf ein 96-Napf-Kulturplatte (pro Napf je 100µl einer Zellsuspension mit  $2 \times 10^6$  Zellen/ml) mit Rundböden aufgetragen. Für die einzelnen Restimulationen kamen folgende Substanzen zur Anwendung:

KLH-Versuche:       - KLH (von 100µg/ml bis 4µg/ml)  
                          - Con A (2,5µg/ml)

Versuche mit

*N. brasiliensis*:     - Con A (2,5µg/ml)  
                          - NES (Nippostrongylus exkretorisches-sekretorisches Protein;  
                          von 5µg/ml bis 0,2µg/ml)

Versuche mit

*L. monocytogenes*: - Con A (2,5µg/ml)  
                          - HKL (heat killed listeria  $10^7$ ,  $10^6$ ,  $10^5$ )  
                          - p60 (10µg/ml, 2µg/ml und 0,4µg/ml)

Verdünnungen der Substanzen wurden in RPMI<sup>+</sup> angesetzt. Die Inkubationszeit betrug zwischen 1 und 5 Tage in einem Wärmeschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>.

Die *in-vitro*-Stimulation von CFSE-gefärbten Lymphknotenzellen verliefen im Prinzip gleich zu den Restimulationen. Dabei wurden folgende Stimulationsansätze festgelegt:

- nur Medium (negative Kontrolle)
- 2,5µg/ml Con A (polyklonale Stimulation - positive Kontrolle)
- 2,5µg/ml R73 (monoklonaler anti-rat TZR $\alpha\beta$ )
- 5 µg/ml JJ 319 (konventioneller anti-rat CD28)
- 2,5µg/ml R73 + 5µg/ml JJ 319 (Kostimulation)
- 5 µg/ml JJ 316 (superagonistischer anti-rat CD28, „Superagonist“)

Inkubationszeit betrug auch in diesen Versuchen ein bis fünf Tage unter oben beschriebenen Bedingungen.

### 2.2.6.2. Proliferationstest

Die Lymphozyten wurden zunächst in 96-Napf-Platten restimuliert. (siehe auch: (Re)-Stimulation; Abschnitt 2.2.6.1.). Nach 48 Stunden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> folgte die Zugabe von 0,5 µCi/Napf <sup>3</sup>H-Thymidin. Die Zellen verblieben erneut ca. 16 Stunden (über Nacht) im Wärmeschrank unter oben genannten Bedingungen. Danach wurden die Zellen mit Hilfe eines Betaplate harvester auf Glasfaserfilter (Printed Filtermat A) geerntet. Es folgte ein Trocknen der Filter bei 37°C für mindestens 1 Stunde. Danach wurden die Filter in eine Plastikhülle eingeschweißt (sample bags) und 10ml Scintillationsflüssigkeit dazugegeben. Zum Schluss wurde die Hülle noch verschlossen und mit einer Maske versehen, bevor eine Messung mittels Betaplate durchgeführt wurde. In einem Scintillationszähler wurde dann der radioaktive Zerfall des von proliferierenden Zellen in neu gebildete DNS eingebauten <sup>3</sup>H-Thymidins bestimmt und als Zerfälle pro Minute (cpm) angegeben. Diese Größe ist der Proliferationsrate der Zellen direkt proportional. Es wurden von jedem Ansatz Triplikate angelegt und gemessen.

### 2.2.6.3. Nachweis KLH-spezifischer Immunglobuline mittels ELISA

Dieser ELISA diente zum Nachweis von KLH-spezifischen Immunglobulinen im Serum von KLH-immunisierten Ratten. Zunächst wurden 96-Napf-Platten mit 150µg/ml KLH in PBS beschichtet. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4°C. Danach wurden die freien Proteinbindungsstellen mind. 2 Stunden bei RT mit PBS/BSA blockiert. Im folgenden Schritt wurden die in PBS/1%BSA/Tween verdünnten Seren aufgetragen. Die Inkubationszeit betrug zwischen 2 und 3 Stunden bei RT. Danach wurde mit Waschpuffer mindestens dreimal gespült, bevor detektierende Antikörper aufgegeben werden konnte. Es handelte sich hier um einen Biotin-konjugierten Ziege-anti-Ratte IgG, welcher in PBS/ 1%BSA/ Tween 1:5000 verdünnt und für eine Stunde (RT) aufgetragen wurde. Es folgte dreimaliges Waschen mit Waschpuffer und danach Inkubation der Platten mit alkalischer Phosphatase konjugiertem Streptavidin (Verdünnung 1:2000 in PBS/ Tween 20) für eine Stunde bei RT. Hierauf folgte erneut dreimaliges Waschen mit Waschpuffer. Für die Entwicklung der Platten wurde als Substrat je eine Tablette p-Nitrophenyl-Phosphat in 10ml Diethanolaminpuffer aufgelöst und die erhaltene Lösung auf die Platte aufgetragen. Nach einer Inkubationszeit von ca. 15min im Dunkeln bei RT war bei vorhandenen Antikörpern eine deutliche gelbe Farbreaktion zu erkennen, deren Stärke von der Menge des gebundenen Antikörpers abhängig war. Gemessen wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 405 nm an einem ELISA-Reader.

#### 2.2.6.4. ELISA zum Nachweis der verschiedenen Immunglobulinklassen

Zum Nachweis der verschiedenen Immunglobulinklassen kamen folgende Maus-anti-Ratte-Antikörper zu Anwendung: IgA, IgE, IgG1, IgG2a, IgG2b und IgM. 96-Napf-Platten mit Flachboden wurden zunächst mit dem jeweiligen primären Antikörper (unkonjugiert) mit einer Konzentration von 1 µg/ml in PBS beschichtet und über Nacht bei 4°C inkubiert. Es folgte am nächsten Tag ein Blocken mit PBS/BSA für mind. 2 Stunden bei RT. Nach dreimaligem Waschen mit PBS/Tween wurden die Seren und zur Bestimmung der jeweiligen Antikörperkonzentration auf jede Platte ein Immunglobulin-Standard (für IgG1, IgG2a, IgG2b und IgM von 1000ng/ml bis 2ng/ml und für IgA und IgE von 250ng/ml bis 0,5 ng/ml) in PBS/1%BSA/Tween 20 aufgetragen. Inkubationszeit betrug ca 2-3 Stunden bei RT.

Danach wurde wieder dreimal gewaschen, bevor die biotynolierten Nachweisantikörper (Detektoren) in einer Konzentration von 1mg/ml in PBS/1%BSA/Tween 20 auf die Platten gegeben wurden und für eine Stunde bei RT inkubierten. Wieder folgte dreimaliges Waschen mit Waschpuffer und danach Inkubation der Platten mit alkalischer Phosphatase konjugiertem Streptavidin (Verdünnung 1:2000 in PBS/ Tween 20) für eine Stunde bei RT. Hierauf folgte erneut dreimaliges Waschen mit Waschpuffer. Die Entwicklung der Platten und Messung der Absorption erfolgte wie in Abschnitt 2.2.6.3.beschrieben.

#### 2.2.6.5. Zytokin-ELISA

Diese ELISAs wurden durchgeführt unter Verwendung von verschiedenen von BD erworbenen Kits, welche einen Antikörper (Capture AB) zum Beschichten der Platte (96-Napf Nunc-Platten), einen zum Detektieren (Detektor), eine Peroxidase (Enzym) und einen Standard enthielten. Ausgewählte Kits waren ; IL-4, IL-10 und IFN $\gamma$ . Bis auf wenige Einzelheiten glichen sich alle drei Vorgehensweisen. Zunächst wurden die Platten beschichtet. Hierfür musste der Capture AB in einem bestimmten Puffer verdünnt werden - dem Coating-Puffer (Für IL-4 und IFN $\gamma$  kam Coating-Puffer I zur Anwendung, für IL-10 Coating-Puffer II.). Dieser Schritt wurde über Nacht durchgeführt bei 4°C. Anschließend mussten die Platten fünfmal mit Waschpuffer gewaschen werden. Danach wurde mit PBS/10% FCS geblockt. Dies erfolgte bei Zimmertemperatur ca. 1Stunde. Auch hierauf mußte mindestens fünfmal gewaschen werden. Dann wurden die Proben (meist unverdünnte oder verdünnte Überstände aus verschiedenen Stimulationen) und der Standard aufgegeben, wobei jede Verdünnung bei diesem Schritt mit PBS/10% FCS angesetzt war. Folgende Standards kamen zur Anwendung:

IL-4 : 100 - 50 - 25 - 12,5 - 6,25 - 3,125 - 1,56 - 0,78 - 0,36 - 0,18pg/ml

IL-10: 1000 - 500 - 250 - 125 - 62,5 - 31,25 - 15,6 - 7,8 - 3,6 - 1,8pg/ml

IFN $\gamma$ : 2000 - 1000 - 500 - 250 - 125 - 62,5 - 31,25 - 15,6 - 7,8 - 3,6pg/ml

Inkubationszeit für die Proben und Standards betrug mind. zwei Stunden bei RT. Wieder musste danach fünfmal gewaschen werden. Beim nächsten Schritt konnten Detektor und Enzym gleichzeitig aufgeben werden, beide in PBS/10% FCS verdünnt. Inkubationszeit betrug hier eine Stunde bei RT. Danach erhöhte sich das Waschen auf siebenmal. Hierauf folgte das Substrat - Tetramethylbenzidin. Es sollte ca. 30min im Dunkeln inkubieren. Die Reaktion wurde dann mit 2N Schwefelsäure gestoppt und das Ergebnis bei einer Wellenlänge von 450nm am ELISA-Reader gemessen.

## 2.2.7. Infektionsversuche

### 2.2.7.1. Infektion mit *Nippostrongylus brasiliensis*

Das für die Infektion von Ratten mit *Nippostrongylus brasiliensis* benötigte Larvenstadium L3 des Hakenwurmes wurde freundlicherweise von Herrn PD Dr. Klaus Erb zur Verfügung gestellt. Die von ihm bezogenen Larven befanden sich auf Filterpapier. Dieses wurde in ein 15ml Röhrchen gegeben, welches anschließend mit 15ml normalem Leitungswasser aufgefüllt wurde. Nach diesem Vorgang fallen die Larven sofort vom Filter auf den Grund des Röhrchens. Danach wurde mehrmals (2-3mal) mit Wasser gewaschen und das Filterpapier entfernt. Dabei durfte nur bei höchstens 500U/min zentrifugiert werden. Außerdem sollte kein zu kaltes Wasser verwendet werden, weil es zum Absterben der Larven führen konnte. Nach dem letzten Waschritt wurden die Larven in PBS aufgenommen und die Dichte pro ml bestimmt. Dies erfolgte, indem auf eine Petrischale mindestens 10 Tropfen à 10 $\mu$ l der Larven/PBS-Suspension aufgetragen und die Wurmzahl in jedem dieser Tropfen bestimmt wurde. Hierbei war es sehr wichtig die Suspension vor jedem Auftropfen gut zu durchmischen, da ein rasches Absinken der Larven leicht zu Fehlern führen konnte.

Aus allem Ausgezählten wurde danach ein Durchschnitt gebildet. Erhaltene Zahl x100 ergab die L3-Zahl/ml. Verabreicht wurde je nach Versuchsaufbau von 750 L3 bis 2000 L3. Injiziert wurden zwischen 0,75-1,50ml (je Versuchsaufbau und Larvenzahl) subkutan in die Nackenfalte.

### **2.2.7.2. Auszählen von Wurmeiern im Kot von mit *Nippostrongylus brasiliensis* infizierten Ratten**

Die Produktion von Eiern erfolgt im Dünndarm von infizierten Ratten. Dies beginnt ca. um die Tage 5/6 nach der Infektion. Damit ein Einsammeln des Kotes erleichtert wurde, kamen die Ratten ab dem 4. Tag nach L3-Gabe in ihren Ställen auf Laufgitter. Außerdem wurde der Boden mit feuchten Tüchern ausgelegt, damit ein Austrocknen des Kotes verhindert werden konnte. Das Absammeln des gesamten Kotes erfolgte jeden Tag. Danach wurde er gewogen und 3g von jedem Tier (Gemäß der Eichung der Wurmeier-Zählkammer) abgenommen. Der Kot wurde anschließend in gesättigter Kochsalzlösung eingeweicht und mit dem Mittelteil einer Spritze zerdrückt, um die Eier freizulegen. Zum Abtrennen der festen Bestandteile der erhaltenen Suspension wurde diese dann über ein Stahlsieb „gefiltert“. In der gewonnenen Flüssigkeit befanden sich nun die Wurmeier. Nach einer 10minütigen Zentrifugation bei 1200Umdrehungen/min (und ohne Bremse!!) befanden sich die leichten Wurmeier alle am oberen Rand der gesättigten Kochsalzlösung. Ca. 0,6ml wurden vorsichtig von der Oberfläche abpipettiert und in der Zählkammer ausgezählt.

### **2.2.7.3. Infektion mit *Listeria monocytogenes***

#### *Aufbereitung erhaltener Listerien*

Der für die Infektion von Ratten mit *Listeria monocytogenes* benötigte EGD-Stamm SV 1/2A wurde freundlicherweise von Herrn Prof. Göbel (Biozentrum, Würzburg) zur Verfügung gestellt.

Erhaltene Bakterien wurden zunächst auf einer Kulturplatte ausgestrichen. Danach wurde von dieser Platte eine Einzelkolonie für eine Übernachtskultur (30ml, Brain-Heart Infusion in Aqua dest.) entnommen. Diese Kultur befand sich auf einem Schüttler bis eine  $OD_{600}$  bei ca. 0,9 - 1,0 erreicht war. Dieser Wert spiegelt in der Wachstumskurve der Bakterien eine späte log-Phase wieder, und es konnte dann davon ausgegangen werden, dass eine Dichte von ca.  $1-2 \times 10^9$  Bakterien/ml vorlag. War dieser Wert erreicht, folgte eine Zentrifugationsschritt bei 6000U/min für 10min (4°C). die Listerien wurden danach in PBS aufgenommen und noch zweimal gewaschen, bevor sie letztendlich in ca. 20ml PBS/ 20% Glycerin überführt wurden. Dabei musste darauf geachtet werden, dass eine gute Resuspension durch gründliches Vortexen erreicht wurde. Waschen und Resuspendieren erfolgte ebenfalls bei 4°C. Am Ende der Prozedur wurden 1ml Aliquots bei -80°C eingefroren. So waren die Listerien für ca. 6 Monate haltbar.

*Infektion mit Listeria monocytogenes*

Zwei Tage vor Infektionsstart wurde ein Aliquot aufgetaut und eine Verdünnungsreihe (auf Eis!) angelegt. Diese Reihe bestand aus  $10^n$ -Schritten. Von den Verdünnungen 1:10<sup>5</sup> und 1:10<sup>6</sup> wurden dann jeweils 100µl entnommen und auf einer BHI-Kulturplatte aufgetragen. 24 Stunden später erfolgte eine Auszählung der gewachsenen Kolonien. Somit war es möglich, die aktuelle Bakterien-Konzentration in den Aliquots zu ermitteln. Dieser Vorgang wurde auch am Tag der Infektion mit dem Aliquot wiederholt, aus welchen die zu inokulierenden Listerien entnommen wurden. Grund dafür war, mögliche Kontaminationen zu erkennen, aber auch die inokulierte Bakterienzahl zu bestätigen.

Inokuliert wurden  $5 \times 10^4$  CFU/Ratte in PBS intravenös.

**2.2.7.4. Ermittlung der Erregerzahl in den Lebern von mit *Listeria monocytogenes* infizierten Ratten**

An den Tagen 6 und 14 nach erfolgter Infektion wurden die Ratten getötet und die Leber entnommen. Dabei wurde zunächst die ganze Leber gewogen und anschließend für ca. eine Stunde in 10ml Aqua dest. (auf Eis!) belassen. Danach wurde die Leber mit dem gesamten destillierten Wasser in einen Douncer überführt und ca. 5min homogenisiert. Nach Rückführung der gewonnenen Suspension in ein 50ml Röhrchen folgte ein Beschallen im Sonifier bei Stufe 5 für 10sec. Zuletzt wurde eine Verdünnungsreihe der Organsuspension angelegt, welche wieder aus  $10^n$ -Schritten aufgebaut war. Verschiedene Stufen davon wurden ausplattiert und 24Stunden inkubiert bei 37°C und 5%CO<sub>2</sub>. Danach konnten die gewachsenen Kolonien ausgezählt werden.

## 3. Ergebnisse

### 3.1. *In vivo* T-Zell-Expansion durch Stimulation mittels superagonistischem, CD28-spezifischem mAk

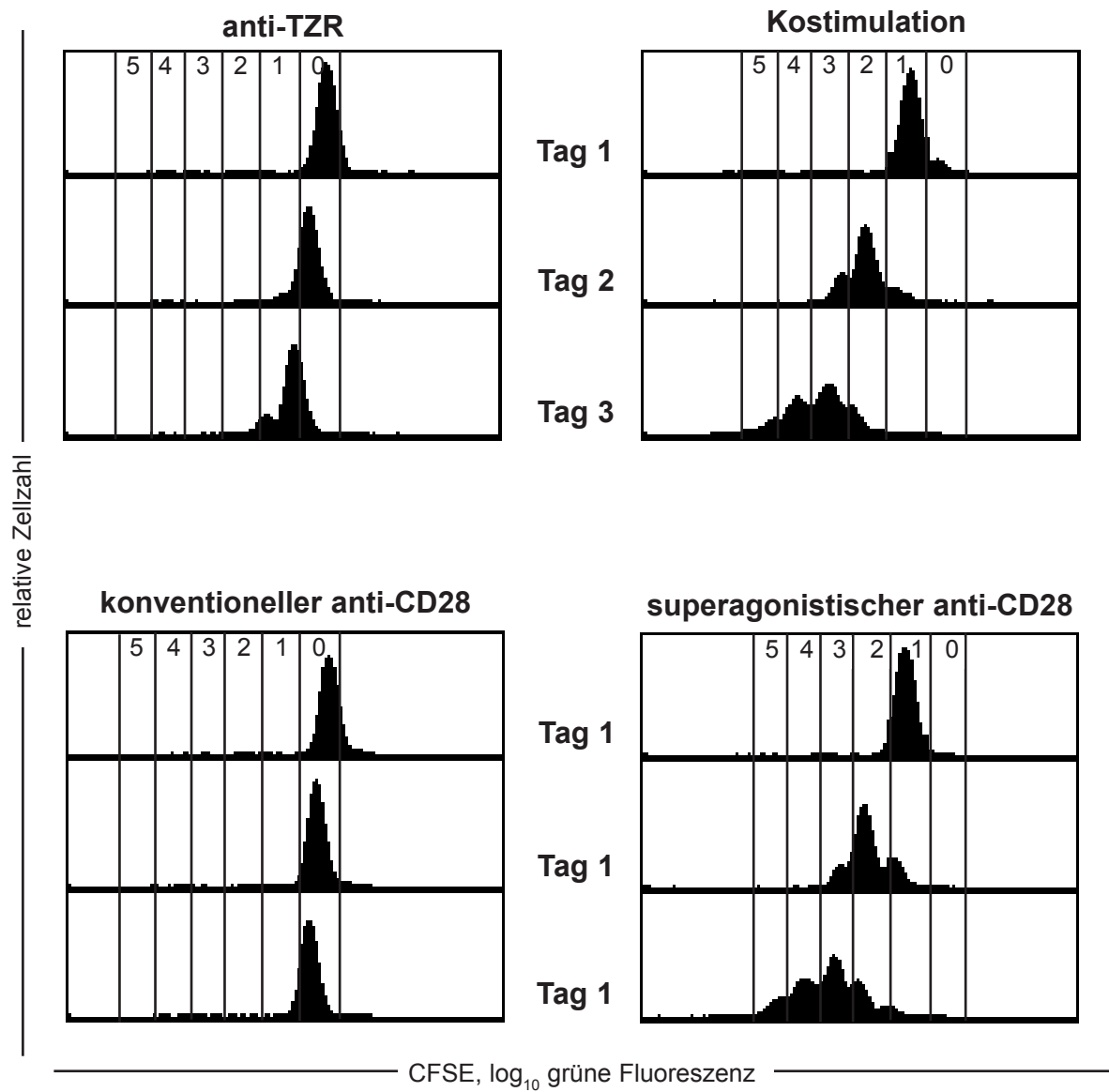
#### 3.1.1. Zellteilungsraten nach Behandlung mit superagonistischem anti-CD28 mAk

##### 3.1.1.1. *In-vitro*-Versuche

Zur Bestimmung der Zellteilungsaktivität nach Stimulation mit konventionellem bzw. superagonistischem, CD28-spezifischem mAk wurden gereinigte T Zellen aus Rattenlymphknoten mit dem fluoreszierenden Farbstoff CFSE kovalent markiert, und die schrittweise Verdünnung der Fluoreszenz als Indikator für die durchlaufenen Zellteilungen bestimmt.

Wie in Abbildung 6 zu sehen ist, zeigen T Zellen aus Rattenlymphknoten in Zellkultur nur minimale Proliferation als Antwort auf TZR-Stimulation allein und bis zu fünf Teilungen unter kostimulatorischen Bedingungen nach drei Tagen unter Verwendung eines konventionellen anti-CD28 Antikörpers. Dies stimmt mit der „Zwei-Signal-Theorie“ (Bretscher and Cohn, 1970; Lafferty und Cunningham, 1975; Bretscher, 1999) überein. Konventioneller anti-CD28 mAk allein, führte wie erwartet ebenfalls zu keiner Proliferation der T Zellen *in vitro*. Die mitogene Aktivität des superagonistischen anti-CD28 mAk führte *in vitro* zu einer Proliferation, die mit der unter kostimulatorischen Bedingungen (TZR + CD28) vergleichbar war. T Zellen durchliefen bis zu fünf Teilungen bei drei Tagen in Kultur, wobei ebenfalls beobachtet wurde, dass alle zu Beginn des Versuches eingesetzten Zellen an der Proliferation beteiligt waren. Der „Superagonist“ war somit im Kontrast zum konventionellen anti-CD28 mAk in der Lage, ohne TZR Signal optimale T-Zell-Proliferation auszulösen





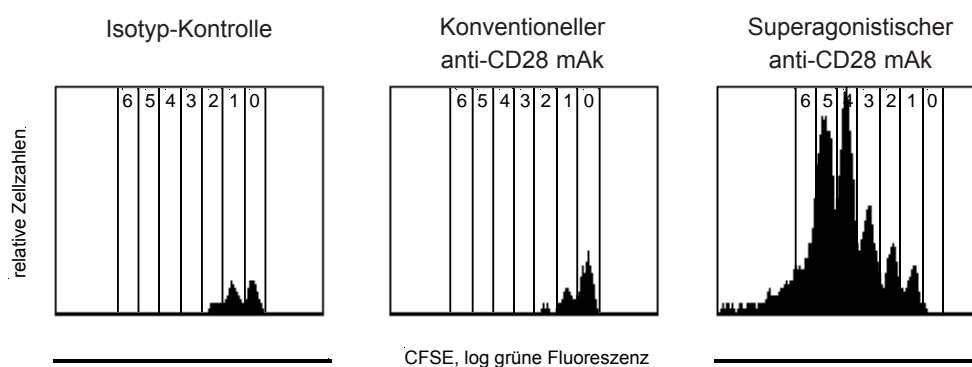
**Abbildung 6: Vergleich der mitogenen Aktivität zwischen konventionellem und superagonistischem anti-CD28 mAk *in vitro***

Die Histogramme zeigen Proliferation von Lymphknotenzellen *in vitro* nach Stimulation mit TZR allein, mit TZR und CD28 (konventionell) - Kostimulation, mit konventionellem mAk und mit superagonistischem mAk. Zahlen geben die Anzahl der durchlaufenen Zellteilungen wieder.

### 3.1.1.2. *In-vivo*-Versuche

Die mitogene Aktivität von konventionellem und superagonistischem Antikörper wurde auch *in vivo* verglichen (Abbildung 7). Allerdings beschränkte sich die Untersuchung auf den Vergleich konventioneller und superagonistischer Antikörper, da die mAk-vermittelte Kostimulation mit anti-TZR plus anti CD28 mAk nur in Zellkultur durchführbar ist. Dabei wurden bestrahlte PVG-Ratten mit CFSE-gefärbten T Zellen rekonstituiert und einen Tag danach mit jeweils 1mg mAk bzw. Isotyp-Kontrolle behandelt. Zwei Tage später erfolgte die Analyse von Milz und Lymphknotenzellen hinsichtlich der CFSE-Fluoreszenz. Es zeigte sich ein ähnliches Bild wie bei den *in-vitro*-Versuchen. Bei Tieren, die mit konventionellem anti-CD28 mAk (JJ319) oder Isotyp-Kontrolle (MOPC-31C) behandelt wurden, war nur bei wenigen transferierten Zellen eine Teilung zu beobachten, welche vermutlich der homeostatischen Proliferation entspricht (Surh et al., 2000; Maury et al., 2001; Troy et al., 2003).

Behandlung mit dem superagonistischen anti-CD28 zeigte dem gegenüber, dass nahezu alle applizierten Donorzellen Zellteilungen durchliefen, wobei bis zu sechs Teilungen auftraten, was wiederum zu einem drastischen Ansteigen der Zellzahl der ursprünglich transferierten T Zellen führte.

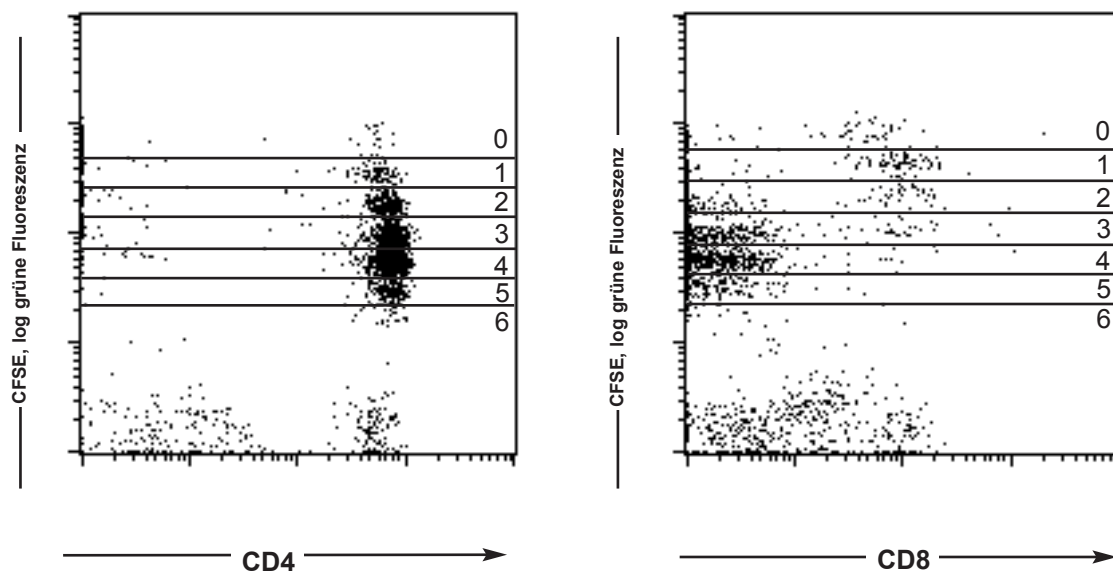


**Abbildung 7: Vergleich der mitogenen Aktivität zwischen konventionellem und superagonistischem anti-CD28 mAk *in vivo***

Die Histogramme zeigen die Zellteilungen transferierter, CFSE-gefärbter T Zellen nach einer intravenösen Injektion von je 1mg konventionellem bzw. superagonistischem, CD28-spezifischem mAk. Zahlen stehen für die Anzahl der durchlaufenen Zellteilungen

Weiterführende Charakterisierung der T Zellen aus den Tieren, welche mit superagonistischem mAk behandelt wurden, zeigte, dass sich innerhalb des T-Zell-Kompartiments  $CD4^+$  Zellen öfters teilten als  $CD8^+$  Zellen, die  $CD4^+$ -Zell-Aktivierung also effizienter war als die der  $CD8^+$  Zellen.

Zusammenfassend zeigen hier aufgeführte Versuche, dass die neuen superagonistischen anti-CD28 mAk effektive T-Zell-Mitogene *in vivo* darstellen.



**Abbildung 8: Vergleich der Wirkung von superagonistischem, CD28-spezifischem mAk auf  $CD4^+$  T Zellen und  $CD8^+$  T Zellen**

Lethal bestrahlte ( $CD45^a$ ) Ratten erhielten 40 Millionen  $CD45^b$ , CFSE-markierte T Zellen aus Lymphknoten entsprechender Donortiere und wurden mit superagonistischem CD28-spezifischem mAk (1mg am Tag 1, iv) behandelt. Milzzellen wurden am Tag 2 nach Antikörpergabe entnommen und gegen  $CD45^b$ , CD4 und CD8 gefärbt.

### 3.1.2. Repopulation der verschiedenen Zellkompartimente in rekonstituierten ATXBM-Ratten nach Behandlung mit superagonistischem, CD28-spezifischem mAk

#### 3.1.2.1. *In-vivo*-Rekonstitutionsmodell

Auf Grund der Fähigkeit von CD28-Superagonisten, eine starken T-Zell-Proliferation in Abwesenheit eines TZR-Signales zu induzieren, ist die Anwendung solcher Antikörper zu therapeutischen Zwecken in immunsupprimierten Patienten denkbar. Daher hatten weitere Arbeiten die Untersuchung der qualitativen und quantitativen Aspekte einer Immunantwort nach erfolgter Rekonstitution eines T-Zell-Kompartiments mittels CD28-Superagonisten zum Ziel. Dafür kam ein *in-vivo*-Modell T-lymphopenischer Ratten zur Anwendung. Dieses Modell wurde von Marta Rodríguez-Palmero entwickelt und im Laufe der hier aufgeführten Versuche in einigen Punkten (besonders für die Immunisierung mit KLH) verändert. Da die T-Lymphopenie im Erwachsenenalter nachgestellt werden sollte, in dem die Regeneration auf Grund der Thymusatrophie vorwiegend von residualen, peripheren T Zellen erfolgt, wurde mit thymektomierten Tieren gearbeitet (Mackall et al. 1997; Jameson 2002).

Für die Beschreibung der Repopulation der verschiedenen Zellgruppen (T Zellen, B Zellen, Monozyten, Granulozyten) kam noch das ursprünglich aufgestellte Protokoll einer Rekonstitution thymektomierter Ratten zur Anwendung. Die Vorgehensweise war wie folgt:

Thymektomierte PVG-Ratten, welche das CD45<sup>a</sup>-Molekül exprimieren, wurden mit einer lethalen Dosis von 10Gray eine halbe Stunde bestrahlt (<sup>137</sup> Cäsium-Quelle). Am selben Tag erfolgte auch die Gabe von 5x10<sup>7</sup> syngenen Knochenmarkzellen (KM) und 5x10<sup>6</sup> T Zellen (nur rund 1/1000 der normalen T-Zell-Zahl in einer Ratte), gewonnen aus den Lymphknoten von kongenen (CD45<sup>b</sup>) PVG-Ratten. Inokuliert wurde intravenös. Die Anwendung dieses kongenen Systems ermöglichte die Beobachtung der Entwicklung des peripheren Inokulums ausgereifter T Zellen, da sie jetzt von syngenen T Zellen (die vom transferierten Knochenmark abstammen) mit Hilfe eines CD45<sup>b</sup> spezifischen mAk unterscheidbar waren. Einen Tag nach der Rekonstitution erfolgte die Gabe von Isotyp-Kontrolle (anti-hCD7 oder MOPC-31C) und superagonistischem anti-rat CD28mAk (JJ316). Inokuliert wurde intravenös jeweils 1mg in 1ml PBS. Im

Anschluss an diese Behandlung wurden wöchentlich periphere Blut-Leukozyten-Analysen durchgeführt, wobei hier ein besonderes Augenmerk auf die Entwicklung der transferierten CD45<sup>b</sup>- $\alpha\beta$ T-Zellen gelegt wurde. Außerdem wurde der Zellzahlverlauf von B-Zellen, Granulozyten, Monozyten und  $\gamma\delta$ T Lymphozyten analysiert.

### **3.1.2.2. Repopulation der einzelnen Leukozytenpopulationen im Blut bzw. in den sekundären Lymphorganen (Milz und Lymphknoten) lymphopenischer Ratten nach Inokulation von superagonistischem anti-CD28 mAk**

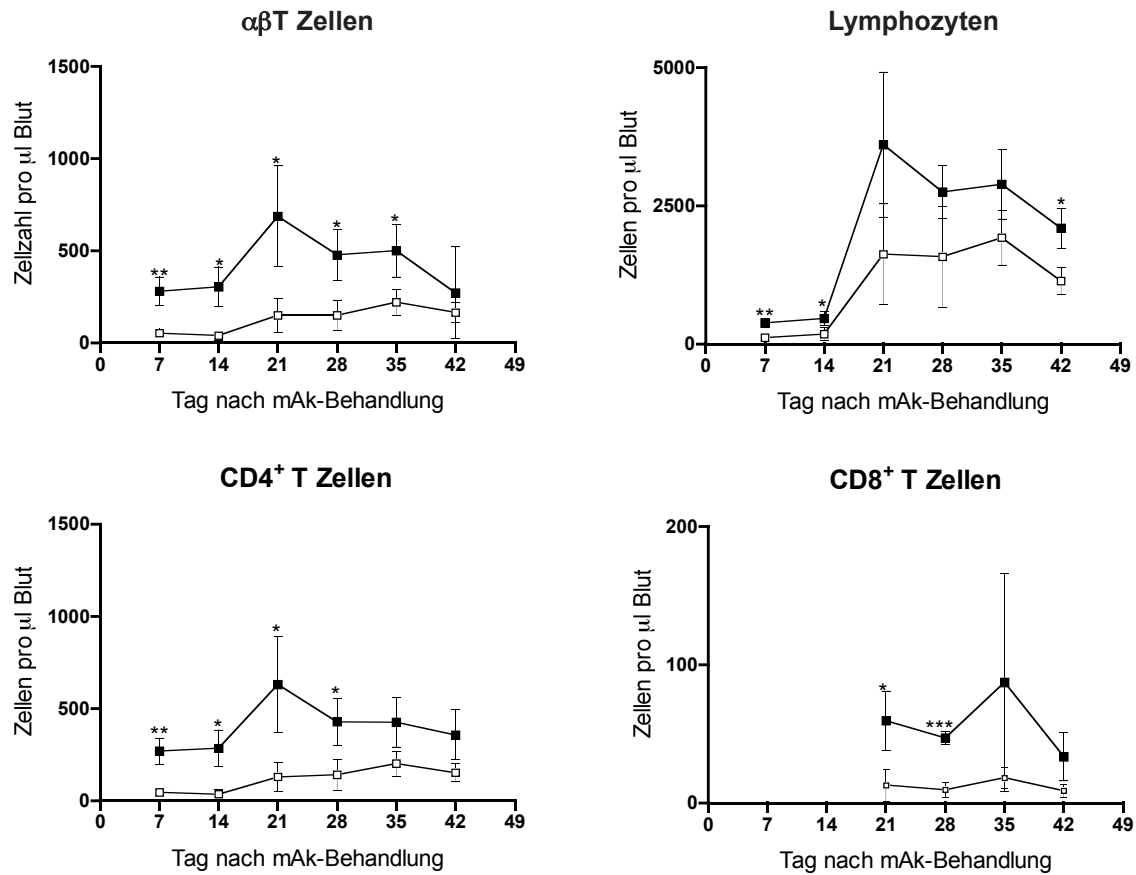
#### **3.1.2.2.1. Blut (Abbildung 9)**

Bei Tieren, welche mit superagonistischem anti-CD28 mAk behandelt wurden, zeigte sich innerhalb von drei Wochen ein dramatischer Anstieg der T Zellen im Blut. Ein Vergleich zwischen Kontrolltieren und behandelten Tieren ergab bis zu 10fach gesteigerte  $\alpha\beta$ T-Zellzahlen. Dabei kam es zu einem rapiden Anstieg von sowohl CD4<sup>+</sup> (bis zu 10fach im Vergleich mit der Isotypkontrolle) als auch CD8<sup>+</sup> T Zellen (bis zu 6fach im Vergleich mit der Isotypkontrolle), wobei bei letzt genannter Population die maximal erreichte Expansion weniger markant ausfiel.

Nach ca. drei Wochen setzte eine sichtbare Verringerung der im Blut zirkulierenden T Lymphozyten ein. Jedoch blieben die mit CD28 Superagonist behandelten Tiere im klaren Vorteil gegenüber den mit Isotypkontrolle behandelten.

In den meisten durchgeführten Versuchen mit ATXBM-Ratten waren nur wenige syngene CD4<sup>+</sup> bzw. CD8<sup>+</sup>T<sup>+</sup> (exprimieren das a-Allel von CD45) Zellen vorzufinden. Diese geringe, meist in den ersten Wochen der Rekonstitution auftretende Anzahl von CD45<sup>a</sup> T Zellen könnten „Überlebende“ der Bestrahlung gewesen sein oder aus dem transferierten Knochenmark (KM) stammen (KM beinhaltet rund 1-3% an reifen T Zellen!). Um letzteres zu verhindern, wurde bei späteren Experimenten das KM nach T Zellen aufgereinigt (siehe auch: Veränderungen am Rekonstitutionsmodell).

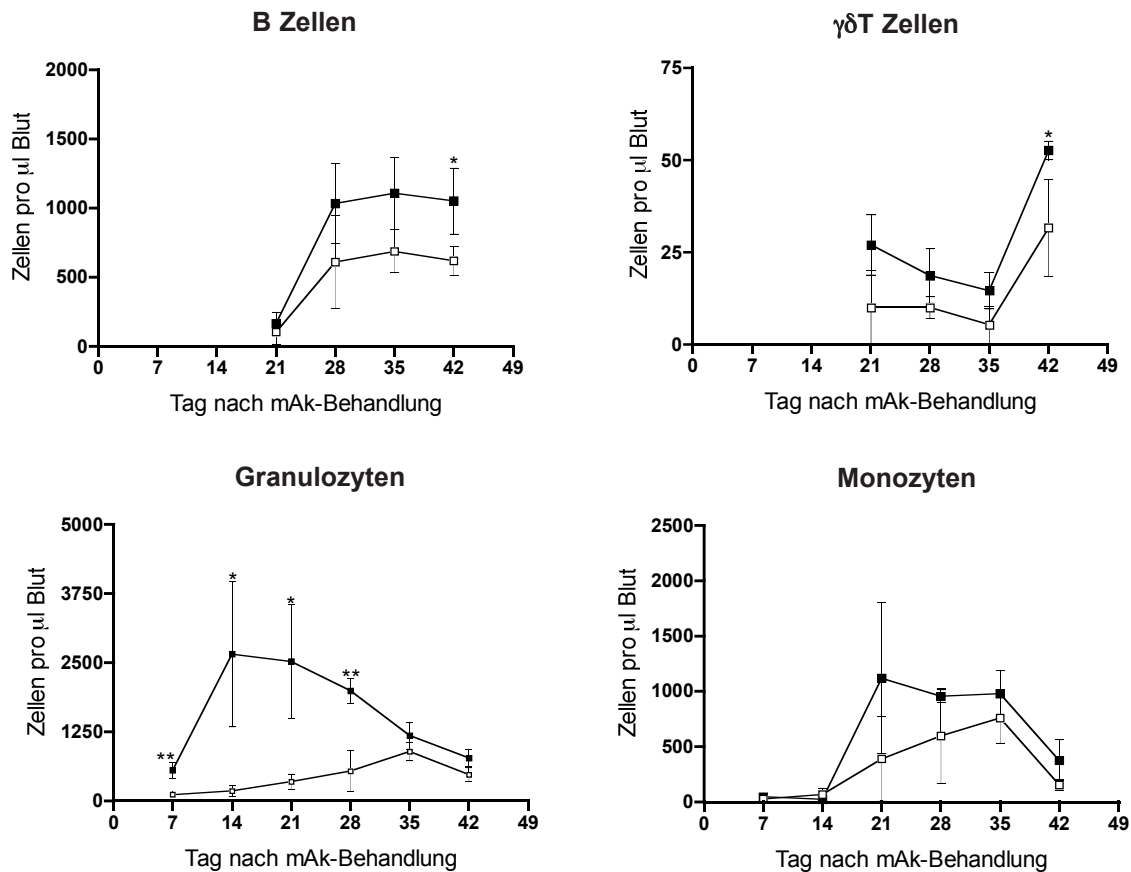
Nach einer erfolgreichen Rekonstitution blieb das T-Zell-Kompartiment der thymektomierten und mit superagonistischen CD28-mAk behandelten Tiere in seiner Größe jedoch unter der Zellzahl in einem normalen Tier. Die in einer gesunden Ratte vorhandenen 2000 T Zellen/ $\mu$ l Blut wurden nur ca. bis zu  $\frac{2}{3}$  erreicht. An dieser Stelle sollte jedoch daran erinnert werden, dass das initiale T-Zell-Inokulum von  $5 \times 10^6$  Zellen nur ungefähr  $\frac{1}{1000}$  der Zellzahl in normalen Tieren entspricht. Von dieser Seite betrachtet ist eine  $\frac{2}{3}$  Repopulation der T Zellen, welche im Blut JJ316 behandelter Ratten erreicht wird, erstaunlich hoch.



**Abbildung 9: T-Zell-Expansion in ATXBM-Ratten nach Behandlung mit superagonistischem anti-CD28 mAk**

ATXBM-Ratten wurden mit 50 Millionen syngenen (CD45<sup>a</sup>) Knochenmarkzellen und 5 Millionen kongenen (CD45<sup>b</sup>) T Zellen rekonstituiert und erhielten ein intravenöses Inokulum von entweder 1mg superagonistischem anti-CD28 mAk (■) oder 1mg Isotypkontrolle (MOPC-31C, □). Blut wurde in wöchentlichen Abständen nach Lymphozyten, αβT Zellen, CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T Zellen analysiert. Mittelwerte und Standardabweichungen von je 3 Tieren pro Gruppe. \* P<0,05; \*\*P>0,01; \*\*\*P<0,001

5-10% der  $5 \times 10^6$  transferierten T Zellen exprimierten nicht  $\alpha/\beta$ , sondern  $\gamma/\delta$  Rezeptoren. Außerdem sind aktivierte T Zellen in der Lage, durch Produktion von Wachstumsfaktoren wie GM-CSF auch die Vermehrung anderer Lymphozyten zu fördern. Deshalb wurde die Repräsentanz anderer Leukozyten nach erfolgter Rekonstitution und CD28 Superagonist Behandlung ebenfalls untersucht.



**Abbildung 10: Repopulation der B Zellen,  $\gamma\delta$ T Zellen, Granulozyten und Monozyten in ATXBM-Ratten nach erfolgter Rekonstitution und CD28-Superagonist Behandlung.**

Lethal bestrahlte PVG ( $\text{CD45}^a$ ) Ratten erhielten 50 Millionen syngene Knochenmarkszellen und 5 Millionen  $\text{CD45}^b$  T Zellen aus Lymphknoten und wurden mit superagonistischem CD28-spezifischem mAk (■) oder Isotypkontrolle MOPC-31C (□) behandelt (1mg am Tag 1, iv). B Zellen,  $\gamma\delta$ T Zellen, Monozyten und Granulozyten wurden über 6 Wochen im Blut analysiert. Mittelwerte und SD stammen von je 3 Tieren einer Gruppe. \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$

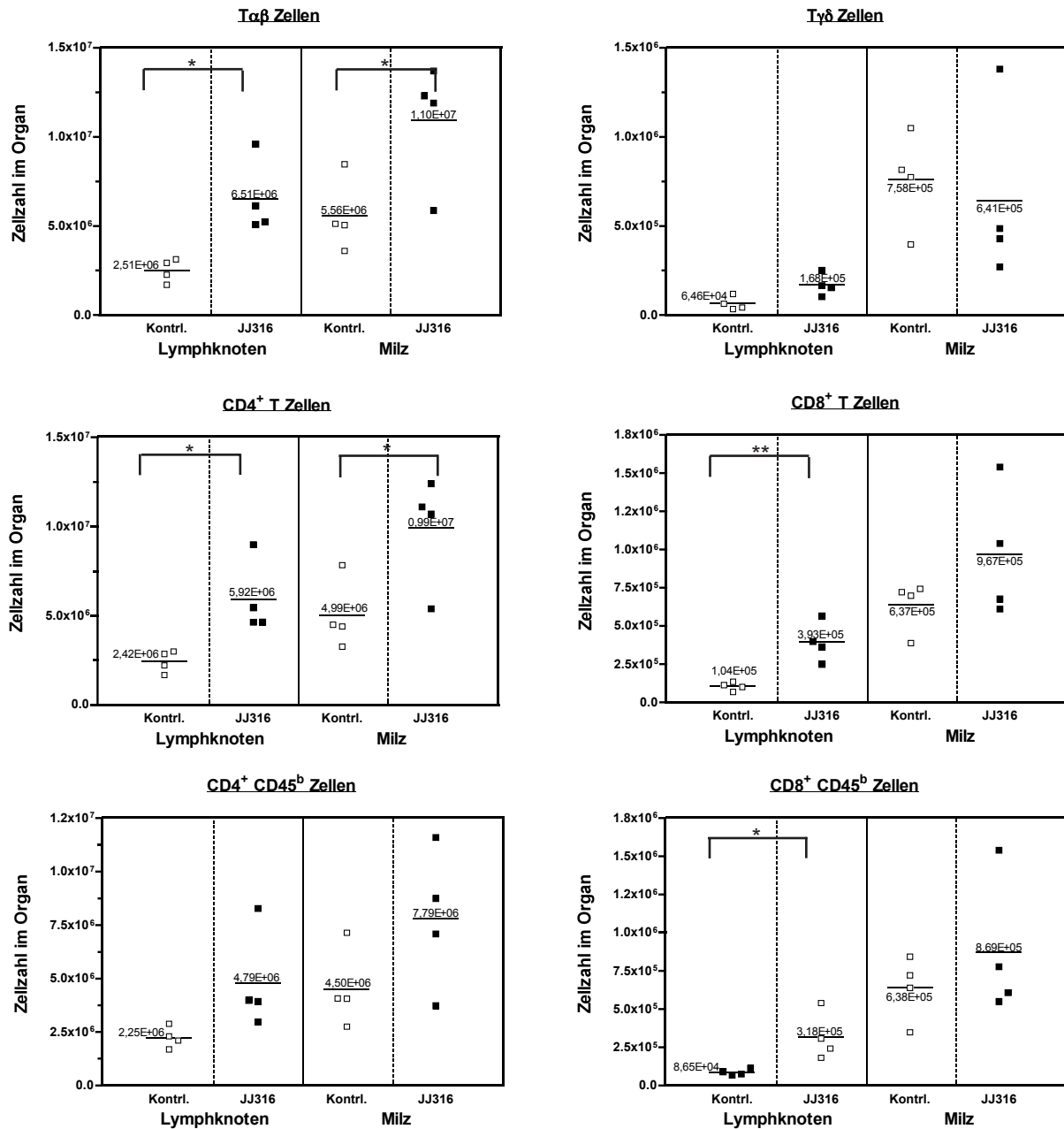


Es zeigten sich nur geringfügige Unterschiede bei B Zellen,  $\gamma\delta$ T Zellen und Monozyten (Abbildung 10).

Die Behandlung mit CD28-Superagonist hat jedoch einen starken Einfluss auf die Kinetik der Repopulation von Granulozyten - deutlich sichtbar an einer stark erhöhten Anzahl an zirkulierenden Zellen dieser Population im Blut. Bereits eine Woche nach mAk-Gabe konnte eine 4fach erhöhte Zellzahl gegenüber der Isotypkontrollgruppe festgestellt werden; zwei Wochen später hatten die mit superagonistischem mAk behandelten Tiere sogar bis zu 8mal mehr Granulozyten im Blut. Eine direkte Stimulation ist in diesem Falle nicht möglich, da Granulozyten kein CD28 exprimieren. Es wäre jedoch denkbar, dass die über JJ316 induzierte Granulozytose auf die Sekretion von GM-CSF (Granulozyten/ Makrophagen Kolonie stimulierender Faktor) durch T Zellen zurückzuführen ist.

#### 3.1.2.2.2. Sekundäre Lymphorgane (Abbildung 11)

Im weiteren sollte das Verhalten des T-Zell-Kompartiments in den sekundären Lymphorganen Milz und Lymphknoten untersucht werden, und zwar zu einem Zeitpunkt, an welchem sich die einzelnen Komponenten der T-Zell-Population im Blut nach der erwähnten Verringerung nahezu stabilisiert hatten - ca. 7 Wochen nach mAk-Behandlung. Milz und Lymphknoten wurden entnommen, und gewonnene Zellen mittels FACS-Analyse ausgewertet. Waren jetzt die Unterschiede zwischen Superagonist-Behandlung und Kontrollgruppe im Blut noch erkennbar, aber nicht mehr signifikant, so konnte in den genannten Organen eine ganz andere Situation vorgefunden werden. Hier zeigten sich bei den  $\alpha\beta$ T Zellen noch deutliche, auch statistisch signifikante Unterschiede. Jedoch gab es keine Differenzen zwischen Kontrolltieren und JJ316-behandelten Tieren im Bezug auf  $\gamma\delta$ T Zellen. Die Ergebnisse zeigen, dass die Auswirkung der durch CD28-Superagonist gesteuerten starken Expansion innerhalb der T-Zell-Population noch längere Zeit danach in den sekundären lymphatischen Organen erkennbar ist.



**Abbildung 11: Langzeit-Repopulation der verschiedenen T-Zell-Kompartimente T-lymphopenischer Ratten 47 Tage nach Gabe von superagonistischem, CD28-spezifischem mAk**

Lethal bestrahlte, thymektomierte PVG-Ratten (CD45<sup>a</sup>) erhielten 50 Mio syngene Knochenmarkszellen und 5 Mio kongene (CD45<sup>b</sup>) T Zellen. Diagramme zeigen Repopulation der T-Zell-Kompartimente in den Organen Lymphknoten und Milz 47 Tage nach iv-Injektion von 1mg superagonistischem, CD28-spezifischem mAk (■) oder 1mg Isotypkontrolle (MOPC-31C, □). \*P<0,05; \*\*P<0,01

## 3.2. Quantitative Aspekte der Immunantwort der mit superagonistischem anti-CD28 mAk therapierten, T-lymphopenischen Ratten

### 3.2.1. Transplantatabstoßung

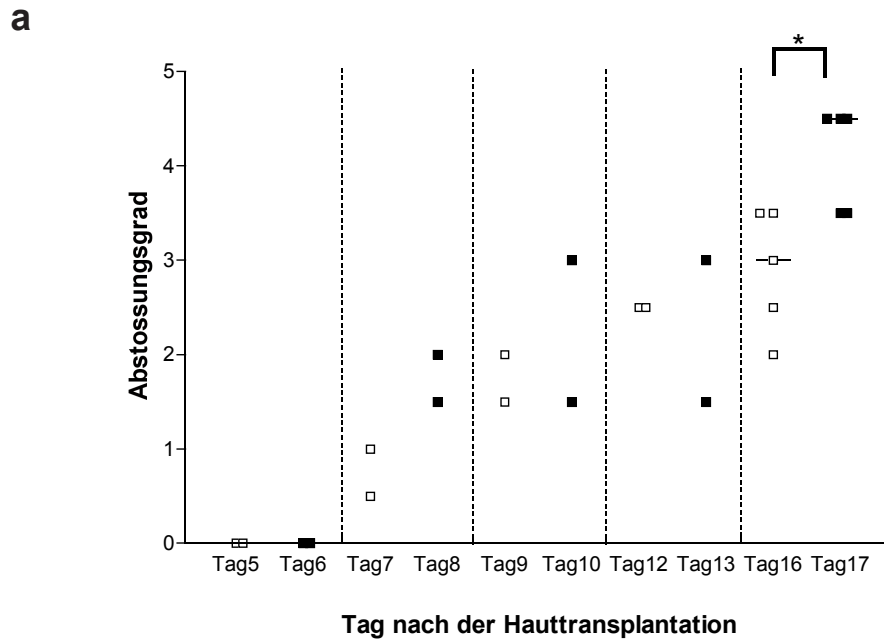
Die Abstoßung eines allogenen Hauttransplantates (Transplantat, welches zwischen genetisch im MHC-verschiedenen Individuen einer Spezies verpflanzt wird) diente als *in vivo* Test der Fähigkeit von T Zellen, welche zuvor transferiert und mit superagonistischen anti-CD28 mAk vermehrt wurden, Alloantigene *in vivo* zu erkennen.

Thymektomierte PVG-Ratten (RT1<sup>c</sup>) erhielten 5 Wochen nach Zelltransfer ein Hauttransplantat von einer LEW-Ratte (RT1<sup>b</sup>) (allogenes Transplantat) und als negativ Kontrolle gleichzeitig auch ein PVG-Hauttransplantat (syngenes Transplantat = Transplantat zwischen genetisch identischen Individuen; in vorliegendem Falle zwischen Ratten des selben Inzuchtstammes). Gesunde Tieren zeigen eine Abstoßung des allogenen Transplantats nach ungefähr 10 Tagen (Mitteilung von Dr. Christoph Otto, Klinik für Chirurgie, Würzburg). Ca. 14 Tage nach erfolgter Transplantation war eine deutliche Abstoßung des allogenen Gewebes bei anti-CD28-behandelten sowie bei Kontrolltieren zu erkennen. Dabei konnte beobachtet werden, dass bei dem LEW-Hauttransplantat zunächst eine Entzündungsreaktion nach ca. einer Woche begann, deren Folge eine Nekrotisierung des Gewebes war. Dabei schrumpfte die transplantierte Haut, verhärtete und begann, sich von dem umgebenen Gewebe abzulösen. Nach vollständigem Ablösen bildete sich innerhalb von einer Woche wieder neue Haut. Im Kontrast dazu blieb das syngene Hauttransplantat völlig intakt. Von anfänglichen leichten Entzündungsreaktionen abgesehen, zeigte es schon innerhalb einer Woche beginnendes Einwachsen von Gefäßen, was wiederum ein deutliches Indiz dafür war, dass das Gewebe akzeptiert wurde.

Der Verlauf der Abstoßungsreaktion wurde als Abstoßungsgrad quantifiziert, in welchen Beobachtungen dreier Personen einfließen. In Abbildung 12a ist zunächst zu erkennen, dass alle Tiere, einschließlich aller Isotypkontrollen, das allogene Transplantat abgestoßen hatten. Außerdem ist zu erkennen, dass die mit superagonistischem anti-CD28 mAk behandelten Tiere eine, wenn auch nur geringfügig, aber doch deutlich sichtbar schnellere Abstoßungsreaktion zeigten als die Kontrolltiere. Der Grund dafür könnte die geringere T-Zell-Zahl der Kontrolltiere zum Zeitpunkt der

Transplantation sein, die sich in einer verminderten Fähigkeit, körperfremdes Gewebe zu eliminieren, widerspiegelt. Zusammenfassend zeigt dieser Versuch, dass mittels Superagonist JJ316 expandierte T Zellen *in vivo* die Fähigkeit besitzen, körperfremde Proteine zu erkennen. Die durch CD28-Stimulation erhöhte T Zellzahl könnte sogar zur Verbesserung der Immunreaktion beitragen.

Hauttransplantationen an thymektomierten Ratten, die nur Knochenmark-rekonstituiert waren, zeigten eine sehr verzögerte Abstoßung. Dass diese Reaktion überhaupt auftrat, war wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass trotz Bestrahlung und Thymektomie T Zellen in stark verminderter Zahl in den Tieren auftraten (Daten nicht gezeigt!).



**Abbildung 12: Abstoßung eines Hauttransplantates durch ATXBM PVG Ratten, mit 5 Millionen T Zellen rekonstituiert und mit superagonistischem CD28-mAk bzw. Isotypkontrolle behandelt**

a) Lethal bestrahlte PVG (CD45<sup>a</sup>) Ratten erhielten 50 Millionen syngene Knochenmarkzellen und 5 Millionen CD45<sup>b</sup> T Zellen aus Lymphknoten und wurden mit superagonistischen CD28-spezifischen mAk (■) oder Isotypkontrolle MOPC-31C (□) (1mg am Tag 1, iv) behandelt. Gezeigt ist die Abstoßung eines am Tag 35 (nach Rekonstitution) im Brustbereich der Tiere gesetzten, allogenen Hauttransplantats. Verwendete Einteilung des Abstoßungsgrades: 0 = keine Reaktion; 1 = Entzündungsreaktion beginnt; 2 = Nekrose beginnt; 3 = Nekrose; 4 = beginnende Abstoßung; 5 = komplette Abstoßung. Ermittlung der Signifikanz nur am Tag 5, da hier die Gruppengrößen (n=5) groß genug waren. \*P<0,05.

b) Kontrollratte am Tag 9 nach der Transplantation (links: syngenes Transplantat - rechts: allogenes Transplantat)

c) mit superagonistischem CD28-spezifischem mAk (1mg) behandelte Ratte am Tag 10 (links: syngenes Transplantat - rechts: allogenes Transplantat)

### 3.2.2. Immunisierung T-lymphopenischer Ratten mit dem Modellantigen KLH

Die Funktionsfähigkeit *in vivo* durch CD28 Stimulation expandierter T Zellen wurde zusätzlich anhand der Immunantwort auf das Modellantigen KLH (Haemocyanin der Napfschnecke) geprüft.

#### 3.2.2.1. Optimierung des Rekonstitutions- und Immunisierungsprotokolls

Im Rahmen der Untersuchungen an ATXBM-Ratten wurden schon verschiedene Tests zur Immunantwort auf KLH von M. Rodríguez-Palmero durchgeführt. Es gelang aber in diesem System nicht, konsistente Ergebnisse zu erzielen. So reagierten Ratten, der mit superagonistischen mAk behandelten Gruppe, mit extrem unterschiedlich starken Immunantworten gemessen in Proliferationsassays bzw. ELISAs für KLH-spezifische Ak.

Teilweise war eine gute Recall-Antwort zu erkennen, aber die Ak-Produktion blieb aus.

In manchen Versuchen wurde das Auffinden von T Zellen des peripheren Inokulums (RT7<sup>b</sup>) erschwert, weil eine hohe Anzahl von syngenen T Zellen (RT7<sup>a</sup>, bis zu 12% des gesamten Repertoires) auftrat - ein nach Thymektomie unerwarteter Befund.

Auf Grund dieser Schwierigkeiten wurden das Rekonstitutions- und auch das Immunisierungsprotokoll in einigen Details abgeändert (Abbildung 13).

Zunächst wurde die Frage nach dem Ursprung der unerwartet auftretenden syngenen T Zellen nach erfolgter Thymektomie + lethaler Bestrahlung angegangen. Eine fehlerhafte Bestrahlung konnte ausgeschlossen werden, da in anderen Arbeitsgruppen bei Verwendung der gleichen Cäsiumquelle, keine restlichen Lymphozyten gefunden wurden. Wie bereits erwähnt, können reife T Zellen, die im Knochenmark (KM) zu 1-3% vorhanden sind, in die Peripherie gelangen. Daher wurde das KM vor dem Transfer von T Zellen depletiert. Anschließend wurden  $5 \times 10^7$  KM-Zellen/Ratte ( $< 1\%$  T Zellen) intravenös inokuliert. Das Problem der in höherer Anzahl auftretenden syngenen T Zellen konnte allerdings durch diese Maßnahme nicht im Ganzen gelöst werden. Da immer wieder rekonstituierte Tiere mit höheren syngenen T-Zellzahlen auftraten, ist es wahrscheinlich, dass bei einzelnen Ratten keine vollständige Thymektomie erzielt worden war, so dass KM-abgeleitete T Zellen *de novo* differenzieren konnten. Daher wurden Tiere, bei denen der Anteil an syngenen T Zellen größer als 10% war ausgeschlossen

Das wiederholt beobachtete Ausbleiben einer Antikörper-Antwort bei guter Recall-Antwort im Sinn einer Antigen-spezifischen *in-vitro*-Proliferation der T Zellen warf die Frage auf, ob zum Zeitpunkt der Immunisierung das B-Zell-Kompartiment noch nicht vollständig wiederhergestellt war. So kam es zwar mit superagonistischem CD28 mAk zu einer starken T-Zell-Expansion innerhalb von drei Wochen, während die ebenfalls durch die lethale Bestrahlung zerstörte B-Zellpopulation noch nicht nachgereift war. Um für die B-Zell-Repopulation mehr Zeit zur Verfügung zu stellen ohne die Immunisierung mit KLH später als drei Wochen nach CD28-Superagonist-Behandlung durchzuführen (Zu diesem Zeitpunkt zeigte sich der größte Unterschied zwischen den Tieren der JJ316 Gruppe und den Tieren der Isotypkontrolle! Siehe auch Abschnitt 3.2.1.3.), wurden der KM- und T-Zell-Transfer auf verschiedene Zeitpunkte gelegt. So erfolgte zunächst am Tage der Bestrahlung der Transfer von KM-Zellen für die Rekonstitution des B-Zell-Kompartiments, und drei Wochen später wurden 5 Mio periphere T Zellen inokuliert. Das B-Zell-Kompartiment konnte sich nun in diesen drei Wochen besser anschließen.

Trotzdem blieb die Frage offen, warum manche Tiere keine Immunreaktion auf KLH zeigten. Zwar genügte es bei manchen Tieren, in Anlehnung an das für Mäuse übliche Protokoll, KLH in Alaun präzipitiert i.p. zu inokulieren, um eine starke Antwort hervorzurufen. In anderen Fällen zeigte sich jedoch selbst dann keine Reaktion, wenn zusätzlich hitzeinaktivierte *Bordetella pertussis*-Bakterien verabreicht wurden. Zur Lösung dieses Problems wurde die Immunisierungs-route variiert. In einer Versuchsreihe mit normalen Ratten ergab sich, dass intramuskuläre (im) bzw. subkutane (sc) Verabreichung von KLH in Alaun eine deutlich zuverlässigere Immunantwort initiierte, bei der keine Tiere ohne Reaktionen (im Proliferationsassay bzw. Ak-Produktion) auftraten. Eine weitere Verbesserung der KLH-Immunisierung wurde beim Wechsel von Alaun zu Titermax<sup>R</sup> erreicht. Titermax<sup>R</sup> zeigt große Ähnlichkeiten zum Freund'schen Adjuvants, ist aber wesentlich weniger toxisch für Tiere. Als optimales Immunisierungsprotokoll erwies sich die intramuskuläre Inokulation (in den Musculus glutaris) mit 100µg KLH in Titermax pro Tier.

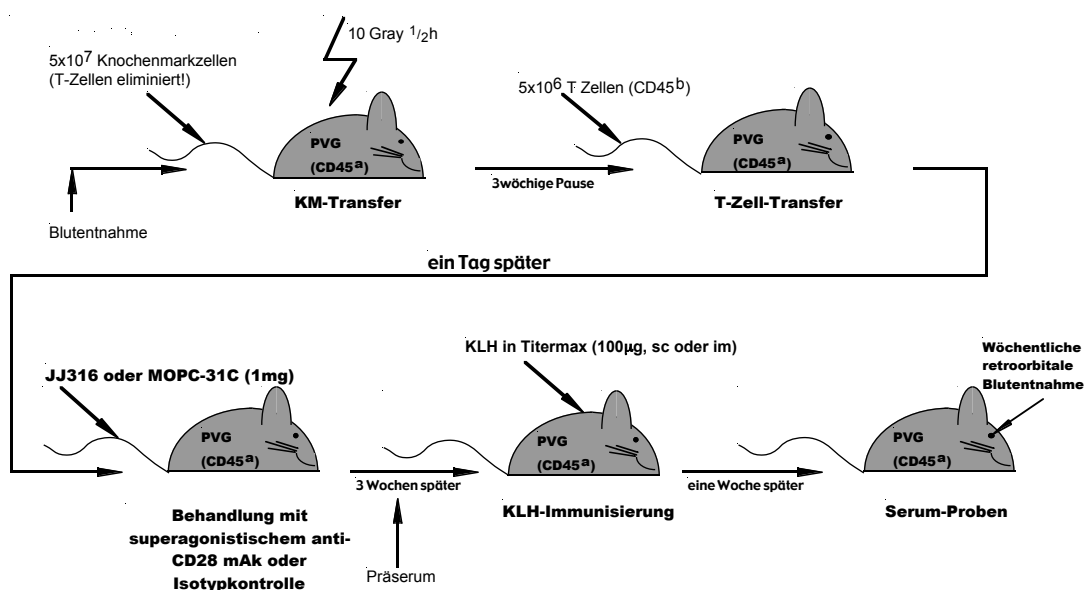


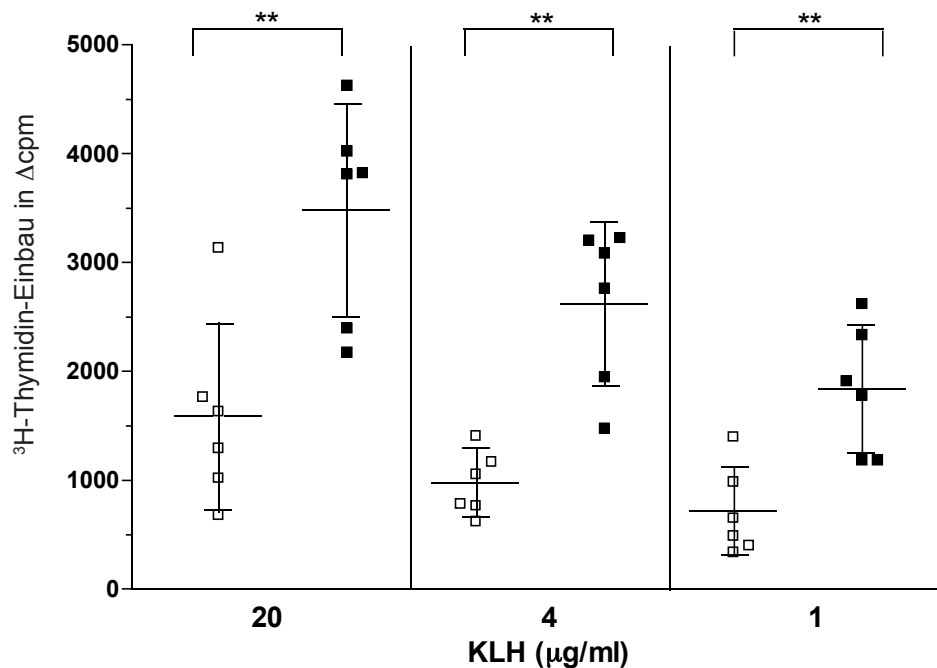
Abbildung 13: Modifiziertes Modell für die Rekonstitution von ATXBM Ratten mit syngenen KM und allotyp-markierten T Zellen

### 3.2.2.2. Proliferation von T Zellen aus CD28-Superagonist behandelten, KLH-immunisierten Ratten nach Restimulation *in vitro*

ATXBM-Ratten wurden zunächst drei Wochen nach Behandlung mit CD28-Superagonist bzw. Isotypkontrolle MOPC-31C mit 100µg KLH in Titermax<sup>R</sup> (1:1) immunisiert. Wiederum vier Wochen später wurden die Tiere getötet, und Lymphknoten- sowie Milzzellen für eine Restimulation mit unterschiedlichen Konzentrationen von KLH (20µg/ml, 4µg/ml und 1µg/ml) entnommen. Anhand der proliferativen Recall-Antwort, gemessen über den Einbau von <sup>3</sup>H-Thymidin, konnte anschließend die Reaktivität der KLH-geprägten T Zellen quantifiziert werden.

Bei allen getesteten KLH-Konzentrationen zeigte sich sowohl bei Lymphknoten als auch in der Milz, dass die Ratten, welche mit CD28-Superagonist vorbehandelt waren, mit einer höheren Proliferationsrate antworteten als die Tiere der Isotypkontrolle. Somit konnte gezeigt werden, dass mittels mitogenem antiCD28 mAk expandierte T Zellen in der Lage sind Gedächtnis-T-Zellen zu bilden, und zwar deutlich besser als die Kontrolltiere. Abbildung 14 zeigt stellvertretend für alle durchgeführten Tests die Proliferationsraten von KLH-geprägten Milzzellen.

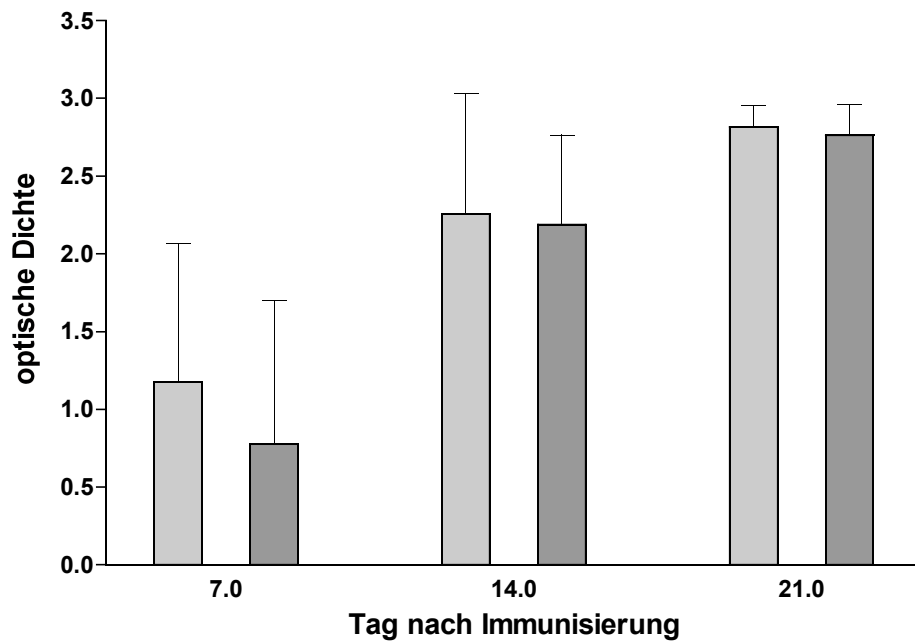




**Abbildung 14: Recall-Antwort T-lymphopenischer Ratten behandelt mit superagonistischem anti-CD28 mAk bzw. Isotypkontrolle**

Proliferation als Antwort auf eine KLH-Immunisierung (■ = superagonistischer antiCD28 mAk; □ = Isotypkontrolle MOPC-31C) Gezeigte Mittelwerte und SD aus einem Versuch mit 6 Tieren pro Gruppe; \*\*P<0,01  
 $\Delta$ cpm = cpm stimuliert - cpm unstimuliert

Zur Bestimmung der Antikörperproduktion nach einer KLH-Immunisierung wurde den Tieren nach KLH-Inokulation wöchentlich retroorbital Blut entnommen, und das daraus gewonnene Serum in einem KLH-spezifischen ELISA getestet. Wie in Abbildung 15 zu erkennen ist, wurden nach einer Behandlung, wie in Abbildung 13 gezeigt, hohe Titer an KLH-spezifischen Antikörpern sowohl bei der Isotypkontrolle als auch bei den Tieren, welche mit superagonistischem mAk behandelt wurden, nachgewiesen. Dies bedeutet, dass auch ohne eine induzierte T-Zell-Expansion die T-Zell-Hilfe in Bezug auf jenes hoch immunogene Protein gesättigt war.



**Abbildung 15: Produktion KLH-spezifischer Antikörper in T-lymphopenischen Ratten behandelt mit superagonistischem anti-CD28 mAk bzw. Isotypkontrolle**

Antikörperproduktion nach KLH-Immunisierung gemessen im Serum (Verdünnung 1:100) der Tiere (hellgrau = Isotypkontrolle MOPC-31C; dunkelgrau = superagonistischer anti-CD28 mAk). Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus einem Versuch mit 6 Tieren pro Gruppe.

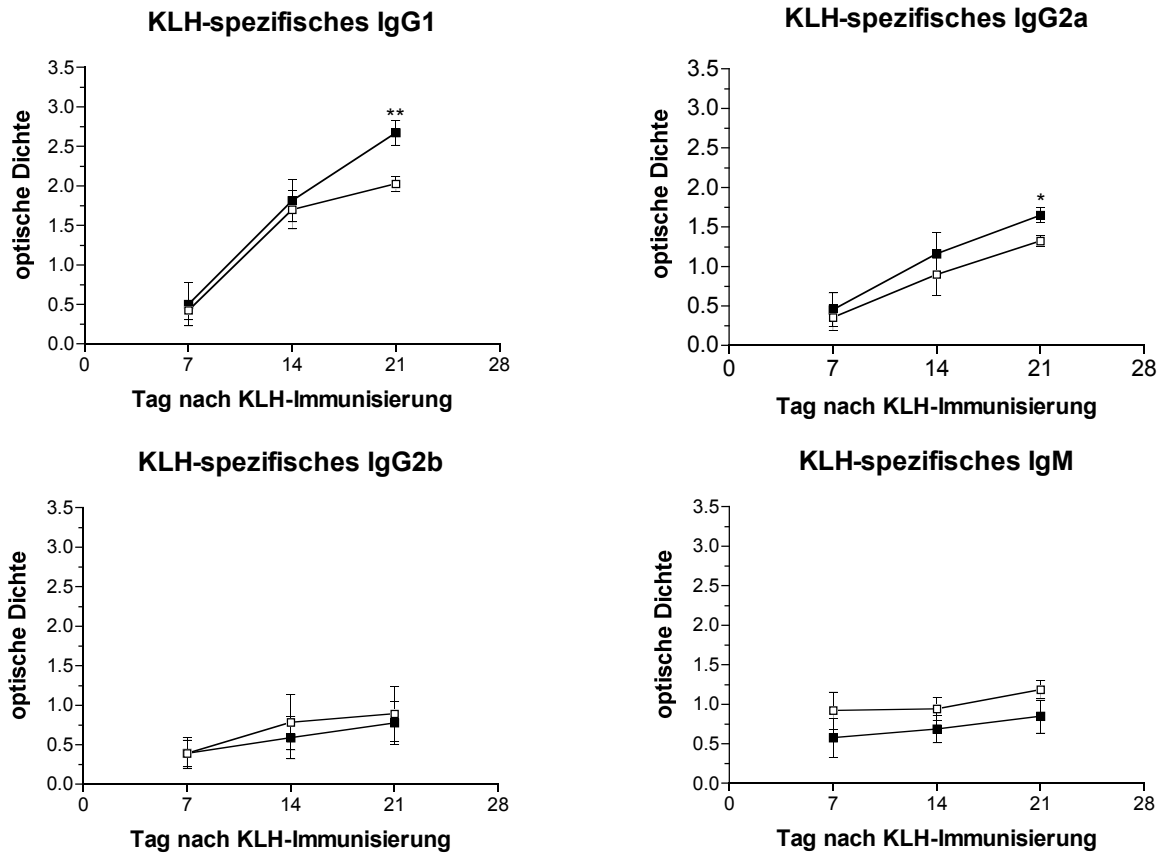
### **3.3. Qualitative Aspekte der Immunantwort der mit mitogenem anti-CD28 mAk therapierten, T-lymphopenischen Ratten**

#### **3.3.1. Immunglobulinklassen im Blut T-lymphopenischer Ratten nach Therapie mit superagonistischem anti-CD28 mAk**

Zur Beurteilung möglicher qualitativer Veränderungen der Immunantwort nach Behandlung von T-lymphopenischen Ratten mit CD28-Superagonist wurde nach Immunisierung mit KLH in wöchentlichen Abständen Blut genommen. Anschließend wurden im Serum dieser Proben mittels isotypspezifischen ELISAs die KLH-spezifischen Antikörper der verschiedenen Immunglobulinklassen IgG1, IgG2a, IgG2b und IgM gemessen.

IgG1 und IgG2a zeigen bei Ratten eine Th2-gewichtete Immunantwort an, während eine verstärkte Bildung von IgG2b für eine Th1-Antwort spricht (Brüggemann, 1988; Mosmann and Coffmann, 1989).

In Abbildung 16 ist zu erkennen, dass drei Wochen nach erfolgter Immunisierung die mit superagonistischem mAk behandelten Tiere mehr IgG1 und IgG2a als die Ratten der Kontrollgruppe produzierten. Im Gegensatz dazu blieben die Werte für IgG2b und IgM nahezu gleich. Die Verstärkung der Antikörperproduktion in CD28-stimulierten Tieren ist somit durch Th2-Zellen vermittelt, im Einklang mit den publizierten Zytokinprofil CD28-stimulierter nicht-lymphopenischer Ratten (Rodríguez-Palmero et al., 1999).



**Abbildung 16: Antikörper der verschiedenen Immunglobulinklassen im Blut von KLH-immunisierten ATXBM PVG Ratten rekonstituiert mit einer kleinen T-Zell-Zahl und behandelt mit superagonistischem, CD28-spezifischem mAk bzw. Isotypkontrolle**

Lethal bestrahlte und zuvor thymektomierte PVG-Ratten erhielten 50 Millionen syngene Knochenmarkszellen (CD45<sup>a</sup>) und 5 Millionen kongene (CD45<sup>b</sup>) T Zellen. Einen Tag nach T-Zell-Transfer erhielt eine Gruppe von je 6 Tieren superagonistischen anti-CD28 mAk (■) eine weitere MOPC-31C als Isotypkontrolle (□) (je 1mg in PBS, iv). 3 Wochen nach Ak-Behandlung wurde mit 100µg KLH in Titermax<sup>R</sup> intramuskulär immunisiert; danach wöchentlich Serum entnommen für Ig-Klassen-spezifische ELISAs. Verdünnung der Seren 1:100; Mittelwerte und SD ermittelt aus einem Versuch mit 6 Tieren. \*P<0,05; \*\*P<0,01.

### 3.3.2. Zytokinproduktion von CD4<sup>+</sup>T Lymphozyten CD28-Superagonist behandelte Tiere nach Restimulation *in vitro*

#### 3.3.2.1. Polyklonale Stimulation mit Concanavalin A

ATXBM-PVG-Ratten erhielten einen Tag nach erfolgter syngener Knochenmarks- und kongener T-Zell-Spende entweder 1mg JJ316 (CD28 Superagonist) oder Isotypkontrolle (MOPC-31C). Drei Wochen später wurden die Tiere getötet und die Lymphknoten entnommen. Die ungetrennten Lymphknotenzellen wurden danach *in vitro* mit ConA unterschiedlich lang restimuliert (zwischen 1 bis 3 Tage). Mittels zytokinspezifischer ELISAs wurde der IL-10, IL-4 und IFN $\gamma$  Gehalt in den Überständen gemessen.

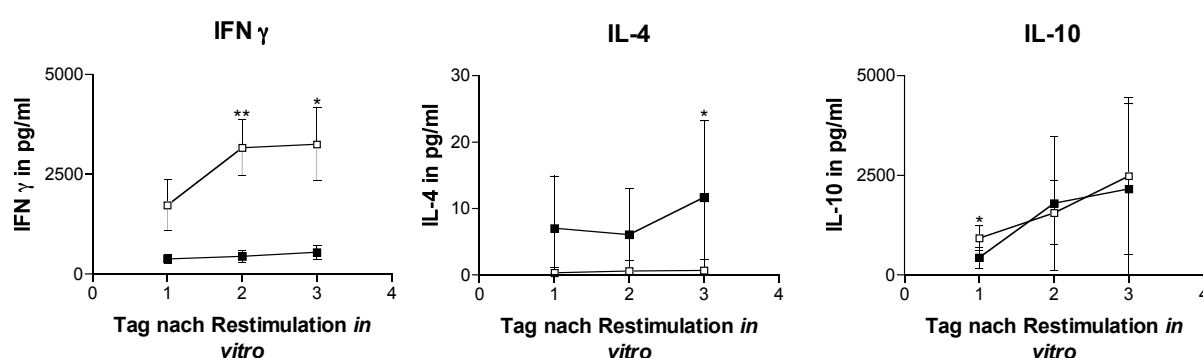
In Abbildung 17 wird sichtbar, dass nach einer polyklonalen *in-vitro*-Stimulation mit ConA keine Differenzen in der IL-10-Produktion zwischen den Kontrolltieren und den mit Superagonist behandelten Tieren auftraten. Dies deckt sich auch mit dem unter Punkt 3.3.3. beschriebenen Absinken der gesteigerten Zellzahl von regulatorischen T Zellen in der expandierten T-Zell-Population nach Abklingen des mitogenen Effektes von superagonistischem CD28 mAk.

Deutlich sichtbar ist jedoch eine erhöhte Produktion von IL-4 und eine niedrigere Produktion von IFN $\gamma$  bei den T-lymphopenischen Tieren, welche eine CD28-Superagonist-Therapie erhielten gegenüber den Tieren der Isotyp-Kontrollgruppe. Dies zeigt an, dass eine Behandlung mit superagonistischem anti-CD28 mAk eine Verschiebung der T-Zell-Funktion in Richtung T-Helfer-Typ 2 verursacht.

#### 3.3.2.2. KLH-Restimulation

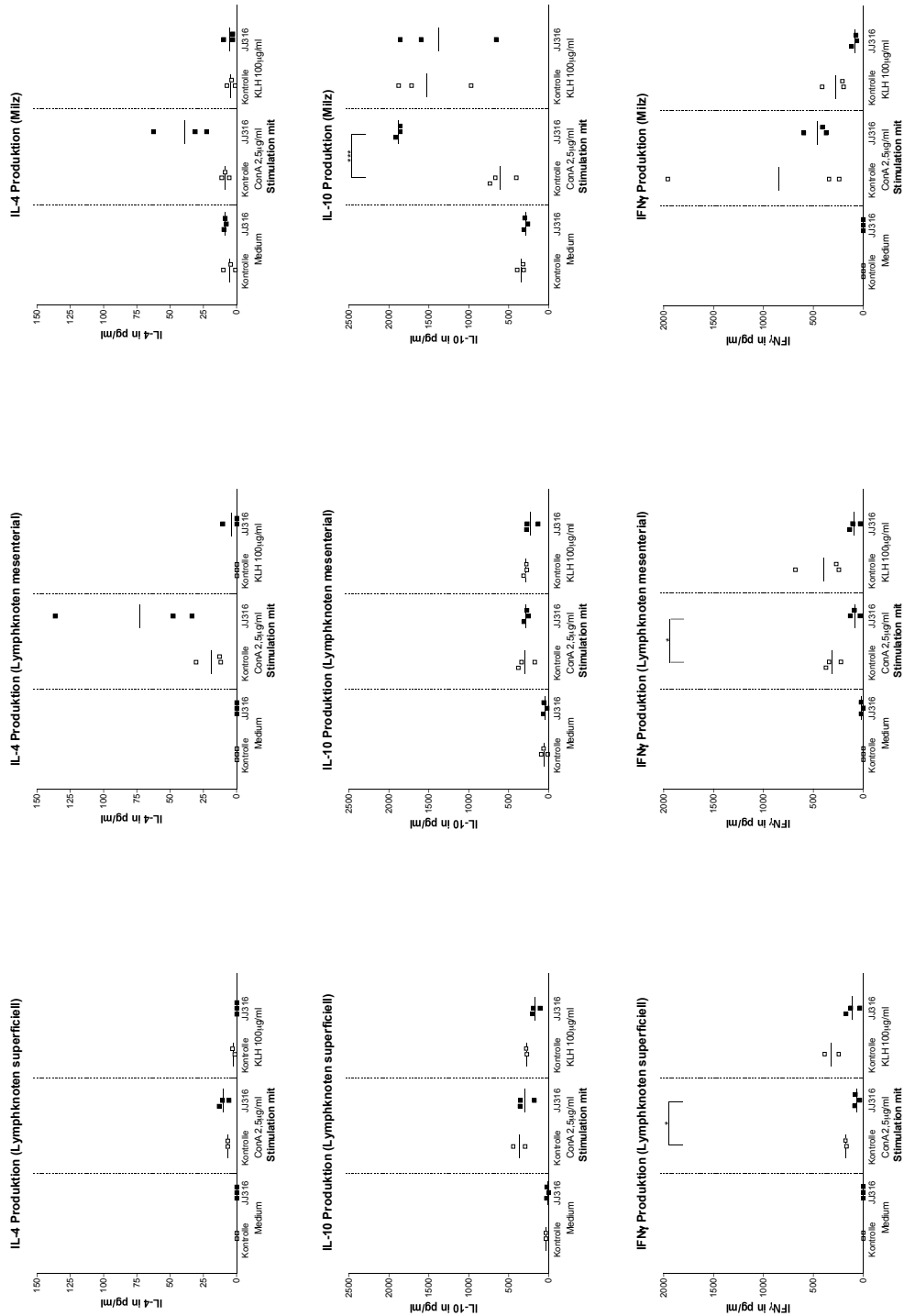
Zum Nachweis der Zytokinproduktion durch KLH-spezifische Zellen wurden Milz- und Lymphknotenzellen aus KLH-immunisierten Ratten isoliert und *in vitro* mit 100 $\mu$ g/ml KLH restimuliert (positive Kontrolle: Concanavalin A). Nach drei Tagen wurden die Überstände gewonnen und in ELISAs auf den Gehalt an IFN $\gamma$ , IL-4 und IL-10 getestet (Abbildung 18). In allen Gruppen wurde IFN $\gamma$ , IL-4 und IL-10 nachgewiesen, wenn auch in unterschiedlichen Verhältnissen. So produzierten sowohl die Milz als auch die Zellen der Lymphknoten mit CD28-Superagonist behandelte Tiere deutlich mehr IL-4 und weniger IFN $\gamma$  als die der Isotypkontrolle. Dies bestätigt wiederum die in früheren Experimenten (Rodríguez-Palmero et al., 1999) schon gezeigte bevorzugte Th2-Polarisierung durch superagonistischen anti-CD28 mAk, wobei es dadurch jedoch nicht zum Erliegen der Th1-Immunantwort (gezeigt an der vorhandenen IFN $\gamma$ -

Produktion) kommt. Auffällig ist eine gesteigerte Produktion von IL-10 von mit CD28-Superagonist behandelten Tieren in der Milz nach einer polyklonalen Stimulation mit ConA, das wieder als polyklonaler Aktivator mitgeführt wurde. Mögliche Erklärungen wären hier vielleicht ein spezielles „homing“-Verhalten von Treg Zellen. Denkbar wäre auch, dass eine andere Leukozytenpopulation der Milz Quelle dieser erhöhten IL-10 Produktion ist. Eine derartig verstärkte IL-10-Produktion konnte bei den Lymphknotenzellen Ak-behandelter Tiere nach polyklonaler Stimulation *in vitro* nicht beobachtet werden (Elflein et al., 2003; s. Punkt 3.3.2.1.).



**Abbildung 17: Concanavalin A induzierte Zytokinproduktion durch Lymphknotenzellen aus T-Zell-rekonstituierten ATXBM-PVG-Ratten behandelt mit superagonistischem, CD28-spezifischem mAk**

Lethal bestrahlte PVG (CD45<sup>a</sup>) Ratten erhielten 50 Million syngene Knochenmarkzellen und 5 Millionen CD45<sup>b</sup> T Zellen aus Lymphknoten und wurden mit superagonistischem, CD28-spezifischem mAk (■) oder Isotypkontrolle MOPC-31C (□) (1mg am Tag1, iv) behandelt. Zytokinmessung nach polyklonaler Stimulation von ungetrennten Lymphknotenzellen (entnommen 3 Wochen nach Ak-Behandlung) mit Concanavalin A (2,5µg/ml). Unstimulierte Kontrollen sind nicht mit aufgeführt, da keine Zytokine meßbar waren. Mittelwerte und SD aus einem Versuch mit je 6 Tieren pro Gruppe. \*P<0,05; \*\*P<0,01



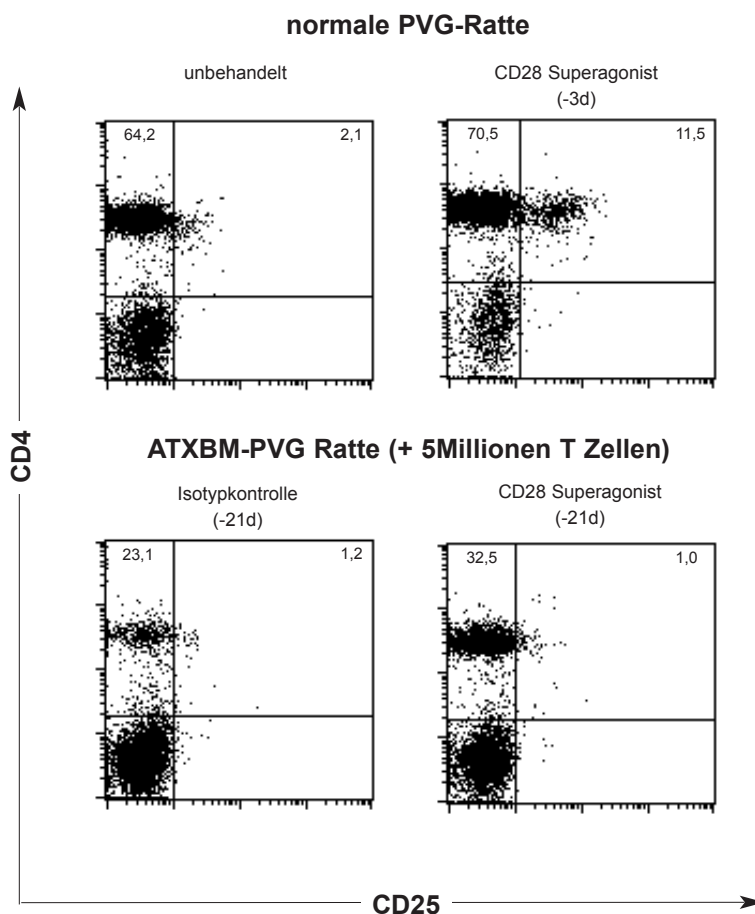
**Abbildung 18: Zytokinproduktion von Lymphknoten- und Milzzellen aus T-Zell-rekonstituierten ATXBM PVG Ratten behandelt mit superagonistischem, CD28-spezifischem mAk und immunisiert mit KLH**

Lethal bestrahlte PVG (CD45<sup>b</sup>) Ratten erhielten 50 Millionen syngene Knochenmarkszellen und 5 Millionen CD45<sup>b</sup> T Zellen aus Lymphknoten und wurden mit superagonistischem, CD28-spezifischem mAk (■) oder Isotypkontrolle MOPC-31C (□) (1mg am Tag 1, iv) behandelt. Anschließend folgte am Tag21 eine Immunisierung mit KLH in Titermax<sup>R</sup> (1:1). Zytokinmessung nach Restimulation von ungetrennten Lymphknoten- bzw. Milzzellen (entnommen 3 Wochen nach KLH-Immunisierung) mit Concanavalin A (2.5 $\mu$ g/ml) und KLH 100 $\mu$ g/ml. \*P<0.05; \*\*P<0.01; \*\*\*P<0.001

### 3.3.3. Regulatorische T Zellen in T-lymphopenischen Ratten nach Behandlung mit superagonistischem anti-CD28 mAk

Nach einer Gabe von superagonistischem anti-CD28 mAk konnte in naiven PVG-Ratten beobachtet werden, dass mit der starken Expansion der gesamten T-Zellpopulation ein deutlicher Anstieg (auf ca. 20% der CD4<sup>+</sup>T Zellen) der CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T Zellen verbunden war. Dies wurde bereits bei LEW Ratten durch Lin and Hünig (2003) beschrieben und bestätigt sich hier im PVG Stamm (Abbildung19).

Eine erhöhte Frequenz an CD25<sup>+</sup> T Zellen innerhalb der CD4<sup>+</sup> T Zellen drei Wochen nach Rekonstitution und mAk-Behandlung von ATXBM-PVG-Ratten war jedoch nicht mehr zu erkennen. Die Frequenz der CD25<sup>+</sup> T Zellen hatten sich in beiden Gruppen (CD28-Superagonist-behandelt und Kontrollgruppe) auf einen Wert, ähnlich dem in naiven Tieren, eingestellt.



**Abbildung 19: Regulatorische T Zellen in den Lymphknoten T-Zell-rekonstituierter ATXBM PVG Ratten behandelt mit superagonistischem, CD28spezifischem mAk**

CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T Zellen in den Lymphknoten einer normalen PVG-Ratte unbehandelt (oben links), mit superagonistischem anti-CD28 mAk behandelt (oben rechts, Behandlung 3 Tage zuvor) und CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T Zellen in den Lymphknoten lethal bestrahlter ATXBM-PVG (CD45<sup>b</sup>) Ratten (erhielten 50 Million syngene Knochenmarkzellen und 5 Millionen syngene CD45<sup>b</sup> T Zellen aus Lymphknoten und wurden mit superagonistischem, CD28-spezifischem mAk (unten rechts) oder Isotypkontrolle MOPC-31C (unten links) (1mg am Tag 1, iv) behandelt. Lymphknoten wurden 3 Wochen nach Antikörperbehandlung entnommen und gefärbt.



### 3.4. Modulation der Immunantwort gegen Infektionserreger mit CD28-Superagonisten

#### 3.4.1. Infektionsversuche mit dem Rattenhakenwurm *Nippostrongylus brasiliensis*

##### 3.4.1.1. Infektionsverlauf der *Nippostrongylus brasiliensis* - Infektion

Für die Untersuchung des Einflusses von superagonistischem anti-CD28 mAk auf die Generierung einer Th2-Immunantwort wurden verschiedene Versuchsprotokolle einer *Nippostrongylus*-Infektion (Nb-Infektion) angewendet (Tabelle 1). Folgende Parameter wurden variiert:

1. Die Zahl der inokulierten L3-Larven zur Bestimmung eines reproduzierbar messbaren Infektionsverlaufs bei möglichst niedriger Belastung der Tiere.
2. Die Dosis des applizierten superagonistischen mAks, um einen selektiven Effekt regulatorischer T Zellen (0,1mg/ Tier) von Treg-Aktivierung bei zusätzlicher Lymphozytose (1mg/ Tier) abzugrenzen.
3. Zeitlicher Abstand zwischen mAk-Gabe und L3-Inokulation, um den Einfluss der Antikörperbehandlung zu verschiedenen Zeitpunkten der Infektion zu untersuchen.

Bei allen durchgeführten Versuchsansätzen zeigte sich ein ähnlicher Infektionsverlauf (Abbildung 20 und Tabelle 1), wie er in der Literatur beschrieben wird (Lawrence et al., 1996; McCoy et al., 1997; Wibawa et al., 2002 ). Der Eiausstoß begann meist um den Tag 6. Während der Vorlaufzeit wandern die inokulierten Larven über die Lunge in den Darm, und reifen dabei unter zwei Häutungen zu Ei-produzierenden, adulten Würmern. Danach war ein drastischer Anstieg der Eierzahlen im Kot zu erkennen, welcher um den Tag 8 seinen Höhepunkt fand. Dann sank die Produktion wieder ab, bis um den Tag 14 keine Eier mehr im Kot der Tiere vorzufinden waren. Teilweise kam es nach dem ersten Peak zu einem erneuten, kleineren Anstieg der Eierzahl im Kot um den Tag 11. Dies war jedoch nicht auf bestimmte Gruppen beschränkt, sondern trat verstreut auf. Ob hier bestehende Abwehrstrategien des Organismus noch einmal kurzzeitig durchbrochen wurden, ist nicht bekannt.

Die Kinetik des Eiausstoßes war in alle Gruppen - behandelt mit CD28-Superagonist oder mit Isotypkontrolle, vergleichbar. In jedem Falle konnten also die adulten Würmer durch das Immunsystem der Tiere aus dem Darm erfolgreich entfernt werden. Die auftretenden Schwankungen der erreichten Eierzahlen pro Gramm Kot sind bei Infektionsexperimenten am lebenden Versuchstier nicht ungewöhnlich.

## Ei-Ausstoss im Kot

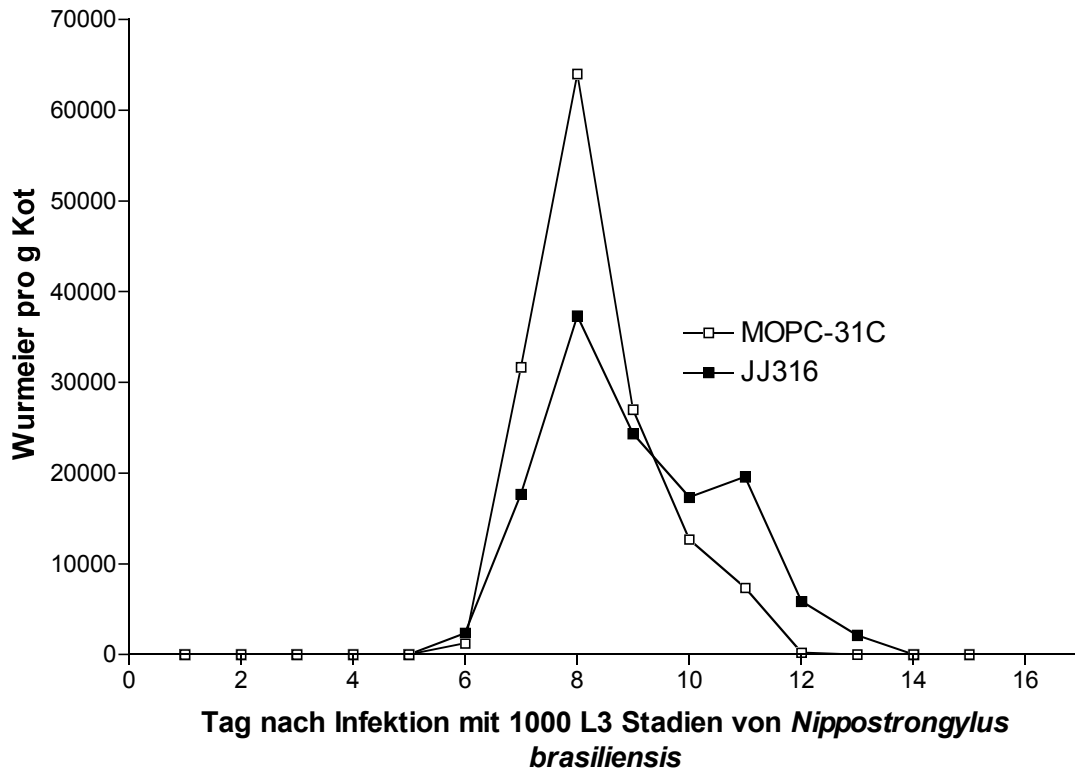


Abbildung 20: Beispiel von zwei Verlaufskurven des Eiausstoßes der Infektion von PVG Ratten mit *Nippostrongylus brasiliensis*

Bei dem gezeigten Beispiel handelt es sich um eine Infektion mit 1000 L3-Stadien. Am selben Tag erfolgte eine Inokulation von entweder 1mg Isotypkontrolle (MOPC-31C □) bzw. JJ316 (■). Mittelwerte stammen aus einem Versuch mit je drei Tieren pro Gruppe.

Anzahl der inokulierten L3-Larven		1000								2000				
		mAk-Behandlung und Infektion gleichzeitig				1 Wo vor L3-Gabe mAk-Behandlung				mAk-Behandlung und Infektion gleichzeitig		1 Wo vor L3-Gabe mAk-Behandlung		
Zeitpunkt der mAk-Behandlung und der Infektion		Kontroll-Tiere 1mg	Super-agonist 1mg	Kontroll-Tiere 1mg	Super-agonist 0,1mg	Super-agonist 1mg	Kontroll-Tiere 1mg	Super-agonist 1mg	Kontroll-Tiere 1mg	Super-agonist 1mg	Kontroll-Tiere 1mg	Super-agonist 1mg	Kontroll-Tiere 1mg	Super-agonist 1mg
Versuchsgruppen														
Beginn des Eiausstoßes im Kot (Tag nach Infektion)		6	6	6	6	6	6	6	7	6	5	5	6	6
Ende des Eiausstoßes im Kot (Tag nach Infektion)		14	14	13	13	13	13	13	14	14	13	13	15	15
Tag nach Infektion mit L3		8	8	9	7	9	9	10	10	10	8	8	8	8
Maximaler Eiausstoß		65000	40000	65000	60000	90000	65000	35000	35000	25000	120000	120000	150000	150000
Verlauf der Eiausstoß in Schüben (j=ja + Anzahl der Schübe, n=nein)		n	j (2)	j (2)	j (2)	j (2)	j (2)	j (2)	j (2)	j (2)	n	n	j (2)	j (2)

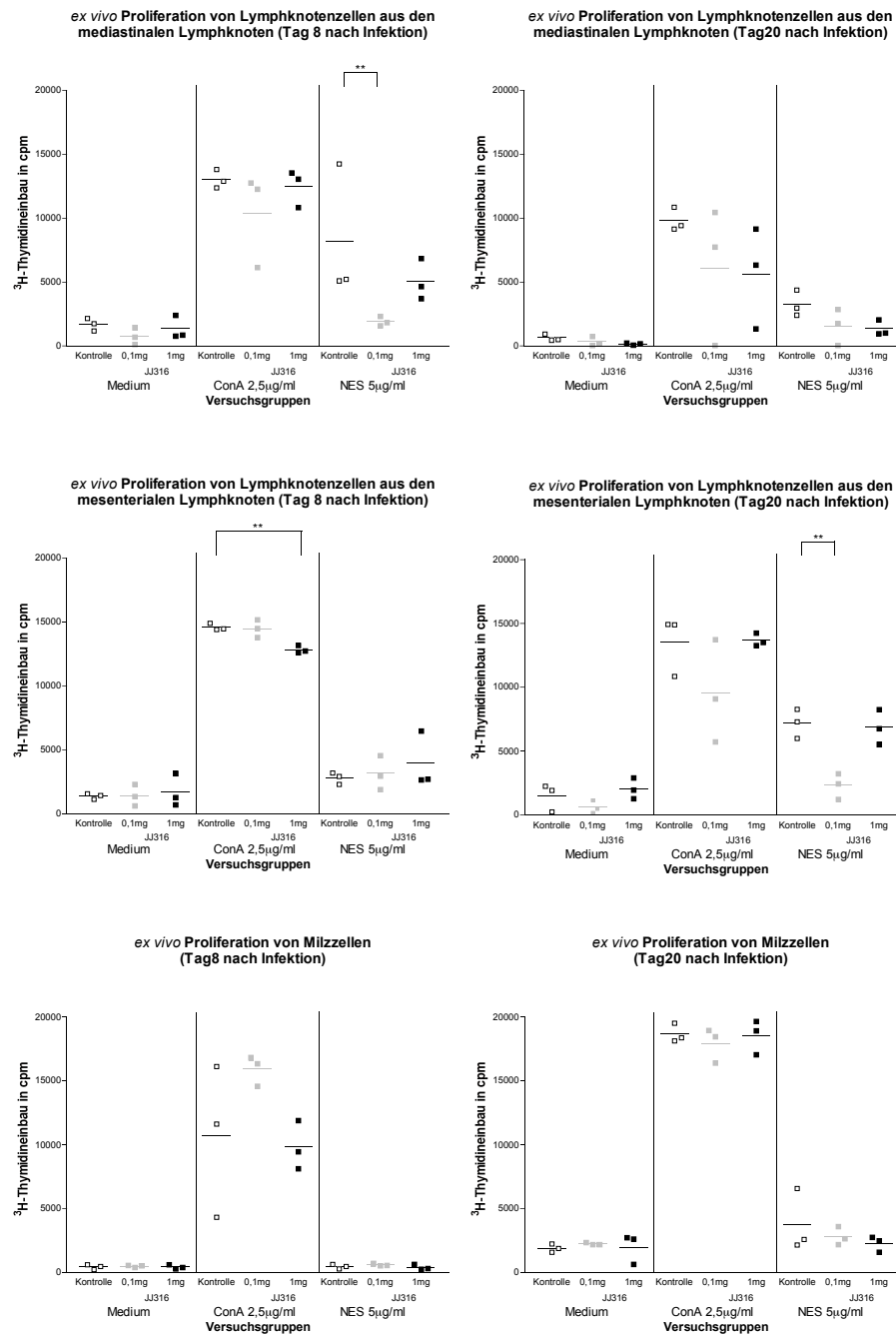
Tabelle 1: Versuchsansätze zur Infektion mit *Nippostrongylus brasiliensis* (Angenebene Mittelwerte stammen aus Versuchen mit einer Gruppengröße von n=3.)

### 3.4.1.2. Proliferative *in vitro* Recall-Antwort *Nippostrongylus brasiliensis*-infizierter Ratten auf Wurmantigene

Um den Effekt der CD28-Stimulation auf die Ausbildung *Nippostrongylus brasiliensis*-spezifischer Gedächtniszellen zu untersuchen, wurden gesunde Ratten mit mAk behandelt (0,1mg oder 1mg JJ316 sowie 1mg MOPC-31C als Kontrolle) und gleichzeitig mit 1000 L3-Stadien des Rattenhakenwurmes infiziert. 8 bzw. 20 Tage nach der Infektion wurden die Tiere getötet und Lymphknotenzellen (mediastinal und mesenterial getrennt) sowie Milzzellen entnommen und *in vitro* mit NES restimuliert.

T Zellen aus CD28-Superagonist behandelten Tieren zeigten eine proliferative Antwort auf NES, die sich kaum von der Kontrollgruppe unterschied. Im Vergleich dazu zeigte die Gruppe, welche nur mit 0,1mg anti-CD28 mAk behandelt wurde eine deutlich verminderte Antwort in den mediastinalen Lymphknoten am Tag 8 (kurz nach der Lungenpassage) und in den mesenterialen am Tag 20 (endgültige Bekämpfung des Wurmes im Darm abgeschlossen.). Dieser Effekt könnte auf die bei der niedrigen anti-CD28 mAk Dosis bevorzugt angesprochenen Treg Zellen zurückzuführen sein (Abbildung 21).

Die vorliegenden Daten zeigen somit, dass T Zellen, welche mittels superagonistischem anti-CD28 mAk *in vivo* expandierten, in der Lage sind, Gedächtniszellen zu generieren. Ebenfalls sprechen die Ergebnisse für einen Einfluss von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T(reg) Zellen auf die Stärke der Immunantwort.



**Abbildung 21: Proliferationsantwort auf NES nach Restimulation *in vitro***

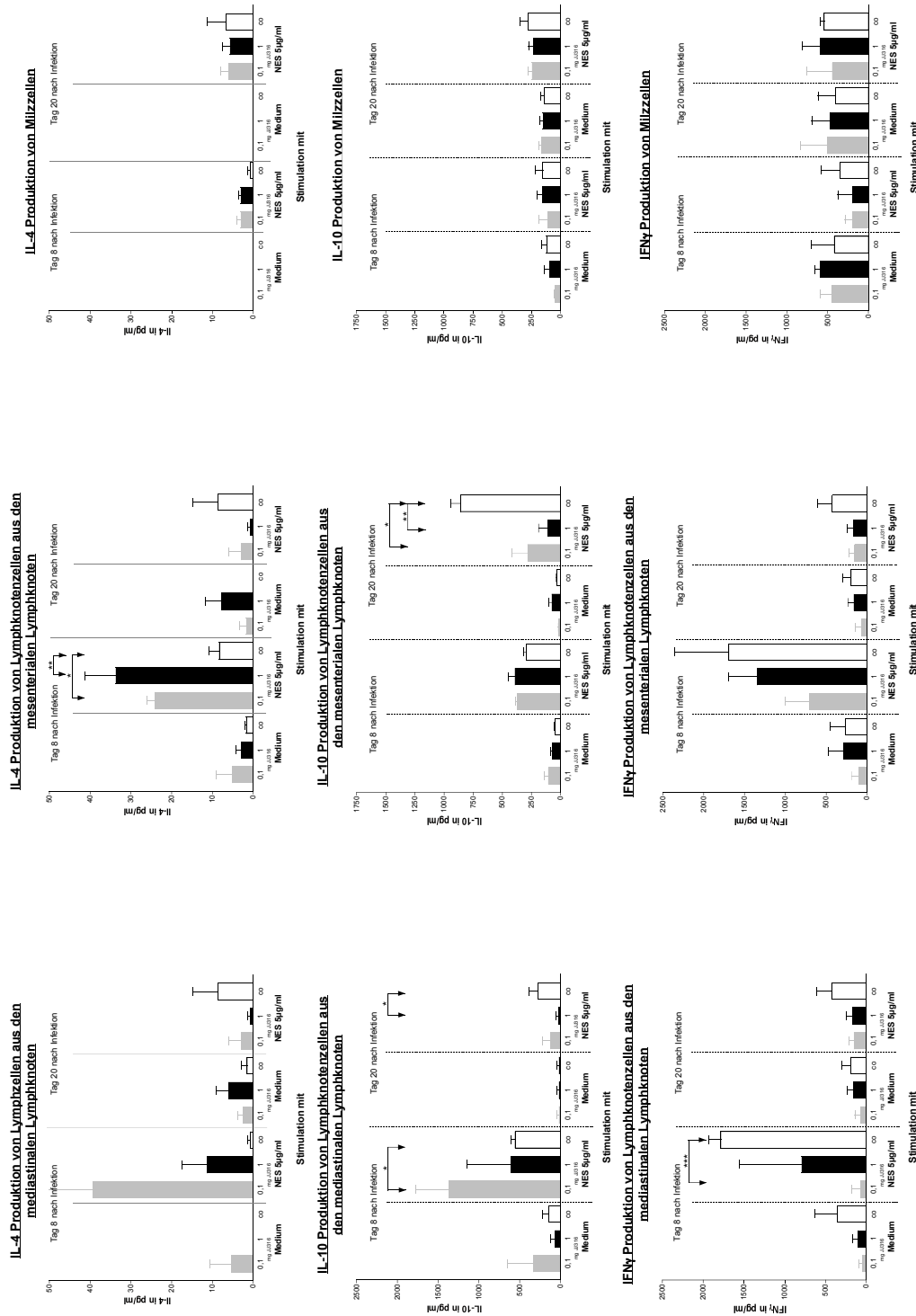
PVG Ratten erhielten 1000 Larven des L3-Stadiums des Nematoden *Nippostrongylus brasiliensis* und am selben Tag eine Antikörpergabe von 1mg Isotypkontrolle (MOPC-31C, □), 0,1mg JJ316 (■) oder 1mg JJ316 (■). Den Tieren wurden am Tag 8 bzw. am Tag 20 die mediastinalen und mesenterialen Lymphknoten sowie die Milz entnommen. Gewonnene Zellen wurden mit ConA (positive Kontrolle) und NES restimuliert. Mittelwerte basieren auf einen Versuch mit je 3 Tieren pro Gruppe. \*\*P<0,01

### **3.4.1.3. Zytokinproduktion von T Zellen *Nippostrongylus brasiliensis* - infizierter Ratten nach Stimulation mit Wurmantigenen**

Für die Charakterisierung der Zytokinproduktion von NES-spezifischen Zellen wurden Lymphknoten- und Milzzellen aus Nb-infizierten Ratten *in vitro* mit 5µg/ml NES restimuliert. Drei Tage danach wurden die Überstände gewonnen und mittels spezifischer ELISAs auf ihren IFN $\gamma$ -, IL-4 und IL-10-Gehalt getestet.

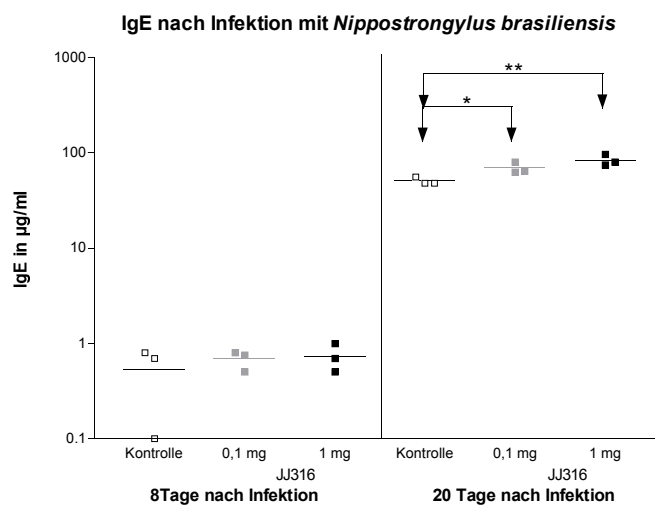
Es ist ersichtlich, dass T Zellen aus CD28-Superagonist behandelten Tieren - ebenso wie aus Kontrolltieren - sowohl IFN $\gamma$  als auch IL-10 und IL-4, also Zytokine vom Th1- und Th2-Typ produzierten. Jedoch wird - speziell anhand der erhöhten Produktion von IL4 und IL-10 am Tag 8 durch Lymphknotenzellen aus den mesenterialen und mediastinalen Lymphknoten - die, schon von Rodríguez-Palmero 1999 beschriebene, favorisierte Th2-Differenzierung deutlich, welche sich im Zuge der ohnehin stark Th2-polarisierenden Nb-Infektion noch von den Kontrolltieren unterscheidet (Abbildung 22).

Die erhöhte IL-10 Produktion mit 0,1mg Superagonist behandelter Tiere in den mediastinalen Lymphknoten am Tag8 der Infektion könnte auch auf die bei dieser mAk-Konzentration speziell angesprochenen regulatorischen T Zellen (Treg) zurückzuführen sein, da natürliche Treg Zellen der Ratte verstärkt IL-10 produzieren. Dies würde auch einen vermuteten Einfluss von Treg Zellen bei der voran beschriebenen geringeren Proliferationsrate dieser Gruppe in den mediastinalen Lymphknoten am Tag 8 bekräftigen, konnte jedoch in dieser Form nicht für T Zellen aus den mesenterialen Lymphknoten am Tag 20 gefunden werden.



**Abbildung 22: Zytokinproduktion nach Restimulation von Lymphknoten- und Milzzellen nach einer Infektion mit *Nippostrongylus brasiliensis***  
 PVG Ratten erhielten 1000 Larven des L3-Stadiums des *Nippostrongylus brasiliensis* und gleichzeitig (am selben Tag) eine Antikörpergabe von entweder 1mg Isotypkontrolle (MOPC-31C, □), 0,1 mg JJ316 (■) oder 1mg JJ316 (◼). Tieren wurden am Tag 8 bzw. am Tag 20 die mediastinalen und mesenterialen Lymphknoten sowie die Milz entnommen. Gewonnene Zellen wurden restimuliert mit NES. Jeweils drei Tage später wurden die Überstände gewonnen und mittels ELISA auf IFNγ, IL-10 und IL-4 getestet. Mittelwerte basieren auf einen Versuch mit je 3 Tieren pro Gruppe. \*P<0,05; \*\*P<0,01; \*\*\*P<0,001

Der Effekt der bevorzugten Th2-Polarisierung einer Immunantwort nach Superagonist-Behandlung spiegelt sich auch anhand des Vorkommens von IgE im Serum wieder, dessen Produktion von Th2-Zellen abhängig ist. Trotz der auch in der Kontrollgruppe auf Grund der Nb-Infektion deutlich gestiegenen IgE-Produktion nach 20 Tagen, besteht auch hier ein signifikanter Unterschied zu der noch höheren Produktion von IgE bei den mit superagonistischen mAk behandelten Tieren (Abbildung 23).



**Abbildung 23: IgE im Serum nach einer Infektion mit *Nippostrongylus brasiliensis***

PVG Ratten erhielten 1000 Larven des L3-Stadiums von *Nippostrongylus brasiliensis* und am selben Tag eine Antikörpergabe von entweder 1mg Isotypkontrolle (MOPC-31C, □), 0,1 mg JJ316 (■) oder 1mg JJ316 (■). Tieren wurden am Tag 8 bzw. am Tag 20 getötet und Serum entnommen, welches im ELISA auf IgE getestet wurde. \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ ;



#### **3.4.1.4. Immunpathologie der Lunge nach Infektion mit *Nippostrongylus brasiliensis***

Immunpathologische Begleiterscheinungen bei einer Infektion mit *Nippostrongylus brasiliensis* sind die Bildung von Granulomen um die Bronchiolen und Gefäße in der Lunge und die starke Proliferation von Becherzellen (Becherzellhyperplasie) in der Lunge und im Darm von infizierten Tieren. Dabei ist nicht eindeutig geklärt, wodurch die Bildung von Granulomen ausgelöst wird, da die Granulombildung eine Woche nach der Lungenpassage der Larven erst beginnt. Es wird vermutet, dass es sich hier um eine immunologische Reaktion auf Häutungspartikel der Larven handelt (Matsuda et al., 2001). Die Vermehrung der Becherzellen dient der Bekämpfung des Parasiten durch erhöhte Schleimproduktion (Ishikawa et al., 1994).

Um die Proliferation der Becherzellen und die Bildung von Granulomen bei Infektionen mit Nb und zusätzlicher Behandlung mit superagonistischem CD28-spezifischem mAk zu untersuchen, wurden den Tieren am Tag 8 und 20 nach erfolgter Nb-Infektion und gleichzeitiger mAk-Gabe die Lungen entnommen und histologische Schnitte angefertigt. Mittels einer PAS-Färbung konnte die Schleimbildung der Becherzellen gezeigt werden. Diese Färbemethode ermöglichte gleichzeitig die Darstellung von Granulomen.

Die infizierten Kontrolltiere wiesen starke perivaskuläre und peribronchiale Infiltrate/Granulome auf, begleitet von einer starken Becherzellhyperplasie. Ratten, welche mit 1mg JJ316 behandelt wurden, wiesen ebenfalls Granulome auf, wenn auch in etwas geringerem Ausmaß als bei der Isotypkontrolle. Eine Reduzierung der Becherzellproliferation konnte nicht erkannt werden. Deutlicher wurden jedoch die Unterschiede bei den Tieren, welche mit nur 0,1mg behandelt wurden. Hier zeigte sich eine sichtbare Reduzierung der Anzahl der gebildeten Granulome, welche auch wesentlich kleiner waren im Vergleich zu den anderen Versuchsgruppen. Auch die Becherzellhyperplasie fiel bei dieser Gruppe wesentlich geringer aus.

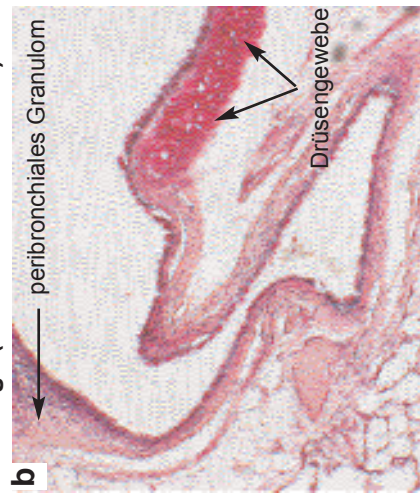
Ein deutlicher Unterschied zwischen Kontrolltieren und mAk-behandelten Tieren zeigte sich auch im Anfärben der peribronchialen Drüsen, welche bei den infizierten Kontrolltieren nach einer PAS-Färbung stark angefärbt wurden. Die Ursache dafür und auch für ein Fehlen dieser Hyperplasie des Drüsengewebes bei den mit CD28-Superagonist behandelten Tieren ist ungeklärt (Abbildung 24).

**Gesunde Ratte**

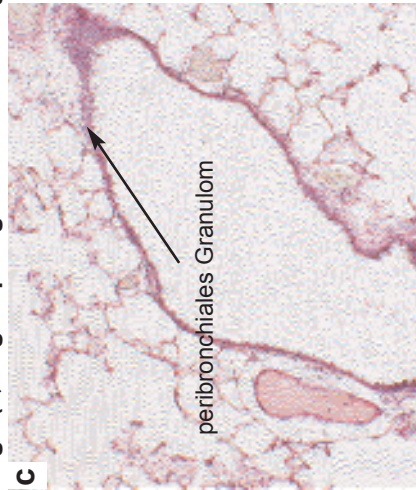


**Infektion mit *Nippostrongylus brasiliensis***

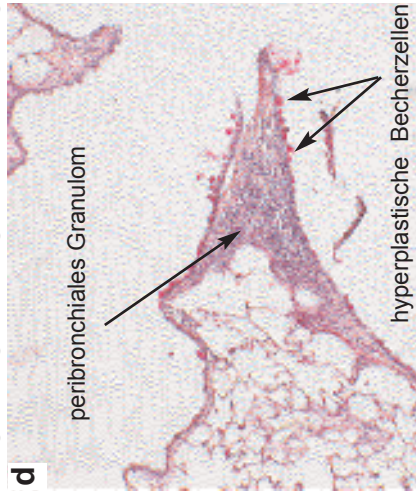
**Lunge (infizierte Kontrolltiere)**



**Lunge (0,1mg Superagonist-Behandlung)**



**Lunge (1mg Superagonist-Behandlung)**



**Abbildung 24: Lungenhistologie 8 Tage nach Infektion mit *Nippostrongylus brasiliensis***

a: gesunde Ratte; HE-Färbung, Schnittdicke 7 $\mu$ m; 63fache Vergrößerung  
 b: infiziertes Kontrolltier (1mg MOPC-31C); Ausschnitt aus einer Broncheole mit angefärbter peribronchialer Drüse. PAS-Färbung; Schnittdicke 7 $\mu$ m, 100fache Vergrößerung  
 c: 0,1mg-Behandlung; Ausschnitt einer Broncheole mit peribronchialem Granulom. PAS-Färbung; Schnittdicke 7 $\mu$ m, 100fache Vergrößerung  
 d: 1mg-Behandlung; Ausschnitt einer Broncheole mit peribronchialem Granulom. PAS-Färbung; Schnittdicke 7 $\mu$ m, 100fache Vergrößerung

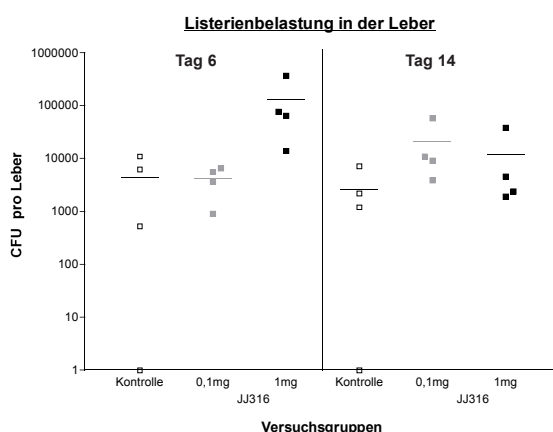
### 3.4.2. Infektionsversuche mit *Listeria monocytogenes*

#### 3.4.2.1. Infektionsverlauf einer *Listeria monocytogenes*-Infektion

Für die Untersuchung des Einflusses von CD28-Superagonist auf die Differenzierung einer Th1-Antwort wurden Versuche mit *Listeria monocytogenes* durchgeführt. Das dafür verwendete Protokoll basierte auf persönlichen Mitteilungen von Prof. Goebel und Dr. Pilgrim (Biozentrum der Universität Würzburg) sowie auf Literaturhinweisen (Hasegawa et al., 1992; Hirose et al., 1998). Die Ratten bekamen  $5 \times 10^4$  CFU/Tier des EGD-Stammes SV 1/2 A von *L. monocytogenes* intravenös inoculiert. Am selben Tag erfolgte ebenfalls die Ak-Behandlung (1mg MOPC-31C, 0,1mg JJ316 und 1mg JJ316; in Anlehnung an die Versuche mit *Nippostrongylus brasiliensis*).

Eine Listerieninfektion verläuft ca. 2 bis 2,5 Wochen, wobei die Bakterienlast in den Organen Milz und Leber um die Tage 6-8 am größten ist. Auch in diesen Versuchen wurde die Dosis des applizierten superagonistischen mAks variiert, um einen selektiven Effekt regulatorischer T Zellen ( bei 0,1mg JJ316/ Tier) von Treg-Aktivierung bei zusätzlicher Lymphozytose abzugrenzen.

Anhand der Messungen der CFU in der Leber der infizierten Tiere zeigte sich, dass es zwar zunächst eine deutlich höhere Erregerzahl in den Lebern der mit 1mg JJ316-behandelten Tiere vorlag, jedoch alle drei Gruppen gegen Ende der Infektion (ca. Tag14) ähnlich niedrige CFU-Zahlen aufwiesen (Abbildung 25). Es zeigte sich somit, dass der anfängliche Nachteil in der Listerienkontrolle in den mit 1mg Superagonist behandelten Tieren nur transient ist.



**Abbildung 25: Erregerzahlen in der Leber nach einer Infektion mit *Listeria monocytogenes***

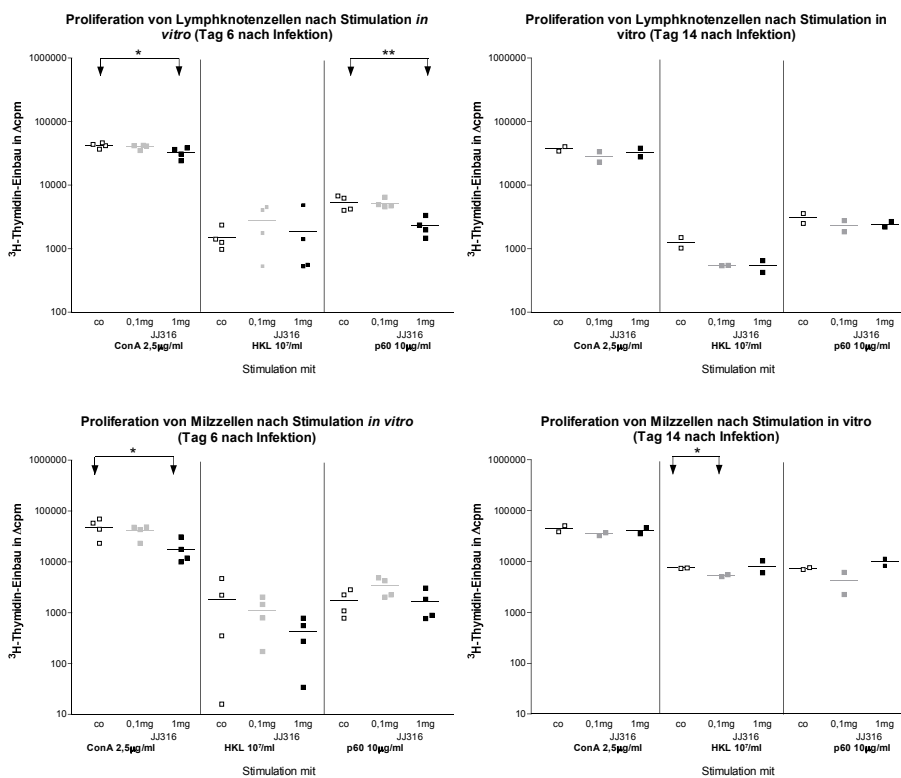
PVG Ratten erhielten  $5 \times 10^4$  CFU des EGD-Stammes SV 1/2A von *Listeria monocytogenes* und am selben Tag eine Antikörpergabe von entweder 1mg Isotypkontrolle (MOPC-31C, □), 0,1 mg JJ316 (■) oder 1mg JJ316 (■). Die Tiere wurden am Tag 6 bzw. am Tag 14 getötet und die Lebern auf ihren Gehalt an CFU von *Listeria monocytogenes* getestet.

### 3.4.2.2. Proliferative *in vitro* Recall-Antwort *Listeria monocytogenes* infizierter Ratten auf Protein60 (p60) und Heat-killed-listeria (HKL)

Um den Effekt einer CD28-Stimulation auf die Ausbildung *Listeria monocytogenes*-spezifischer Gedächtniszellen zu untersuchen, wurden Ratten mit mAk behandelt (0,1mg oder 1mg JJ316 sowie 1mg MOPC-31C als Kontrolle) und gleichzeitig mit  $5 \times 10^4$  CFU von *Listeria monocytogenes* infiziert. 6 bzw. 14 Tage nach der Infektion wurden die Tiere getötet und Lymphknoten- sowie Milzzellen entnommen und *in vitro* mit p60 und HKL restimuliert.

T Zellen aus CD28-Superagonist behandelten Tieren zeigten eine proliferative Antwort auf p60 und HKL, die sich nur wenig von der Kontrollgruppe unterschied. Die Ursache einer teilweise niedrigen proliferativen Antwort von 1mg Superagonist behandelten Tieren am Tag 6 könnte darauf zurückzuführen sein, dass die gleichzeitig ablaufende JJ316-gesteuerte, polyklonale T-Zell-Expansion andere Immunreaktionen verzögert, wie z.Bsp. das T-Zell-Priming.

Ein Effekt einer favorisierten Aktivierung von  $CD4^+CD25^+$  Treg Zellen durch die Gabe von 0,1mg CD28-Superagonist auf die Ausbildung von Listerien-spezifischer Gedächtniszellen konnte in diesem Versuchsansatz nicht beobachtet werden (Abbildung 26).



**Abbildung 26:** Proliferationsantwort auf p60 und HKL nach Restimulation *in vitro*

PVG Ratten erhielten  $5 \times 10^4$  CFU des EGD-Stammes SV 1/2A von *Listeria monocytogenes* und am selben Tag eine Antikörpergabe von entweder 1mg Isotypkontrolle (MOPC-31C, □), 0,1mg JJ316 (■) oder 1mg JJ316 (■). Den Tieren wurden am Tag 6 bzw. am Tag 14 die Lymphknoten sowie die Milz entnommen. Die Zellen wurden *in vitro* mit ConA (positive Kontrolle), p60 und HKL (heat-killed listeria) restimuliert. \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$

### 3.4.2.3. Zytokinproduktion *Listeria monocytogenes*-infizierter Ratten

Für die Charakterisierung der Zytokinproduktion von p60-spezifischen Zellen wurden Lymphknoten- und Milzzellen aus Listerien-infizierten Ratten *in vitro* mit 5 $\mu$ g/ml p60 restimuliert. Drei Tage danach wurden die Überstände gewonnen und mittels spezifischem ELISA auf ihren IFN $\gamma$ -, IL-4 und IL-10-Gehalt getestet.

Bei dieser Th1-gerichteten Immunantwort konnte erwartungsgemäß kein IL-4 detektiert werden. Abbildung 27 zeigt, dass T Zellen aus CD28-Superagonist behandelten Tieren (beider Konzentrationen) - ebenso wie T Zellen aus Kontrolltieren - sowohl IFN $\gamma$  als auch IL-10 produzierten. Trotzdem ist die IFN $\gamma$ -Produktion am Tag 6 der Infektion bei mit 1mg JJ316 behandelten Ratten in der Milz deutlich vermindert. Dies könnte ebenfalls mit der bereits unter Punkt 3.4.2.2. beschriebenen Verzögerung der Differenzierung Listerien-spezifischer T Zellen aufgrund der gleichzeitig ablaufenden CD28-Superagonist gesteuerten T-Zell-Expansion in Zusammenhang stehen, aber auch mit der durch CD28-Superagonist-Behandlung bevorzugten Bildung einer Th2-Immunantwort in Verbindung stehen.

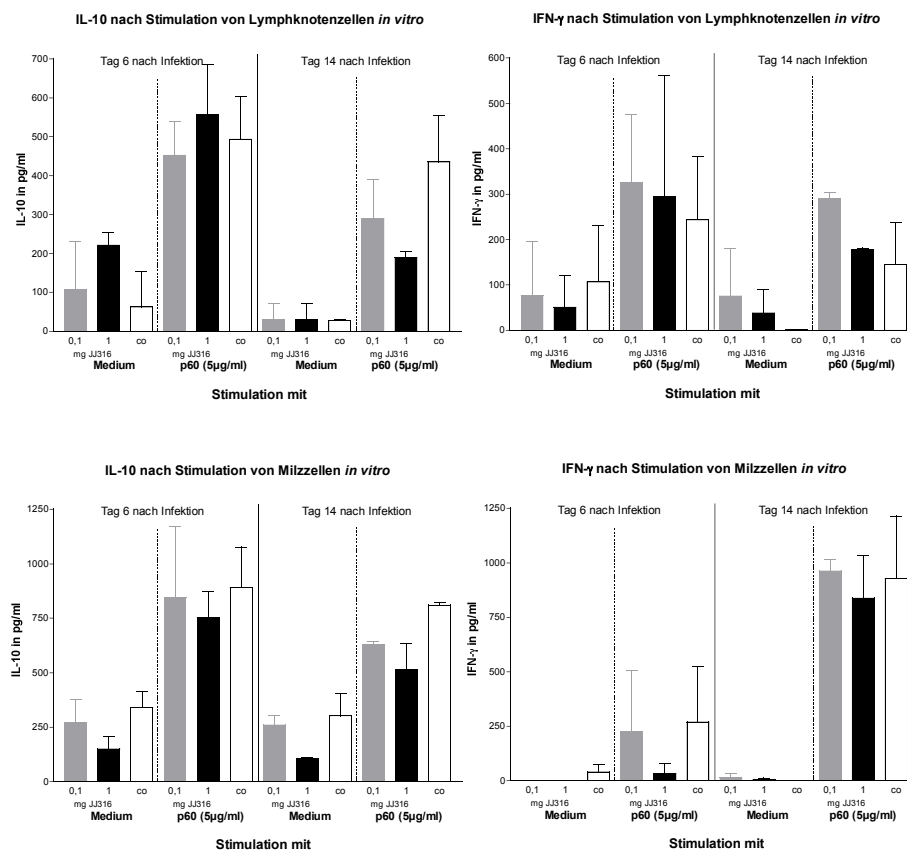


Abbildung 27:

**Zytokinproduktion nach Restimulation von Lymphknoten- und Milzzellen nach einer Infektion mit *Listeria monocytogenes***

PVG Ratten erhielten 5 $\times 10^4$  CFU des EGD-Stammes SV 1/2A von *Listeria monocytogenes* und am selben Tag eine Antikörpergabe von entweder 1mg Isotypkontrolle (MOPC-31C, □), 0,1 mg JJ316 (■) oder 1mg JJ316 (■). Tieren wurden am Tag 6 bzw. am Tag 14 die Lymphknoten sowie die Milz entnommen. Gewonnene Zellen wurden restimuliert mit p60. Jeweils drei Tage später wurden die Überstände gewonnen und mittels ELISA auf IFN $\gamma$  und IL-10 getestet.

#### 3.4.2.4. Immunpathologie der Leber nach Infektion mit *Listeria monocytogenes*

Eine immunpathologische Begleiterscheinung bei einer Infektion mit *Listeria monocytogenes* ist die Bildung von Granulomen in der Leber. Die Entstehung dieser Granulome basiert auf der Akkumulation von mononuklearen Zellen um infizierte Makrophagen, um diese zu unterstützen oder abzutöten, wenn sie "kampfunfähig" geworden sind (Mielke et al., 1989) und ist ca. eine Woche nach Inokulation der Bakterien zu beobachten.

Für die Untersuchung der Granulombildung bei Infektion mit *Listeria monocytogenes* und gleichzeitiger Superagonist-Behandlung, wurden infizierten und mAk-behandelten Tieren am Tag 8 die Lebern entnommen und histologische Schnitte angefertigt. Mittels einer HE-Färbung konnten die Granulome gut vom umgebenden Lebergewebe unterschieden werden.

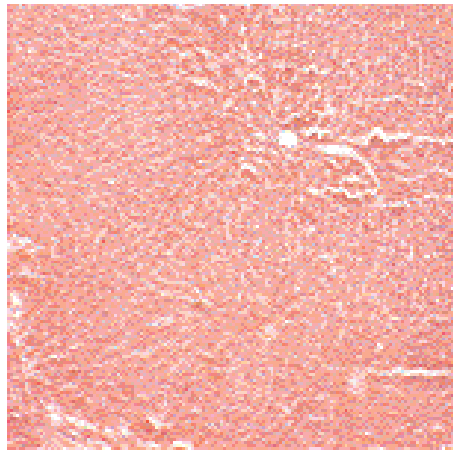
Bei den Kontrolltieren traten nach Infektion mit  $5 \times 10^4$  CFU keine Granulome auf (Abbildung 28). Vermutlich lag hier die Zahl der inokulierten Bakterien unter dem Schwellenwert für die Bildung von Granulomen.

Bei einer Konzentration von 0,1mg Superagonist konnten Granulome angefärbt werden. Jedoch waren diese klein und von geringerer Anzahl.

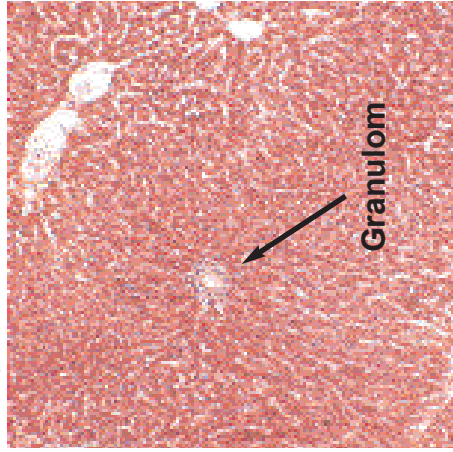
Die bei mit 1mg Superagonist behandelten Ratten auftretende, vermehrte Bildung von zum Teil sehr großen Granulomen bekräftigt ebenfalls aus histologischer Sicht die Vermutungen, welche bereits bei Proliferations- und Zytokintest beschrieben wurden. Die durch CD28-Superagonist-Behandlung ausgelöste, polyklonale T-Zell-Expansion hemmt zunächst eine rasche und effektive Immunantwort. Es kommt zu höheren Keimzahlen (Abbildung 25). Nach Abklingen des suppressiven Effekts des Antikörpers, kommt es jedoch zu einer erfolgreichen Abwehr der Listerien (Abbildung 25, Tag 14), wobei es nun, auf Grund der erhöhten Bakterienzahlen in der Leber, auch zu einer verstärkten Granulombildung kommt.

## Infektion mit *Listeria monocytogenes*

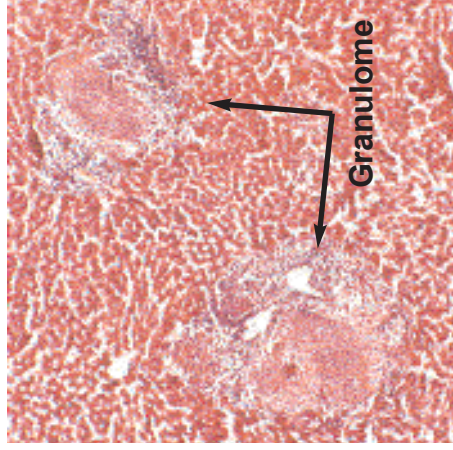
Kontrolltiere



Superagonist-Behandlung (0,1mg/Tier)



Superagonist-Behandlung (1mg/Tier)



**Abbildung 28: Granulome in der Leber *Listeria monocytogenes*-infizierter Ratten**

Bilder zeigen Ausschnitte von Lebergewebe verschieden behandelte und mit *Listeria monocytogenes* infizierter Ratten  
HE-Färbung, Schnittdicke 7µm, Vergrößerung 6,3fach

## 4. Diskussion

### 4.1. Regeneration des T-Zell-Kompartiments mit Hilfe von CD28-Superagonist

Der Wiederaufbau eines T-Zell-Kompartiments in erwachsenen, lymphopenischen Patienten stützt sich aufgrund mangelnder Thymusaktivität vorrangig auf die sehr langsam voranschreitende, homeostatische Proliferation. Patienten sind so über längere Zeit der Gefahr von lebensbedrohlichen Infektionen ausgesetzt. Auch eine Therapie, gestützt auf eine Antigen-gesteuerte Proliferation, ist nicht ausreichend. Sie verläuft zwar schneller als die homeostatische, jedoch kommt es hier nur zu einer oligoklonalen Expansion innerhalb der T-Zell-Population.

Ideale therapeutische Bedingungen wären die polyklonale Expansion aller residualen T Zellen so schnell und effizient wie bei einer Antigen-getriebenen Proliferation ohne Verluste der T-Zell-Funktion bei späteren Immunantworten. Vorangegangene Arbeiten der Arbeitsgruppe um Professor Hünig und die vorliegende Arbeit zeigen, dass zumindest in Hinsicht auf die CD4<sup>+</sup> T Zellen innerhalb eines T-Zell-Kompartiments der Ratten-spezifische CD28-Superagonist diese therapeutischen Anforderungen erfüllt.

Superagonistischer, CD28-spezifischer mAk besitzt die Fähigkeit, residuale, nicht geprimte T Zellen polyklonal in Abwesenheit einer TZR-Bindung *in vitro* und *in vivo* zu aktivieren. In der vorliegenden Arbeit bilden die *in-vivo*-Effekte dieser Antikörper den Mittelpunkt.

Zunächst wurde dabei die Stimulation residualer, reifer T Zellen in einem T-lymphopenischen System analysiert, welches mit Hilfe von thymektomierten, bestrahlten, KM-rekonstituierten PVG-Ratten (ATXBM-Ratten) simuliert wurde. Mit Hilfe dieser Tiere konnte die klinische Situation erwachsener, lymphopenischer Patienten mit fortgeschrittener Thymusatrophie sehr gut reproduziert werden. ATXBM-Ratten erhielten ein kleines Inokulum ( $5 \times 10^6$  periphere T Zellen), welches in seiner Größe ca.  $\frac{1}{1000}$  eines T-Zell-Kompartiments gesunder Tiere entspricht.

Eine einzige Gabe von superagonistischem anti-CD28 mAk führte zu einer dramatischen Beschleunigung der T-Zell-Repopulation mit zum Teil bis zu fünf durchlaufenen Zellteilungen innerhalb von drei Tagen, was in der Geschwindigkeit einer Antigen-gesteuerten Proliferation entspricht. Dies bildete einen starken Kontrast zur



Behandlung mit einem Kontrollantikörper (mAk irrelevanter Spezies) und konventionellem CD28mAk. Hier zeigte sich in den meisten Fällen nur eine Zellteilung in drei Tagen (vereinzelt auch zwei) und spiegelte somit die langsam voranschreitende, homeostatische Expansion (CD28-unabhängige Expansion - Prlic et al., 2001) wider. Aus diesen Experimenten wird ersichtlich, dass superagonistische, CD28-spezifische mAk potente T-Zell-Mitogene sind.

Neben der voran beschriebenen Eigenschaft von CD28-Superagonist, eine polyklonale T-Zell-Expansion ohne TZR-Stimulation zu initiieren, zeigte sich ebenfalls eine Expression eines anti-inflammatorischen Zytokinprofils während der akuten Phase der Stimulation sowie ein vorteilhafter Einfluss auf das Überleben expandierter T Zellen. Eine über TZR gesteuerte polyklonale T-Zell-Expansion resultiert nach einer anfänglichen proliferativen Phase in einer Fas/ FasL (CD95/ CD95L) induzierten T-Zell-Depletion (Vaux et al., 1996; Gorak-Stolinska et al., 2001). Dieser Mechanismus wird bereits durch eine CD28-vermittelte Kostimulation abgeschwächt (Boise et al., 1995). T Zellen, welche mit CD28-Superagonist aktiviert wurden, zeigen eine markante Expression des Überlebensfaktors bcl-x<sub>L</sub> und sie exprimieren kein CD95L. Somit konnte ein anti-apoptotischer Effekt, welcher bereits bei CD28-Kostimulation auftrat, in noch ausgeprägterer Form beobachtet werden (Kerstan and Hünig, 2004). Diese Eigenschaft des superagonistischen anti-CD28 mAks erweist sich ebenfalls als sehr vorteilhaft in Bezug auf eine T-Zell-Repopulation in einem T-lymphopenischen System.

Hinsichtlich der Initiierung einer Expansion eines T-Zell-Kompartiments kämen auch andere T-Zell-Wachstumsfaktoren in Betracht. Sie unterscheiden sich jedoch in einem wesentlichen Punkt von CD28-Superagonist: Die Aktivität dieser Zytokine ist von zusätzlichen Signalen abhängig. So zum Beispiel fördert IL-2, ein bekannter T-Zell-Wachstumsfaktor, die klonale T-Zell-Expansion während einer Immunantwort basierend auf der Induktion von IL-2R, was wiederum von einer Antigenerkennung über TZR abhängig ist (Nelson and Willerford, 1998; Nelson, 2004).

IL-15 wäre ebenfalls als Wachstumsfaktor für T Zellen zu nennen. Dieses Zytokin weist viele strukturelle und funktionelle Gemeinsamkeiten zu IL-2 auf und ist für die Regulation vieler verschiedener Zelltypen entscheidend (z.Bsp.: Natürliche Killerzellen, CD8<sup>+</sup> Gedächtniszellen) Aber genau wie bei IL-2 ist hier für die Initiierung einer Proliferation von T Zellen eine Antigenerkennung über TZR notwendig (Cooper et al., 2002; Lodolce et al. 2002).

Auch IL-7 spielt für das Überleben von Lymphozyten, speziell auch bei der Repopulation von T Zellen bei T-Lymphopenie im Rahmen der homeostatischen Expansion eine entscheidende Rolle. Jedoch verläuft durch IL-7 geförderte T-Zell-Proliferation wesentlich langsamer als eine über Antigen gesteuerte (Fry, 2001; Mackall et al., 2001; Goldrath et al., 2002).

Die Frage nach der Diversität innerhalb des rasch rekonstituierten T-Zell-Kompartiments konnte bereits im Vorfeld von Marta Rodriguez-Palmero beantwortet werden. Das Problem bei einer Thymus-unabhängigen T-Zell-Repopulation besteht darin, dass die Regeneration in erster Linie auf der Proliferation von peripheren T Zellen basiert und, wenn über ein Antigen gesteuert, das resultierende T-Zell-Repertoire nur eine limitierte Anzahl an bestimmten V $\beta$ -Segmenten exprimiert (Mackall et al., 1996). Rodriguez-Palmero führte zytometrische Messungen an peripher expandierten CD45<sup>b</sup> T Zellen durch, wobei keine signifikanten Unterschiede zwischen diesen Lymphozyten (Inokulum reifer T Zellen) und den im Thymus gereiften auftraten (Elflein et al., 2003). Somit konnte schon im Vorfeld ausgeschlossen werden, dass eine durch CD28-Superagonist gesteuerte, periphere T-Zell-Repopulation sich wie eine durch Superantigen verursachte Expansion peripherer T Zellen verhält.

Obwohl sowohl CD4<sup>+</sup> als auch CD8<sup>+</sup> T Zellen auf eine CD28-Superagonist-Behandlung *in vivo* reagieren, war der Effekt auf das CD4<sup>+</sup> T-Zellkompartiment ausgeprägter als auf die CD8<sup>+</sup> T-Zellpopulation. Dies bildet einen Kontrast zu homeostatischen und Antigen-gesteuerten Expansionen, bei denen, wenn auch bislang nur in Mäusen beobachtet, CD8<sup>+</sup> T Zellen gegenüber CD4<sup>+</sup> Zellen stärker expandierten (Ferreira et al., 2000; Dai and Lakkis, 2001). Jedoch ist es denkbar, dass diese geringere CD8<sup>+</sup>-Proliferation während einer Superagonist-Behandlung in einem lymphopenischen System durch ein erhöhtes Potential von CD8<sup>+</sup> T Zellen, bei Antigenkontakt zu proliferieren, ausgeglichen wird.

Der gleiche Effekt konnte auch bei der Analyse von Blutleukozyten von T-lymphopenischen, mit CD28-Superagonist behandelten Ratten beobachtet werden. Superagonist-behandelte Tiere zeigten eine starke Expansion von CD4<sup>+</sup> bzw. CD8<sup>+</sup> T Zellen, mit 10fach bzw. 6fach erhöhten Zellzahlen im Vergleich zu T-lymphopenischen Kontrolltieren, wobei auch hier die CD4<sup>+</sup> T Zellen ein stärkeres proliferatives Potential aufwiesen als CD8<sup>+</sup> T Zellen.

Stabile Zellzahlen stellten sich ca. sechs Wochen nach mAk-Behandlung ein. Jedoch

wurden nur ca.  $\frac{2}{3}$  der Werte gesunder Tiere erreicht. Dieser Effekt einer unvollständigen Regeneration innerhalb eines peripheren T-Zell-Kompartiments wurde bereits von Mackall et al. 1997(b) für extrathymische Repopulationen beschrieben. Jedoch sollte an dieser Stelle daran erinnert werden, dass das initiale T-Zell-Inokulum mit einer Größe von  $5 \times 10^6$  peripheren T Zellen extrem klein war und nur einem Tausendstel eines gesunden Tieres entsprach. Von dieser Seite betrachtet ist eine erreichte  $\frac{2}{3}$  Repopulation extrem hoch.

In Lymphknoten und in der Milz konnte der Effekt der erhöhten T-Zell-Proliferation nach CD28-Superagonist-Behandlung noch länger als im Blut, sogar sieben Wochen nach einer einzigen Gabe von 1mg des superagonistischen, anti-CD28 mAKs beobachtet werden.

Eine so starke Beschleunigung der Regeneration eines T-Zell-Kompartiments in Form einer gesteigerten, polyklonalen Expansion beinhaltet eine erhöhte Gefahr auftretender, autoreaktiver T Zellen, welche die Gefahr von Autoimmunkrankheiten mit sich brächten. Solch ein negativer Nebeneffekt einer CD28-Superagonist-Behandlung konnte bislang nicht beobachtet werden. Der Grund dafür wird in einer, während der CD28-Stimulation erhöhten Proliferation von Treg Zellen gesehen (Lin and Hünig, 2003). Zytometrische Messungen von Lymphknotenzellen rekonstituierter, CD28-Superagonist behandelte Ratten ergaben jedoch, dass Treg Zellen nach Abklingen des mitogenen Effekts der CD28-Stimulation wieder auf ein normales Niveau zurückkehren.

Einen Einfluss auf die Regeneration anderer Leukozytenpopulationen konnte bis auf Granulozyten nicht oder nur schwach (nicht signifikant) festgestellt werden. Granulozyten zeigten interessanterweise innerhalb der ersten Tage nach erfolgter mAK-Behandlung (1mg) einen dramatischen Anstieg der Zellzahl. Dies wurde bereits von Marta Rodríguez-Palmero (persönliche Mitteilung von M. Rodríguez-Palmero und T. Hünig) bei Behandlung nicht-thymektomierter Tiere beobachtet. Es existieren Arbeiten, in denen beschrieben wurde, dass der GM-CSF Promotor auf kostimulatorische Signale von CD28 antwortet - also eine Verknüpfung zwischen den Signalwegen, aktiviert durch CD28 und dem Promotor von GM-CSF, besteht. (Shannon et al., 1995; Shang et al., 1999). Ebenfalls konnte in Mäusen beobachtet werden, dass die Inokulation von löslichem CD40L in KM-transplantierten Tieren einen Effekt auf hämatopoetische Vorläuferzellen ausübte, was sich in einer verbesser-

ten Rekonstitution von Blutplättchen aber auch speziell von Granulozyten widerspiegelte (Funakoshi et al., 1997). Inwieweit ein Zusammenhang zwischen voran Beschriebenem und erhöhter Granulozytenzahl im Blut nach Superagonist-Behandlung besteht, konnte bislang nicht geklärt werden. Jedoch sollte die Induktion dieser Proliferation von Granulozyten mittels superagonistischem, CD28-spezifischem mAk als positiver, zusätzlicher Effekt in Hinblick späterer, therapeutischer Anwendung gewertet werden. Eine erhöhte Granulozytenzahl in immunsupprimierten Patienten würde die Eliminierung von bakteriellen Infektionen wesentlich verbessern.

#### **4.2. T-Zell-Funktion nach peripherer T-Zell-Expansion mittels CD28-Superagonist**

Eine erhöhte Geschwindigkeit der Regeneration eines T-Zell-Kompartiments könnte eventuell den Verlust der T-Zell-Funktion mit sich bringen, was jedoch in verschiedenen Experimenten widerlegt werden konnte.

So proliferierten und produzierten CD28-expandierte Lymphknotenzellen aus T-lymphopenischen, rekonstituierten Tieren Zytokine als Antwort auf eine polyklonale Stimulation mit Concanavalin A *in vitro*. Gleichzeitig führte eine durch CD28-Superagonist gesteuerte, polyklonale T-Zell-Expansion zu einer favorisierten Bildung einer Th2-Immunantwort, was sich in einer erhöhten Produktion von IL-4, sowie niedrigeren IFN $\gamma$ -Gehalte nach ConA-Stimulation bei JJ316-behandelten Ratten im Vergleich zu den Kontrolltieren zeigte. Dies steht in Einklang mit Ergebnissen aus früheren Experimenten, bei denen beobachtet wurde, dass bei einer Stimulation mit CD28-Superagonist bevorzugt prominente Th2-Zytokine wie IL-10 und IL-4 sowie Th2-abhängige Ig-Isotypen wie IgG1, IgG2a und IgE produziert wurden (Tacke et al., 1997; Rodríguez-Palmero et al., 1999).

Dem gegenüber produzierten Lymphknotenzellen beider Versuchsgruppen annähernd gleich viel IL-10, ebenfalls die Aussage unterstützend, dass nach Abklingen des mitogenen Effekts der CD28-Stimulation keine erhöhte Präsenz der Treg Zellen vorliegt. Ähnlich verhielten sich auch mittels CD28-Superagonist expandierte Milzzellen nach polyklonaler Stimulation mit ConA, wobei hier jedoch eine auffällig erhöhte IL-10 Produktion vorlag. Dieser Effekt bleibt bislang ungeklärt. Denkbar wäre hier ein Zusammenhang mit einem speziellen "homig"-Verhalten von Treg Zellen, aber auch eine andere Leukozytenpopulation als IL-10 Quelle.

Trotz bevorzugter Differenzierung in Th2-Richtung konnte anhand einer

Hauttransplantation gezeigt werden, dass CD28-Superagonist-behandelte Tiere auf Alloantigene *in vivo* antworten konnten und somit also auch zu einer zellvermittelten Immunantwort fähig waren, welche während der Regenerationsphase in JJ316-behandelten Tieren (1mg) nicht etwa verzögert oder langsamer sondern sogar geringfügig schneller verlief.

Für die Untersuchung, ob Superagonist-expandede T Zellen ein spezifisches Antigen erkennen, und auch in der Lage sind, eine normale Immunantwort dagegen zu bilden, wurde die Immunantwort auf eine Stimulation mit KLH *in vivo* und *in vitro* getestet. Eine *in-vitro*-Restimulation mit KLH zeigte proliferative Antworten von Lymphknoten- und Milzzellen KLH-immunisierter Ratten aus der Superagonist-behandelten Gruppe und auch aus der Kontrollgruppe. Es zeigte sich, dass alle Tiere die Fähigkeit besaßen, eine KLH-Gedächtniszellpopulation aufzubauen. Ein Vergleich beider Gruppen ergab zusätzlich eine deutlich erhöhte Proliferationsrate CD28-Superagonist-behandelter Tiere. Eine mögliche Erklärung wäre hier, dass die erhöhte T-Zell-Zahl und die favorisierte Induktion des Th2-Phenotyps nach einer Behandlung mit CD28-Superagonist, eine verbesserte T-Zell-Hilfe bei der humoralen Antwort auf die Stimulation mit KLH ergaben. Dies sollte sich dann auch in einer erhöhten, KLH-spezifischen Antikörperproduktion widerspiegeln. Es zeigten sich jedoch gleich hohe Titer KLH-spezifischer Antikörper, was wiederum bedeutete, dass auch ohne CD28-Superagonist gesteuerte T-Zell-Proliferation die T-Zell-Hilfe für dieses hoch immunogene Protein gesättigt war.

Eine Intrazellulärfärbung nach Restimulation mit KLH ergab zunächst, getestet von Marta Rodríguez-Palmero, dass sich die Frequenzen IFN $\gamma$ -produzierender Zellen bei CD28-Superagonist-behandelten und Kontrolltieren nicht unterschieden. Zusätzlich konnten IL-4 produzierende Zellen nur bei den mit superagonistischem mAk behandelten Tieren angefärbt werden (Elflein et al., 2003). Im späteren Zytokin Elisa traten jedoch Unterschiede in den Mengen an produziertem IFN $\gamma$  zwischen den Versuchsgruppen auf, wobei die IFN $\gamma$ -Produktion bei Superagonist-behandelten Ratten niedriger ausfiel. Auch anhand dieser Ergebnisse wird noch einmal die schon mehrfach erwähnte, durch CD28-Superagonist-Behandlung favorisierte Ausdifferenzierung einer Th2-Immunantwort deutlich. Gleichzeitig ist aber auch eine Aufrechterhaltung der Th1-Funktion erkennbar.

Zusammengefasst beschleunigt CD28-Superagonist-Behandlung die Repopulation eines peripheren T-Zell-Kompartiments nach T-Zell-Depletion, wobei sich keine Nachteile hinsichtlich der Repertoiregröße und der T-Zell-Funktion ergeben.

### **4.3. Modulation der Immunantwort gegen Infektionserreger mittels CD28-Superagonist**

Wie bereits erwähnt, besitzt CD28-Superagonist nicht nur die Eigenschaft, eine starke T-Zell-Expansion zu initiieren. Dieser Antikörper fördert auch die Proliferation von regulatorischen T Zellen, und eine Stimulation mit CD28-Superagonisten führt zu einer bevorzugten Differenzierung von CD4<sup>+</sup> T Zellen in Th2-Richtung. Diese Eigenschaften des CD28-Superagonisten könnten die Immunantwort gegen Infektionserreger beeinflussen. Daher befasste sich ein weiterer Teil der vorliegenden Arbeit mit der Modulation der Immunantwort gegen Infektionserreger mittels CD28-Superagonisten. Ausgewählte Erreger waren *Listeria monocytogenes* und *Nippostrongylus brasiliensis*. Über beide Infektionen ist bekannt, dass sie stark polarisierte Immunantworten auslösen. Alle Infektionen wurden an naiven Tieren durchgeführt.

Für die Erkennung und Beseitigung von *Listeria monocytogenes* Bakterien werden primär CD8<sup>+</sup> Zellen benötigt (Lukacs und Kurlander, 1989; Kaufmann 1993; Berg et al. 2003; Schiemann et al., 2003). Aber auch Th1-polarisierte CD4<sup>+</sup> T Zellen sind an einer Immunantwort gegen Listerien beteiligt, wobei ihre Funktion hierbei nicht eindeutig geklärt ist. So sind CD4<sup>+</sup> T Zellen wesentlich an der Bildung von Granulomen und der Induktion einer effizienten CD8<sup>+</sup> Zell-Antwort beteiligt (Mielke et al., 1992; Wodarz and Jansen, 2001). Ebenfalls diskutiert wird eine unterstützende Funktion bei der Ausbildung eines optimalen Niveaus an CD8<sup>+</sup>-Gedächtniszellen (Shedlock et al., 2003).

Eine Infektion mit *Listeria monocytogenes* führte zunächst zu deutlich höheren Erregerzahlen in den Lebern der mit CD28-Superagonist behandelten Tiere. Dies könnte auf ein verzögertes T-Zell-Priming zurückzuführen sein, da sich zu diesem Zeitpunkt die CD28-Superagonist-gesteuerte Expansion und die Infektion überlagern, und dabei die starke proliferative Antwort auf die CD28-Superagonist-Stimulation

andere Immunreaktionen, wie eben zum Beispiel das T-Zell-Priming, verhindert bzw. verzögert. T-Zell-Priming bei einer Listerieninfektion findet schon innerhalb der ersten 3 Tage statt (Mercado et al., 2000; Kursar et al., 2004). Somit beginnt eine spezifische antilisteriale Abwehr schon wenige Tage nach Infektionsbeginn. Denkbar wäre ebenfalls ein Einfluss der starken Aktivierung von Treg Zellen, welche, zum Beispiel über IL-10, die Induktion der Th1- und CD8<sup>+</sup>-Immunität blockieren. Bei einer Behandlung mit 0,1mg CD28-Superagonist findet zwar auch eine selektive Treg-Zell-Aktivierung statt, welche jedoch viel geringer ist als bei 1mg Behandlung.

Die anfänglichen hohen Erregerzahlen JJ316-behandelter Tiere sanken jedoch gegen Ende der Infektion auf das Niveau der Kontrolltiere ab. Dies zeigt, dass der anfängliche Nachteil bei der antilisterialen Abwehr nur transient war.

Die Färbung von Gewebeschnitten listerieninfizierter Tiere zeigte eine deutlich erhöhte Anzahl von Granulomen in den Lebern der mit CD28-Superagonist behandelten Tiere im Vergleich zu den Kontrollen. Der Grund dafür könnte einerseits sein, dass eine durch CD28-Stimulation gehemmte, rasche Immunantwort einen stärkeren Listerienbefall der Organe verursacht, dessen erfolgreiche Abwehr nach Abklingen des suppressiven Effekts nun auch zur vermehrten Bildung von Granulomen führt. Andererseits käme jedoch auch in Betracht, dass die aufgrund der durch CD28-Superagonist-Stimulation besonders angesprochenen CD4<sup>+</sup> T Zellen, die Bildung von Granulomen favorisieren. Es existieren Arbeiten, in denen beschrieben ist, dass besonders CD4<sup>+</sup>-Zellen an der Bildung von Granulomen bei einer Listerieninfektion beteiligt sind (Mielke, 1991; Mielke et al., 1992).

Um den Einfluss von CD28-Superagonist-Behandlung auf die Bildung von *Listeria monocytogenes*-spezifischer Gedächtniszellen zu untersuchen, wurden Lymphknoten- und Milzzellen Listerien-infizierter Tiere (behandelt mit 1mg JJ316 oder Isotypkontrolle) mit p60 *in vitro* restimuliert. p60 ist ein 60kDa Oberflächenprotein und auch als IAP bekannt. Zunächst wurde vermutet, es spiele eine Rolle bei der Invasion von Wirtszellen (Kuhn and Goebel, 1989). In jüngster Zeit wurde es auch Zusammenhang mit Zellteilungsprozessen von Listerien beobachtet (Cabanés et al., 2002). Zellen von mit superagonistischem, CD28-spezifischem mAk behandelten PVG-Ratten und Kontrolltieren zeigten proliferative Antworten und IL-10 sowie IFN $\gamma$ -Produktion nach p60-Restimulation *in vitro*. Geringere Proliferation und niedrigere IFN $\gamma$ -Produktion von Milzzellen CD28-Superagonist-behandelter Ratten 6 Tage nach Infektionsstart bekräftigen hier jedoch wiederum die Annahme einer transient

gehemmten Immunantwort JJ316-behandelter Tiere. Letztendlich zeigte sich aber kein Einfluss einer CD28-Superagonist-Behandlung auf die Bildung Listerien-spezifischer Gedächtniszellen.

Im Gegensatz zu *Listeria monocytogenes* verursacht eine Infektion mit dem Rattenhakenwurm *Nippostrongylus brasiliensis* eine stark Th2-polarisierte Immunantwort, wobei eine IL-4 bzw. IL-13 gesteuerte Becherzellproliferation (Becherzellhyperplasie) mit anschließender, stark erhöhter Schleimsekretion im Darm für eine Beseitigung der adulten Würmer im Vordergrund stehen (Urban et al., 1998; McKenzie et al., 1999; Holland et al., 2000). Ähnliche Vorgänge laufen auch in der Lunge zu einem früheren Zeitpunkt der Infektion ab. Es wird jedoch vermutet, dass es sich hier weniger um die Bekämpfung der parasitischen Würmer, sondern vielmehr eine Reaktionen auf Häutungspartikel handelt (Ramaswamy et al., 1991; Matsuda et al., 2001).

Mittels Messung des Eiausstoßes im Kot infizierter Tiere lässt sich der Verlauf einer *Nippostrongylus*-Infektion gut verfolgen. Eine gleichzeitig zur Infektion verlaufende CD28-Superagonist-Behandlung führte nicht, wie aufgrund der durch Superagonist favorisierten Th2-Immunantwort vermutet, zu einer verkürzten Infektionsdauer. Ebenfalls gab es keine Unterschiede in der Anzahl der ausgeschiedenen Eier/ g Kot an den einzelnen Tagen der Infektion zwischen Superagonist-behandelten Tieren und der Kontrolle. Denkbar ist, dass auch ohne Superagonist-gesteuerter T-Zell-Expansion, die T-Zell-Hilfe für die Bekämpfung des Parasiten gesättigt war.

Anhand von gefärbten Gewebeschnitten der Lunge konnten Becherzellhyperplasie und perivaskuläre/ peribronchiale Granulome bei infizierten JJ316-behandelten und Kontrolltieren beobachtet werden, wobei die Granulome CD28-Superagonist-behandelter Ratten geringfügig kleiner waren. Ein deutlicher Unterschied zeigte sich im Anfärben der peribronchialen, submukosalen Drüsen. Peribronchiale, submukosale Drüsen sind die Hauptquelle des tracheobronchialen Schleims und spielen eine physiologische Hauptrolle bei allgemein verbreiteten Lungenkrankheiten, wie zum Beispiel auch bei bronchialem Asthma (Ebsen et al., 2002). Jedoch nur bei infizierten Kontrolltieren konnte dieses Gewebe angefärbt werden. Vermutlich sezernieren auch diese Drüsen, genau wie die Becherzellen, vermehrt Schleim während der Lungenpassage der Wurmlarven, wobei hier, eventuell vergleichbar mit den Becherzellen, die Hyperplasie und Schleimproduktion über Zytokine gesteuert wird.



Eine fehlende Aktivierung dieser Drüsen in Superagonist-behandelten Tieren könnte darauf zurückzuführen sein, dass die durch die mAk-Behandlung vermehrten anti-inflammatorischen Treg Zellen diesen Zytokinen entgegenwirken. Letztendlich bleibt jedoch die genaue Funktion des peribronchialen, submukosalen Drüsengewebes im Rahmen einer *Nippostrongylus*-Infektion wie auch die fehlende Hyperplasie bei CD28-Superagonist-behandelten Tieren im Einzelnen noch ungeklärt.

Die Bildung von *Nippostrongylus brasiliensis* (Nb) - spezifischen Gedächtniszellen wurde durch eine gleichzeitige CD28-Superagonist-Behandlung nicht wesentlich beeinflusst. Besonders Lymphknotenzellen beider Versuchsgruppen proliferierten und sezernierten Zytokine als Antwort auf eine Restimulation mit NES *in vitro*. Es wurden somit im Verlauf der Wurminfektion Nb-spezifische Gedächtniszellen gebildet. Unterschiede aufgrund einer mAk-Behandlung traten bei der proliferativen Antwort nicht auf. Es zeigte sich aber wiederum das durch CD28-Superagonist-Behandlung bevorzugt exprimierte Th2-Zytokinprofil, welches sich im Zuge der schon stark Th2-polarisierten Nb-Infektion besonders in der Produktion von IL-4 während der Infektion (Tag8) von den Kontrolltieren unterschied. Gleicher Effekt spiegelte sich auch bei der Bildung von IgE wieder. Eine ohnehin schon erhöhte Produktion von IgE Nb-infizierter Kontrollratten fiel jedoch noch signifikant niedriger aus bei einem Vergleich mit produziertem IgE der mit CD28-Superagonist behandelten Ratten. Insgesamt gesehen zeigte sich jedoch kein wesentlicher Einfluss einer CD28-Superagonist-Behandlung auf die Dauer und Stärke einer Nb-Infektion sowie auf die Bildung Nb-spezifischer Gedächtniszellen.

In jüngster Zeit wurde beobachtet, dass eine Behandlung mit 1mg CD28-Superagonist ebenfalls die Proliferation von regulatorischen T Zellen fördert (Lin and Hünig, 2003), und dass bei einer Gabe von 0,1mg JJ316 eine Treg-Zell-Aktivierung von einer zusätzlichen Lymphozytose abgrenzbar war (N. Beyersdorf und T. Hünig, persönliche Mitteilung). Treg Zellen spielen eine wesentliche Rolle bei der Limitierung immunpathologischer Begleiterscheinungen aufgrund übermäßiger, durch Erreger-induzierter, inflammatorischer Immunantworten. Dabei zeigt sich oft ein Zusammenspiel natürlicher ( $CD4^+CD25^+$ ) und induzierter, regulatorischer T Zellen in Form einer Induktion der Differenzierung Zytokin-produzierender, regulatorischer T Zellen (Tr1/ Th3) durch  $CD4^+CD25^+$  T Zellen (Foussat et al., 2003; Kingston and McGuirk, 2004). Treg Zellen nehmen aber auch Einfluss auf ein ausbalanciertes Verhältnis zwischen Wirt und Parasit/Mikroben, wobei sie über die Aufrechterhaltung

einer chronischen, mikrobiellen Infektion, eine effektive Strategie der Aufrechterhaltung einer lebenslangen Immunität gegenüber einer Reinfektion bewirken (Belkaid et al., 2002; Kingston and McGuirk, 2004; Sakaguchi, 2004).

Bei einer Infektion mit *Listeria monocytogenes* ergab eine gleichzeitige Behandlung mit 0,1mg CD28-Superagonist nur hinsichtlich der Bildung von Granulomen in der Leber einen Unterschied zu den Kontrolltieren. Dieses Auftreten von Granulomen könnte ebenfalls, wie bei einer Behandlung mit 1mg CD28-Superagonist, für eine transiente Verzögerung der Immunantwort aufgrund der Aktivierung von Treg Zellen sprechen. Jedoch ist dieser Effekt bei einer Applikation von nur 0,1mg wesentlich geringer als bei 1mg Superagonist-Behandlung. Somit ist die Verzögerung der Induktion einer Immunantwort nicht so stark, was auch mit den gleich hohen Erregerzahlen von 0,1mg CD28-Superagonist-behandelten Ratten und Kontrolltieren in Einklang steht.

Eine Behandlung mit 0,1mg CD28-Superagonist bei gleichzeitiger Infektion mit dem Rattenhakenwurm *Nippostrongylus brasiliensis* (Nb) ergab besonders in Hinblick der immunpathologischen Begleiterscheinungen Unterschiede zu den anderen Versuchsgruppen (1mg CD28-Superagonist und Isotypkontrolle). So zeigte sich anhand von gefärbten Gewebeschnitten von Lungen Nb-infizierter Tiere (behandelt mit 0,1mg JJ316) eine deutlich verminderte Becherzellproliferation, und auch die Anzahl und Größe der peribronchialen/ perivaskulären Granulome war wesentlich reduziert. Gleichzeitig konnte aber keine gegenüber den Kontrolltieren veränderte Infektionsdauer beobachtet werden. Verminderte proliferative Antworten und erhöhte IL-10-Produktion nach Restimulation von Lymphknotenzellen infizierter Tiere behandelt mit 0,1mg CD28-Superagonist mit NES sprechen ebenfalls für einen Einfluss von Treg Zellen, wobei ein direkter Zusammenhang noch nicht geklärt wurde.

Insgesamt gesehen kam es zu einer eher moderaten Modulation der Immunantwort gegen Infektionserreger mit CD28-Superagonist im Sinne einer initialen Verzögerung der Abwehr von *Listeria monocytogenes* (jedoch nicht bei der Abwehr von *Nippostrongylus brasiliensis*) sowie einer leicht reduzierten proliferativen Recall-Antwort und einer erhöhten IL-10 Produktion. Im Hinblick auf die Protektion gegenüber immunpathologischen Begleiterscheinungen konnte eine Reduktion der Lungengranulome sowie der Hyperplasie Schleim-bildender Zellen bei *Nippostrongylus brasiliensis* Infektionen beobachtet werden.

## 4.4. Ausblick

Die Nutzung der Eigenschaft von CD28-Superagonisten, eine polyklonale Expansion reifer, residueller T Zellen zu induzieren, könnte besonders im Hinblick auf die Regeneration eines T-Zell-Kompartiments in immunsupprimierten Patienten nach zytotoxischer Anti-Tumor-Therapie ein effektives therapeutisches Mittel bieten. Eine Behandlung mit superagonistischem, CD28-spezifischem mAk könnte eine alternative Methode zum bisherigen adoptiven Transfer einer großen Anzahl von zuvor *in vitro* expandierten T Zellen darstellen (Garlie et al., 1999; Lokhorst and Liebowitz, 1999). Einziger Vorteil der herkömmlichen Methode gegenüber CD28-Superagonist-Gabe ist, dass ein gleicher Effekt auf CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> Zellen besteht. Es werden also sicherlich in der Zukunft für ein optimales, therapeutisches Protokoll zur Behandlung mit CD28-Superagonisten zusätzliche Komponenten für die Initiierung einer CD8<sup>+</sup>-T-Zell-Expansion notwendig sein, möglicherweise auch Superagonisten von Kostimulatoren von CD8<sup>+</sup> Zellen, wie z.Bsp. 4-1BB (Cooper et al., 2002; Maus et al., 2002). Eine solche Therapie wäre nicht sehr aufwendig, dadurch auch mit wenig Kosten verbunden und somit für viele Patienten zugänglich.

Weitere Vorteile einer CD28-Superagonist-Behandlung würden sich aus der polyklonalen T-Zell-Expansion, einer nach der Expansion fehlenden T-Zell-Depletion (Kontraktion des T-Zell-Kompartiments), der gleichzeitigen Erhöhung der Granulozytenzahlen, was einen besseren Schutz vor bakteriellen Infektionen bietet, und den bislang noch nicht beobachteten, toxischen Nebeneffekten ergeben.

Die wichtige Rolle von CD4<sup>+</sup> T Zellen bei der Verknüpfung vieler immunologischer Prozesse unterstreicht die Bedeutung der Entwicklung neuer, therapeutischer Mittel, die eine rasche Regeneration dieser Population nach zytotoxischer Therapie begünstigt und somit die Immunkompetenz in immunsupprimierten Patienten innerhalb kürzester Zeit verbessert.

## 5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden die *in-vivo*-Effekte eines „superagonistischen“ mAk mit Spezifität für den kostimulierenden Rezeptor CD28 der Ratte untersucht. Dieser Antikörper unterscheidet sich von konventionellen CD28-spezifischen mAk durch seine Fähigkeit, T Zellen auch ohne Ligation des TZR und damit polyklonal zu aktivieren. Die so ausgelöste Expansion der T Zellen verläuft so schnell und effizient wie eine durch Antigen gesteuerte Proliferation; die überproportionale Vermehrung anti-inflammatorischer regulatorischer T Zellen während der initialen Expansionsphase ist vermutlich für das Ausbleiben toxischer Effekte im Zuge der polyklonalen T-Zellvermehrung verantwortlich.

Im ersten Teil der Arbeit wurde das therapeutische Potential des CD28 Superagonisten zur Beschleunigung des Wiederaufbaus eines stark reduzierten T-Zellkompartiments durch Expansion residueller T Zellen getestet.

Um die Situation adulter, lymphopenischer Patienten mit fortgeschrittener Thymusathropie zu simulieren, wurden Experimente an thymektomierten Ratten durchgeführt, die nach letaler Bestrahlung frische Knochenmarkszellen sowie ein kleines Inokulum reifer T Zellen (in etwa  $1/1000$  der T Zellen eines gesunden Tieres) erhielten. Nach der Applikation von 1mg CD28-Superagonist/Tier war eine dramatische Beschleunigung der T-Zell-Repopulation zu beobachten mit bis zu fünf durchlaufenen Zellteilungen innerhalb von drei Tagen - eine Zellteilungsrate, wie sie bei Antigen-gesteuerter Proliferation beobachtet wird. Im Gegensatz zu dieser bleibt jedoch nach der polyklonalen, CD28-Superagonist induzierten Proliferation die Diversität des T-Zell-Kompartiments erhalten.

Obwohl die Stimulation mit superagonistischem mAk sowohl CD4<sup>+</sup> und auch CD8<sup>+</sup> T Zellen ansprach, war der Effekt auf die Expansion des CD4<sup>+</sup> T-Zell-Kompartiments ausgeprägter als auf die CD8<sup>+</sup> T-Zell-Population. Dies konnte sowohl bei der Analyse von peripheren Blutleukozyten als auch von Lymphknoten- bzw. Milzzellen CD28-Superagonist behandelte Tiere beobachtet werden. Bei einer eventuellen klinischen Nutzung von CD28-Superagonisten zur T-Zellvermehrung wäre deshalb die zusätzliche Gabe eines die CD8<sup>+</sup> T Zellen stimulierenden Mittels, wie z.Bsp. IL-15, für eine optimale Therapie notwendig.

Unerwartet war ein ebenfalls positiver Effekt der CD28-Superagonist-Stimulation auf die Expansion der Granulozytenpopulation. Die Ursache dafür ist zur Zeit noch nicht geklärt, könnte jedoch in der Produktion von GM-CSF durch aktivierte CD4<sup>+</sup> T Zellen

liegen. Im Zusammenhang einer CD28-Superagonist-Therapie könnte es sich um einen nützlicher Nebeneffekt handeln, da durch die Vermehrung der Granulozyten die Abwehr von Bakterien rascher wieder hergestellt wird.

Eine polyklonale Expansion von T Zellen birgt das Risiko der Aktivierung autoreaktiver Zellen. Bei einer CD28-Superagonist-Stimulation wird jedoch gleichzeitig zur gesteigerten Proliferation von Effektorzellen die Bildung von regulatorischen T Zellen erhöht, die Autoimmunität effektiv unterdrücken. Wie hier gezeigt wird, geht nach abgeschlossener Expansion des T-Zell-Kompartiments die Zahl an CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T Zellen dann wieder auf ein niedrigeres Niveau (entsprechend dem gesunder, unbehandelter Tiere) zurück.

Die Untersuchung der Funktion von T Zellen, die *in vivo* durch Behandlung mit CD28-Superagonist vermehrt worden waren, ergab eine normale proliferative Antwort und Zytokinproduktion nach polyklonaler Stimulation mit ConA *in vitro*. Sie besaßen auch die Fähigkeit, nach *in-vivo*-Immunisierung mit KLH, eine gegen dieses Proteinantigen gerichtete Immunantwort zu generieren: neben robuster Antikörperproduktion konnten *in vitro* „Recall“ Antworten der T Zellen im Sinne einer Antigen-induzierten Proliferation und Zytokinproduktion gemessen werden. Die vermehrte Produktion von IL-4 durch CD28-Superagonist expandierte T Zellen bestätigte die schon an naiven Tieren beobachtete Th2-gewichtete Differenzierung in Antwort auf diesen Stimulus. Für die Untersuchung der Alloreaktivität CD28-Superagonist expandierter Zellen wurde eine Hauttransplantation (Ratten vom MHC-Haplotyp RT1<sup>c</sup> erhielten Haut von Ratten des MHC-Haplotyps RT1<sup>l</sup>.) durchgeführt. Sowohl Antikörper-behandelte als auch Kontrolltiere stießen das Transplantat ab, wobei eine geringfügig beschleunigte Abstoßung bei CD28-Superagonist behandelten Ratten zu beobachten war. Diese Ergebnisse zeigen deutlich, dass CD28-Superagonist-expandierte Zellen die Fähigkeit besitzen, eine zellvermittelte Immunantwort gegen allogene Transplantate zu bilden.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde der Einfluss einer CD28-Superagonist-Behandlung auf Immunantworten gegen infektiöse Krankheitserreger an immunologisch intakten Ratten untersucht. *Listeria monocytogenes* und *Nippostrongylus brasiliensis* kamen aufgrund der Induktion stark polarisierter Immunantworten (Th1 bzw. Th2) zur Anwendung. Die Behandlung mit 1mg CD28 Superagonist gleichzeitig mit der Infektion hatte bei *Listeria monocytogenes* Infektion einen transienten Anstieg der Keimzahl zur Folge, bei *Nippostrongylus brasiliensis* keinen Einfluss auf die Kontrolle der Erreger. *In-vitro*-Restimulationen zeigten anhand von proliferativen Antworten und

Zytokinproduktion, dass gegen beide Erreger spezifische Immunantworten in allen Versuchstiergruppen generiert und eine Gedächtnispopulation gebildet wurde. Bei der Bewertung histopathologischer Begleiterscheinungen zeigten sich jedoch deutliche Effekte der Superagonist-Behandlung: Bei der *Listeria monocytogenes* Infektion fanden sich deutlich mehr angefärbte Granulome in der Leber; dies könnte mit dem transienten Anstieg der Keimzahl und der folgenden heftigeren Immunantwort zusammenhängen. Dem gegenüber waren nach einer *Nippostrongylus brasiliensis* - Infektion die perivaskulären/peribronchialen Granulome in der Lunge behandelte Tiere kleiner als bei Kontrolltieren. Für beide Effekte könnte eine präferentielle Aktivierung regulatorischer T Zellen und/oder die durch CD28-Superagonist-Stimulation favorisierte Th2-Differenzierung verantwortlich sein.

Um einer möglichen Beteiligung von Treg Zellen nachzugehen, wurde zusätzlich eine 10-fach niedrigere Dosis des CD28 Superagonisten eingesetzt, da diese in Normaltieren eine Aktivierung von Treg Zellen ohne generalisierte Lymphozytose auslöst (N. Beyersdorf et al., pers. Mitteilung). Die Granulombildung in der *Listeria monocytogenes* Infektion lag in der mit 0,1mg behandelten Gruppe zwischen der in Kontrolltieren und der in der Gruppe mit der hohen Antikörperdosis. In der *Nippostrongylus brasiliensis* - Infektion konnte jedoch nach niedrig-dosierter CD28 Therapie im Vergleich zur Kontrollgruppe eine deutlich geringere Becherzellproliferation und eine reduzierte Anzahl an kleinen, perivaskulären/ peribronchialen Granulomen beobachtet werden. Die verminderte proliferative Antwort und erhöhte IL-10-Produktion nach Restimulation von Lymphknoten- und Milzzellen dieser Tiere *in vitro* sprechen für eine durch Treg Zellen supprimierte Immunantwort, wobei ein direkter Zusammenhang noch zu klären ist.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass CD28-Superagonisten starke T-Zell-Mitogene sind, durch welche es jedoch nicht zur Beeinträchtigung der T-Zell-Funktion kommt. Somit wären mit einem anti-humanen, superagonistischen, CD28-spezifischen mAk günstige therapeutische Bedingungen für Patienten mit pathologisch erniedrigten T-Zell-Zahlen gegeben, den Zeitraum für eine erhöhte Gefahr lebensbedrohlicher Infektionen zu verkürzen. Die transiente „Überaktivierung“ regulatorischer T Zellen bei CD28-Stimulation eines intakten Immunsystems könnte als anti-inflammatorisches Therapieprinzip zum Einsatz kommen, u. a. zur Kontrolle immunpathologischer Nebeneffekte der Erregerabwehr.

## 6. Summary

The present project focuses on the mitogenic effects of the superagonistic rat anti-CD28 mAb, with particular emphasis on its ability to activate and expand residual, mature T cells in lymphopenic rats in a TCR independent manner. The CD28 superagonist possesses the capacity to initiate T cell activation without TCR engagement. The resulting polyclonal T cell expansion is as rapid and efficient as an antigen driven proliferation, and its additional property to transiently increase the frequency of anti-inflammatory regulatory T-cells is likely to be responsible for the of toxic side-effects during CD28-driven polyclonal T-cell expansion.

In the first part of the work, the therapeutic potential of CD28 superagonists in rebuilding a collapsed T-cell compartment was tested.

As a model for T-lymphopenic patients with thymic atrophy, thymectomised rats were lethally irradiated and reconstituted with bone marrow cells and a small inoculum of mature T-cells. Treatment with 1mg of CD28 superagonist resulted in a dramatic repopulation of the T cell compartment. The stimulated cells underwent up to five cell divisions within three days, a proliferation rate comparable with antigen-driven proliferative responses. In contrast to antigen driven proliferation, however, CD28-driven expansion maintains T cell clonal diversity.

Analysis of peripheral blood lymphocytes, lymph node cells and splenocytes from CD28 superagonist treated animals showed that while all T-cells were responsive to the CD28 superagonist, the response was more pronounced in the CD4<sup>+</sup> than in the the CD8<sup>+</sup> T cell compartment. In the case of the CD8<sup>+</sup> T cell compartment, future therapeutic applications will need to incorporate additional CD8<sup>+</sup> T cell stimulators such as IL-15.

Surprisingly, the granulocyte population was also found to be responsive to superagonist stimulation. At present the exact cause for this has not been clarified, but may be explained as an indirect effect of GM-CFS production by CD28-activated CD4 T-cells. It is conceivable that as a useful side effect of treatment with the superagonist, elevated levels of granulocytes will enhance the defence against bacterial infections. The polyclonal expansion and activation of the whole T cell compartment simultaneously carries the risk of generating autoreactive T cells. However, CD28 superagonist treatment concurrently expands regulatory T cells, which are known to effectively inhibit autoimmune disease. Once the T cell compartment completes its expansion, the

number of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells returns to a level that is comparable with untreated animals.

CD28 superagonist expanded T cells were found to successfully function as T helper cells. This was shown by *in vitro* polyclonal stimulation with ConA, which resulted in polyclonal T cell proliferation and cytokine production. In addition, immunisation with KLH led to an antigen specific immune response characterised by KLH specific antibodies and a robust proliferative recall response *in vitro*. Furthermore, based on the cytokine profile analysed, a skewing of CD28 superagonist-expanded T-cells towards the Th2 T cell population was determined, in keeping with previous observations with CD28 stimulated naive rats.

CD28 superagonist expanded T cells were also found to generate a T cell mediated immune response against alloantigens. Skin transplantation experiments showed that animals treated with CD28 superagonist mAb showed a marginal acceleration in graft rejection.

In the second part of this thesis, the influence of CD28 superagonist treatment on the immune response to infectious agents in immunologically normal rats was studied. In particular, the intracellular bacterium *Listeria monocytogenes* and the helminth *Nippostrongylus brasiliensis* were employed because they induce markedly skewed immune responses (Th1 and Th2, respectively). Treatment with 1mg CD28 superagonist led to a transient increase in bacterial load in case of *Listeria monocytogenes* but had no effect on the control of the *Nippostrongylus brasiliensis* infection. In-vitro-restimulation assays determined a pathogen specific immune response as well as the generation of a memory population. Interestingly the histopathological analysis of superagonist treated animal livers revealed an increase in granulomas post infection with *Listeria monocytogenes*, which could be secondary to the transient increase in bacterial load and the ensuing stronger immune response. In contrast, the presence of granulomas in the lungs of *Nippostrongylus brasiliensis* infected animals were smaller when treated with 1mg superagonist. Both observed effects could be mediated by an increase in the number of regulatory T cells and/or the polarised Th2 response upon treatment with CD28 superagonist.

To follow up on a potential role of Treg cells in controlling immunopathology, a tenfold lower dose of the CD28 superagonist, known to efficiently activate Treg cells without generalised lymphocytosis, was employed. Granuloma formation in *L. monocytogenes* infected animals treated with 0.1mg of CD28 superagonist was intermediate bet-



ween control and high-dose treatment. In *N. brasiliensis* infection, however, a markedly lower proliferation of goblet cells was observed as well as reduced numbers of small perivascular/ peribronchial granulomas were observed under low-dose anti-CD28 therapy. A reduced proliferative response and increased IL-10 production after restimulation *in vitro* suggests that the response is influenced by T reg cells, however a direct correlation remains to be established.

In summary, CD28 superagonists are strong T cell mitogens which do not impair T cell function. Treatment with anti-human CD28 superagonist could create favourable therapeutic conditions to reduce the time during which there is an increased risk of life-threatening infections in patients with pathologically low T cell numbers. Furthermore, the transient „hyperactivation“ of Treg cells during CD28 stimulation of an intact immune system suggests an anti-inflammatory strategy which may e.g. be useful to control immunopathological side effects of host defense against infectious agents.

## 7. Literaturverzeichnis

Agata Y, Kawasaki A, Nishimura H, Ishida Y, Tsubata T, Yagita H and Honjo T. Expression of the PD-1 antigen on the surface of stimulated mouse T and B lymphocytes. *Int Immunol*. 8(5). pp. 765-72. (1996)

Alegre ML, Frauwirth KA and Thompson CB. T-cell regulation by CD28 and CTLA-4. *Nat Rev Immunol*. 1(3). pp. 220-8. (2001)

Allen JE and Maizels RM. Th1-Th2: reliable paradigm or dangerous dogma? *Immunol Today*. 18(8). pp. 387-92. (1997)

Andrews NW and Portnoy DA. Cytolysins from intracellular pathogens. *Trends Microbiol*. 2(8). pp. 261-3. (1994)

Annacker O, Pimenta-Araujo R, Burlen-Defranoux O, Barbosa TC, Cumano A and Bandeira A. CD25<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T cells regulate the expansion of peripheral CD4 T cells through the production of IL-10. *J Immunol*. 166(5). pp. 3008-18. (2001)

Appleman LJ and Boussiotis VA. T cell anergy and costimulation. *Immunol Rev*. 192. pp. 161-80. (2001)

Asano M, Toda M, Sakaguchi N and Sakaguchi S. Autoimmune disease as a consequence of developmental abnormality of a T cell subpopulation. *J Exp Med*. 184(2). pp. 387-96. (1996)

Azuma M, Ito D, Yagita H, Okumura K, Phillips JH, Lanier LL and Somoza C. B70 antigen is a second ligand for CTLA-4 and CD28. *Nature*. 366(6450). pp. 76-9. (1993)

Bach JF. Regulatory T cells under scrutiny. *Nat Rev Immunol*. 3(3). pp. 189-98. (2003)

Baecher-Allan C, Brown JA, Freeman GJ and Hafler DA. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> regulatory cells in human peripheral blood. *J Immunol*. 167(3). pp. 1245-53. (2001)

Belkaid Y, Piccirillo CA, Mendez S, Shevach EM and Sacks DL. CD4+CD25+ regulatory T cells control *Leishmania major* persistence and immunity. *Nature*. 420(6915). pp. 502-7. (2002)

Bennett B, Check IJ, Olsen MR and Hunter RL. A comparison of commercially available adjuvants for use in research. *J Immunol Methods*. 153(1-2). pp. 31-40. (1992)

Bennett SR, Carbone FR, Karamalis F, Flavell RA, Miller JF and Heath WR. Help for cytotoxic-T-cell responses is mediated by CD40 signalling. *Nature*. 393(6684). pp. 478-80. (1998)

Berg RE, Crossley E, Murray S and Forman J. Memory CD8<sup>+</sup> T cells provide innate immune protection against *Listeria monocytogenes* in the absence of cognate antigen. *J Exp Med*. 198(10). pp. 1583-93. (2003)

Bischof A, Hara T, Lin CH, Beyers AD and Hünig T. Autonomous induction of proliferation, JNK and NF- $\alpha$ B activation in primary resting T cells by mobilized CD28. *Eur J Immunol*. 30(3). pp. 876-82. (2000)

Boise LH, Minn AJ, Noel PJ, June CH, Accavitti MA, Lindsten T and Thompson CB. CD28 costimulation can promote T cell survival by enhancing the expression of bcl-x<sub>L</sub>. *Immunity*. 3(1). pp. 87-98. (1995)

Boise LH, Gonzalez-Garcia M, Postema CE, Ding L, Lindsten T, Turka LA, Mao X, Nunez G and Thompson CB. bcl-x, a bcl-2-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death. *Cell*. 74(4). pp. 597-608. (1993)

Braun L and Cossart P. Interactions between *Listeria monocytogenes* and host mammalian cells. *Microbes Infect*. (7). pp. 803-11. (2000)

Bretscher PA. A two-step, two-signal model for the primary activation of precursor helper T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96. pp. 185-190 (1999)

Bretscher P and Cohn MA. theory of self-nonself discrimination. *Science* 169. pp. 1042-1049 (1970)

Brideau RJ, Carter PB, McMaster WR, Mason DW and Williams AF. Two subsets of rat T lymphocytes defined with monoclonal antibodies. *Eur J Immunol.* 10(8). pp. 609-15. (1980)

Brodie D, Collins AV, Iaboni A, Fennelly JA, Sparks LM, Xu XN, van der Merwe PA and Davis SJ. LICOS, a primordial costimulatory ligand? *Curr Biol.* 10(6). pp. 333-6. (2000)

Bromley SK, Iaboni A, Davis SJ, Whitty A, Green JM, Shaw AS, Weiss A and Dustin ML. The immunological synapse and CD28-CD80 interactions. *Nat Immunol.* 2(12). pp. 1159-66. (2001)

Brunet JF, Denizot F, Luciani MF, Roux-Dosseto M, Suzan M, Mattei MG and Golstein P. A new member of the immunoglobulin superfamily--CTLA-4. *Nature.* 328(6127). pp. 267-70. (1987)

Brunet LR, Finkelman FD, Cheever AW, Kopf MA and Pearce EJ. IL-4 protects against TNF-alpha-mediated cachexia and death during acute schistosomiasis. *J Immunol.* 1997; 159(2). pp. 777-85. (1997)

Brüggemann M. Evolution of the rat immunoglobulin gamma heavy-chain gene family. *Gene.* 74(2). pp. 473-82. (1988)

Burkly LC, Lo D and Flavell RA. Tolerance in transgenic mice expressing major histocompatibility molecules extrathymically on pancreatic cells. *Science.* 248(4961). pp. 1364-8. (1990)

Bush AO, Fernandez JC, Esch GW and Seed JR. Parasitism: The diversity and ecology of animal parasites. *Cambridge University Press* (2001)

Cabanes D, Dehoux P, Dussurget O, Frangeul L and Cossart P. Surface proteins and the pathogenic potential of *Listeria monocytogenes*. *Trends Microbiol.* 10(5). pp. 238-45. (2002)

Cederbom L, Hall H and Ivars F. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells down-regulate co-stimulatory molecules on antigen-presenting cells. *Eur J Immunol.* 30(6). pp. 1538-43. (2000)

Chambers WH, Vujanovic NL, DeLeo AB, Olszowy MW, Herberman RB and Hiserodt JC. Monoclonal antibody to a triggering structure expressed on rat natural killer cells and adherent lymphokine-activated killer cells. *J Exp Med.* 169(4). pp. 1373-89. (1989)

Chen Y, Kuchroo VK, Inobe J, Hafler DA and Weiner HL. Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalomyelitis. *Science.* 265(5176). pp. 1237-40. (1994)

Cheng TC. The biology of animal parasites. *WB Saunders Company.* Philadelphia and London (1964)

Coffman RL, Seymour BW, Hudak S, Jackson J and Rennick D. Antibody to interleukin-5 inhibits helminth-induced eosinophilia in mice. *Science.* 245(4915). pp. 308-10. (1989)

Conlan JW and North RJ. Neutrophils are essential for early anti-*Listeria* defense in the liver, but not in the spleen or peritoneal cavity, as revealed by a granulocyte-depleting monoclonal antibody. *J Exp Med.* 179(1). pp. 259-68. (1994)

Cooper D, Bansal-Pakala P and Croft M. 4-1BB (CD137) controls the clonal expansion and survival of CD8 T cells in vivo but does not contribute to the development of cytotoxicity. *Eur J Immunol.* 32(2). pp. 521-9. (2002)

Cooper MA, Bush JE, Fehniger TA, VanDeusen JB, Waite RE, Liu Y, Aguila HL and Caligiuri MA. In vivo evidence for a dependence on interleukin 15 for survival of natural killer cells. *Blood.* 100(10). pp. 3633-8. (2002)

Cossart P and Lecuit M. Interactions of *Listeria monocytogenes* with mammalian cells during entry and actin-based movement: bacterial factors, cellular ligands and signaling. *EMBO J.* 17(14). pp.3797-806. (1998)

Dabiri GA, Sanger JM, Portnoy DA and Southwick FS. *Listeria monocytogenes* moves rapidly through the host-cell cytoplasm by inducing directional actin assembly. *Proc Natl Acad Sci USA.* 87(16). pp. 6068-72. (1990)

Dai Z and Lakkis FG. Cutting edge: Secondary lymphoid organs are essential for maintaining the CD4, but not CD8, naive T cell pool. *J Immunol.* 167(12). pp. 6711-5. (2001)

Damle NK, Klussman K, Leytze G, Aruffo A, Linsley PS and Ledbetter JA. Costimulation with integrin ligands intercellular adhesion molecule-1 or vascular cell adhesion molecule-1 augments activation-induced death of antigen-specific CD4<sup>+</sup> T lymphocytes. *J Immunol.* 151(5). pp. 2368-79. (1993)

Davis SJ, Ikemizu S, Evans EJ, Fugger L, Bakker TR and van der Merwe PA. The nature of molecular recognition by T cells. *Nat Immunol.* 2003. 4(3). pp. 217-24.

de Boer M, Kasran A, Kwekkeboom J, Walter H, Vandenberghe P and Ceuppens JL. Ligation of B7 with CD28/CTLA-4 on T cells results in CD40 ligand expression, interleukin-4 secretion and efficient help for antibody production by B cells. *Eur J Immunol.* 23(12). pp. 3120-5. (1993)

Despommier DD and Karapelou JW. Parasite life cycles. *Springer Verlag.* New York, Berlin, Heidelberg, London, Paris, Tokyo (1987)

Dieckmann D, Bruett CH, Ploettner H, Lutz MB and Schuler G. Human CD4(+)CD25(+) regulatory, contact-dependent T cells induce interleukin 10-producing, contact-independent type 1-like regulatory T cells [corrected]. *J Exp Med.* 196(2). pp. 247-53. (2002)

Dong C and Flavell RA: Th1 and Th2 cells. *Curr Opin Hematol* 8. pp. 47-51 (2001)

Dong H, Zhu G, Tamada K and Chen L. B7-H1, a third member of the B7 family, co-stimulates T-cell proliferation and interleukin-10 secretion. *Nat Med.* 5(12). pp. 1365-9. (1999)

Dunn PL and North RJ. Early gamma interferon production by natural killer cells is important in defense against murine listeriosis. *Infect Immun.* 59(9). pp. 2892-900. (1991)

Ebsen M, Anhenn O, Roder C and Morgenroth K. Morphology of adenovirus type-3 infection of human respiratory epithelial cells in vitro. *Virchows Arch.* 440(5). pp. 512-8. (2002)

Elflein K, Rodríguez-Palmero M, Kerkau T and Hünig T. Rapid recovery from T lymphopenia by CD28 superagonist therapy. *Blood.* 102(5). pp. 1764-70. (2003)

Fallarino F, Grohmann U, Hwang KW, Orabona C, Vacca C, Bianchi R, Belladonna ML, Fioretti MC, Alegre ML and Puccetti P. Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells. *Nat Immunol.* 4(12). pp. 1206-12. (2003)

Ferreira C, Barthlott T, Garcia S, Zamoyska R and Stockinger B. Differential survival of naive CD4 and CD8 T cells. *J Immunol.* 165(7). pp.3689-94. (2000)

Ferrick DA, Schrenzel MD, Mulvania T, Hsieh B, Ferlin WG and Lepper H: Differential production of interferon- $\gamma$  and interleukin-4 in response to Th1- and Th2-stimulating pathogens by  $\gamma\delta$  T cells in vivo. *Nature* 373 (6511). pp255-257 (1995)

Finkelman FD, Shea-Donohue T, Goldhill J, Sullivan CA, Morris SC, Madden KB, Gause WC and Urban JF Jr. Cytokine regulation of host defense against parasitic gastrointestinal nematodes: lessons from studies with rodent models. *Annu Rev Immunol.* 15. pp. 505-33. (1997)

Foussat A, Cottrez F, Brun V, Fournier N, Breitmayer JP and Groux H. A comparative study between T regulatory type 1 and CD4+CD25+ T cells in the control of inflammation. *J Immunol.* 171(10). pp. 5018-26. (2003)

Freedman AS, Freeman GJ, Rhyhart K and Nadler LM. Selective induction of B7/BB-1 on interferon-gamma stimulated monocytes: a potential mechanism for amplification of T cell activation through the CD28 pathway. *Cell Immunol.* 1137(2). pp. 429-37. (1991)

Freeman GJ, Long AJ, Iwai Y, Bourque K, Chernova T, Nishimura H, Fitz LJ, Malenkovich N, Okazaki T, Byrne MC, Horton HF, Fouser L, Carter L, Ling V, Bowman MR, Carreno BM, Collins M, Wood CR and Honjo T. Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J Exp Med.* 192(7). pp. 1027-34. (2000)

Freeman GJ, Gribben JG, Boussiotis VA, Ng JW, Restivo VA Jr, Lombard LA, Gray GS and Nadler LM. Cloning of B7-2: a CTLA-4 counter-receptor that costimulates human T cell proliferation. *Science*. 262(5135). pp. 909-11. (1993)

Fry TJ and Mackall CL. Interleukin-7: master regulator of peripheral T-cell homeostasis? *Trends Immunol*. 22(10). pp. :564-71. (2001)

Funakoshi S, Taub DD, Anver MR, Raziuddin A, Asai O, Reddy V, Rager H, Fanslow WC, Longo DL and Murphy WJ. Immunologic and hematopoietic effects of CD40 stimulation after syngeneic bone marrow transplantation in mice. *J Clin Invest*. 99(3). pp. 484-91. (1997)

Gaillard JL, Berche P, Frehel C, Gouin E and Cossart P. Entry of *L. monocytogenes* into cells is mediated by internalin, a repeat protein reminiscent of surface antigens from gram-positive cocci. *Cell*. 65(7). pp.1127-41. (1991)

Garlie NK, LeFever AV, Siebenlist RE, Levine BL, June CH and Lum LG. T cells coactivated with immobilized anti-CD3 and anti-CD28 as potential immunotherapy for cancer. *J Immunother*. 22(4). pp. 336-45. (1999)

Gause WC, Urban JF Jr and Stadecker MJ. The immune response to parasitic helminths: insights from murine models. *Trends Immunol*. 24(5). pp. 269-77. (2003)

Germain RN. T-cell development and the CD4-CD8 lineage decision. *Nat Rev Immunol*. 2(5). pp. 309-22. (2002)

Gershon RK and Kondo K. Cell interactions in the induction of tolerance: the role of thymic lymphocytes. *Immunology*. 18(5). pp. 723-37. (1970)

Goldrath AW, Sivakumar PV, Glaccum M, Kennedy MK, Bevan MJ, Benoist C, Mathis D and Butz EA. Cytokine requirements for acute and Basal homeostatic proliferation of naive and memory CD8+ T cells. *J Exp Med*. 195(12). pp. 1515-22. (2002)

Gorak-Stolinska P, Truman JP, Kemeny DM and Noble A. Activation-induced cell death of human T-cell subsets is mediated by Fas and granzyme B but is independent of TNF-alpha. *J Leukoc Biol*. ;70(5). pp. 756-66. (2001)



Grewal IS, Xu J and Flavell RA. Impairment of antigen-specific T-cell priming in mice lacking CD40 ligand. *Nature*. 378(6557). pp. 617-20. (1995)

Grohmann U, Orabona C, Fallarino F, Vacca C, Calcinaro F, Falorni A, Candeloro P, Belladonna ML, Bianchi R, Fioretti MC and Puccetti P. CTLA-4-Ig regulates tryptophan catabolism *in vivo*. *Nat Immunol*. 3(11). pp. 1097-101. (2002)

Gross JA, St John T and Allison JP. The murine homologue of the T lymphocyte antigen CD28. Molecular cloning and cell surface expression. *J Immunol*. 144(8). pp. 3201-10. (1990)

Gross JA, Callas E and Allison JP. Identification and distribution of the costimulatory receptor CD28 in the mouse. *J Immunol*. 149(2). pp. 380-8. (1992)

Groux H, O'Garra A, Bigler M, Rouleau M, Antonenko S, de Vries JE and Roncarolo MG. A CD4<sup>+</sup> T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature*. 389(6652). pp. 737-42. (1997)

Guidos CJ. Positive selection of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells. *Curr Opin Immunol*. 8(2). pp. 225-32. (1996)

Hansen, J.A.; Martin, P.J. and Nowinski, R.C.: Monoclonal Antibodies identifying a novel T cell antigen of human lymphocytes. *Immunogenetics* 10. pp. 247-260 (1980)

Hansen JA, Martin PJ and Nowinski RC. Monoclonal antibodies identifying a novel T cell antigen of human lymphocytes. *Immunogenetics*. 10. pp. 247-260. (1980)

Hara T, Fu SM and Hansen JA. Human T cell activation. II. A new activation pathway used by a major T cell population via a disulfide-bonded dimer of a 44 kilodalton polypeptide (9.3 antigen). *J Exp Med*. 161(6). pp. 1513-24. (1985)

Hasbold J, Lyons AB, Kehry MR and Hodgkin PD. Cell division number regulates IgG1 and IgE switching of B cells following stimulation by CD40 ligand and IL-4. *Eur J Immunol*. 28(3). pp. 1040-51. (1998)

Hasegawa T, Tanaka T and Yoshikai Y. The appearance and role of gamma delta T cells in the peritoneal cavity and liver during primary infection with *Listeria monocytogenes* in rats. *Int Immunol.* 4(10). pp. 1129-36. (1992)

Hathcock KS, Laszlo G, Pucillo C, Linsley P and Hodes RJ. Comparative analysis of B7-1 and B7-2 costimulatory ligands: expression and function. *J Exp Med.* 180(2). pp. 631-40. (1994)

Heinzel FP, Sadick MD, Holaday BJ, Coffman RL and Locksley RM. Reciprocal expression of interferon gamma or interleukin 4 during the resolution or progression of murine leishmaniasis. Evidence for expansion of distinct helper T cell subsets. *J Exp Med.* 169(1). pp. 59-72. (1989)

Hertz CJ, Kiertcher SM, Godowski PJ, Bouis DA, Norgard MV, Roth MD and Modlin RL. Microbial lipopeptides stimulate dendritic cell maturation via Toll-like receptor 2. *J Immunol.* 166(4). pp. 2444-50. (2001)

Hirose K, Suzuki H, Nishimura H, Mitani A, Washizu J, Matsuguchi T and Yoshikai Y. Interleukin-15 may be responsible for early activation of intestinal intraepithelial lymphocytes after oral infection with *Listeria monocytogenes* in rats. *Infect Immun.* 66(12). pp. 5677-83. (1998)

Ho IC and Glimcher LH: Transcription: tantalizing times for T cells. *Cell* 109, pp. 102-120 (2002)

Holland MJ, Harcus YM, Riches PL and Maizels RM. Proteins secreted by the parasitic nematode *Nippostrongylus brasiliensis* act as adjuvants for Th2 responses. *Eur J Immunol.* 30(7). pp. 1977-87. (2000)

Hsieh CS, Macatonia SE, Tripp CS, Wolf SF, O'Garra A and Murphy KM. Development of TH1 CD4<sup>+</sup> T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages. *Science.* 260(5107). pp. 547-9. (1993)

Hünig T, Torres-Nagel N, Mehling B, Park HJ and Herrmann T. Thymic development and repertoire selection: the rat perspective. *Immunol Rev.* 184. pp. 7-19. (2001)

Hünig T, Wallny HJ, Hartley JK, Lawetzky A and Tiefenthaler G. A monoclonal antibody to a constant determinant of the rat T cell antigen receptor that induces T cell activation. Differential reactivity with subsets of immature and mature T lymphocytes. *J Exp Med.* 169(1). pp. 73-86. (1989)

Hutloff A, Dittrich AM, Beier KC, Eljaschewitsch B, Kraft R, Anagnostopoulos I and Kroczeck RA. ICOS is an inducible T-cell co-stimulator structurally and functionally related to CD28. *Nature.* 397(6716). pp. 263-6. (1999)

Ishida Y, Agata Y, Shibahara K and Honjo T. Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. *EMBO J.* 11(11). pp. 3887-95. (1992)

Ishikawa N, Horii Y, Oinuma T, Suganuma T and Nawa Y. Goblet cell mucins as the selective barrier for the intestinal helminths: T-cell-independent alteration of goblet cell mucins by immunologically 'damaged' *Nippostrongylus brasiliensis* worms and its significance on the challenge infection with homologous and heterologous parasites. *Immunology.* 81(3). pp. 480-6. (1994)

Issekutz TB, Palecanda A, Kadela-Stolarz U and Marshall JS. Blockade of either alpha-4 or beta-7 integrins selectively inhibits intestinal mast cell hyperplasia and worm expulsion in response to *Nippostrongylus brasiliensis* infection. *Eur J Immunol.* 31(3). pp. 860-8. (2001)

Itoh M, Takahashi T, Sakaguchi N, Kuniyasu Y, Shimizu J, Otsuka F and Sakaguchi S. Thymus and autoimmunity: production of CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> naturally anergic and suppressive T cells as a key function of the thymus in maintaining immunologic self-tolerance. *J Immunol.* 162(9). pp. 5317-26. (1999)

Jameson SC. Maintaining the norm: T-cell homeostasis. *Nat Rev Immunol.* 2(8). pp. 547-56. (2002)

Janeway CA, Travers P, Walport M and Shlomchik M. Immunologie. 5. Auflage. *Spektrum Akademischer Verlag GmbH*, Heidelberg/ Berlin. (2002, deutsche Fassung)

Jefferies WA, Green JR and Williams AF. Authentic T helper CD4 (W3/25) antigen on rat peritoneal macrophages. *J Exp Med.* 162(1). pp. 117-27. (1985)

Jendro MC, Ganten T, Matteson EL, Weyand CM and Goronzy JJ. Emergence of oligoclonal T cell populations following therapeutic T cell depletion in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 38(9). pp. 1242-51. (1995)

Jonuleit H, Schmitt E, Stassen M, Tuettenberg A, Knop J and Enk AH. Identification and functional characterization of human CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties isolated from peripheral blood. *J Exp Med.* 193(11). pp. 1285-94. (2001)

Jonuleit H and Schmitt E. The regulatory T cell family: distinct subsets and their interrelations. *J Immunol.* 171(12). pp. 6323-7. (2003)

Kampinga J, Kroese FG, Pol GH, Opstelten D, Seijen HG, Boot JH, Roser B, Nieuwenhuis P and Aspinall R. RT7-defined alloantigens in rats are part of the leucocyte common antigen family. *Scand J Immunol.* 31(6). pp. 699-710. (1990)

Kappler JW, Roehm N and Marrack P. T cell tolerance by clonal elimination in the thymus. *Cell.* 49(2). pp. 273-80. (1987)

Karim M, Kingsley CI, Bushell AR, Sawitzki BS and Wood KJ. Alloantigen-induced CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> regulatory T cells can develop *in vivo* from CD25<sup>-</sup>CD4<sup>+</sup> precursors in a thymus-independent process. *J Immunol.* 172(2). pp. 923-8. (2004)

Kaufmann SH. Immunity to intracellular bacteria. *Annu Rev Immunol.* 11. pp. 129-63. (1993)

Kemper C, Chan AC, Green JM, Brett KA, Murphy KM and Atkinson JP. Activation of human CD4<sup>+</sup> cells with CD3 and CD46 induces a T-regulatory cell 1 phenotype. *Nature.* 421(6921):388-92. (2003)

Keymer A, Martin J and Wainwright SM. Estimation of the numbers and infectivity of *Nippostrongylus* larvae. *J Helminthol.* 57(3). pp. 225-30. (1983)

Klaus SJ, Pinchuk LM, Ochs HD, Law CL, Fanslow WC, Armitage RJ and Clark EA. Costimulation through CD28 enhances T cell-dependent B cell activation via CD40-

CD40L interaction. *J Immunol.* 152(12). pp. 5643-52. (1994)

Kerstan A and Hünig T. Cutting edge: distinct TCR- and CD28-derived signals regulate CD95L, Bcl-xL, and the survival of primary T cells. *J Immunol.* 172(3). pp. 1341-5. (2004)

Kühnlein P, Park JH, Herrmann T, Elbe A and Hünig T. Identification and characterization of rat gamma/delta T lymphocytes in peripheral lymphoid organs, small intestine, and skin with a monoclonal antibody to a constant determinant of the gamma/delta T cell receptor. *J Immunol.* 153(3). pp. 979-86. (1994)

Kuhn M and Goebel W. Identification of an extracellular protein of *Listeria monocytogenes* possibly involved in intracellular uptake by mammalian cells. *Infect Immun.* 57(1). pp. 55-61. (1989)

Kursar M, Mittrücker HW, Koch M, Kohler A, Herma M and Kaufmann SH. Protective T cell response against intracellular pathogens in the absence of Toll-like receptor signaling via myeloid differentiation factor 88. *Int Immunol.* 16(3). pp. 415-21. (2004)

Lafferty, K.J. and Cunningham, A.J. A new analysis of allogeneic interactions. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.* 53. pp. 27-42 (1975)

Lafferty KJ, Prowse SJ, Simeonovic CJ and Warren HS. Immunobiology of tissue transplantation: a return to the passenger leukocyte concept. *Annu Rev Immunol.* 1. pp. 143-73. (1983)

Laport GG, Levine BL, Stadtmauer EA, Schuster SJ, Luger SM, Grupp S, Bunin N, Strobl FJ, Cotte J, Zheng Z, Gregson B, Rivers P, Vonderheide RH, Liebowitz DN, Porter DL and June CH. Adoptive transfer of costimulated T cells induces lymphocytosis in patients with relapsed/refractory non-Hodgkin lymphoma following CD34<sup>+</sup>-selected hematopoietic cell transplantation. *Blood.* 102(6). pp. 2004-13. (2003)

Latchman Y, Wood CR, Chernova T, Chaudhary D, Borde M, Chernova I, Iwai Y, Long AJ, Brown JA, Nunes R, Greenfield EA, Bourque K, Bousiotis VA, Carter LL, Carreno BM, Malenkovich N, Nishimura H, Okazaki T, Honjo T, Sharpe AH and Freeman GJ. PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. *Nat Immunol.* 2(3). pp. 261-8. (2001)

- Law DA, Spruyt LL, Paterson DJ and Williams AF. Subsets of thymopoietic rat thymocytes defined by expression of the CD2 antigen and the MRC OX-22 determinant of the leukocyte-common antigen CD45. *Eur J Immunol.* 19(12). pp. 2289-95. (1989)
- Lawrence RA, Gray CA, Osborne J and Maizels RM. *Nippostrongylus brasiliensis*: cytokine responses and nematode expulsion in normal and IL-4-deficient mice. *Exp Parasitol.* 84(1). pp. 65-73. (1996)
- Lenschow DJ, Walunas TL and Bluestone JA. CD28/B7 system of T cell costimulation. *Annu Rev Immunol.* 14. pp. 233-58. (1996)
- Lenschow DJ, Zeng Y, Thistlethwaite JR, Montag A, Brady W, Gibson MG, Linsley PS and Bluestone JA. Long-term survival of xenogeneic pancreatic islet grafts induced by CTLA4lg. *Science.* 257(5071). pp. 789-92. (1992)
- Lenschow DJ and Bluestone JA. T cell co-stimulation and *in vivo* tolerance. *Curr Opin Immunol.* 5(5). pp. 747-52. (1993)
- Leonard WJ. Cytokines and immunodeficiency diseases. *Nat Rev Immunol.* 1(3). pp. 200-8. (2001)
- Levine BL, Bernstein WB, Connors M, Craighead N, Lindsten T, Thompson CB and June CH. Effects of CD28 costimulation on long-term proliferation of CD4<sup>+</sup> T cells in the absence of exogenous feeder cells. *J Immunol.* 159(12). pp. 5921-30. (1997)
- Levings MK, Sangregorio R and Roncarolo MG. Human CD25(+)CD4(+) t regulatory cells suppress naive and memory T cell proliferation and can be expanded in vitro without loss of function. *J Exp Med.* 193(11). pp. 1295-302. (2001)
- Levings MK and Roncarolo MG. T-regulatory 1 cells: a novel subset of CD4 T cells with immunoregulatory properties. *J Allergy Clin Immunol.* 106(1 Pt 2). pp. S109-12. (2000)
- Lin CH and Hünig T. Efficient expansion of regulatory T cells in vitro and in vivo with a CD28 superagonist. *Eur J Immunol.* 33(3). pp. 626-38. (2003)
- Lin CH. Promotion. Universitätsbibliothek der Universität Würzburg, (2004)

Lingnau A, Domann E, Hudel M, Bock M, Nichterlein T, Wehland J and Chakraborty T. Expression of the *Listeria monocytogenes* EGD inIA and inIB genes, whose products mediate bacterial entry into tissue culture cell lines, by PrfA-dependent and -independent mechanisms. *Infect Immun.* 63(10). pp. 3896-903. (1995)

Linsley PS, Brady W, Urnes M, Grosmaire LS, Damle NK and Ledbetter JA. CTLA-4 is a second receptor for the B cell activation antigen B7. *J Exp Med.* 174(3). pp. 561-9. (1991)

Linsley PS, Greene JL, Tan P, Bradshaw J, Ledbetter JA, Anasetti C and Damle NK. Coexpression and functional cooperation of CTLA-4 and CD28 on activated T lymphocytes. *J Exp Med.* 176(6). pp. 1595-604. (1992)

Liu YJ, Kanzler H, Soumelis V and Gilliet M. Dendritic cell lineage, plasticity and cross-regulation. *Nat Immunol.* 2(7). pp. 585-589. (2001)

Lodolce J, Burkett P, Koka R, Boone D, Chien M, Chan F, Madonia M, Chai S and Ma A. Interleukin-15 and the regulation of lymphoid homeostasis. *Mol Immunol.* 39(9). pp. 537-44. (2002)

Loke P, Nair MG, Parkinson J, Guiliano D, Blaxter M and Allen JE. L-4 dependent alternatively-activated macrophages have a distinctive *in vivo* gene expression phenotype. *BMC Immunol.* 3(1). pp. 7. (2002)

Lokhorst HM and Liebowitz D. Adoptive T-cell therapy. *Semin Hematol.* 36(1 Suppl 3). pp. 26-9. (1999)

Lühder F, Huang Y, Dennehy KM, Guntermann C, Müller I, Winkler E, Kerkau T, Ikemizu S, Davis SJ, Hanke T and Hünig T. Topological requirements and signaling properties of T cell-activating, anti-CD28 antibody superagonists. *J Exp Med.* 197(8). pp. 955-66. (2003)

Lukacs K and Kurlander RJ. MHC-unrestricted transfer of antilisterial immunity by freshly isolated immune CD8 spleen cells. *J Immunol.* 143(11). pp. 3731-6. (1989)

Lyons AB and Parish CR. Determination of lymphocyte division by flow cytometry. *J Immunol Methods.* 171(1). pp. 131-7. (1994)

Lyons AB. Analysing cell division *in vivo* and *in vitro* using flow cytometric measurement of CFSE dye dilution. *J Immunol Methods*. 243(1-2). pp. 147-54. (2000)

Lyons AB. Divided we stand: tracking cell proliferation with carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester. *Immunol Cell Biol*. 77(6). pp. 509-15. (1999)

Mackall CL, Fleisher TA, Brown MR, Magrath IT, Shad AT, Horowitz ME, Wexler LH, Adde MA, McClure LL and Gress RE. Lymphocyte depletion during treatment with intensive chemotherapy for cancer. *Blood*. 84(7). pp. 2221-8. (1994)

Mackall CL, Bare CV, Granger LA, Sharrow SO, Titus JA and Gress RE. Thymic-independent T cell regeneration occurs via antigen-driven expansion of peripheral T cells resulting in a repertoire that is limited in diversity and prone to skewing. *J Immunol*. 156(12). pp. 4609-16. (1996)

Mackall CL and Gress RE. Thymic aging and T-cell regeneration. *Immunol Rev*. 160. pp. 91-102. (1997)

Mackall CL, Hakim FT and Gress RE. Restoration of T-cell homeostasis after T-cell depletion. *Semin Immunol*. 9. pp. 339-46. (1997b)

Mackall CL. T-cell immunodeficiency following cytotoxic antineoplastic therapy: a review. *Oncologist*. 4(5). pp. 370-8. (1999)

Mackall CL, Fry TJ, Bare C, Morgan P, Galbraith A and Gress RE. IL-7 increases both thymic-dependent and thymic-independent T-cell regeneration after bone marrow transplantation. *Blood*. 97(5). pp. 1491-7. (2001)

Maizels RM and Yazdanbakhsh M. Immune regulation by helminth parasites: cellular and molecular mechanisms. *Nat Rev Immunol*. 3(9). pp. 733-44. (2003)

Martin, P.J.; Ledbretter, J. A.; Morishita, Y.; June, C.H.; Beatty, P.G. and Hansen, J.A.: A 44 kilodalton cell surface homodimer regulates interleukin 2 production by activated human T lymphocytes. *J Immunol*. 136 (9). pp. 3282-87 (1986)

Matsuda S, Tani Y, Yamada M, Yoshimura K and Arizono N. Type 2-biased expression of cytokine genes in lung granulomatous lesions induced by *Nippostrongylus brasiliensis* infection. *Parasite Immunol*. 23(5). pp. 219-26. (2001)



Maury S, Salomon B, Klatzmann D and Cohen JL. Division rate and phenotypic differences discriminate alloreactive and nonalloreactive T cells transferred in lethally irradiated mice. *Blood*. 98(10). pp. 3156-8. (2001)

Maus MV, Thomas AK, Leonard DG, Allman D, Addya K, Schlienger K, Riley JL and June CH. Ex vivo expansion of polyclonal and antigen-specific cytotoxic T lymphocytes by artificial APCs expressing ligands for the T-cell receptor, CD28 and 4-1BB. *Nat Biotechnol*. 20(2). pp. 143-8. (2002)

McAdam AJ, Chang TT, Lumelsky AE, Greenfield EA, Boussiotis VA, Duke-Cohan JS, Chernova T, Malenkovich N, Jabs C, Kuchroo VK, Ling V, Collins M, Sharpe AH and Freeman GJ. Mouse inducible costimulatory molecule (ICOS) expression is enhanced by CD28 costimulation and regulates differentiation of CD4<sup>+</sup> T cells. *Immunol*. 165(9). pp. 5035-40. (2000)

McAdam AJ, Greenwald RJ, Levin MA, Chernova T, Malenkovich N, Ling V, Freeman GJ and Sharpe AH. ICOS is critical for CD40-mediated antibody class switching. *Nature*. 409(6816). pp. 102-5. (2001)

McAdam AJ, Schweitzer AN and Sharpe AH. The role of B7 co-stimulation in activation and differentiation of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells. *Immunol Rev*. 165. pp. 231-47. (1998)

McCoy K, Camberis M and Gros GL. Protective immunity to nematode infection is induced by CTLA-4 blockade. *J Exp Med*. 186(2). pp. 183-7. (1997)

McKenzie GJ, Fallon PG, Emson CL, Grecis RK and McKenzie AN. Simultaneous disruption of interleukin (IL)-4 and IL-13 defines individual roles in T helper cell type 2-mediated responses. *J Exp Med*. 189(10). pp. 1565-72. (1999)

Mercado R, Vijn S, Allen SE, Kerksiek K, Pilip IM and Pamer EG. Early programming of T cell populations responding to bacterial infection. *J Immunol*. 165(12). pp. :6833-9. (2000)

Mielke ME. T cell subsets in granulomatous inflammation and immunity to *L. Monocytogenes* and *B. abortus*. *Behring Inst Mitt*. (88). pp. 99-111. (1991)

Mielke ME, Rosen H, Brocke S, Peters C and Hahn H. Protective immunity and granuloma formation are mediated by two distinct tumor necrosis factor alpha- and gamma interferon-dependent T cell-phagocyte interactions in murine listeriosis: dissociation on the basis of phagocyte adhesion mechanisms. *Infect Immun.* 60(5). pp. 1875-82. (1992)

Mielke ME, Niedobitek G, Stein H and Hahn H. Acquired resistance to *Listeria monocytogenes* is mediated by Lyt-2<sup>+</sup> T cells independently of the influx of monocytes into granulomatous lesions. *J Exp Med.* 170(2). pp. 589-94. (1989)

Mills KH and McGuirk P. Antigen-specific regulatory T cells--their induction and role in infection. *Semin Immunol.* (2). pp. 107-17. (2004)

Mombaerts P, Arnoldi J, Russ F, Tonegawa S and Kaufmann SH. Different roles of alpha beta and gamma delta T cells in immunity against an intracellular bacterial pathogen. *Nature.* 365(6441). pp. 53-6. (1993)

Moser M and Murphy KM. Dendritic cell regulation of TH1-TH2 development. *Nat Immunol.* 1(3). pp. 199-205. (2000)

Mosmann TR and Coffman RL: Th1 and Th2 cells: different patterns of lymphokine secretions lead to different functional properties. *Annu Rev immunol* 7. pp. 145-173 (1989)

Mosmann TR and Coffmann RL. Th1 and Th2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Ann. Rev. Immunol.* 7. pp. 145-173. (1989)

Mosmann TR and Sad S. The expanding universe of T-cell subsets: Th1 and Th2 and more. *Immunol Today* 17, pp. 138-46 (1996)

Murphy, K.M. and Reiner, S.L. The lineage decisions of helper T cells. *Nat. Rev. Immunol.* 2. pp.933-944 (2002)

Mäkela, O. and Cross, A.M. The diversity and specialisation of immunocytes. *Progr. Allergy* 14. pp. 145- 152 (1970)

Nakamura K, Kitani A, Fuss I, Pedersen A, Harada N, Nawata H and Strober W. TGF-beta1 plays an important role in the mechanism of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cell activity in both humans and mice. *J Immunol.* 172(2). pp. 834-42. (2004)

Nakamura K, Kitani A and Strober W. Cell contact-dependent immunosuppression by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor beta. *J Exp Med.* 194(5). pp. 629-44. (2001)

Nelson BH. IL-2, regulatory T cells, and tolerance. *J Immunol.* 172(7). pp. 3983-8. (2004)

Nelson BH and Willerford DM. Biology of the interleukin-2 receptor. *Adv Immunol.* 70. pp. 1-81. (1998)

Ng WF, Duggan PJ, Ponchel F, Matarese G, Lombardi G, Edwards AD, Isaacs JD and Lechler RI. Human CD4(+)CD25(+) cells: a naturally occurring population of regulatory T cells. *Blood.* 98(9). pp. 2736-44. (2001)

Nishimura H, Honjo T and Minato N. Facilitation of beta selection and modification of positive selection in the thymus of PD-1-deficient mice. *J Exp Med.* 191(5). pp. 891-8. (2000)

Nishimura H, Nose M, Hiai H, Minato N and Honjo T. Development of lupus-like autoimmune diseases by disruption of the PD-1 gene encoding an ITIM motif-carrying immunoreceptor. *Immunity.* 11(2). pp. 141-51. (1999)

Nishizuka Y and Sakakura T. Thymus and reproduction: sex-linked dysgenesis of the gonad after neonatal thymectomy in mice. *Science.* 166(906). pp. 753-5. (1969)

Ohmori Y and Hamilton TA. IL-4-induced STAT6 suppresses IFN-gamma-stimulated STAT1-dependent transcription in mouse macrophages. *J Immunol.* 159(11). pp.5474-82. (1997)

Ono M, Kondo T, Kawakami M and Honjo T. Purification of immunoglobulin heavy chain messenger RNA by immunoprecipitation from the mouse myeloma tumor, MOPC-31C. *J Biochem (Tokyo)* 81(4). pp. 949-54. (1977)

Oppmann B, Lesley R, Blom B, Timans JC, Xu Y, Hunte B, Vega F, Yu N, Wang J, Singh K, Zonin F, Vaisberg E, Churakova T, Liu M, Gorman D, Wagner J, Zurawski S, Liu Y, Abrams JS, Moore KW, Rennick D, de Waal-Malefyt R, Hannum C, Bazan JF and Kastelein RA: Novel p19 protein engages IL-12 p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12. *Immunity* 13, pp. 715-725 (2000)

Ostrov DA, Shi W, Schwartz JC, Almo SC and Nathanson SG. Structure of murine CTLA-4 and its role in modulating T cell responsiveness. *Science* 290(5492). pp. 816-9. (2000)

Ouyang W, Lohning M, Gao Z, Assenmacher M, Ranganath S, Radbruch A and Murphy KM. Stat6-independent GATA-3 autoactivation directs IL-4-independent Th2 development and commitment. *Immunity* 12. pp. 27-37 (2000)

Palmer E. Negative selection--clearing out the bad apples from the T-cell repertoire. *Nat Rev Immunol.* 3(5). pp. 383-91. (2003)

Pantaloni D, Le Clainche C and Carlier MF. Mechanism of actin-based motility. *Science.* 292(5521). pp. 1502-6. (2001)

Papiernik M, de Moraes ML, Pontoux C, Vasseur F and Penit C. Regulatory CD4 T cells: expression of IL-2R alpha chain, resistance to clonal deletion and IL-2 dependency. *Int Immunol.* 10(4). pp. 371-8. (1998)

Paterson DJ, Jefferies WA, Green JR, Brandon MR, Corthesy P, Puklavec M and Williams AF. Antigen of activated rat T lymphocytes including a molecule of 50,000 Mr detected only on CD4 positive T blasts. *Mol Immunol.* 24(12). pp. 1281-90. (1987)

Pearce EJ and MacDonald AS. The immunobiology of schistosomiasis. *Nat Rev Immunol.* 2(7). pp. 499-511. (2002)

Penhale WJ, Farmer A, McKenna RP and Irvine WJ. Spontaneous thyroiditis in thymectomized and irradiated Wistar rats. *Clin Exp Immunol.* 15(2). pp. 225-36. (1973)

Perez VL, Van Parijs L, Biuckians A, Zheng XX, Strom TB and Abbas AK. Induction of peripheral T cell tolerance *in vivo* requires CTLA-4 engagement. *Immunity*. 6(4). pp. 411-7. (1997)

Perrin PJ, Maldonado JH, Davis TA, June CH and Racke MK. CTLA-4 blockade enhances clinical disease and cytokine production during experimental allergic encephalomyelitis. *J Immunol*. 157(4) pp. 1333-6. (1996)

Pflanz S, Timans JC, Ceung J, Rosales R, Kanzler H, Gilbert J, Hibbert L, Churakova T, Travis M, Vaisberg E, Blumenschein WM, Mattson JD, Wagner JL, To W, Zurawski S, McClanahan TK, Gorman DM, Bazan JF, de Waal-Malefyt R, Rennick D and Kastelein RA: IL-27, a heterodimeric cytokine composed of EBI3 and p28 protein, induces proliferation of naive CD4<sup>+</sup> T cells. *Immunity* 16. pp. 779-790 (2002)

Piccirillo CA, Letterio JJ, Thornton AM, McHugh RS, Mamura M, Mizuhara H and Shevach EM. CD4(+)CD25(+) regulatory T cells can mediate suppressor function in the absence of transforming growth factor beta1 production and responsiveness. *J Exp Med*. 196(2). pp. 237-46. (2002)

Portnoy DA, Jacks PS and Hinrichs DJ. Role of hemolysin for the intracellular growth of *Listeria monocytogenes*. *J Exp Med*. 167(4). pp. 1459-71. (1988)

Prlic M, Blazar BR, Khoruts A, Zell T and Jameson SC. Homeostatic expansion occurs independently of costimulatory signals. *J Immunol*. 167(10). pp. 5664-8. (2001)

Ramaswamy K, De Sanctis GT, Green F and Befus D. Pathology of pulmonary parasitic migration: morphological and bronchoalveolar cellular responses following *Nippostrongylus brasiliensis* infection in rats. *J Parasitol*. 77(2). pp. 302-12. (1991)

Read S, Malmstrom V and Powrie F. Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25(+)CD4(+) regulatory cells that control intestinal inflammation. *J Exp Med*. 192(2). pp. 295-302. (2000)

Riddell SR and Greenberg PD. Principles for adoptive T cell therapy of human viral diseases. *Annu Rev Immunol*. 13. pp. 545-86. (1995)

Riddell SR and Greenberg PD. T cell therapy of human CMV and EBV infection in immunocompromised hosts. *Rev Med Virol.* 7(3). pp. 181-192. (1997)

Rissoan MC, Soumelis V, Kadowaki N, Grouard G, Briere F, de Waal Malefyt R and Liu YJ. Reciprocal control of T helper cell and dendritic cell differentiation. *Science.* 283(5405). pp. 1183-6. (1999)

Robey E, Fowlkes BJ. Selective events in T cell development. *Annu Rev Immunol.* 12. pp. 675-705. (1994)

Robinson AP, Puklavec M and Mason DW. MRC OX-52: a rat T-cell antigen. *Immunology.* 57(4). pp. 527-31. (1986)

Rodríguez-Palmero M, Hara T, Thumbs A and Hünig T. 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.* 29(12). pp. 3914-24. (1999)

Romagnani S: Induction of TH1 and TH2 responses: a key role for the 'natural' immune response? *Immunol. Today* 13(10). pp. 379-381 (1992)

Roncarolo MG, Bacchetta R, Bordignon C, Narula S and Levings MK. Type 1 T regulatory cells. *Immunol Rev.* 182. pp. 68-79. (2001)

Sakaguchi S. Naturally Arising CD4+ Regulatory T Cells for Immunologic Self-Tolerance and Negative Control of Immune Responses. *Annu Rev Immunol.* 22. pp. 531-562. (2004)

Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M and Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol.* 155(3). pp. 1151-64. (1995)

Schiemann M, Busch V, Linkemann K, Huster KM and Busch DH. Differences in maintenance of CD8<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> bacteria-specific effector-memory T cell populations. *Eur J Immunol.* 33(10). pp. 2875-85. (2003)

Schwartz RH. A cell culture model for T lymphocyte clonal anergy. *Science*. 248(4961). pp. 1349-56. (1990)

Seroogy CM and Fathman CG. T-cell anergy: from phenotype to genotype and back. *Immunol Res*. 28(3). pp. 255-64. (2003)

Shahinian A, Pfeffer K, Lee KP, Kundig TM, Kishihara K, Wakeham A, Kawai K, Ohashi PS, Thompson CB and Mak TW. Differential T cell costimulatory requirements in CD28-deficient mice. *Science*. 261(5121). pp. 609-12. (1993)

Shang C, Attema J, Cakouros D, Cockerill PN and Shannon MF. Nuclear factor of activated T cells contributes to the function of the CD28 response region of the granulocyte macrophage-colony stimulating factor promoter. *Int Immunol*. 11(12). pp. 1945-56. (1999)

Shannon MF, Himes SR and Coles LS. GM-CSF and IL-2 share common control mechanisms in response to costimulatory signals in T cells. *J Leukoc Biol*. 57(5). pp. 767-73. (1995)

Sharpe AH and Freeman GJ. The B7-CD28 superfamily. *Nat Rev Immunol*. 2(2). pp. 116-26. (2002)

Shedlock DJ, Whitmire JK, Tan J, MacDonald AS, Ahmed R and Shen H. Role of CD4 T cell help and costimulation in CD8 T cell responses during *Listeria monocytogenes* infection. *J Immunol*. 170(4). pp. 2053-63. (2003)

Shevach EM. CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> suppressor T cells: more questions than answers. *Nat Rev Immunol*. 2(6). pp. 389-400. (2002)

Spickett GP, Brandon MR, Mason DW, Williams AF and Woollett GR. MRC OX-22, a monoclonal antibody that labels a new subset of T lymphocytes and reacts with the high molecular weight form of the leukocyte-common antigen. *J Exp Med*. 158(3). pp. 795-810. (1983)

Stack RM, Lenschow DJ, Gray GS, Bluestone JA and Fitch FW. IL-4 treatment of small splenic B cells induces costimulatory molecules B7-1 and B7-2. *J Immunol*. 152(12). pp. 5723-33. (1994)

Stahnke K, Fulda S, Friesen C, Strauss G and Debatin KM. Activation of apoptosis pathways in peripheral blood lymphocytes by in vivo chemotherapy. *Blood*. 98(10). pp. 3066-73. (2001)

Stamper CC, Zhang Y, Tobin JF, Erbe DV, Ikemizu S, Davis SJ, Stahl ML, Seehra J, Somers WS and Mosyak L. Crystal structure of the B7-1/CTLA-4 complex that inhibits human immune responses. *Nature*. 410(6828). pp. 608-11. (2001)

Stephens LA and Mason D. CD25 is a marker for CD4<sup>+</sup> thymocytes that prevent autoimmune diabetes in rats, but peripheral T cells with this function are found in both CD25<sup>+</sup> and CD25<sup>-</sup> subpopulations. *J Immunol*. 165(6). pp. 3105-10. (2000)

Surh CD, Sprent J. Homeostatic T cell proliferation: how far can T cells be activated to self-ligands? *J Exp Med*. 192(4). F9-F14. (2000)

Surh CD and Sprent J. Homeostatic T cell proliferation: how far can T cells be activated to self-ligands? *J Exp Med*. 192(4). pp. F9-F14. (2000)

Szabo SJ et al: A novel transcription factor, T-bet, directs Th1-lineage commitment. *Cell* 100. pp. 655-669 (2000)

Tacke M, Clark GJ, Dallman MJ and Hunig T. 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*. 154(10). pp. 5121-7. (1995)

Tacke M, Hanke G, Hanke T and Hünig T. 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*. 27(1). pp. 239-47. (1997)

Takahashi T, Tagami T, Yamazaki S, Uede T, Shimizu J, Sakaguchi N, Mak TW and Sakaguchi S. Immunologic self-tolerance maintained by CD25(+)CD4(+) regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4. *J Exp Med*. 192(2). pp. 303-10. (2000)



Takahashi T, Tagami T, Yamazaki S, Uede T, Shimizu J, Sakaguchi N, Mak TW and Sakaguchi S. Immunologic self-tolerance maintained by CD25(+)CD4(+) regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4. *J Exp Med.* 192(2). pp. 303-10. (2000)

Thornton AM and Shevach EM. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation *in vitro* by inhibiting interleukin 2 production. *J Exp Med.* 188(2). pp. 287-96. (1998)

Thornton AM and Shevach EM. Suppressor effector function of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> immunoregulatory T cells is antigen nonspecific. *J Immunol.* 164(1). pp. 183-90. (2000)

Tilney LG and Portnoy DA. Actin filaments and the growth, movement, and spread of the intracellular bacterial parasite, *Listeria monocytogenes*. *J Cell Biol.* 109(4 Pt 1). pp. 1597-608. (1989)

Tomita M, Kobayashi T, Itoh H, Onitsuka T and Nawa Y. Goblet cell hyperplasia in the airway of *Nippostrongylus brasiliensis*-infected rats. *Respiration.* 67(5). pp. 565-9. (2000)

Torres-Nagel N, Kraus E, Brown MH, Tiefenthaler G, Mitnacht R, Williams AF and Hünig T. Differential thymus dependence of rat CD8 isoform expression. *Eur J Immunol.* (11). pp. 2841-8. (1992)

Troy AE and Shen H. Cutting edge: homeostatic proliferation of peripheral T lymphocytes is regulated by clonal competition. *J Immunol.* 170(2). pp. 672-6. (2003)

Tseng SY, Otsuji M, Gorski K, Huang X, Slansky JE, Pai SI, Shalabi A, Shin T, Pardoll DM and Tsuchiya H. B7-DC, a new dendritic cell molecule with potent costimulatory properties for T cells. *J Exp Med.* 193(7). pp. 839-46. (2001)

Turka LA, Ledbetter JA, Lee K, June CH and Thompson CB. CD28 is an inducible T cell surface antigen that transduces a proliferative signal in CD3<sup>+</sup> mature thymocytes. *J Immunol.* 144(5). pp. 1646-53. (1990)

Turka LA, Linsley PS, Lin H, Brady W, Leiden JM, Wei RQ, Gibson ML, Zheng XG, Myrdal S, Gordon D, et al. T-cell activation by the CD28 ligand B7 is required for cardiac allograft rejection *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 89(22). pp. 11102-5. (1992)

Uchikawa R, Yamada M, Matsuda S and Arizono N. IgE antibody responses induced by transplantation of the nematode *Nippostrongylus brasiliensis* in rats: a possible role of nematode excretory-secretory product in IgE production. *Immunology*. 80(4). pp. 541-5. (1993)

Uchikawa R, Matsuda S and Arizono N. Suppression of gamma interferon transcription and production by nematode excretory-secretory antigen during polyclonal stimulation of rat lymph node T cells. *Infect Immun*. 68(11). pp. 6233-9. (2000)

Urban JF Jr, Madden KB, Cheever AW, Trotta PP, Katona IM and Finkelman FD. IFN inhibits inflammatory responses and protective immunity in mice infected with the nematode parasite, *Nippostrongylus brasiliensis*. *J Immunol*. 151(12). pp. 7086-94. (1993)

Urban JF Jr, Noben-Trauth N, Donaldson DD, Madden KB, Morris SC, Collins M and Finkelman FD. IL-13, IL-4Ralpha, and Stat6 are required for the expulsion of the gastrointestinal nematode parasite *Nippostrongylus brasiliensis*. *Immunity*. 8(2). pp 255-64. (1998)

van Kooten C and Banchereau J. CD40-CD40 ligand. *J Leukoc Biol*. 67(1). pp. 2-17. (2000)

van Seventer GA, Newman W, Shimizu Y, Nutman TB, Tanaka Y, Horgan KJ, Gopal TV, Ennis E, O'Sullivan D, Grey H, et al. Analysis of T cell stimulation by superantigen plus major histocompatibility complex class II molecules or by CD3 monoclonal antibody: costimulation by purified adhesion ligands VCAM-1, ICAM-1, but not ELAM-1. *J Exp Med*. 174(4). pp. 901-13. (1991 [II])

van Seventer GA, Shimizu Y, Horgan KJ, Luce GE, Webb D and Shaw S. Remote T cell co-stimulation via LFA-1/ICAM-1 and CD2/LFA-3: demonstration with immobilized ligand/mAb and implication in monocyte-mediated co-stimulation. *Eur J Immunol*. (7). pp. 1711-8. (1991 [I])

Vaux DL and Strasser A. The molecular biology of apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 93(6). pp. 2239-44. (1996)

Vazquez-Boland JA, Kocks C, Dramsi S, Ohayon H, Geoffroy C, Mengaud J and Cossart P. Nucleotide sequence of the lecithinase operon of *Listeria monocytogenes* and possible role of lecithinase in cell-to-cell spread. *Infect Immun*. (1). pp. 219-30. (1992)

Viola A and Lanzavecchia A. T cell activation determined by T cell receptor number tunable thresholds. *Science* 273. pp. 104-106 (1996)

Viola A, Schroeder S, Sakakibara Y and Lanzavecchia A. T lymphocyte costimulation mediated by reorganization of membrane microdomains. *Science*. 283(5402). pp. 680-2. (1999)

Walunas TL, Lenschow DJ, Bakker CY, Linsley PS, Freeman GJ, Green JM, Thompson CB and Bluestone JA. CTLA-4 can function as a negative regulator of T cell activation. *Immunity*. 1(5). pp. 405-13. (1994)

Waterhouse P, Penninger JM, Timms E, Wakeham A, Shahinian A, Lee KP, Thompson CB, Griesser H and Mak TW. Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in Ctla-4. *Science*. 270(5238). pp. 985-8. (1995)

Weiner HL. Induction and mechanism of action of transforming growth factor-beta-secreting Th3 regulatory cells. *Immunol Rev*. 182. pp. 207-14. (2001, [I])

Weiner HL. Oral tolerance: immune mechanisms and the generation of Th3-type TGF-beta-secreting regulatory cells. *Microbes Infect*. 3(11). pp. 947-54. (2001, [II])

Weston SA and Parish CR. New fluorescent dyes for lymphocyte migration studies. Analysis by flow cytometry and fluorescence microscopy. *J Immunol Methods*. 133(1). pp. 87-97. (1990)

Wibawa H, Noviana D, Tsuchiya K, Satruja F and Horii Y. Resistance of cotton rats, *Sigmodon hispidus*, to primary infection by *Nippostrongylus brasiliensis*. *J Vet Med Sci*. 64(5). pp. 423-6. (2002)

Willems F, Marchant A, Delville JP, Gerard C, Delvaux A, Velu T, de Boer M and Goldman M. Interleukin-10 inhibits B7 and intercellular adhesion molecule-1 expression on human monocytes. *Eur J Immunol.* 24(4). pp. 1007-9. (1994)

Wood KJ and Sakaguchi S. Regulatory T cells in transplantation tolerance. *Nat Rev Immunol.* 3(3). pp. 199-210. (2003)

Woollett GR, Barclay AN, Puklavec M and Williams AF. Molecular and antigenic heterogeneity of the rat leukocyte-common antigen from thymocytes and T and B lymphocytes. *Eur J Immunol.* 15(2). pp. :168-73. (1985)

Yamada H, Martin PJ, Bean MA, Braun MP, Beatty PG, Sadamoto K and Hansen JA. Monoclonal antibody 9.3 and anti-CD11 antibodies define reciprocal subsets of lymphocytes. *Eur J Immunol.* 15(12). pp. 1164-8. (1985)

Yee C, Thompson JA, Byrd D, Riddell SR, Roche P, Celis E and Greenberg PD. Adoptive T cell therapy using antigen-specific CD8+ T cell clones for the treatment of patients with metastatic melanoma: in vivo persistence, migration, and antitumor effect of transferred T cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 99(25). pp. 16168-73. (2002)

Yokochi T, Holly RD and Clark EA. B lymphoblast antigen (BB-1) expressed on Epstein-Barr virus-activated B cell blasts, B lymphoblastoid cell lines, and Burkitt's lymphomas. *J Immunol.* 128(2). pp. 823-7. (1982)

Yoshimoto T and Paul WE : CD4pos, NK1.1pos T cells promptly produce interleukin 4 in response to *on vivo* challenge with anti-CD3. *J. Exp. Med.* 179(4). pp. 1285-95 (1994)

Yoshinaga SK, Whoriskey JS, Khare SD, Sarmiento U, Guo J, Horan T, Shih G, Zhang M, Coccia MA, Kohno T, Tafuri-Bladt A, Brankow D, Campbell P, Chang D, Chiu L, Dai T, Duncan G, Elliott GS, Hui A, McCabe SM, Scully S, Shahinian A, Shaklee CL, Van G, Mak TW, et al. T-cell co-stimulation through B7RP-1 and ICOS. *Nature.* 402(6763). pp. 827-32. (1999)

Yung RL, Ray D, Mo RR and Chen J. T Cell Integrin Overexpression as a Model of Murine Autoimmunity. *Biol Proced Online.*5. pp. 211-221. (2003)

Zhang Y, Apilado R, Coleman J, Ben-Sasson S, Tsang S, Hu-Li J, Paul WE and Huang H. Interferon gamma stabilizes the T helper cell type 1 phenotype. *J Exp Med.* 194(2). pp. 165-72. (2001)

Zheng W and Flavell RA: The transcriptionfactor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cyticine gene expression in CD4 T cells. *Cell* 89. pp. 587-596 (1997)

## 8. Abkürzungsverzeichnis

Ag	Antigen
Alaun	Aluminium-Kalium-Sulfat
APZ	Antigen präsentierende Zelle
ATXBM	adulte, thymectomized, irradiated and bone marrow reconstituted
BSA	bovine serum albumin
BSS	balanced salt solution
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CD	cluster of determination
CFSE	carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester
CFU	clone forming unit
ConA	Concanavalin A
cpm	counts per minute
DZ	Dendritische Zellen
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
FCS	foetal calf serum
FITC	fluoresceinisothiocyanate
FL	Fluoreszenz
FSC	forward scatter
GM-CSF	granulocyte-macrophage colony stimulation factor
h	Stunde
HE	Hämalaun-Eosin
HKL	heat-killed listeria
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
II	Interleukin
im	intramuskulär
ip	intraperitoneal
iv	intravenös
KLH	keyhole limpet hemocyanin
KM	Knochenmark

L3	infektiöses Larvenstadium von <i>Nippostrongylus brasiliensis</i>
LEW	Lewis-Ratte
Lk	Lymphknoten
Lm	<i>Listeria monocytogenes</i>
mAb	monoclonal antibody
MACS	magnetic-activated cell sorter
mAk	monoklonaler Antikörper
min	Minute/Minuten
mind.	mindestens
Mio	Millionen
Nb	<i>Nippostrongylus brasiliensis</i>
NES	<i>Nippostrongylus</i> exkretorisches-sekretores Protein
NMIg	normal mouse immunoglobulins
OD	optische Dichte
OT	Objektträger
p60	Protein 60 von <i>Listeria monocytogenes</i>
PAS	perjod acid Schiff's reaction
PBL	periphere Blutleukozyten
PE	phycoerythrin
pNPP	4-Nitrophenylphosphat
RT	Raumtemperatur
sc	subkutan
sec	Sekunde
SSC	side scatter
TGF	T cell growth factor
Th	T Helferzellen
Treg	regulatorische T Zellen
TZR	T-Zell-Rezeptor
U/min	Umdrehungen pro Minute

## 9. Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1: Th1-Differenzierung
- Abbildung 2: Th2-Differenzierung
- Abbildung 3: Infektionszyklus von *Listeria monocytogenes*
- Abbildung 4: Lebenszyklus von *Nippostrongylus brasiliensis*
- Abbildung 5: Entwicklung der beiden Treg-Gruppen
- Abbildung 6: Vergleich der mitogenen Aktivität zwischen konventionellem und superagonistischem anti-CD28 mAk *in vitro*
- Abbildung 7: Vergleich der mitogenen Aktivität zwischen konventionellem und superagonistischem anti-CD28 mAk *in vivo*
- Abbildung 8: Vergleich der Wirkung von superagonistischem, CD28-spezifischem mAk auf CD4<sup>+</sup> T Zellen und CD8<sup>+</sup> T Zellen
- Abbildung 9: T-Zell-Expansion in ATXBM-Ratten nach Behandlung mit superagonistischem anti-CD28 mAk
- Abbildung 10: Repopulation der B Zellen,  $\gamma\delta$  T Zellen, Granulozyten und Monozyten in ATXBM-Ratten nach erfolgter Rekonstitution und CD28-Superagonist Behandlung
- Abbildung 11: Langzeit-Repopulation der verschiedenen T-Zell-Kompartimente T-lymphopenischer Ratten 47 Tage nach Gabe von superagonistischem, CD28-spezifischem mAk
- Abbildung 12: Abstoßung eines Hauttransplantates durch ATXBM PVG Ratten, mit 5 Millionen T Zellen rekonstituiert und mit superagonistischem CD28-mAk bzw. Isotypkontrolle behandelt
- Abbildung 13: Modifiziertes Modell für die Rekonstitution von ATXBM Ratten mit syngenen KM und allotyp-markierten T Zellen
- Abbildung 14: Recall-Antwort T-lymphopenischer Ratten behandelt mit superagonistischem antiCD28- mAk bzw. Isotypkontrolle
- Abbildung 15: Produktion KLH-spezifischer Antikörper in T-lymphopenischen Ratten behandelt mit superagonistischem anti-CD28 mAk bzw. Isotypkontrolle
- Abbildung 16: Antikörper der verschiedenen Immunglobulinklassen im Blut von KLH-immunisierten ATXBM PVG Ratten rekonstituiert mit einer kleinen T-Zell-Zahl und behandelt mit superagonistischem anti-CD28-spezifischem mAk bzw. Isotypkontrolle
- Abbildung 17: Concanavalin A induzierte Zytokinproduktion durch Lymphknotenzellen aus T-Zell-rekonstituierten ATXBM-PVG-Ratten behandelt mit superagonistischem, CD28-spezifischem mAk



Abbildung18: Zytokinproduktion von Lymphknoten- und Milzzellen aus T-Zell-rekonstituierten ATXBM PVG Ratten behandelt mit superagonistischem, CD28-spezifischem mAk und immunisiert mit KLH

Abbildung19: Regulatorische T Zellen in den Lymphknoten T-Zell-rekonstituierter ATXBM PVG Ratten behandelt mit superagonistischem, CD28-spezifischem mAk

Abbildung20: Beispiel von zwei Verlaufskurven des Eiausstosses der Infektion von PVG Ratten mit *Nippostrongylus brasiliensis*

Abbildung21: Proliferationsantwort auf NES nach Restimulation *in vitro*

Abbildung22: Zytokinproduktion nach Restimulation von Lymphknoten- und Milzzellen nach einer Infektion mit *Nippostrongylus brasiliensis*

Abbildung23: IgE im Serum nach einer Infektion mit *Nippostrongylus brasiliensis*

Abbildung24: Lungenhistologie 8Tage nach Infektion mit *Nippostrongylus brasiliensis*

Abbildung25: Erregerzahlen in der Leber nach einer Infektion mit *Listeria monocytogenes*

Abbildung26: Proliferationsantwort auf p60 und HKL nach Restimulation *in vitro*

Abbildung27: Zytokinproduktion nach Restimulation von Lymphknoten- und Milzzellen nach einer Infektion mit *Listeria monocytogenes*

Abbildung28: Granulome in der Leber *Listeria monocytogenes*-infizierter Ratten

Tabelle 1: Versuchsansätze zur Infektion mit *Nippostrongylus brasiliensis*

# LEBENS LAUF

## Persönliche Daten

Name	Karin Sabine Elflein geborene Funkhänel
Anschrift	Oelspielstraße 32 97286 Sommerhausen Tel.: 09333/902356 e-mail: karelf@web.de
Geburtsort	Schlema/ Erzgebirge
Geburtstag	17.08.1971
Familienstand	verheiratet
Kinder	eine Tochter

## Schul Ausbildung

09.78 - 08.86	Polytechnische Oberschule Aue/ Erzgebirge
09.86 - 08.90	Erweiterte Oberschule in Schneeberg/ Erzgebirge Besuch einer Spezialklasse für Englisch und Französisch

## Studium

09.90 - 08.92	Grundstudium in Physik an der Universität in Jena
09.92 - 08.94	Grundstudium in Biologie an der Universität in Jena
09.94 - 02.98	Hauptstudium in Biologie an der Universität in Jena (Schwerpunkte: Neurobiologie und Immunbiologie)

06.97 - 02.98      Diplomarbeit am Institut für Allgemeine Zoologie in Jena  
(Schwerpunkt: Das Nervensystem der Schlammschnecke  
*Lymnea stagnalis*; Note: 1,0)

---

**Beruflicher Wertegang/ Promotion**

---

03.98 - 07.98      Praktikumsassistentin am Institut für Allgemeine Zoologie

08.98 - 01.00      Wissenschaftliche Mitarbeiterin in der wissenschaftlichen  
Nachwuchsgruppe um Frau Dr. A. Wizenmann im  
Biozentrum der Universität Würzburg

ab 02.00            Promotion unter der Betreuung von Prof. Dr. T. Hünig am  
Institut für Immunbiologie und Virologie der Universität  
Würzburg  
(Schwerpunkt: T-Zell-Immunbiologie)

---

**Publikationen**

---

Elflein K, Rodríguez-Palmero M, Kerkau T and Hünig T. Rapid recovery from  
T lymphopenia by CD28 superagonist therapy. *Blood*. 2003;**102**(5). pp. 1764-  
70.

Schmidt J, Elflein K, Stienekemeier M, Rodríguez-Palmero M, Schneider C,  
Toyka KV, Gold R and Hünig T. Treatment and prevention of experimental  
autoimmune neuritis with superagonistic CD28-specific monoclonal antibo-  
dies. *J Neuroimmunol*. 2003;**140**(1-2). pp. 143-52.

Würzburg, den 27. Mai 2004

---

Karin Elflein